

Maisons-Alfort, le 23 novembre 2001

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

AVIS

Saisine n° 2001-SA-0080

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la présentation d'éléments scientifiques d'appréciation de l'équivalence des huîtres *Crassostrea gigas* triploïdes, par rapport à des organismes diploïdes ou "sauvages", en vue de répondre à certaines inquiétudes des consommateurs

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a été saisie le 20 mars 2001 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes afin de disposer des éléments scientifiques d'appréciation de l'équivalence des huîtres *Crassostrea gigas* triploïdes, par rapport à des organismes diploïdes ou "sauvages", en vue de répondre à certaines inquiétudes des consommateurs. L'Association Force Ouvrière Consommateurs avait également saisi l'Afssa sur ce sujet le 18 septembre 2000.

CONTEXTE

Des recherches effectuées sur les organismes marins et plus récemment sur les huîtres ont conduit à produire des organismes stériles dotés de trois génomes de base par croisement d'huîtres tétraploïdes avec des huîtres diploïdes. Sur le plan organoleptique, les huîtres triploïdes ne sont plus laiteuses (gamétogenèse incomplète) et présentent, toute l'année, les caractéristiques des huîtres hivernales. Par ailleurs les gains de croissance observés seraient de 22% à 38 %.

Le comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 22 octobre et le 21 novembre 2001, a orienté sa réflexion sur les questions suivantes :

- le caractère polyploïde constitue-t-il en lui-même un facteur de risque sanitaire ?
- des incidents particuliers liés à la consommation d'huîtres triploïdes par rapport à des huîtres diploïdes ont-ils été rapportés ?
- le caractère triploïde a-t-il une influence sur les performances biologiques par rapport aux huîtres diploïdes, notamment au regard du pouvoir de filtration et du risque d'accumulation vis-à-vis des contaminants de l'environnement ?

LA POLYPLOÏDIE DANS LE REGNE VÉGÉTAL ET ANIMAL

Le génome de base d'un organisme est caractérisé par le nombre de chromosomes non homologues contenu dans le noyau d'une cellule (par exemple 23 chez l'homme, 10 chez l'huître, 14 chez le blé dur). Les êtres vivants, surtout dans le règne animal, sont généralement diploïdes, leur génome étant constitué de deux génomes de base, l'un d'origine maternelle, l'autre d'origine paternelle.

Un organisme polyploïde est un organisme animal ou végétal qui possède plus de deux génomes de base. Les polyploïdes dont le nombre de génome de base est pair sont fertiles, les polyploïdes dont le génome de base est impair sont généralement stériles.

La polyploïdisation a joué un rôle important dans l'évolution spontanée de nombreuses espèces surtout chez les végétaux où elle est très répandue à l'état naturel.

La polyploïdie végétale

Près de la moitié des espèces végétales sont polyploïdes. La forme tétraploïde est la plus fréquente. En effet, au cours de l'évolution des espèces, on retrouve les formes ancestrales diploïdes, localisées souvent dans leur aire d'origine. Des formes polyploïdes fertiles, plus diversifiées, sont apparues naturellement, dont les propriétés ont eu pour conséquence d'accroître leur aire de répartition. De nombreuses espèces du règne végétal ont accumulé des génomes dans un même noyau. Parmi les espèces les plus connues, on peut citer le blé (hexaploïde), les poireaux (tétraploïde), les pommes de terre (tétraploïde), les fraises (octaploïde), certaines espèces d'aubergines (tétraploïdes).

Les espèces tétraploïdes peuvent être croisées avec des diploïdes, ce qui conduit généralement à la production de triploïdes. Une telle situation perturbant fortement la formation des cellules sexuelles, les graines de ces espèces sont peu nombreuses et abortives. L'absence de pépins chez la banane ou certaines variétés d'agrumes ou de pastèques illustre cet intérêt des triploïdes.

A ces polyploïdes naturels, on peut ajouter des formes créées par l'Homme dans les espèces suivantes : la betterave, le navet, les trèfles violets, les ray-grass. Cette polyploïdisation s'obtient en bloquant la division cellulaire avec des substances comme la colchicine.

Les formes polyploïdes (naturelles ou artificielles) sont généralement plus vigoureuses. Elles ont une diversité très grande d'interactions génétiques et enzymatiques qui a pour conséquence une meilleure homéostasie vis-à-vis des variations environnementales et une plus grande possibilité d'exploitation du substrat.

Les effets additifs de l'accumulation de gènes ont des conséquences au niveau cellulaire, physiologique et morphologique. Le développement dans le temps des formes polyploïdes est souvent plus lent (durée plus importante de l'état méristématique, différenciation plus lente avec floraison plus tardive que les diploïdes correspondants). L'épaisseur et les dimensions foliaires sont aussi souvent accrues par la polyploïdie mais les intensités de ramification et de tallage sont diminuées.

La polyploïdie a également pour conséquence de changer la composition des tissus en protéines et en substances de synthèse (pigment, auxines, vitamines etc..). Ces observations ont été faites aussi bien sur les protéines du métabolisme cellulaire que dans les substances de réserve d'une graine.

Des interactions entre gènes homologues sont souvent mises à profit, au cours des générations de reproduction de ces polyploïdes, pour sélectionner des caractères agronomiques d'intérêt.

La polyploïdie animale

Alors qu'elle est souvent observée chez les plantes, la polyploïdie naturelle est plus rare chez les animaux et souvent associée avec une reproduction asexuée (gynogenèse). Chez les poissons, notamment chez les salmonidés, différentes espèces présentent à l'état naturel des formes triploïdes ou tétraploïdes. Chez les bivalves marins, comme les coquilles Saint-Jacques, qui sont des organismes sexués diploïdes, on peut également observer des individus polyploïdes. En période de reproduction, ces animaux aquatiques diploïdes subissent une réduction de leur croissance liée à la mise en place de la gamétogenèse. Au contraire, la triploïdie est le plus souvent associée à une forte réduction du développement gonadique et donc à une meilleure croissance. La maîtrise de cette technique est donc d'un intérêt certain pour l'aquaculture.

De nombreux essais ont eu lieu pour induire cette polyploïdie chez les animaux. Des méthodes simples (traitement bref des œufs par des températures basses ou élevées ou de hautes pressions peu après la fécondation) ont été mises au point pour produire des triploïdes et des tétraploïdes, mais il est apparu que seuls les invertébrés et les vertébrés inférieurs (poissons et amphibiens) pouvaient donner des individus polyploïdes viables. Actuellement, les applications de la triploïdie sont limitées aux truites et aux huîtres.

LA TRIPLOÏDIE CHEZ L'HUITRE *CRASSOSTREA GIGAS*

Le mode d'obtention des huîtres triploïdes

Les recherches sur la polyploïdisation ont principalement commencé aux Etats-Unis dans les années 1980. En France, ces travaux ont été approfondis à partir des années 1990 dans plusieurs centres de recherche public et privé. Deux types de techniques ont été développés depuis 1980 pour obtenir des huîtres triploïdes.

Obtention d'un triploïde directement avec un inhibiteur de la division de l'œuf après fécondation (traitement chimique)

Pour obtenir un individu triploïde, il est nécessaire de provoquer la rétention du second globule polaire pendant la méiose de l'œuf. Différentes techniques ont été mises au point qui permettent d'obtenir des individus triploïdes.

- L'application d'un traitement à la cytochalasine B (inhibiteur de la polymérisation des fibres d'actine) est le traitement classiquement utilisé pour induire la polyploïdisation chez l'huître. Ce traitement est assez efficace (obtention en moyenne d'environ 80% d'individus triploïdes) et a été largement utilisé. Cependant, ce traitement peut conduire à des mortalités significatives au stade larvaire.
- Plus récemment, une nouvelle méthode a été mise au point qui utilise le 6-diméthylaminopurine (6-DMAP). Ce traitement présente une efficacité au moins comparable à celui par la cytochalasine mais avec des mortalités plus faibles.

Cette technique implique de répéter le traitement chimique des œufs à chaque génération en utilisant des molécules fortement toxiques comme la cytochalasine B et, bien que le succès de la triploïdisation soit élevé, il est très rarement de 100%.

Des traitements physiques (choc thermique, choc de pression) ont également été testés mais conduisent à des taux de triploïdisation plus faibles.

Obtention d'un triploïde par croisement d'un tétraploïde avec un diploïde

Des équipes de recherche ont développé une stratégie plus efficace pour produire des triploïdes en croisant des individus tétraploïdes, obtenus par blocage d'un globule polaire, avec des individus diploïdes. Des techniques d'obtention de tétraploïdes ont été mises en œuvre dès 1994 aux Etats-Unis et plus récemment en France par l'IFREMER.

La production d'huîtres triploïdes

En France

L'intérêt aquacole de l'utilisation d'individus triploïdes a conduit, ces dernières années, au développement de cette production en France. Dans une première période (1994-1999), les huîtres triploïdes étaient obtenues après traitement chimique des œufs après fécondation et ces produits (naissains triploïdes) ont été commercialisés auprès des professionnels. Cette production peut être estimée, en 1994, à quelques millions de naissains pour aboutir en 1999 à une centaine de millions de naissains représentant environ 5% de la production nationale ostréicole. A partir de ces naissains, des huîtres ont donc été mises sur le marché en quantités variables mais croissantes entre 1994 et 1999 (en 1999, environ 15.000 tonnes ont été commercialisées).

A partir de 1999, une certaine maîtrise de la production de lignées tétraploïdes par l'IFREMER a permis à plusieurs éclosiers de proposer des naissains triploïdes issus en totalité de croisements tétraploïdes/diploïdes pour lesquels le taux de succès était de l'ordre de 100%. Ainsi, en 1999, 250 millions de naissains ont été vendus aux producteurs et les premières huîtres provenant du grossissement de ces naissains devraient être commercialisées à la fin de l'année 2001. Il est important de noter que les lignées tétraploïdes restent très fragiles (de fortes mortalités sont observées) ce qui conduit à l'utilisation chaque année d'un nombre limité de mâles tétraploïdes pour la production des naissains triploïdes.

Aux Etats-Unis

Il existe sur la côte ouest des Etats-Unis une production importante d'huîtres *Crassostrea gigas* triploïdes, représentant environ 40% de la production américaine d'huîtres *C. gigas*, obtenues en partie par traitement chimique (depuis environ 15 ans, ces huîtres triploïdes sont commercialisées sur le marché américain) et plus récemment par croisement tétraploïdes/diploïdes.

PERFORMANCES BIOLOGIQUES COMPAREES DES HUITRES TRIPLOÏDES ET DIPLOÏDES

Des études comparatives visant à évaluer les performances de survie et de croissance des huîtres triploïdes et diploïdes ont été réalisées en milieu expérimental et naturel.

Les performances de survie

Selon les données fournies par l'IFREMER, des différences entre huîtres diploïdes et triploïdes sont observées lorsque l'on considère les performances de survie en période estivale (mai-juillet) : chez les individus diploïdes, de fortes mortalités sont en général observées dans les élevages (50-70%) alors que, dans les mêmes conditions d'élevage en milieu naturel, des huîtres triploïdes (croisement tétraploïdes/diploïdes) présentent une mortalité globale de l'ordre de 10%. Cependant, la survie des huîtres triploïdes obtenues par traitement chimique est équivalente à celle des huîtres diploïdes. Ceci illustre sans doute le fait que les deux modes de production de triploïdes ne conduisent pas nécessairement à des individus identiques quant à l'expression de caractères zootechniques. Cela suggère aussi que l'absence de gamétogenèse complète n'explique pas à elle seule la réduction de mortalité estivale.

Les performances de croissance

Huîtres triploïdes obtenues par traitement chimique

Des travaux physiologiques ont été réalisés et publiés sur les huîtres triploïdes issues d'un traitement chimique (en général, cytochalasine B) et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus sur des huîtres diploïdes. L'analyse des performances montre en général une meilleure croissance liée à une augmentation du taux d'alimentation, une demande réduite en besoins énergétiques et une plus grande efficacité d'absorption des nutriments.

Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer ces différences de performances (influence de la stérilité induite par la triploïdie...) mais de récents travaux confortent l'idée que ces meilleurs résultats de croissance sont associés à une augmentation de la variabilité allélique plutôt qu'à un effet quantitatif du statut de polyploïde.

Huîtres triploïdes obtenues par croisement tétraploïdes/diploïdes

En ce qui concerne les triploïdes issues d'un croisement tétraploïdes/diploïdes, très peu de données bibliographiques sont disponibles. Selon des informations de l'IFREMER, de meilleures performances de croissance des triploïdes par rapport aux diploïdes sont observées sur différents sites de production en milieu naturel (au niveau du poids de la coquille mais pas au niveau du poids sec). D'autres travaux, réalisés en conditions d'élevage optimales en structure expérimentale par l'IFREMER, semblent indiquer une différence au niveau du poids sec et au niveau de la consommation d'oxygène mais la comparaison sur les fonctions standardisées pour l'acquisition ou la dépense d'énergie reste plus difficile à interpréter. L'ensemble de ces travaux reste préliminaire et mériterait d'être approfondi. Ils confirment aussi l'influence des facteurs du milieu dans l'expression des caractères génétiques chez l'huître. Il est donc important de bien intégrer ces facteurs "milieu d'élevage" lorsque l'on compare les performances de croissance des huîtres diploïdes et triploïdes.

Etudes des paramètres physiologiques

Il est indiqué par l'IFREMER que des premières études comparatives de laboratoire relatives à la composition biochimique (glucidique, lipidique, protéique) ont été réalisées. Ces résultats préliminaires ne semblent pas mettre en évidence de différences significatives entre les huîtres triploïdes et diploïdes, hormis une augmentation attendue de la teneur en glycogène et une plus faible concentration en lipides chez les huîtres triploïdes durant la période estivale. Ces études ne sont pas publiées.

Des connaissances sur la capacité de filtration et d'absorption des huîtres triploïdes par rapport aux diploïdes seraient déterminantes au regard des contaminants de l'environnement (métaux lourds, phycotoxines) et du risque d'accumulation. Il convient cependant de noter que les connaissances sur

le pouvoir d'accumulation des huîtres diploïdes vis-à-vis des contaminants de l'environnement sont elles-mêmes peu documentées ; un programme de recherche du ministère de l'Environnement est en cours sur les huîtres diploïdes, axé sur l'évaluation des métaux lourds, des produits phytosanitaires et plus généralement de l'influence de la pollution environnementale sur la qualité des huîtres et sur leur système immunitaire.

Il est souligné que la réglementation¹ impose des contrôles sanitaires qui visent à assurer la sécurité du consommateur vis-à-vis du risque microbiologique, phytoplanctonique et toxique. De plus, la culture des huîtres doit être faite dans des zones dont les teneurs en métaux lourds (Pb, Cd et Hg) ne conduisent pas à une accumulation dans l'huître supérieure à des normes fixées au niveau national^{1,2}.

Dans l'état actuel des données disponibles, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que les éléments de réponse suivants peuvent être apportés aux questions posées :

- le caractère polyploïde des huîtres ne paraît pas constituer en lui-même un facteur de risque sanitaire au regard de l'existence de ce phénomène, à l'état naturel dans les règnes animal et végétal, et de son recul d'utilisation à des fins d'amélioration des espèces ;
- les huîtres triploïdes sont consommées depuis de nombreuses années, sans qu'aient été rapportés d'incidents particuliers liés à leur consommation. Cependant, aucune donnée disponible ne permet d'évaluer si l'incidence des toxi-infections alimentaires observées après consommation d'huîtres est différente entre des huîtres triploïdes et diploïdes ;
- il n'existe pas de données disponibles sur le pouvoir potentiel accumulateur des huîtres triploïdes comparé aux diploïdes en fonction des conditions de milieu et vis-à-vis des polluants de l'environnement ; les connaissances sur cet aspect de la physiologie de l'huître diploïde sont elles-mêmes très fragmentaires.

S'il peut être rappelé que des contrôles sanitaires sont régulièrement effectués dans les zones de production ostréicole en vue de garantir la sécurité du consommateur, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments recommande cependant d'étudier de manière comparative, dans le cadre d'un programme de recherche adapté, les capacités de bioaccumulation et de dépuraction des huîtres triploïdes et diploïdes vis-à-vis des métaux lourds, des bactéries et des phycotoxines, en prenant en compte l'influence des perturbations liées aux facteurs environnementaux. Dans l'attente de ces résultats, bien que rien n'indique que les huîtres triploïdes présentent un risque particulier, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments recommande un renforcement des contrôles sanitaires sur les zones de production d'huîtres triploïdes à l'égard des contaminants de l'environnement d'une part dans un souci de vigilance et d'autre part en vue d'améliorer les connaissances sur le comportement de ces huîtres dans le milieu naturel.

Martin HIRSCH

¹ Décret 94-340 du 28 avril 1994 relatif aux conditions sanitaires de production et de mise sur le marché des coquillages vivants et arrêté du 21 mai 1999 relatif au classement de salubrité et à la surveillance des zones de production et des zones de reparcage des coquillages vivants.

² Un nouveau règlement européen (CE) 466/2001, applicable à partir du 5 avril 2002, fixe des teneurs maximales en contaminants Pb, Hg et Cd pour les mollusques bivalves lors de leur mise en circulation.