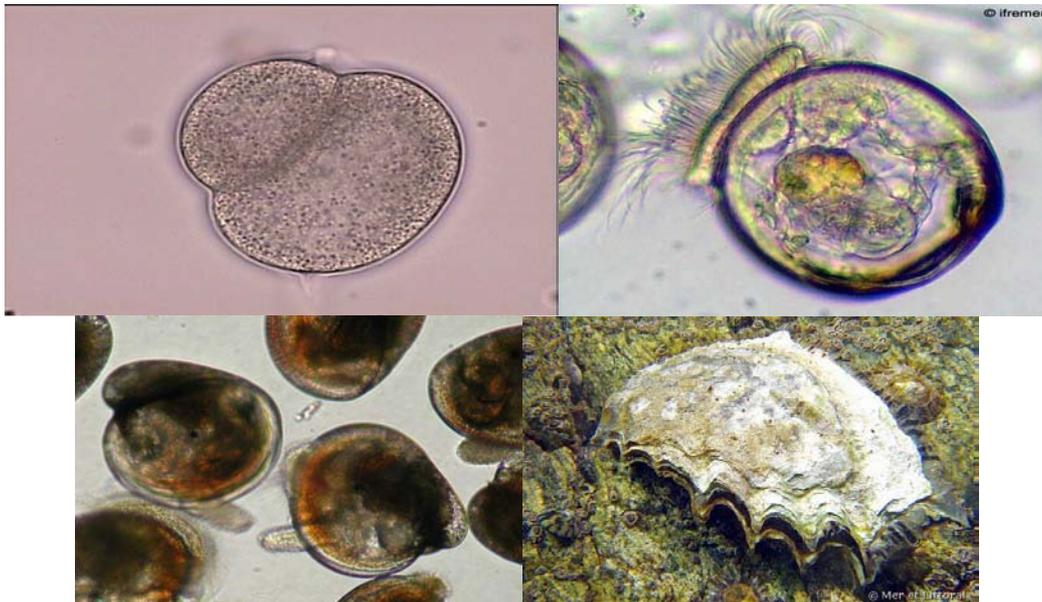




Institut Universitaire et Technologique
Département Génie Biologique
15 rue François Vaux de Foletier
17026 LA ROCHELLE cedex 01

*Optimisation des approches de gynogenèse chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en utilisant l'inactivation du sperme par les UV.*



Mlle ASSATI Sabrina 2006/2007

Ce stage a été effectué au

Laboratoire de Génétique et Pathologie
Avenue du Mus de loup
Ronce les Bains
17390 La Tremblade

Du 16 Avril 2007 au 22 Juin 2007.

Mlle ASSATI Sabrina

RESPONSABLE DANS L'ENTREPRISE : Mr Abdellah BENABDELMOUNA

TUTEUR PEDAGOGIQUE : Mr Cyril BARTHELEMY

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier Mr Jean PROU pour m'avoir accueillie au sein de la station Ifremer de La tremblade, ainsi que Mr Tristan RENAULT pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein du laboratoire LGP.

Je remercie toute l'équipe de l'Ifremer qui s'est toujours montrée disponible et agréable, ce qui m'a permis de me sentir à mon aise très rapidement.

Un grand merci à tous les stagiaires, Stéphanie, Laurence, Mathilde, Clément, Nicol, Leslie, Jessica... Avec qui j'ai passé de bons moments pendant toute la durée de ce stage.

Merci à Stéphanie pour son écoute et sa bonne humeur.

Merci aussi à Serge pour m'avoir très bien reçu dans son bureau.

J'adresse un grand remerciement à Christophe LEDU qui a toujours su me donner de très bons conseils, être disponible à tous moments, et qui m'a permis de devenir autonome. Travailler à ses côtés a toujours été un moment agréable.

Je remercie aussi l'IUT sans qui ce stage n'aurait pas été possible.

Je remercie mes amis, ma famille et benoit pour m'avoir supportée (dans les deux sens du terme !) tout le long de ces deux mois et demi.

Et le meilleur pour la fin, un très grand merci à mon maître de stage Benabdelmouna Abdellah, pour sa disponibilité, sa générosité, sa patience et sa grande aide surtout pour l'écriture de ce rapport ! J'ai reçu une très bonne formation, au niveau de la manipulation, des interprétations, et des connaissances sur les huîtres. Ce fut un plaisir d'élever ces larves qui m'ont fascinée pendant tout le stage. Grâce à lui je ne vois plus les huîtres du même œil.

SOMMAIRE

<u>I. AVANT PROPOS</u>	<u>5</u>
<u>II. INTRODUCTION</u>	<u>6</u>
<u>III. MATERIEL ET METHODE</u>	<u>11</u>
III.1. PRODUCTION DE PHYTOPLANCTON ET CONDITIONNEMENT DES GENITEURS	11
III.1.1. PRELEVEMENT DES GAMETES	12
III.1.2. COMPTAGE DES GAMETES	12
III.2. MANIPULATIONS GYNOGENETIQUES	13
III.2.1. IRRADIATION DU SPERME PAR LES UV	13
III.2.2. FECONDATION ET RESTAURATION DE LA DIPLOIDIE	14
III.3. ELEVAGE LARVAIRE	15
III.4. MICRONURSERIE ET NURSERIE	17
<u>IV. RESULTATS ET DISCUSSION</u>	<u>17</u>
IV.1. EXPERIENCE 1	17
IV.1.1. RESULTATS DE L'ELEVAGE LARVAIRE ET ANALYSES CYTOMETRIQUES	18
IV.2. EXPERIENCE 2	23
IV.2.1. RESULTATS DE L'ELEVAGE LARVAIRE ET ANALYSES CYTOMETRIQUES	24
IV.3. EXPERIENCE 3	25
IV.3.1. RESULTATS DE L'ELEVAGE LARVAIRE ET ANALYSES CYTOMETRIQUES	27
<u>V. CONCLUSION</u>	<u>30</u>
<u>Bibliographie</u>	<u>31</u>

I. AVANT PROPOS

L'IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER, est un institut national de recherche marine créé en 1984 et qui contribue à la connaissance des océans et de leurs ressources, à la surveillance du milieu marin et littoral et au développement durable des activités maritimes. C'est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC), placé sous la tutelle conjointe des ministères chargés de la Recherche, de l'Agriculture et de la Pêche, de l'Équipement et des Transports, de l'Écologie et du Développement durable. L'Ifremer est présent dans 26 implantations réparties sur tout le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM. L'Institut est structuré en 5 centres (Boulogne, Brest, Nantes, Toulon et Tahiti) dirigés par le siège social de Paris.

La station Ifremer de la Tremblade est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral. Sa compétence géographique pour l'environnement littoral s'étend de la rive gauche de la Charente à la Gironde. Dans le domaine conchylicole ses compétences géographiques s'étendent sur l'ensemble des pertuis charentais, depuis le Sud de la Vendée jusqu'à l'estuaire de la Gironde. La station compte deux laboratoires. Le laboratoire LCPC (Laboratoire Conchylicole du Poitou Charente) et le laboratoire LGP (Laboratoire de Génétique et Pathologie).

Le laboratoire LGP est impliqué dans l'acquisition de connaissances concernant l'amélioration génétique, le contrôle des performances et la santé des espèces d'intérêt en aquaculture marine. Ces travaux sont aujourd'hui reconnus mondialement et ont permis des avancées certaines dans le domaine de la conchyliculture (huîtres triploïdes, développement d'outils de diagnostic, détection de nouveaux agents infectieux ...). Le laboratoire a été et est aujourd'hui aussi très fortement impliqué dans la surveillance de la ressource. Il assure en particulier la surveillance des coquillages en terme de santé animale. Il opère également la surveillance des sites nationaux de captage d'huîtres en terme de ploïdie. Ainsi, en plus de son positionnement régional fort, il a clairement une dimension nationale et internationale.

II. INTRODUCTION

Les premières huîtres creuses qui apparurent sur les côtes françaises appartiennent à l'espèce *Crassostrea angulata* (huître creuse portugaise). Elles furent importées en 1860 suite à la disparition de l'huître plate *Ostrea edulis* seule espèce endémique des côtes françaises. Cette dernière disparut suite à l'apparition de parasites. *Crassostrea angulata* fut à son tour décimée par deux maladies d'origine virale (maladie des branchies, Comps et Duthoit, 1976 ; Comps *et al.*, 1976 ; maladie hémocytaire, Comps, 1983), dès lors on importa du Japon au début des années 70 des naissains d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* (huître creuse japonaise) pour soutenir les entreprises conchyliques (Grizel et Héral. 1991). L'expansion de cette espèce fut rapide et elle représente de nos jours 95% de la production d'huître française (FAO, 2006). Sa production est basée à 90% sur le captage naturel du naissain dans les deux bassins ostréicoles d'Arcachon et de Marennes-Oléron.

L'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* est, contrairement à la moule, hermaphrodite. Elle est capable de changer de sexe soit durant une même saison de reproduction, ce qui est rare, soit au cours de saisons consécutives. Les raisons de son changement de sexe ne sont pas encore connues, mais il a été constaté que plus l'huître vieillissait et plus elle avait de chance de devenir une femelle. La saison de reproduction s'étend de juin à septembre. Lorsqu'elles pondent, les femelles expulsent les ovules (plusieurs millions) en effectuant des battements des valves tandis que les mâles laissent échapper les spermatozoïdes comme un mince filet continu, en entrouvrant leurs valves.

La fécondation a donc lieu dans l'eau et au bout de 24h apparaît une petite larve d'huître appelée larve D (figure1), car elle a la forme de cette lettre. La vie nageuse de la larve appelée véligère dure une vingtaine de jours pendant lesquels elle grandit et subit des transformations. Ensuite elle devient oeillée, une tache sombre apparaît ainsi qu'un pied (figure2) qui va lui permettre de ramper pour pouvoir se fixer.

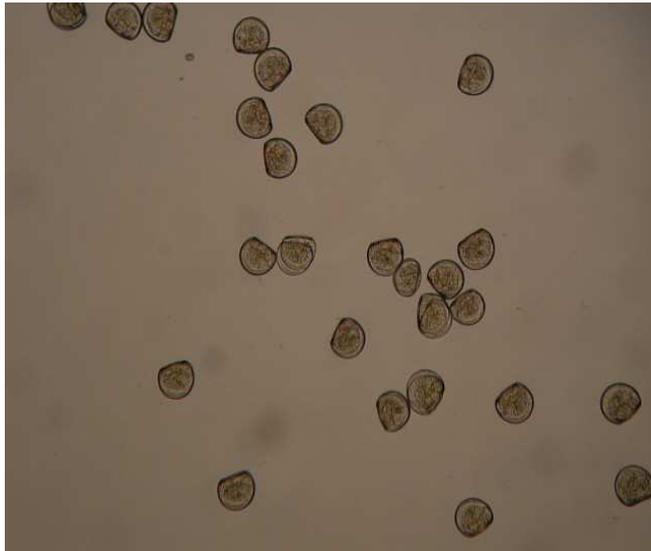


FIGURE 1 : Photo de larves D obtenues au bout de 24 heures, (photo C. LEDU)



FIGURE 2 Larve pédivéligère, (photo C. LEDU)

Une fois fixée, la larve subit d'autres transformations et alors elle devient un naissain (jeune huître). Les *Crassostrea* vivent dans les estrans (partie du littoral découvrant à chaque marée), contrairement à d'autres espèces. Sa classification est la suivante :

<u>Règne :</u>	Animal
<u>Embranchement :</u>	Mollusque
<u>Classe :</u>	Bivalve

<u>Ordre :</u>	Filibranchia
Sous ordre :	Anisomyaria
<u>Famille :</u>	Ostreidae
<u>Genre :</u>	Crassostrea
<u>Espèce :</u>	gigas

Dès son introduction dans les estuaires cette espèce connaît elle aussi des mortalités chroniques (Maurer et Comps 1986 ; Bodoy et al. 1990). Les causes exactes de ces mortalités sont encore inconnues, et beaucoup de projets de recherches ont été lancés afin de pouvoir les identifier.

Cependant plusieurs facteurs ont été incriminés :

- un facteur environnemental lié à la température élevée de l'eau, supérieure à 20°C (Cheney et al. 2000),

- un facteur lié à l'huître elle-même (génétique, physiologie, immunologie). A titre d'exemple, l'état physiologique des huîtres en période estivale est primordial durant les épisodes de mortalités estivales. Les huîtres utilisent la majorité de leur réserve énergétique pour la reproduction et tout particulièrement lors de la ponte où leurs réserves de glycogènes se retrouvent au plus bas. Pendant cette période elles ne peuvent donc se défendre (Berthelin *et al.*, 2000) contre toutes les agressions extérieures comme le choc de température, la nourriture déficiente, les attaques bactériennes ou parasitaires. Au début des années 2000, IFREMER a initié un grand programme de recherche (MOREST) pour lutter contre les MORTalités ESTivales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Dans le cadre de ces projets de recherche, l'obtention de lignées clonales est une valeur importante (Chourrout 1989). En effet, il est important de disposer de souches génétiquement uniformes pour faciliter les recherches tant en génétique, qu'en pathologie, immunologie ou bien physiologie. La consanguinité est classiquement utilisée pour s'approcher de l'état homozygote. Seulement cette méthode reste longue à réaliser. Puisque pour obtenir un résultat il faut attendre plusieurs générations d'individus.

La méthode la plus rapide se fait en induisant la reproduction uniparentale, comme la gynogenèse, l'androgenèse et l'autofécondation. Cette méthode est

entièrement maîtrisée en agronomie surtout sur les plantes. Chez les animaux, la reproduction uniparentale est létale pour les oiseaux et les mammifères et reste encore à être optimisée chez les mollusques bivalves.

Dans le cadre de ce stage, seule la gynogenèse a été étudiée. La gynogenèse est un mode de reproduction dans lequel l'action du spermatozoïde se limite à l'activation de l'ovocyte. L'œuf se développe donc à partir du seul génome maternel. Le développement haploïde de l'œuf a lieu suite à un traitement mutagène des spermatozoïdes les rendant génétiquement inactifs. Pour compenser l'absence de pronucleus mâle, les œufs haploïdes inséminés doivent être traités afin de doubler leur matériel génétique et ainsi devenir diploïde. Cette méthode a été décrite pour la première fois chez les grenouilles par Hertwig en 1911. Il existe deux types de gynogenèses différentes, la gynogenèse méiotique et la gynogenèse mitotique.

- La gynogenèse méiotique consiste à rétablir la diploïdie en supprimant l'une des deux divisions méiotiques de l'ovocyte (généralement la deuxième) (figure 3). Issus d'une division méiotique, les individus produits par ce type de manipulation gynogénétique ne peuvent donc pas être homozygotes à 100%.

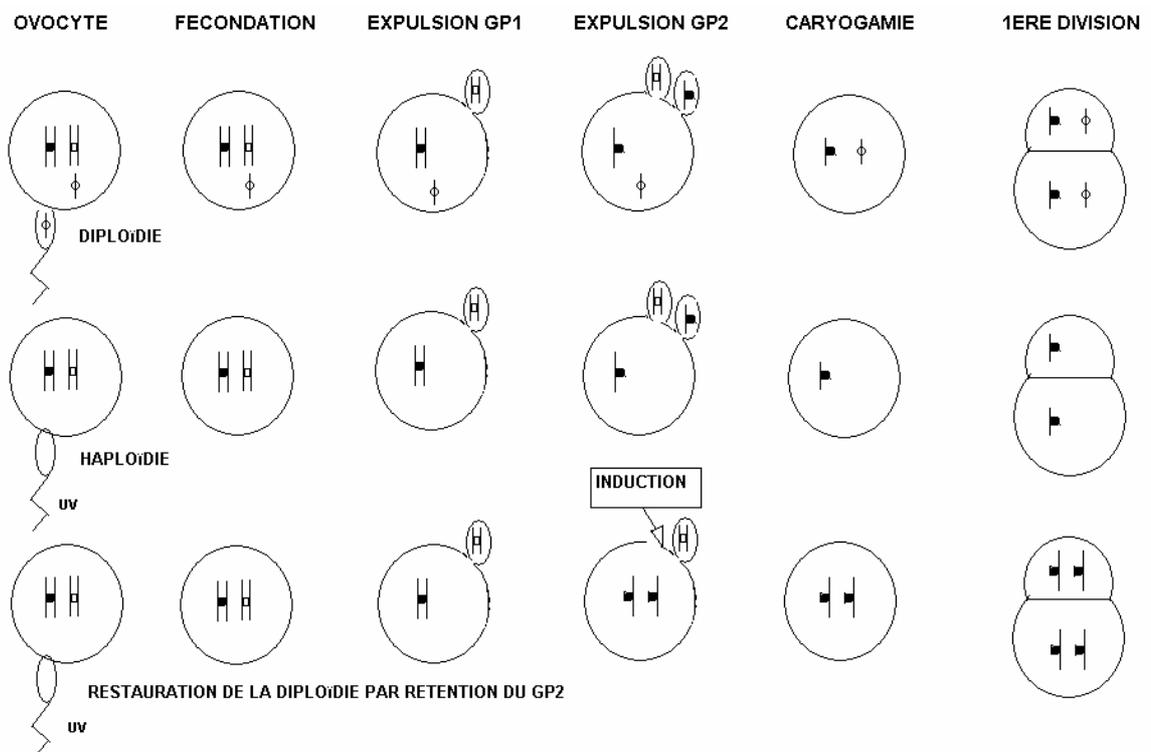


FIGURE 3 Induction de la méiogynogenèse (par rétention du GP2)

- La gynogenèse mitotique consiste à inhiber la première division de mitose de l'embryon (figure 4). Les individus produits par ce type de manipulation gynogénétique sont donc tous différents mais tous homozygotes à 100%. C'est ce type de gynogenèse qui présente le plus d'intérêt dans le but de produire des lignées génétiquement uniformes (lignées clonales).

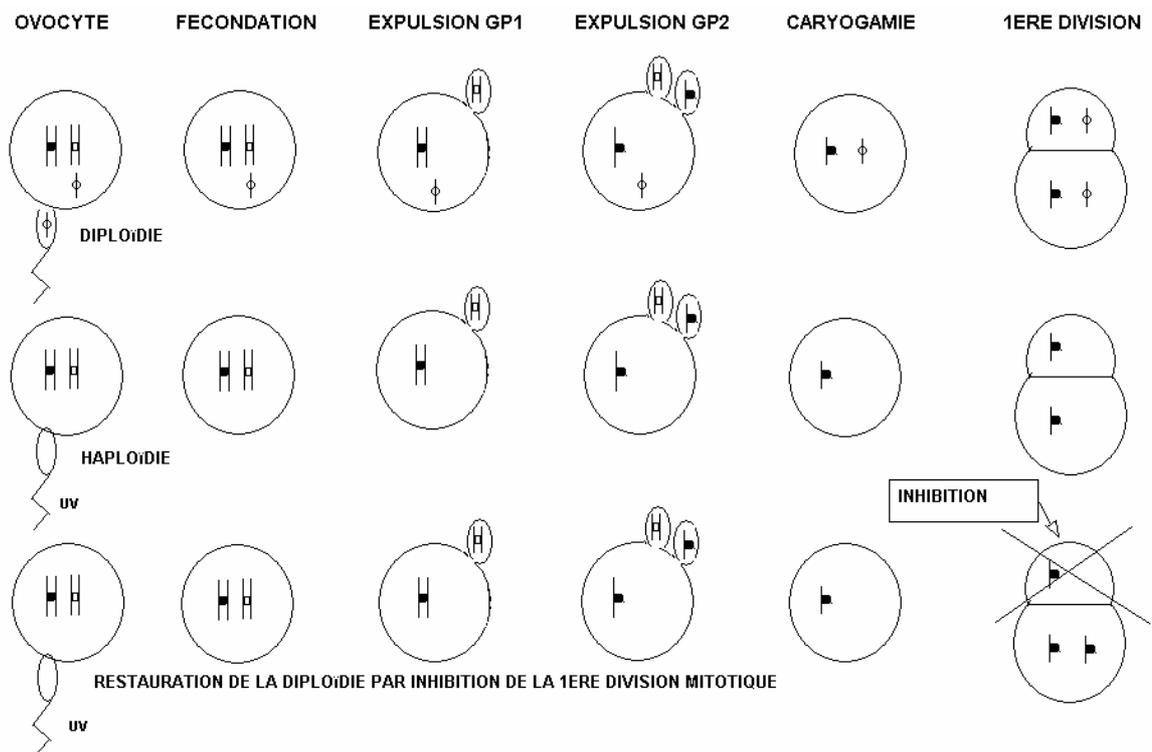


FIGURE 4 Induction de la mitogynogenèse

Chez les mollusques, aucun travail ne décrit la production de diploïdes gynogénétiques viables après inhibition de la première division mitotique. La production de diploïdes gynogénétiques viables a toujours été faite après inhibition de la méiose II (Méïogynogénèse). Cette production a été décrite chez *Halliotis discus hannai* (Fujino *et al.* 1990), *Mulinia lateralis* (Guo et Allen, 1994), *Chlamys farreri* (Pan et al. 2004), *Mytilus edulis* (Fairbrother 1994) et *Mytilus galloprovincialis* (Scarpa et al. 1994). Chez *C. gigas*, un seul travail décrit l'obtention de diploïdes gynogénétiques après inhibition de la méiose II (Guo *et al.* 1993).

Dans ce travail, notre but sera d'optimiser les manipulations gynogénétiques méiotiques et surtout mitotiques et ceci afin d'obtenir des lignées clonales (pures) d'huîtres qui seront à la base des études futures sur cette espèce. Dans un premier

temps, une partie matériel et méthode présente les expérimentations et les analyses qui ont été réalisées, dans un deuxième temps seront décrits les différents résultats des expérimentations ainsi que leur interprétations, et dans un dernier temps sera présentée la synthèse de ces résultats ainsi que les différentes perspectives possibles.

III. MATERIEL ET METHODE

III.1. PRODUCTION DE PHYTOPLANCTON ET CONDITIONNEMENT DES GENITEURS

Les microalgues sont utilisées en éclosérie pour la nourriture des mollusques. Les performances de croissance et de survie sont étroitement liées à cet apport de phytoplancton, tout particulièrement lors de l'élevage larvaire et de la maturation des géniteurs.

Les espèces généralement utilisées pour l'alimentation des larves sont :

-*Isochrysis galbana* souche tahiti : *T-iso*,

-*Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* ou *chaetoceros* sp. *Tenuissimus-like* (ex-tubo),

-*Pavlova lutheri*

-*Tetraselmis*

Une autre espèce est utilisée pour les géniteurs :

-*Skeletonema costatum*

L'eau utilisée pour la production des micro algues est une eau de forage puisée à 100 mètres de profondeur. Cette eau de forage présente toutes les caractéristiques chimiques de l'eau de mer et a l'avantage d'être limpide, de qualité constante et aseptique.

Les géniteurs des manipulations gynogénétiques sont des huîtres matures diploïdes et âgées de deux ans. Elles sont issues d'un captage naturel effectué dans l'estuaire de la Seudre. Elles ont été traitées spécialement pour être portées à maturation. Elles ont été placées dans de l'eau à 22°C, et ont été nourries continuellement, ces conditions permettent à l'huître d'arriver à maturation au bout de deux mois.

III.1.1. PRELEVEMENT DES GAMETES

Différentes méthodes sont utilisées pour obtenir les gamètes à partir d'huîtres matures. La stimulation de ponte en est une, elle peut se faire soit par induction physique (variations thermiques, mise à sec...), soit par induction chimique (variation de pH, de salinité, injection de KCL...). Ces méthodes de stimulation de ponte sont non destructives et aboutissent généralement à l'expulsion de gamètes ayant complété leur cycle de formation.

La méthode la plus rapide et la plus couramment utilisée, est la scarification des gonades et ceci bien qu'elle soit destructive. Dans ce cas, les huîtres subissent premièrement un nettoyage de surface à l'aide d'une brosse afin d'éliminer toutes impuretés et sont ensuite ouvertes. A l'aide d'une micro pipette, 50µL de gamètes sont directement prélevés dans les gonades et observés sous microscope photonique dans le but de déterminer la nature mâle (spermatozoïdes) ou femelle (ovocytes) des gamètes prélevés. Cette étape de sexage aboutit à la constitution d'un groupe de géniteurs mâles et d'un groupe de géniteurs femelles qui subiront séparément la scarification de leurs gonades afin d'obtenir une solution de spermatozoïdes ou d'ovocytes. A l'aide d'une pissette remplie d'eau de mer filtrée à 25°C (EMF), les huîtres sont d'abord rincées et leurs gonades scarifiées à l'aide d'un scalpel stérile. Les gamètes sont ensuite repris dans de l'EMF et après un tamisage à travers un tamis de 60 µm de taille de maille destiné à en éliminer les gros débris, leur volume est ajusté en utilisant de l'EMF.

III.1.2. COMPTAGE DES GAMETES

La fécondation se fait dans de l'EMF à 25°C. Le rapport entre ovocytes et spermatozoïdes doit être contrôlé et ceci dans le but de maximiser les contacts entre les différents gamètes tout en évitant qu'un même ovocyte ne soit fécondé par plusieurs spermatozoïdes (polyspermie). Un comptage le plus précis possible des gamètes est donc fortement recommandé. Le comptage se fait à l'aide d'un logiciel nommé SAMBA installé sur un ordinateur, et relié à un microscope photonique.

III.1.2.1. COMPTAGE DES SPERMATOZOÏDES

La solution de spermatozoïdes est diluée au centième et une goutte est déposée sur une cellule de THOMA. Après une mise au point à l'objectif 40x, une

dizaine de champs sont comptés et le logiciel produit une moyenne des comptages de chaque champ ce qui nous permet d'en déduire le nombre total de spermatozoïdes collectés.

III.1.2.2. COMPTAGE DES OVOCYTES

Les ovocytes sont comptés en utilisant une cellule de Malassez. Après une mise au point à l'objectif 4x, le comptage se fait directement après dépôt de la goutte. De la même façon que pour les spermatozoïdes, une dizaine de champs sont comptés et le logiciel produit une moyenne des comptages de chaque champ ce qui nous permet d'en déduire le nombre total d'ovocytes collectés.

III.2. MANIPULATIONS GYNOGENETIQUES

Différentes techniques d'inactivation de sperme ont été mises au point. Elles reposent sur l'utilisation d'agents mutagènes chimiques, de rayons ionisants (gamma), ou de rayons UV. Les rayons UV sont actuellement les plus utilisés car ils ont une meilleure facilité de mise en œuvre, un faible coût d'utilisation et ils conduisent à une inactivation complète du stock chromosomique.

III.2.1. IRRADIATION DU SPERME PAR LES UV

Le traitement d'irradiation UV a pour but d'inactiver le génome paternel sans toutefois altérer la motilité et la fécondité du spermatozoïde. En effet, si le spermatozoïde est trop irradié, un faible taux de fécondation sera obtenu. Par contre, si l'irradiation n'est pas suffisante, alors un faible taux de larves diploïdes d'origine gynogénétique sera obtenu. Ainsi, afin de maximiser les traitements UV et tout en sachant que ces rayons ont un faible pouvoir pénétrant, il faut irradier de faibles épaisseurs de sperme et agiter lentement avec un agitateur.

Le sperme est placé dans des fractions de 2 mL dans une boîte de pétri (environ 3 cm de diamètre) positionnée à 10 cm de la lampe, sur un agitateur magnétique réglé à 50 tr/min.

La lampe UV utilisée (VL115-C, Vilber Lourmat), 15 W, délivrant une dose d'UV (254 nm) de 1.08 mW/cm² mesurée par un radiomètre à microprocesseur VLX-3W (Vilber Lourmat). Pour avoir une irradiation maximale la lampe doit être chauffée au minimum 10 minutes à l'avance. La manipulation doit se faire dans le noir,

l'irradiation du sperme terminée celui-ci doit être protégé de la lumière afin d'éviter sa photo-réactivation.

III. 2. 2. FECONDATION ET RESTAURATION DE LA DIPLOIDIE

Après l'étape d'irradiation du sperme, la fécondation des ovocytes se fait dans de petits volumes (EMF, 50 mL), à une température de 25°C et à l'obscurité.

Une fois le génome mâle inactivé, les œufs haploïdes inséminés doivent être traités afin qu'ils regagnent leur diploïdie. Le rétablissement de la diploïdie est fait soit par gynogenèse méiotique soit par gynogenèse mitotique en utilisant un agent antimitotique : la cytochalasine B (CB) ou le 6-diméthylaminopurine (6-DMAP).

La CB est un agent antimitotique qui agit sur le degré de polymérisation des molécules d'actine en empêchant leur addition aux filaments, sans inhiber la mitose. Elle peut donc être utilisée afin de bloquer l'expulsion de l'un des deux globules polaires au cours de la méiose, mais aussi afin de bloquer la première division mitotique. L'action de la CB dépend de plusieurs paramètres tels que :

- sa concentration, qui est généralement entre 0.5 et 1 mg/l,
- la durée du traitement, qui est de 15 à 20 minutes,
- la température d'incubation, qui doit être de 25-26°C,
- et le moment d'application, qui lui dépend du type de gynogenèse voulu.

La CB est un produit très dangereux qui a une action cancérigène et doit donc être manipulée avec précaution. Comme la CB n'est pas soluble dans l'eau, elle doit être dissoute dans un solvant organique adéquat (le DMSO). Les embryons traités sont tamisés sur un tamis de 10 µm afin de laver une partie de la CB. Ensuite, ils sont lavés dans un litre d'eau de mer contenant du DMSO (1mL/L) pendant 20 minutes. Ensuite les embryons sont placés en incubation dans des jarres de 30L d'eau de mer à 25°C/26°C.

Le traitement au 6-DMAP, contrairement à la CB, ne perturbe pas la synthèse des protéines mais seulement l'activité phosphorylatrice des protéines kinase, ce qui entraîne ainsi une décondensation de la chromatine. Cela permet donc soit de bloquer l'expulsion de l'un des deux globules polaires soit d'inhiber la première division mitotique. Contrairement au traitement à la CB, un rinçage à l'eau de mer suffit à éliminer le 6-DMAP, et donc les protéines peuvent se rephosphorylées et les

chromosomes se recondenser. Chez *C. gigas*, le suivi du développement embryonnaire réalisé à 25-26°C montre que l'expulsion du second globule polaire se réalise en majorité entre la 20^{ième} et 35^{ième} minute post-fécondation (PF), alors que la première division mitotique se réalise généralement entre la 45^{ième} et 60^{ième} minute PF. C'est pour cette raison que les essais de rétablissement de la diploïdie se font par :

- Gynogénèse méiotique : traitement entre la 20^{ième} et 35^{ième} minute post-fécondation (PF) en utilisant soit la CB (0.5 mg/l) soit le 6-DMAP (60 mg/l).
- Gynogénèse mitotique : traitement entre la 45^{ième} et 60^{ième} minute post-fécondation (PF) en utilisant soit la CB (0.5 mg/l) soit le 6-DMAP (60 mg/l).

III.3. ELEVAGE LARVAIRE

Les larves obtenues après les inductions gynogénétiques sont remises en culture dans des bacs cylindro-coniques contenant 30 L d'eau de mer filtrée à 22°C et aérée grâce à un bulleur incorporé dans le bac d'élevage. Les larves sont nourries quotidiennement avec une ration adaptée de phytoplancton (*Isochrysis galbana* et *Tetraselmis suecica*). Afin de pouvoir estimer les taux d'éclosion et une éventuelle mortalité des larves, ces dernières sont tamisées après 24 heures post-fécondation, au travers d'un filtre de 30 µm de diamètre, reprises dans une éprouvette graduée contenant 1 ou 2 L d'eau de mer filtrée et le nombre total de larves D ou mal formées est estimé à partir d'un comptage sous loupe binoculaire dans un échantillon de 50-100 µl.

(Moyenne des larves comptées) x (volume éprouvette (µL))/(volume échantillon (µL))

A partir de ce résultat, le taux d'éclosion de larves D ainsi que celui des larves mal formées sont obtenus après ce calcul :

(Nombre total de larves D ou mal formées / nombre initial d'ovocytes) x 100

Durant les tamisages suivants (tous les deux jours), la taille des mailles est adaptée à la croissance des larves. Les différentes tailles de tamis sont : 30µm, 45µm, 60µm, 85µm, 100µm, 125µm, 150µm, 180 µm et 220µm. Arrivées à la taille de

220µm les larves sont alors oeillées et prêtes à se fixer ce qui marque la fin de l'élevage larvaire.

D'autre part, surtout en début d'élevage larvaire, la ploïdie des larves est déterminée par cytométrie en flux. Après chaque tamisage, un échantillon de larves (100 larves au minimum) est prélevé et mis dans un tube de 1,5 mL. Après élimination de l'eau de mer par une brève centrifugation, les larves sont reprises dans 1 mL de tampon de lyse (5 mM MgCl₂, 85 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1% Triton X-100, pH7). Ensuite, les larves sont broyées à l'aide d'un piston en plastique et les noyaux libérés sont filtrés au travers d'un filtre en nylon de 30 µm de taille de maille (Partec Celltrics) et recueillis dans un tube d'analyse de cytométrie, puis marqués au DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) à la concentration finale de 1 µg/mL, par addition de 1 mL de tampon de lyse contenant le DAPI à 2 µg/mL et 2 µL de témoin interne de ploïdie (érythrocytes de truite, TRBC, Coulter DNA Reference Calibrator, 629972).

Après une incubation minimale de 30 min sur glace et à l'obscurité, les analyses cytométriques sont réalisées en utilisant un cytomètre Partec PAII. Chaque analyse (canal FL4, échelle linéaire de 1024 canaux) se fait sur un minimum de 2000 particules. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogrammes de fréquences (Pics) avec une distribution gaussienne des événements au sein de chaque pic. En fonction de leur taille du génome, différents pics peuvent être observés :

- Pic haploïde : correspond aux larves issues d'ovocytes fécondés par un spermatozoïde inactivé et n'ayant pas subi un rétablissement de diploïdie par gynogenèse,
- Pic diploïde : correspond soit aux larves issues d'ovocytes fécondés par un spermatozoïde inactivé et ayant pas subi un rétablissement de diploïdie par gynogenèse, ou bien aux larves issues d'ovocytes fécondés par un spermatozoïde non inactivé par le traitement UV,
- Pic triploïde : correspond vraisemblablement aux larves issues d'ovocytes fécondés par un spermatozoïde non inactivé par le traitement UV et ayant subi au même temps soit une rétention de l'expulsion du second globule polaire soit le blocage de la première mitose suite au traitement par l'agent antimittotique (CB ou 6-DMAP).

III.4. MICRONURSERIE ET NURSERIE

Chez *C. gigas*, les larves sont prêtes à être fixées lorsqu'elles atteignent une taille de 220 µm environ, elles sont donc pourvues d'un œil et d'un pied (larves pédivéligères). A ce stade, l'élevage larvaire est terminé.

Les larves vont être fixées en micronurserie. Elles sont alors disposées sur des tamis de 150µm dont les parois ont été paraffinées, dans des bacs alimentés continuellement en eau de mer et en phytoplancton. Les tamis sont recouverts de microbrisure de coquille d'huître de telle façon à permettre une fixation individuelle des larves. La température doit être de 21°C/23°C et doit être vérifiée régulièrement. Un nettoyage quotidien est réalisé pour éliminer les biodépôts ainsi que les microorganismes. Au bout de 3 semaines, les larves fixées et métamorphosées seront séparées de l'excès de microbrisure après tamisage au travers d'un tamis de 350 µm de taille de maille. Cette opération est renouvelée toutes les 4 semaines dans le but d'isoler des populations tête/corps/queue de lot et ceci en utilisant des tamis dont la taille de maille va en croissant (500, 1000, 2000 µm).

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. EXPERIENCE 1

Trois millions d'ovocytes ont été fécondés avec 20 millions de spermatozoïdes, dans de petits volumes (50mL). La CB a été utilisée afin de rétablir la diploïdie.

Six lots ont été testés:

- le premier lot correspond au témoin diploïde (**Te2n**) dans lequel le sperme n'est pas irradié et les embryons non traités à la CB.

- le deuxième lot correspond au témoin haploïde (**TeUV**) dans lequel le sperme a été irradié pendant 40 secondes ou 5 minutes 30 secondes et les embryons non traités à la CB.

- le troisième lot, appelé **40A**, a été obtenu à partir de sperme irradié pendant 40 secondes et dont les embryons ont été traités à la CB afin d'induire une gynogenèse méiotique (20-35 min PF).

- le quatrième lot, appelé **40B**, a été obtenu à partir de sperme irradié pendant 40 secondes et dont les embryons ont été traités à la CB afin d'induire une gynogenèse mitotique (45-60 min PF).

- le cinquième lot, appelé **530A**, a été obtenu à partir de sperme irradié pendant 5min30 et dont les embryons ont été traités à la CB afin d'induire une gynogenèse méiotique (20-35 min PF).

- le sixième lot, appelé **530B**, a été obtenu à partir de sperme irradié pendant 5min30 et dont les embryons ont été traités à la CB afin d'induire une gynogenèse mitotique (45-60 min PF).

A la suite de ces fécondations et de ces traitements, les différents lots seront suivis tout au long de l'élevage larvaire.

IV.1.1. RESULTATS DE L'ELEVAGE LARVAIRE ET ANALYSES CYTOMETRIQUES

Le comptage de chaque lot est effectué dès le deuxième jour, afin d'évaluer le taux d'éclosion :

LOT	% LARVES D	% LARVES MAL FORMEES
Te2n	21,8	0
TeUV	0	4,3
40A	29,4	1,8
40B	1,22	0,83
530A	0,17	0,17
530B	0	0

Tableau 1 : Pourcentage de larves obtenues suite aux différents traitement

D'après ce tableau, le témoin négatif (**TeUV**) ne montre aucune larve D et seulement un faible pourcentage de larves mal formées (4.3%). Ces larves issues de ce traitement (**TeUV**), quand elles sont analysées en cytométrie en flux, montrent un fort pic haploïde ce qui signifie que l'irradiation a bien fait effet en inactivant le sperme (figure 5). Un faible pic diploïde apparaît tout de même ce qui signifie qu'une petite proportion de spermatozoïdes n'a pas été inactivée par l'irradiation UV. Cependant le taux de larves diploïdes est de 19% alors que celui des larves haploïdes est de 81% ce qui montre la bonne efficacité du traitement UV.

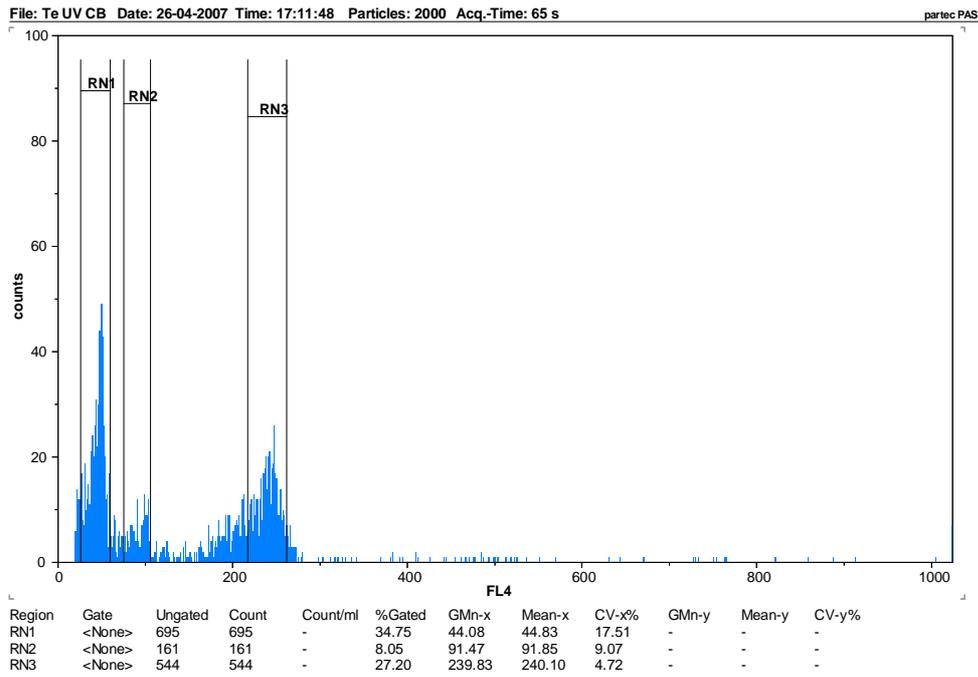


Figure 5 : analyse cytométrique des larves issues du traitement TeUV

Le témoin positif (**Te2n**) montre un taux d'éclosion de 21.8%. Comme attendu, les larves issues de cette fécondation, une fois analysées par cytométrie en flux, ne montrent qu'un seul pic diploïde (figure 6) ce qui est parfaitement normal puisque ces larves sont issues de parents diploïdes.

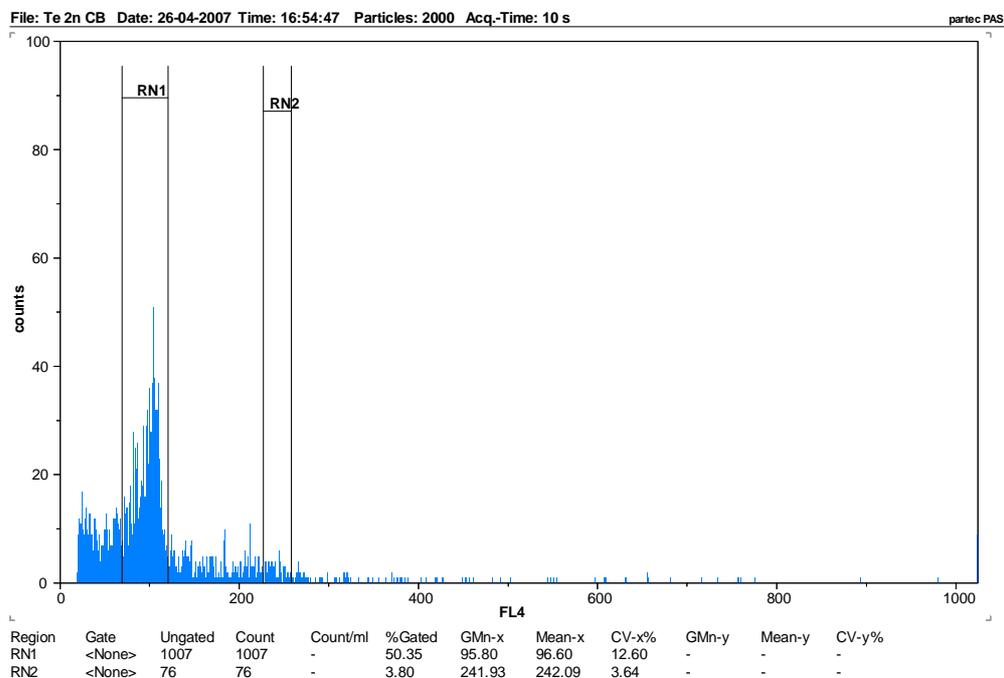


Figure 6 : analyse cytométrique des larves issues du traitement Te2n

De façon comparative, le traitement **40A**, montre un taux d'éclosion assez élevé (29.4%) et même plus élevé que celui obtenu sur le **Te2n**. L'analyse, par

cytométrie en flux, des larves issues de ce traitement montre que 90% des larves sont diploïdes alors que les 10% restants sont triploïdes (figure 7). Le fort pic diploïde indique que la diploïdie a bien été rétablie suite au traitement à la CB. La présence du petit pic triploïde s'explique facilement par le fait que le traitement UV n'inactive que 81% du sperme ce qui veut dire que les 19% restant du sperme sont non inactivés. Dans ce cas, la rétention du second globule polaire suite au traitement à la CB induit l'apparition d'une population de larves triploïdes. Les larves diploïdes obtenues suite à ce traitement **40A** seront en grande majorité d'origine gynogénétique car produites par les 81% du sperme inactivé, toutefois, une faible proportion de ces larves diploïdes ne sera pas d'origine gynogénétique notamment celles issues de sperme non inactivé et ayant échappé au traitement à la CB.

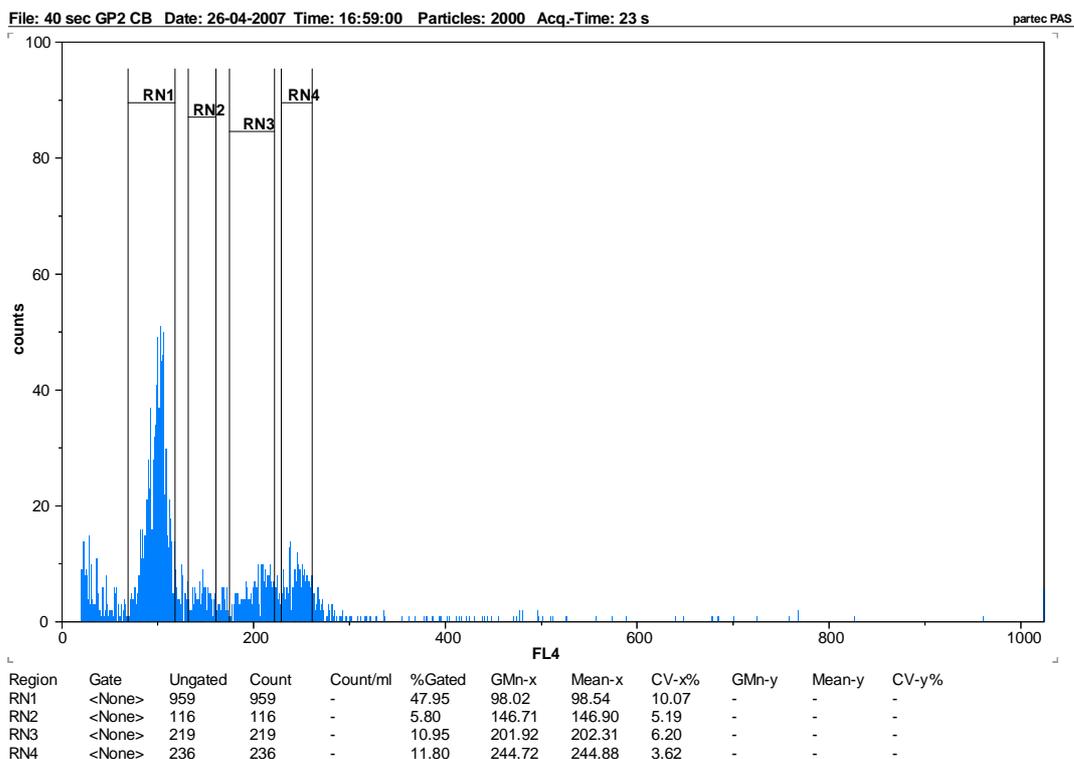


Figure 7 : analyse cytométrique des larves issues du traitement 40A

Comparativement au traitement **40A**, le traitement **40B** ne montre pas un très bon taux d'éclosion de larves D (1.22% contre 29.4). Il apparaît donc que la gynogenèse mitotique est plus difficile à induire que la gynogenèse méiotique. L'analyse, par cytométrie en flux, des larves issues de ce traitement montre que 60% des larves sont haploïdes alors que les 40% restantes sont diploïdes (figure 8). Ceci montre que le rétablissement de la diploïdie via la suppression de la première mitose est beaucoup plus difficile à obtenir que via la rétention du second globule polaire

(40% de diploïdes obtenus dans **40B** contre 90% dans **40A**). De la même façon que pour le traitement **40A** (gynogenèse méiotique), les larves diploïdes obtenues suite au traitement **40B** (gynogenèse mitotique) ne peuvent être toutes de nature gynogénétique du fait de la présence des larves issues de sperme non inactivé et ayant échappé au traitement à la CB.

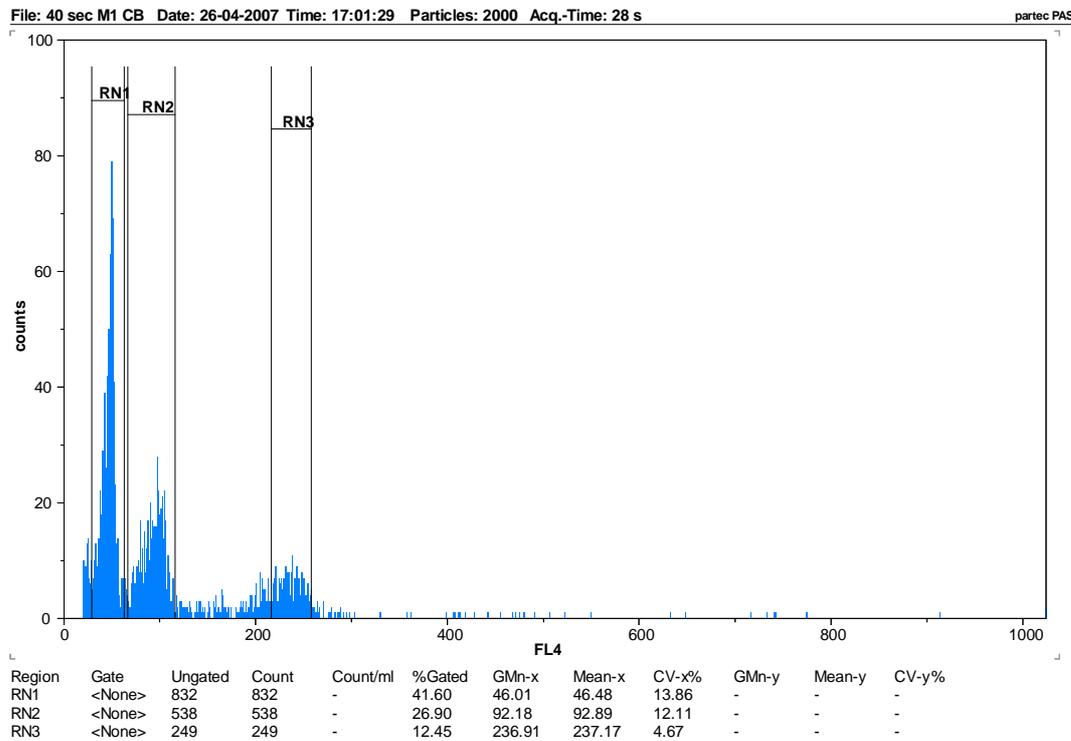


Figure 8 : analyse cytométrique des larves issues du traitement 40B

Le traitement **530A** montre un taux d'éclosion de larves D très bas (0.17%) ce qui suggère que ce traitement est trop long et n'est pas compatible avec le maintien de la capacité de fécondation du sperme. L'analyse, par cytométrie en flux, des larves issues de ce traitement montre l'existence de deux niveaux de ploïdie : des larves diploïdes à 80% et des larves triploïdes à 20% (figure 9). De tels résultats montrent aussi que le rétablissement de la diploïdie a été moins efficace durant le traitement **530A** (62% de diploïdes) comparativement à ce que nous avons obtenu durant le traitement 40A (90% de diploïdes).

Le dernier traitement **530B** n'a pas permis l'observation de larves D ou mal formées. Le fait qu'aucune larve n'ait été observée peut être expliqué soit par un nombre trop bas pour être prélevé correctement, soit par une fécondation trop peu efficace suivie par un traitement nocif à la CB. La gynogenèse mitotique apparaît une fois encore être plus difficile à induire que la gynogenèse méiotique.

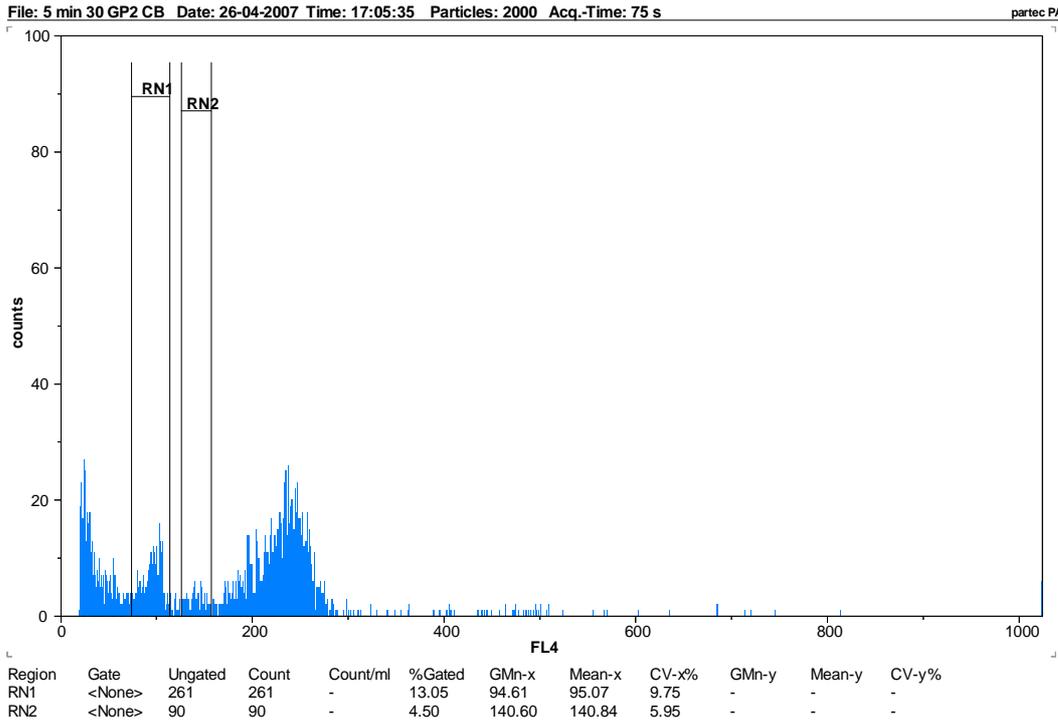


Figure 9 : analyse cytométrique des larves issues du traitement 530A.

Les lots ont été suivis afin d'établir une courbe de croissance (figure 10):

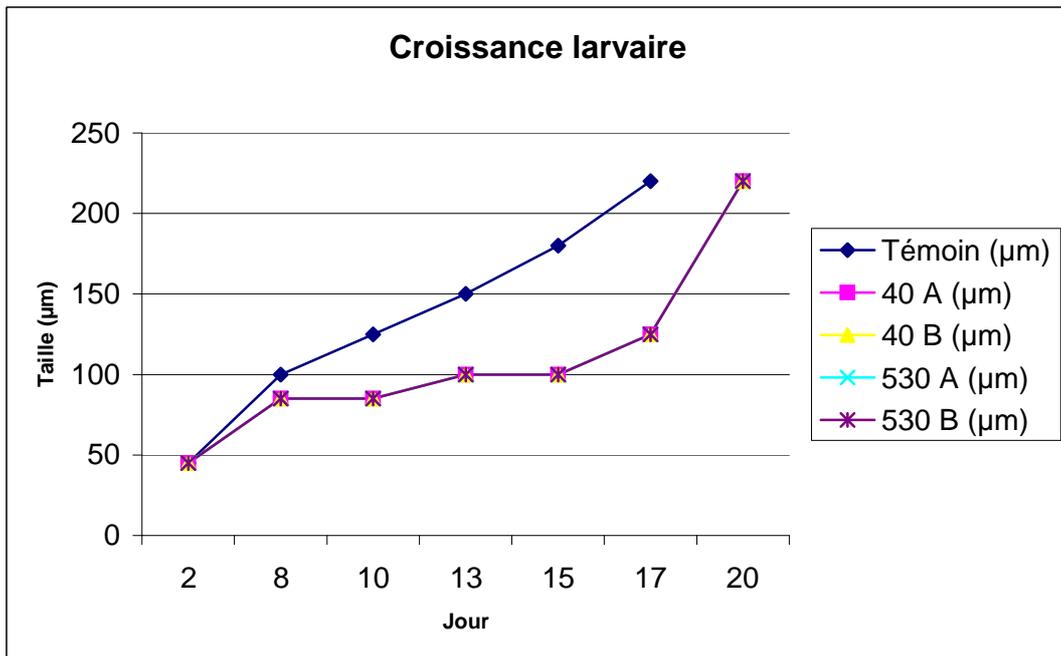


Figure 10 : suivi de la croissance des larves au cours de l'élevage larvaire.

Sur cette courbe, la croissance du lot témoin non traité (Te2n) représentée par la courbe bleue se fait à peu près de façon continue avec une date de fixation 3-4 jours plus précoce que pour les lots traités. Il semblerait qu'une fois traitées les larves ont plus de difficultés à grandir. Cette croissance plus lente des larves issues

des différents traitements peut s'expliquer par la nature gynogénétique de ces larves. En effet, la gynogenèse d'une part augmente la consanguinité et par conséquent le fardeau génétique et, d'autre part, les traitements UV et CB que subissent les larves les rendent plus faibles. Ainsi, à cause de ces difficultés de croissance la majorité des larves traitées n'arrivent pas à terme et au final, moins d'une vingtaine de larves par traitement ont atteint le stade naissain analysable.

IV.2. EXPERIENCE 2

Le protocole appliqué a été le même que pour l'expérience 1 à la différence que la CB a été remplacée par le 6-DMAP à la concentration de 60 mg/l.

Six lots ont été testés:

- le premier lot correspond au témoin diploïde (**Te2n**) dans lequel le sperme n'est pas irradié et les embryons non traités au 6-DMAP.

- le deuxième lot correspond au témoin haploïde (**TeUV**) dans lequel le sperme a été irradié pendant 40 secondes ou 5 minutes 30 secondes et les embryons non traités au 6-DMAP.

- le troisième lot, appelé **40Da**, a été obtenu à partir de sperme irradié pendant 40 secondes et dont les embryons ont été traités au 6-DMAP afin d'induire une gynogenèse méiotique (20-35 min PF).

- le quatrième lot, appelé **40Db**, a été obtenu à partir de sperme irradié pendant 40 secondes et dont les embryons ont été traités au 6-DMAP afin d'induire une gynogenèse mitotique (45-60 min PF).

- le cinquième lot, appelé **530Da**, a été obtenu à partir de sperme irradié pendant 5min30 et dont les embryons ont été traités au 6-DMAP afin d'induire une gynogenèse méiotique (20-35 min PF).

- le sixième lot, appelé **530Db**, a été obtenu à partir de sperme irradié pendant 5min30 et dont les embryons ont été traités au 6-DMAP afin d'induire une gynogenèse mitotique (45-60 min PF).

A la suite de ces fécondations et de ces traitements, les différents lots seront suivis tout au long de l'élevage larvaire.

IV.2.1. RESULTATS DE L'ELEVAGE LARVAIRE ET ANALYSES CYTOMETRIQUES

Les traitements UV (40 sec ou 5min30) et 6-DMAP induisent une chute drastique de l'effectif des larves obtenues. Pour cette raison, les comptages ont été très difficiles à réaliser et nos analyses ont concerné les seules mesures cytométriques.

Le témoin non traité **Te2n** montre un seul pic diploïde (figure 11). La fécondation a été normale et elle permet la production de larves fonctionnelles en forme de larves D.

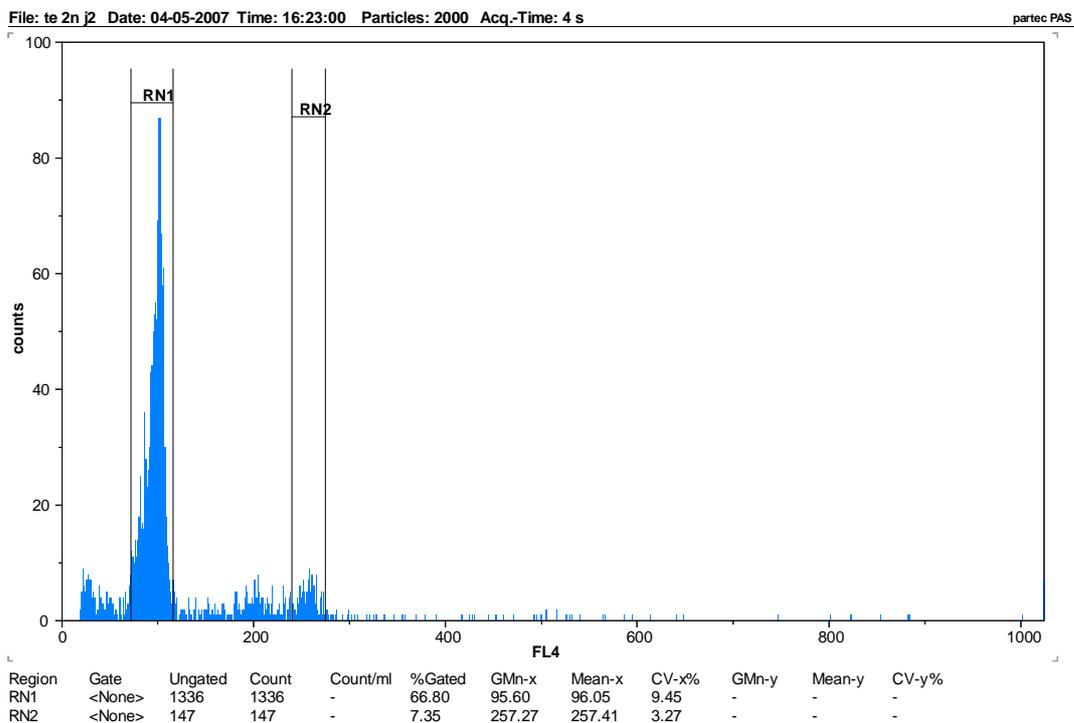


Figure 11 : analyse cytométrique des larves issues du traitement Te2n

Les traitements **40Da, 40Db, 530Da** et **530Db** (figure 12) produisent des larves uniquement diploïdes ce qui montre que l'induction de la gynogenèse via le traitement au 6-DMAP a été efficace. Cependant, et comme nous l'avons montré plus haut, une faible proportion de sperme n'est pas inactivée par les UV et produit aussi des larves diploïdes. De ce fait, les larves diploïdes obtenues, ne peuvent pas être en totalité d'origine gynogénétique et seule une analyse ultérieure par des marqueurs microsatellites peut confirmer ou non cet état gynogénétique.

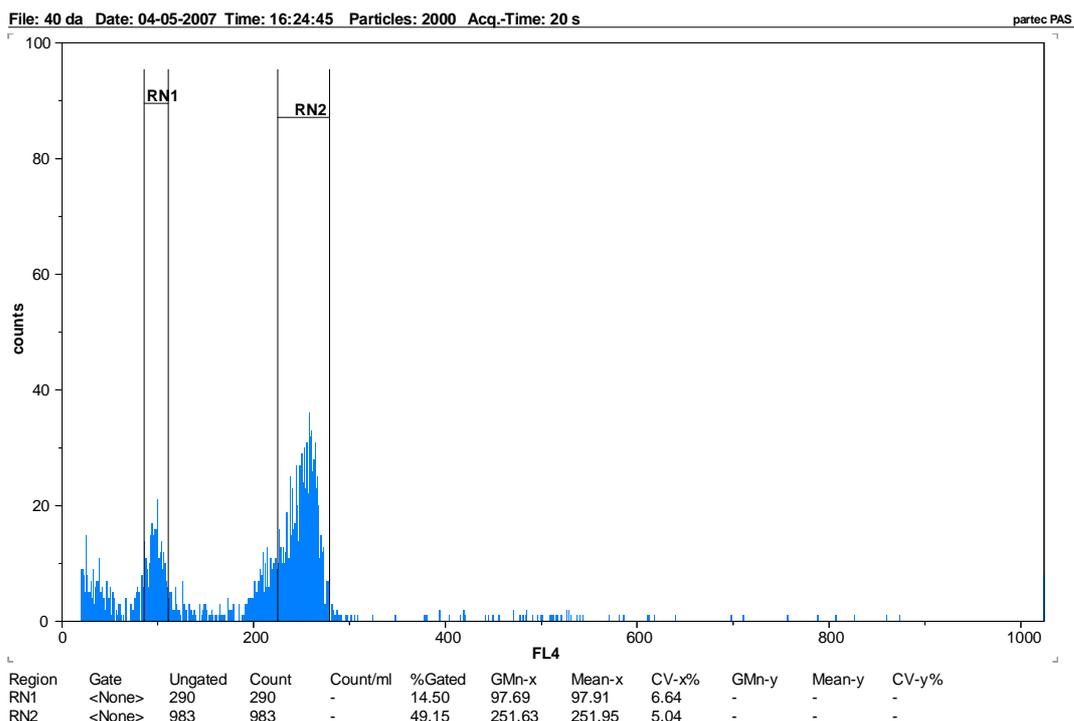


Figure 12 : analyse cytométrique des larves issues du traitement 40Da. Un résultat similaire a été obtenu sur les larves issues des traitements 40Db, 530Da et 530Db.

Même si tous les lots montrent des résultats cytométriques satisfaisants en terme de rétablissement de la diploïdie, l'expérience 2 a produit des résultats non satisfaisants en terme d'effectif de larves obtenues. En outre, au cours de l'élevage les larves issues des traitements **40Da** et **40Db** ont arrêté de grandir. Toutefois, quelques larves issues des traitements **530Da** et **530Db** sont arrivées à fixation au bout du 19^{ième} jour. Ces larves semblent avoir une croissance normale vu qu'elles arrivent à fixation de façon comparable aux larves issues du lot témoin non traité (**Te2n**). Les larves issues des traitements **530Da** et **530Db** sont mises en fixation et continuent leur cycle en micronurserie. Dès que leur taille le permet, elles seront analysées par des marqueurs microsatellites pour confirmer ou non leur état gynogénétique.

IV.3. EXPERIENCE 3

Cette expérience est destinée à optimiser les conditions favorables à l'obtention de larves mitogynogénétiques. Dans cette expérience 3, nous avons comparé les résultats obtenus en utilisant deux femelles diploïdes individuelles différentes : femelle diploïde sauvage issue d'un captage naturel (**SV**) et femelle diploïde

consanguine issue de plusieurs générations d'autofécondations (**CS**). En se basant sur les résultats obtenus lors des expériences 1 et 2, nous avons procédé à l'expérience 3 avec les étapes optimisées suivantes :

- L'induction se fait à partir de femelles individuelles.

- L'inactivation du sperme par les UV se fait pendant 40 secondes. En effet, cette irradiation pendant 40 secondes était suffisante pour détruire le matériel génétique paternel tout en préservant les spermatozoïdes qui restent féconds et engendrent un nombre de naissains (larves arrivées en fixation) beaucoup plus conséquent qu'avec une irradiation pendant 5 minutes et 30 secondes.

- Le rétablissement de l'état diploïde se fait en utilisant la CB. En effet, la CB s'avérait être plus efficace que le 6-DMAP et permettait l'obtention d'un nombre de naissains plus important qu'avec le 6-DMAP.

- L'augmentation du rapport entre spermatozoïdes et ovocytes permettant d'augmenter les chances de contact entre les gamètes et par conséquent le taux de fécondation. Nous avons donc utilisé un rapport spermatozoïdes et ovocytes de 40x (au lieu de 6.6x précédemment). Ainsi, 500 000 ovocytes sont mis en présence de 20 millions de spermatozoïdes irradiés.

Dans cette expérience 3, cinq lots ont été testés :

- le premier lot correspond au témoin diploïde sauvage non traité (**Te2SV**).

- le deuxième lot correspond au témoin diploïde consanguin non traité (**Te2CS**).

- le troisième lot correspond au témoin haploïde, **TeUV** dans lequel le sperme a été irradié pendant 40 secondes et les embryons non traités à la CB.

- le quatrième lot, appelé **40SV**, a été obtenu à partir de sperme irradié pendant 40 secondes et d'ovocytes issus de la femelle (SV) et dont les embryons ont été traités à la CB afin d'induire une gynogenèse mitotique (45-60 min PF).

- le cinquième lot, appelé **40CS**, a été obtenu à partir de sperme irradié pendant 40 secondes et d'ovocytes issus de la femelle (CS) et dont les embryons ont été traités à la CB afin d'induire une gynogenèse mitotique (45-60 min PF). Seule la femelle b a été fécondée dans ce lot.

IV.3.1. RESULTATS DE L'ELEVAGE LARVAIRE ET ANALYSES CYTOMETRIQUES

Dès le lendemain, les lots sont tamisés et les larves sont observées à la loupe. Les tamisages ont été effectués sur des tamis de 30 µm. Et un comptage est effectué :

POURCENTAGE DE LARVES FECONDEES (FIGURE 15)

LOT	% LARVES D	% LARVES MAL FORMEES
Te2SV	17,5	0
Te2nCS	22,2	0
TeUV	0	1,17
40SV	5,4	1,3
40CS	0,8	1,4

Tableau 2 : Pourcentage de larves obtenues lors de l'expérience 3

Le **Te2SV** montre un taux d'éclosion plus faible que celui de **Te2nCS** (17.5% 22%). Il semblerait d'après ce résultat que la femelle consanguine (CS) soit plus féconde que la femelle sauvage. Comme attendu, les larves issues de ces fécondations, une fois analysées par cytométrie en flux à J1 et J4, ne montrent qu'un seul pic diploïde ce qui est parfaitement normal puisque ces larves sont issues de parents diploïdes.

A J1, le témoin UV montre un taux nul d'éclosion de larves D. Les seules larves obtenues suite à l'utilisation de ce sperme irradié sont des larves mal formées (taux d'éclosion de 1.17%) ce qui illustre l'efficacité du traitement UV utilisé. Les analyses cytométriques montrent un pic haploïde et un pic diploïde (figure 13). Le taux de larves diploïdes est de 27.4% et le taux de larves haploïdes est de 72.6%. La proportion de larves haploïdes étant nettement supérieure à celle des larves diploïdes, l'irradiation est satisfaisante puisque 72.6% du sperme a été inactivé par les rayons UV.

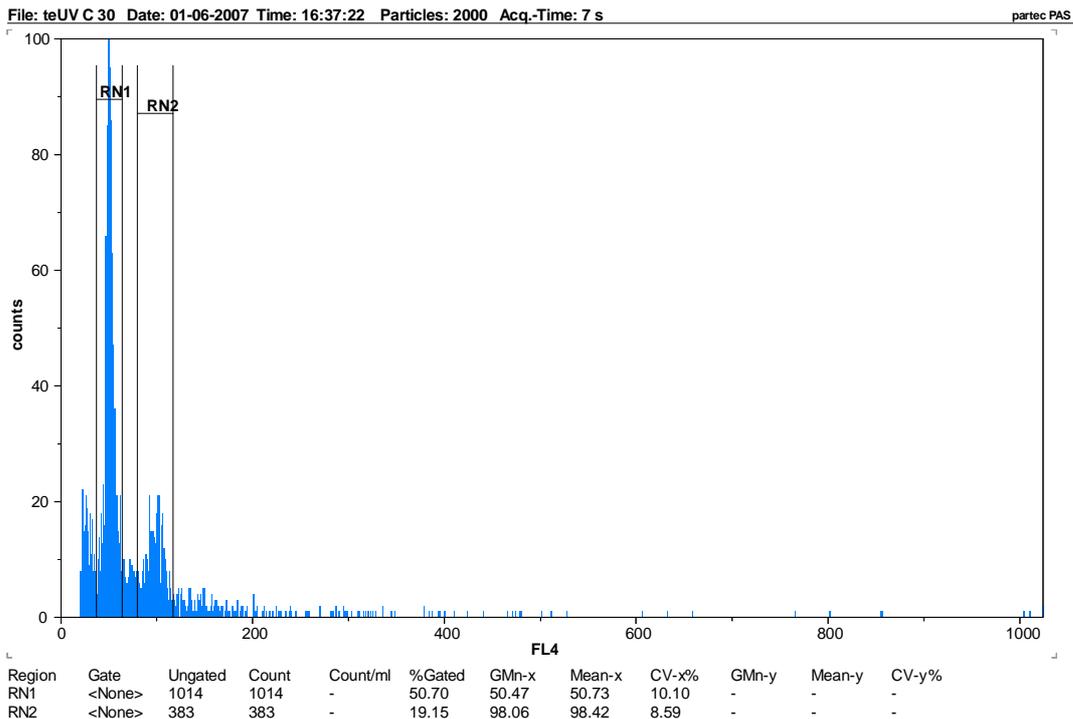


Figure 13 : analyse cytométrique des larves issues du traitement TeUV.

Le lot **40SV**, montre un résultat bien meilleur que pour les autres expériences. Ainsi, le taux d'éclosion est de 5.4% ce qui représente 4.5 fois le taux obtenu lors de l'expérience 1 (5.4% contre 1.22%). Il apparaît donc évident que le fait d'augmenter le rapport spermatozoïdes/ovocytes et d'utiliser une femelle diploïde sauvage individuelle (au lieu d'un pool de femelles) améliore de façon notable le taux d'éclosion. Un résultat assez différent est obtenu quand nous utilisons une femelle diploïde individuelle consanguine. Dans ce cas correspondant au lot (**40CS**), le taux d'éclosion n'est que de 0.8%. Il semblerait que la femelle diploïde naturelle possède des caractères génétiques lui permettant de résister aux manipulations gynogénétiques. Dans notre étude, une seule femelle naturelle diploïde et individuelle a été comparée à une seule femelle diploïde individuelle consanguine. Afin de conclure quant à l'opportunité d'utiliser des femelles consanguines ou naturelles, d'autres expérimentations sont nécessaires notamment en utilisant plusieurs femelles consanguines et naturelles.

L'analyse cytométrique des larves issues du traitement 40SV montre la présence d'un seul pic diploïde (figure 14). Ce résultat indique que l'irradiation ainsi que l'induction gynogénétique se sont donc bien déroulées puisqu'il n'y a pas de pics triploïdes ni haploïdes. Cependant il est possible qu'une faible proportion de sperme

ne soit pas irradiée et ait échappé au traitement à la CB. On ne peut donc pas conclure que le pic diploïde corresponde uniquement à des larves gynogénétiques.

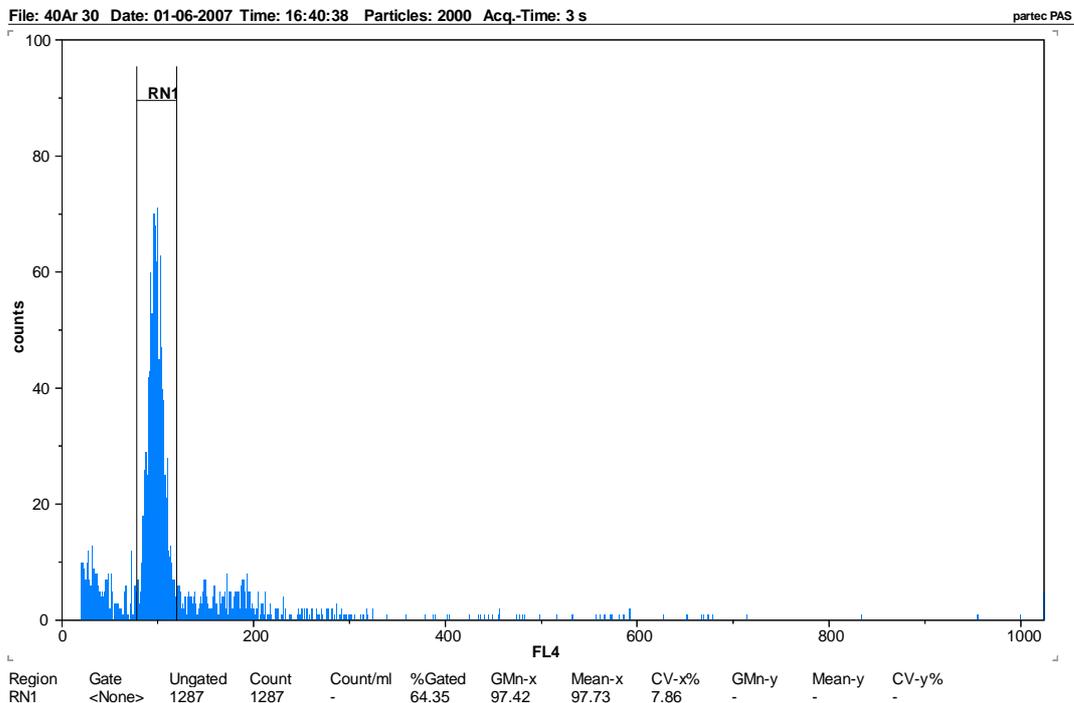


Figure 14 : analyse cytométrique des larves issues du traitement 40SV.

Au cours de l'élevage larvaire, les larves issues du traitement **40CS** se sont arrêtées de pousser à partir du huitième jour et ont été perdues par la suite à cause d'une mortalité totale. Ces larves issues de la femelle consanguine n'ont donc pas pu compléter leur cycle d'élevage larvaire. Concernant les larves issues de la femelle sauvage, leur élevage larvaire présente à peu près les mêmes caractéristiques que celui du témoin non traité. En effet, Les larves du témoin non traité sont arrivées à fixation à J18, tandis que les larves du lot **40SV** sont arrivées en fixation deux jours plus tard (J 20 post-fécondation).

V. CONCLUSION

A la suite de toutes ces expériences, l'expérience 3 s'est montrée la plus concluante. En effet, le rétablissement de la diploïdie à l'aide de la CB ainsi que l'inactivation du sperme aux rayons UV pendant 40 secondes ont été optimisés. Une étude antérieure sur la gynogenèse avait déjà été tentée au sein de l'Ifremer la Tremblade (Peudener et Gérard, 1993), mais n'avait pas été concluante. Durant cette étude, le rétablissement de la diploïdie n'a pas pu être réusé et donc les larves devenaient anormales et n'atteignaient pas le stade de larve D. Les paramètres concernant l'inactivation du sperme et le rétablissement de la diploïdie restaient donc à être optimisés.

La mitogynogenèse conduisant à un génome homozygote est plus intéressante à induire que la méiogynogenèse, car ainsi il est plus facile d'atteindre une lignée pure d'individus. La mitogynogenèse a montré lors des expériences 1 et 2 qu'elle était beaucoup plus difficile à induire. Mais nous avons réussi à progresser dans son optimisation durant l'expérience 3. Le rapport entre spermatozoïdes et ovocytes est un paramètre très important à contrôler. Le taux de fécondation avait nettement augmenté lorsque nous avons augmenté ce rapport. L'utilisation de femelles individuelles influe considérablement sur le taux de fécondation comme l'a montré l'expérience 3. Comme chaque géniteur possède un génome différent il est donc judicieux de les séparer pour ne pas créer d'interférence lors de la fécondation.

Lors de chaque expérience de gynogenèse, un prélèvement de branchies de chaque géniteur a été effectué. Ceci permettra lorsque les naissains auront atteint une taille suffisante, de comparer les ADN des géniteurs avec ceux des naissains. Ainsi, les naissains qui ne posséderont que le génome maternel seront gynogénétiques et parmi ceux-ci, ceux qui seront homozygotes pour tous les marqueurs testés seront considérés comme étant issus de mitogynogenèse. Ces naissains mitogynogénétiques serviront de géniteurs femelles à de nouvelles manipulations gynogénétiques (méiogynogénétique). Ce qui aura pour finalité d'engendrer des lignées pures qui pourront servir comme matériel biologique de référence durant les recherches futures.

Bibliographie

- Berthelin, C., Kellner, K. & Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Physiol.*, (125 B) 359-369.
- Bodoy, A., Garnier, J., Razet, D., Geairon, P., 1990. Mass mortalities of oysters (*Crassostrea gigas*) during spring 1988 in the bay of Marennes-Oléron, related to environmental conditions. Note ICES CM 1990 / K : 11, 1-23.
- Cheney, D.P., MacDonald, B.F., Elston, R.A., 2000. Summer mortality of pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J Shellfish Res* 19, 353-359.
- Chourrout, D., 1989. Gynogenèse, polyploidie et transfert de gènes chez la truite arc-en-ciel (*salmo gairdneri*). Thèse de doctorat de l'université de Paris 6, 60p.
- Comps, M., Bonami, J.R., Vago, C. & Razet, D., 1976. La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, 256 : 13-15.
- Comps, M. & Duthoit, J.L., 1976a. Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 283 : 1595-1597.
- Comps, M., Bonami, J.R., Vago, C. & Razet, D., 1976b. La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, 256 : 13-15.
- Comps, M., 1983. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. *Thèse de Doctorat, Montpellier* : 128 p.
- Fairbrother, J.E. 1994. Viable gynogenetic diploid *Mytilus edulis* (L.) larvae produced by ultraviolet light irradiation and cytochalasin B shock. *Aquaculture* 126, 25-34.
- FAO, 2006. La situation mondiale des Pêches et de l'Aquaculture. <http://www.fao.org/docrep/009/A0699f/A0699f00.htm>
- Fujino, K., Arai, K., Iwadare, K., Yoshida, T. Nakajima, S. 1990. Induction of gynogenetic diploid by inhibiting second meiosis in the pacific abalone. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56, 1755-1763.

- Grizel, H., Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). J. Cons. Int. Explor. Mer 47, 399-403.
- Guo, X., Hershberger, W.K., Cooper, K., Chew, K.K. 1993. Artificial gynogenesis with ultraviolet light-irradiated sperm in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. induction and survival. Aquaculture 113, 201-214.
- Guo, X., Allen S.K.Jr. 1994. Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say). Genetics 138, 1199-1206.
- Maurer, D., Comps, M., 1986. Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. Pathology in Marine Aquaculture, Edited by Vivarès, C.P., Bonami, J.R. and E. Jaspers, European Aquaculture Society, Special Publication N° 9, Bredene, Belgium, pp. 29-41.
- Pan, Y., Li, Q., Wang, R. 2004. Induction of gynogenetic diploids and cytological studies in the zhikong scallop, *Chlamys farreri*. Aquat. Living resour. 17, 201-206.
- Peudener, Girard, 1993. Obtention de lignées pures de mollusques par gynogénèse. Rapport de stage. 36p.
- Scarpa, J., Komaru, A., Wada, K.T., 1994. Gynogenetic induction in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Bull. Natl. Res. Aquacult. 23, 33-41.

RESUME :

La gynogenèse est un mode de reproduction dans lequel l'action du spermatozoïde se limite à l'activation de l'ovocyte. Le génome mâle est inactivé génétiquement suite à une irradiation aux rayons UV. Il y a deux gynogenèses : la méïogynogenèse et la mitogynogenèse. Le but de cette étude a été d'optimiser les paramètres induisant ces deux gynogenèses.

Les traitements d'inactivation du sperme ainsi que de rétablissement de la diploïdie ont été optimisés. Le traitement aux rayons UV le mieux adapté à l'inactivation du sperme est de 40 secondes. L'agent antimitotique permettant efficacement l'induction de la diploïdie est la CB.

La viabilité des individus issus de gynogenèse a été démontrée. Les naissains issus de méïogynogenèse et mitogynogenèse sont arrivés à fixation.

Une étude ultérieure de génotypage est nécessaire pour prouver que les naissains obtenus ne comportent que le génome maternel. Et ceux étant bien issus de gynogenèse serviront de géniteurs femelles pour de nouvelles manipulations méïogynogénétiques, afin d'obtenir des lignées clonales qui serviront comme matériel biologique de référence pour les recherches futures.

MOTS-CLES :

Gynogenèse, méïogynogenèse, mitogynogenèse, *Crassostrea gigas*, cytochalasine B, 6-DMAP, cytométrie en flux, lignée clonale, irradiation UV.