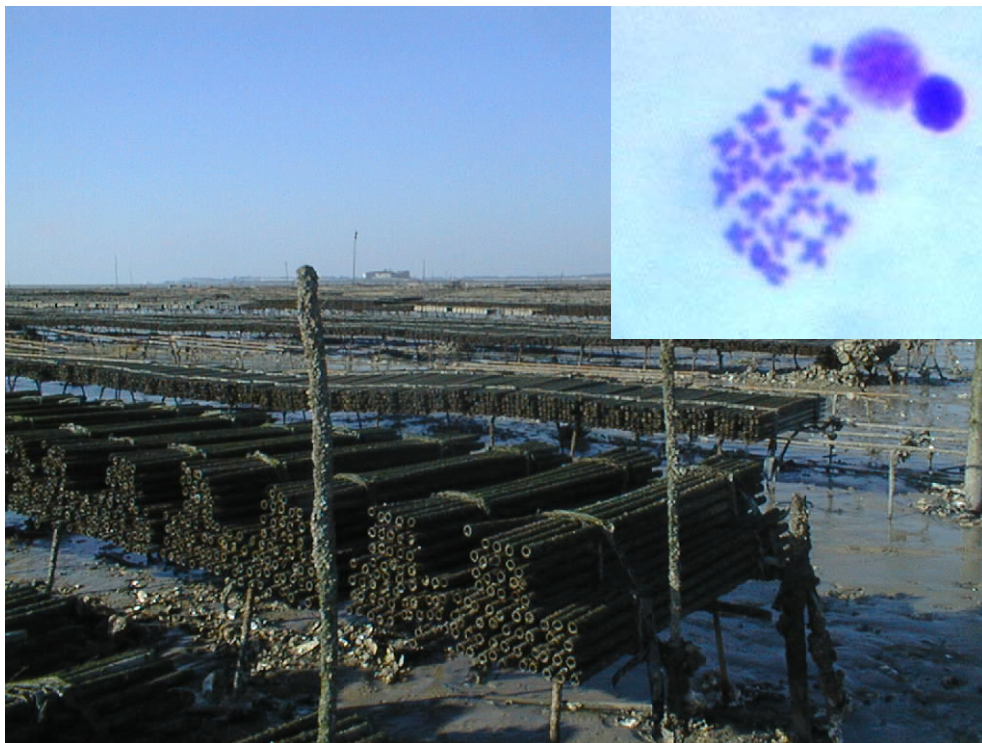




Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006
Convention 99 RPC-A-201 "Génétique"
Programme 3 : Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la génétique
Année 2000

Action 2: Etude des anomalies chromosomiques chez
Crassostrea gigas

S. Lapègue¹, H. McCombie², A. Leita², S. Heurtebise¹, P. Boudry¹, C. Thiriot², et A. Gérard¹



(1) IFREMER Laboratoire de Génétique et Pathologie	(2) CNRS Observatoire Océanologique de Villefranche sur Mer
BP 133, 17390 La Tremblade Tél. 05 46 36 98 36 Fax. 05 46 36 37 51	06230 Villefranche sur Mer Tél. 04 93 76 38 25 Fax. 04 93 76 38 93

SOMMAIRE

1. CONTEXTE DES ETUDES MENEES EN 2000	3
2. LE CAPTAGE 1999	4
2.1. ECHANTILLONNAGE.....	4
2.2. METHODE D'ETUDE	8
2.3. RESULTATS	10
2.4. CONCLUSION	11
3. LE CAPTAGE 2000.....	11
4. ANNEXES	14
4.1. FICHIER DES POIDS INDIVIDUELS DE 200 ANIMAUX PAR SITE	15
4.2. PROTOCOLES.....	20
4.2.1. Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques	20
4.2.2. Préparation des lames microscopiques.....	24
4.3. RESULTATS BRUTS DES TAUX D'ANEUPLOÏDIE OBSERVES.....	28

L'étude présentée ici a été réalisée en étroite collaboration avec le Laboratoire Océanologique de Villefranche-sur-Mer et plus particulièrement Catherine Thiriot et Alexandre Leitao. Cette collaboration engagée depuis de nombreuses années maintenant a ainsi permis au laboratoire IFREMER Génétique et Pathologie de La Tremblade d'acquérir les compétences nécessaires dans l'étude de l'aneuploïdie.

De plus, la relation avec les professionnels et les échantillonnages sur le terrain ont été réalisés grâce à la collaboration avec le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC) et en particulier Stéphane Robert ainsi qu'avec notre pilote Jean-Luc Seugnet.

1. Contexte des études menées en 2000

Divers travaux menés depuis 1984 montrent qu'il existe, chez l'huître *creuse* *Crassostrea gigas*, des cellules montrant un nombre anormal de chromosomes ($2n = 19$, 18 ou même 17 au lieu de $2n = 20$). Le niveau d'aneuploïdie est déterminé par le décompte des chromosomes à partir de suspensions cellulaires de tissu branchial.

Le pourcentage de cellules aneuploïdes est toujours significativement supérieur dans les "lots de queue", c'est-à-dire les huîtres présentant des croissances plus faibles, et peut atteindre plus de 30 %. Récemment, une étude réalisée au sein du programme européen « Genephys » a démontré que plus de 50 % de la variance pour la vitesse de croissance était liée au taux d'aneuploïdie.

Cependant, de nombreux points concernant ce phénomène restent inconnus en particulier à cause des difficultés méthodologiques rencontrées lors de son étude.

En 1999, une expérimentation a été menée afin de faire un état des lieux du niveau d'aneuploïdie des populations du bassin de Marennes-Oléron, et plus particulièrement des sites de captage afin de déterminer si certains sites pouvaient être davantage touchés que d'autres. Les résultats ont montré que l'on observe de l'aneuploïdie dans chaque site avec un taux moyen par population relativement faible par rapport à celui des populations étudiées précédemment. Les tests statistiques n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les cinq populations étudiées. Cependant, il est apparu que les animaux appartenant à la classe des « moyens » sont globalement moins aneuploïdes que ceux classés « petits » ou « grands », et ce, dans toutes les populations. Ce dernier résultat est plutôt étonnant et reflète très certainement les difficultés de comparer des classes de taille de populations naturelles. En effet, les collecteurs peuvent avoir recueilli différentes cohortes de pontes et donc des animaux d'âge différent, biaisant ainsi la classement effectué sur le poids. C'est toute la difficulté d'étudier ce caractère sur des populations naturelles.

Pour faire un suivi plus précis, des collecteurs vierges ont été placés en 1999 dans deux des mêmes zones à des dates connues afin d'obtenir des animaux de la même année et si possible d'une même cohorte ou tout au moins provenant d'un nombre réduit de cohortes, dont les émissions auront été proches dans le temps. Nous avons étudié le taux d'aneuploïdie dans deux sites du bassin de Marennes-Oléron en nous focalisant sur les deux classes de taille extrêmes et en étudiant un plus grand nombre d'animaux (30 par classe).

De plus, des collecteurs vierges ont été placés pendant l'été 2000 en un site de captage de façon séquentielle pendant trois périodes de deux semaines, afin d'obtenir des animaux, si possible d'une même cohorte ou tout au moins provenant d'un nombre réduit de cohortes, dont les émissions auront été proches dans le temps.

2. Le captage 1999

2.1. Echantillonnage

A la fin du printemps 2000, du naissain de 1 an sur collecteur a été échantillonné dans deux différents sites de captage du bassin de Marennes-Oléron. Il s'agit des sites de Bonne-Anse, et Fouras (figure 1). Les collecteurs ont été hébergés gracieusement par deux ostréiculteurs que nous tenons à remercier chaleureusement. Les caractéristiques liées aux différents échantillons sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des échantillons prélevés dans les différents sites.

Site	Nature du matériel	Date de mise à l'eau des collecteurs	Date de prélèvement du matériel	Professionnel
Bonne-Anse	Collecteurs tubes	4 août 1999	15 mai 2000	Mr. Rousselot
Fouras	Collecteurs tubes	2 août 1999	19 mai 2000	Mr. Allard

Les échantillons ont été placés en race-ways puis dans des bacs de 800 l dans les salles de l'écloserie de la station IFREMER de La Tremblade. Les bacs étaient alimentés en eau de mer à laquelle a été ajouté du phytoplancton sous la forme de *Skeletonema costatum*. La pousse des huîtres s'est alors poursuivie dans de bonnes conditions. Un détroquage manuel a été réalisé le 15 juin 1999. Les huîtres ont alors été placées dans des tamis de 2000 microns en micronurserie.

Deux cents animaux par site, choisis aléatoirement sur les collecteurs, ont été pesés le 4 juillet et mis en casiers individuels. Ils représentent la variabilité de poids du site considéré. Le fichier de pesées avec les moyennes par site est présenté dans l'annexe 4.1 et les histogrammes de distribution de poids sur la figure 2. Les histogrammes mettent en évidence des distributions à peu près normales des poids dans les différentes populations.

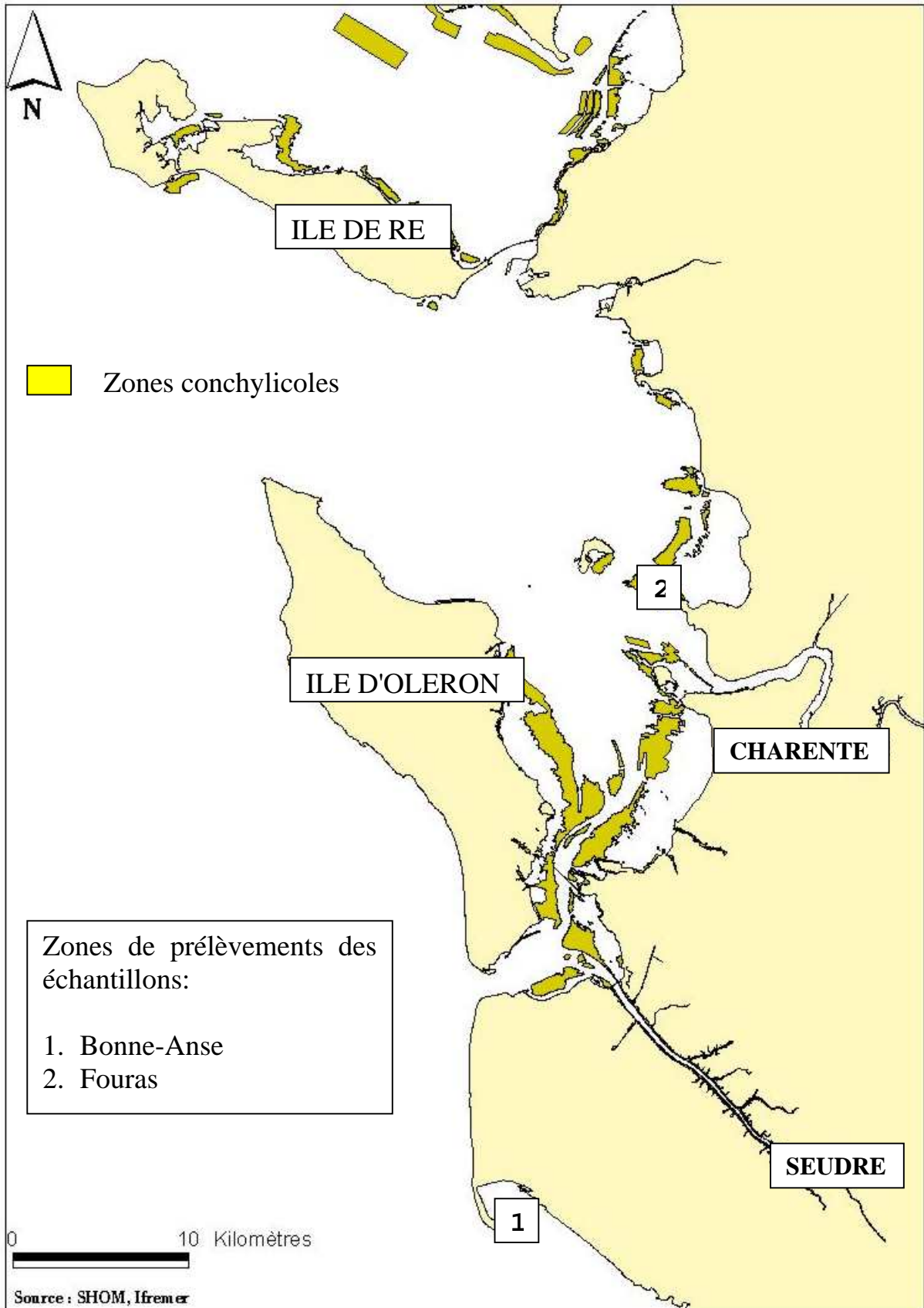
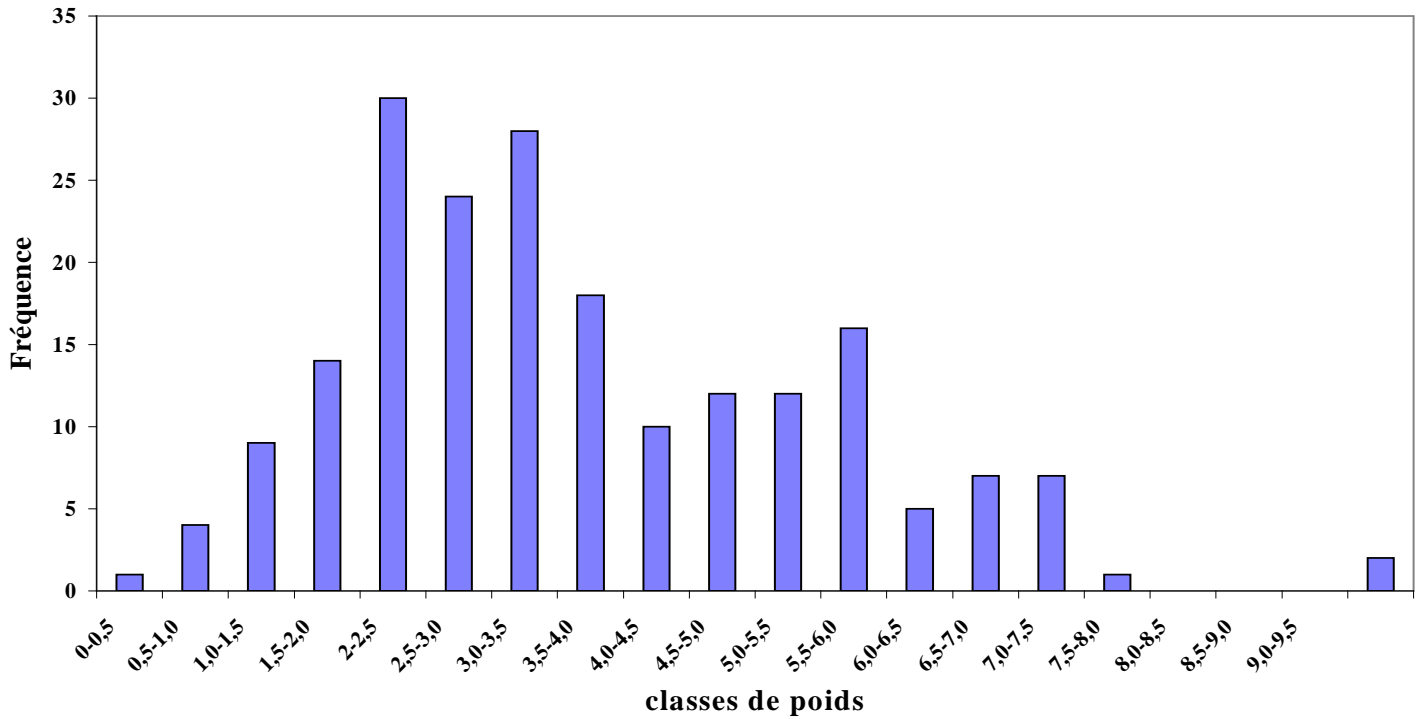


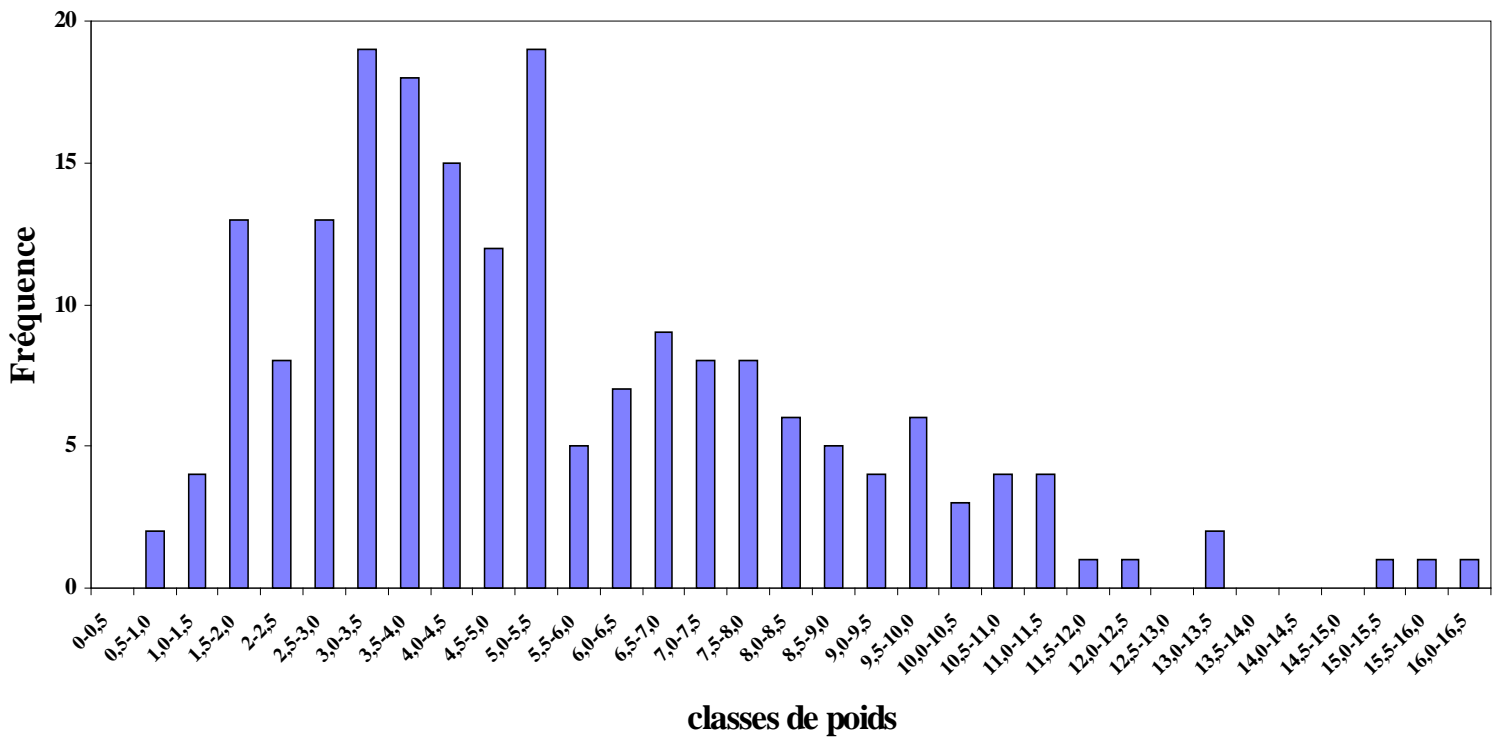
Figure 1. Localisation des sites échantillonnés

Figure 2 : Histogrammes de distribution des poids en grammes

Bonne Anse



Fouras

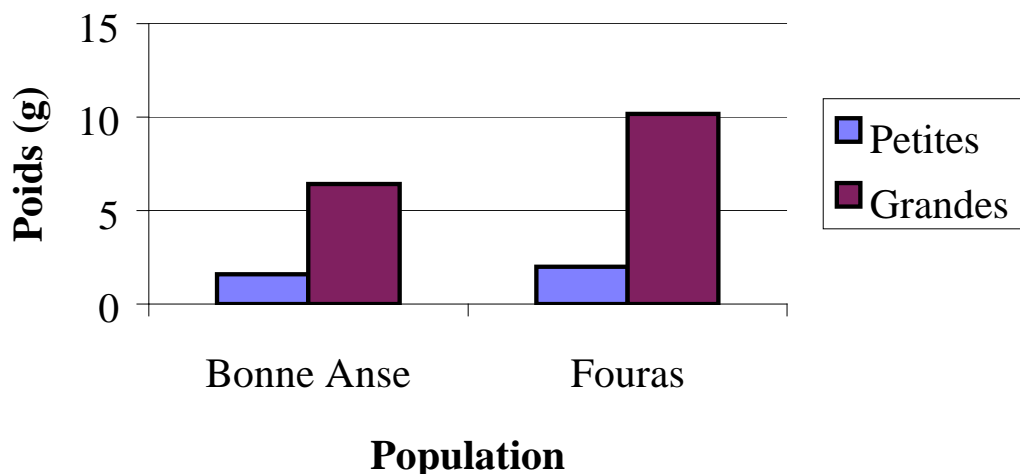


Etant donné le lien mis en évidence entre aneuploïdie et poids des animaux, nous avons voulu nous affranchir de ce paramètre afin de pouvoir estimer au mieux le taux d'aneuploïdie moyen d'une population. Pour cela, nous avons choisi d'étudier 60 animaux de chaque population : 30 représentant des animaux "petits" et 30 des animaux "grands". Dans chaque population, les deux groupes de trente ont été choisis aux extrémités de la distribution. Les moyennes et écart-types des poids pour chaque population et chaque classe sont donnés dans le tableau 2. Les poids des animaux par population et par classe sont également représentés graphiquement sur la figure 3.

Tableau 2 : Moyennes et écart-types des poids (g) des animaux étudiés pour chaque classe et chaque population.

Population	Classe	Moyenne	écart-type
Bonne-Anse	Petites	1,57	0,45
	Grandes	6,41	0,65
	Total	3,89	2,49
Fouras	Petites	2,00	0,54
	Grandes	10,17	1,19
	Total	5,90	4,21

Figure 3. Histogramme des poids moyens par population et par classe de taille



Si les petits animaux apparaissent à peu près de la même taille dans les deux populations, il n'en est pas de même pour les animaux de grandes tailles qui sont en moyenne 50% plus gros à Fouras qu'à Bonne-Anse.

2.2. Méthode d'étude

Deux grandes étapes peuvent être distinguées, l'une consistant en la préparation du matériel biologique et la seconde en la préparation des lames microscopiques sur lesquelles seront observés les chromosomes. La préparation des huîtres pour la visualisation des métaphases somatiques correspond à la fixation de matériel biologique dans lequel se trouve des cellules permettant l'observation des chromosomes. La préparation des lames microscopiques consiste en l'étalement des cellules afin de réaliser la visualisation des chromosomes. Le détail de ces opérations a été exposé dans le rapport de l'année précédente. Les protocoles sont rappelés en annexe 4.2.

Le travail de comptage des chromosomes proprement dit peut alors commencer. Il se déroule sous microscope optique. Il s'agit tout d'abord de repérer les mitoses, ce qui constitue l'étape la plus fastidieuse. Cette étape dépend en grande partie de la qualité des étalements. Lorsqu'une mitose est repérée, la position sur la lame est notée (afin de ne pas compter plusieurs fois la même mitose) et elle est observée à plus fort grossissement ($1.25 \times 10 \times 40$). Une caméra reliée à un écran permet de mieux visualiser la mitose et de compter les chromosomes. De façon générale, les métaphases sont a priori choisies au hasard tout en privilégiant une dispersion la plus homogène des chromosomes.

Les fixations des fragments de branchies traités à la colchicine se sont déroulées les 5, 6 et 7 juillet. Les préparations de lames et les comptages de chromosomes se sont ensuite étalés de ces dates à la fin du mois d'août, occupant une personne à temps plein. Il s'agit en effet de la fixation de 60 échantillons par site, soit, sur 2 sites, 120 fixations. Une lame au minimum est nécessaire par échantillon. Si 30 mitoses n'ont pu être observées sur une première lame, une seconde voire une troisième est réalisée pour l'échantillon en question.

Dans les analyses ultérieures, cette étape devrait pouvoir être optimisée. En effet, grâce à l'aide financière apportée par la région Poitou-Charentes, le laboratoire LGP a pu acquérir un système permettant la recherche automatisée de métaphases (décembre 2000) (Figure 4). Cet appareil est composé d'un microscope Zeiss sur lequel est monté une platine motorisée qui peut accueillir huit lames en même temps. Une caméra reliée à un système informatique permet le traitement des images et leur visualisation. Le microscope balaie ainsi automatiquement des surfaces définies sur les huit lames et le logiciel permet la reconnaissance d'images ressemblant à des métaphases. Ces images sont stockées provisoirement sous formes de petites vignettes photographiques. L'opérateur, en "cliquant" sur une vignette montrant une métaphase, entraîne le repositionnement du microscope au-dessus de cette métaphase. Le comptage des chromosomes peut alors être réalisé.

Cet appareil a donc été installé à la fin de l'année et des premières expériences ont été réalisées afin de mettre au point son fonctionnement. Nous pensons qu'il en découlera un gain de temps non négligeable dans les analyses dès 2001, mais également un confort de travail pour le manipulateur.



Figure 4. Système de recherche de métaphases automatisé

2.3. Résultats

Les résultats sur le niveau d'aneuploïdie observé dans les populations captées en 1999 (figures 5 et 6) montrent une forte différence par rapport aux résultats obtenus sur le captage 1998. Tout d'abord, le taux d'aneuploïdie dans la population de Bonne-Anse est plus important que celui observé l'année précédente avec 17.44 % sur ce captage 1999 au lieu de 12% sur le captage 1998 étudié l'année dernière. De plus, Le taux d'aneuploïdie est significativement ($p < 0.001$ dans l'ANOVA) plus grand dans la population de Bonne Anse (17.44 %) que dans celle de Fouras (11.66%) (Figure 5). C'est aussi, et seulement, dans cette population qu'une différence d'aneuploïdie entre les deux classes de taille s'est avérée significative ($p = 0.04$, figure 6), les plus petits animaux étant plus aneuploïdes. Ce dernier résultat est en accord avec les résultats des études précédentes obtenus dans des populations provenant d'écloseries et d'autres de milieux naturels.

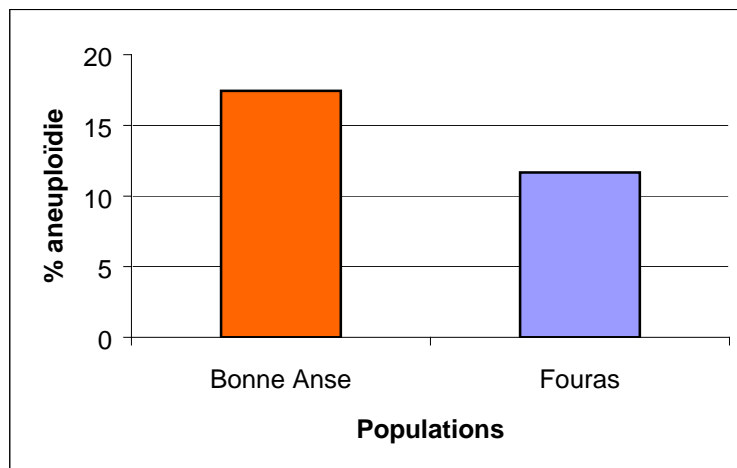


Figure 5. Taux d'aneuploïdie dans les deux population étudiées

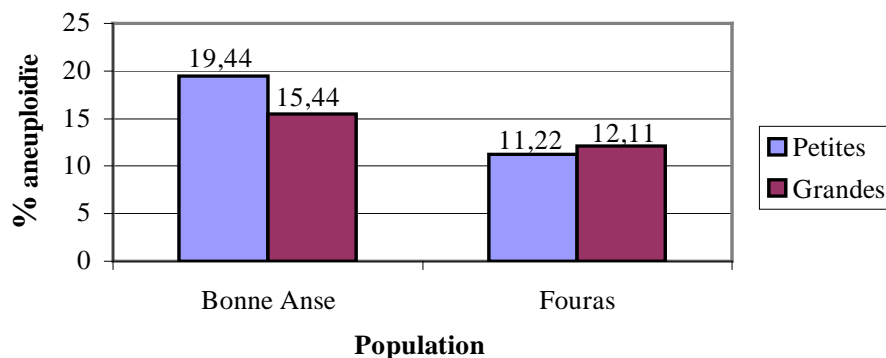


Figure 6. Taux d'aneuploïdie par population et classe de taille

2.4. Conclusion

Une différence significative du taux d'aneuploïdie entre les populations étudiées a été révélée cette année. De plus, une différence de ce même taux entre les deux classes de taille a été mise en évidence dans la population Bonne Anse. On retrouve ainsi la corrélation entre aneuploïdie et croissance qui avait été mise en évidence dans de nombreuses études antérieures.

Il est à noter que, dans cette population, les animaux sont en moyenne plus petits. La population de Bonne Anse est connue comme étant exposée à des polluants provenant de la Gironde, et la pêche à pied est en conséquence interdite dans cette zone. Le site est cependant toujours utilisé pour le captage d'huîtres élevées ensuite dans d'autres zones du bassin.

Nous allons donc poursuivre le suivi de cette population et nous pencher sur l'impact éventuel de polluants sur le taux d'aneuploïdie du naissain. En effet, alors qu'une relation aneuploïdie-pollution n'a pas encore été établie chez l'huître, des anomalies chromosomiques ont été observées chez d'autres espèces de bivalves, par exemple l'influence de la pollution sur l'aneuploïdie de la moule.

3. Le captage 2000

Une approche encore plus précise de l'étude du taux d'aneuploïdie chez le naissain a été réalisée en 2000. Il s'agissait d'étudier des groupes d'huître captées sur une période assez courte afin de réduire l'hétérogénéité des animaux en terme d'âge, facteur qui peut influencer indépendamment la taille des animaux et ainsi masquer une éventuelle relation aneuploïdie-croissance.

Pour réaliser cette étude, des collecteurs ont été positionnés pendant trois périodes consécutives de 2 semaines chacune (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractéristiques de l'échantillonnage.

Site	Nature du matériel	Date de mise à l'eau des collecteurs	Date de prélèvement du matériel
Fouras	4 collecteurs (Coupelles)	29/7/2000	16/8/2000
Fouras	4 collecteurs (Coupelles)	16/8/2000	29/8/2000
Fouras	4 collecteurs (Coupelles)	29/8/2000	18/9/2000

Malgré un captage assez moyen cette année, les collecteurs se sont avérés suffisamment fournis pour constituer trois lots d'étude. Après leur retrait du milieu marin, les collecteurs ont été placés dans des bassins à La station de La Tremblade pendant dix semaines. Le détroquage a ensuite été réalisé et a été grandement facilité par l'utilisation de coupelles souples comme support de captage. Cette manipulation n'a ainsi entraîné qu'une perte très

faible d'animaux alors que l'utilisation du système de capteurs en tuyaux PVC durs avait induit l'année précédente un nombre important d'animaux très abîmés (coquilles cassées), et donc rapidement morts ou d'animaux stressés.

Les animaux ont ensuite été placés dans des raceways (Figure 7) dans l'écloserie avec une alimentation plus importante en phytoplancton afin de favoriser les divisions cellulaires (Figure 8).



Figure 7. Raceways en circuit fermé dans lesquels les lots ont été mis en pousse.

Le traitement des deux premiers lots a pu être commencé dès cette année. Ainsi, 30 animaux "petits" et 30 animaux "grands" ont été fixés pour chacun des deux premiers lots. De plus, 2 lames ont été réalisées pour chaque animal. Cela représente au total 120 animaux fixés et 240 lames réalisées. Les niveaux d'aneuploidie seront étudiés l'année prochaine toujours dans le cadre de la collaboration avec l'équipe du CNRS de Villefranche-sur-mer.



Figure 8. Naissain d'un lot du captage 2000 dans un tamis

4. Annexes

4.1. Fichier des poids individuels de 200 animaux par site

4.2. Protocoles

4.2.1. Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques

4.2.2. Préparation des lames microscopiques

4.3. Résultats bruts des taux d'aneuploidie observés

4.1. Fichier des poids individuels de 200 animaux par site

Numéro individuel	Sites étudiés	
	Bonne Anse	Fouras
1	7,4	11,35
2	4,25	6,64
3	3,91	11,11
4	5,78	5,13
5	3,1	3,66
6	2,85	10,18
7	4,3	2,55
8	10	7,67
9	5,37	6,38
10	4,61	4,46
11	3,04	5,47
12	3,57	2,78
13	6,73	4,12
14	5,74	4,11
15	7,29	4,63
16	5,74	0,63
17	3,9	8,09
18	1,47	7,06
19	2,08	15,08
20	1,68	1,65
21	9,37	3,18
22	2,41	3,02
23	3,29	0,95
24	3,58	3,54
25	1,88	3,32
26	2,87	7,5
27	3,48	1,56
28	1,72	1,82
29	2,17	3,08
30	1,62	10,31
31	2,62	8,4
32	2,14	3,57
33	3,84	4,98
34	4,07	4,11
35	2,91	9,46
36	2,16	2,92
37	5,3	2,23
38	2,76	15,86
39	3,38	6,59
40	5,2	4,31
41	7,54	8,1
42	3,33	9,27
43	3,23	3,77
44	6,33	3,39
45	2,63	5,84

Numéro individuel	Sites étudiés	
	Bonne Anse	Fouras
46	2,24	12,78
47	1,26	10,9
48	1,68	8
49	2,23	4,1
50	6,66	3,29
51	5,58	16,37
52	3,16	7,53
53	3,11	5,45
54	6,72	3,45
55	4,33	7,26
56	1,25	10,72
57	3,08	5,15
58	2,19	4,16
59	2,66	5,38
60	2,52	1,9
61	3,49	2,44
62	4,72	4,52
63	3,85	7,61
64	7,38	9,52
65	5,03	5,43
66	5,08	4,67
67	2,09	7,76
68	1,68	3,01
69	1,85	4,04
70	1,03	4,43
71	1,96	3,75
72	4,25	1,52
73	4,82	1,26
74	4,53	8,44
75	3,97	6,09
76	3,39	4,85
77	2,21	4
78	2,77	5,15
79	5,16	3,22
80	2,31	6,57
81	2,82	2,75
82	1,65	5,28
83	3,5	4,83
84	4,12	6,38
85	0,95	4,36
86	1,43	6,12
87	4,1	4,95
88	3,24	2,54
89	3,02	10,68
90	7,27	3,58
91	2,04	1,87

Numéro individuel	Sites étudiés	
	Bonne Anse	Fouras
92	2,99	6,59
93	3,75	6,29
94	3,83	5,11
95	1,28	6,55
96	1,5	8,37
97	7,49	2,73
98	6,97	3,27
99	2,52	2,5
100	3,48	11,48
101	2,45	1,96
102	1,58	2,36
103	0,86	2,03
104	2,87	1,88
105	2,46	3,26
106	5,1	4,1
107	1,53	9,09
108	2,89	2,94
109	2,21	8,49
110	1,07	9,99
111	0,63	7,16
112	3,12	7,21
113	3,69	5,32
114	5,78	2,27
115	3,23	6,94
116	5	3,83
117	5,92	3,86
118	3,4	3,78
119	7,05	3,79
120	4,8	6,85
121	5,7	5,11
122	6,21	5,89
123	5,83	3,84
124	3,96	3,14
125	3,87	2,63
126	3,39	5,01
127	5,88	3,24
128	4,92	1,36
129	4,75	8,97
130	5,45	4,42
131	5,54	12,57
132	3,33	6,39
133	3,35	10,11
134	2,09	3,97
135	3,05	5,45
136	3,32	9,71
137	3,9	5,16

Numéro individuel	Sites étudiés	
	Bonne Anse	Fouras
138	2,59	3,64
139	1,95	3,46
140	2,62	6,47
141	5,57	4
142	3,04	2,96
143	1,86	3,13
144	1,49	3,72
145	2,28	7,79
146	0,47	2,31
147	2,42	1,5
148	3,55	2,8
149	2,21	5,23
150	6,51	3,58
151	5,24	5,11
152	2,4	8,66
153	2,22	6
154	3,8	2,66
155	6,61	8,91
156	2,28	4,69
157	2,89	7,92
158	5,47	4,47
159	2,85	5,49
160	2,71	2,74
161	2,88	12,04
162	2,04	13,32
163	4,02	7,12
164	3,12	4,75
165	2,67	3,4
166	3,27	6,6
167	4,75	1,98
168	2,48	3,45
169	5,82	7,27
170	7,23	5,72
171	5,14	3,14
172	2,38	2,55
173	5,8	1,61
174	2,09	4,78
175	3,15	11,07
176	4,43	3,75
177	6,24	1,81
178	4,91	9,86
179	5,29	9,44
180	2,64	9,84
181	5,19	6,61
182	0,97	9,95
183	6,06	8,92

Numéro individuel	Sites étudiés	
	Bonne Anse	Fouras
184	4,14	10,98
185	2,68	3,1
186	2,88	4,1
187	3,86	1,23
188	4,76	7,29
189	6,46	1,89
190	4,56	5,46
191	2,12	4,98
192	2,33	11,88
193	2,14	8,86
194	3,6	5,23
195	5,09	7,84
196	2,46	2
197	6,7	2,33
198	3,98	4,36
199	5,63	5,78
200	1,73	4,78
Moyenne	3.71	5.53

4.2. Protocoles

4.2.1. Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques

**Aneuploïdie:
Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.
1- Solutions**

A préparer avant la manip. (après-midi de la nuit où ça sera lancé)

a) Les solutions suivantes:

- Solution hypotonique de citrate de sodium à 0,9% (pour utilisation le matin)
- Solution 'Mère' de colchicine 0,1% permettant de bloquer les mitoses en métaphase (sera diluée le soir avant de traiter les huîtres)

La quantité de solution nécessaire est dépendante du nombre d'animaux traités et des volumes des containers dans lesquels le traitement de la nuit aura lieu (colchicine) et dans lesquels les préparations seront fixées et stockées le matin (citrate).

CITRATE : Solution de citrate de sodium à 0,9%, donc:
900 mg de citrate de sodium dans
100 ml H₂O **distillée** (stockage au réfrigérateur)

Le tissu est mis dans le citrate une seule fois (directement après la dissection), donc la quantité nécessaire est égale au volume des tubes dans lesquels on mettra le tissu.

e.g. Les tubes ont la capacité de 2.2 ml et il y a 120 animaux:

$$\begin{aligned} 2.2 \text{ ml} \times 120 &= 264 \text{ ml} \\ + \text{ extra} &= 300 \text{ ml} \end{aligned}$$

*Si on a 900 mg de citrate de sodium dans 100 ml H₂O distillée
On a besoin de 3 x 900 mg*

$$= 2700 \text{ mg sodium citrate pour } 300 \text{ ml H}_2\text{O distillée}$$

COLCHICINE 'MÈRE': Solution 'Mère' de colchicine à 0,1%, donc:
100 mg colchicine
100ml H₂O **de mer filtrée** (stockage au réfrigérateur)

La quantité de solution 'Mère' nécessaire dépend du volume de solution 'fille' de colchicine, à 0,005%, nécessaire pour le traitement de nuit, qui est égal au volume des récipients dans lesquels les huîtres vont être traitées.

$$\begin{aligned} &100 \text{ ml solution 'fille' (faite le soir juste avant de lancer le traitement)} \\ &= 5 \text{ ml solution 'mère'} \\ &+ 95 \text{ ml H}_2\text{O de mer avec Isochrisis} \end{aligned}$$

i.e. 5 ml de solution Mère est nécessaire pour chaque 100ml de solution fille

e.g. Si on utilise 50 ml par petit animal (<2 g) et que l'on a 120 animaux, on a besoin de 6 litres de solution 'fille'.

6 litres de solution 'fille' est requis

$6000 \text{ ml} / 100 = 60$

$60 \times 5 \text{ ml} = 300 \text{ ml}$

Donc 300 ml de solution 'mère' est requis. Et si on a 100 mg de colchicine dans 100 ml de H₂O de mer, dans 300 ml on va avoir besoin de 300 mg.

ATTENTION : LA COLCHICINE EST UN PRODUIT TRES TOXIQUE, A PESER AVEC GANTS ET MASQUE EN SALLE DES POWDRES.

b) Numérotter les tubes de 2.2 ml qui seront utilisés.

A préparer la nuit, juste avant le manip.

COLCHICINE 'FILLE' : Juste avant la manip, la solution 'fille' est préparée à partir de la solution 'mère'

100 ml solution 'fille'

=5 ml solution 'mère'

+95 ml H₂O **de mer avec Isochrisis**

L'eau de mer avec *Isochrisis* est composée du mélange (2/1) Eau de mer filtrée/ *Isochrisis* pris dans la salle des algues (à choisir dans un 300 litres à couleur brune moyenne).

Dans l'exemple ci-dessus, 6000 ml de solution 'fille' est requis

Dont 300 ml de solution mère de colchicine (5%)

Et du mélange (2/1) de 3800 ml d'eau de mer filtrée/1900 ml Isochrisis,

A préparer le matin juste avant le fixation

SOLUTION FIXATRICE : Le fixateur est composé d'un mélange (3/1) éthanol absolu/ acide acétique glacial. Il est utilisé après le citrate et changé 4 fois avant que les échantillons soient stockés dans le réfrigérateur. La quantité nécessaire est donc 5 fois le volume des tubes dans lesquels seront fixés les animaux.

Dans l'exemple ci-dessus, 2.2 ml tubes x 120 animaux = 264 ml

$264 \text{ ml} \times 5 = 1320 \text{ ml}$

+ extra = 1500 ml

$1500 / 4 = 375$

Donc 1125 ml éthanol absolu

Et 375 ml acide acétique glacial

Préparer au fur et à mesure cette solution: 100 ml alcool absolu + 300 ml acide acétique glacial.

Aneuploïdie:
Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.
2- Manip de nuit.

Cette fiche décrit la manip avec lancement manuel la nuit.
Le soir, avant de partir, préparer d'abord les choses suivantes:

Pour la nuit:

- Colchicine (solution mère),
- Epruvettes graduées pour mesurer les différents volumes,
- Pichet/s et bêcher/s pour les algues et le mélange avec la solution 'fille',
- Bols/bêchers/aquariums pour le traitement des huîtres,
- Gants,
- Bulleur (tubes et pierres) pour oxygéner l'eau,
- Agitateur magnétique,
- Blouse de laboratoire.

Pour le matin (à préparer le soir ou pendant la nuit):

- Solution de citrate,
- Ethanol absolu et Acide Acétique Glacial et bouteille pour le fixateur,
- Tubes eppendorfs pour mettre les échantillons,
- Microscope pour la dissection (loupe binoculaire),
- Chaise à la bonne hauteur pour la dissection,
- Outils de dissection (ciseaux, forceps, scalpel/couteau pour ouvrir les huîtres),
- Boîte de Pétri
- Pissette d'eau de mer,
- Bol pour servir de poubelle,
- Pipette/s pasteur,
- Sopalin,
- Minuteurs,
- Papier brouillon et crayon papier,
- Gants,
- Blouse de laboratoire,
- Chocolat ou autre nourriture !!!

Mise en marche la nuit

ATTENTION : LA COLCHICINE EST UN PRODUIT TRES TOXIQUE, PORTER DES GANTS !

Le traitement à la colchicine, permettant le blocage des mitoses en métaphase, est lancé à minuit et arrêté entre 8 à 10 heures plus tard pour du comptage (6 heures pour du banding).

Avant le lancement, la solution fille de colchicine (5%) est préparée avec la solution mère, l'eau de mer filtré et *Isochrisis* (voir Fiche 1).

Ce mélange est fait dans un bêcher/s ou pichet avec l'agitateur magnétique en marche pendant quelques minutes. Les huîtres sont mises dans leurs bols ou autres récipients de façon à ne pas les entasser mais en leur laisser de l'espace pour s'ouvrir et filtrer. La solution est ajoutée et le bulleur mis en marche pour aérer l'eau.

Aneuploïdie:
Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.
3- Dissection et fixation le matin

Les démarches décrites ci-dessous sont à faire suite à la manip détaillée en fiche 2: Manip de nuit. Elles sont à faire le matin suivant le traitement des huîtres à la colchicine. Pour une visualisation du nombre de chromosomes, la manip est arrêtée après 6 heures (à 6 heures du matin si elle a été lancée à minuit).

La fixation concerne les solutions suivantes:

- Citrate (déjà préparé et stocké au réfrigérateur, voir fiche 1)
- Fixateur: solution (3/1) d'éthanol absolu/acide acétique glacial (à préparer le matin, voir fiche 1)

Dissection

Les branchies des huîtres sont découpées dans de l'eau de mer propre et mises dans les eppendorfs ou récipient de taille adéquate avec le citrate (volume 20 x supérieur à celui du tissu étudié) pendant 40 minutes. Puis Le citrate est enlevé par aspiration avec une pipette pasteur et remplacé par du fixateur.

Pour découper les branchies, l'huître est ouverte avec un scalpel et regardée avec le microscope de dissection (fig. 1). Le manteau et les branchies sont découpés ensemble en prenant soin de ne pas abîmer la glande digestive ni la gonade si il y en a. Les branchies (et peut-être le manteau avec!) sont enlevées ensemble puis le manteau (plus épais avec les poils) est découpé afin de garder seulement les lamelles des branchies qui sont entre les deux couches de manteau. Avant de mettre le tissu dans le citrate, 2 petites coupures sont faites du haut vers le bas des branchies pour faciliter la pénétration de citrate (fig. 2.). Ces coupures ne sont pas faites sur la totalité mais seulement deux tiers de la largeur des branchies. Ceci permet d'éviter que les branchies ne se séparent en morceaux. Elles restent attachées les unes avec les autres à la base.

Fixation

Les branchies restent dans leur tube d'origine et différents bains (un de citrate et cinq de fixateur (F)) sont appliqués:

Citrate pendant	40 min
F1	10 min
F1'	10 min
F2	20 min
F3	20 min
F5 final (dans lequel l'échantillon va être stocké au réfrigérateur)	

D'un point de vue pratique, il est généralement plus facile de faire la fixation des échantillons par groupes de 10. Un minuteur est mis en marche lorsque la dissection ou le changement de fixateur est terminé pour chaque groupe. L'heure de chaque changement est notée pour chaque groupe afin de respecter au mieux les durées des bains précisées ci-dessus.

4.2.2. Préparation des lames microscopiques

Aneuploïdie: Préparation des lames microscopiques. 1- Fixation des chromosomes

Les lames peuvent être préparées à partir de 24 heures après la fin de fixation (Penser à préparer des lames propres à l'avance (voir plus bas)!!!).

Matériel

Le matériel suivant est nécessaire:

Microscope de dissection binoculaire
Une table chauffante pour lames (mis a 44°C)
Lames 'porte objets' (lavées à l'acide chlorhydrique, voir ci-dessous)
Lame avec dépression circulaire (ou petit verre de cristallisation)
Pincettes fines
Ciseaux fins
2 Pipettes pasteurs
Boîte pétri
Bol poubelle

Les solutions suivantes sont également nécessaires :

1/1 Acide Acétique/ Eau distillée
Fixateur 3/1 Ethanol Absolu/ Acide Acétique Glaciale (frais)

Méthodologie

Une lame 'porte objets' est mise sur la table chauffante à 44°C sur laquelle le numéro de l'animal (numéro de lame, date etc.) est inscrit. Pour voir le numéro clairement lorsque la lame est sur le microscope pendant le comptage, orientez la partie où l'on écrit à droite.

Les tubes eppendorf contenant les branchies sont retirés du réfrigérateur. La branchie est mise sur la boîte de pétri avec son fixateur et un petit morceau est découpé. Ce morceau mesure 2-3mm de longueur. Les extrémités des branchies sont plus riches en mitoses (lieux d'attache des 4 lamelles). Aussi, est-il préférable de prélever à cet endroit, en prenant soin d'inclure les différentes lamelles.

Remettre le reste des branchies dans le tube, remplir avec du fixateur frais et remettre le tube au réfrigérateur.

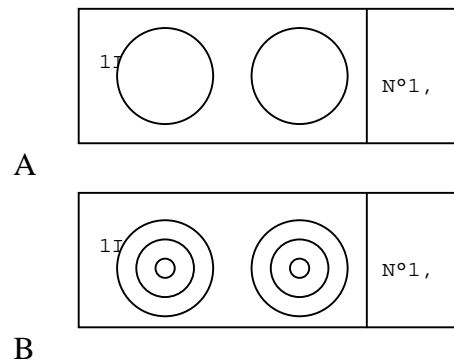
Le morceau découpé est séché sur une serviette en papier et mis sur la lame avec la dépression avec le mélange 1/1 Acide/Eau de façon à remplir cette dépression (Utilisation de la pipette Pasteur n°1). La lame est posée sous le microscope.

Après quelques minutes il apparaît de petites bulles autour du morceau. Le morceau peut être agité dans la solution avec la pince pour libérer ces bulles. Enfin le morceau, qui est devenu

transparent, est enlevé et jeté. Le liquide restant contient les noyaux. Le liquide est aspiré avec une pipette pasteur (Pipette Pasteur n°2) et laissé tombé sur la lame de la manière suivante:

Le liquide est donc aspiré, en évitant d'aspirer les éventuelles déchets de tissu qui sont déchirés du morceau original. Essayer de récupérer toutes les bulles.

Pour déposer le liquide sur la lame, on doit le laisser tomber d'une hauteur de 60cm. D'abord, toucher la lame avec le bout de la pipette pour viser. Puis lever la pipette et laisser tomber le liquide en gouttes sur la lame. L'objectif est de casser la membrane nucléaire. Pour bien distribuer le matériel sur la lame, faire deux gouttes rondes côte à côte (voir figure A).



Le liquide est ensuite réaspiré très doucement avec la même pipette (N°2). La pipette placée bien verticalement permet d'aspirer petit à petit le liquide au centre de chaque goutte (aller de l'une à l'autre rapidement) afin de tracer des cercles concentriques (Figure B). Le matériel nucléaire se dépose sur la lame et sèche en même temps que le liquide est aspiré ou s'évapore naturellement avec la chaleur de la table chauffante (lorsque les gouttes rétrécissent d'elles-mêmes, les laisser faire: utiliser l'aspiration comme une aide!). Ainsi, le matériel est mieux distribué facilitant la lecture ultérieure. On laisse ensuite la lame sécher à température ambiante.

La pipette N°2 est rincée (avec de l'eau acidifiée deux ou trois fois) ou remplacée entre les échantillons. La table chauffante est nettoyée. La lame avec la cavité est nettoyée avec de l'eau acidifiée sans l'essuyer pour ne pas introduire de peluches. De façon générale, travailler en blouse et gains pour éviter de salir les lames.

Nettoyage à l'acide chlorhydrique des lames avant utilisation pour l'étude de l'aneuploïdie

Les lames sont trempées du soir au matin dans un mélange (9/1) d'alcool 90/95% / acide chlorhydrique (HCl). Pour mélanger les deux solutions, ajouter doucement l'acide à l'alcool. La solution va fumer donc faire cette étape sous la hotte. Utiliser comme stockage une boîte plastique qui ferme.

Retirer les lames du bain d'acide (le bain peut être gardé et réutilisé). Les mettre dans un porte-lames et les rincer sous le robinet légèrement ouvert pendant 24 heures. (En cas d'urgence 16-18h suffisent)

Les lames sont ensuite stockées dans un bain d'alcool à 90% jusqu'à leur utilisation.

Aneuploïdie:
Préparation des lames microscopiques.
2- Coloration des lames

Matériel

Le matériel suivant est nécessaire:

- pHmètre (la première fois et lorsque l'on a besoin de mélanger du tampon)
- Bain à lames = "baignoire"
- Epruvettes graduées
- Pipette (pour le bain de coloration), filtres et cônes
- Parafilm et ciseaux
- Bouteille en verre pour faire le mélange (si le cylindre n'est pas en verre)
- Minuteur

Les produits chimiques suivants sont nécessaires :

- Colorant de Giemsa
- Tampon phosphate à pH 6.8: Préparé avec $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- Eau distillée

Méthodologie 1: Préparation du tampon phosphate.

Le tampon est composé de deux solutions stock qui sont mélangées afin de produire une solution à pH 6.8.

Solution A: 7.8g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 250ml d'eau distillée

Solution B: 17.9g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 250ml d'eau distillée

Le mélange est fait à partir de 51ml de A et 25ml environ de solution B et le pH est mesuré avec le pHmètre. De la solution B (prévoir 25 autres ml) est ajoutée progressivement jusqu'à ce que le pH voulu (6.8) soit atteint. De l'eau distillée est ensuite ajoutée pour donner 200ml au total.

Le tampon est stocké au réfrigérateur jusqu'à son utilisation. Il faut le laisser se réchauffer à température ambiante avant chaque utilisation afin d'attendre le bon pH.

Les solutions de base sont stockées.

Méthodologie 2: Coloration des lames.

ATTENTION : GIEMSA EST UN PRODUIT TOXIQUE, PORTER DES GANTS !

Après avoir fixé les chromosomes, les lames sont mises dans le bain à lames. Pour un bain de 100ml, le bain composé de :

4ml Giemsa,
4ml Tampon Phosphate pH 6.8,
92ml Eau distillée.

Les trois liquides sont mis dans la bouteille, qui est fermée par du parafilm et agitée pour mélanger le contenu en tournant 12 fois !

Le mélange est ensuite versé directement sur les lames placées dans leur "baignoire" et le minuteur lancé pour 9 ou 10 minutes. Les lames ont été positionnées dos à dos. Bouger les lames doucement avec un doigt (en portant des gants) pour vérifier que leurs surfaces sont en contact avec la solution.

Lorsque la coloration est finie, jeter la solution dans l'évier et rincer les lames dans leur baignoire 3 fois avec de l'eau du robinet et 1 fois enfin avec de l'eau distillée. Les lames peuvent être séchées sur du sopalin sur une surface plane.

4.3. Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés

Population: Bonne Anse. Echantillonnage de 30 animaux de grande taille							
Animal n°	Nombre de mitoses (N=30)					N° de lames	% aneuploïdie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	26	3		1	4	1	13,33
2	29	1			1	1	3,33
3	25	5			5	2	16,67
4	27	2	1		3	1	10
5	27	1	1	1	3	1	10
6	28		1	1	2	1	6,67
7	24	3	2	1	6	2	20
8	23	5	2		7	2	23,33
9	24	5	1		6	1	20
10	26	1	3		4	2	13,33
11	25	3	1	1	5	2	16,67
12	25	5			5	1	16,67
13	24	4	1	1	6	2	20
14	23	4	2	1	7	1	23,33
15	27	3			3	2	10
16	24	5	1		6	1	20
17	22	3	3	2	8	1	26,67
18	23	3	3	1	7	1	23,33
19	26	4			4	1	13,33
20	26	3	1		4	2	13,33
21	23	5	1	1	7	2	23,33
22	24	6			6	2	20
23	29	1			1	1	3,33
24	26	1	3		4	2	13,33
25	24	3	1	2	6	1	20
26	26	4			4	1	13,33
27	28	2			2	1	6,67
28	26	3	1		4	1	13,33
29	26	3		1	4	1	13,33
30	25	1	3	1	5	1	16,67
					% aneuploïdie totale:		15,44

Population: Bonne Anse. Echantillonnage de 30 animaux de petite taille							
Animal n°	Nombre de mitoses (N=30)					N° de lames	% aneuploïdie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	27	3			3	1	10
2	27	2		1	3	1	10
3	25	4	1		5	1	16,67
4	25	3	2		5	1	16,67
5	25	1	2	2	5	1	16,67
6	27	2	1		3	1	10
7	25	3	1	1	5	2	16,67
8	24	4	2		6	5	20
9	20	2	6	2	10	2	33,33
10	21	5	2	2	9	2	30
11	29		1		1	3	3,33
12	25	5			5	2	16,67
13	25	5			5	2	16,67
14	23	3	3	1	7	2	23,33
15	23	6	1		7	1	23,33
16	21	6	3		9	1	30
17	24	1	3	2	6	2	20
18	25	2	2	1	5	1	16,67
19	29	1			1	1	3,33
20	25	2	1	2	5	1	16,67
21	23	5	1	1	7	1	23,33
22	22	5	3		8	1	26,67
23	22	1	4	3	8	1	26,67
24	21	9			9	2	30
25	18	6	5	1	12	1	40
26	24	3	2	1	6	1	20
27	23	6	1		7	1	23,33
28	24	3		1	4	2	13,33
29	27	3			3	1	10
30	24	3	3		6	2	20
					% aneuploïdie totale:		19,44

Population: Fouras. Echantillonnage de 30 animaux de grande taille

Animal n°	Nombre de mitoses (N=30)					N° de lames	% aneuploidie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	30				0	1	0
2	25	4		1	5	1	16,67
3	28	1	1		2	1	6,67
4	27	2		1	3	1	10
5	30				0	1	0
6	28	1	1		2	1	6,67
7	26	3		1	4	1	13,33
8	25	4		1	5	1	16,67
9	27	3			3	1	10
10	28	2			2	1	6,67
11	26	4			4	1	13,33
12	26	2	2		4	1	13,33
13	25	4		1	5	1	16,67
14	26	2	1	1	4	1	13,33
15	28	2			2	1	6,67
16	27	3			3	1	10
17	28	1		1	2	1	6,67
18	27	3			3	1	10
19	26	3	1		4	1	13,33
20	27	3			3	1	10
21	27	2		1	3	1	10
22	26	3		1	4	1	13,33
23	24	3	1	2	6	2	20
24	26	4			4	1	13,33
25	25	3	1	1	5	1	16,67
26	27	3			3	2	10
27	21	8	1		9	1	30
28	27	3			3	1	10
29	25	5			5	2	16,67
30	23	3	3	1	7	2	23,33
					% aneuploïdie totale:		12,11

Population: Fouras. Echantillonnage de 30 animaux de petite taille							
Animal n°	Nombre de mitoses (N=30)					N° de lames	% aneuploïdie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	25	4	1		5	2	16,67
2	25	3	2		5	1	16,67
3	25	3	2		5	1	16,67
4	28	1		1	2	1	6,67
5	29	1			1	1	3,33
6	28	2			2	1	6,67
7	23	4	2	1	7	2	23,33
8	24	4	2		6	1	20
9	27	3			3	1	10
10	29	1			1	1	3,33
11	25	4	1		5	1	16,67
12	28	2			2	1	6,67
13	27	2	1		3	1	10
14	29		1		1	2	3,33
15	29	1			1	2	3,33
16	27	2	1		3	1	10
17	27	2	1		3	1	10
18	28	2			2	1	6,67
19	26	2	2		4	1	13,33
20	20	9	1		10	1	33,33
21	27	2	1		3	2	10
22	29	1			1	1	3,33
23	28	1	1		2	1	6,67
24	26	3	1		4	1	13,33
25	23	4	1	2	7	1	23,33
26	29		1		1	1	3,33
27	24	3	2	1	6	1	20
28	28	2			2	1	6,67
29	29	1			1	1	3,33
30	27	2		1	3	1	10
					% aneuploïdie totale:		11,22