

**L'utilisation de naissain d'écloserie, en particulier triploïde,  
en ostréiculture : analyse des conséquences sanitaires,  
environnementales, génétiques et zootechniques**

***Rapport au Directeur de Cabinet  
du Ministre de l'Agriculture et de la Pêche***

**Bernard Chevassus-au-Louis**

*Inspecteur général de l'agriculture, coordonnateur*

**Gilles Boeuf**

*Professeur à l'Université Paris 6, Président du MNHN*

**François Bonhomme**

*Directeur de recherches au CNRS*

**Michel Mathieu**

*Professeur à l'Université de Caen*

**15 mai 2009**



## Résumé

Au cours de l'été 2008, d'importantes mortalités d'huîtres, en particulier de juvéniles, ont été observées dans la quasi-totalité des zones conchylicoles françaises. La question du rôle du naissain d'écloserie – dont l'usage s'est beaucoup développé depuis une dizaine d'années – dans ces mortalités a donc été soulevée, ainsi que celle de l'utilisation de triploïdes ( $3n$ ) stériles, qui constituent la majorité de la production des écloséries.

**Ce rapport examine dans une première partie les causes possibles de ces mortalités.** Il montre en particulier que les fluctuations de mortalité observées depuis 1993 peuvent être reliées aux conditions climatiques hivernales et printanières qui ont précédé : un hiver doux et un printemps pluvieux (anomalie NAO+) se traduiront par de fortes mortalités au cours de l'été qui suivra. Il semblerait en outre qu'une telle anomalie climatique conduite à des captages plus tardifs et à un naissain de moindre qualité, qui présenterait une plus grande fragilité au cours de l'année  $n+1$ .

Si ces relations statistiques au climat permettent de rendre compte des mortalités 2008 et de la surmortalité des juvéniles, les mécanismes responsables de ces relations (qualité du plancton, apports de polluants, plus grande abondance des pathogènes) restent à préciser. En particulier, on ne peut ni écarter ni prouver qu'il y ait eu en 2008 apparition de souches virales plus virulentes que les années précédentes. De même, on ne dispose pas de données permettant de définir les effets éventuels des pratiques d'élevage sur l'ampleur de ces mortalités.

Les différences éventuelles de survie entre les naissains issus de captage naturel et ceux produits en écloserie n'ont été étudiée de manière précise que dans une expérimentation réalisée dans le bassin de Thau, qui conclut à des mortalités plus tardives mais finalement similaires pour le naissain d'écloserie. En outre, contrairement à des observations antérieures qui concluaient à une meilleure survie des triploïdes, aucune différence n'a été observée dans cette expérience entre les naissains d'écloserie diploïdes ( $2n$ ) et triploïdes ( $3n$ ).

**La seconde partie du rapport examine les données disponibles sur la fertilité des triploïdes** et l'effet éventuel sur ce phénomène du mode de production de ces triploïdes, en distinguant ceux produits directement par traitement chimique (type 1) et ceux produits par croisement entre des diploïdes et des tétraploïdes ( $4n$ ).

Il apparaît qu'une croissance plus ou moins importante de la gonade peut-être observée dans une proportion notable de  $3n$ , avec une production d'ovules ou de spermatozoïdes représentant de 2 à 20% de celle des diploïdes. Ces gamètes peuvent être prélevés et se révèlent viables, mais la réalité de leur émission spontanée dans les bassins conchylicoles n'est pas clairement établie.

Les descendants obtenus dans des croisements  $2n \times 3n$  ou  $3n \times 3n$  présentent un nombre de chromosomes pouvant aller de  $2n$  à  $3n$  (avec un mode à  $2,5n$ ) et sont pour la plupart inviables. Les seuls survivants (moins de 1%) sont quelques diploïdes ou hyperdiploïdes ( $2n+1$ ,  $2n+2$ ), quelques triploïdes ou hypotriploïdes ( $3n-1$ ,  $3n-2$ ) et, très rarement, des tétraploïdes.

Enfin, les observations disponibles ne permettent pas d'étayer l'hypothèse d'une plus forte fertilité des  $3n$  de type 2 par rapport à ceux de type 1.

Sur la base de ces observations, le rapport conclut :

- que l'hypothèse d'une prolifération spontanée de  $3n$  ou de  $4n$  dans les bassins conchylicoles ne peut être défendue ;
- que la production éventuelle d'individus hyperdiploïdes restera un phénomène quasi-indétectable et non susceptible de se développer ;
- que l'émission spontanée de spermatozoïdes par les  $3n$  est un phénomène à confirmer ou à infirmer mais qui n'aurait en tout état de cause que des conséquences marginales sur la production naturelle de naissain.

**Cette seconde partie examine également les résultats des opérations de biovigilance** conduites depuis 2001 sur le naissain de captage. Ces observations ont confirmé l'absence d'individus  $3n$  ou  $4n$  mais on montré par contre la présence d'une proportion parfois notable d'individus de type  $2n$  présentant une quantité d'ADN réduite dans leurs cellules branchiales (tissu utilisé pour mesurer le niveau de ploïdie). Ce phénomène serait à relier à la perte de chromosomes observée parfois chez les mollusques dans le tissu branchial, ces individus hypodiploïdes présentant en outre une croissance réduite. L'ampleur et l'origine de ce phénomène seraient donc à préciser, l'hypothèse d'un effet de substances polluantes étant proposée et méritant d'être considérée avec attention.

**La troisième partie présente les données disponibles sur l'écophysiologie des  $3n$ .** La supériorité de croissance des  $3n$  sur les  $2n$  est confirmée mais l'accent est mis surtout sur la supériorité, en termes de croissance et de survie, des triploïdes de type 2 (issus de croisement) par rapport à ceux de type 1 (directs).

Les conclusions invitent en particulier à :

- **préciser les causes des mortalités** par des études épidémiologiques plus fines, en particulier sur les sites épargnés par les mortalités ;
- **mieux caractériser le phénomène de présence d'aneuploïdes dans le naissain de captage** et son origine ;
- **réfléchir à la manière de réduire la forte vulnérabilité des bassins conchylicoles** à la dissémination de nouveaux agents pathogènes susceptibles d'apparaître à l'avenir ;
- **mettre en place un dispositif de certification des naissains**, aussi bien de captage que d'écloserie et réaliser des essais comparatifs et multilocaux des différents types de triploïdes.

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Le contexte et les travaux antérieurs .....</b>	<b>5</b>
<b>2. La saisine .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Organisation du rapport.....</b>	<b>6</b>
<b>4. Remarques préalables .....</b>	<b>7</b>
<b>I. ANALYSE DES MORTALITES 2008 .....</b>	<b>9</b>
<b>I.1. Cadrage de l'analyse.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Les effets de l'environnement .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. Les bioagresseurs et le « pathosystème ».....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. L'hôte et sa variabilité .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Les pratiques d'élevage.....</b>	<b>15</b>
<b>II. LA REPRODUCTION DES TRIPLOÏDES ET SES CONSEQUENCES.....</b>	<b>17</b>
<b>II.1. Rappel sur les méthodes de production des triploïdes.....</b>	<b>17</b>
<b>II.2. Les données nouvelles sur la reproduction des 3n.....</b>	<b>18</b>
<b>II.3. Les résultats de la biovigilance.....</b>	<b>19</b>
<b>II.4. Conséquences possibles et conclusions.....</b>	<b>21</b>
<b>III. L'ELEVAGE DES 3N .....</b>	<b>29</b>
<b>III.1. Les données disponibles sur l'écophysiologie des 3n .....</b>	<b>29</b>
<b>III.2. Conclusion .....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONS GENERALES ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE CITEE .....</b>	<b>33</b>
<b>ANNEXE I : LETTRE DE SAISINE .....</b>	<b>35</b>
<b>ANNEXE II : RAPPORT AU COMITE SCIENTIFIQUE DU MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE PRESENTE A LA SEANCE DU 24 NOVEMBRE 1998 .....</b>	<b>39</b>
<b>ANNEXE III : SIMULATION DE L'EVOLUTION DE POPULATIONS CONTENANT DES HYPERDIPLÔÏDES .....</b>	<b>51</b>



## **Introduction**

### **1. Le contexte et les travaux antérieurs**

Au cours de l'été 2008, d'importantes mortalités ont été observées dans la plupart des bassins ostréicoles français. Ces mortalités ont touché principalement, mais pas uniquement, les jeunes huîtres. Suite à ces phénomènes, la question a été soulevée du rôle qu'aurait pu jouer le naissain issu des écloseries, dont l'utilisation s'est développée depuis les années 2000 et est aujourd'hui largement répandue : l'Ifremer évalue à 30% en moyenne la proportion de ces naissains dans les élevages.

Ce naissain d'écloserie est pour l'essentiel constitué de triploïdes, individus à maturation réduite produits par diverses méthodes de cytogénétique. En effet, les ostréiculteurs continuent à recourir au naissain de captage pour obtenir des individus diploïdes et la demande vis-à-vis des écloseries est donc faible<sup>1</sup>. La question de l'impact, notamment environnemental, de ces naissains triploïdes pouvait donc être posée, suite notamment à diverses observations montrant que leur stérilité n'était que partielle. Cette question avait d'ailleurs fait l'objet d'un premier rapport présenté par B. Chevassus-au-Louis en novembre 1998 au Conseil scientifique du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, puis en mars 1999 au Comité national de la conchyliculture. Ce rapport concluait au caractère *a priori* très limité des risques environnementaux mais avait néanmoins préconisé la mise en place d'une biovigilance visant à détecter la présence éventuelle de polyploïdes dans les naissains de captage.

Cette recommandation avait été appliquée et différentes campagnes ont été réalisées en 2001, 2003, 2005, 2006, 2007 et 2008 (Benabdelmouna *et al.*, 2008). De plus, une convention avait été établie entre les différentes parties prenantes (l'Ifremer, le MAP et le Syndicat professionnel des écloseries) pour rendre obligatoire la déclaration de tout échappement accidentel d'huîtres tétraploïdes et maintenir en circuit contrôlé le stock d'huîtres tétraploïdes à l'écloserie Ifremer de La Tremblade, l'Ifremer ne diffusant à partir de ce stock que des mâles dont la tétraploïdie a été contrôlée et destinés uniquement au croisement avec des diploïdes pour la production de triploïdes par les écloseries commerciales..

Un autre avis relatif aux triploïdes est celui rendu par le COMEPRA (Comité d'Ethique et de Précaution) de l'Ifremer en septembre 2004 relatif à « *l'utilisation des biotechnologies, prises au sens le plus large, par la conchyliculture* ». S'appuyant sur les conclusions du rapport Chevassus-au-Louis, l'avis soulignait la nécessité d'assurer un contrôle drastique des huîtres tétraploïdes et de préciser la fertilité éventuelle des triploïdes. L'avis insistait en outre sur l'importance des évolutions induites chez les professionnels par l'utilisation des triploïdes et sur la nécessité de « *la mise en œuvre d'un suivi technique, de manière qu'un contrôle efficace et rigoureux puisse être réalisé à chaque rouage de la filière qui mène des chercheurs aux professionnels* ».

En ce qui concerne les mortalités estivales, d'autres épisodes de mortalités plus ou moins massives avaient été observés par le passé et avaient donné lieu à un important

---

<sup>1</sup> Selon l'Ifremer, 10% du naissain d'écloserie serait diploïde, ce qui signifie qu'environ 95% du naissain diploïde élevé est issu de captage.

programme de recherche animé par l'Ifremer, le programme MOREST, dont les résultats ont été publiés à partir de 2004<sup>2</sup>.

## **2. La saisine**

Pour faire le point de ces différentes questions, le Directeur de Cabinet du Ministre de l'Agriculture et de la Pêche a saisi un collège de quatre experts biologistes (Gilles Boeuf, Professeur à l'Université Paris 6 et Président du Muséum national d'Histoire naturelle, François Bonhomme, Directeur de recherches au CNRS, Bernard Chevassus-au-Louis, Inspecteur général de l'agriculture et Michel Mathieu, Professeur à l'Université de Caen), dont l'animation a été confiée à Bernard Chevassus-au-Louis. La lettre de saisine du 3 avril 2009 (Annexe I) cerne ainsi le champ de l'expertise, qui devra :

- « *faire la synthèse de l'état des connaissances scientifiques actuelles, françaises et étrangères, sur le naissain d'écloserie, en particulier, mais pas uniquement triploïde, et s'intéressera notamment à ses conditions de production et de contrôle, à la stabilité des souches, à leur résistance aux agressions extérieures, à la propagation d'épidémies éventuelles et à l'appauvrissement de la biodiversité du milieu marin* ».

- « *recenser et synthétiser les connaissances actuellement disponibles* » sur d'autres facteurs pouvant « *avoir un impact sur la résistance des huîtres d'élevage, les rendant ainsi plus vulnérables à des attaques d'agents pathogènes ou à l'apparition de toxines dans le milieu* ».

- « *comporter des pistes d'approfondissement, concernant notamment les pratiques des ostréiculteurs (type d'élevage, densité, transferts des lots d'huîtres entre bassins de production) afin d'identifier si elles constituent des facteurs aggravants des mortalités constatées, voire des facteurs de risque en eux-mêmes* ».

## **3. Organisation du rapport**

Pour répondre à cette demande, le collège d'experts a développé trois grandes analyses :

- dans une première partie, le rapport examine les données disponibles sur les mortalités 2008 et, en particulier, si les facteurs identifiés par le programme MOREST peuvent rendre compte de ces mortalités et si d'éventuelles différences ont pu être observées entre les naissains issus de captage naturel et ceux issus d'écloserie ;

- dans une seconde partie, la question de la fertilité des triploïdes et de ses conséquences est examinée, en particulier sous l'angle de ses impacts environnementaux ; les résultats des opérations de biovigilance et, en particulier, l'observation fréquente d'aneuploïdes dans les naissains de captage, sont présentés et discutés.

- la troisième partie présente les données publiées sur l'écophysiologie des triploïdes et sur les conséquences éventuelles du métabolisme particulier de ses animaux.

**Ce rapport s'appuie essentiellement sur des données ayant fait l'objet de rapports diffusés ou de publications scientifiques.** Dans le cas contraire, la mention « communication personnelle » indique qu'il s'agit d'informations orales recueillies par l'un des membres du collège d'experts. Pour faciliter la lecture, les développements à caractère technique sont en petits caractères et pourront être ignorés par les non-spécialistes.

---

<sup>2</sup> Voir notamment Samain *et al.*, 2004, Soletchnik *et al.*, 2005, Samain et McCombie, 2008.

#### **4. Remarques préalables**

**Le collège souligne d'emblée le caractère inadéquat d'un examen des données se focalisant uniquement sur la distinction entre naissain issu de captage naturel et naissain d'écloserie et voulant attribuer à chacun des propriétés spécifiques, voire affirmer globalement la supériorité de l'un ou de l'autre :** dans les deux cas des variations notables peuvent exister au sein de ces deux groupes, pouvant résulter, pour le captage naturel, du lieu ou de la période de captage et, pour les écloséries, de l'origine des reproducteurs et de la méthode utilisée pour produire les triploïdes. De plus, une comparaison rigoureuse entre la descendance de mêmes géniteurs, l'une captée dans le milieu naturel, l'autre obtenue en écloserie, est à l'évidence difficilement envisageable en pratique.

**Plus généralement, Il est opportun de rappeler qu'à l'heure actuelle il n'existe encore quasiment pas en France de souches différenciées de *C. gigas*,** si l'on entend par « souche » un pool génétiquement clos et indépendant d'autres pools analogues ou des populations naturelles. En effet, comme la majorité des espèces de bivalves, l'espèce fait partie des « recordmans » du polymorphisme génétique, et à ce titre le fardeau génétique potentiel constitué par la présence d'une très grande quantité de gènes délétères est énorme. Ceci occasionne une très grande sensibilité à la consanguinité, et donc nécessite d'avoir recours à une gestion contraignante d'un grand nombre de géniteurs indépendants si l'on veut fermer le cheptel et donc créer une « souche ». En pratique cela n'existe qu'à une échelle expérimentale réduite (cas des souches dites « R » et « S » dont il sera fait état plus bas) et les cycles d'élevage en écloserie restent donc essentiellement ouverts<sup>3</sup>.

Par ailleurs, étant donné la dispersion importante en phase larvaire et les fréquentes transferts d'individus à l'échelle de l'ensemble de la façade européenne, il est peu probable que se soient établies des différenciations génétiques pérennes depuis l'introduction de l'espèce sur nos côtes, différenciations qui justifieraient la distinction d'origines géographiques particulières. Quant à l'existence ailleurs dans le monde de sous-espèces ou de races locales génétiquement différenciées et qui seraient éventuellement mieux adaptées aux perspectives d'évolution de l'hydroclimat telle qu'on peut l'envisager dans un futur proche, cela reste encore du domaine de la conjecture, sans compter les énormes risques et difficultés de tous ordres liés à l'introduction volontaire de variétés exotiques. Les comparaisons de souches d'origines diverses ont d'ailleurs montré le potentiel des populations françaises (Soletchnik et al., 2002).

\*\*\*

\*

---

<sup>3</sup> Voir cependant Taris *et al.*, 2006.



## **I. Analyse des mortalités 2008**

### ***I.1. Cadrage de l'analyse***

Comme tous les organismes, l'huître *C.gigas* doit réaliser une juste répartition de ses ressources entre survie, croissance et reproduction. Ses ressources correspondent en quantité à l'énergie qu'elle acquiert par son alimentation, mais aussi en qualité à l'acquisition dans le milieu de certains éléments qu'elle ne peut synthétiser elle-même, comme par exemple certains acides gras poly-insaturés essentiels qui se trouvent en proportion variable selon la nature de la nourriture ingérée.

Au plan de la survie, ces ressources sont consommées pour le simple maintien de ses tissus, cellules ou protéines correspondant à son métabolisme de base, mais aussi par la lutte contre les microbes, pathogènes et autres bioagresseurs ainsi qu'à la détoxification des composés nocifs éventuellement présents dans le milieu. Quant à la croissance, hautement énergétivore, c'est une nécessité en phase juvénile, même dans les conditions d'élevage, pour l'accès à la ressource par filtration d'eau, ne serait-ce qu'à cause de la compétition avec la flore et la faune fixée sur la coquille et avec les autres individus proches. Et pour ce qui concerne la reproduction, l'espèce est « programmée » depuis des millions d'années pour maximiser ce paramètre par la sélection naturelle, les huîtres qui se seraient reproduites moins que les autres n'ayant pas laissé de descendants jusqu'à nos jours. On constate donc un énorme investissement dans la gonade en période favorable, ce qui demande encore une fois beaucoup d'énergie.

**L'animal se trouve donc à certains moments critiques de sa vie devant une « vanne 3-voies » qu'il doit actionner pour « choisir » entre ces trois objectifs**, d'une part en fonction de son passé récent (p.ex. en fonction des réserves qu'il a accumulées), ou bien de signaux présents dans le milieu (température, abondance de plancton, présence de pathogènes, période de l'année,...) qui pourraient le « renseigner » sur la probabilité d'évolution favorable des ressources à plus ou moins long terme. Quand toutes les conditions sont optimales (nourriture abondante, oxygène dissous abondant, milieu indemne d'agents infectieux ou xénobiotiques) l'animal va probablement pouvoir s'engager dans la croissance et la gamétogénèse sans compromettre sa survie. Mais si l'un des paramètres devient critique, il se peut qu'il soit trop tard pour faire « machine arrière » et que l'animal épuise rapidement le peu de réserves qu'il lui reste, soit parce qu'il doit faire face à un afflux de pathogènes, soit parce qu'il ne peut plus oxygéner correctement la masse de ses gamètes en formation.

Ceci a été clairement démontré dans le cadre du programme MOREST mené jusqu'en 2006 où les individus sélectionnés pour une plus faible survie aux mortalités estivales (lignées S) présentent, dans certaines conditions une gamétogénèse plus importante et donc ayant une biomasse gonadique importante qu'ils ne pouvaient plus maintenir en vie une fois passé le seuil critique de température, alors que ceux qui avaient eu un investissement plus modeste dans la reproduction survivaient nettement mieux.

Il a été aussi montré que certains facteurs environnementaux – comme par exemple la densité des animaux et/ou la proximité du substrat – pouvaient aggraver le phénomène, les animaux ayant probablement de ce fait à répondre à d'autres stress (chimiques ou infectieux) augmentant leur demande énergétique. Ici, il faut mentionner que le fait qu'un individu résistera ou non aux mortalités est bien quelque chose de prédéterminé dans une large mesure, car le caractère « résistant » ou « sensible » a pu être sélectionné dans les descendances de familles expérimentales testées dans des conditions standard. Cette caractéristique est héritable (Degrémont *et al.*, 2007), et perdure maintenant depuis 5

générations grâce au maintien de 12 familles expérimentales indépendantes (lignées dites R et S) fournissant du matériel pour l'étude des bases biologiques du phénomène de mortalité estivale (voir notamment Samain *et al.*, 2007).

Sans rentrer dans les détails de toutes les interactions multiples que l'on pressent, **on peut avec justesse garder l'image de l'huître comme celle d'un animal réalisant un compromis pour la réalisation de ses fonctions vitales, compromis dont l'issue favorable ou non pour sa survie est hautement dépendante de la combinaison et de la séquence temporelle de facteurs variés qui conditionnent sa survie** : réserves / ressources / température / pathogènes / état reproductif voire même stress de manipulation. En d'autres termes, certaines fois cela « marche » à l'échelle d'un bassin ou d'un site et les mortalités restent en deçà du seuil tolérable, alors que d'autres fois non.

Il faut noter d'ailleurs que la plupart des espèces sauvages subissent ce genre d'aléas, notamment celles qui vivent dans un milieu à fortes fluctuations et qui sont dites à « stratégie r », par opposition aux espèces très longévives dites à « stratégie K » qui limitent les risques en étalant leur effort de reproduction sur une longue période de temps, donc grâce à une bonne survie. Ainsi les huîtres, comme beaucoup d'autres espèces, n'ont pas été sélectionnées par la nature pour satisfaire aux exigences de la conchyliculture, mais pour optimiser leur reproduction parfois aux dépens de leur survie, en courant le risque que, certaines années, ni la reproduction ni la survie ne fonctionnent correctement.

## **1.2. Les effets de l'environnement**

Depuis son introduction, *Crassostrea gigas*, a connu plusieurs épisodes de mortalités qui sont rappelés ci-dessous<sup>4</sup>. Bien que ces épisodes n'aient pas toujours été quantifiés, on retient principalement :

- des premières observations de mortalités significatives sur Marennes et Arcachon dans les années 1976 ;
- un premier phénomène marqué de mortalités de 1980 à 1983 sur Arcachon justifiant une première étude. En 1983, un phénomène de mortalités est aussi à noter sur Marennes ;
- un épisode de forte intensité en 1988 à Marennes et de moyenne intensité en 1989 sur Arcachon ;
- une période de mortalité plus longue à partir de 1992 à Arcachon et en Bretagne, avec un paroxysme en 1994 et 1995 sur l'ensemble des écosystèmes conchylicoles, justifiant toute une série d'études ;
- les années 1998 à 2001 sont aussi marquées par des épisodes de mortalités, plus principalement en Normandie, justifiant le lancement du projet MOREST ;
- en 2007 (à Thau, en Baie de Bourgneuf et en Normandie) puis surtout en 2008 que la crise s'avère très forte et d'ampleur nationale, sur les juvéniles (naissain) mais aussi sur les adultes.

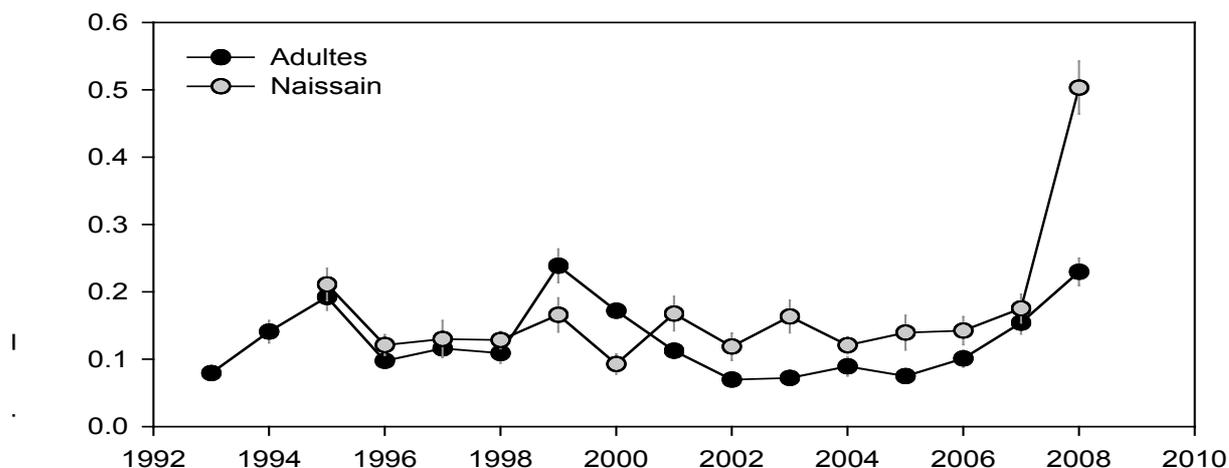
---

<sup>4</sup> L'essentiel des données présentées dans le présent paragraphe sont issues du document : « Climat et phénomènes de mortalités d'huîtres creuses : approche à partir d'indices météorologiques de grande échelle ». S. Pouvreau<sup>1</sup>, P. Soletchnik<sup>2</sup>, M. Ropert<sup>2</sup>, J. Mazurié<sup>2</sup>, D. Maurel<sup>2</sup>, F. Pernet<sup>2</sup>, E. Bédier<sup>2</sup>, C. Cassou<sup>3</sup>. *Document en préparation, avril 2009* (<sup>1</sup> Ifremer - Département 'Physiologie des Organismes Marins' BP 70 – 29280 Plouzané ; <sup>2</sup> Ifremer - Département 'Environnement côtier et Ressources' BP 70 – 29280 Plouzané ; <sup>3</sup> Cerfacs - Centre européen de recherche et de formation avancée en calcul scientifique (Cerfacs) 42, avenue Gaspard-Coriolis - 31057 Toulouse Cedex)

La figure 1 montre les courbes de mortalités des juvéniles et des adultes telles qu'elles ont été observées au cours des 15 dernières années. Dans le cartouche du dessous, les mortalités adultes sont figurées avec un indicateur très intégrateur des données climatiques, le nombre de jours passé en régime NAO+ (oscillation de l'Atlantique nord) durant l'hiver précédent.

Le régime NAO+ est caractérisé par un anticyclone des Açores très décalé vers l'ouest (souvent sur la Méditerranée occidentale plutôt que sur l'Atlantique) et une dépression islandaise assez creuse et principalement centrée sur les Iles Britanniques. Ce régime correspond à une pénétration plus importante des masses d'air océanique sur le continent européen, ce qui engendre des hivers doux et des printemps pluvieux sur l'Europe occidentale.

Figure 1 : Relation entre climatologie générale et mortalités estivales



**Il apparaît donc une très bonne corrélation entre les paramètres climatiques endurés par les huîtres au cours de l'hiver de l'année n-1 et les mortalités subies en années n.** Le coefficient de corrélation est de 0.67 entre mortalités adultes et occurrence de régime NAO+, ce qui peut être considéré comme très fort pour un phénomène biologique multi paramètres. D'après les données enregistrées par le réseau REMORA, les mortalités juvéniles sont bien corrélées également aux mortalités adultes (figure 1), bien que l'épisode 2008 montre une intensité en net décrochage pour ces premières.

**Dans l'état actuel des connaissances, le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les paramètres climatiques globaux (qui régissent pluviométrie, température hivernale, etc.) sont corrélés de manière aussi nette avec les mortalités estivales restent hypothétiques.** Plusieurs hypothèses non-exclusives sont mises en avant, telles que

conditions du recrutement du naissain en année n-1, qualité du phytoplancton ingérée, persistance microbiologique hivernale accrue, ruissellement de xénobiotiques augmentée par la pluviométrie. Il ne peut non plus être totalement exclu qu'un facteur supplémentaire explique l'intensité particulière des mortalités juvéniles constatées en 2008 (cf. § ci-dessous concernant les agents infectieux).

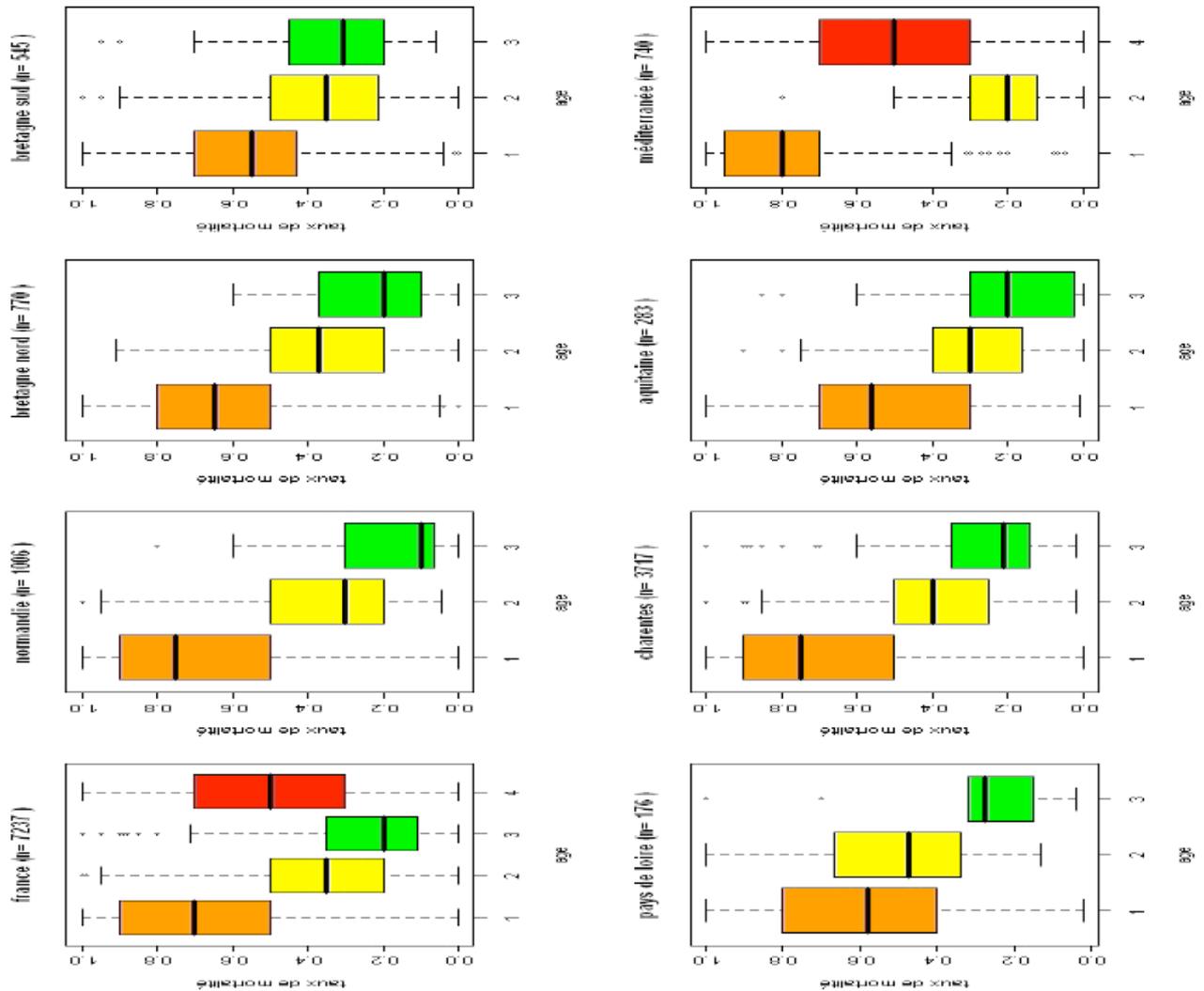
Parmi les hypothèses proposées, Benabdelmouna (2009) met en évidence une corrélation négative entre le régime NAO+ et la qualité du naissain capté la même année, cette qualité du naissain capté étant définie par les pourcentages de larves moyennes et grosses observés au cours des campagnes de pêches larvaires. Cette qualité du naissain serait elle-même un bon prédicteur de la survie au cours de l'année n+1. **Autrement dit, une anomalie NAO+ au cours d'une année n conduirait à une mauvaise survie du naissain au cours de l'année n+1.** Hors, la figure 1 montre que l'anomalie NAO+ de 2008, qui serait responsable de la forte mortalité générale de l'été 2008, a été précédée d'une anomalie NAO+ marquée en 2007, dont les effets auraient donc affecté spécifiquement le naissain en 2008, d'où l'écart observé entre les mortalités des adultes et du naissain. Cette hypothèse est encore à étayer mais nous la mentionnons car elle souligne également le rôle important du climat hivernal et printanier sur les mortalités estivales.

Par ailleurs, comme le montre la figure 2, **les phénomènes observés ont tendance, avec des variations dans le détail, à être corrélés sur l'ensemble des bassins ostréicoles français, cette tendance augmentant au fil des années** et étant particulièrement nette pour l'épisode 2008, peut-être à cause de son intensité.

Cependant, il est toujours possible de trouver dans chaque région des sites particuliers où il n'y a pas ou peu de mortalité, ce qui tendrait à confirmer que le modèle d'interactions multifactorielles qui semble se confirmer est le bon. Ainsi, bien que le forçage climatique soit une condition nécessaire des mortalités, les principaux facteurs explicatifs que nous venons de mentionner dans le paragraphe précédent agissent en synergie, et il reste possible que, dans certains sites, les niveaux atteints par chacun d'entre eux soient suffisamment bas pour que le phénomène ne se déclenche pas. **L'étude de ces sites reste une source de progrès pour l'amélioration des conditions d'élevage et/ou d'implantation dans l'avenir.**

Inversement, un autre corollaire de ce modèle multifactoriel est qu'il est parfaitement possible que ce ne soit pas le même facteur qui montre l'intensité maximum dans un site et dans un autre, ce qui engendrera des résultats apparemment contradictoires quand aux causes de mortalité, si on ne prête pas une très grande attention à analyser le phénomène dans sa globalité.

Figure 2 : Etude épidémiologique des mortalités de naissain et juvéniles d'huîtres creuses observées au cours de l'été 2008 en France<sup>5</sup> (1 : Naissain (< 12 mois) ; 2 : Juvéniles (>12 – 24 mois) ; 3 : Adultes (> 24 mois) ; 4 : Naissain collé (Thau).



### 1.3. Les bioagresseurs et le « pathosystème »

A chaque fois que des études précises ont été menées, il apparaît que des pathogènes (virus herpétique de l'huître et vibrions notamment) sont associés aux animaux en train de mourir, et que ceci puisse se transmettre d'une huître à l'autre dans certaines conditions de proximité. L'ensemble des résultats tend à indiquer que les pathogènes sont rarement la cause première des mortalités, mais qu'ils les favorisent et les amplifient : une huître aux limites de ses capacités énergétiques résistera moins bien à une charge forte en vibron que la même huître dans un environnement indemne de cette bactérie et, une fois un épisode de mortalité démarré, la charge en pathogène du site augmente, ce qui peut entraîner des mortalités en chaîne. Les raisons pour lesquelles ces charges en pathogènes

<sup>5</sup> Source : Présentation des premiers résultats issus du réseau REPAMO. Laurence Miossec, Gwenhael Allain, février 2009, comm. Pers. Ifremer – LGP, La Tremblade.

sont variables d'une année à l'autre et d'un site à l'autre sont elles aussi multiples, mais il est clair que le réservoir pathogénique est présent sur l'ensemble du littoral français. **Pour le moment, on ne peut ni écarter ni prouver qu'il y ait eu en 2008 et depuis l'apparition de souches plus virulentes que les années précédentes.**

#### 1.4. L'hôte et sa variabilité

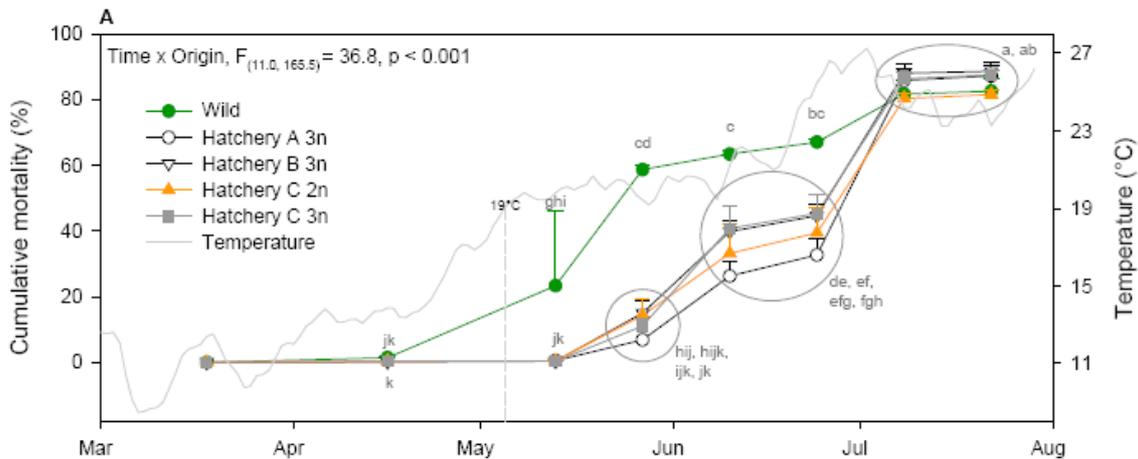
La figure 3 ci-dessous montre les courbes de mortalité caractéristiques de différents lots de juvéniles dans l'étang de Thau en 2008. Il apparaît que le témoin diploïde issu de captage naturel a manifesté une mortalité nettement plus précoce que celles des lots 2n et 3n en provenance de diverses écloseries.

Ceci illustre deux phénomènes qu'il convient de souligner :

- **Tous les lots de naissains ne sont pas égaux quant à leur probabilité de montrer ou non une forte mortalité.**

Ceci conforte les résultats obtenus avec les lignées R et S, ainsi qu'avec la présomption rapportée plus haut selon laquelle les *conditions* de recrutement du naissain en année n-1 peuvent influencer sur sa qualité. On peut imaginer par exemple que certaines années en certains sites, l'hydroclimat peut avoir été plutôt favorable au recrutement de naissain majoritairement de type S plutôt que R, puisqu'une forte héritabilité de ce caractère a été démontrée (Dégremont *et al.*, 2007).. Il se trouve que cela semble avoir été le cas cette année à Thau, où les lots d'écloserie se sont mieux comportés que le témoin issu du captage naturel, sans qu'il soit possible de généraliser cette observation (le contraire aurait probablement pu également se produire).

Figure 3 : Mortalités cumulées des juvéniles dans l'étang de Thau en 2008<sup>6</sup>



- **La nature diploïde ou triploïde du naissain n'a pas influé sur les survies juvéniles, le blocage de la gamétogénèse chez les 3n n'ayant pas été un facteur améliorant dans ce cas-là.**

Ce résultat contraste avec des données antérieures obtenues par le programme MOREST, qui avaient montré fréquemment une meilleure survie estivale des juvéniles de triploïdes (Tableau 1).

<sup>6</sup> d'après "Environmental anomalies, energetic weakness and fatty acid modifications in oysters coincide with an exceptional mortality event". Fabrice Pernet *et al.* en prep. Mars 2009 (Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources du Languedoc Roussillon, Bd. Jean Monnet, 34200 Sète, France)

Tableau 1 : Comparaison des mortalités estivales de naissain diploïde et triploïde (type 2) en rivière d'Auray (Bretagne Sud). D'après Samain et McCombie, 2008.

Année	2002	2003	2005
Mortalités 2n %	23,7	47,8	57,8
Mortalités 3n %	7,3	50,4	3,8

### 1.5. Les pratiques d'élevage

Diverses pratiques d'élevage sont susceptibles également d'influer sur les phénomènes de mortalité et ont été évoquées par le programme MOREST. On peut citer les manipulations (fréquence de manipulation des poches, criblages, transferts), les densités d'élevage, la proximité du sédiment (hauteur des tables) et, plus récemment, la mise en élevage de naissain à différentes périodes de l'année, pratique permise par les écloseries.

Le groupe d'experts ne disposait pas de données précises lui permettant de se prononcer (une enquête par questionnaire est en cours). Cependant, il apparaît que dans le cas de l'étang de Thau, les pratiques d'élevage n'ont pratiquement pas évolué et que de fortes mortalités ont néanmoins été observées.

\*\*\*

\*



## **II. La reproduction des triploïdes et ses conséquences**

### ***II.1. Rappel sur les méthodes de production des triploïdes***

Pour clarifier l'analyse des données bibliographiques, il est nécessaire de présenter les différents types de triploïdes existants, liés à leur méthode d'obtention. Il faut distinguer en effet :

- des triploïdes obtenus directement par traitement des œufs après fécondation par la cytochalasine B, méthode développée aux USA par SK Allen dans les années quatre-vingt (Allen, 1986). D'autres approches utilisant, comme chez les poissons, un traitement thermique, avaient été testées antérieurement (Quillet and Panelay, 1986) mais n'ont pas été développées à grande échelle. Nous désignerons ces triploïdes directs comme étant « de type 1 ».

Outre un éventuel effet délétère du traitement chimique sur leurs performances, ces triploïdes présentent une hétérozygotie plus réduite de leur génome, liée à l'existence de deux stocks chromosomiques maternels partiellement homologues, phénomène dont les conséquences propres sont difficiles à cerner. Indiquons que ce sont ces triploïdes qui sont produits à grande échelle chez les poissons d'aquaculture, en particulier les truites.

- des triploïdes obtenus par croisement entre des géniteurs diploïdes femelles et des géniteurs tétraploïdes mâles, que nous qualifierons de « triploïdes de type 2 ».

#### **Trois méthodes différentes existent pour produire ces tétraploïdes :**

- la plus ancienne a été proposée (et brevetée) par SK Allen (Guo et Allen, 1994a). Elle consiste à utiliser les quelques ovules produits par des femelles  $3n$  (voir plus loin) et à les féconder par des mâles diploïdes, puis à appliquer un traitement par la cytochalasine B.

Les descendants  $3n$  de ces tétraploïdes (que nous qualifierons de type 2A) sont a priori plus hétérozygotes que les triploïdes de type 1 et n'ont pas d'effet résiduel de traitement chimique. On pouvait donc en espérer obtenir ainsi de meilleures performances zootechniques. Par contre, le fait d'utiliser des triploïdes fertiles pour produire ces  $4n$  pouvait faire craindre une augmentation du taux de maturation dans leur descendance par rapport à des triploïdes de type 1.

**Ce sont ces tétraploïdes que l'Ifremer a commencé à diffuser en 2003 auprès des écloseries, les livraisons cumulées de 2003 à 2007 étant d'environ 500 individus mâles** (Ifremer, 2008).

- Outre la plus forte fertilité éventuelle des triploïdes produits, une critique apportée à ces tétraploïdes est le fait qu'ils résultent généralement d'un tout petit nombre de femelles triploïdes fondatrices et donc qu'ils vont produire des descendants triploïdes génétiquement assez similaires. Cette homogénéité génétique peut constituer un facteur de fragilité du naissain vis-à-vis de facteurs environnementaux ou d'agents pathogènes. C'est pourquoi l'Ifremer a mis au point une méthode, dite « Ronçoise », visant à élargir la base génétique de ses  $4n$ .

Ces tétraploïdes sont obtenus en croisant les tétraploïdes mâles avec des femelles diploïdes et en appliquant après la fécondation un traitement à la cytochalasine doublant le stock génétique femelle (McCombie *et al.*, 2005a).

Ces nouveaux  $4n$  présenteraient selon l'Ifremer une meilleure fertilité et une meilleure survie. Ils fourniront donc des triploïdes (dit de type 2B) génétiquement plus divers, mais qui conserveraient – au moins partiellement – l'aptitude éventuelle à une plus forte maturation sexuelle. **Ce sont ces nouveaux  $4n$  que l'Ifremer a commencé à livrer aux écloseries commerciales début 2008.** Ils ont donné lieu à la production des triploïdes élevés à partir de 2008 (à l'exception d'une écloserie qui a continué à fournir des triploïdes de type 1).

- Enfin, l'Ifremer, pour essayer de s'affranchir de l'éventuelle fertilité résiduelle des triploïdes, a entrepris de développer une méthode de tétraploïdisation directe à partir de géniteurs mâles et femelles diploïdes, en induisant par la cytochalasine la fusion cellulaire de plusieurs cellules issues de la méiose, méthode déjà testée chez les moules (Scarpa *et al.*, 2003 ; McCombie *et al.*, sous presse). Les triploïdes résultants (type 2C) ne sont pas encore diffusés mais une étude comparative des quatre types de triploïdes (1, 2A, 2B et 2C) est envisagée en 2009.

## **II.2. Les données nouvelles sur la reproduction des 3n**

Les premiers travaux portant sur la production d'huîtres triploïdes datent des années 80. Ces recherches, inspirées des résultats obtenus chez les poissons, visaient à obtenir des huîtres stériles pour permettre l'introduction de *Crassostrea gigas* sur la côte est des Etats-Unis sans risque de dissémination de cette espèce exotique, afin de soutenir la production ostréicole sévèrement touchée par les mortalités de *Crassostrea virginica*, l'espèce indigène. **Dès cette époque, il apparut que les *C.gigas* triploïdes obtenues n'étaient pas totalement stériles** et leur introduction sur la côte est ne fut pas autorisée. Néanmoins, ces travaux trouvèrent leur application sur la côte ouest des Etats-Unis où la production de *C.gigas* était déjà fondée sur la fourniture de naissain par des écloseries. Les performances de croissance des triploïdes et le fait qu'elles ne soient pas « laiteuses » en été favorisèrent le développement de cette filière puisque dans les années 90, plus de 30% du naissain produit par les écloseries américaines était triploïde.

La production de naissain triploïde en France date de 1994. Jusqu'à la fin des années 90, ces triploïdes furent produits par traitement à la cytochalasine B (triploïdes de type 1). Cette méthode présente trois inconvénients : i) elle implique l'utilisation de produits toxiques pour les utilisateurs, ii) elle entraîne un certain retard dans le développement du naissain, et iii) elle ne permet pas l'obtention de 100% de triploïdes, et induit une hétérogénéité dans les lots ainsi obtenus.

Une deuxième méthode a été proposée dès le milieu des années 90, et s'est largement imposée. Elle est fondée sur la production d'animaux tétraploïdes dont le croisement avec des diploïdes donnera quasiment 100% de larves triploïdes. Cette méthode (triploïdes de type 2A) a fait l'objet d'un dépôt de brevet. En France, les mâles tétraploïdes sont produits par l'Ifremer, qui les fournit aux écloseries. Celles-ci assurent avec leurs gamètes la fécondation d'huîtres femelles normales et obtiennent ainsi du naissain triploïde qui ne présente pas le retard de développement attribué au choc chimique.

Il est cependant apparu que certaines huîtres triploïdes n'étaient que peu ou pas inhibées dans leurs capacités de reproduction.

Si l'on écarte (i) les possibilités de mélanges de lots 2n et 3n au cours de la filière de production (ii) le fait que certains triploïdes sont encore produits par la méthode chimique, et donc associés à quelques pourcents de diploïdes, et enfin (iii) la possibilité que parmi les femelles utilisées par les écloseries quelques individus soient hermaphrodites (leurs spermatozoïdes génèrent des diploïdes), la production de gamètes par des huîtres triploïdes est un phénomène avéré.

Selon la littérature scientifique, la fécondité des triploïdes se situe en moyenne entre 2 et 20% de celle des diploïdes, mais certains triploïdes peuvent produire un nombre de gamètes équivalents à celui d'un diploïde. Si l'on se réfère aux rares publications traitant de ce problème, les triploïdes obtenus à partir des femelles tétraploïdes (type 2A) produiraient plus de gamètes que les triploïdes de type 1. Chez les triploïdes, la ségrégation des chromosomes après fécondation est majoritairement aléatoire, et leurs gamètes présentent des ploïdies variées, bien que centrées autour de 1,5n. La possibilité que ces gamètes de triploïdes puissent être émis semble possible mais n'a pas été clairement avérée. Il est clair

cependant que ces gamètes présentent un caractère fécondant similaire à celui des diploïdes.

Par contre, les taux de survie des larves obtenues par croisement entre ces gamètes de triploïdes et des gamètes issus de diploïdes sont faibles, voire très faibles.

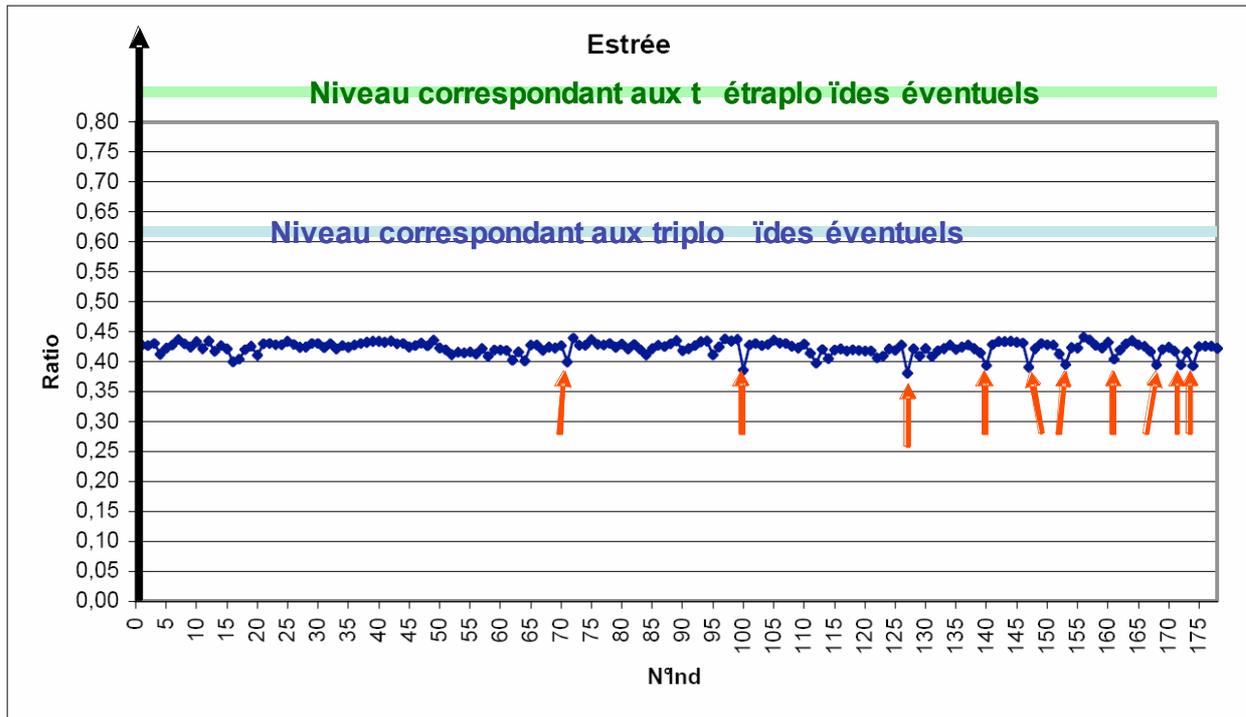
Ces taux de survie sont pour le naissain d'un mois de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ . Ils sont sensiblement plus élevés pour des croisement  $3n \times 2n$  (femelle  $3n \times$  mâle  $2n$ ) que pour les croisements  $2n \times 3n$ . Les mortalités sont considérables durant la première semaine de développement et touchent de façon différentielle les larves en fonction de leur ploïdie. Les croisements  $2n \times 3n$ , dont les taux de survie sont infimes, produisent très majoritairement des aneuploïdes. En revanche, les croisements  $3n \times 2n$  produisent davantage d'euploïdes, en majorité des  $2n$ , puis des  $3n$  et quelques  $4n$ .

Dans l'éventualité d'une émission de gamètes par des huîtres triploïdes en zone de captage naturel, les larves produites auraient soit 20 chromosomes ( $2n$ ) (pour environ 60% d'entre elles) soit 30 chromosomes ( $3n$ ) pour environ 30%, et 10% seraient aneuploïdes ( $2n+1$  et  $3n-1$  pour l'essentiel).

### II.3. Les résultats de la biovigilance

Les différentes campagnes de biovigilance réalisées depuis 2001 sur les bassins de captage d'Arcachon et de Marennes-Oléron ont utilisé la cytométrie de flux, méthode qui permet d'estimer la quantité d'ADN des noyaux en mesurant leur fluorescence, sans devoir examiner les chromosomes. Ceci permet d'étudier un grand nombre d'individus (plusieurs centaines à chaque campagne) et de détecter sans ambiguïté des individus  $3n$  et  $4n$  (figure 4). De plus, la précision de la méthode permet de détecter des individus ayant un seul chromosome en moins ou en excès (perte d'ADN d'environ 5%).

Figure 4 : exemple d'un résultat d'examen d'un échantillon d'individus par cytométrie de flux (Bassin de Marennes-Oléron, site d'Estrée en 2008). Les niveaux correspondant aux triploïdes et tétraploïdes éventuels sont indiqués. Les flèches indiquent les individus supposés aneuploïdes.

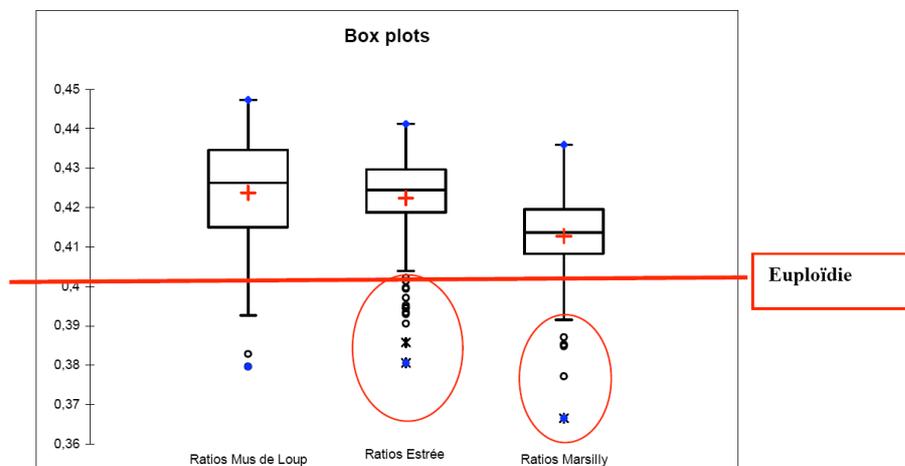


**Plusieurs milliers d'individus ont été analysés mais aucun individu 3n ou 4n n'a été détecté au cours de ces campagnes.** La détection de quelques 3n n'aurait d'ailleurs pas été choquante car on sait que des triploïdes spontanés peuvent être observés à faible fréquence dans des populations naturelles de nombreuses espèces animales.

**En revanche, un taux notable d'hypodiploïdes, avec des individus dont la cytométrie indique qu'ils pourraient avoir perdu jusqu'à 4 ou 5 chromosomes (sur les 20 que possèdent un diploïde), a été détecté dans plusieurs échantillons depuis 2005** (les campagnes antérieures ne donnent pas d'éléments sur ce phénomène). Les rapports ne proposent pas d'estimation quantitative de ce taux d'aneuploïdes, mais l'examen des graphes (figure 5) montre qu'il peut parfois dépasser largement 10% et l'on peut indiquer les tendances qualitatives suivantes<sup>7</sup> :

- en 2005, ce taux était particulièrement élevé à Arcachon ;
- en 2006, le taux était similaire dans les deux sites ;
- en 2007, c'est le bassin de Marennes-Oléron qui montre un taux significativement plus élevé. Au sein de ce bassin, les captages des sites d'Estrée et de Marsilly apparaissent particulièrement touchés. Ce sont les naissains du captage 2007 qui seront observés en 2008 et présenteront les importantes mortalités estivales.
- enfin, le rapport 2008 ne détecte plus de différences entre les deux bassins mais retrouve au sein de Marennes-Oléron une plus forte incidence de l'aneuploïdie à Estrée et Marsilly.

Figure 5 : exemple d'analyse statistique des échantillons montrant la présence d'individus ayant un niveau de fluorescence significativement inférieur au standard diploïde (biovigilance 2008)



**Indiquons qu'il s'agit d'aneuploïdie au niveau des cellules somatiques (cellules branchiales) et que l'on ne dispose pas de données sur les atteintes éventuelles à la lignée germinale, pouvant conduire à la transmission de ces anomalies.** S'il semble exister des différences notables entre familles, attestant d'une éventuelle variabilité génétique de ce phénomène, les études de transmission à la descendance, en croisant des individus de familles plus ou moins atteintes (Leitao *et al.*, 2001a ; McCombie *et al.*, 2005b ; Bouilly *et al.*, 2005) ne nous semblent pas vraiment concluantes.

En outre, la cytométrie de flux mesure un niveau moyen de ploïdie, alors que les observations caryologiques montrent que les pertes de chromosomes peuvent être variables d'une cellule à l'autre. En

<sup>7</sup> Les tests statistiques sont réalisés en comparant les fluorescences moyennes des échantillons et non les fréquences d'aneuploïdes.

particulier, Thiriôt-Quiéveux (1986) avait montré sur différents naissains d'origine française prélevés en 1984-1985 des taux de cellules branchiales aneuploïdes de l'ordre de 20%, mais avec un nombre de chromosome d'au moins 17 (alors que la cytométrie semble détecter des individus ayant perdu **en moyenne** jusqu'à 4 ou 5 chromosomes). Cette étude avait également montré, sur du naissain issu de Bouin, un taux de cellules aneuploïdes nettement plus élevé dans les « queues de lot » que dans les « têtes de lot » (26 versus 9%).

**Il serait donc très souhaitable d'examiner par caryologie les individus que la cytométrie considère comme aneuploïdes, afin de pouvoir relier les deux types d'observations et de voir si le taux d'aneuploïdie est effectivement supérieur à celui observé dans les années 85.**

Benabdelmouna *et al.* (2008), en s'appuyant sur de nombreuses références bibliographiques (voir bibliographie dans le texte) attribuent ces hypodiploïdes à l'influence de produits toxiques (herbicides, fongicides, métaux lourds) apportés par le lessivage des sols. Cette hypothèse nous semble à considérer avec attention et il serait intéressant de vérifier dans un premier temps si les variations interannuelles et interbassins du taux d'aneuploïdie peuvent se relier à des épisodes de pluviométrie plus ou moins intenses ayant favorisé l'apport de toxiques. Quoiqu'il en soit, le fait que ce taux élevé d'aneuploïdie puisse fragiliser le naissain est très vraisemblable.

Outre les observations de Thiriôt-Quiéveux (1986), Leitao *et al.* (2001 a et b) et Batista *et al.* (2007) observent effectivement une plus faible croissance des individus hypodiploïdes. Il peut s'agir d'un effet direct de la perte de chromosome ou d'un effet « marqueur » de l'effet des substances toxiques mais il n'est pas possible de discriminer ces deux hypothèses (il faudrait produire des aneuploïdes sans utiliser de substances toxiques pour le faire).

On ne dispose hélas pas de données similaires sur le naissain d'écloserie qui, en outre, est pour l'essentiel triploïde.

Benabdelmouna (communication personnelle) avance l'hypothèse d'une meilleure tolérance des triploïdes à des pertes de chromosomes, du fait qu'ils conservent dans ce cas deux exemplaires du chromosome incriminé et que d'éventuels gènes récessifs à effets délétères ne peuvent donc s'exprimer (alors que chez les diploïdes, il ne reste qu'un seul chromosome). La supériorité des triploïdes, et notamment leur mortalité plus tardive à Thau, ne serait donc pas liée uniquement à leur moindre investissement reproducteur mais aussi à ce phénomène. Cette hypothèse est intéressante et mérite d'être approfondie et testée mais nous avons vu que, dans les observations de Thau, les individus  $2n$  et  $3n$  issus d'écloserie présentaient des mortalités similaires, ce qui ne va pas dans le sens escompté.

#### **II.4. Conséquences possibles et conclusions**

Plusieurs conséquences possibles peuvent résulter de ces observations sur la fertilité partielle des  $3n$  :

- **la première est une diminution des performances zootechniques** (survie et croissance) par rapport à ce que l'on pouvait attendre d'individus totalement stériles. On peut considérer que les études d'élevage, que nous détaillerons en troisième partie, avaient intégré ce phénomène mais que les conditions particulières de 2008 ont pu révéler une fragilité non identifiée jusqu'alors. Cependant, nous avons vu que les seules données comparatives précises (Thau) ne révélaient aucune différence entre les naissains d'écloserie diploïdes et triploïdes. Comme nous l'avons indiqué, il apparaît néanmoins nécessaire, dans cette optique, de tester effectivement les différents types de triploïdes pour leurs performances de croissance et de survie.

- **la seconde est un développement non maîtrisé de populations  $3n$  et éventuellement  $4n$  dans les bassins d'élevage.** C'est la question qui avait été posée en 1998 et sur laquelle nous allons revenir à la lumière de ces nouvelles données.

- **la troisième est celle de l'effet de la présence d'individus aneuploïdes dans la descendance viable des triploïdes,** que nous allons également examiner.

#### II.4.1. Le risque d'envahissement par les 3n et 4n

##### a. Rappel des conclusions du rapport de 1998

L'étude réalisée par B. Chevassus-au-Louis en 1998 (annexe II) avait examiné la possibilité d'un développement incontrôlé de populations triploïdes ou tétraploïdes sous l'effet de deux phénomènes :

- l'échappement accidentel d'individus 4n issus des écloseries ;
- la production de gamètes par des individus triploïdes incomplètement stériles.

En ce qui concerne le premier point, **le rapport concluait qu'un échappement accidentel, même massif, était insuffisant pour aboutir à un éventuel développement d'une population de tétraploïdes** et qu'il fallait avoir des échappements chroniques (à chaque génération) et représentant une proportion notable de la population d'huîtres diploïdes (au moins quelques %) pour aboutir à un tel phénomène. De plus, ce développement ne pouvait se faire que progressivement et la mise en place d'une biovigilance apparaissait suffisante pour le détecter et mettre fin si nécessaire à l'utilisation de tétraploïdes par les écloseries.

En ce qui concerne la fertilité des triploïdes, **le rapport considérait que le principal facteur pouvant conduire à un envahissement était la production éventuelle par ces triploïdes de gamètes « non-réduits » (3n)**, qui pouvaient donner lieu, s'ils étaient fécondés par des gamètes issus de diploïdes, à la production « endogène » de tétraploïdes. Ce taux de production de gamètes non réduits devait être d'au moins 1 à 2% pour conduire à l'apparition d'un nombre conséquent d'individus 4n.

Outre cette production éventuelle de tétraploïdes, le rapport faisait l'hypothèse que la descendance viable d'individus triploïdes croisés avec des diploïdes devait être constituée pour l'essentiel de quelques individus 2n et 3n en nombre voisin, représentant au total un taux de survie relatif d'environ 0,2% par rapport à un témoin 2n x 2n.

Le rapport avait fait l'hypothèse de la formation systématique de trivalents (appariement des trois chromosomes homologues) lors de la méiose des 3n avec ensuite une ségrégation aléatoire de chaque trivalent, aboutissant à des gamètes ayant de 10 à 20 chromosomes, dans des proportions régies par un loi simple (binomiale). Selon ce modèle, la proportion de gamètes « équilibrés » (ayant exactement 10 ou 20 chromosomes) devait être d'environ 2 pour mille. En supposant l'inviabilité totale des aneuploïdes (nous reviendrons ultérieurement sur ce point) et une viabilité des 3n identique à celle des 2n, on aboutissait aux prévisions évoquées ci-dessus.

Enfin, le rapport montrait **qu'une population constituée entièrement d'individus triploïdes présentant une certaine fertilité n'était pas stable et devait, en l'absence d'introduction de nouveaux triploïdes, redonner assez rapidement une population diploïde**. L'éventualité de voir cette population « basculer » vers une population 4n supposait des conditions extrêmement peu probables (absence quasi-totale de 2n dans le bassin, fort taux de production de gamètes non-réduits).

**On pouvait en conclure que, au cas où il apparaîtrait nécessaire de mettre fin à la production de triploïdes, le simple fait d'arrêter l'introduction de nouveaux triploïdes permettrait de voir disparaître rapidement les triploïdes dans les bassins de production.**

##### b. Analyse des données nouvelles

**En ce qui concerne l'échappement éventuel de 4n, le nombre actuel de reproducteurs utilisés dans les écloseries (l'Ifremer en fournit quelques centaines par**

**an) fait que des échappements ne pourraient être qu'anecdotiques par rapport au stock de reproducteurs 2n présent dans les bassins de production, même en cas de malveillance ou de catastrophe naturelle.** La biovigilance mise en place n'a d'ailleurs détecté aucun individu 4n dans les deux bassins de captage étudiés jusqu'en 2008.

En ce qui concerne les triploïdes, la capacité de certains d'entre eux à produire des gamètes viables et fécondables a été confirmée par diverses études (voir II.1). Les données de Guo et Allen (1994b) sur des triploïdes de type 1, de Gong *et al.* (2004) et de Normand (2005)<sup>8</sup> sur des triploïdes de type 2A fournissent en particulier des données précieuses sur la nature de ces gamètes :

- pour les mâles 3n, croisés avec des femelles 2n, les seuls descendants viables observés sont diploïdes (avec quelques aneuploïdes) et les taux de survie relatifs (par rapport à un croisement 2n x 2n) de l'ensemble des descendants sont sensiblement plus faibles que celui envisagé par le modèle (0,003% et 0.03% dans les études, 0,2% dans le modèle). Cela signifie que la méiose mâle ne produit pas de gamètes non-réduits (phénomène également observé chez les poissons) et que le nombre de méiose produisant des gamètes équilibrés est sans doute plus faible que dans le modèle.

- pour les femelles 3n, on observe effectivement des descendants diploïdes et triploïdes en proportions similaires (67 2n et 41 3n sur l'ensemble des deux études, avec des taux de survie relatifs compatibles avec le modèle, voire supérieur (0,22% et 1,6% respectivement). Par contre, les tétraploïdes apparaissent extrêmement rares dans la descendance (4 observés chez Guo et Allen, soit environ 0,04% des larves à la fécondation ; aucun chez Gong *et al.*).

On peut en conclure que **ce phénomène de production de gamètes non-réduits, même s'il existe, est inférieur de plusieurs ordres de grandeur au seuil qui permettrait le développement d'une population endogène de 4n dans un bassin contenant une proportion même proche de 100% de 3n.**

### *c. Conclusions sur le risque d'envahissement*

**Sur la base des observations disponibles, les conclusions du rapport de 1998, selon lesquelles l'hypothèse de prolifération incontrôlable de 3n et 4n dans les bassins conchylicoles était peu plausible, sont confirmées et même renforcées.**

**Il convient cependant, compte tenu des incertitudes inhérentes à tout phénomène biologique, de maintenir le principe d'un suivi à pas de temps large (tous les deux ou trois ans) de la ploïdie des naissains.**

## **II.4.2. La question des aneuploïdes**

Comme indiqué précédemment, les individus triploïdes peuvent produire dans leur descendance un petit nombre d'aneuploïdes viables. **Nous insistons sur la nécessité de bien distinguer ce phénomène de celui précédemment évoqué des aneuploïdes observés par la biovigilance.**

En effet, les individus détectés par la biovigilance sont hypodiploïdes, c'est-à-dire ont perdu des chromosomes, alors que les descendants des triploïdes sont hyperdiploïdes, c'est-à-dire présentent des chromosomes excédentaires. En outre, les hypodiploïdes ne sont affectés que dans une partie de leurs cellules somatiques et la transmission de ces anomalies à leur descendance n'a pas été mise en évidence, alors que les individus hyperdiploïdes sont issus de gamètes déséquilibrés et sont vraisemblablement affectés dans l'ensemble de leurs cellules, y compris la lignée germinale, d'où la possibilité de transmettre cette anomalie.

Nous allons donc examiner les conséquences possibles de l'existence de ces hyperdiploïdes.

### *a. La viabilité des aneuploïdes*

<sup>8</sup> Le type de 3n utilisé n'est pas indiqué dans ce mémoire mais leur fourniture par l'Ifremer nous fait supposer qu'il s'agit de 3n de type 2A.

Le rapport de 1998 avait fait l'hypothèse d'une inviabilité totale des aneuploïdes. Les travaux précédemment cités montrent que, outre les individus  $2n$ ,  $3n$  et  $4n$ , la descendance des triploïdes peut comporter un certain nombre d'individus hyperdiploïdes ( $2n+1$ ,  $2n+2$ ,  $2n+3$ ) ou hypotriploïdes ( $3n-2$ ,  $3n-1$ ). On peut comparer les proportions observées par Gong *et al.* (2004) avec les proportions théoriques issues du modèle simple de ségrégation précédemment évoqué (tableau 2), dans l'hypothèse d'une égale viabilité de tous les génotypes<sup>9</sup>.

Tableau 2 : Nombres observés et attendus d'individus de différents niveaux de ploïdie dans la descendance de triploïdes. Les données sont exprimées en prenant la valeur de référence 100 pour les  $2n$

	$2n$	$2n+1$	$2n+2$	$2n+3$	$3n-2$	$3n-1$	$3n$
Théorique	100	1000	4500	12000	4500	1000	100
Observés (mâles)	100	200	250	66	33	16	0
Observés (femelles)	100	9	0	0	2	9	54

**Les proportions apparaissent très inférieures au modèle**, ce qui peut résulter de deux phénomènes non-exclusifs :

- une production plus forte de gamètes équilibrés que dans l'hypothèse d'une formation systématique de trivalents avec ségrégation aléatoire. Guo et Allen observent en particulier dans la méiose femelle la présence d'uni et de bivalents qui pourraient expliquer l'excédent de diploïdes par rapport aux aneuploïdes et aux triploïdes. Cependant, nous avons vu précédemment que le nombre absolu d'individus  $2n$  et  $3n$  était plutôt inférieur à celui prévu par le modèle. En outre, les courbes de distribution des chromosomes ou de la cytométrie de flux peu après la fécondation sont unimodales et centrées sur 25 chromosomes (=  $2,5n$ ), ce qui est conforme au modèle de formation de trivalents avec ségrégation aléatoire. Ce n'est qu'au fil du temps, et après d'importantes mortalités, qu'apparaît progressivement une distribution avec deux modes centrés sur  $2n$  et  $3n$ .

- une viabilité très inférieure des aneuploïdes. Ce phénomène est très classique chez les animaux, même si les mollusques présentent fréquemment, même dans les populations naturelles, des taux non négligeables d'aneuploïdes et les très fortes mortalités observées dans la descendance des individus triploïdes résultent certainement d'une inviabilité des aneuploïdes ayant plus de trois chromosomes excédentaires ou absents. On peut d'ailleurs observer dans le tableau 1 que l'écart aux valeurs théoriques est d'autant plus élevé que ce nombre de chromosomes excédentaires ou absents est élevé.

Outre la production d'aneuploïdes par les  $3n$ , deux autres sources possibles d'aneuploïdes sont à mentionner, liées :

- pour les triploïdes de type I à la présence possible de quelques individus non strictement  $3n$  parmi eux. Wang *et al.* (1999) en observent deux (un  $2n-1$  et un  $3n-1$ ) parmi 90 individus d'un lot  $3n$ , soit  $2,2\%$ <sup>10</sup>.

- à la nature des gamètes produits par les géniteurs  $4n$ . Wang *et al.* (*ibid.*) indiquent en effet qu'environ 20% (18/90) des produits du croisement de femelles  $2n$  par des mâles  $4n$  – censé ne produire que des  $3n$  – sont en fait des aneuploïdes ( $3n-2$ ,  $3n-1$  et  $3n+1$ ).

Il convient donc de s'interroger sur les conséquences de cette production d'aneuploïdes.

### b. Conséquences éventuelles

La possibilité d'une production, par les individus triploïdes ou tétraploïdes, d'hyperdiploïdes présentant des performances de survie et croissance restreintes posent trois questions distinctes :

<sup>9</sup> Guo et Allen (1994) n'observent pas d'aneuploïdes dans la descendance des  $3n$  mais, suite à un accident d'élevage, ils n'ont pu analyser les individus à 9 mois que par cytométrie de flux, méthode moins précise que la caryologie.

<sup>10</sup> Aucun aneuploïde n'est observé dans un lot témoin de 30 individus  $2n$  mais la différence n'est pas significative.

- 1. **Une diminution éventuelle des performances zootechniques des lots de triploïdes, liée à la présence d'hypo ou d'hypertriploïdes.** Ce point serait à documenter davantage, en particulier en comparant les différents types de tétraploïdes, mais a sans doute été pris en compte de fait dans les différents tests de comparaison de performance de lots  $2n$  et  $3n$ .

- 2. **L'introduction éventuelle dans les populations diploïdes d'un « fardeau génétique »<sup>11</sup>, liée à une augmentation progressive de la fréquence des aneuploïdes.**

Ce point concerne les hyperdiploïdes de type  $2n+1$  et  $2n+2$ , qui présentent une certaine viabilité et que l'on peut supposer fertiles. Les individus hypo ou hypertriploïdes ont en effet très vraisemblablement une reproduction similaire à celle des triploïdes et ne sont donc pas susceptibles de produire de nombreux descendants.

Nous avons examiné cette question en regardant si, dans l'hypothèse d'une assez bonne viabilité de ces hyperdiploïdes, ces individus étaient susceptibles de se maintenir, voir d'augmenter leur fréquence dans la descendance. L'annexe II présente les résultats de cette étude, qui montre **une disparition assez rapide de ces aneuploïdes dès lors que leur viabilité est inférieure à environ 50% de celle des diploïdes**, ce qui, comme nous l'avons vu, est très certainement le cas. Le tableau 3 donne à titre indicatif le taux résiduels d'aneuploïdes après 5 générations pour différentes valeurs de la viabilité.

Tableau 3 : taux d'aneuploïdes ( $2n+1$  et  $2n+2$ ) résiduels après 5 générations pour différentes valeurs de leur viabilité relative (on part d'un taux initial de 40% d'aneuploïdes).

Viabilité	100%	80%	60%	40%	20%
Taux résiduel %	37,5	19,2	9,4	0,9	0,2

Il apparaît donc que, même si une population de triploïdes produisait un certain nombre d'hyperdiploïdes, ceux-ci resteraient en nombre limité et ne perdureraient pas dans le milieu après arrêt de l'introduction de  $3n$ . Comme précédemment, la poursuite de la biovigilance apparaît une mesure suffisante pour s'assurer de l'absence de ce phénomène.

- 3. **Une augmentation éventuelle du fardeau « démographique », c'est-à-dire une fécondation d'ovules d'huîtres femelles  $2n$  par des mâles  $3n$ , conduisant à des larves inviabilés et donc par une diminution de la production de naissain** (le fait que les triploïdes femelles puissent émettre des œufs n'est par contre pas susceptible d'avoir de telles conséquences). Ceci pose donc la question de la capacité reproductive des mâles triploïdes dans le milieu naturel. En effet, les études de croisement ont été réalisées en écloserie, avec prélèvement des gamètes par dilacération de la gonade et les données sur la production de gamètes par les mâles sont assez qualitatives.

Guo et Allen (1994b) indiquent : *“Unfortunately, sperm production in triploid males was not determined in this study. Our observations seem to suggest that the relative fecundity (relative to diploids) of triploid males might be even lower than triploid females”* (c'est à dire inférieur à la valeur de 2% estimée pour les femelles dans cette étude). Dans une présentation en 2003 à la Chambre des représentants des USA, Allen reprend cette affirmation : *“More recent data showed that triploid males are about 1000 fold less fecund than diploid males ; triploid females about 20 times less fecund”*. Gong et al. (2004) ne mesurent pas non plus la fertilité des mâles mais indiquent seulement : *« since fecundity of triploid were limited, gametes from several triploids were combined for each cross »*. Ils utilisent en effet un mélange de 4 à 8 spermés de triploïdes au lieu d'un seul pour les diploïdes. En ce qui concerne les femelles  $3n$ , ils indiquent une fécondité relative de 13% de celle des femelles  $2n$  (1,1 versus 8,2 millions d'ovules). Seul Normand (2005) donne une estimation chiffrée de la fertilité des mâles : il indique que sur 26 huîtres  $3n$ , 12 (soit environ 50%) *« présentaient un degré de maturité suffisant pour procéder aux croisements »*. Parmi elles, 3 mâles ont produit en moyenne 4,5 milliards de spermatozoïdes

<sup>11</sup> Nous utilisons cette expression au sens large. Au sens strict, le fardeau génétique désigne la présence dans le génome de gènes récessifs à effets délétères.

chacun, contre 20 milliards pour les diploïdes, soit une fécondité relative de 22%, similaire à celle des femelles (21%). Ces chiffres sont compatibles avec les observations de Gong *et al.* mais notablement supérieurs à ceux avancés par Allen. On peut donc se demander, sans pouvoir trancher, si ces différences résultent d'une meilleure maîtrise de l'induction de la maturation ou du type de triploïdes étudié (type 1 pour Allen, 2 pour les autres).

En ce qui concerne le pouvoir fécondant des spermatozoïdes produits par les triploïdes, il apparaît assez similaire à celui des diploïdes.

Gong *et al.* obtiennent des taux de fécondation de l'ordre de 80%, ce qui attestent de la viabilité de ces spermatozoïdes. De même, Guo et Allen obtiennent un taux de fécondation de 58% pour le sperme de 3n contre 68% pour le sperme de 2n. Normand indique également une légère différence de 9% des taux de fécondation en faveur des 2n.

En ce qui concerne l'émission spontanée de gamètes dans le milieu naturel, on ne dispose pas d'observations directes mais Normand *et al.* (2008), pour des triploïdes de type 1, indiquent : « *Previous authors have reported spontaneous emissions of gametes by triploid oysters (Gouletquer et al., 1996 ; Shpigel et al, 1992 ; Allen and Downing, 1990) but this phenomenon remain poorly documented* ». Ils observent eux-mêmes chez les 3n une décroissance de 12% de l'indice de condition (CI = 1000 x poids sec de la chair/poids de la coquille) à l'automne (contre 44% chez les 2n) et concluent « *Our data also suggests that spawning can be observed in maturing triploids if the proportion of mature gametes is sufficient* ».

**Il est donc possible que les mâles 3n présentent dans le milieu naturel un potentiel reproducteur de l'ordre de quelques % de celui des diploïdes**, qui pourrait se traduire par un impact du même ordre sur la production de naissain. Même si les maturations sexuelles des 3n semblent décalées par rapport à celles des 2n (Allen et Downing, 1990 ; Normand *et al.*, 2008 ; Benabdelmouna, communication personnelle), la coexistence dans les bassins d'individus 2n et 3n<sup>12</sup> et la possibilité pour les deux sexes de libérer leurs gamètes dans le milieu, avec d'éventuels phénomènes de synchronisation de ces émissions, font qu'une petite partie des ovules émis par les 2n pourrait être fécondée par le sperme des 3n, ces croisements conduisant comme nous l'avons vu à une mortalité quasi-totale des descendants. **De ce fait, ce phénomène pourrait se traduire par une variation à la marge des captages de naissain mais n'aurait aucune conséquence sur la qualité du naissain capté.**

Il conviendrait cependant de préciser ces différents points par des observations plus directes. En effet, **si les triploïdes mâles fécondaient une proportion p de femelles 2n, le « signal visible » résultant de ce phénomène, c'est-à-dire la présence d'individus hyperdiploïdes ou hypotriploïdes serait difficile à détecter par la biovigilance**, même si p était de l'ordre de 1 à 2%.

En utilisant les résultats de Gong *et al.* (2004), on peut calculer que les fréquences de ces individus seraient respectivement de  $2p \times 10^{-4}$  et  $2p \times 10^{-5}$ , c'est-à-dire qu'aucun individu de ce type ne serait détecté dans un échantillon de 1000 individus (soit le nombre total d'individus examinés par la biovigilance), voir même dans un échantillon 10 fois plus grand.

### II.4.3. Effet du type de triploïdes

Comme nous l'avons indiqué, les données de Guo et Allen (1994b) et de Normand *et al.* (2008) portent sur des triploïdes directs (type 1) alors que celles de Gong *et al.* (2004) concernent des triploïdes de type 2A. De même, les observations faites en 2008 sur une éventuelle tendance exacerbée à la maturation des triploïdes en méditerranée (Ifremer, 2009) concerne des triploïdes de type 2 (A ou B ?). **Si l'hypothèse d'une plus forte fertilité**

<sup>12</sup> Même si les lots 3n sont élevés dans des poches distinctes, il peut exister un certain taux de 2n au sein de ces lots.

**éventuelle des triploïdes de type 2 peut être défendue sur un plan théorique, elle ne semble pas soutenue par les observations actuellement disponibles.**

En effet, les triploïdes étudiés par Normand *et al.* (Type I) présentent, comme nous l'avons vu, des signes de maturation notable et Guo et Allen indiquent, toujours pour des triploïdes de type I : « *seventy-seven triploid oysters were examined during this study, and gametes were observed in 60 (78%) of them. Nineteen of the (35) females that produced a large number of eggs were used for crosses* ». A l'inverse, Haure *et al.* (2003) indiquent que, dans une étude en milieu contrôlé, ils n'ont observé que 8% de gonades développées et aucune gonade « fluante » dans un lot de triploïde de type 2. Enfin, le bilan annuel des élevages 2008 (triploïdes de type 2 pour l'essentiel) indique (Ifremer, 2008) que « *des analyses de ploïdie réalisées sur des juvéniles issus de lots triploïdes touchés par la maladie ont montré que tous les individus qui présentent une maturation étaient en fait diploïdes alors que tout ceux qui n'étaient pas en maturation étaient bien triploïdes* ».

**De même, l'aptitude éventuelle des triploïdes de type 2 à produire plus d'ovocytes non réduits – du fait de leur origine<sup>13</sup> – n'est pas confirmée, les seuls descendants 4n étant observées au contraire chez les triploïdes de type 1.**

En ce qui concerne le taux de survie des 3n et leur sensibilité éventuelle aux facteurs environnementaux, il convient également de séparer les considérations théoriques et les observations : sur un plan théorique, l'hypothèse que les nouveaux triploïdes (de type 2B) produits en 2008 seraient génétiquement plus diversifiés et présenteraient globalement une meilleure résistance peut être défendue. Par contre, les observations réalisées en 2008 en méditerranée (cf I) ne discriminent même pas les naissains d'écloserie 2n et 3n et des études complémentaires et multilocales seraient donc nécessaires pour évaluer les performances zootechniques de ces différents génotypes.

\*\*\*

\*

---

<sup>13</sup> Dans la méthode de production de Guo et Allen, certains tétraploïdes peuvent résulter de tels ovocytes.



### **III. L'élevage des 3n**

#### ***III.1. Les données disponibles sur l'écophysiologie des 3n***

Ainsi que nous l'avons vu, différentes techniques sont disponibles pour produire en élevage des huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) triploïdes. Leur intérêt est discuté par ailleurs et nous allons ici nous intéresser à leur physiologie, écophysiologie et aux comparaisons qui ont pu être établies avec les animaux « normalement diploïdes ».

Plusieurs documents, établis entre 2003 et 2008, nous ont été fournis par l'Ifremer.

Un travail publié en 1986 et utilisant des triploïdes de type 1 avait déjà précisé les capacités constantes de croissance sur l'année de *C. gigas* 3n (Allen and Downing, 1986). Un travail complémentaire a été produit en 2003 sur la comparaison des performances de croissance et de survie d'huîtres 2n et 3n (produites par deux techniques différentes) conservées en milieu contrôlé (Haure *et al.*, 2003). Les deux méthodes de triploïdisation utilisées étaient celle avec la cytochalasine B (type 1) et avec le croisement 4n x 2n (type 2A).

Les animaux ont été stabulés en bassins expérimentaux à la Station Ifremer de La Tremblade. Pour un débit de 1,5 l d'eau/huître et par heure,  $1.10^9$  cellules de *Skeletonema costatum* ont été fournies pour chaque individu par jour. La distribution alimentaire a toujours été au niveau de ceux les plus élevés en mer. La température a fluctué entre mars et juillet entre 13,5 et 15°C.

Les 3n issues du croisement 4n x 2n (Type 2A) n'ont pas dépassé 1,5 % de mortalité entre juin et juillet alors que les deux autres lots (3n de type 1 et 2n) subissaient entre 6 et 10 % de mortalité. Sur l'ensemble de l'expérimentation, les triploïdes de type 2 ont également mieux augmenté leur masse corporelle. Ce groupe d'huître se singularise donc par rapport aux deux autres. Ces résultats confirment les observations de Wang *et al.* (1999), qui montrent que les triploïdes de type 2A ont un poids supérieur de 25 % à celui des triploïdes de type 1 et de 40 % à celui des diploïdes.

Sur un plan qualitatif, les indices AFNOR<sup>14</sup> et de Lawrence & Scott<sup>15</sup> (1982) ne sont pas discriminants. La ponte des 2n a entraîné 33% de perte de poids sec en fin de printemps. Aucune détresse physiologique n'est enregistrée, les sucres se maintenant à des valeurs satisfaisantes : les trois lots se sont maintenus à trois fois la teneur des huîtres qui commencent à présenter des problèmes dans le milieu naturel.

Le bilan énergétique total (SFG<sup>16</sup>) a été estimé : les 2n grandissent moins en masse de chair et en coquille. Les huîtres sont apparues capables, ainsi stabulées, de prélever de l'oxygène sans trop ouvrir les valves et sans filtrer et s'alimenter. Les taux de filtration et de prélèvement de la matière organique particulaire (MOP) ont été faibles pour tous les lots. Les diploïdes ont cependant plus consommé, la MOP ramenée à la surface branchiale ayant été plus élevée car la gamétogenèse demande un surcroît d'apport énergétique.

Dans un travail produit en 2007, Berthollet-Marolle revient sur la validation du modèle 3n dans de nouvelles conditions expérimentales : les huîtres 2n et 3n sont bien différentes, l'ingestion alimentaire dépendante de la température de l'eau étant différemment régulée. Les huîtres 3n produites par traitement chimique ont une dépense énergétique supérieure. Le réchauffement de l'eau lié au changement global n'affecterait pas la capacité des 3n à ne

---

<sup>14</sup> Rapport en % du poids frais sur le poids total.

<sup>15</sup> Poids sec de la chair/(poids total - poids de coquille) x 1000.

<sup>16</sup> Le SFG (Scope for Growth) correspond à la différence entre l'énergie apportée par la nourriture et la perte d'énergie liée aux différentes fonctions de l'huître.

pas maturer. Le modèle de Pouvreau, établi en 2006, reste valable, les coûts de croissance, allocation énergétique et coût de maintenance pouvant être calculés et utilisés de la même façon. Les 3n auraient peut-être un seuil thermique ( $< 19^{\circ}\text{C}$ ) plus haut que celui des 2n ?

Dans une autre étude, publiée en 2008, Guéguen *et al.* se sont intéressés à l'influence de la polyploïdie sur la contamination des huîtres par les toxines paralysantes. Ont été testés *Alexandrium minutum* et *A. catenella*. Les taux de filtration et de consommation n'ont pas été différents entre 2n et 3n. Les triploïdes développent une activité valvaire plus importante en juin. On ne note pas d'écarts de concentration de toxines entre 2n et 3n en novembre et mars. Par contre, en juin, on observe une accumulation plus forte de toxine dans la gonade des 2n, alors que, à l'inverse, la glande digestive des 3n est plus chargée en toxines que celle des 2n, du fait d'un transfert plus faible dans la gonade. Aucun écart n'est observé pour les autres tissus (branchies, manteau, muscle).

Peu de publications sont disponibles sur la physiologie des *C. gigas* 3n, en dehors de travaux réalisés ou commandités par l'Ifremer que nous venons d'évoquer : un ancien travail de Davis (1988), un papier de Danton *et al.* (1999). Trois travaux australiens sur une autre espèce, *Saccostrea commercialis* sont également disponibles (Cox *et al.*, 1996 ; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2001a et b).

### **III.2. Conclusion**

Ces données montrent donc que des différences notables peuvent exister entre les triploïdes selon leur mode de production, allant dans le sens d'une meilleure performance des 3n produits par croisement. Cette conclusion renforce notre recommandation de mener des comparaisons plus précises entre ces différents types de 3n.

## **Conclusions générales et recommandations**

Ce rapport a été réalisé dans un temps limité et nous avons vu que plusieurs incertitudes ne pouvaient être levées que par des observations et expérimentations complémentaires. Cependant, plusieurs conclusions fortes peuvent être proposées dès maintenant :

1. Tout d'abord, si les conditions climatiques particulières de l'hiver 2007-2008 et du printemps 2008 (et peut-être de l'année précédente) semblent pouvoir expliquer de manière assez satisfaisante les mortalités de l'été 2008, ces conditions n'ont rien d'exceptionnel et de nouveaux épisodes de ce type sont donc à prévoir. **Dans cette perspective, une analyse plus fine des variations de mortalité entre sites (incluant les sites épargnés et élargie éventuellement à des sites étrangers) et des facteurs ayant pu favoriser ou réduire ces mortalités (en particulier les pratiques d'élevage) est à réaliser.**

2. La question des apports de substances polluantes dans les bassins conchylicoles, posée notamment par l'observation récurrente d'aneuploïdes dans les opérations de biovigilance, constitue une autre menace que l'on ne peut éluder. **Il faut souligner tout d'abord que ce phénomène n'a aucun rapport possible avec l'utilisation de naissain d'écloserie et avec le développement des élevages d'individus triploïdes.** Il convient ensuite, dans un premier temps, de vérifier la cohérence entre les méthodes de détection de ces aneuploïdes par cytométrie de flux et par caryologie. Dans un second temps, **préciser l'ampleur et l'impact de ces phénomènes, identifier les substances incriminées, vérifier si ces problèmes sont suffisamment pris en compte dans l'expertise des produits de l'industrie chimique sont des actions de long terme à intégrer dans les programmes issus du Grenelle de l'environnement, notamment ECOPHYTO 2018.**

3. Même si aucun agent pathogène nouveau n'a été détecté (ce qui n'exclut pas une éventuelle évolution de la virulence des pathogènes existants) et que tous les bassins semblent disposer d'un « pathosystème » résident susceptible de s'exprimer lorsque l'environnement lui devient favorable, **l'organisation actuelle de l'ostréiculture présente une extrême vulnérabilité vis-à-vis de l'émergence de pathogènes nouveaux.** L'importance des transferts interbassins et, *a fortiori*, la pratique – qui nous a été plusieurs fois rapportée – de transferts entre zones où apparaissent des mortalités et zones apparemment indemnes constituent de puissants facteurs de dissémination d'agents pathogènes émergents et vont à l'encontre de toutes les approches recommandées dans le domaine de la santé animale. De plus, l'absence d'informations systématiques sur de tels transferts (à défaut d'une réglementation) brouille le signal épidémiologique et ne peut que freiner l'identification d'un nouveau phénomène pathologique. **La réduction de cette vulnérabilité de la filière, qu'elle résulte de l'organisation des professionnels, d'une intervention des pouvoirs publics ou de leur action conjointe, apparaît donc indispensable.**

4. Même si aucune influence nette de l'origine et des caractéristiques du naissain (captage ou écloserie, diploïde ou triploïde) n'a été mise en évidence, les données précises ne reposent que sur une observation (Thau), les autres indications sur l'absence de différences étant très qualitatives. En outre, il apparaît qu'aussi bien les naissains de

captage que ceux d'écloserie peuvent présenter des caractéristiques variables susceptibles de modifier leurs performances : entre autres, le taux d'aneuploïdie pour les premiers, le taux de triploïdie, le taux d'aneuploïdie et le mode de production des géniteurs tétraploïdes pour les seconds. **Il apparaît donc indispensable de mettre en place un dispositif de certification du naissain par un opérateur indépendant**, à l'image du travail que réalise le GEVES pour les semences végétales. En effet, la délivrance par l'Ifremer de tétraploïdes aux écloseries fait seulement l'objet d'un examen de la demande par cet organisme, qui se retrouve ainsi juge et partie et n'exerce en outre aucun contrôle de qualité sur les produits diffusés par ces écloseries. Quant au naissain de captage, les échanges sont seulement régis par la législation générale sur la loyauté des transactions. Cette certification devra porter *a minima* sur les caractéristiques génétiques. Le groupe d'experts ne se prononce pas sur l'intérêt d'éventuelles garanties sanitaires mais invite à une réflexion dans ce domaine.

5. De manière complémentaire, **l'organisation de tests pluriannuels et multilocaux des différents types de triploïdes, afin de préciser leurs performances zootechniques, apparaît souhaitable**. Il semble en effet que la succession rapide des offres de différents types de triploïdes, pouvant présenter des caractéristiques de croissance, survie et maturation différente (sans parler de la présence plus ou moins abondantes de diploïdes dans ces lots), ait créé quelques incertitudes au sein de la profession. Dans cette optique, une conception, une réalisation et une interprétation conjointe de ces tests par les professionnels et par l'Ifremer ne présenteraient que des avantages.

6. L'émission éventuelle de spermatozoïdes dans le milieu par des mâles triploïdes est un phénomène sans doute limité, mais qui ne peut être exclu sur la base des observations disponibles. **S'il prenait de l'ampleur, ce phénomène pourrait, dans des bassins fortement chargés en triploïdes, avoir à la marge un impact négatif sur la production quantitative de naissain, mais non sur la qualité de ce naissain**. Il convient donc d'en confirmer l'existence et, si oui, d'en préciser l'importance par des observations spécifiques, le dispositif de biovigilance n'étant pas adapté à la mise en évidence de ce phénomène.

7. **Sur la base des observations disponibles, les conclusions du rapport de 1998, selon lesquelles l'hypothèse de prolifération incontrôlable de 3n et 4n dans les bassins conchylicoles était peu plausible, sont confirmées et même renforcées**. Cependant, même s'il n'a pas détecté de polyploïdes, le dispositif de biovigilance a montré son intérêt, à la fois pour confirmer les approches théoriques du rapport de 1998 sur le caractère peu vraisemblable du développement de tels individus et pour mettre en évidence des phénomènes méconnus, comme le taux non négligeable d'aneuploïdie dans le naissain de captage. **Maintenir ce dispositif, sur une base annuelle ou bisannuelle, en association avec les travaux sur les fluctuations de l'abondance du captage, serait donc pertinent**.

\*\*\*\*\*

\*\*\*

\*

## Bibliographie citée

*NB : Cette liste ne reprend que les principaux articles sur lesquels le groupe d'expertise s'est appuyé et qui comportent des bibliographies plus exhaustives.*

- Allen S K Jr, 1986. Genetic manipulations: critical review of methods and performances in shellfish. Pp. 127-143 in *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, vol II, K. Tiews, ed. Heenemann Verlag, Berlin.
- Allen S K Jr, Downing S I, 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 102, 197-208.
- Allen S K Jr, Downing S I, 1990. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Gametogenesis. *Can.J.Fish. Aquat. Sci.*, 47, 1213-1222.
- Batista F, Leitão A, Fonseca V G *et al.*, 2007. Individual relationship between aneuploidy of gill cells and growth rate in the cupped oysters *Crassostrea angulata*, *C. gigas* and their reciprocal hybrids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 352, 226-233.
- Benabdelmouna A, Huber M, Cantin C *et al.*, 2008. Niveau de ploïdie des huîtres des bassins de captage de Marennes Oléron et Arcachon (Campagne biovigilance 2008). *Rapport Ifremer*, 26 p.
- Benabdelmouna A, 2009. Mortalité des naissains de *C. gigas* : climat, reproduction et captage. *Rapport interne Ifremer*, 23 p.
- Berthollet Marolle E, 2007. Amélioration du modèle individuel de croissance et de reproduction de type "Dynamic Energy Budget" chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et application aux cas particuliers des huîtres triploïdes. *Mémoire de Master 2 « Sciences de la mer et du littoral »*, UBO, Plouzané.
- Bouilly K, Leitão A, Chaves R *et al.*, 2005. Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*. *Genome*, 48, 1-4.
- Cox E S, Smith M S R, Nell J A, Maguire G B, 1996. Studies on triploid oysters in Australia. VI. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Ireland and Roughley). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 197, 101-120.
- Danton E, Veron B, Mathieu M, 1999. Impact of specific feeding conditions on sterols of diploid and triploid oysters *crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 233, 259-267.
- Davis J P, 1988. Growth rate of sibling diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *J. Shell. Res.*, 7, 202.
- Degremont L, Ernande B, Bedier E, Boudry P, 2007. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture*, 262, 41-53.
- Gong N, Yang H, Zhang G *et al.*, 2004. Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Heredity*, 93, 408-415.
- Gueguen M, Baron R, Bardouil M *et al.*, 2008. Influence de la polyploïdie sur la contamination des huîtres par des toxines paralysantes. *Rapport de fin d'étude Réf 08/05 210 074 /F*.
- Guo X, Allen S K Jr, 1994a. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3, 42-50.
- Guo X, Allen S K Jr, 1994b. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Biol. Bull.*, 187, 309-318.
- Haure J, Fortin A, Dupuy B *et al.*, 2003. Etude comparative des caractéristiques écophysiologiques et des performances de croissance de l'huître creuse *Crassostrea gigas* diploïde et triploïde en milieu contrôlé. *Rapport Ifremer*, 37 p., disponible sur [www.ifremer.fr/docelec](http://www.ifremer.fr/docelec)
- Ifremer, 2008. Compte-rendu de la réunion bilan annuelle Ifremer-Ecloseries commerciales du 05/11/2008. 21 p.
- Kesarcodi-Watson A, Lucas J S, Klumpp D W, 2001a. Comparative feeding and physiological energetics of diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis*. I. Effects of oyster size. *Aquaculture*, 203, 177-193.

- Kesarcodi-Watson A, Lucas J S, Klumpp D W, 2001b. Comparative feeding and physiological energetics of diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis*. II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. *Aquaculture*, 203, 195-216.
- Leitão A, Boudry P, McCombie H *et al.*, 2001a. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquat. Living Resourc.*, 14, 233-237.
- Leitão A, Boudry P, Thiriôt-Quévieux C, 2001b. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. *Aquaculture*, 193, 39-48.
- McCombie H, Ledu C, Phelipot P *et al.*, 2005a. A complementary method for production of tetraploid *Crassostrea gigas* using crosses between diploids and tetraploids with Cytochalasin B treatments. *Marine Biotech.*, 7, 318-330.
- McCombie H, Lapègue S, Cornette F *et al.*, 2005b. Chromosome loss in bi-parental progenies of tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 247, 97-105.
- McCombie H, Cornette F, Beaumont A. Short sharp shock produces viable tetraploids in crosses of diploid blue mussels *Mytilus edulis*. *Aquaculture Research*, in press.
- Normand J, 2005. Etude de la reproduction d'huîtres creuses triploïdes *Crassostrea gigas* (Thunberg) : transmission des chromosomes, et potentiel reproducteur. *Rapport de stage de 2<sup>ème</sup> année de Master*, UBO, Plouzané.
- Normand J, Le Pennec M, Boudry P, 2008. Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture*, 282, 124-129.
- Quillet E, Panelay P J, 1986. Triploidy induction by thermal shock in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 57, 271-279.
- Samain J F, Boudry P, Degremont P *et al.*, 2004. Summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, overview of 3-year results of the cooperative "MOREST" Project. *J. Shellfish Res.*, 23, 309-310.
- Samain JF, Dégremont L, Soletchnik P *et al.*, 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*, 268, 227-243.
- Samain JF, McCombie H., 2008. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*, The Morest project, Eds Quae, Versailles, France.
- Scarpa, J, Wada, KT, Komaru, A, 1993. Induction of tetraploidy in mussels by suppression of polar body formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 2017-2023.
- Soletchnik P, Lambert C, Costil K, 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to rearing environment conditions. *J. Shellfish Res.*, 24, 197-207.
- Soletchnik P, Huvet A, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N, Gouletquer P, Boudry P, 2002. Comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids. *Aquatic Living Resources*, 15, 243-250.
- Taris N, Sauvage C, Batista FM, Baron S, Ernande B, Haffray P, Boudry P, 2006. Conséquences génétiques de la production de larves d'huîtres en écloserie : étude des processus de dérive et de sélection. *Les Actes du BRG*, 6: 521-541.
- Thiriôt-Quévieux C, 1986. Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica*, 70, 225-231.
- Wang Z, Guo X, Allen S K Jr, Wang R, 1999. Aneuploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid production. *Aquaculture*, 173, 347-357.

## **Annexe I : Lettre de saisine**



*Republique Française*

*Ministère de l'Agriculture  
et de la Pêche*

*Paris, le* 03 AVR. 2009

*Le Directeur de Cabinet*

N/Réf : CI0502945

à

Monsieur Bernard CHEVASSUS AU LOUIS  
Inspecteur général de l'agriculture  
UMR GABI – Equipe Génétique en Aquaculture  
INRA  
78350 JOUY-EN-JOSAS

Objet : expertise scientifique collective sur l'ostréiculture

Le secteur de l'ostréiculture a été confronté à des mortalités très importantes de jeunes huîtres qui ont touché, au cours de l'été 2008, la plupart des bassins de production français.

Face à cette situation préoccupante, le Ministre de l'agriculture et de la pêche a demandé à l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (IFREMER) d'engager tous les travaux nécessaires pour déterminer les causes de ces mortalités afin de prévenir de nouveaux épisodes.

Après la remise de premières conclusions provisoires, l'IFREMER a engagé sur l'ensemble des secteurs impactés, une étude épidémiologique qui doit permettre de déterminer les causes et les déterminants possibles des mortalités constatées. Ces investigations se poursuivent actuellement.

A l'occasion de l'épisode de mortalités de l'été 2008, des interrogations se sont fait jour, générant de fortes préoccupations et d'importants débats au sein de la profession, sur le rôle qu'aurait pu jouer le recours au naissain produit dans les écloseries et, plus particulièrement, l'introduction largement répandue de naissains triploïdes, l'accent étant d'abord mis sur le risque environnemental.

L'expertise scientifique devra faire la synthèse de l'état des connaissances scientifiques actuelles, françaises et étrangères, sur le naissain d'écloserie, en particulier, mais pas uniquement, le naissain triploïde, et s'intéressera notamment à ses conditions de production et de contrôle, à la stabilité des souches, à leur résistance aux agressions extérieures, à la propagation d'épidémies éventuelles et à l'appauvrissement de la biodiversité du milieu marin. Dans un souci d'équilibre, ce travail devra inclure une comparaison avec les caractéristiques du naissain obtenu par captage naturel.

.../...

*78, rue de Varenne – 75349 Paris 07<sup>sp</sup> – Tél. : 01 49 55 49 55*

D'autres facteurs peuvent avoir un impact sur la résistance des huîtres d'élevage, les rendant ainsi plus vulnérables à des attaques d'agents pathogènes ou à l'apparition de toxines dans le milieu. Subsidairement, l'expertise pourra donc recenser et synthétiser les connaissances actuellement disponibles et pertinentes sur ces autres facteurs.

A partir de cette synthèse, l'expertise fera les recommandations appropriées.

Cette expertise scientifique sera conduite en toute indépendance par un collège regroupant des universitaires et chercheurs des meilleurs laboratoires français. Le collège sera composé de :

- Gilles Bœuf, de la station marine de Banyuls
- Michel Mathieu, de l'UMR de Caen
- François Bonhomme, de l'Université de Montpellier

et de vous même.

Je souhaite que vous assuriez le pilotage de ce collège, dont le rapport, qui pourra comporter des pistes d'approfondissement, concernant notamment les pratiques des ostréiculteurs (type d'élevage, densité, transferts de lots d'huîtres entre bassins de production) afin d'identifier si elles constituent des facteurs aggravants des mortalités constatées, voire des facteurs de risque en eux-mêmes, devra m'être remis impérativement avant la fin du mois d'avril 2009.



Gilles PELURSON

**Annexe II :**

**Rapport au Comité Scientifique du Ministère de L'Agriculture et de la  
Pêche présenté à la séance du 24 novembre 1998<sup>17</sup>**

---

<sup>17</sup> Ce document a fait l'objet de quelques corrections de pure forme par rapport au texte présenté en 1998



# **EFFET D'UN FLUX EVENTUEL DE TETRAPLOIDES DANS LES ZONES CONCHYLICOLES : EVALUATION DE L'IMPACT ENVIRONNEMENTAL**

*Bernard CHEVASSUS-AU-LOUIS  
Laboratoire de génétique des poissons INRA 78350 JOUY en JOSAS*

## **PROBLEMATIQUE GENERALE**

Le développement de la production d'huîtres triploïdes "des 4 saisons" par croisement entre des géniteurs diploïdes et tétraploïdes implique la production en milieu confiné de reproducteurs tétraploïdes.

Le confinement ne pouvant être parfait, il faut envisager le devenir de tétraploïdes dans l'environnement, en particulier s'ils parviennent dans un bassin conchylicole.

Ce devenir dépendra de nombreux paramètres, en particulier :

- **de l'importance et de la fréquence** (régulière ou sporadique) des **échappements**.

- **de la valeur sélective de ces tétraploïdes** comparativement aux diploïdes. La polyploïdie semble en effet se traduire chez les huîtres par une amélioration des performances de croissance, qui peut conduire à une plus grande fertilité des animaux. En ce qui concerne la survie, les données obtenues chez les triploïdes sont également en faveur d'une amélioration, en particulier lors de périodes difficiles.

- **du degré d'isolement** entre les gamètes produits par les diploïdes et les tétraploïdes. Cet isolement peut être spatial, les tétraploïdes pouvant avoir des préférences écologiques les conduisant à coloniser des milieux légèrement différents. Il peut également être temporel, la période de ponte pouvant être décalée, ou physiologique, les gamètes homologues s'associant de manière préférentielle.

- **de l'existence d'une production endogène de tétraploïdes**, liée à diverses anomalies méiotiques affectant les diploïdes et les triploïdes.

Nous avons donc étudié ces différents paramètres, en distinguant trois scénarios :

## **SCENARIO 1 :**

C'est le plus simple. **On suppose que les triploïdes sont totalement stériles, que les diploïdes ne produisent que des gamètes normaux haploïdes, que tous les gamètes se mélangent au hasard (panmixie) et que les valeurs sélectives sont égales pour tous les génotypes.**

On étudie dans ce cas uniquement les conséquences d'un flux □ de tétraploïdes (mesure en % du stock total d'huîtres potentiellement reproductrices dans la zone d'impacts) sur la fréquence d'équilibre de ces tétraploïdes dans le milieu.

Le modèle montre :

- que des flux accidentels doivent être massifs (représentant plus de la moitié du stock) pour permettre une implantation et un envahissement du bassin conchylicole par des 4n. La série 1 de la figure 1 montre en particulier que 3 échappements massifs (40% du stock) à G0, G9 et G18 ne permettent pas d'implanter les 4n.

- que des flux chroniques doivent avoir des valeurs fortes (supérieurs à 21% du stock = série 2) pour être envahissants. Sinon (série 3 et 4), le taux de tétraploïdes reste limité aux environs de la valeur de ce flux.

- qu'en situation de flux important mais non limité (série 5), un flux massif instantané peut faire "basculer" le peuplement vers l'envahissement par les 4n.

### **CONCLUSION**

*Dans ce premier scénario, il apparaît que la valeur des flux échappés pouvant conduire à un envahissement par les 4n doit être très élevée, que ces flux doivent être chroniques (plus de 20%), et que de telles valeurs ne seront sans doute pas atteintes même si tous les tétraploïdes présents dans l'écloserie venaient à s'échapper.*

### **SCENARIO 2 :**

Nous avons dans ce cas introduit deux autres paramètres :

- **l'effet de la valeur sélective** : nous l'avons fait varier entre 80% et 200% de celle des diploïdes. Il apparaît (figure 2) que cette variation module de manière notable la valeur du flux critique pouvant déclencher l'envahissement. De 22% pour des valeurs sélectives égales, on passe à 31% pour une valeur sélective de 0,8 et l'on descend à 7% pour une valeur sélective de 2.

- **l'effet de l'isolement reproducteur** : nous l'avons défini par le pourcentage de gamètes se reproduisant en croisement au hasard par rapport à ceux ne rencontrant que des gamètes de même ploïdie. Le modèle permet d'avoir des valeurs différentes pour les 2n et les 4n mais notre simulation (figure 3) a utilisé des valeurs identiques. On observe une chute rapide du flux critique dès que l'isolement reproducteur croît. Ainsi, pour des valeurs sélectives égales, le flux critique passe de 22 à 5,5% quand le taux d'isolement passe de 0 à 50%. L'introduction d'une valeur sélective différentielle accentue le phénomène. Si les tétraploïdes sont défavorisés ( $s = 0,8$ ), l'isolement reproducteur ne modifie que faiblement le flux critique. S'ils sont légèrement favorisés ( $s = 1,2$ ), les flux critiques permettant l'envahissement peuvent devenir très faibles : 1,4% par exemple pour un isolement de 50%.

### **CONCLUSION :**

*L'introduction de ces deux paramètres modifie sensiblement les conclusions du premier scénario. L'hypothèse d'une valeur sélective supérieure à celle des diploïdes étant vraisemblable, il convient d'en préciser la valeur et aussi d'avoir des informations sur un éventuel isolement reproducteur (spatial, temporel), ces deux paramètres interagissant fortement. En l'absence de ces informations, il convient de retenir des valeurs de flux critiques beaucoup plus faibles (quelques %) que dans le scénario 1.*

### **SCENARIO 3 :**

Nous avons dans ce cas étudié les **conséquences d'une faible fertilité résiduelle des triploïdes et introduit les anomalies de méiose pouvant affecter les diploïdes et les triploïdes.**

#### **1. Hypothèses sur la reproduction**

Dans les conditions naturelles, la possibilité d'avoir une production endogène de tétraploïdes par les diploïdes est réelle, mais anecdotique. En effet, dans la plupart (toutes?) des espèces animales, un certain taux de gamètes ne subit pas la réduction chromosomique et est donc diploïde. Plusieurs mécanismes peuvent y contribuer, mais le plus fréquent est sans doute le non-achèvement de la 2<sup>ème</sup> division de méiose (non-expulsion du 2<sup>ème</sup> globule polaire). Nous n'avons pas de données chez les huîtres mais les données dont nous disposons chez les poissons conduisent à situer ce taux de gamètes diploïdes  $d$  dans la fourchette de  $d = 1$  à 5%. Il en résulte la possibilité de produire un très faible nombre de triploïdes et de tétraploïdes par croisement entre ces gamètes diploïdes et des gamètes haploïdes ou (plus rarement) diploïdes.

En outre, la stérilité des triploïdes n'est pas totale. La croissance de la gonade est fortement inhibée, mais une petite production de gamètes peut être observée chez certains animaux. Les données obtenues oralement auprès de l'IFREMER (à confirmer) seraient d'environ un animal sur 20 environ pouvant produire des gamètes et, dans ce cas, une production gamétique d'environ 10% de celle des diploïdes, soit au total une fécondité de l'ordre de 2% de celle d'un nombre équivalent de reproducteurs diploïdes. Dans la suite des simulations, nous avons pris une valeur de  $t = 10\%$  pour être sûr d'être très au-delà de la réalité biologique.

Quelle est la nature des gamètes ainsi produits? Si la méiose se réalise, les appariements entre les trois chromosomes homologues conduiront à des disjonctions de type 2/1, donc essentiellement à des gamètes aneuploïdes. Cependant, compte tenu du faible nombre de chromosomes ( $2n = 20$ ), une petite proportion de méiose (une sur 512) devrait aboutir à des gamètes équilibrés, soit haploïdes, soit diploïdes. En outre, un certain taux d'améiose devrait également exister, et conduire à des gamètes triploïdes non réduits. On peut même penser que ce taux pourrait être plus élevé que chez les diploïdes, et ceci pour deux raisons :

- le phénomène d'améiose est fréquemment décrit chez les vertébrés inférieurs (poissons et amphibiens) et les plantes triploïdes, en particulier lorsqu'ils résultent d'hybridation (allotriploïdes).

- l'obtention des tétraploïdes s'est faite en recherchant des huîtres triploïdes capables de produire de tels gamètes triploïdes et l'on sait chez les poissons que ce phénomène peut avoir une base génétique. Cette sélection peut donc conduire à des triploïdes ayant une plus grande aptitude à la non-réduction.

Pour ces deux raisons, nous avons donc exploré des valeurs du taux  $a$  de non-réduction chez les  $3n$  pouvant varier de 0 à 100%.

Le modèle développé considère donc le mélange possible (sans isolement reproducteur) de trois types de gamètes :

- des haploïdes, issus des géniteurs diploïdes et des quelques méioses équilibrées de géniteurs diploïdes.

- des diploïdes, issus des géniteurs diploïdes (non-réduction), des géniteurs triploïdes (méioses équilibrées) et des tétraploïdes.

- des triploïdes, issus des géniteurs triploïdes (non-réduction).

Il en résulte des descendants allant de  $2n$  à  $6n$ , et nous avons supposé que les  $5n$  et  $6n$  étaient inviabilés (cas des poissons).

## 2. Devenir des populations triploïdes

La première question que nous avons examinée concerne le **devenir dans ces conditions de populations ne contenant que des triploïdes et présentant un taux de maturation  $t$** . La simulation réalisée avec une population à 99,9% triploïde et avec  $t = 10\%$  montre qu'une telle population est instable et qu'elle donnera naissance, en l'absence de flux externes, à une population soit entièrement  $2n$ , soit entièrement  $4n$ . Les conditions de basculement vers la fondation d'une population  $4n$  sont relativement aisées à atteindre (figure 4) : il suffit que le taux de non-réduction des  $3n$  dépasse 1,5%, même si celui des  $2n$  est nul.

Cependant, ce scénario limite de fondation d'une population  $4n$  est peu réaliste :

- on constate tout d'abord qu'une faible proportion de  $2n$  dans la population initiale suffit à éviter le phénomène. Ainsi, pour 10% de  $2n$ , il faut une améiose quasi-systématique des  $3n$  (a supérieur à 90%) pour éviter que la population ne retourne à l'état diploïde.

- on observe d'autre part que le taux  $t$  de fertilité relative des  $3n$  par rapport aux  $2n$  est un paramètre important. Nous avons pris une valeur de 10% mais les valeurs réelles sont sans doute plus proches de 1 à 2%. Dans ce cas, les valeurs minimales du taux d'améiose permettant de fonder une population tétraploïdes deviennent beaucoup plus élevées (environ 10% pour  $t = 0,1$ ).

## 3. Les populations mixtes

Nous avons ensuite examiné **le cas plus réaliste de populations ostréicoles contenant des proportions plus ou moins importantes de triploïdes, et estimé dans ce cas le taux endogène de  $4n$  qui en résulte**, que nous avons calculé dans deux cas extrêmes (en supposant l'absence de flux exogène et des valeurs sélectives égales) :

- la situation "naturelle" (pas d'apport de  $3n$  dans le bassin ostréicole): Dans ce cas, (figure 5A) le flux endogène reste limité à moins de 1%, sauf pour des valeurs très fortes des taux de non-réduction des  $2n$  (plus de 5%) et des  $3n$  (plus de 50%).

- la situation où une production importante d'animaux triploïdes se fait dans le bassin conchylicole avec des apports à chaque génération. Dans ce cas (figure (5B), le flux endogène est notablement plus élevé: pour des apports de 40%, il peut avoisiner les 2% pour des valeurs moyennes du taux de non-réduction des  $2n$  (2 à 5%) et des valeurs élevées, mais possibles, du taux de non-réduction des  $3n$  (40 à 50%).

## CONCLUSION

*Ces valeurs du flux endogène ne sont pas susceptibles en elle-même d'atteindre le flux critique conduisant à une "explosion" des tétraploïdes. Cependant, ce flux endogène, non*

*négligeable dans des bassins conchylicoles très chargés en triploïdes, pourra s'ajouter au flux exogène éventuel et conduire à des niveaux critiques dans des cas limites (figure 6), surtout si l'on introduit une valeur sélective plus forte des tétraploïdes et un certain degré d'isolement reproducteur (cf. scénario 2)*

## **CONCLUSION GENERALE**

Cette étude rapide devra être affinée et critiquée. Elle montre cependant que des flux réguliers de tétraploïdes représentant quelques pour cents d'un stock d'élevage peuvent dans des bassins conchylicoles produisant des quantités importantes de triploïdes et, sous certains hypothèses extrêmes, conduire à des scénarios d'envahissement progressif de bassin par les tétraploïdes. En prenant un facteur 10 de sécurité, **nous situerons provisoirement le flux acceptable à moins de 1 pour mille.**

Cependant, de telles valeurs de flux peuvent certainement être évitées par des **mesures de confinement simples et une déclaration obligatoire des échappements accidentels**, dans la mesure où le cheptel de tétraploïdes permettant une production, même importante, d'huîtres triploïdes, sera relativement faible et localisé en un petit nombre de sites.

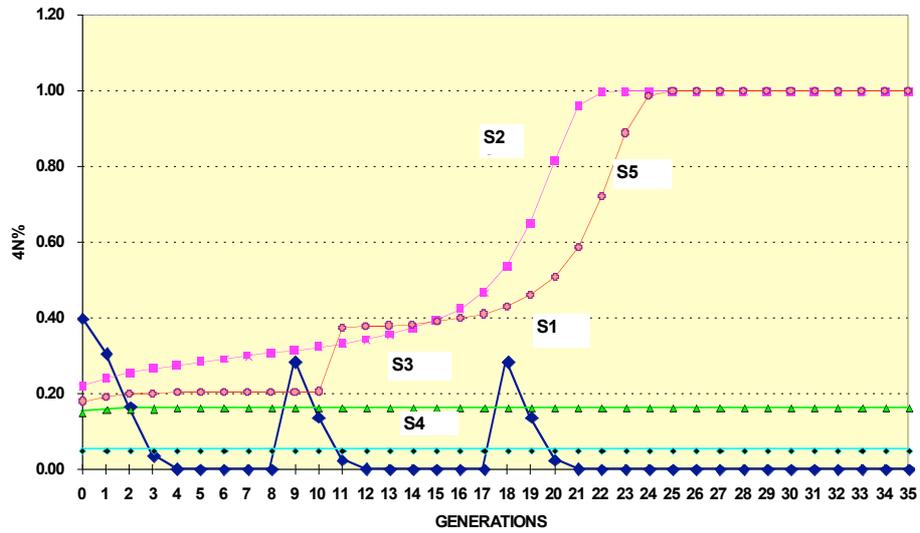
En outre, les scénarios d'envahissement ne sont pas brutaux lorsqu'il s'agit de flux chroniques: les valeurs d'équilibre étant atteintes après 10 à 20 générations, après une montée lente du taux de 4n. **Une biovigilance légère, avec mesure régulière (tous les deux ou trois ans) du taux de tétraploïdes dans les bassins conchylicoles, sera donc suffisante**, étant donné que l'arrêt du flux exogène conduit, dans la quasi-totalité des cas examinés, à l'extinction de la population tétraploïde.

Enfin, il apparaît que **le taux exact de stérilité des 3n et la nature des gamètes qu'ils peuvent produire (en particulier les gamètes non-réduits) sont des paramètres importants pour fixer plus précisément les seuils admissibles.** Des études dans ce domaine, pour lesquelles des méthodes simples et peu coûteuses sont disponibles, devront être recommandées.

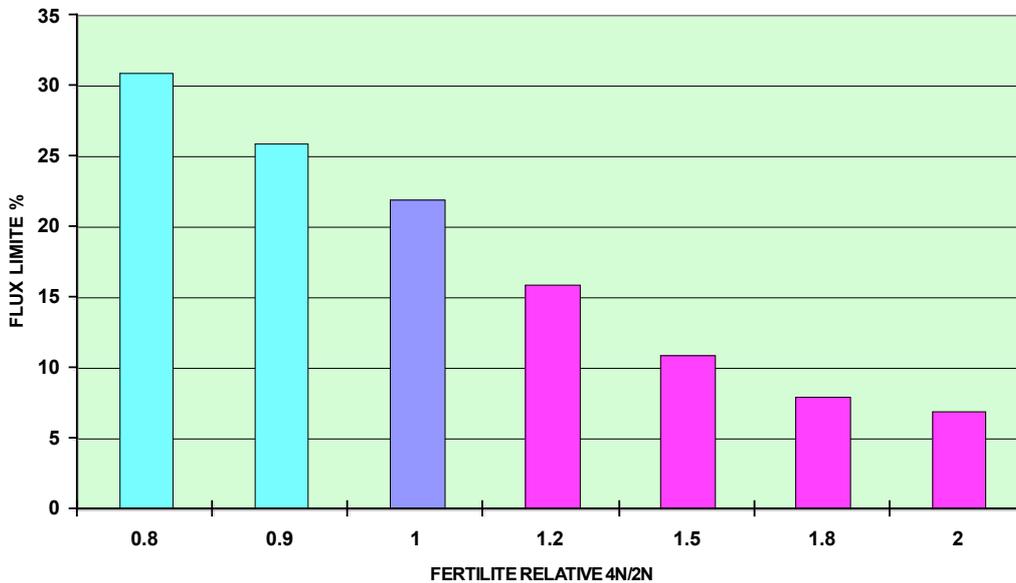
\*\*\*\*

**FIGURE 1 : EVOLUTION DE LA FREQUENCE DES TETRAPLOIDES POUR DIFFERENTES VALEURS DU FLUX EXOGENE (SCENARIO 1 : On suppose le mélange au hasard des gamètes produits par les 2n et les 4n et pas de différence de valeur sélective entre les deux génotypes)**

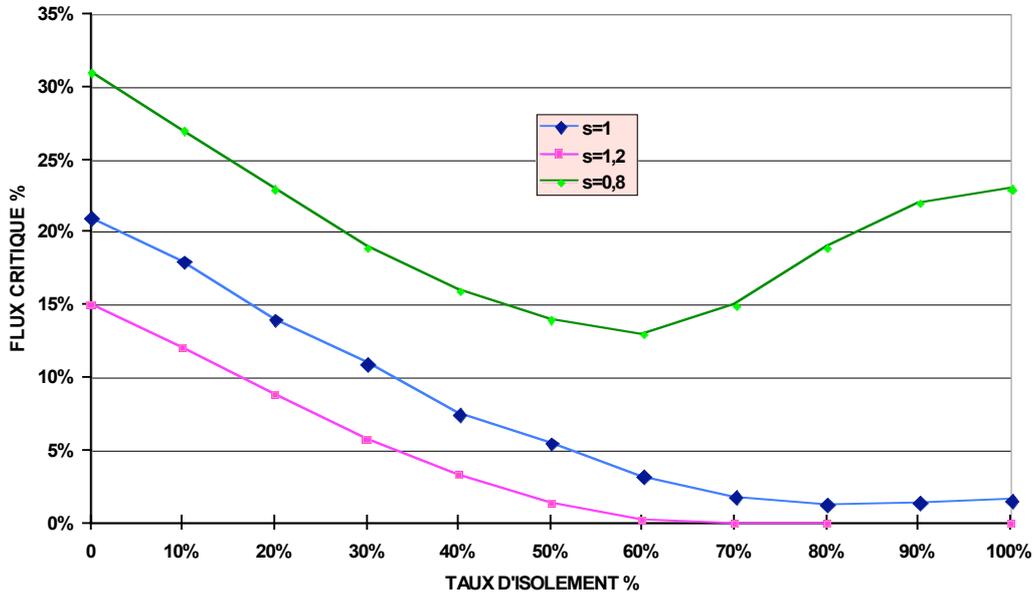
- SERIE 1 : 3 contaminations accidentelles de fréquence 40%
- SERIE 2 : Flux chronique représentant 22% du stock
- SERIE 3 : Flux chronique représentant 15% du stock
- SERIE 4 : Flux chronique représentant 5% du stock
- SERIE 5 : Flux chronique représentant 18% du stock et contamination accidentelle forte (50%) à G11.



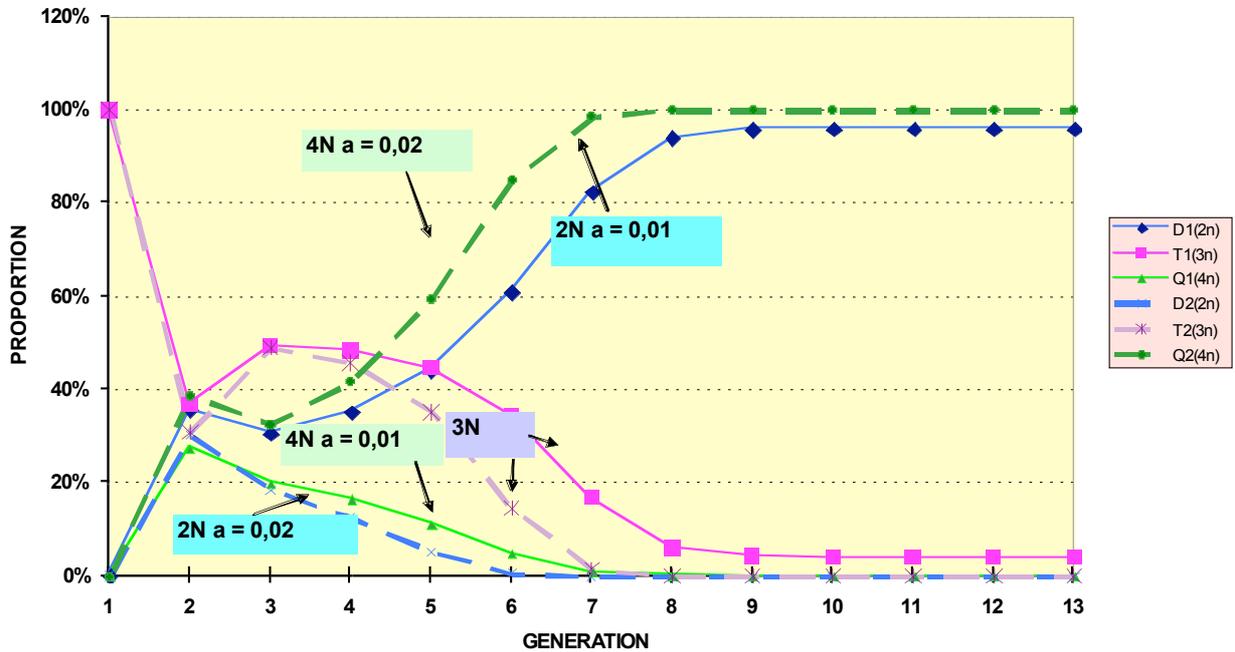
**FIGURE 2 : VALEUR DU FLUX CRITIQUE EN FONCTION DE LA VALEUR SELECTIVE RELATIVE DES 4N ET DES 2N (on conserve l'hypothèse d'un mélange au hasard des gamètes)**



**FIGURE 3 : EFFET DE L'ISOLEMENT REPRODUCTEUR SUR LA VALEUR DU FLUX CRITIQUE (SCENARIO 2 : On suppose qu'une partie seulement des gamètes se mélange au hasard et l'on introduit différentes valeurs sélectives)**

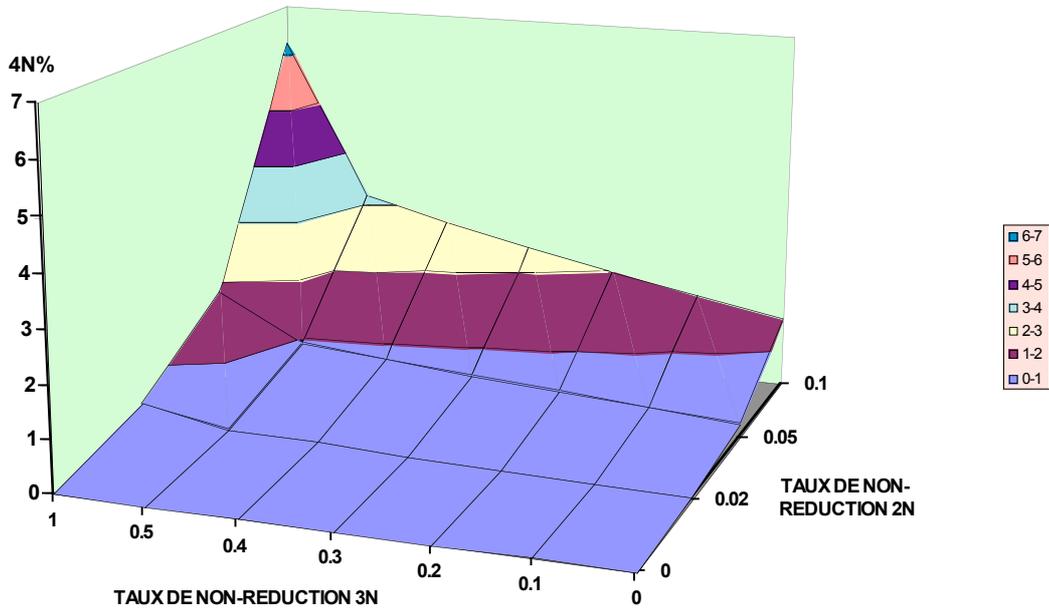


**FIGURE 4 : EVOLUTION POSSIBLE D'UNE POPULATION TRIPLOIDE (à 99,9%) SELON LE TAUX a D'AMEIOSE. La population bascule vers l'état tétraploïde si a est supérieur à 1,5%**

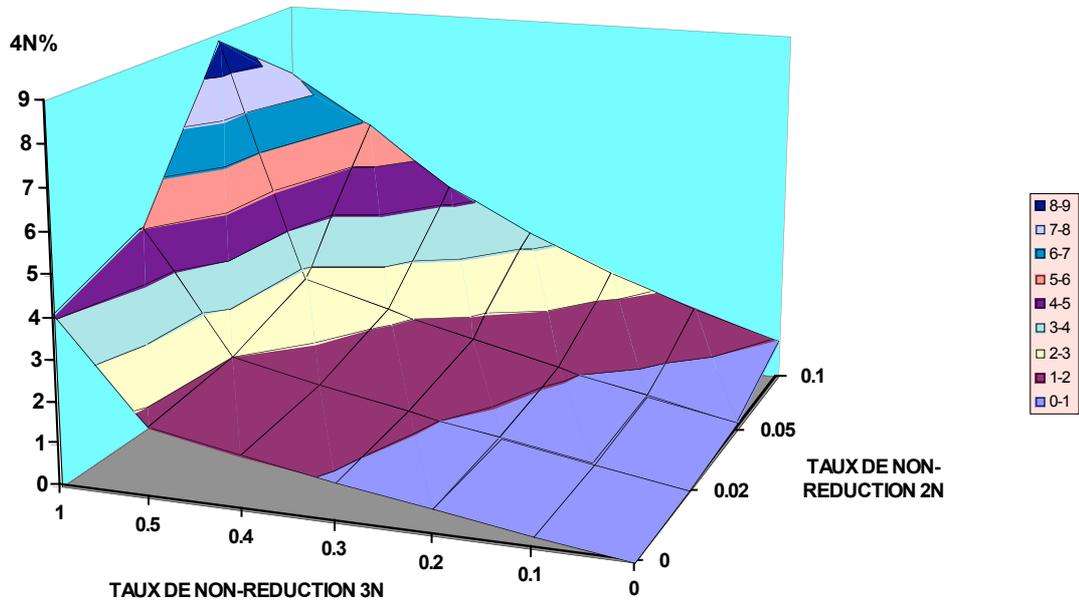


**FIGURE 5 : IMPORTANCE DE LA PRODUCTION ENDOGENE DE 4N EN FONCTION DE LA FREQUENCE DE GAMETES NON-REDUITS PRODUITS PAR LES 2N ET LES 3N (On suppose que la stérilité des 3n n'est pas complète et qu'ils contribuent à la production de gamètes dans une proportion  $t$  (10% dans ce cas ,ce qui est sans doute une valeur très surestimée). Même valeur sélective pour les 2n et les 4n.**

**FIG. 5A : pas d'apport de triploïdes à chaque génération**



**FIG 5B : Elevage de triploïdes dans la zone avec un apport représentant 40% des animaux élevés à chaque génération.**



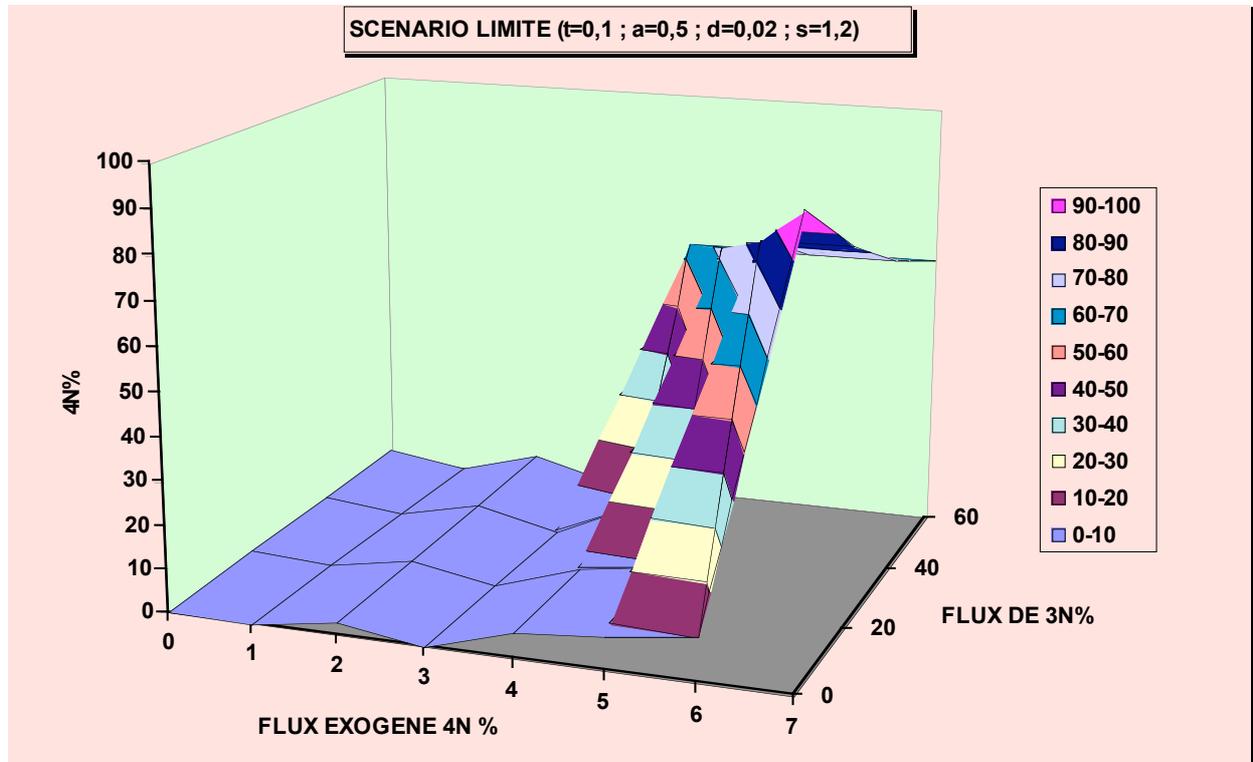
**FIGURE 6 : COMBINAISON D'UN FLUX EXOGENE, D'UN FLUX ENDOGENE ET D'UNE VALEUR SELECTIVE AVANTAGEANT LES TETRAPLOIDES : valeurs limites des flux exogènes de 4n et de 3n conduisant au basculement vers des populations tétraploïdes.**

t = fécondité relative des 3n par rapport aux 2n

a = taux de production de gamètes non-réduits par les 3n

d = taux de production de gamètes non-réduits par les 2n

s = valeur sélective des 4n par rapport aux 2n





**Annexe III :**  
**Simulation de l'évolution de populations contenant des  
hyperdiploïdes**



## SIMULATION DE L'EVOLUTION DE POPULATIONS CONTENANT DES HYPERDIPLOIDES

Nous avons considéré une population qui serait constituée de proportions variables d'individus  $2n$ ,  $2n+1$  et  $2n+2$ , les individus  $2n+1$  et  $2n+2$  étant fertiles mais ayant une viabilité  $v$  inférieure à celle des  $2n$ . On suppose en outre que les individus ayant 3 chromosomes surnuméraires ou plus sont inviables.

Compte tenu des données observées sur la descendance des  $3n$ , nous avons considéré que la contribution de ces  $3n$  à la production de nouveaux aneuploïdes était négligeable par rapport à celle issue du croisement des aneuploïdes existant avec des  $2n$ .

En supposant des proportions initiales  $x$ ,  $y$  et  $z$  d'individus  $2n$ ,  $2n+1$  et  $2n+2$ , les proportions de gamètes produits seront :

$$g \text{ (gamètes } n) = x + y/2 = z/4$$

$$h \text{ (gamètes } n+1) = y/2 + z/2$$

$$i \text{ (gamètes } n+2) = z/4$$

Dans l'hypothèse de panmixie, on supposant une même viabilité relative  $v$  pour les individus  $2n+1$  et  $2n+2$ , les fréquences suivantes seront observées dans la génération résultante pour les différents génotypes :

$$x = g^2/S$$

$$y = 2vgh/S$$

$$z = (2vgi + vh^2)/S$$

$$\text{avec } S = vh^2 + 2vgh - (1 - 2v) g^2$$

On peut modéliser sous excel les fréquences de  $x$ ,  $y$  et  $z$  dans les générations successives. On observe (figure 1) que, dans le cas où  $v = 1$ , les individus  $2n + 2$  déclinent rapidement mais que les individus  $2n+1$  perdurent longtemps dans la descendance (mais on ne peut parler vraiment dans ce cas de fardeau génétique) avec même parfois une augmentation temporaire de leur fréquence.

Par contre, dès que  $v$  est inférieur à 1, on observe une diminution plus ou moins rapide de leur fréquence, d'autant plus rapide que  $v$  est faible. **On peut donc conclure au fait qu'un éventuel fardeau génétique produit par des  $3n$  fertiles restera à un niveau très faible et sera rapidement éliminé si l'on met fin à l'élevage de ces triploïdes.**

Figure 1 : exemple d'évolution des fréquences d'individus  $2n+1$  et  $2n+2$  pour deux valeurs  $s$  de leur viabilité relative par rapport aux  $2n$  (fréquence initiale de 20% pour les deux génotypes)

