

INSTITUT NATIONAL DES TECHNIQUES DE LA MER
CHERBOURG

Conservatoire National des Arts et Métiers

DIPLOME DE TECHNICIEN SUPERIEUR DE LA MER
Génie Biologique et productions marines

Rapport de stage

ESSAIS D'OBTENTION DE LIGNEES PURES DE MOLLUSQUES
PAR
GYNOGENESE

Isabelle PEUDENIER

Septembre 1992

Maître de stage : André GERARD

Unité de Recherche en Génétique et Eclosion
BP 133
17390 La Tremblade



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'URGE qui m'a permis de réaliser un stage de fin d'études dans de très bonnes conditions.

Je remercie infiniment André Gérard, mon maître de stage, qui a su m'intégrer de façon chaleureuse au sein de son équipe et me conseiller pendant ces quatre mois.

J'ai été très heureuse de travailler avec Christophe Ledu au cours de ce stage. Ce travail d'équipe a été très enrichissant et je l'en remercie vivement.

Je tiens à témoigner ma gratitude et mon amitié à Yamama Naciri pour sa disponibilité.

A ces remerciements, j'associe également pour leur gentillesse, Jean-Marie et Marie-Claude Peignon, ainsi que Pascal Phelipot.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	3
1. INTRODUCTION.....	4
2. MATERIEL ET METHODES.....	8
2.1 TECHNIQUES D'ECLOSERIE.....	8
2.1.1 PRODUCTION DE PHYTOPLANCTON.....	8
2.1.2 ORIGINE, MAINTIEN, MATURATION DES GENITEURS.....	9
2.1.3 PONTE ET PRELEVEMENT DES GAMETES.....	9
2.1.4 ELEVAGE LARVAIRE.....	11
2.1.5 MICRONURSERIE.....	11
2.2 TECHNIQUES DE CYTOGENETIQUE.....	12
2.2.1 DESTRUCTION DU GENOME PATERNEL.....	12
2.2.2 FECONDATION.....	13
2.2.3 RESTAURATION DE LA DIPLOÏDIE.....	13
2.2.3.1 Chronologie du développement embryonnaire précoce	
2.2.3.2 Traitement à la cytochalasine	
2.2.3.3 Traitement au 6-DMAP	
2.2.4 DETERMINATION DE LA PLOÏDIE SUR LES EMBRYONS.....	15
2.2.4.1 Méthode caryologique	
2.2.4.2 Détermination par imagerie numérique	

3. RESULTATS, DISCUSSION	18
3.1 AMELIORATION DE LA TECHNIQUE D'ANALYSE D'IMAGES SUR LES EMBRYONS.....	18
3.2 IRRADIATION DU SPERME.....	20
3.2.1 MISE AU POINT D'UNE DILUTION STANDARD DU SPERME....	20
3.2.2 IRRADIATION ET MOTILITE DU SPERME.....	22
3.2.3 RECHERCHE DE L'EFFET HERTWIG.....	22
3.3 RESULTATS DES RESTAURATIONS DE LA DIPLOÏDIE A LA CYTOCHALASINE ET AU 6-DMAP.....	24
3.3.1 RESULTATS DE L'EXPERIENCE 1.....	24
3.3.1.1 Protocole	
3.3.1.2 Restauration de la diploïdie	
3.3.2 RESULTATS DES EXPERIENCES 2 ET 3.....	26
3.3.2.1 Protocole	
3.3.2.2 Développement embryonnaire précoce de l'expérience 2	
3.3.2.3 Restauration de la diploïdie	
3.3.2.4 Elevage larvaire	
4. CONCLUSION	31
5. BIBLIOGRAPHIE	32
6. ANNEXES	34
7. MOTS-CLES	
8. RESUME	

LISTE DES ABREVIATIONS

CB	Cytochalasine B.
6-DMAP	6-Diméthylaminopurine.
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
EGTA	Ethylène glycol-bis(β -aminoéthyl éther).
GA	pour Glucamine, un des constituant du tampon (Annexe 1).
GP	Globule polaire (GP1 : 1 ^{er} globule, GP2 : 2 ^{ème} globule).
HEPES	(N-[2-Hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthane sulfonic acid]).

1. INTRODUCTION

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) a reçu des missions multiples par le texte fondateur de l'Institut (décret du 5 juin 1984). Il est le seul organisme français dont la vocation est exclusivement maritime. Il mène des recherches à caractère fondamental et appliqué dans des disciplines très variées telles que géosciences, biologie, halieutique, chimie, océanographie physique, modélisation mathématique.

L'Unité de recherche en Génétique et Eclosion créée en novembre 1990, trouve son origine dans l'éclatement de l'ancien Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés Marins, et dans le regroupement sur le site de La Tremblade de tous les laboratoires du département de Recherche Aquacole au sein d'une même structure: le Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins.

Le développement des recherches dans le domaine de la génétique quantitative et de la cytogénétique des mollusques bivalves vise surtout l'obtention de méthodes et de produits présentant des caractéristiques intéressantes pour la profession conchylicole. L'objectif au niveau socio-économique est de contribuer à l'émergence de nouveaux pôles productifs créateurs ou stabilisateurs d'emplois. Les principaux objectifs au niveau scientifique sont:

- l'obtention de souches résistantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent régulièrement en cause la conchyliculture,
- la création de lignées ou de souches présentant de meilleures performances de croissance et de qualité de chair pour valoriser et promouvoir les activités conchycoliques,
- l'acclimatation de nouvelles espèces et l'hybridation pour limiter les risques liés à la monoculture,
- la recherche de marqueurs.

Pour tenter de répondre à ces objectifs un certain nombre de programmes ont été engagés dont celui sur l'obtention de lignées pures et la recherche de marqueurs génétiques (fig. 1). L'obtention de lignées pures par des méthodes plus rapides que les classiques croisements d'individus apparentés, se fait en induisant la reproduction uniparentale (gynogenèse, androgenèse, autofécondation). Parallèlement la recherche de marqueurs génétiques sera indispensable pour caractériser les animaux, vérifier leur degré d'homozygotie et mettre en évidence leur origine parentale.

Un des intérêts des lignées consanguines réside dans l'éventuelle vigueur hybride (hétérosis) que l'on peut attendre du recroisement de certaines d'entre-elles.

Un autre intérêt, purement scientifique, est de disposer de souches génétiquement uniformes (clones) qui constituent un atout majeur pour de nombreuses études tant en génétique (sélection, transfert de gènes) qu'en pathologie, en physiologie... Le clonage d'animaux par simple reproduction d'individus gynogénétiques est une voie beaucoup plus prometteuse que celle de la transplantation nucléaire (Chourrout, 1989).

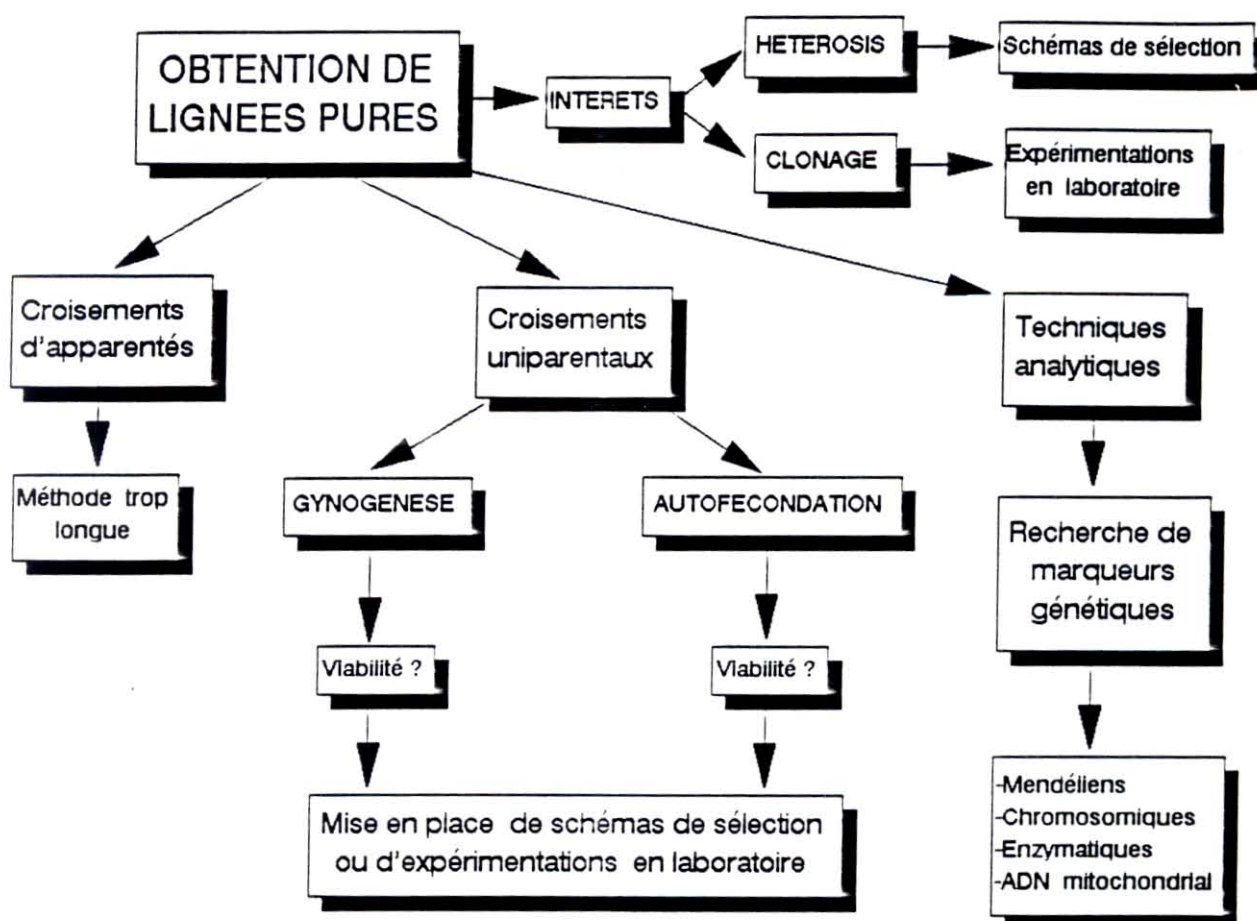
L'étude de la sex-ratio dans les lignées uniparentales peut fournir de précieux renseignements sur le déterminisme du sexe qui est encore inconnu chez les mollusques bivalves.

Les références scientifiques dans ce domaine sont très variées. L'effet d'hétérosis est très souvent recherché dans les schémas d'amélioration des plantes. Des lignées de clones homozygotes ont été rapidement produites chez des espèces allogames par la voie de la reproduction uniparentale en utilisant des agents antiméiotiques, des traitements physiques ou par autofécondations successives.

Chez les animaux, les applications sont plus rares; la gynogenèse, l'androgenèse et la polyploïdie sont létales chez les oiseaux et les mammifères, par contre chez les poissons, ces manipulations, sont très employées pour l'amélioration des performances d'élevage (Diter, 1990).

Chez les mollusques, plusieurs études indiquent que l'hybridation intraspécifique (source d'hétérosis) améliore la croissance et la survie; les bases génétiques, physiologiques et biochimiques, sont encore inconnues (Chevassus et Coche, 1986).

fig.1: OBTENTION DE LIGNEES PURES ET RECHERCHE DE MARQUEURS GENETIQUES

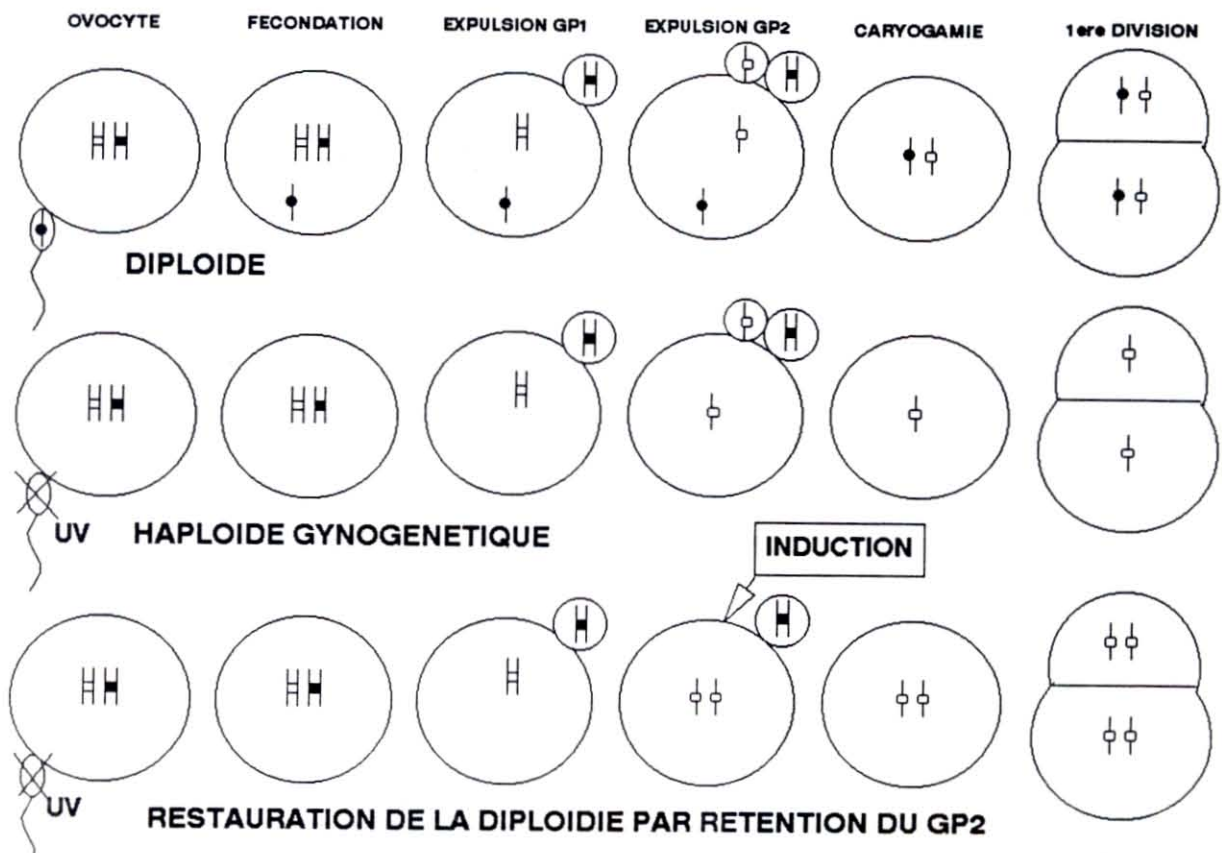


Plusieurs méthodes conduisent à la création de lignées pures: les croisements entre apparentés, l'autofécondation, la gynogenèse ou l'androgenèse.

Dans le cadre de ce stage seule la gynogenèse a été étudiée. Il s'agit du développement d'un oeuf activé par un spermatozoïde, mais sans la participation du génome paternel. Sur le plan génétique, elle est équivalente à la parthénogenèse, mais elle est déclenchée par d'autres facteurs (Chourrout, 1982). La viabilité des individus gynogénétiques n'a toujours pas été obtenue chez les mollusques. Les premiers essais menés au laboratoire de La Tremblade n'ont pu démontrer ni leur viabilité ni leur non-viabilité (Diter, 1990).

La gynogenèse consiste à induire un développement haploïde de l'oeuf, généralement à la suite d'un traitement mutagène (rayonnement ultra-violet) des spermatozoïdes utilisés pour l'activation; dans un deuxième temps, un traitement approprié des oeufs inséminés permet de compenser l'absence du pronucléus mâle, en doublant le matériel génétique de l'embryon (fig.2). L'induction de la gynogenèse nécessite également l'acquisition et la maîtrise des techniques d'analyse de la ploïdie, indispensables à la mise en évidence rapide des individus gynogénétiques.

Fig.2: INDUCTION DE LA GYNOGENESE



2. MATERIEL ET METHODES

2.1 TECHNIQUES D'ECLOSERIE

2.1.1 PRODUCTION DE PHYTOPLANCTON

Premier maillon de la chaîne alimentaire, les micro-algues sont utilisées en éclosion pour la nourriture des mollusques. Les performances de croissance et de survie sont étroitement liées à cet apport de phytoplancton, tant sur le plan quantitatif que qualitatif, tout particulièrement lors de l'élevage larvaire et de la maturation des géniteurs.

Les principales micro-algues utilisées sont:

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

L'eau utilisée pour la culture des algues est essentiellement de l'eau de forage, cette eau pompée à 100m de profondeur présente toutes les caractéristiques chimiques de l'eau de mer et a l'avantage d'être limpide, de qualité constante et aseptique; cependant sa concentration élevée en fer, la rend inutilisable pour la culture en ballons des micro-algues qui servent à la nutrition des élevages larvaires (on emploie dans ce cas de l'eau de mer).

La culture monospécifique de ces algues unicellulaires se fait sur milieu de Conway (Walne, 1974) selon la méthode classique: culture aseptique des souches en erlenmeyers de 500ml; ensemencements successifs de plus grands volumes, 2, 10, 20 puis 300 litres, dans lesquels sont atteintes, en 5 jours environ, des concentrations comprises entre 5 et 20 millions de cellules par ml selon l'espèce considérée.

2.1.2 ORIGINE , MAINTIEN ET MATURATION DES GENITEURS

Les huîtres (*Crassostrea gigas*) âgées de 2 à 4 ans, proviennent de deux exploitations locales (Y.Papin , La Tremblade ; D.Lys , Breuillet).

Le cycle naturel de maturation sexuelle débute sous nos latitudes à la fin de l'hiver. Les huîtres sont aptes à pondre dès juin mais les pontes interviennent généralement en juillet et août. La saison de reproduction qui ne dure que 3 mois, est insuffisante pour un travail continu en éclosion. Il est nécessaire d'avancer la période de reproduction de quelques mois par une maturation artificielle.

Les animaux sont transférés dès le mois de février dans une eau de mer à 22°C enrichie en phytoplancton et à une densité de 50 individus pour 100 litres. Cette eau est renouvelée en continu (200 litres/heure) et les bacs de maturation sont nettoyés quotidiennement afin d'assurer une qualité d'eau optimale.

Après 1 mois dans ces conditions les huîtres sont aptes à fournir des produits gamétiques performants capables de se développer normalement.

2.1.3 PONTE ET PRELEVEMENT DES GAMETES

* PONTE :

L'eau de mer utilisée pour la stimulation des géniteurs et toutes les phases ultérieures est filtrée (1µm) et thermostatée. De nombreuses méthodes d'induction existent : ce sont essentiellement des stress physiques (variations thermiques, mise à sec, augmentation de la turbidité...) ou chimiques (variation de pH, de salinité, injection de KCl...)

Une stimulation la plus naturelle possible et n'altérant pas la qualité des ovules peut être réalisée selon le protocole suivant:

- émergence pendant la nuit à 20°C.
- brossage des coquilles afin de les débarasser des impuretés et des épibiontes.
- immersion dans de l'eau à 25°C.

- addition d'eau de mer contenant des ovules.
- succession de chocs froids et chauds, de 18°C à 28°C.

La ponte intervient entre 1h et 4h après les premiers chocs.

- dès qu'un animal émet des gamètes il est abondamment rincé et isolé dans un bécher où il termine sa ponte. Le bac de stimulation est également rincé en continu afin que les femelles ne filtrent des spermatozoïdes (fécondation non contrôlée). La bonne qualité des gamètes est vérifiée (spermatozoïdes mobiles et non agglutinés, présence d'une vésicule germinative au centre des ovules). Seuls les ovules non contaminés par des spermatozoïdes sont utilisés.

On utilise en moyenne 3 mâles pour 5 femelles. Le mélange des gamètes de différents géniteurs permet de réduire la variabilité individuelle de leur qualité. Avant la fécondation un lot d'ovocytes est prélevé afin de déterminer 2 heures après, le pourcentage de fécondation incontrôlée.

- Les fécès et les impuretés sont éliminés par tamisage des gamètes (ovules sur 75µm, spermatozoïdes sur 25µm).

Un rapport spermatozoïdes/ovules compris entre 50 et 100 permet d'éviter le phénomène de polyspermie et ainsi d'obtenir un taux optimum de fécondation (Gruffydd et Beaumont, 1970).

Enfin les ovocytes sont répartis en plusieurs lots selon le protocole expérimental et placés dans un bain-marie pour contrôler la température pendant le temps d'incubation.

* PRELEVEMENT DES GAMETES :

Pour éviter toute fécondation incontrôlée, une autre méthode permet d'obtenir des gamètes: elle consiste à scarifier la gonade des animaux matures à l'aide d'un scalpel; on récupère alors les gamètes à l'aide d'une pissette d'eau de mer. Ensuite les étapes suivantes sont les mêmes que pour une ponte naturelle. Le principal avantage de cette technique est l'absence de fécondation incontrôlée, élément indispensable dans les expériences de cytogénétique. Elle permet aussi un gain de temps considérable mais elle entraîne le sacrifice des individus, d'où la nécessité d'avoir un stock de géniteurs suffisamment important.

2.1.4 ELEVAGE LARVAIRE

Après les différents traitements d'induction, les oeufs sont incubés à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ à raison de 100 par ml dans des bacs cylindro-coniques de 30 litres remplis d'eau de mer filtrée à $1\mu\text{m}$ et légèrement agitée par un bullage à la base.

Au bout de 24 heures, les larves nageuses sont recueillies sur un tamis (maillage de $45\mu\text{m}$), comptées et mesurées par lots afin:

- d'ajuster leur nombre à 10 larves par ml,
- de chiffrer le taux d'éclosion,
- et éventuellement de dénombrer le taux de larves anormales.

Cette opération de tamisage est répétée ensuite tout les deux jours jusqu'au transfert en nurserie; à cette occasion des prélèvements sont effectués pour le contrôle de la croissance et la mortalité.

Après chaque renouvellement d'eau, un antibiotique (chloramphénicol) est ajouté, ceci pour limiter le développement bactérien.

Les larves sont alimentées quotidiennement avec diverses espèces phytoplanctoniques à des concentrations de 20 cellules/ μl par espèce (mélange de 3 espèces en général).

2.1.5 MICRONURSERIE

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

2.2 TECHNIQUES DE CYTOGENETIQUE

2.2.1 DESTRUCTION DU GENOME PARTERNELE

Les agents conduisant à l'inactivation d'un génome parental sont multiples (rayons ionisants et ultra-violet, mutagènes chimiques) mais leur efficacité est variable. Les rayons ultra-violet sont souvent préférés en raison de leur facilité de mise en oeuvre et de leur faible coût d'utilisation. De plus ils conduisent à une inactivation complète du stock chromosomique. Les UV possèdent néanmoins un très faible pouvoir de pénétration. Un certain nombre d'artifices permettent d'augmenter l'homogénéité du traitement:

- l'utilisation de faibles épaisseurs de sperme
- la dilution de l'échantillon à irradier
- l'agitation pendant l'irradiation

L'inactivation du sperme d'huître a été mise au point selon le même principe que chez les poissons. Cependant selon Diter (1990), il est beaucoup plus difficile, dans le cas des bivalves, de récolter du sperme exempt d'impuretés et par conséquent d'effectuer une dilution standard.

Le sperme concentré est dilué en se référant à son absorbance à une longueur d'onde de 265 nm. Cette méthode a l'avantage de prendre en compte la turbidité de l'eau, variable selon la saison et le lieu. Pour que les expériences soient reproductibles, la concentration du sperme traité est toujours ajustée de sorte que sa dilution au 1/10^{ème} ait une densité optique de 0.55 à 265 nm (Diter, 1990).

Le sperme est placé par fractions de 5ml dans une boîte de pétri (6cm de diamètre), sur un agitateur magnétique et irradié sous une lampe UV (254 nm) de 30W (Bioblock C89330). L'intensité de rayonnement au niveau de la surface du liquide se stabilise à 700 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, après un temps de chauffage de 20 minutes. La suspension est constamment et lentement agitée à l'aide d'un barreau magnétique très fin.

Le paramètre optimisé a été le temps d'irradiation. La gynogenèse haploïde a été mise au point en se basant sur la motilité du sperme, le taux de fécondation, le taux de larves D (premier stade larvaire) et les résultats d'analyse d'images.

2.2.2 FECONDATION

La fécondation est provoquée immédiatement après l'irradiation avant que le sperme ne soit altéré. Les témoins et les lots traités sont tout d'abord fécondés dans un petit volume (environ 50ml) maintenu à $25\pm 1^\circ\text{C}$. Quelques minutes après, les différents lots passent dans des volumes d'1 litre puis les traitements terminés dans des volumes de 30 litres à une densité de 100 oeufs/ml.

2.2.3 RESTAURATION DE LA DIPLOIDIE

2.2.3.1 CHRONOLOGIE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRECOCE

La connaissance de la chronologie des premiers événements embryonnaires, à une température donnée, est nécessaire pour choisir le moment optimum d'application du traitement chimique inducteur de la diploïdisation. Ce traitement doit permettre la rétention d'un ou de deux globules polaires (GP).

Afin d'établir cette chronologie, les embryons sont prélevés toutes les 5 minutes après la fécondation et fixés dans du formaldéhyde (6% dans un tampon GA, voir annexe 1). L'observation au microscope de chaque échantillon permet de déterminer, en comptant 100 embryons, le pourcentage relatif des cellules à chacun des stades. La petite taille du GP2 par rapport au GP1, ainsi que sa faible réfringence rendent parfois son observation difficile (planche photo I). Pour améliorer la lecture, les échantillons sont colorés à l'aide d'un fluorochrome (Hoescht 33258) et observés au microscope à épifluorescence (coloration à l'Hoescht: annexe 1; Guerrier P., communication personnelle). Dans ces conditions, l'ADN des cellules fluoresce en blanc sur un fond bleu, les globules polaires apparaissent distinctement sous la forme de taches très lumineuses (planche photo II). D'après Arai *et al.* (1986) un stade est considéré comme représentatif de la population lorsqu'il atteint 40% de celle-ci.

PLANCHE PHOTO I

1- Spermatozoïdes.

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

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

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

5- Stade 2 cellules.

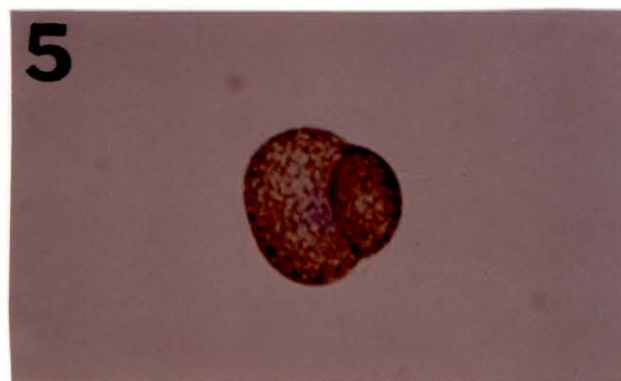
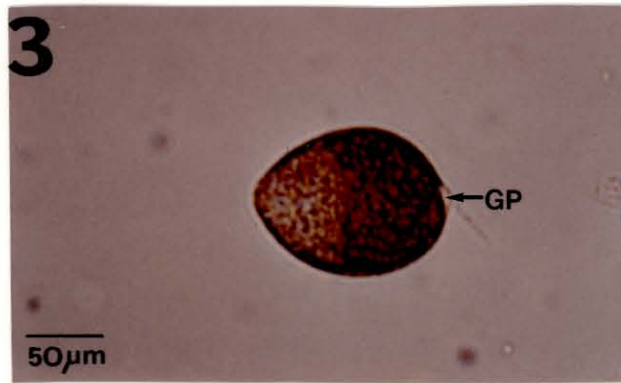
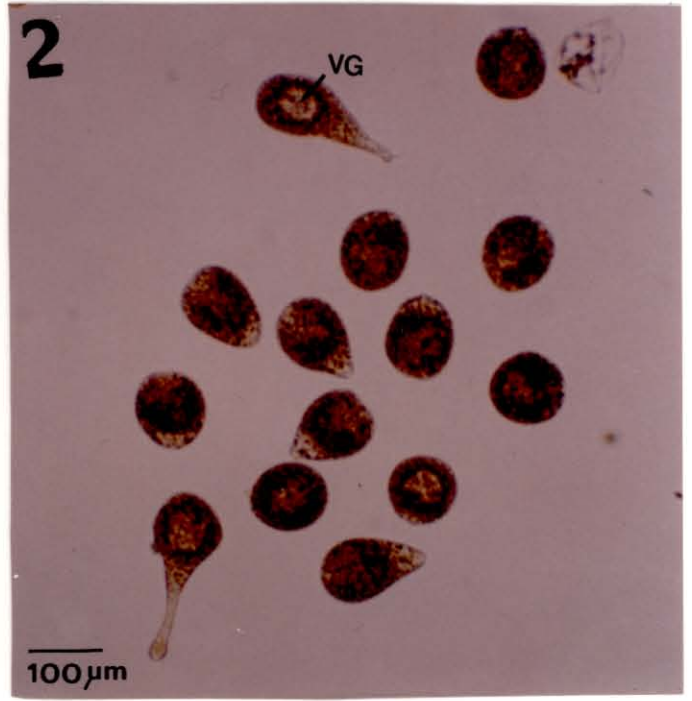
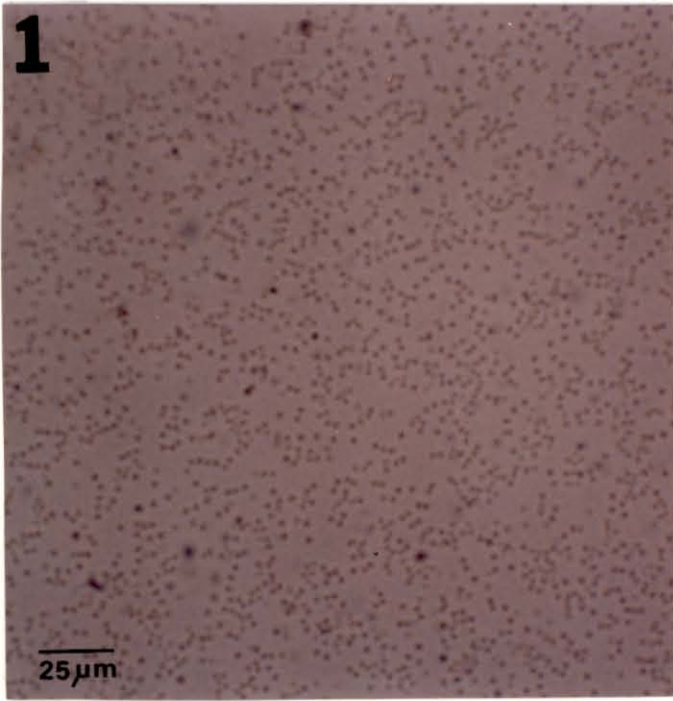


PLANCHE PHOTO II

1- Ovule non fécondé.

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

3- Condensation du génome maternelle.

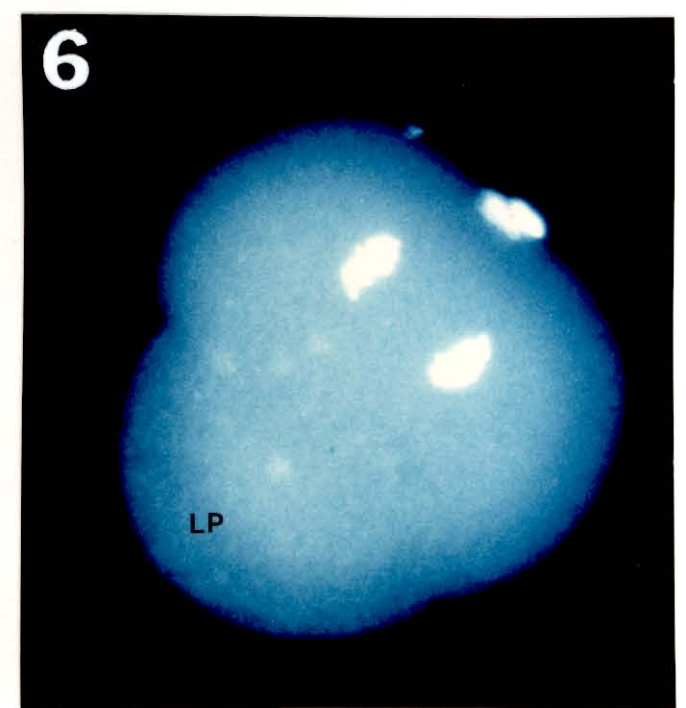
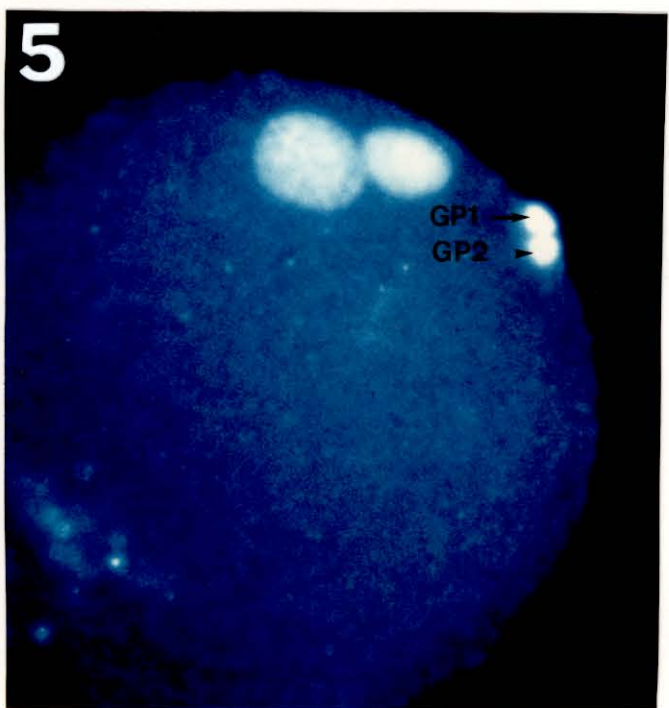
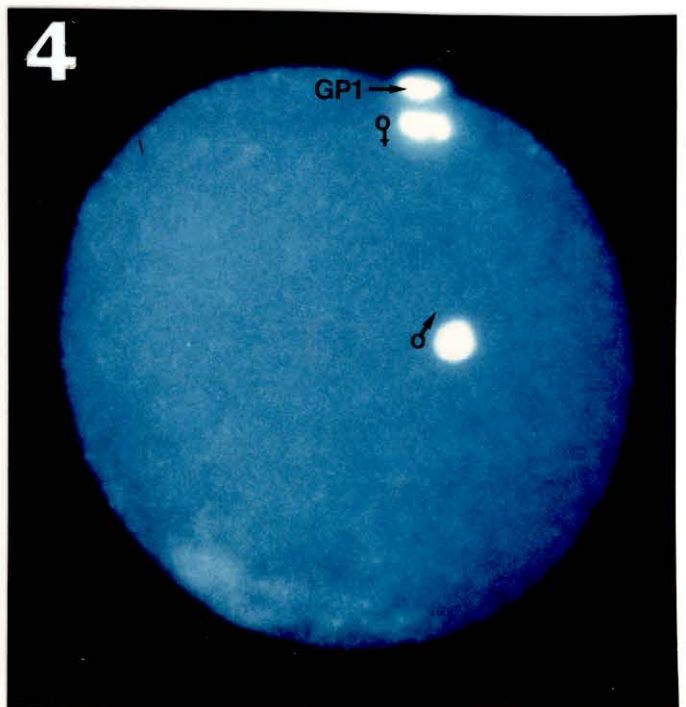
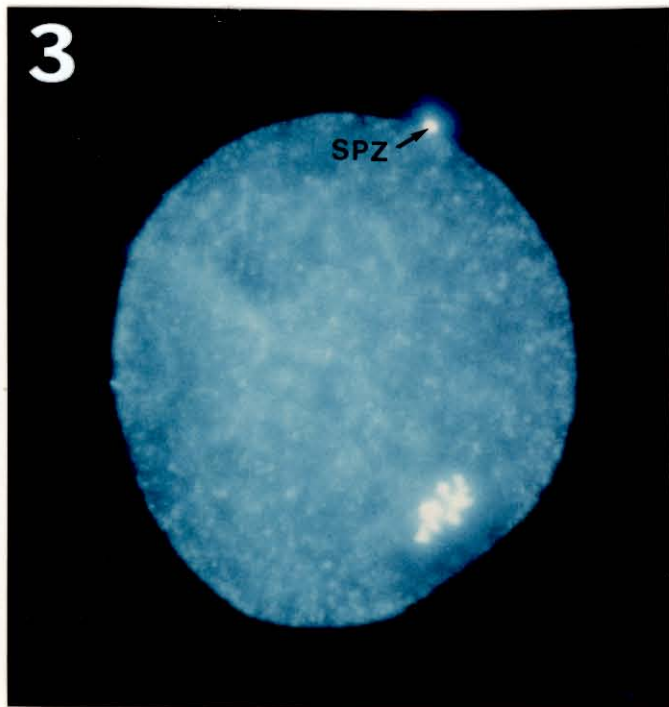
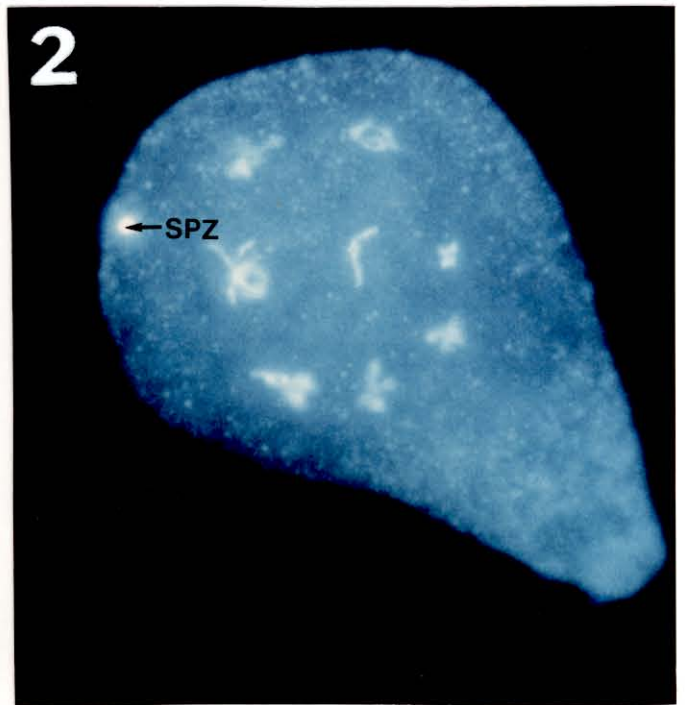
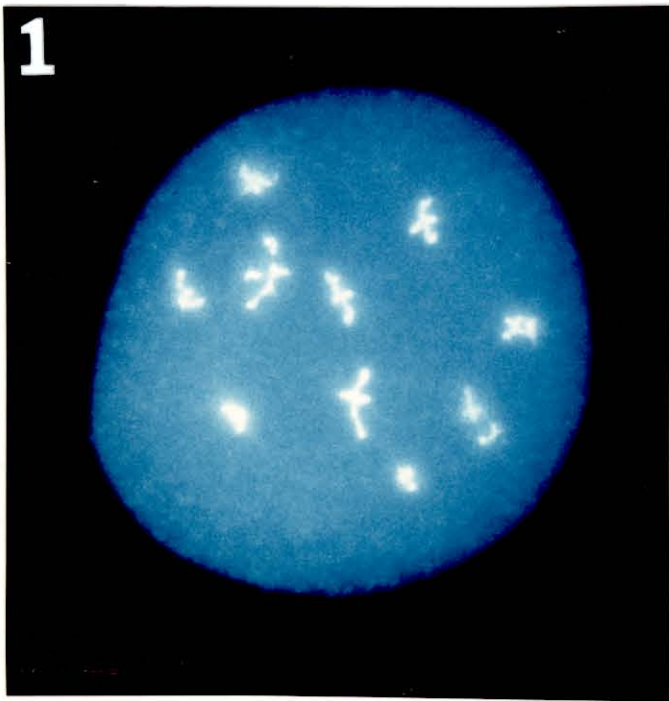
4- Expulsion du premier globule polaire (GP1)

♂ génome paternel

♀ génome maternelle

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

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



2.2.3.2 TRAITEMENT A LA CYTOCHALASINE B

La restauration de la diploïdie est inductible chimiquement par la cytochalasine B (CB). Les cytochalasines qui résultent du métabolisme de diverses espèces de champignons, modifient le degré de polymérisation des molécules d'actine en empêchant leur addition aux filaments, sans toutefois inhiber la mitose. Appliquées lors de la phases préliminaire à l'expulsion d'un des deux GP (méïose), ces substances désorganisent simultanément le réseau de filaments qui permet la migration des chromosomes, et l'anneau fibrillaire qui opère normalement une constriction du fragment cytoplasmique constituant le GP (Gendreau, 1988).

L'efficacité du traitement dépend de plusieurs paramètres:

- la concentration du produit,
- la température d'incubation,
- le moment d'application,
- la durée du traitement.

Le traitement appliqué est adapté de la méthode de Downing et Allen (1987). Il comporte deux étapes, l'immersion des oeufs dans une solution de CB puis le rinçage dans une solution de DMSO (diméthylsulfoxyde).

La CB est un produit dangereux, son action cancérigène et tératogène fait qu'elle doit être manipulée avec précaution. C'est également un produit coûteux (60000F le gramme). Il est recommandé de l'utiliser à une concentration de 1mg/l pendant 15 minutes (Downing et Allen, 1987).

La CB est tout d'abord dissoute dans un solvant, le DMSO, puis mise en contact avec les embryons. Après 15 minutes, ceux-ci sont recueillis sur un tamis de 10 μm où ils sont rincés. Les embryons sont placés dans un bain de DMSO (0.1%) durant 20 minutes afin de les débarrasser de la cytochalasine résiduelle. Puis ils sont placés en incubation dans un bac de 30 litres.

2.2.3.3 TRAITEMENT AU 6-DMAP

Le 6-diméthylaminopurine (6-DMAP) ne perturbe pas la synthèse des protéines mais seulement l'activité phosphorylatrice (Néant et Guerrier, 1988) des protéines kinases, entraînant ainsi la décondensation de la chromatine.

L'effet est réversible, il suffit de laver les oeufs avec de l'eau de mer pour que les protéines se rephosphorylent, que les chromosomes se recondensent, et que les microtubules se reforment.

Le traitement au 6-DMAP est appliqué selon le protocole de Gérard *et al.* (1991) avec une concentration de 300 $\mu\text{M/l}$ administrée 15 minutes après la fécondation pendant 20 minutes.

2.2.4 DETERMINATION DE LA PLOIDIE SUR LES EMBRYONS

2.2.4.1 METHODE CARYOLOGIQUE

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

L'observation microscopique permet de compter le nombre de chromosomes sur 50 métaphases prises au hasard. Le nombre chromosomique diploïde est de 20 chez l'huître (Menzel, 1968). On admettra une tolérance de 1 à 2 chromosomes en plus ou en moins sur chaque catégorie en raison du chevauchement possible des chromosomes ou de la perte de l'un d'entre eux.

2.2.4.2 DETERMINATION PAR IMAGERIE NUMERIQUE

L'analyseur d'image, composé d'un microscope, d'une caméra et d'un micro-ordinateur est un appareil de mesure photométrique (photo ci-dessous) qui permet de déterminer le degré de ploïdie par mesure de la quantité d'ADN (Gérard *et al.* 1991). Les noyaux des cellules sont colorés par la réaction de Feulgen Rosaniline (annexe 3). Cette réaction n'utilise pas de colorants à proprement parler. L'hydrolyse acide des ponts ribose-purine de l'ADN donne des résidus aldéhydes qui en réagissant spécifiquement avec le réactif de Schiff donnent une coloration rose. La densité optique que mesure l'analyseur sera d'autant plus importante qu'il y aura d'ADN. L'analyseur d'image donne le rapport de la densité optique intégrée (DOI) existant entre un témoin diploïde et le sujet étudié. Ce rapport est de 1, si l'animal est diploïde, de 0.5 si l'animal est haploïde et de 1.5 s'il est triploïde.



La technique d'analyse de la ploïdie chez les bivalves par imagerie numérique (larves et animaux adultes) a été mise au point par Gérard *et al.* (1991). Deux protocoles existent en imagerie numérique: l'un effectué sur des individus (frottis) et l'autre sur des populations cellulaires (dissociation). Lorsqu'il s'agit de populations cellulaires il est nécessaire d'avoir des cellules bloquées au même stade de synthèse d'ADN.

Afin d'évaluer rapidement et précocement le taux de ploïdie des échantillons traités, cette technique a été améliorée durant ce stage afin de pouvoir l'appliquer aux embryons et d'obtenir une meilleure résolution des analyses.

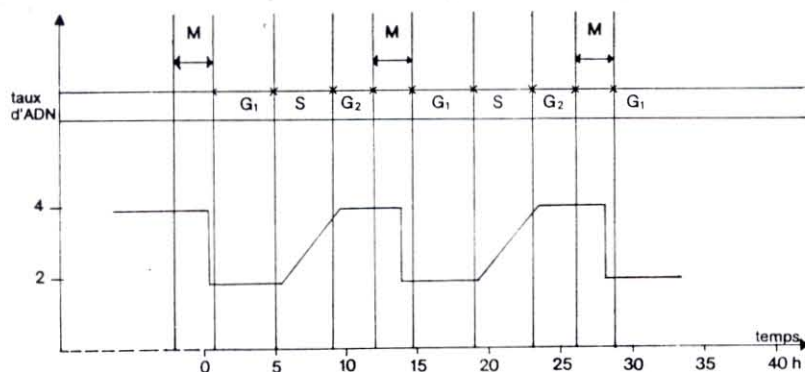
3. RESULTATS, DISCUSSION

3. RESULTATS, DISCUSSION

3.1 AMELIORATION DE LA TECHNIQUE D'ANALYSE D'IMAGE SUR LES EMBRYONS:

L'obtention de résultats satisfaisants, par imagerie numérique appliquée à l'étude des noyaux des cellules d'embryons, nécessite de disposer de cellules bloquées au stade G1 (fig. 3). Les noyaux ont ainsi la même quantité d'ADN.

Fig. 3: Cycle de synthèse d'ADN d'une cellule (d'après Bassler). Figure reproduite à partir de l'encyclopédie des sciences (tome I. Ed. Kister)



- la phase M caractérise la mitose,
- la phase G1 correspond à une période se situant avant la synthèse d'ADN préparant la mitose,
- la phase S correspond à la synthèse d'ADN,
- la phase G2 est la période entre la synthèse de l'ADN et la mitose.

Deux expériences ont permis de tester différents produits antiméiotiques: la colchicine, l'hydroxyurée et l'aphidicoline.

Rappelons que la colchicine désorganise l'appareil achromatique, l'hydroxyurée inhibe de façon réversible la synthèse d'ADN en bloquant la synthèse des protéines, et que l'aphidicoline inhibe la synthèse d'ADN en agissant spécifiquement sur les ADN-polymérase.

Des solutions "stock" de ces trois produits antiméiotiques ont été préparées dans de l'eau distillée. Ces solutions ont été diluées dans de l'eau de mer de sorte que leur concentration finale soit de 0.2 g/l (colchicine), 500 µg/ml (hydroxyurée) et 5 µg/ml (aphidicoline).

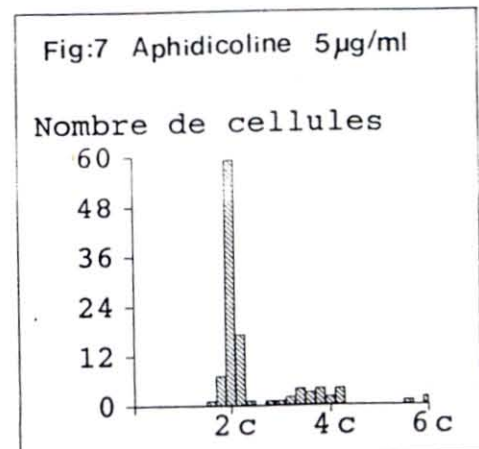
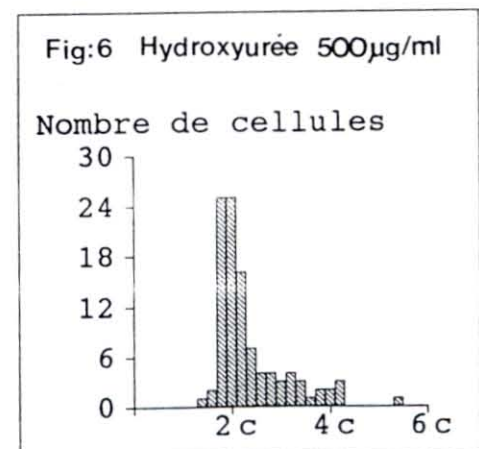
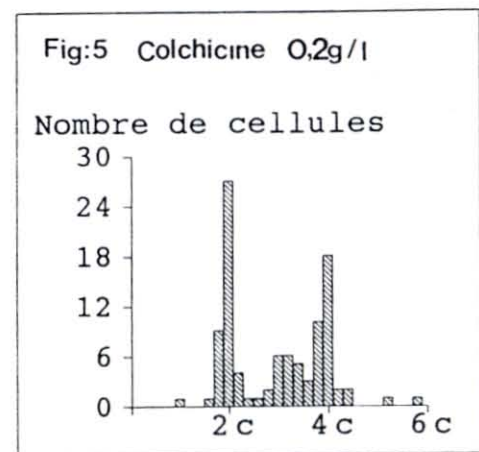
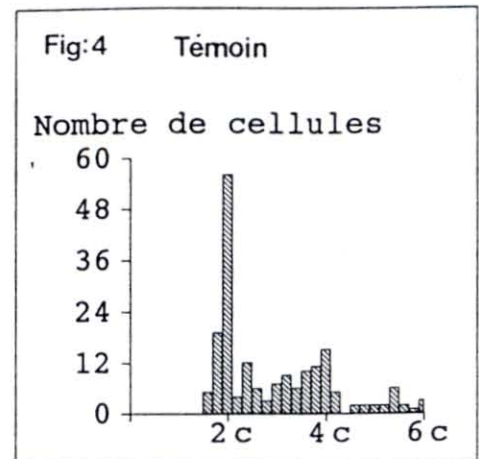
La mise en contact de ces différents produits s'est faite pendant 2 heures sur des embryons âgés de 4 heures.

L'analyse du lot témoin indique que, sans aucun traitement chimique, l'histogramme obtenu donne l'image d'une population cellulaire non homogène au niveau du taux d'ADN (fig. 4), mais contenant principalement des cellules "2C".

L'analyse des lots traités à la colchicine met en évidence la présence de deux populations cellulaires, l'une à "2 C" (diploïde) et l'autre à "4 C" (tétraploïde, cellules en phases G2 et S). Ce résultat n'est pas satisfaisant pour réaliser une référence diploïde pour l'imagerie numérique (fig. 5).

Bien qu'à première vue on obtienne, pour le traitement à l'hydroxyurée (fig. 6), une population de cellules homogène (comparer fig. 5 et 6), celle-ci reste relativement étalée autour de la valeur "2C" (comparer fig.6 et 7).

Les résultats obtenus après traitement à l'aphidicoline mettent en évidence une population cellulaire contenant presque exclusivement des cellules à "2C" (fig. 7). L'effet de ce produit a donc été jugé satisfaisant et a été retenu pour la préparation des cellules destinées à la technique d'analyse d'images.



Une seconde expérience a permis de tester l'influence de la concentration en aphidicoline sur l'homogénéité de la population "2C" obtenue. Les résultats présentés figure 8 montrent que quelque soit la concentration utilisée, on obtient une population de cellules "2C" très homogène. Une dose de 5 $\mu\text{g/ml}$ paraît donc être suffisante pour avoir des résultats corrects.

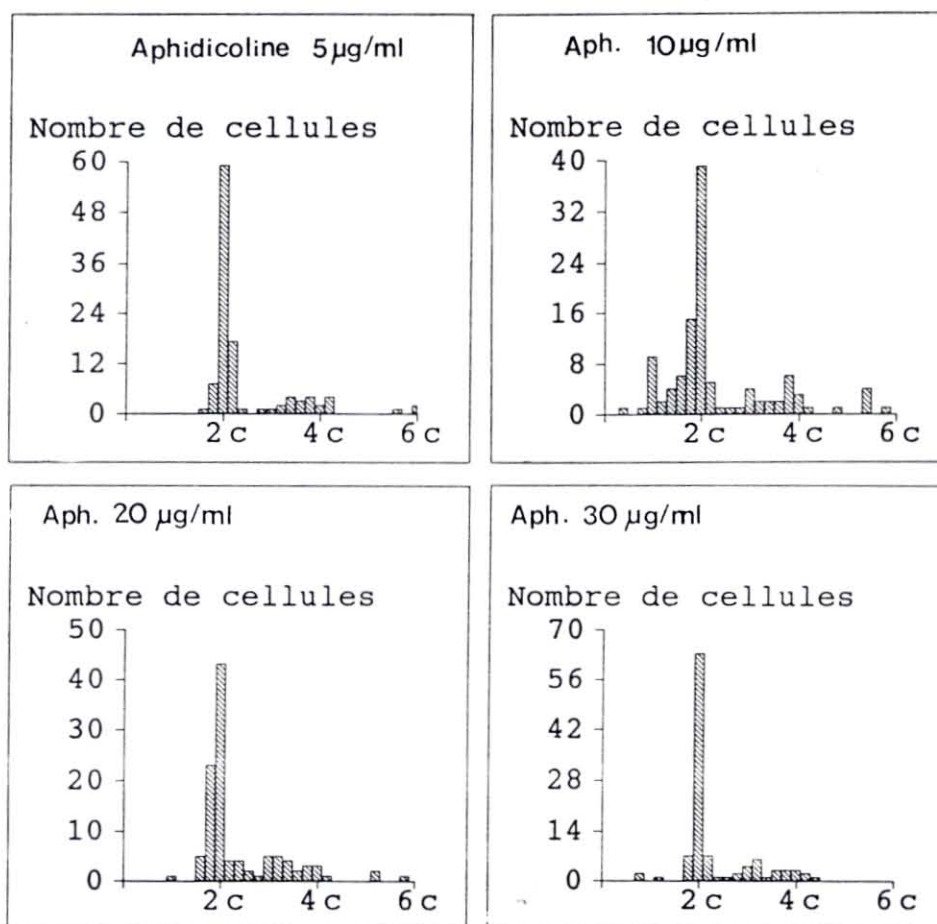


Fig. 8 : Effet de la concentration en aphidicoline sur l'étalement du pic "2C".

3.2 IRRADIATION DU SPERME:

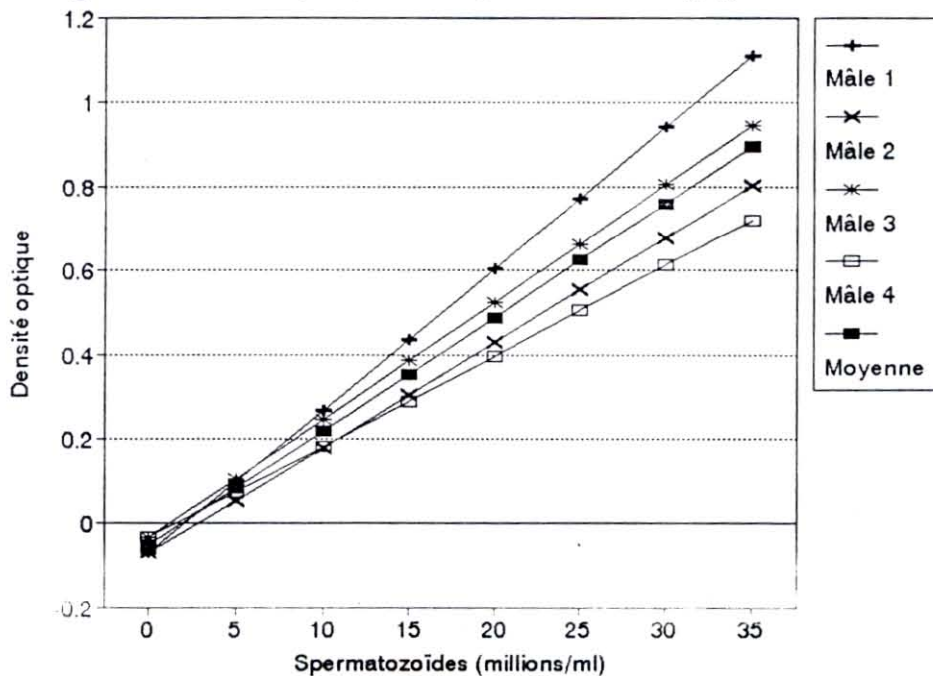
3.2.1 MISE AU POINT D'UNE DILUTION STANDARD DU SPERME:

Quelques expériences préliminaires ont permis de déterminer les paramètres expérimentaux optimaux pour l'obtention d'une dilution standard du sperme.

Une dilution standard est nécessaire pour que les irradiations aux UV soient reproductibles. Les UV étant peu pénétrants, leurs effets dépendent donc de la turbidité du milieu.

Des gammes d'étalonnage ont été effectuées afin de mettre en évidence la relation entre le nombre de spermatozoïdes et la densité optique. Les résultats obtenus sur 4 mâles différents montrent que les gammes étalon ne sont pas reproductibles, en effet, elles présentent d'assez grandes variations de pentes (fig. 9). On ne peut donc pas se fier au seul comptage des spermatozoïdes pour effectuer une dilution standard. Le sperme concentré doit être dilué en se référant toujours à la même densité optique: 0.55 à 265nm (Diter, 1990). Le pouvoir de pénétration des UV est dans ces conditions toujours le même.

Fig. 9 : Densité optique du sperme de *C. gigas*

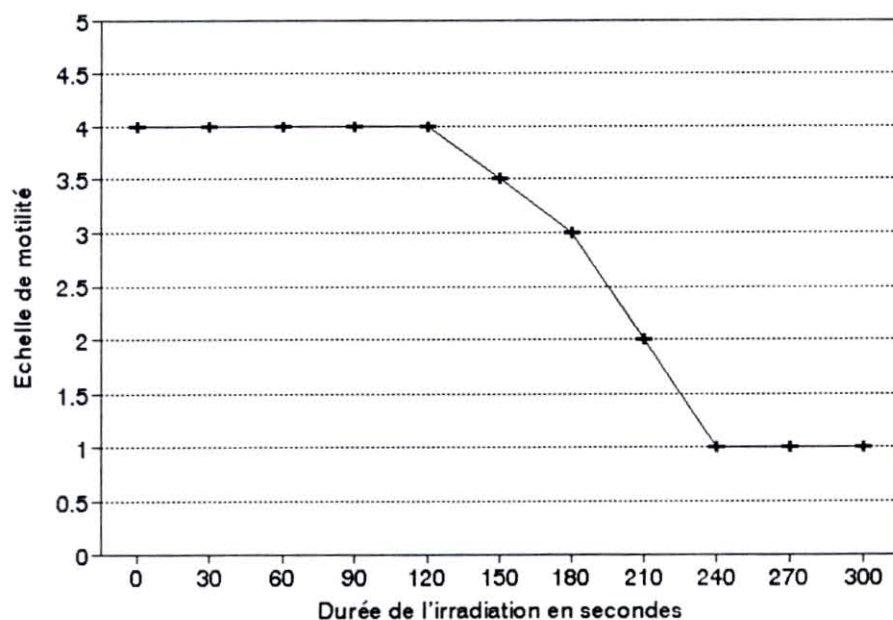


3.2.2 IRRADIATION ET MOTILITE DU SPERME

Une observation microscopique des spermatozoïdes a été réalisée après chaque irradiation. L'évolution de la motilité du sperme en fonction du temps d'irradiation est mise en évidence sur la figure 10. La perte totale de motilité du sperme, lorsqu'il est de bonne qualité intervient après environ 240s d'irradiation. La motilité des spermatozoïdes commence à être affectée pour des durées d'exposition supérieures à 120s.

Pour induire des individus gynogénétiques, on doit choisir du sperme ayant un stock génétique détruit mais présentant encore une certaine motilité afin qu'il soit fécondant. Dans les conditions de travail développées précédemment, un temps d'irradiation d'environ 180s semble le mieux adapté.

Fig.10: Motilité du sperme
Influence de la durée du traitement



Echelle de motilité

Indice 4: Motilité normale

Indice 3: Motilité affectée

Indice 2: Faible motilité

Indice 1: Plus de motilité

3.2.3 RECHERCHE DE L'EFFET HERTWIG:

L'effet Hertwig permet, chez les poissons, de déterminer la durée d'application du traitement pour laquelle le matériel génétique des spermatozoïdes est totalement inactivé tout

en permettant la fécondation des ovules (Chourrout *et al.*, 1980). Cet effet Hertwig correspond à la succession de plusieurs étapes qui sont illustrées dans la figure 11 (Chevassus *et al.*, 1979):

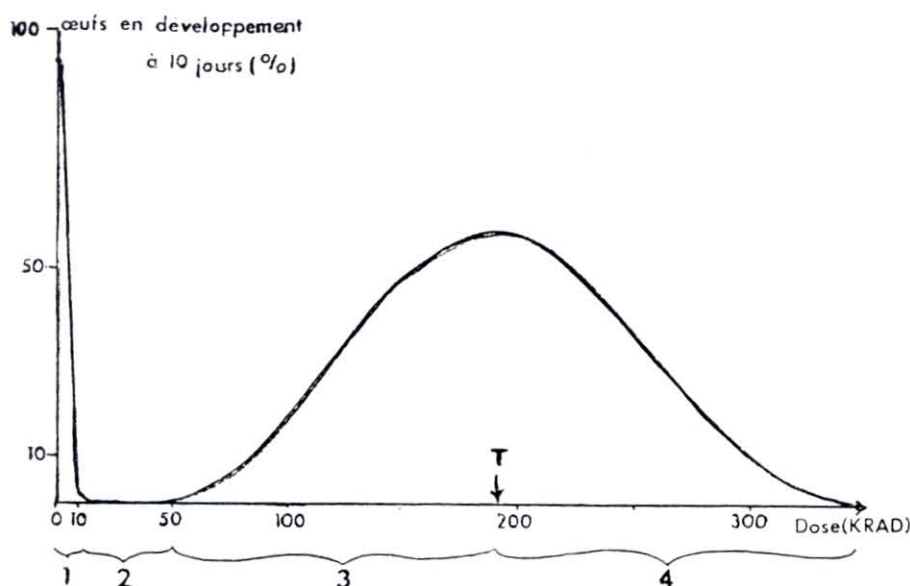


Fig. 11 : Mise en évidence de l'effet Hertwig chez les poissons.

Théoriquement si l'on augmente le temps d'irradiation des spermatozoïdes, on doit observer:

- phase 1: décroissance rapide du taux de fécondation,
- phase 2: zone de "silence",

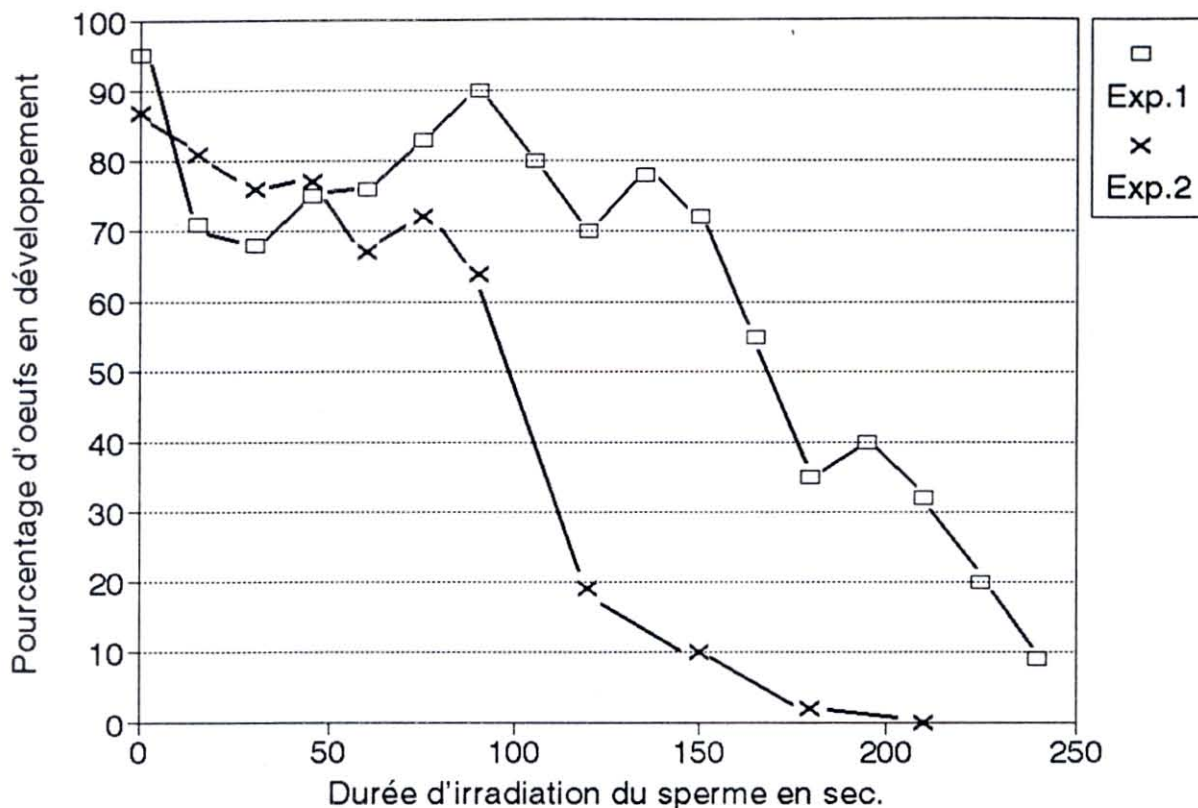
Ces deux phases correspondent à l'accumulation de mutations qui rendent inviables une proportion de plus en plus forte d'embryons.

- phase 3: réaugmentation du taux de fécondation.
- phase 4: nouvelle diminution.

Ces deux dernières phases correspondent à la stimulation par des spermatozoïdes dont le noyau est inactivé et qui stimulent un développement embryonnaire à partir du seul matériel génétique de l'ovule. Pour des durées plus longues, les spermatozoïdes sont complètement détruits et ne peuvent plus stimuler l'ovule. La durée "T" serait la durée d'irradiation choisie pour inactiver le sperme.

Deux expériences ont été menées afin de rechercher l'existence d'un effet Hertwig chez l'huître creuse. Ces deux expériences n'ont permis de constater qu'une diminution globale du pourcentage d'œufs en développement. L'accroissement du taux de fécondation (phase 3 de la courbe obtenue chez les poissons) n'apparaît dans aucune de nos expériences (Fig. 12).

Fig.12: Recherche de l'effet Hertwig



Ces deux seules expériences paraissent insuffisantes pour tirer une conclusion définitive sur l'effet Hertwig chez les mollusques. Cependant il apparaît que les haploïdes gynogénétiques chez l'huître ne soient viables que 24 heures alors que chez les poissons la viabilité peut atteindre plusieurs jours. Chez ces derniers, l'effet Hertwig est observé au bout de 10 jours. De cette façon, on peut faire la différence entre les individus non-viables à cause de leurs mutations et les haploïdes. Chez l'huître, la viabilité des haploïdes ne semble pas suffisamment longue pour établir cette différence.

3.3 RESULTATS DES RESTAURATIONS DE LA DIPLOÏDIE A LA CYTOCHALASINE B. ET AU 6-DMAP

3.3.1 EXPERIENCE 1:

3.3.1.1 PROTOCOLE

Lors de cette expérience, deux durées d'irradiation ont été testées: 3 et 5 minutes. Comme le 6-DMAP donne de bons résultats comme agent de triploïdisation (Gérard *et al.*

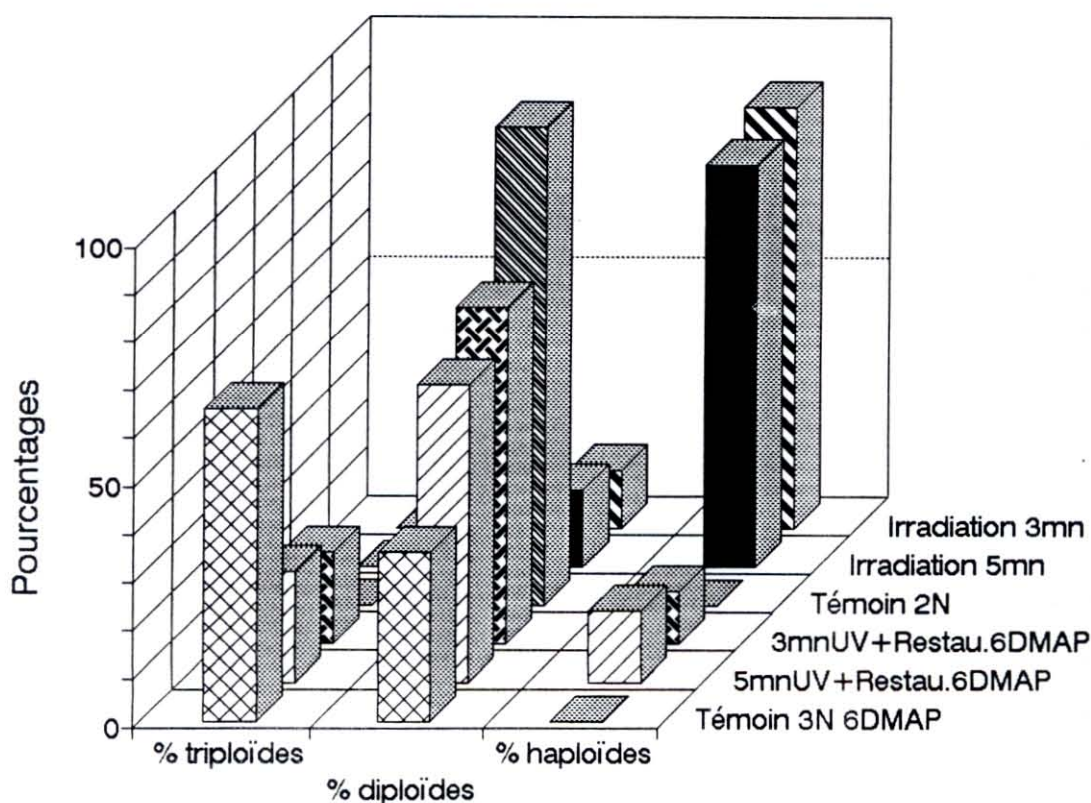
1991), il a été choisi comme traitement chimique pour la restauration de la diploïdie. Un témoin triploïde est réalisé sur un lot non irradié afin de mettre en évidence l'efficacité du traitement (rétention d'un globule polaire).

3.3.1.2 RESTAURATION DE LA DIPLOÏDIE

Les résultats obtenus ne diffèrent pas beaucoup pour les deux irradiations (fig. 13). Pour les témoins haploïdes et les restaurations de la diploïdie, les rendements obtenus avec 3 minutes d'UV sont légèrement supérieurs à ceux obtenus avec 5 minutes d'irradiation. Après 3 minutes d'irradiation, on obtient 88% d'haploïdes et 70% de diploïdes après restauration de la diploïdie. Pour 5 minutes d'exposition aux UV, on a 84% d'haploïdes et 62% de diploïdes après le traitement au 6-DMAP.

Ces résultats sont satisfaisants mais la destruction totale du génome paternel n'est pas démontrée. Cette expérience était un test préliminaire pour déterminer les premiers paramètres expérimentaux. En conséquence, la suite de cette expérience qui aurait consisté à suivre l'élevage larvaire des individus gynogénétiques, et qui aurait pu donner des indications sur la bonne irradiation du sperme, n'a pas été réalisée.

Fig.13: Induction de la gynogenèse
Expérience 1



3.3.2 EXPERIENCES 2 ET 3

3.3.2.1 PROTOCOLE

Lors de ces deux expériences, une seule durée d'irradiation a été testée (les spermatozoïdes ont été exposés aux UV pendant 3 minutes). Deux techniques de restauration de la diploïdie ont été expérimentées (6-DMAP et cytochalasine B).

Quatre témoins ont été réalisés:

- le témoin haploïde (lot fécondé avec du sperme irradié) vérifie l'efficacité de l'irradiation,
- le témoin diploïde (fécondation normale) contrôle la viabilité des individus normaux,
- les deux témoins triploïdes (induction au 6-DMAP et à la CB) mettent en évidence l'efficacité des différents traitements chimiques.

3.3.2.2 DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRECOCE

La cinétique du développement embryonnaire précoce (fig. 14) a été observée sur trois lots de l'expérience 2:

- le lot témoin,
- le lot fécondé avec du sperme irradié pendant 3 minutes,
- le lot diploïdisé par le traitement à la CB.

Dans le cas du témoin diploïde (fig.14a), l'observation microscopique montre que l'apparition du premier GP se situe entre 5 et 15 minutes après la fécondation, et entre 15 et 30 minutes pour le second. Le premier clivage a lieu vers 45 minutes après la fécondation.

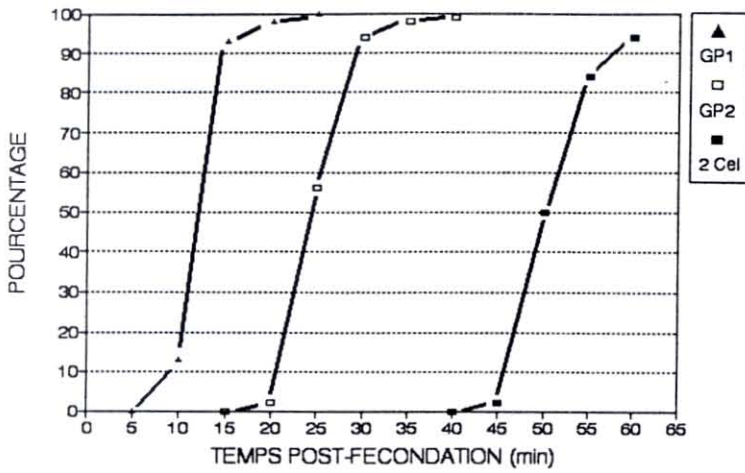
Le traitement chimique pour la restauration de la diploïdie, appliqué à partir de 15 minutes après fécondation, par référence à de précédentes cinétiques, a donc permis de retenir le 2^{ème} GP.

La fécondation avec du sperme irradié induit (pour la première heure de développement) un retard de la première division mitotique, l'expulsion des GP n'étant pas affectée (fig. 14b).

La figure 14c montre que le traitement à la CB provoque effectivement la rétention du 2^{ème} GP.

Fig.14 a : Développement embryonnaire à 25°C

Lot témoin



Echantillon analysé : témoin diploïde

Indice ADN (IA)

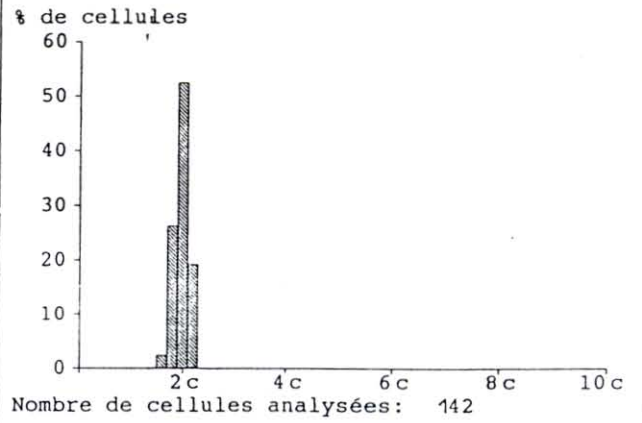
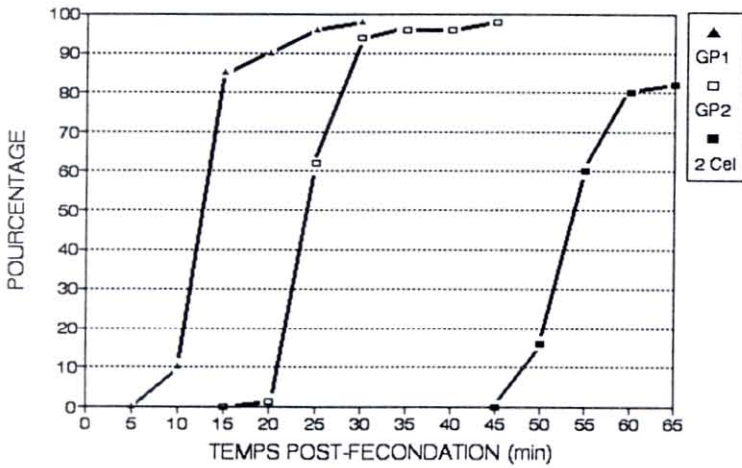


Fig.14b : Développement embryonnaire à 25°C

Lot irradié 3mn aux U.V.



Echantillon analysé : Lot irradié 3mn aux UV

Indice ADN (IA)

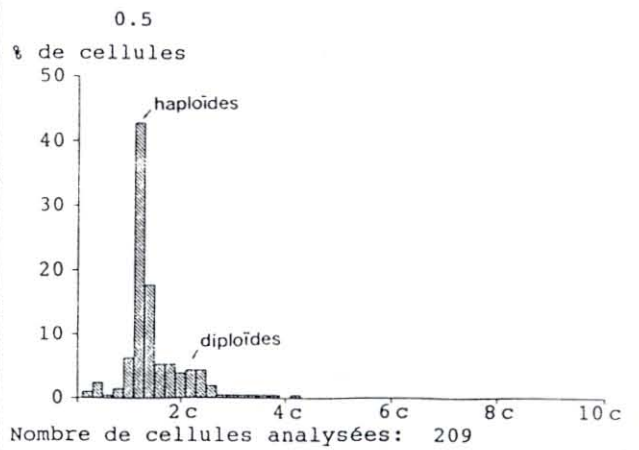
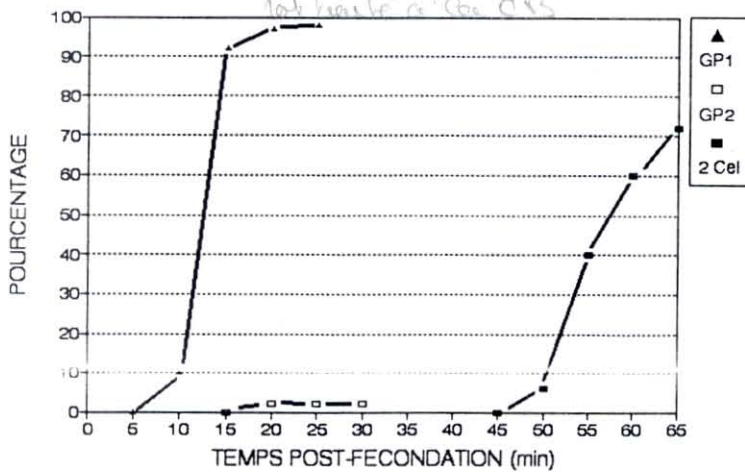


Fig.14 c : Développement embryonnaire à 25°C

Lot restauré à la CB



Echantillon analysé : Lot irradié et restauré à la CB

Indice ADN (IA)

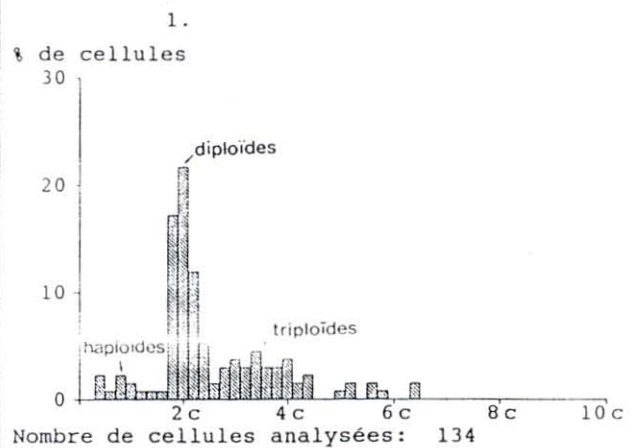


Fig.14 : DEVELOPPEMENTS EMBRYONNAIRES ET RESULTATS DE L'ANALYSE D'IMAGES DE L'EXPERIENCE 2.

D'après la figure 14b, seule la première division mitotique des embryons semble affectée par la présence de sperme irradié. L'observation des embryons au microscope à épifluorescence met cependant en évidence d'autres perturbations (planche photo III). En effet, il semble que le sperme n'ait pas été suffisamment irradié et que des résidus chromosomiques gênent le déroulement des étapes qui suivent les divisions méiotiques (photos 1, 2, 3). Au moment de la caryogamie, la fusion des pronucléus ne se produit pas et on observe alors trois cas de figure :

- le premier cas correspond à la migration, dans l'une des deux cellules-filles, des résidus chromosomiques recondensés du génome mâle (photo 2),
- dans le deuxième cas, ces résidus recondensés se répartissent dans les deux cellules-filles (photo 3),
- le troisième cas correspondrait davantage à celui attendu lors d'une irradiation optimale: le pronucléus mâle se décondense jusqu'à disparaître "complètement" (photo 4).

Ces observations permettent de supposer l'existence d'aberrations chromosomiques qui auraient une incidence sur la non-viabilité des individus gynogénétiques obtenus.

3.3.2.3 RESTAURATION DE LA DIPLOÏDIE

On constate que pour l'expérience 2 (fig.15), la CB donne de meilleurs résultats que le 6-DMAP en ce qui concerne la restauration de la diploïdie. On obtient respectivement 80% et 68% de diploïdes. Par contre, pour l'expérience 3 (fig 16), c'est avec le 6-DMAP que les meilleurs résultats sont obtenus: 90% de diploïdes, contre 71% avec la CB. On ne peut donc pas donner de conclusion sur le traitement le mieux adapté à la restauration de la diploïdie.

Le témoin haploïde de l'expérience 2 comporte 85% d'haploïdes et celui de l'expérience 3 82%. Ceci laisse penser que les diploïdes "restaurés" sont bien des diploïdes gynogénétiques.

PLANCHE PHOTO III

- 1- Persistance de résidus chromosomiques d'origine paternelle (RC).**
- 2- Migration des résidus chromosomiques dans l'une des cellules-filles.**
- 3- Partage des résidus chromosomiques dans les deux cellules-filles.**
- 4- Absence de résidus chromosomiques d'origine paternelle.**

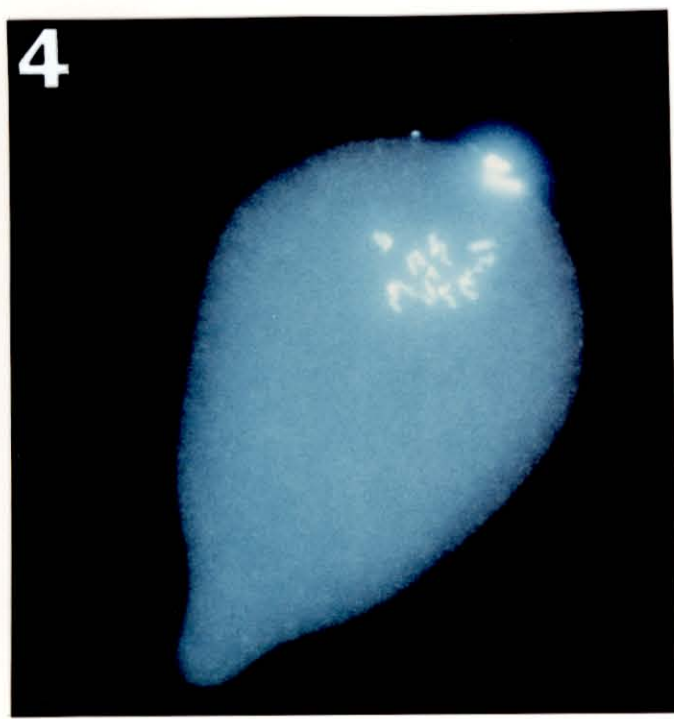
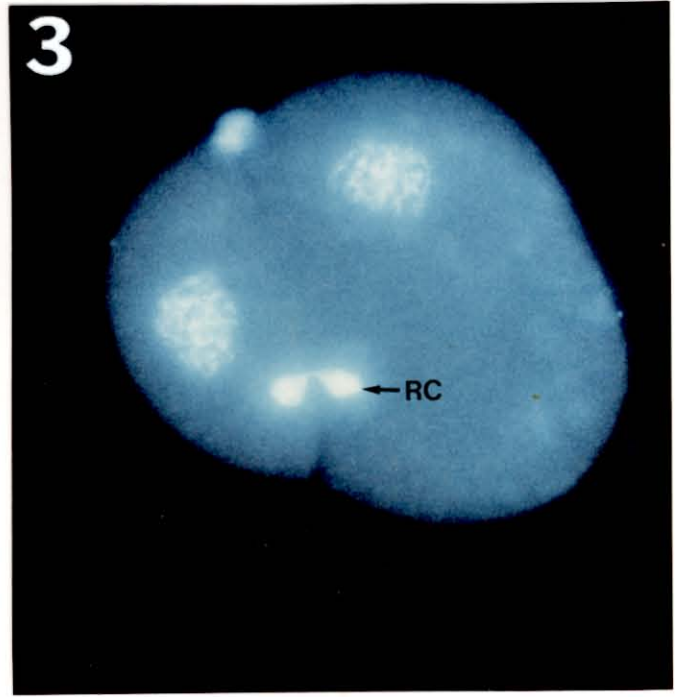
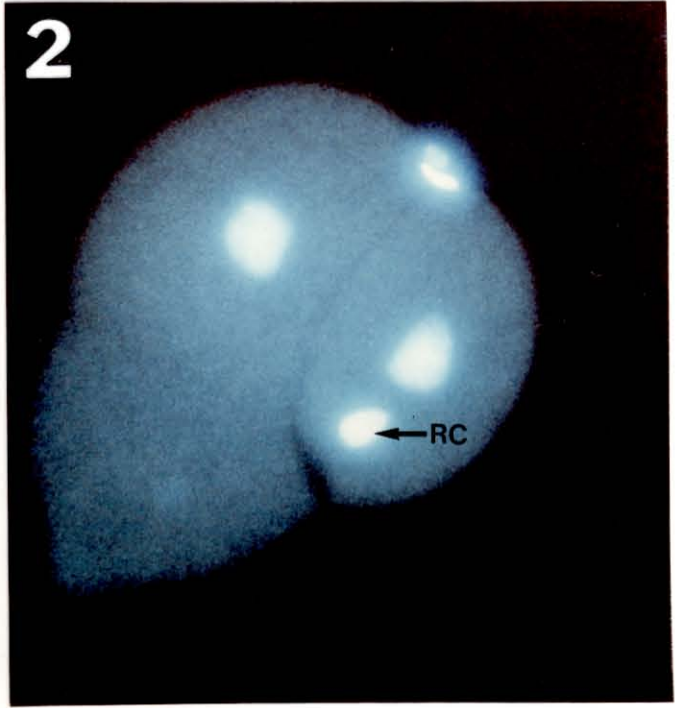
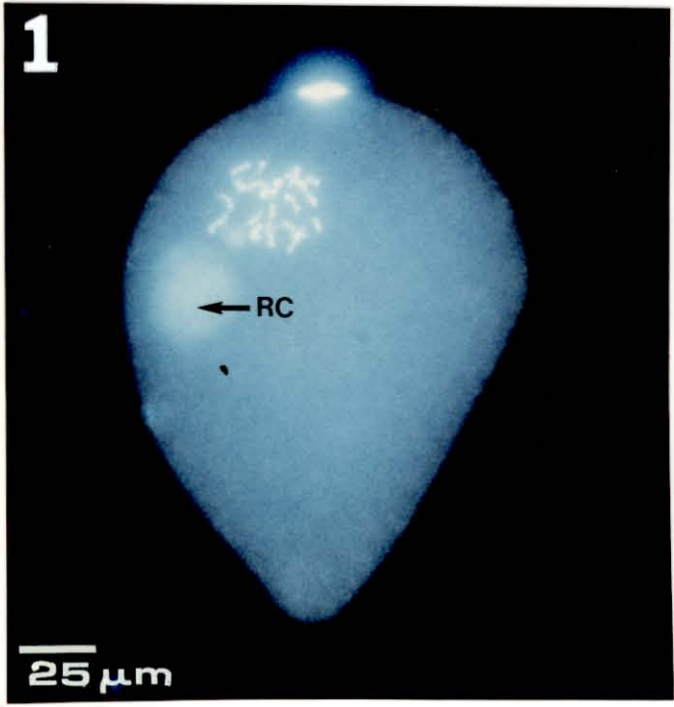


Fig. 15: Induction de la gynogénèse
Expérience 2

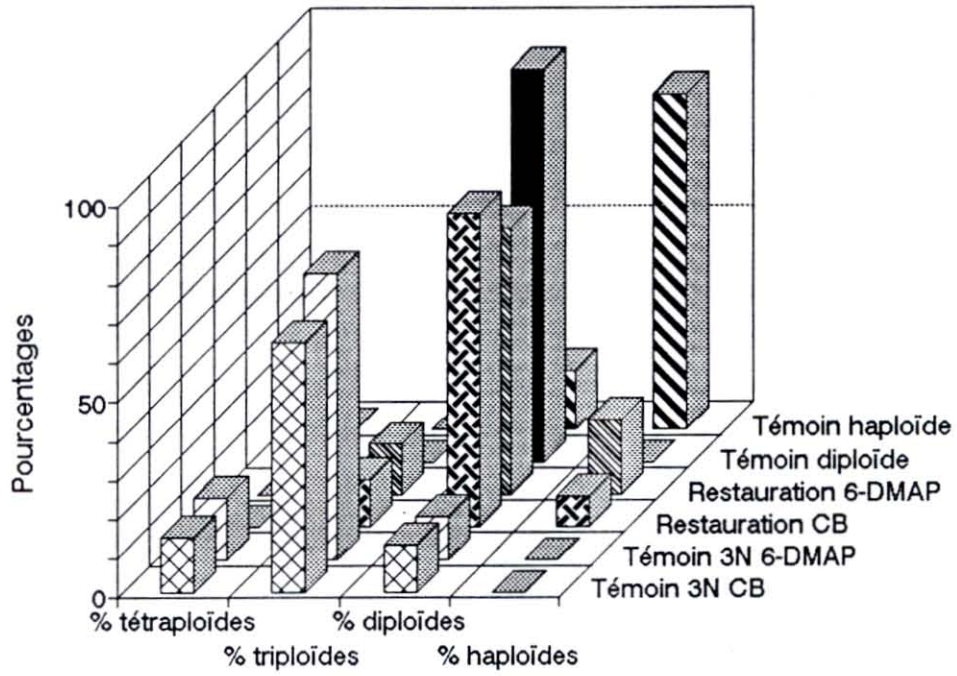
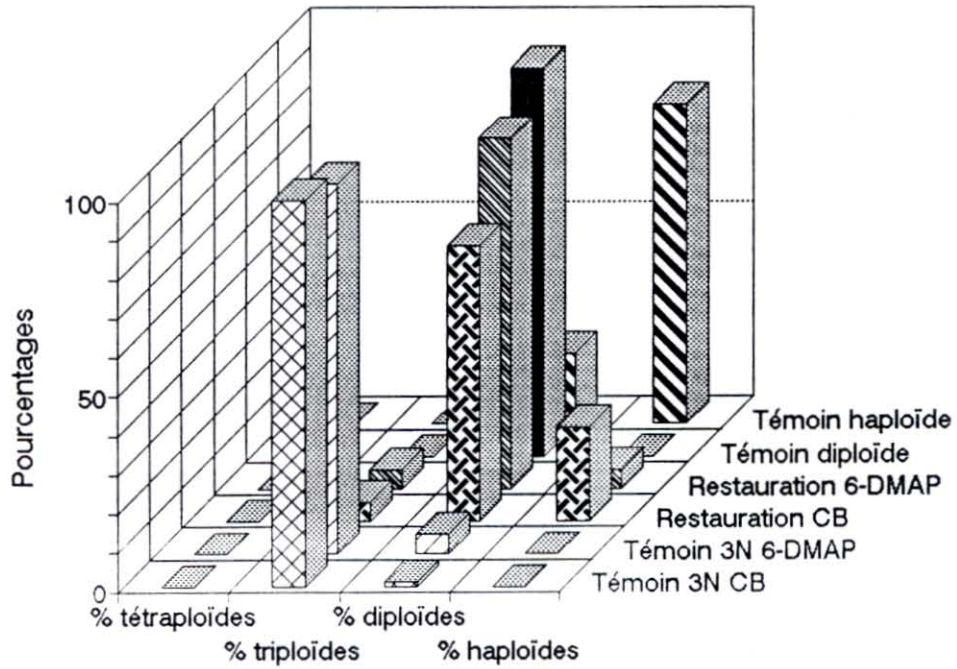


Fig. 16: Induction de la gynogénèse
Expérience 3



3.3.2.4 ELEVAJE LARVAIRE

Lors de l'expérience 2, les embryons haploïdes n'ont vécu que 24 heures : ils présentaient des malformations et ne se sont pas transformés en larves D (planche photo IV). Par contre les diploïdes "restaurés" ont survécu 5 jours (fig.17); ils se sont transformés en larves D mais ne se sont pas alimentés par la suite.

Lors de l'expérience 3, les témoins et les lots traités n'ont pas survécu plus de 3 jours. Ceci peut être dû à un problème d'alimentation ou à un problème bactérien.

Plus de deux expériences auraient été nécessaires pour tirer une conclusion sur la viabilité ou la non-viabilité des individus gynogénétiques.

Fig.17 : Elevage larvaire expérience 2
Croissance comparée

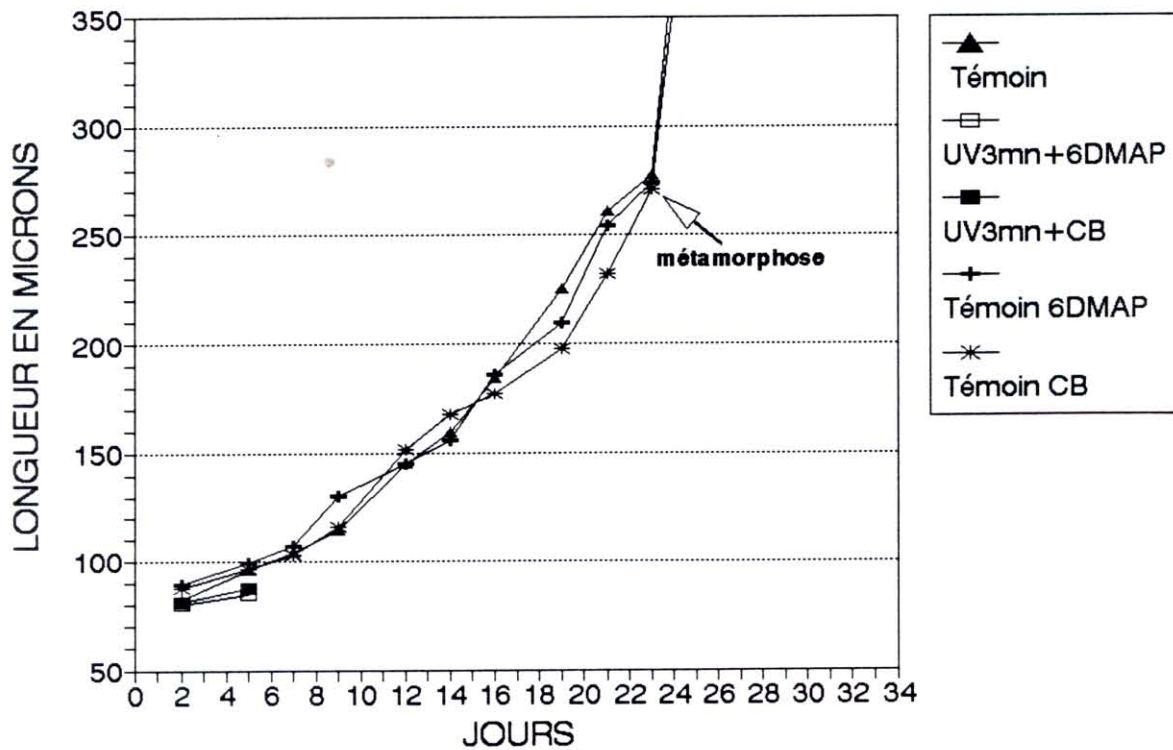
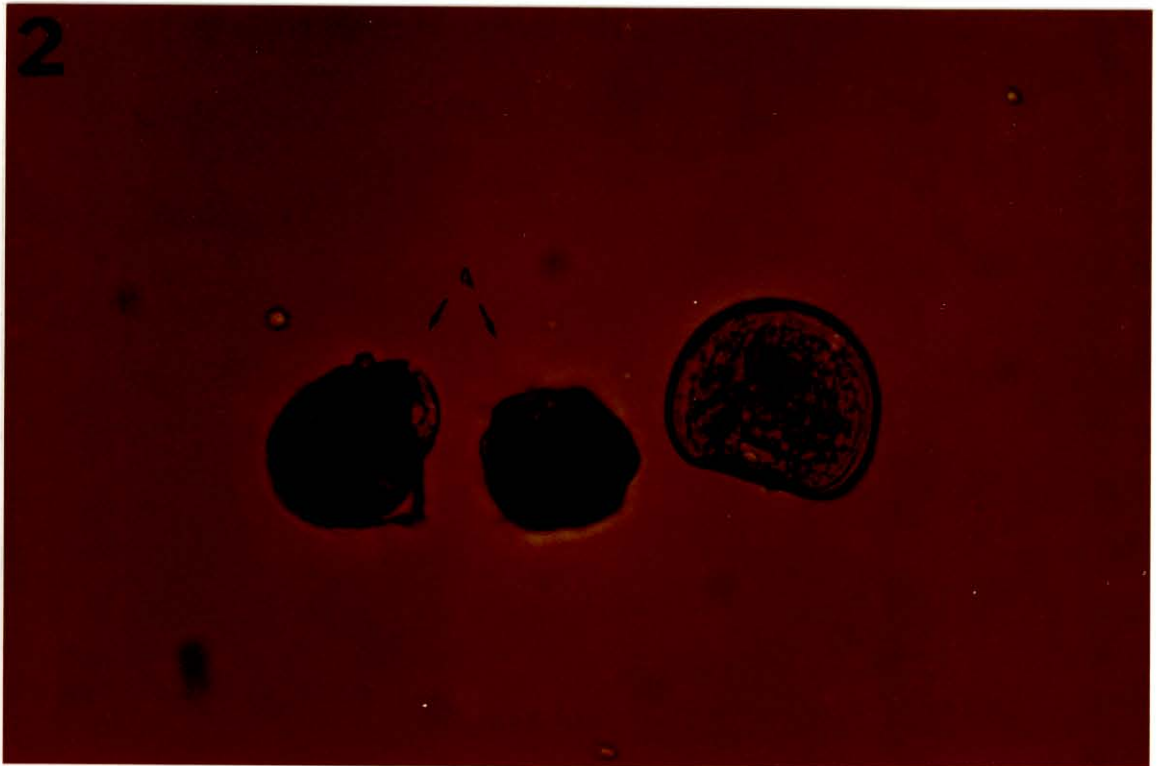
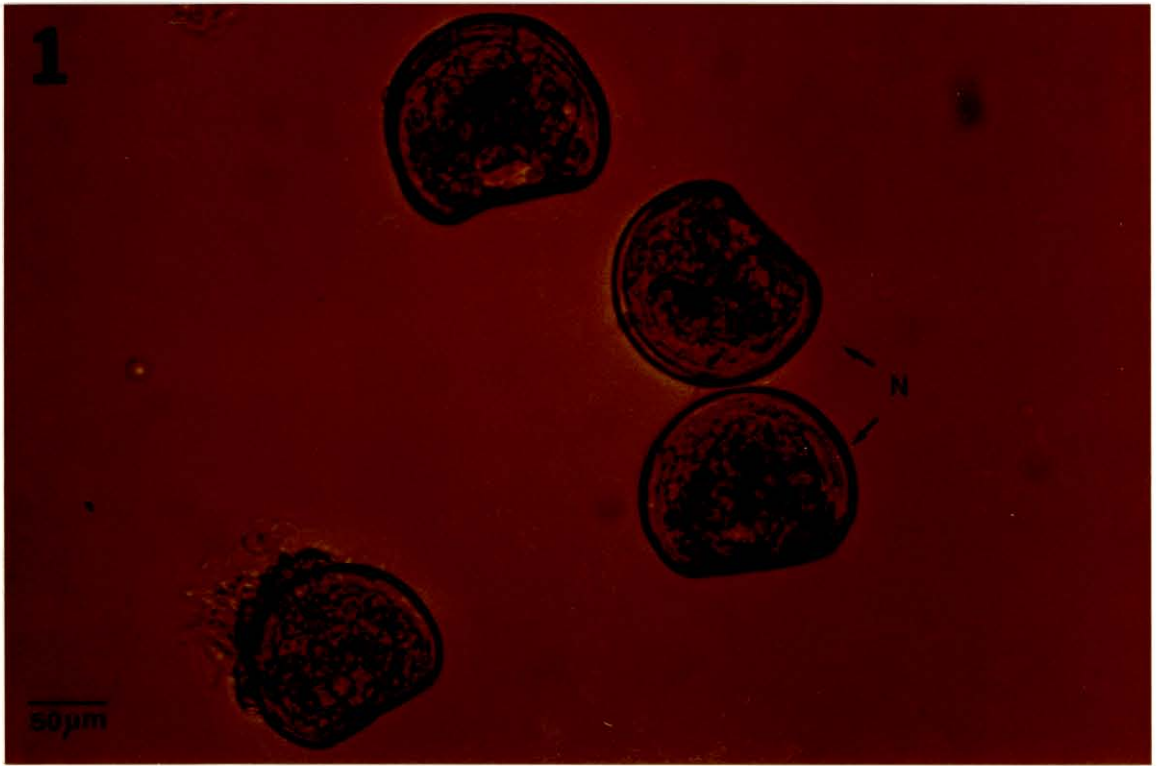


PLANCHE PHOTO IV

1- Larves D normales (N).

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



4. CONCLUSION

Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, l'inactivation génétique du sperme par les UV est plus difficile à obtenir que chez les poissons, principalement du fait d'une grande variabilité inter-individuelle de la motilité avant irradiation. Par ailleurs, l'absence constatée d'effet Hertwig rend plus délicate la définition d'un temps optimal d'exposition aux UV.

Les haploïdes obtenus sont anormaux et n'atteignent pas le stade de larve D. La diploïdie peut être efficacement restaurée en retenant un globule polaire grâce au traitement par la cytochalasine B ou par le 6-DMAP. Ce dernier présente toutefois l'avantage d'être moins coûteux et moins toxique que la cytochalasine B.

La viabilité des individus gynogénétiques diploïdes n'a pas été démontrée, pas plus que leur nature non viable. Une des perspectives de la gynogenèse serait de prolonger ces expériences en optimisant l'irradiation du sperme : une destruction totale du matériel génétique mâle doit en effet être obtenue afin d'éliminer les fragments de chromosomes qui semblent gêner le développement ultérieur des individus gynogénétiques.

Si la gynogenèse est létale, l'autofécondation peut se présenter comme la voie privilégiée d'augmentation de la consanguinité chez les espèces hermaphrodites protandres, comme l'huître creuse, grâce à la congélation du sperme (Lannan, 1971). En cas d'échec, une autre perspective serait d'avoir recours aux croisements entre proches apparentés (croisements frères-soeurs par exemple).

5. BIBLIOGRAPHIE

ARAI, K., NAITO, F. and FUJINO, K., 1986. Triploidization of the pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52 (3): 417-422.

CHEVASSUS, B., CHOURROUT, D. et JALABERT, B., 1979. Les populations "monosexes". Le contrôle de la reproduction chez les poissons. *Bulletin français de pisciculture*, N° 274: 18-31.

CHOURROUT, D., CHEVASSUS, B. and HERRIOUX, F., 1980. Analysis of an effect in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) after fertilization with γ -irradiated sperm. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 20 (3A): 719-726.

CHOURROUT, D., 1982. La gynogenèse chez les vertébrés. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 22 (5): 715-734.

CHOURROUT, D., 1989. Gynogenèse, polyploïdie et transfert de gènes chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Thèse de doctorat de l'Université de Paris VI, 60 p.

DITER, A., 1990. Reproduction uniparentale et polyploïdie induites chez la truite arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*) et chez les bivalves (*Crassostrea gigas*, *Ruditapes philipinarum* et *Chlamys varia*). Thèse de doctorat de l'Université de Paris VI, 88 p.

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

GENDREAU, S., 1988. Fécondation *in vitro* et induction de la polyploïdie chez l'huître plate larvipare, *Ostrea edulis*, L., Mémoire de DEA, Univ. Bret. Occi., Brest, 30p.

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

GRUFFYD et BEAUMONT, 1970. Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pectinus maximus*. Helgoländer wiss. Meeresunters, 20: 486-497.

LANNAN, J.E., 1971. Experimental self-fertilization of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, utilizing cryopreserved sperm. Genetics, 68: 599-601.

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

6. ANNEXES

-ANNEXE 1-

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

METHODE:

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

MATERIEL:Tampon GA:

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

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

TAMPON DE FIXATION:

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

-ANNEXE 2-**PREPARATION DES EMBRYONS POUR L'ANALYSE D'IMAGES****METHODE:**

- ◆ Les embryons âgés de 4 heures sont immergés dans une solution d'aphidicoline à 5µg/ml pendant 2 heures.
- ◆ Choc hypotonique pendant 20 minutes (eau de mer: 1/ eau douce: 3).
- ◆ Enlever l'eau.
- ◆ Fixation au Carnoy froid (éthanol: 3/ acide acétique: 1) pendant 10/10/20/20 minutes (les embryons peuvent être conservés dans le dernier bain).
- ◆ Enlever le maximum de Carnoy.
- ◆ Dissociation des embryons dans 200 µl d'acide acétique à 50% pendant 10 minutes. On favorise la dissociation par agitation sur "vortex".
- ◆ Faire tomber une goutte de 50 µl à 100 µl de suspension sur une lame chauffée à 45°C.
- ◆ Réaspirer doucement la goutte (les noyaux se déposent sur la lame). Retirer immédiatement de la plaque chauffante.
- ◆ Fixation pendant 10 minutes au Bohm Sprenger.

MATERIEL:

- ◆ Aphidicoline: solution mère à 100 µg/ml (à conserver à -4°C). C'est un produit dangereux, donc à manipuler avec précaution.
- ◆ Bohm Sprenger:
 - méthanol 80%
 - formaldéhyde 15%
 - acide acétique 5%

-ANNEXE 3-**PREPARATION DES ECHANTILLONS D'ANALYSE D'IMAGES PAR
COLORATION DE FEULGEN ROSANILINE****METHODE:**

- ◆ Hydratation des lames à l'eau distillée pendant 10 minutes.
- ◆ Hydrolyse acide (HCl) pendant 1 heure.
- ◆ Rinçage à l'eau distillée: 4 fois 1 minute.
- ◆ Réactif de Schiff pendant 1h30 (Sortir le réactif du réfrigérateur 1h avant l'utilisation. Couvrir avec du parafilm pour éviter les dégagements sulfureux, mettre à l'obscurité).
- ◆ Bain sulfureux: 4 fois 1 minute.
- ◆ Eau courante pendant 10 minutes.
- ◆ Eau distillée 3 minutes.
- ◆ Ethanol absolu: 2 fois 3 minutes.
- ◆ Xylène: 2 fois 3 minutes.
- ◆ Monter à l'Eukitt (résine synthétique entre lame et lamelle, permettant de conserver les lames sans altération de leurs qualités).

MATERIEL:

- ◆ HCl 5N pour l'hydrolyse: 431 ml d'HCl concentré (37%) + 569 ml d'eau distillée.
- ◆ Bain sulfureux pour 1 litre:
 - 0.5g de métabisulfite de Na/K.
 - 1ml d'HCl 5N
 - eau distillée qsp 1 litre.