

**Thème Surveillance et Exploitation des
Ressources Aquacoles**

Département Aquaculture en Polynésie

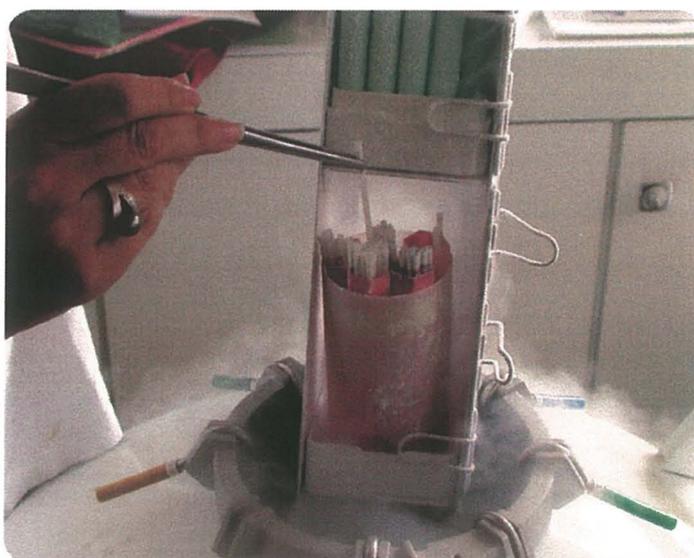
Laboratoire Domestication de l'Huître Perlière

Février 2005

V. Vonau, A. Matehau, C. Rouxel, J.C. Cochard

**Conservation par le froid du
patrimoine génétique de l'huître
perlière *Pinctada margaritifera***

**Rapport final de la Convention N° 40408
Service de la Perliculture - Ifremer**



Sommaire

1.	INTRODUCTION.....	1
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	5
2.1.	Caractéristiques du matériel biologique.....	5
2.1.1.	Origine des animaux.....	5
2.1.2.	Technique de déclenchement de la ponte.....	5
2.1.3.	Détermination de la qualité des gamètes.....	5
2.1.4.	Récupération du sperme au gonopore.....	6
2.1.5.	Concentration du sperme par centrifugation.....	7
2.1.6.	Préparation du sperme.....	7
2.2.	Protocoles de cryoconservation.....	7
2.2.1.	Protocole BC 2.....	7
2.2.2.	Protocole MC 2.....	8
2.3.	Validation des protocoles de cryoconservation.....	8
2.3.1.	Récupération des ovocytes.....	8
2.3.2.	Concentration des ovocytes.....	9
2.3.3.	Pratiques de fécondation.....	9
3.	RÉSULTATS.....	11
3.1.	Déclenchement des pontes.....	11
3.2.	Bilan général de la fabrication des paillettes.....	12
3.2.1.	Bilan général sur le stock de paillettes fabriqués.....	12
3.2.2.	Concentration du sperme à la décongélation.....	12
3.3.	Choix d'un protocole de congélation.....	14
3.4.	Essais de validation du protocole de congélation retenu.....	18
3.4.1.	Délai de fécondation.....	18
3.4.2.	Incidence du DCSB4 sur l'éclosion.....	20
3.4.3.	Essais de validation de novembre 2005.....	21
3.4.4.	Essais de validation de Janvier 2005.....	21
3.5.	Centrifugation du sperme.....	24
4.	DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	25
5.	BIBLIOGRAPHIE.....	28
6.	ANNEXES.....	29

6.1.	Annexe 1 Composition du DCSB4	29
6.2.	Annexe 2 Protocoles des missions	30
	Mission du 13 au 23 avril	30
	Objectif général.....	30
	Plan de travail.....	30
	Mission du 22 Novembre au 03 Décembre :.....	36
	Plan de travail.....	36
	Mission du 17 Janvier 2005 au 27 Janvier 2005.....	41
	Plan de travail.....	41

1. Introduction

La congélation du sperme et des embryons d'huîtres perlières est un moyen de renforcer la sécurité du potentiel économique que représente la Perliculture en Polynésie Française. Elle permet la conservation, à faible coût, de la biodiversité ex-situ des populations d'huîtres perlières sauvages et des génotypes de sujets présentant un intérêt particulier pour l'industrie de la perle.

Un avantage complémentaire de la cryoconservation sera de faciliter l'avancement des programmes d'amélioration génétique.

À ce jour, les divers travaux réalisés sur les gamètes des mollusques bivalves ont permis de congeler la laitance de différentes espèces autres que *Pinctada margaritifera*. Cependant, quelle que soit l'espèce, le protocole complet n'a pas été validé pour garantir la fiabilité et la répétitivité des résultats.

Avant d'aborder la technique de cryoconservation, il a fallu avoir une approche fondamentale sur les caractéristiques des gamètes mâles. Cette approche consiste à déterminer les méthodes de collecte de la laitance, évaluer la motilité des spermatozoïdes, déterminer leur résistance aux concentrations du diluant/cryoprotecteur et approcher le ratio minimum de spermatozoïdes par ovocyte pour assurer une fécondation optimale.

Le but final est de définir une procédure complète de conservation par le froid qui recouvre l'ensemble des étapes de la préparation des reproducteurs à l'obtention de larves viables.

Résultats des travaux antérieurs

Les acquis des conventions 2002 et 2003 (**Conventions N°20140 et N°30166**) peuvent se décliner suivant deux thèmes complémentaires : les caractéristiques des gamètes de l'espèce et l'application et l'adaptation des protocoles de cryoconservation préconisés pour d'autres espèces de mollusques.

Collecte de la semence

La cryoconservation doit être réalisée avec du sperme concentré. Le rapport cryoprotecteur/cellules est un paramètre essentiel de l'efficacité d'une procédure de cryoconservation. La récolte de la semence est réalisée par scarification de la gonade chez la plupart des espèces de mollusques qui ont été étudiées. Les premiers travaux ont permis de mettre en évidence que le sperme émis et celui issu d'une scarification avait des qualités similaires en terme de capacité de fécondation ou « fécondance » mais seulement durant le pic de maturité sexuelle de janvier à avril. La fertilité totale des

spermatozoïdes varie en fonction de la saison, cette méthode n'est donc pas toujours efficace.

Des fécondations moins variables ont été obtenues en dehors des pics de maturité sexuelle, avec du sperme récolté au gonopore par pression de la gonade mais seulement pour les animaux qui ont débuté l'émission de leur laitance par les voies naturelles. Cette méthode de récolte du sperme est utilisée durant les mois de moindre maturité sexuelle, afin d'étendre la période des expérimentations et de s'affranchir en partie de la variabilité individuelle lors des tests de cryoconservation.

Motilité du sperme

Les spermatozoïdes se déplacent par un mouvement du flagelle de fréquence variable entraînant une propulsion plus ou moins efficace. Chez les poissons cette activité est extrêmement fugace (quelques secondes après l'activation du spermatozoïde par l'eau de mer). Il a été établi chez ces animaux que la motilité du sperme était directement corrélée à leur fécondance. L'appréciation de cette motilité permet donc d'évaluer la qualité du sperme qui sera congelé. Elle doit être réalisée très rapidement par appréciation du pourcentage de cellules se déplaçant effectivement sous l'objectif du microscope. Il faut noter que chez les bivalves un spermatozoïde immobile n'est pas obligatoirement mort. Le chimiotactisme exercé par l'ovocyte entraîne l'activation du spermatozoïde. Un lot de spermatozoïdes de forte activité initiale et qui décroît dans le temps à la capacité de retrouver une activité maximale par un effet inattendu du DCSB4, un dilueur mis au point pour la laitance de poisson chez lesquels il n'a, par construction, aucun effet d'activation.

Rapport nombre de spermatozoïdes par ovocyte

La fécondation de l'ovocyte est réalisée par la pénétration d'un seul spermatozoïde. Pour assurer cette rencontre il faut qu'un nombre suffisant de spermatozoïdes soient présents sans excéder une limite supérieure. Les expérimentations réalisées ont permis de démontrer que le ratio de 100 spermatozoïdes par ovocyte permettait une fécondation optimale. Au ratio 10 000 spz./ovocyte la pénétration de plusieurs spermatozoïdes (polyspermie) est systématique.

Développement embryonnaire

Le développement embryonnaire réalisé en petit volume, selon la méthode utilisée à l'écloserie de Rangiroa, a conduit à l'obtention systématique de larves anormales. Les différents protocoles de cryoconservation devant être testés sur de petits lots d'ovocytes, la technique d'incubation des embryons a été améliorée en utilisant un système d'éclosoir maintenu en circuit ouvert avec un débit de 5 l/h.

Application et évolution des protocoles de cryoconservation

Application des protocoles connus

L'utilisation des méthodes dérivées des travaux effectués sur *Crassostrea gigas* par Hughes (1973) : les essais de congélation à partir de la semence émise dans l'eau de mer ne se sont pas avérés concluants. Le sperme ainsi récolté étant trop dilué. Il a été choisi de travailler sur du sperme concentré. L'application stricte de trois des protocoles les plus performants pour *C.gigas* n'a pas permis d'obtenir de résultats concluants sur le sperme de *P. margaritifera*.

La modification du protocole décrit par Bougrier et Rabenomanana (1986) pour *C. gigas* a apporté des premiers résultats avec un taux 10 et 40 % de spermatozoïdes motiles. Les fécondations obtenues avec ce sperme décongelé entraînaient un développement anarchique des embryons et n'ont pas permis d'obtenir de larves D normales. Une hypothétique toxicité du DMSO, le cryoprotecteur utilisé à forte concentration dans ce protocole a été envisagée. Des travaux complémentaires tendaient à démontrer cette toxicité.

Objectifs de la troisième convention (2004)

Validation d'un protocole de cryoconservation

Les conventions précédentes ont permis d'obtenir des survies de spermatozoïdes après décongélation suivant deux protocoles différents dérivés des travaux de Bougrier et Rabenomanana (1986) et de Maisse et Labbé (2002). Il s'agira dans un premier temps d'évaluer les performances respectives de ces protocoles et de choisir le plus efficace pour une utilisation systématique. Dans un second temps, il s'agira de démontrer l'aptitude de ce sperme à féconder des ovocytes et à produire des larves viables.

Collecte des spermatozoïdes

Comme nous l'avons décrit précédemment la méthode actuellement utilisée consiste à stripper la gonade ce qui entraîne le sacrifice de l'animal. Cette méthode induit deux limites : impossibilité de cerner l'évolution de la qualité du sperme de l'animal référencé et diminution du cheptel de référence.

Des tests préliminaires de centrifugation du sperme émis et donc dilué ont démontré qu'il résistait bien et ce, sans dommage apparent. Pour fiabiliser cette démarche il sera nécessaire de tester différentes puissances et durées de centrifugation. Ceci permettra d'obtenir un sperme concentré et ayant conservé son pouvoir fécondant.

Dans l'état d'avancement des travaux il n'est pas envisagé de mission à Rangiroa durant le premier semestre 2004. Par contre il serait souhaitable d'obtenir un lot de femelles provenant de Rangiroa ou Takapoto afin de réaliser l'ensemble des fécondations nécessaires à la validation des protocoles notamment durant le premier trimestre 2004, période favorable à la maturité sexuelle.

La reprise des expérimentations aura lieu en septembre avec une mission possible à Rangiroa début octobre notamment pour valider sur site l'ensemble du protocole retenu.

Optimiser la gestion du sperme congelé

Actuellement l'ensemble des paillettes constituées est stocké dans une cuve spécifique contenant de l'azote liquide à -196°C . Cette conservation assure une pérennité de la qualité du matériel biologique mais nécessite le remplissage régulier (une fois par mois) de la cuve de stockage pour compenser l'évaporation de l'azote liquide. Cette solution est coûteuse et nécessite le transport de conteneurs d'azote liquide depuis Papeete.

Afin de faciliter le stockage futur, nous avons envisagé de tester la conservation des paillettes dans un congélateur à -80°C . Cette approche permettrait d'éviter ces transports et limiterait les risques de rupture de stocks d'azote liquide.

Pour vérifier la faisabilité de cette démarche, il sera nécessaire de constituer une nouvelle banque de sperme résultant du protocole le plus fiable et de scinder chacun des lots en deux. Une partie conservée à -196°C l'autre partie conservée à -80°C . Le suivi des deux types de conservations sera réalisé sur la base de la motilité des spermatozoïdes à la décongélation et sur les capacités fécondantes. Ces tests seront réalisés tous les quinze jours sur une période de deux mois. En fonction des résultats, la poursuite de ces tests se fera suivant un pas beaucoup plus important afin de mettre en évidence l'impact de ce nouveau mode de conservation.

2. Matériel et méthodes

2.1. Caractéristiques du matériel biologique

2.1.1. *Origine des animaux*

L'ensemble des huîtres perlières utilisées lors des expérimentations menées au COP proviennent d'un lot maintenu dans la baie de Vairao entre 7 et 15 m sous la surface. Elles sont réparties sur la filière par chapelets de dix individus sexés et identifiés par une marque gravée. Cette gestion donne l'historique du comportement, pour chaque individu ayant subi un choc thermique. Elle permet de respecter un délai minimum de quatre mois entre deux stimulations thermiques pour déclencher la ponte.

Pour les missions d'Avril, Novembre 2004 et Janvier 2005 (voir plan de travail de chacune de ces missions en Annexe 2), les lots utilisés étaient maintenus dans le lagon de Rangiroa et gérés par l'équipe de l'écloserie. Les individus ayant déjà émis des ovocytes par le passé sont élevés à plat dans des casiers grillagés métalliques suspendus aux filières. Le reste du cheptel est élevé en boucle d'oreille par groupes de 10 individus

2.1.2. *Technique de déclenchement de la ponte*

Un lot d'une soixantaine d'huîtres perlières est ramené à terre par les plongeurs. Les huîtres perlières sont nettoyées au jet à haute pression (COP) ou au grattoir (Rangiroa). Elles sont ensuite immergées dans une eau de mer à 20-22°C pour une durée variant de 12 à 24h. Après ce délai, les animaux sont placés dans une cuve contenant de l'eau de mer à 31-32°C. À l'écloserie de Rangiroa, un cocktail d'algues est ajouté, les bacs de ponte sont placés au soleil.

Le choc thermique entraîne l'émission des gamètes pour les deux sexes, dans un délai variant d'environ 15 min à une heure lorsque la maturité sexuelle est atteinte.

2.1.3. *Détermination de la qualité des gamètes*

L'individu mâle qui émet ses gamètes dans le bac de ponte est immédiatement placé dans un cristalliseur afin de prélever le sperme au plus près de la zone d'expulsion et son indice de motilité (IM) est défini suivant l'échelle de Christen *et al.*, 1987 (Tableau 1).

Le sperme récupéré à l'aide d'une pipette jetable est observé sur une cellule de Malassez. Les animaux dont l'IM est égal à 5 (entre 75 et 100%) sont le plus rapidement possible retirés des cristallisoirs pour stopper l'éjaculation et procéder ensuite au stripping de la gonade.

Les mâles ayant un indice de motilité inférieur à 5 sont mis dans un cristallisoir afin d'avoir un mélange de sperme utilisable comme témoin de fécondation

Tableau 1 - Échelle de motilité définie par Christen *et al* (1987)

Évaluation du taux de motilité	Indice de motilité
de 0 à moins de 1% de spermatozoïdes mobiles	1
de 1 à moins de 25% de spermatozoïdes mobiles	2
de 25 à moins de 50% de spermatozoïdes mobiles	3
de 50 à moins de 75% de spermatozoïdes mobiles	4
de 75 à 100% de spermatozoïdes mobiles	5

Dès qu'une femelle commence à pondre, elle est immédiatement isolée. Une cale est placée entre les valves pour empêcher leur fermeture et permettre ainsi un rinçage abondant au jet de manière à éliminer au maximum les spermatozoïdes provenant du bac de ponte déjà présents dans la cavité palléale. La femelle est ensuite placée dans un cristallisoir où elle poursuit sa ponte. Le critère microscopique de maturation des ovocytes est l'absence de noyau identifié. Cela signifie que la membrane nucléaire est rompue (Germinal Vesicle Breakdown ou GVBD), les ovocytes ne sont fécondables que dans cet état.

Dans les pontes obtenues par choc thermique, un pourcentage parfois important d'ovocytes possède un noyau visible (stade GV). Le choix de la femelle est dépendant du nombre d'ovocytes réellement matures.

2.1.4. Récupération du sperme au gonopore

Il a été constaté au cours des travaux précédents que le sperme obtenu par dilacération de la gonade (stripping) était, suivant la saison, peu actif et peu fécondant. Il a été jugé préférable d'utiliser du sperme provenant d'animaux ayant déjà commencé à émettre leurs gamètes. Pour que ce sperme soit aussi concentré que possible, il est prélevé au niveau du gonopore, orifice du canal déférent d'une huître sacrifiée qui avait commencé à émettre une laitance de bonne qualité (IM=5)

L'animal sélectionné est ouvert et la masse viscérale retirée. Après plusieurs rinçage à l'eau de mer filtrée à 1µm, le manteau est déplacé pour découvrir le gonopore. Par pressions successives sur la gonade, le sperme apparaît et est récupéré immédiatement à l'aide d'une pipette jetable pour être placé dans un bécher. Cette opération est renouvelée plusieurs fois. Les fécondations réalisées en 2004 (Rouxel, 2004), avec le sperme issu d'une scarification de la gonade et le sperme issu du gonopore montraient une nette amélioration des fécondations avec le sperme récupéré au gonopore. Cette méthode a été conservée pour l'ensemble des expérimentations de congélation.

2.1.5. Concentration du sperme par centrifugation

Les méthodes de collecte consistant à dilacérer la gonade ou à prélever le sperme au gonopore entraînent le sacrifice de l'animal. Il est donc impossible de cerner l'évolution dans le temps de la qualité du sperme de l'animal. Outre le fait que cette opération provoque la disparition du cheptel il sera impossible d'améliorer la qualité du matériel biologique disponible si celle-ci s'avère insuffisante.

Des tests préliminaires de centrifugation du sperme émis dans l'eau et donc dilué ont démontré qu'il résistait sans dommage apparent à une centrifugation lente. Nous avons poursuivi ces travaux initiés durant la 2ème convention et défini un protocole utilisable lors de nos missions à Rangiroa.

L'individu mâle qui émet ses gamètes dans le bac du choc thermique est immédiatement placé dans un cristallisateur contenant environ 1 litre d'eau de mer filtrée. L'animal est retiré du récipient à la fin de l'émission de sa semence. Le sperme dilué subit ensuite une filtration sur une maille de 10 µm afin d'éliminer les impuretés. La semence est ensuite concentrée par centrifugation (Sigma 6 K 15) à 5 000 rpm pendant 3 minutes et à 23°C. Le sperme concentré repris dans de l'eau de mer filtré est prêt à l'utilisation ou la congélation.

2.1.6. Préparation du sperme

Les collectes du sperme permettent d'obtenir une masse beige et visqueuse qui n'est pas utilisable en l'état. Pour supprimer les éventuelles impuretés on ajoute 3 ml d'eau de mer filtrée à 0,22 µm afin d'assurer une filtration sur une maille de 25 µm. Le sperme concentré est prêt à l'utilisation. Le comptage des spermatozoïdes est réalisé au microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez, en plaçant 20 µl de sperme préalablement dilué 20 fois dans de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm et fixé par une goutte de formol.

2.2. Protocoles de cryoconservation

A l'issue des travaux effectués durant la deuxième convention, deux protocoles permettant de conserver des spermatozoïdes de motilité 2 à la décongélation ont été retenus.

2.2.1. Protocole BC 2

La technique décrite par Bougrier *et al.* (1986) et modifiée par C. Rouxel consiste à ajouter 15 volumes (7,5 ml) de diluant (DCSB₄) contenant 20% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) au volume (0,5ml) de la solution de sperme (SI) constitué de 1 ml de sperme concentré et 3 ml d'eau de mer filtrée (rapport 15/1). On remplit ensuite par aspiration les paillettes de 500 µl et d'un diamètre de 1 mm, bouchées hermétiquement à la pâte à modeler de couleur verte (repérage du protocole BC2) aux deux extrémités. Les paillettes ainsi conditionnées, sont ensuite placées sur un portoir lequel est lui-même posé sur un radeau dans les vapeurs d'azote liquide à 3 cm au-dessus de la surface de l'azote liquide.

Au bout de 7 minutes, temps nécessaire pour que les paillettes prennent une couleur opalescente, elles sont plongées dans l'azote liquide pour un stockage définitif.

Pour la décongélation, une ou plusieurs paillettes sont placées dans un bain d'eau de mer filtrée à 25° C durant 15 secondes. Les extrémités des paillettes sont coupées. Le sperme décongelé est utilisé immédiatement soit pour la fécondation soit pour évaluation de son activité. (voir protocole détaillé en annexe). Une évaluation de la concentration et de la motilité du sperme congelé a été réalisée de façon systématique quelques heures après la fabrication des paillettes sur le site même des opérations.

2.2.2. Protocole MC 2

La technique par Maisse G *et al.* (2002) et adaptée à l'huître perlière *Pinctada margaritifera* par C. Rouxel diffère du protocole BC 2 par le rapport 9/1 soit 9 V (3 ml) de diluant (DCSB₄) pour 1 V (440 µl) de cryoprotecteur DMSO (440 µl) et 1 ml de sperme (SI). On remplit ensuite par aspiration les paillettes de 500 µl et d'un diamètre de 1 mm, bouchés hermétiquement à la pâte à modeler de couleur jaune (repérage du protocole MC2) aux deux extrémités. Les paillettes ainsi conditionnés, sont ensuite placés sur un portoir lequel est lui même posé sur un radeau dans les vapeurs d'azote liquide à 3 cm au-dessus de la surface de l'azote liquide. Au bout de 7 minutes, temps nécessaire pour que les paillettes prennent une couleur opalescente, elles sont plongées dans l'azote liquide pour un stockage définitif.

La décongélation se fait comme précédemment dans un bain d'eau de mer filtrée à 25° C durant 15 secondes. De la même manière un comptage et une évaluation de la motilité sont réalisés moins de 24 h. après la réalisation des paillettes.

2.3. Validation des protocoles de cryoconservation

2.3.1. Récupération des ovocytes

L'ensemble des animaux est disposé dans le même bac pour le choc thermique. Les mâles émettent généralement leurs gamètes plus tôt que les femelles. Lorsqu'un individu émet des ovocytes. Un coin est placé entre les deux valves pour l'empêcher de se refermer. Un lavage de la cavité palléale est réalisé à l'eau de mer filtrée courante. La femelle est ensuite isolée dans un cristalliseur où elle poursuit sa ponte. Après 15 à 20 min l'animal est enlevé et les ovocytes sont passés au travers d'une maille de 85 µm qui retient les grosses impuretés. Le délai entre le début la ponte et l'utilisation des ovocytes pour la fécondation est de 50 min à 1h au maximum. Cette pratique est similaire à celle préconisée par Valdez-Raminez (1999) pour *Crassostrea gigas* et par Le Moullac *et al.* (2003), dans le cadre des travaux sur la maturation ovocytaire de *P. margaritifera*.

Malgré le lavage de la cavité palléale des femelles, la présence des spermatozoïdes dans le milieu conduit à des fécondations non contrôlées presque systématiques. Pour vérifier s'il existe une fécondation non contrôlée, un lot d'ovocytes est toujours conservé pour chacune des opérations de fécondation.

2.3.2. Concentration des ovocytes

Après lavage et filtration sur maille de 85 μm , les ovocytes sont concentrés et lavés sur une maille de 11 μm . Ils sont ensuite transférés dans une éprouvette graduée de 1000 ml pour évaluation du nombre par comptage de trois échantillons de 100 μl . Les ovocytes sont alors répartis en lots de volume équivalent correspondant à environ 300 000 ovocytes.

2.3.3. Pratiques de fécondation

Suivant le protocole en usage à l'écloserie de Rangiroa, la phase de segmentation s'effectue dans des cuves de 18 à 20 litres. Les 2/3 du volume sont siphonnés toutes les deux heures après la fécondation, à chaque fois le volume est ramené à son niveau initial par adjonction d'eau de mer filtrée. Le produit des deux premiers siphonnages n'est pas conservé car il s'agit essentiellement de gamètes non fécondés qui ne sédimentent pas. Le produit des deux suivants est transférés dans un bac de 500 l (bac d'élevage), il est constitué de morula et gastrula nageuses. Le tiers restant après l'ensemble des siphonnages ne sera pas conservé car il est essentiellement constitué d'œufs dont la segmentation s'est bloquée au cours du temps.

La démarche expérimentale utilisée au COP nécessite de travailler en petit volume pour tester, sur un même lot d'ovocyte, le plus grand nombre possible de différentes semences de mâles cryoconservés. Aussi avons nous privilégié les éclosiers en circuit ouvert sans sélection des embryons (figure 1).

L'incubateur est constitué de 2 cylindres (ou éclosiers) placés chacun dans un compartiment d'un bac et dont le fond est fermé par une maille à plancton de 10 μm de vide de maille. Les deux cylindres sont reliés entre eux par une ouverture située au niveau de la surface de l'eau. L'eau de mer filtrée est distribuée en permanence (20 l/h) dans un des compartiments du bac contenant les éclosiers, elle traverse ces derniers vers le deuxième compartiment où elle est évacuée par un dégorgeoir. La circulation de l'eau de mer se fait de bas en haut dans le 1^{er} cylindre et de haut en bas dans le 2nd cylindre. Dès le stade morula les embryons ciliés sont mobiles et nagent dans la colonne d'eau. Ce dispositif permet de travailler avec un grand nombre d'embryons en limitant les contacts entre ces derniers et les ovocytes qui, non fécondés, se dégradent rapidement. La récupération des larves « D » s'effectue le lendemain dans le second cylindre.

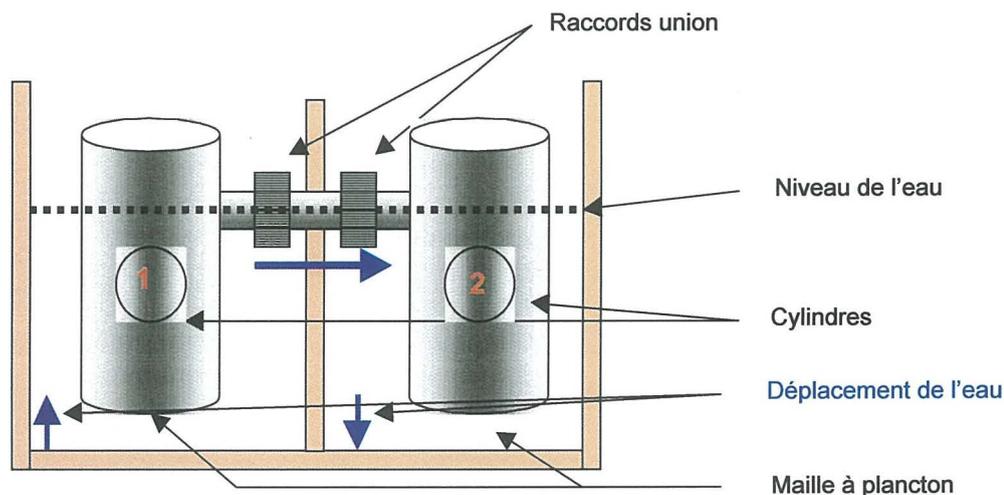


Figure 1- Schéma de principe des éclosiers

Les ovocytes (environ 300 000) et le sperme sont mis en contact dans un bécher. L'évaluation du taux de fécondation après 1h 30 de contact entre les gamètes est réalisée par comptage d'un échantillon fixé au formol 5% (environ 200 ovocytes ou embryons et, dans tous les cas, avec au moins une dizaine d'observations de la catégorie la moins représentée). Au-delà de ce délai, le contenu de chaque bécher est versé dans un des deux éclosiers. Les larves « D » seront récupérées le lendemain dans l'éclosier opposé et mises en suspension dans un volume de 100 ml. Le comptage des larves est réalisé sur 3 échantillons d'1 à 2 ml.

3. Résultats

La plus grande partie du travail a été réalisé lors des trois missions à Rangiroa : du 13 au 23 avril 2004, du 22 novembre au 3 décembre 2004 et du 17 au 27 janvier 2005. Le plan de travail détaillé de chacune de ces missions ainsi que les données expérimentales recueillies sont présentés en annexe.

3.1. Déclenchement des pontes

Pour l'ensemble des pontes réalisées lors des missions de Rangiroa, la réponse moyenne des animaux mâles et femelles est de 26% sur 1639 huîtres stimulées. Le taux de réponse des femelles et des mâles est respectivement de 5% et 20%.

Lors de la mission d'avril, 520 nacres ont été stimulées pour la collecte des gamètes, 73(14%) mâles et 31(6%) femelles ont répondu à la stimulation par choc thermique. De même au cours de la mission de novembre-décembre un total 833 animaux à subi un choc thermique, 199 (24%) mâles et 53 (6%) femelles ont répondu aux stimulations. Enfin au cours de la troisième et dernière mission en janvier 2005 sur 286 animaux sollicités, 67 (23%) mâles et 8 (3%) femelles ont répondu. Pour mémoire, à Vairao, sur un an 1092 animaux ont été soumis au choc thermique dans le cadre des différents actions menées par le laboratoire : 863 (79%) n'ont pas répondu, 200 mâles(18%) et 29 femelles(3%) ont émis des gamètes.

Tableau 2 – Bilan général des pontes réalisées dans le cadre de la convention

Date	Heure départ stimulation	Délai entre stimulation et dernière émission	Total animaux stimulés	Pas de réponse	réponse Mâles	réponse Femelle
15/04/05	8:28	0:47	81	51	19	11
15/04/05	12:05	0:32	49	44	4	1
16/04/04	9:00	0:28	130	94	26	10
19/04/04	9:25	0:19	130	128	1	1
21/04/04	8:20	1:05	130	99	23	8
24/11/04	7:56	1:16	103	63	31	9
24/11/04	13:17	0:32	106	43	40	23
25/11/04	8:00	0:44	100	57	34	9
25/11/04	13:12	0:32	83	68	10	5
26/11/04	7:55	1:00	124	98	24	2
26/11/04	9:35	0:48	114	88	26	0
01/12/04	8:20	0:44	92	67	23	2
01/12/04	13:00	0:37	111	97	11	3
19/01/05	8:23	0:49	74	32	37	5
19/01/05	13:35	1:32	50	50	0	0
20/01/05	8:15	0:45	86	70	14	2
21/01/05	8:25	0:35	76	59	16	1

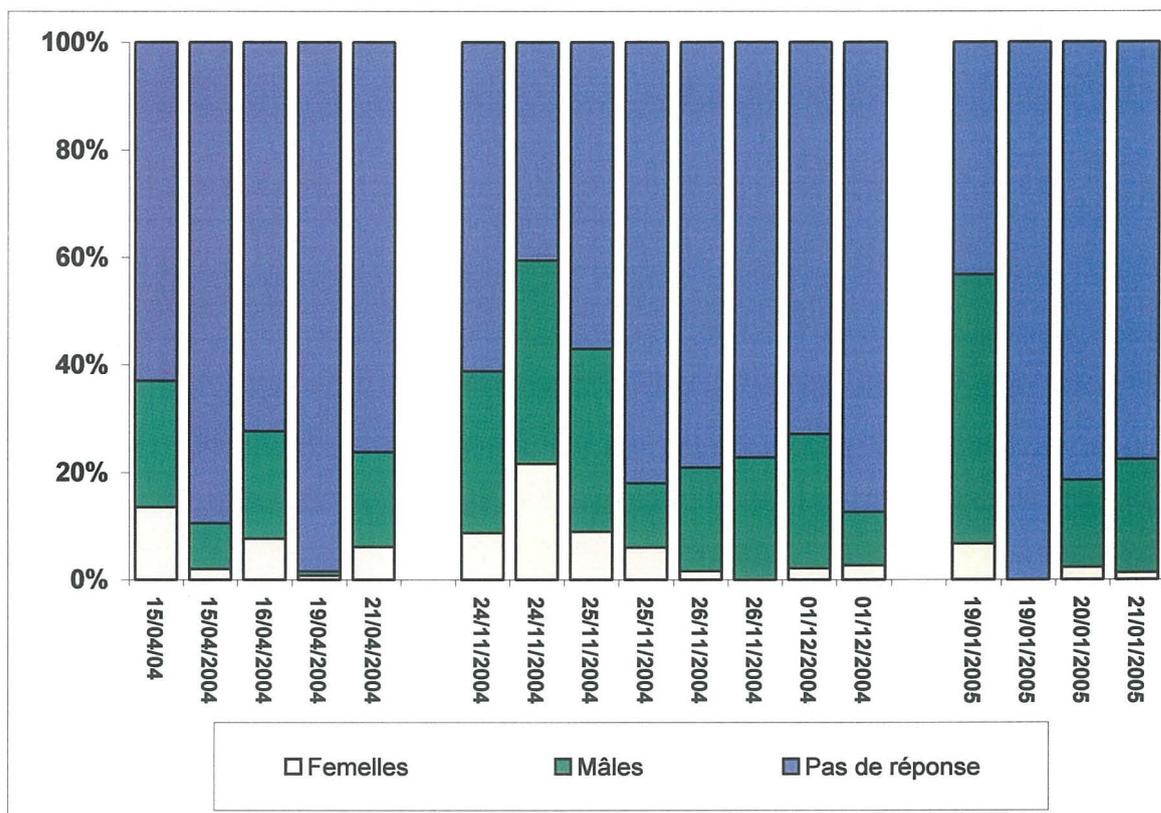


Figure 2 - Bilan général des pontes réalisées lors des missions à Rangiroa

3.2. Bilan général de la fabrication des paillettes

3.2.1. Bilan général sur le stock de paillettes fabriqués

Pour l'ensemble des 3 missions à Rangiroa, ont été fabriqués (Tableau 3) :

- 60 paillettes pour le protocole BC2 et représentant la semence de 4 mâles ;
- 212 paillettes (semence de 16 mâles) pour le protocole MC2 avec comme diluant le DCSB4
- 32 paillettes (semence de 2 mâles) suivant le protocole MC2 mais avec un nouveau diluant appelé GIGASTOR(GT).

3.2.2. Concentration du sperme à la décongélation

La concentration du sperme à la décongélation est en moyenne de 71% de la concentration initiale pour le protocole MC2. Cette chute de concentration est proportionnelle à la concentration initiale (Tableau 4, figure 3). Elle n'est que 47% pour le

protocole BC2 dont les paillettes sont toujours plus diluées que pour le premier protocole. La lecture du tableau 3 révèle que l'indice de motilité chute fortement lors de la décongélation. Ces mesures ont été réalisées très peu de temps après la réalisation des paillettes (le jour même ou le lendemain) et sur le même site. Il est à noter que les Lots M16 et M17 avaient un indice de motilité nul à la décongélation mais nous avons constaté qu'en présence d'ovocytes environ 5 à 10 % des spermatozoïdes (indice 2) étaient réactivés et se déplaçaient vers les gamètes femelles.

Tableau 3 – Bilan de général de la préparation de paillettes

Date	Référence mâle	Protocole cryo utilisé	Diluant utilisé	Type de Cryo-Portect. utilisé	Nombres de paillettes	volume d'une paillette en ml	Indice Motilité (1 - 5) spz avant congél.	Concentr. spz/Paillette (x 10 ⁶) décongelé	Indice Motilité (1 - 5) spz décongelé.
15/04/04	M 01	BC 2	DCSB4	DMSO	15	0,500	5	22,2	2
15/04/04	M 02	BC 2	DCSB4	DMSO	15	0,500	4	15,8	2
15/04/04	M 01	MC 2	DCSB4	DMSO	8	0,500	5	61,4	2
15/04/04	M 02	MC 2	DCSB4	DMSO	8	0,500	4	47,0	2
16/04/04	M 03	BC 2	DCSB4	DMSO	15	0,500	5	24,0	3
16/04/04	M 04	BC 2	DCSB4	DMSO	15	0,500	4	10,0	2
16/04/04	M 03	MC 2	DCSB4	DMSO	8	0,500	5	54,6	3
16/04/04	M 04	MC 2	DCSB4	DMSO	8	0,500	4	85,0	3
25/11/04	M 05	MC 2	DCSB4	DMSO	15	0,500	5	262,0	1
25/11/04	M 06	MC 2	DCSB4	DMSO	15	0,500	4	374,0	1
25/11/04	M 07	MC 2	DCSB4	DMSO	8	0,500	3	156,0	1
25/11/04	M 08	MC 2	DCSB4	DMSO	8	0,500	3	190,0	1
26/11/04	M 09	MC 2	DCSB4	DMSO	15	0,500	3	210,0	1
16/11/04	M 10	MC 2	DCSB4	DMSO	15	0,500	3	344,0	1
26/11/04	M 11	MC 2	DCSB4	DMSO	8	0,500	3	302,0	1
30/11/04	M 12	MC 2	DCSB4	DMSO	8	0,500	4	616,0	1
19/01/05	M 13	MC 2	DCSB4	DMSO	27	0,500	5	364,0	1
19/01/05	M 14	MC 2	DCSB4	DMSO	26	0,500	5	502,0	1
20/01/05	M 16	MC 2	DCSB4	DMSO	24	0,500	5	26,4	0
20/01/05	M 17	MC 2	DCSB4	DMSO	11	0,500	5	26,8	0
20/01/05	M 16	MC 2	GT	DMSO	22	0,500	5	21,4	0
20/01/05	M 17	MC 2	GT	DMSO	10	0,500	5	23,4	0

Tableau 4 - Évolution des concentrations avant et après congélation suivant le protocole

Protocole	Concentration Spz/Paillette (x 10 ⁶)	Concentration Spz/Paillette (x 10 ⁶) décongelé	Taux de survie
BC 2	35	22	63%
BC 2	31	16	52%
BC 2	74	24	32%
BC 2	26	10	39%
MC 2	154	61	40%
MC 2	133	47	35%
MC 2	322	55	17%
MC 2	111	85	76%
MC 2	446	364	82%
MC 2	610	502	82%
MC 2	28	26	96%
MC 2	28	27	97%
MC 2	24	21	90%
MC 2	25	23	93%

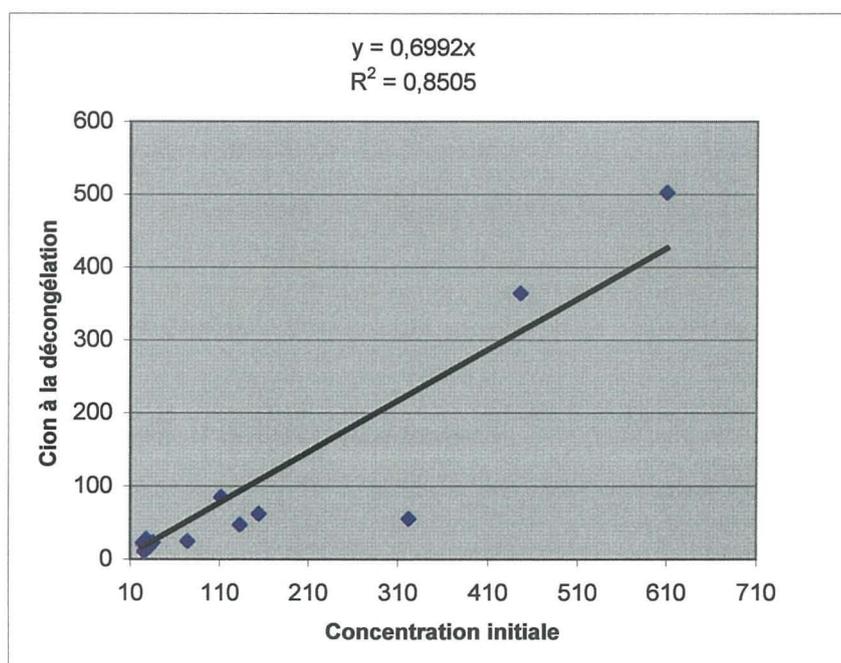


Figure 3 - Relation entre la concentration des paillettes avant et après congélation (protocole MC2)^o

3.3. Choix d'un protocole de congélation

Deux protocoles de congélation avaient permis d'obtenir des spermatozoïdes viables à la décongélation. Il était nécessaire d'adopter l'un d'entre eux sur une base objective, si possible dans le cadre d'une validation de la technique par une fécondation suivie du développement des embryons. Ce choix était l'un de objectifs de la première mission effectuée en Avril 2004 (Voir Annexe 2).

La première étape a consisté à sélectionner le sperme de quelques individus dont l'indice de motilité initiale était de 4 ou 5 et comparer leurs performances pour la fécondation de deux lots d'ovocytes (A et B). Trois femelles différentes ont donc été utilisées pour les fécondations, une avant congélation pour évaluer la qualité initiale du sperme ovocytes et deux le lendemain pour l'évaluation de la fécondance du sperme congelé. Un mélange de plusieurs spermes a été systématiquement utilisé comme référence. Les résultats sont présentés Figures 4 et 5.

Après congélation, les paillettes préparées suivant les deux protocoles ont été utilisées pour féconder un troisième lot d'ovocytes. Ils ont été à nouveau comparés à un témoin fécondé et un lot d'ovocyte fécondé avec un mélange de sperme frais est utilisé en référence. Les résultats sont présentés Figure 6 et 7

Les taux de fécondations sont tous très faible que ce soit pour le sperme frais ou cryopréservé. Les différence entre les taux de fécondation du sperme frais(marron) et le sperme cryopréservé (protocole BC2 en vert, protocole MC2 en jaune) sont essentiellement due à l'effet femelle. Par ailleurs, il est à noter que les taux de fécondation correspondant aux mâles M04 frais et M05 frais n'ont pas pu être mesurés.

La comparaison des protocole de cryopreservation des gamètes mâles BC2 (vert) et MC2 (jaune) ne démontre pas d'avantage particulier de l'une ou l'autre de ces méthodes ni sur la fécondation ni sur l'éclosion. Au regard de ces résultats nous avons pris la décision d'abandonner le protocole BC2 qui présentent l'inconvénient d'une plus faible concentration de sperme par paillette. Cette concentration étant d'un rapport 1/3 en moyenne en faveur du protocole MC2.

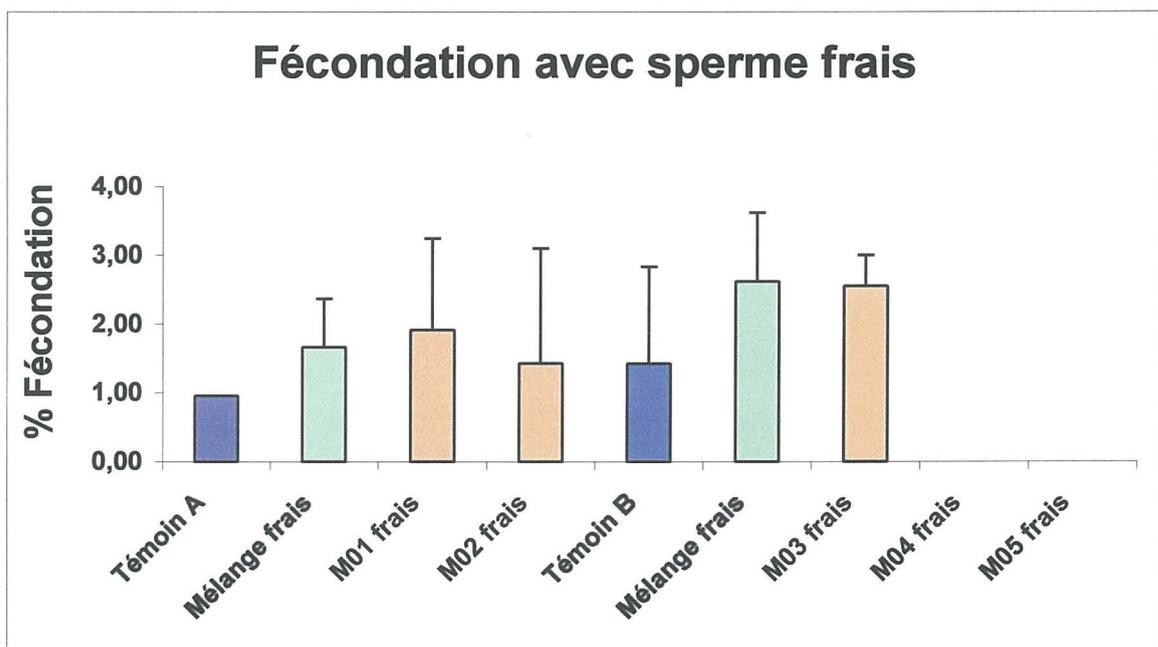


Figure 4 – Évaluation de la qualité du sperme avant congélation. Les mâles M01 et M02 ont été testés sur le lot d'ovocytes correspondant au Témoin A, les mâles M03, M04 et M05 sur le lot correspondant au témoin B.

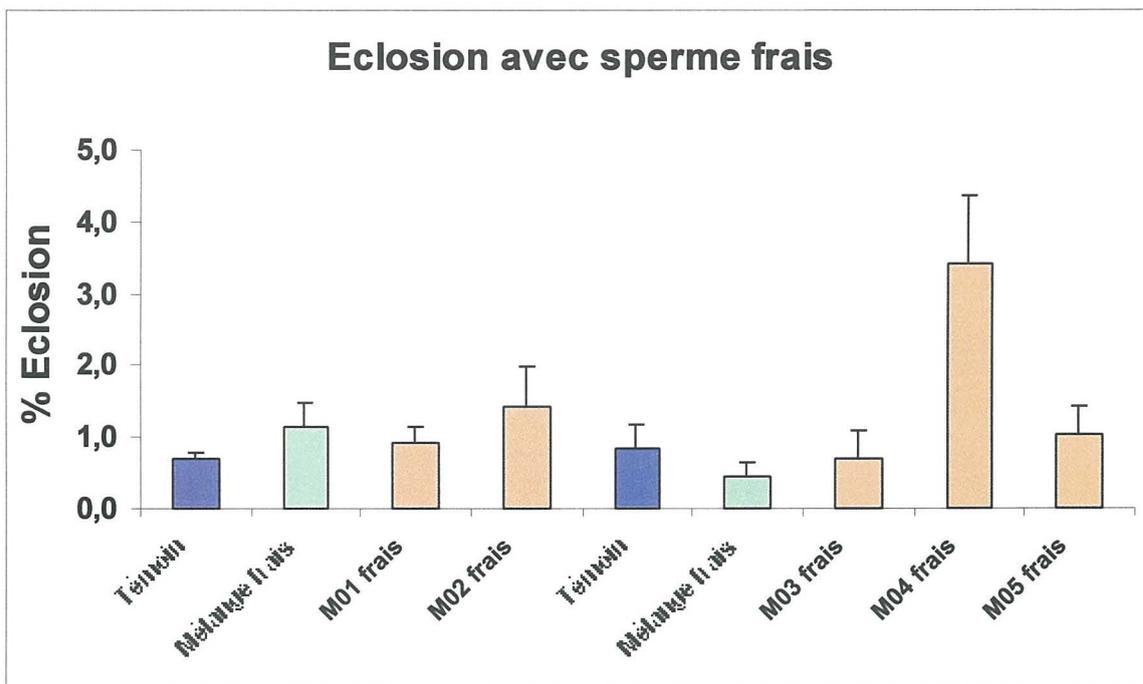


Figure 5 – Évaluation de la qualité du sperme avant congélation. Les mâles 1 et M02 ont été testés sur le même lot d’ovocytes correspondant au Témoin A, les mâles M03, M04 et M05 sur le lot correspondant au témoin B.

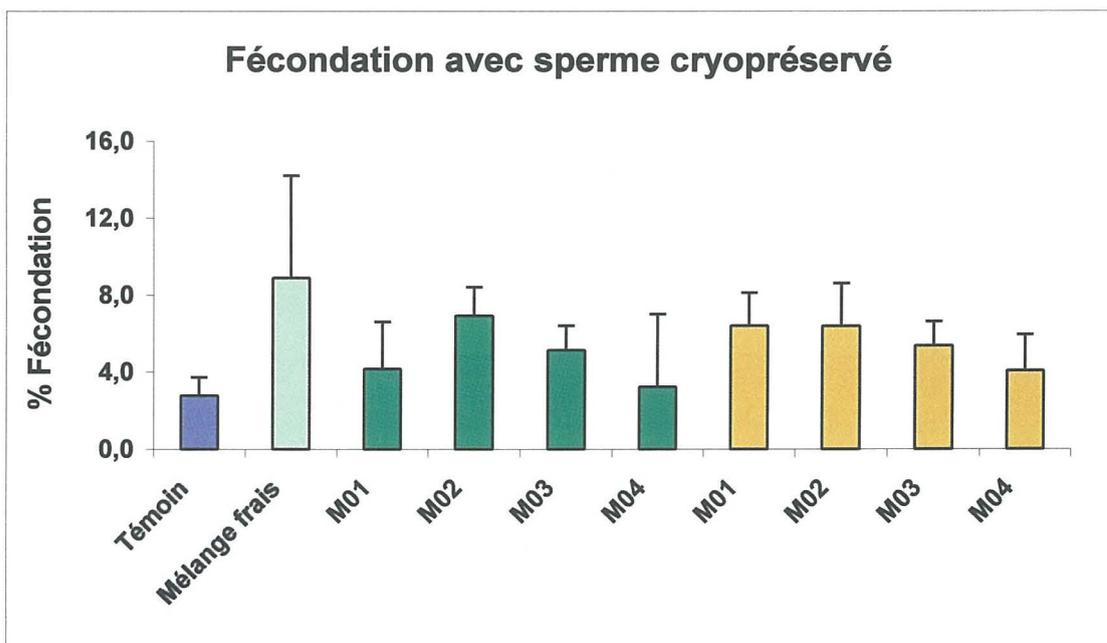


Figure 6 - Évaluation de la fécondance du sperme après congélation. Les lots congelés suivant le protocole BC2 sont figurés en vert et ceux réalisés suivant le protocole MC2 sont en jaune.

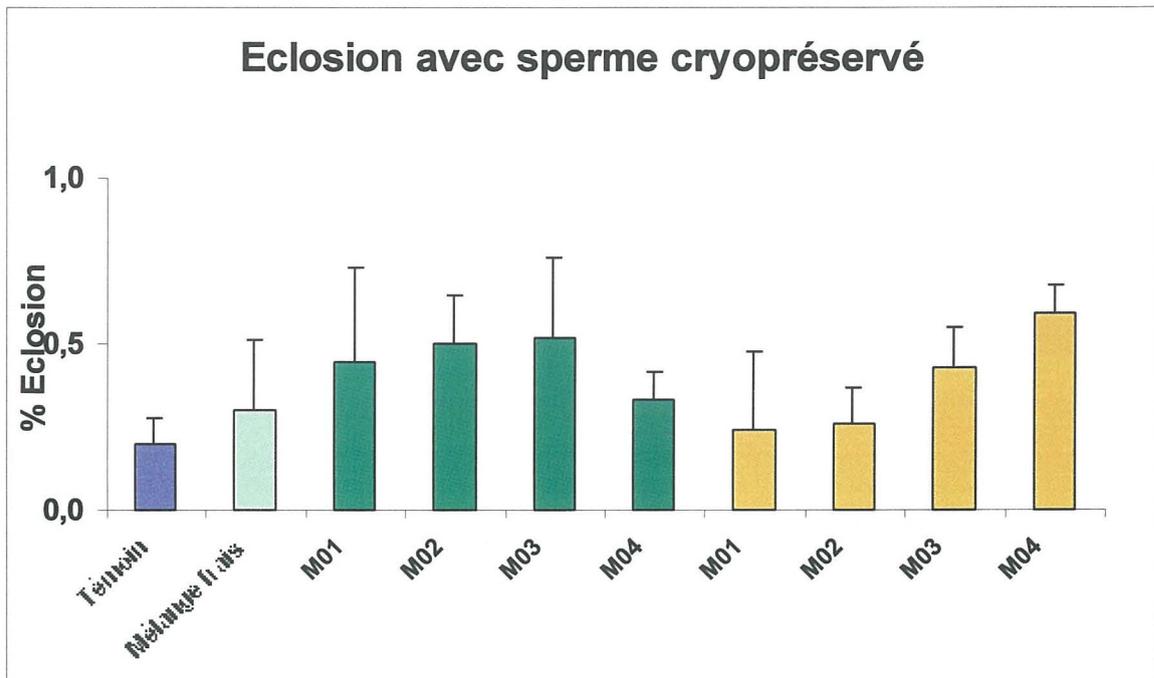


Figure 7 – Taux d'écllosion obtenus avec du sperme congelé. Les lots congelés suivant le protocole BC2 sont figurés en vert et ceux réalisés suivant le protocole MC2 sont en jaune.

Le choix de privilégier le protocole MC2 a été confirmé lors d'une comparaison réalisée au COP qui a permis d'obtenir des taux d'éclussions significatifs en partant d'un lot d'ovocytes n'ayant pas été pollué par le sperme du bac de ponte (Figure 8). La fécondance du sperme du mâle M27 après congélation ayant été démontré celui-ci a été conservé comme référence pour des essais ultérieurs bien que les taux d'éclussion soient restés faibles.

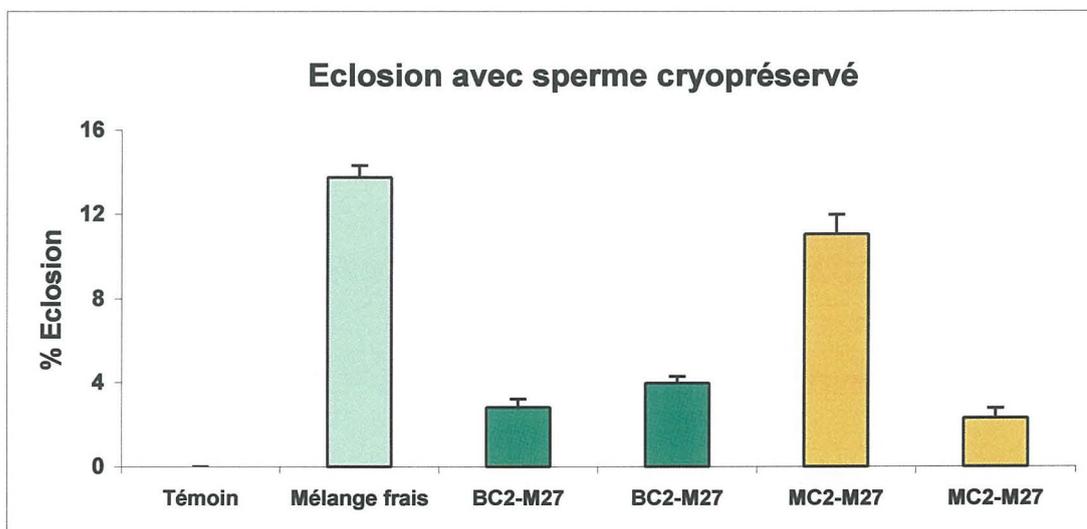


Figure 8 – Taux d'éclussions observés à l'issue d'un essai mené au COP. Les lots congelés suivant le protocole BC2 sont figurés en vert et ceux réalisés suivant le protocole MC2 sont en jaune.

3.4. Essais de validation du protocole de congélation retenu

La validation des protocoles de congélation prévue à la mission d'avril n'ayant pas été concluante, cet objectif a été repris pour la mission de novembre.

Les taux de fécondation particulièrement faibles de la première mission ont conduit à vérifier la durée de fécondabilité des ovocytes après la ponte (Figure 9) et à utiliser le DCSB4 comme activateur des spermatozoïdes sur le sperme frais pour tenter de remédier à la chute rapide d'activité constatée.

3.4.1. Délai de fécondation

Le test a été réalisé en novembre en utilisant une semence mâle dont l'indice s'est exceptionnellement maintenu à 4-5 pendant plus de deux heures. Il montre (Figure 9) que la viabilité des ovocytes décroît à partir d'environ une heure mais que les taux de fécondation obtenus sont inférieurs à 50% même lorsque la fécondation a lieu moins d'une heure après la ponte.

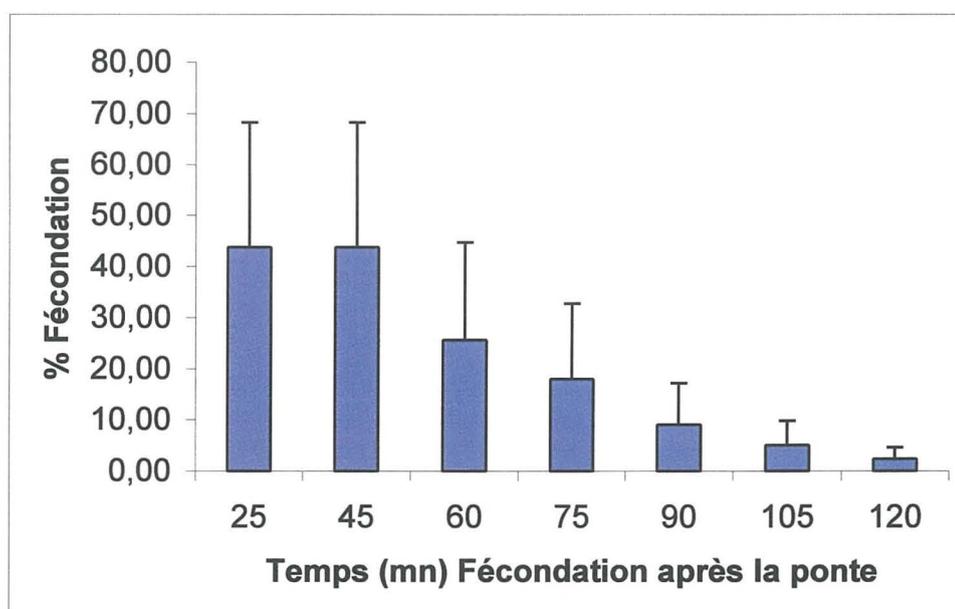


Figure 9 – Évolution de la fécondabilité des ovocytes après leur émission

Cette expérience a été reprise au début de la mission de janvier en explorant cette fois la première demi-heure et le rôle du DCSB4. Les essais ont été réalisés sur 4 lots d'ovocytes fécondés à 5, 10 et 30 minutes après l'émission à l'aide de sperme provenant de 2 différents mâles pour chaque lot, les trois dernières femelle ayant été fécondées par les mêmes mâles (Figure 10, Tableau annexe 3). L'analyse des résultats observés 3 heures après la fécondation montre l'effet hautement significatif ($p < 0,0001$) du DCSB4 sur le taux de fécondation. Dans le délai d'un demi-heure aucune baisse

significative du taux de fécondation moyen n'est observée en présence ou en absence de DCSB4 (Figure 11).

Les taux de fécondation sont extrêmement variable d'une femelle à l'autre mais aussi à l'intérieur d'un même lot. Figure 10, l'activation par le TCSB4 du premier mâle n'a pas d'effet sur les premières fécondations de la première femelle et il faut attendre 30 minutes pour que cette fécondation devienne efficace atteignant 67% démontrant ainsi que ces œufs étaient fécondables. Les trois lots suivants fécondés par les mêmes mâles atteignent des taux de fécondation très élevés lorsque le sperme est réactivé mais les taux sont très variables et il ne se dégage aucune tendance nette en fonction du temps

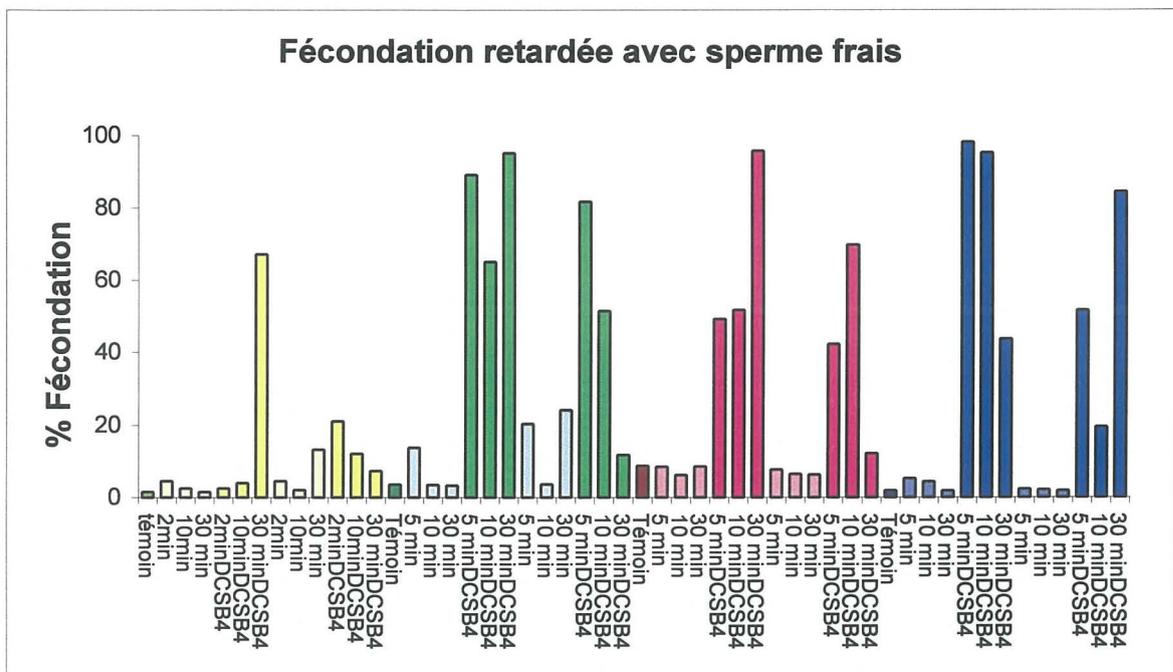


Figure 10 – Essais de fécondation retardée réalisés sur 4 femelles différentes.

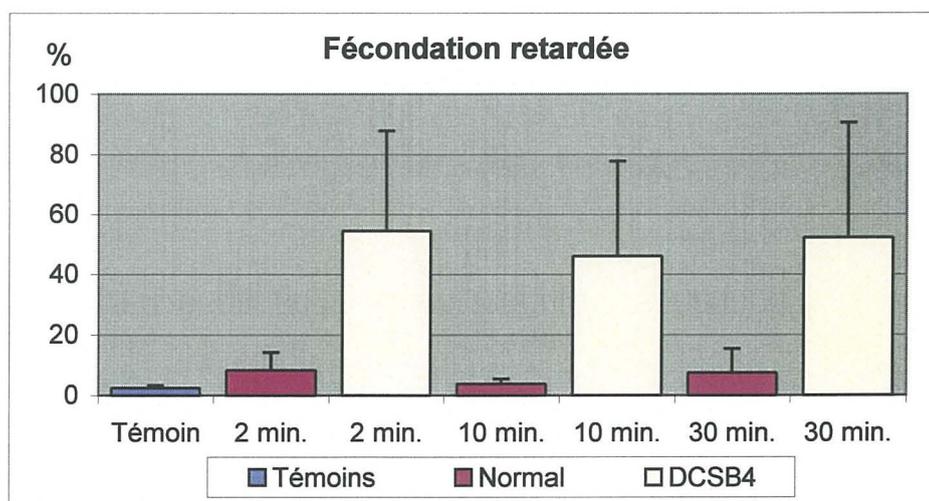


Figure 11 – Bilan général des essais de fécondation retardée de janvier

3.4.2. Incidence du DCSB4 sur l'éclosion

L'activation du sperme par le DS+CSB4 ayant permis une augmentation des taux de fécondation à trois heures nous avons voulu vérifier que cet effet avait des conséquences positives sur le développement jusqu'à la larve D. L'essai réalisé en novembre a confirmé que l'utilisation du DCSB4 permet une activation des spermatozoïdes qui a conduit à une légère augmentation du taux de fécondation chez une des deux femelles testées (Figures 12 et 13). Les taux d'éclosions observés restaient cependant très faibles, l'influence du DCSB4 n'apparaît pas décisive à ce niveau. Le sperme conservé M27 apparaissait fécondant pour au moins une femelle mais les taux d'éclosion étaient trop faibles pour qu'un effet positif soit détecté

Il peut être conclu que les faibles taux de fécondation observés ne proviennent pas seulement d'une perte de motilité rapide des spermatozoïdes mais que la qualité des ovocytes doit aussi être mise en cause.

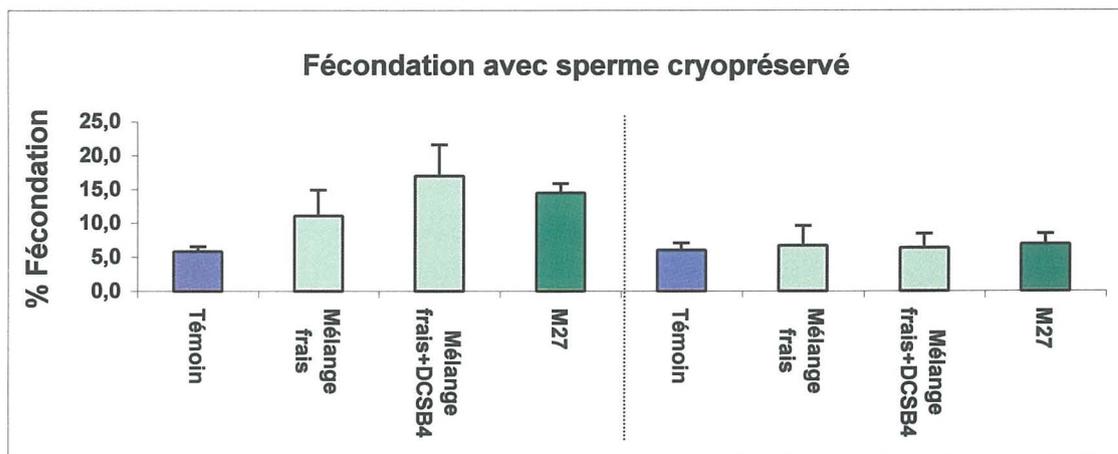


Figure 12 –Tests de fécondation réalisés en Novembre. Les deux groupes correspondent à deux lots d'ovocytes différents

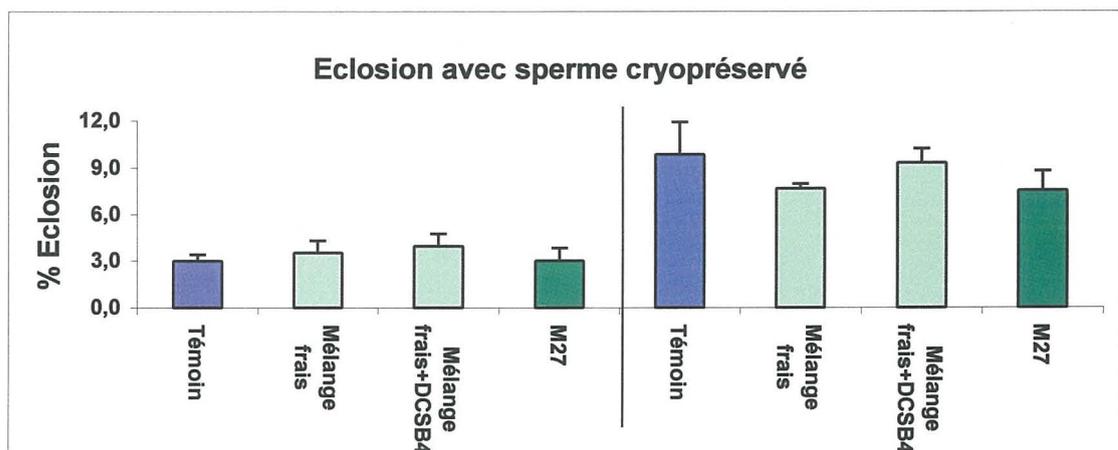


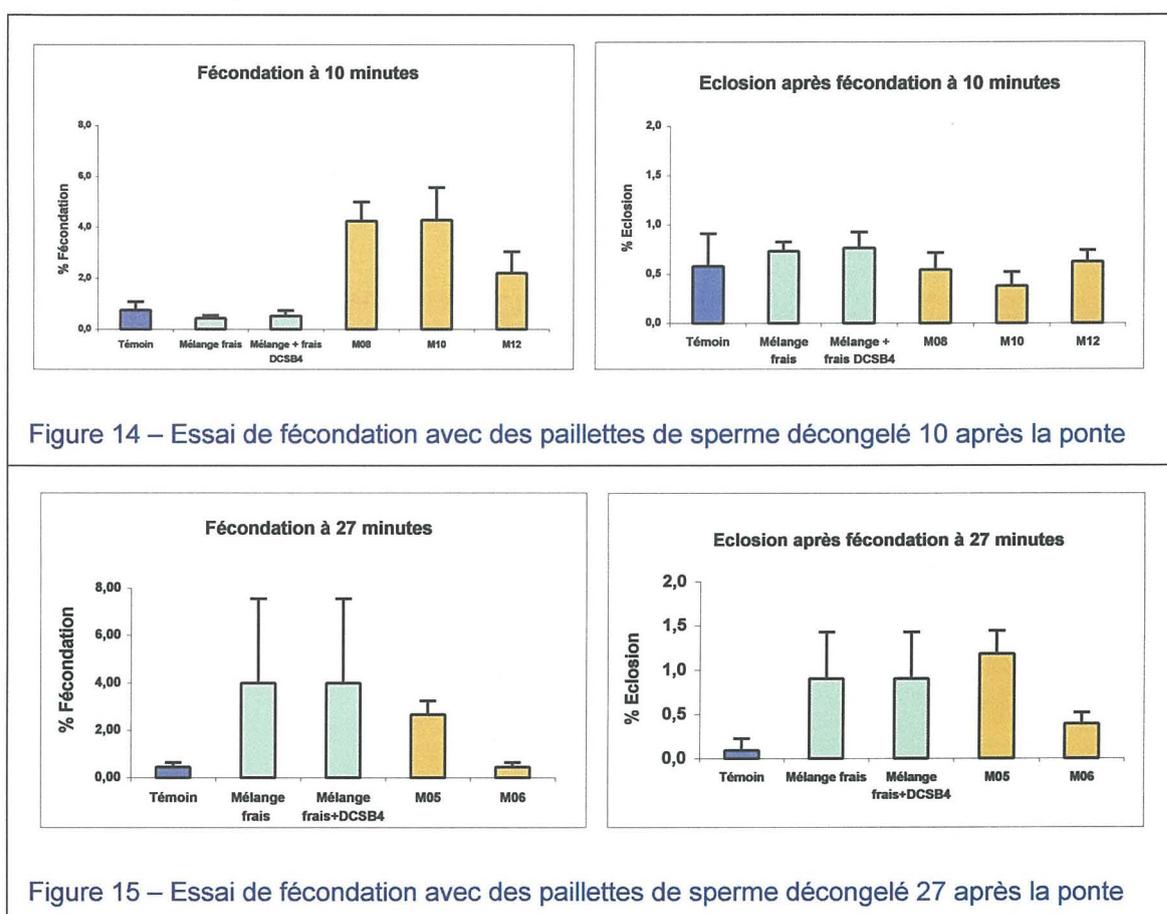
Figure 13 – Éclosions observées en novembre. Les deux groupes correspondent à deux lots d'ovocytes différents

3.4.3. Essais de validation de novembre 2005

Suite à l'évaluation de la durée de fécondabilité des ovocytes et du rôle du DCSB4 sur l'activité du sperme deux essais de démonstration du pouvoir fécondant du sperme congelé ont été réalisés sur deux femelles différentes. Le premier 10 minutes après l'émission des ovocytes (Figure 14), le second après 27 minutes de délai (Figure 15).

Une nouvelle fois les taux de fécondation des témoins sont extrêmement faibles, et les taux de fécondations par du sperme décongelé utilisé à 10 minutes sont supérieurs à ceux des témoins (4% contre moins de 1%) mais cela ne se traduit pas par un plus grand nombre de larves le lendemain.

La fécondation réalisée après 27 minutes de délai permet d'obtenir des fécondations supérieures à celle du témoin non fécondé mais une nouvelle fois les taux observés sont trop faibles pour que des conclusions soient tirées.



3.4.4. Essais de validation de Janvier 2005

En raison de la très grande variabilité des résultats obtenus lors des premières missions, il a été décidé d'augmenter la puissance expérimentale en multipliant les lots d'ovocytes soumis aux essais d'évaluation du pouvoir fécondant du sperme décongelé ; Neuf lots d'ovocytes ont ainsi été traités et fécondés par une série de paillettes de sperme

provenant de prélèvement au gonopore (M13, M14, M15) ou d'émissions centrifugées (M16, M17). Les paillettes M13, M14 et M15 ont été séparées en deux parties représentant 1/3 (A) et 2/3 (B) du volume. Le faible niveau moyen des fécondations le premier jour à peine supérieur à celui des lots non fécondés nous a conduit à ajouter du DCSB4 dans un lot non fécondé dans le but de vérifier que le sperme contenu dans la cavité palléale se comportait de manière semblable à celui utilisé pour les fécondations contrôlées. Il s'agissait de vérifier que tous les ovocytes fécondables n'avaient pas été fécondés dans la cavité palléale et/ou qu'une partie du sperme déjà présent pouvait être réactivé par le DCSB4 contenu dans les paillettes de sperme.

Les résultats de ces tests sont présentés Tableau-annexe 4 et résumés Figure 16. Les résultats ont été très variables suivant les femelles : certains taux de fécondation dépassant 40 % alors que leurs équivalents étaient inférieurs à 2%. Nous avons donc choisi de ranger chacun des 11 traitements des 6 lots d'ovocytes identiques par ordre le lot ayant le plus faible taux de fécondation ayant le rang 1 celui, le plus fort le rang 11. La même opération a été effectuée sur les taux d'éclosion. La variance des moyennes des rangs a ensuite été analysée, elle n'a permis de déceler une hétérogénéité significative que sur les taux d'éclosion. Une comparaison deux à deux des moyennes des taux d'éclosions a ensuite été effectuée par PLSD. Elle est présentée Tableau 5. La plupart des lots ont des taux d'éclosion significativement supérieurs à ceux des témoin. L'addition de DCSB4 au témoin (T.+DCSB4) provoque une augmentation significative de l'éclosion qui reste cependant inférieure à celle obtenue avec une mélange de sperme frais. Aucun des lots ayant reçu du sperme congelé ne diffère significativement du lot T.+DCSB4. Il n'est donc pas possible de conclure sur la base de cette expérience que le sperme décongelé est effectivement fécondant.

Tableau 5 – Bilan des comparaisons deux à deux des différentes paillettes dans l'expérience de janvier. Les comparaisons significatives ($p < 0,05$) sont en bleu turquoise

	Rang moyen	Mél. frais	M15A	M16	M13A	M17	M14B	T+ DCSB4	M13B	M14A	M15B	Témoin
Mél. frais	9,2											
M15A	8,3											
M16	8,2											
M13A	8,0											
M17	7,3											
M14B	6,5											
T. + DCSB4	6,0											
M13B	5,7											
M14A	4,8											
M15B	3,3											
Témoin	1,5											

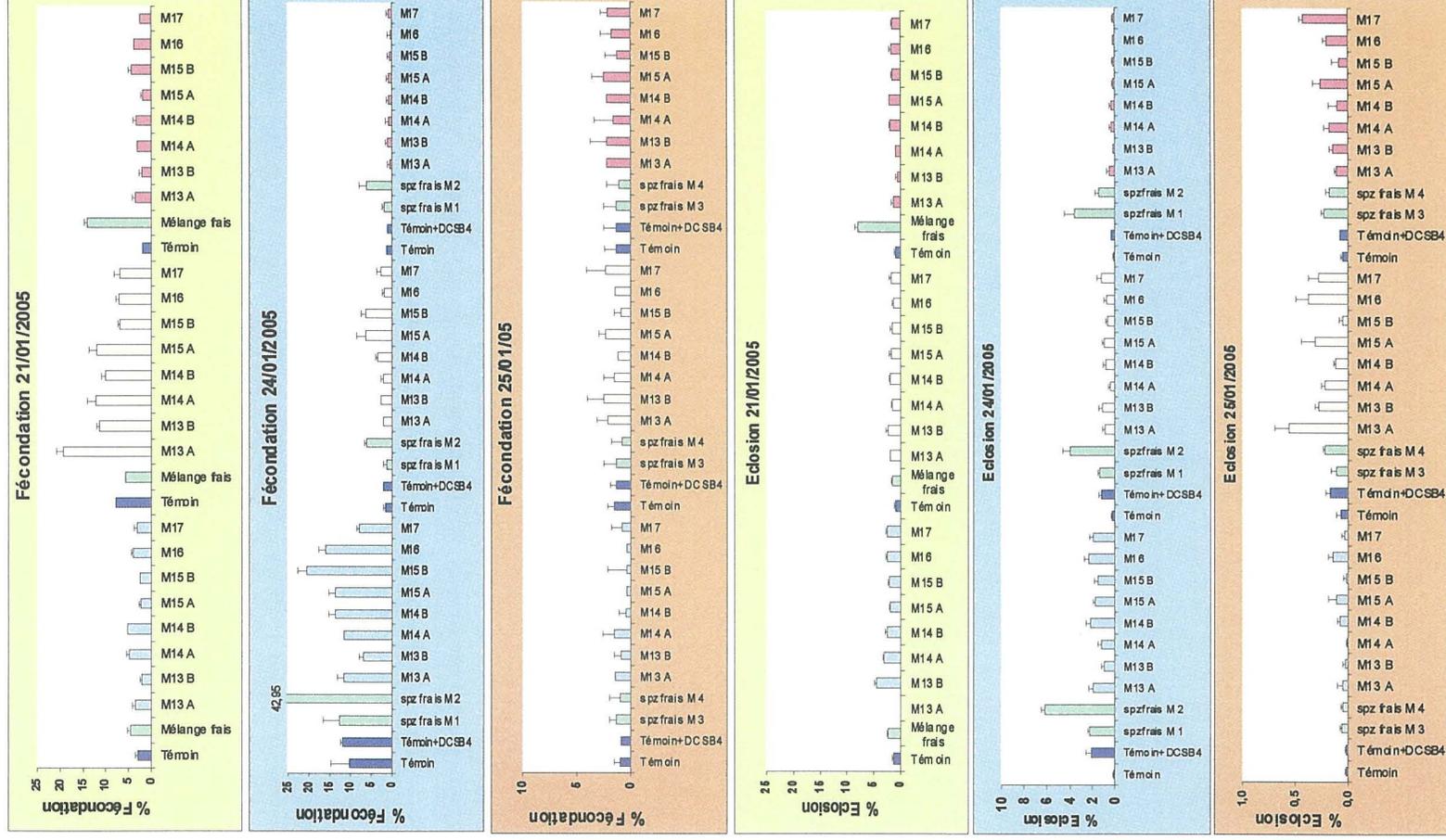


Figure 16 – Résultats des tests de fécondation réalisés en janvier. Chaque série a été réalisée sur trois femelles différentes. La première série expérimentale ne comportait pas de lots de sperme frais activé par le DCSB4.

3.5. Centrifugation du sperme

Les essais de centrifugation de sperme émis ou obtenu par stripping, dilué dans l'eau de mer, montrent qu'une centrifugation de 3 minutes à 5000 tours/minute permet la concentration des cellules sans dégâts visibles au microscope. Le culot se présente sous la forme d'une masse beige dense. Lorsqu'il est repris dans de l'eau de mer filtrée à une concentration équivalente à celle du sperme recueilli au gonopore, son indice de motilité initial chute rapidement à 0 (1 heure environ). Ce sperme est réactivé à l'indice 4 ou 5 par dilution dans le DCSB4. Les spermatozoïdes du surnageant peu mobiles et peu concentrés après la centrifugation peuvent aussi être réactivés par le DCSB4.

La centrifugation permet de concentrer efficacement les spermatozoïdes sans perte sensible de mobilité. Cette méthode a été utilisée pour conserver du sperme par congélation (voir essais de validation de janvier 2005) mais aussi pour conserver le sperme par réfrigération à 2°C. Un lot de sperme d'huître perlière albinos a ainsi été conservé pendant une semaine. La réactivation par dilution à 50% dans le DCSB4 a permis de retrouver un indice de 4 ou 5 jusqu'au 6^{ème} jour où il est tombé à 2. Ce sperme centrifugé a été utilisé pour féconder un lot d'ovocytes. Le taux de fécondation a été de 70% contre 12% pour le témoin recevant du sperme non activé. Environ 10% des embryons ont présenté un développement anormal (polyspermie probable). Le taux d'éclosion a été de 10% à J1

Tableau 6 - Essais de mise au point de la centrifugation du sperme, le sperme était réactivé par dilution à 50% dans le DCSB4

	Temps centrif. (minutes)	N. tours/min.	Stripping		Émis	
			Indice initial	Activé	Indice initial	Activé
Initial	0,0	0	1	4	5	5
Surnageant	0,5	10 000	1	5	2	5
Culot	1,0	10 000	0	5	4	4
Surnageant	1,0	10 000	débris cell.	débris cell.	1 (traces)	-
Culot	1,0	10 000	1	4	3	4
Surnageant	1,0	8 000	0	5	2	5
Culot	1,0	8 000	0	4 amas	5	5
Surnageant	3,0	5 000	0	5	2	4
Culot	3,0	5 000	1	5	5	5
Surnageant	5,0	2 000	0	5	2	5
Culot	5,0	2 000	0	5	5	5

4. Discussion et conclusions

Le premier objectif des expérimentations de cette convention était la validation d'un protocole de congélation du sperme de *Pinctada margaritifera*. Les essais réalisés lors de la première mission, en Avril 2004, ont conduit à sélectionner le protocole de congélation MC2 dérivé de celui décrit par Maisse et Labbé (2002) pour l'huître creuse *Crassostrea gigas* plutôt que le protocole BC2 de Bougrier et Rabenomanana (1986). Une chute importante de la concentration des paillettes est observée à la décongélation dans les deux cas. Il résulte probablement de l'adsorption d'une partie des cellules sur les parois des paillettes. Les paillettes préparées suivant le protocole MC2 sont plus concentrées en spermatozoïdes pour des résultats tout à fait comparables en terme de motilité à la décongélation. Elles permettraient donc de féconder un plus grand nombre d'ovocytes.

La motilité du sperme est généralement considérée comme un bon indice de la qualité du sperme à la décongélation. Les deux protocoles appliqués sur des spermatozoïdes d'indices de motilité élevés (4 ou 5) permettent l'obtention de sperme motile à la décongélation d'indice moyen ou faible (2 ou 1). Le rapport entre le nombre de spermatozoïdes mobiles contenus dans une paillette et le nombre d'ovocytes (300 000) utilisé dans nos expériences était toujours supérieur à 10. Pour d'autres espèces de bivalves (*Crassostrea gigas* ou *P. maximus* par exemple) un tel rapport est suffisant pour la fécondation de 50 à 100% des ovocytes. Ces taux de fécondation n'ont jamais été observés au cours de ce travail.

Il a été constaté, par ailleurs, que pour deux lots de paillettes au moins l'indice de motilité était insuffisant pour caractériser l'état des cellules à la décongélation. Malgré la dilution dans le DCSB4 les spermatozoïdes étaient totalement inactifs mais étaient réactivés en présence d'ovocytes. Seule la capacité à féconder peut constituer un réel critère d'évaluation de la qualité du sperme après congélation. Il était donc indispensable d'utiliser ce critère pour évaluer le protocole choisi.

Les expériences qui ont été réalisées au cours des trois missions à Rangiroa à trois moments différents du cycle annuel ont dû reprendre ce même objectif car chacune des expériences menées a été marquée par de très faibles taux de fécondation et d'éclosion. Une seule de ces expériences a permis d'obtenir des taux de fécondation significativement supérieurs à 10% lorsque le sperme frais était utilisé en présence de DCSB4. Dans toutes les autres expériences les taux de fécondation étaient inférieurs à 10 % et les taux d'éclosion étaient de l'ordre de 2 à 3 % dans le meilleur des cas.

À Rangiroa, la motilité du sperme était évaluée au moment où l'animal prélevé dans le bac de ponte et, isolé dans un cristalliseur, recommençait à émettre du sperme.

Seuls les individus d'indice de motilité 5 (plus de 75% des spermatozoïde se déplaçant activement) étaient retenus pour les fécondations et/ou pour la congélation. Des contrôles réalisés ultérieurement montraient une interruption très rapide des mouvements. Dans la plupart des cas, un indice inférieur à 3 était observé après seulement une demi-heure. Cette perte de motilité n'est pas synonyme de mortalité des spermatozoïdes car les travaux réalisés sur la concentration du sperme par centrifugation ont montré que ce sperme non motile conservé à 2°C pouvait être réactivé pendant une semaine et restait fécondant.

Ces constatations sur la motilité du sperme sont identiques à celles qui ont été faites dans le cadre des conventions pour la mise au point de la triploïdisation (voir rapport N° III 4-0439). Pour une induction efficace de la triploïdie, il est nécessaire d'introduire immédiatement le sperme dans le cristalliseur où est isolé l'individu émettant des ovocytes au lieu d'attendre la fin de l'émission comme il est d'usage courant. Les ovocytes sont fécondés dès leur émission. Cette pratique permet d'obtenir une fécondation synchrone. Il a cependant été remarqué que les taux de fécondation obtenus par cette méthode à Rangiroa étaient faibles, variables et très inférieurs à ceux obtenus au COP. Au COP, ils sont régulièrement compris entre 90 et 100% (moyenne $96,7\% \pm 2,5\%$). À Rangiroa, ils variaient entre 5 et 90% mais le plus souvent entre 20 et 40%. De la même manière les taux d'éclosion pris de façon globale sont en moyenne très faibles.

Ces observations nous ont conduit à réexaminer nos pratiques de fécondation pour vérifier la durée de fécondabilité des ovocytes ainsi que celle des spermatozoïdes. Il est apparu que la période où l'ovocyte est fécondable peut être supérieure à une heure lorsque le sperme reste actif. La fécondation de divers lots d'ovocytes effectuée en respectant un délai maximal d'une demi-heure, montre clairement que les ovocytes sont plus ou moins fécondables. Durant cette période, le facteur essentiel est l'activité des spermatozoïdes qui peut être contrôlée par le DCSB4. Ces résultats nous ont conduit à utiliser de façon systématique le DCSB4 comme activateur du sperme frais et du sperme décongelé. L'utilisation de l'activateur sur les lots témoins où les fécondations sont dues aux spermatozoïdes qui étaient présents dans le bac de ponte et polluaient la cavité palléale, montre que ces spermatozoïdes déjà présents peuvent aussi être réactivés. Ils sont responsables d'une augmentation du taux de fécondation des témoins qui ne permet plus de mettre statistiquement en évidence la capacité de fécondation du sperme décongelé.

Peu d'essais ont pu être menés au COP dans le cadre de cette convention mais les fécondations spontanées y constituent elles aussi une difficulté pour la démonstration de la fécondance du sperme décongelé. Des taux de fécondation non contrôlée pouvant aller jusqu'à 80% ont été observés. Il est donc nécessaire d'isoler de façon systématique les individus identifiés comme femelles dès le début des chocs thermiques d'induction de la ponte.

La poursuite des tests d'évaluation de la capacité de fécondation du sperme congelé sur le site de Rangiroa ne devrait être envisagée qu'après la détermination des causes de ces faibles fécondations. Il faut rappeler que la technique de ponte et de fécondation artificielle mise au point à Rangiroa au cours des années 80 consiste à réunir tous les œufs recueillis et fécondés dans un récipient de 30 l où ils sédimentent. Les œufs

fécondés se développent rapidement et environ trois ou quatre heures après la fécondation commencent à nager. Ces embryons mobiles sont recueillis par siphonage et placés dans les bacs d'élevage où leur nombre sera évalué au premier renouvellement d'eau. Cette méthode n'est, à notre connaissance, pratiquée par aucune écloserie commerciale ou expérimentale. D'ordinaire, les œufs sont directement placés dans les bacs d'élevage larvaire. Les taux de fécondation sont généralement très proche de 100 %. Les taux d'éclosion sont plus variables et dépendent de la qualité des ovocytes et de la saison. La méthode développée à Rangiroa présente l'avantage d'éviter l'introduction dans les bacs larvaires d'une très grande quantité d'ovocytes non fécondés qui serait la cause d'une pollution bactérienne du milieu. C'est probablement en raison des très faibles taux de fécondation que cette méthode a été retenue. Il semble donc que les faibles taux d'éclosion de Rangiroa aient une origine ancienne.

Dans le cadre de projets visant à la conservation de génotypes d'intérêt caractérisant certaines populations naturelles ou certains individus il est nécessaire de maîtriser au mieux cette phase. En effet, des taux de fécondation aussi faibles ne permettront sans doute pas d'éviter des biais de sélection dès les premiers jours d'élevage. Il importe donc de comprendre les mécanismes qui conduisent à cette perte de viabilité des gamètes et d'en corriger les effets. À cet égard, les résultats obtenus sur le site de Vairao peuvent servir de témoin dans cette étude. Ils démontrent déjà que les faibles performance de fécondation à Rangiroa ne sont pas une caractéristique normale de l'espèce mais sont le produit de l'environnement (pris au sens large) des huîtres perlières à Rangiroa.

5. Bibliographie

Bougrier S., Rabenomanana L.D., 1986. Cryopreservation of spermatozoa of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **58**, 277-280.

Christen R., Gatti J.L., Billard R., 1987. Trout sperm motility : the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. *Eur. J. Biochem.* **166** : 667-671.

Ewart J.W., Epifanio C.E., 1981. A tropical flagellate food for larval and juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquaculture*. **22** : 297-300.

Hughes J.B., 1973. An examination of eggs challenged with cryopreserved spermatozoa of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Cryobiology*. **10** : 342- 344.

Jeulin C., Billard R., 1995. Energetics of the flagellar movement of vertebrate spermatozoa involved in internal and external fertilization. *In comparative Biology of male gametes in the animal kingdom. C.R. Acad. Agric. Fr.* **84** : 147-157

Le Moullac G., Rouxel C., Vonau V., 2003. Le contrôle des croisements chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera*. Convention N° 30271.

Maisse G., Labbé C., 2002. Mise au point d'une procédure de congélation du sperme de l'huître creuse *Crassostrea Gigas*. Contrat de recherche 02/5210834.

Ogawa K., Mohri T., Mohri H., 1977. Identification of dynein as the outer arms of sea urchin sperm axonemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74** : 5006-5010.

Paniagua-Chavez C.G., Buchanan J.T., Supan J.E., Tiersch T.R., 2000. Cryopreservation of sperm and larvae of eastern oyster. *In. Cryopreservation in aquatic species.* 230-239.

Rouxel C., 2002. Conservation par le froid, du patrimoine génétique de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*. Convention N° 20140.

Valdez-Ramirez M.E., 1999. Estimation de la qualité des gamètes femelles et des embryons de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale.

Yankson K., Moyse J., 1991. Cryopreservation of the spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and three other oysters. *Aquaculture*, **97**, 259-267.

6. Annexes

6.1. Annexe 1 Composition du DCSB4

Solution mère

PH final 8.2, conservation 10 jours à 4°C

	Formule	En gramme/L
Chlorure de sodium	NaCl	19.50
Glycine	NH ₂ CH ₂ COOH	6.25
Sulfate de magnésium	MgSO ₄	0.25
Chlorure de calcium	CaCl ₂ 2H ₂ O	0.25
Tris base		2.42
Acide chlorhydrique	HCl	0.6ml

Composition du CF HBSS

	Formule	En gramme /l
Chlorure de sodium	NaCl	24.0
Chlorure de potassium	KCl	1.2
Sulfate de magnésium	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.6
Phosphate de sodium hydraté	Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	0.36
Phosphate de potassium	KH ₂ PO ₄	0.18
Carbonate de sodium	NaHCO ₃	1.05

Glucose	$C_6H_{12}O_6$	3.0
---------	----------------	-----

6.2. Annexe 2 Protocoles des missions

Mission du 13 au 23 avril

Objectif général

Validation des protocoles BC2 et MC2 de cryoconservation définis lors des travaux réalisés au centre Ifremer

Les travaux de mise au point d'une technique de conservation par le froid se sont déroulés au COP durant les deux conventions précédentes et ont abouti à adapter deux protocoles développés indépendamment pour la cryoconservation de *Crassostrea gigas* par Bougrier et Rabenomanana (1986) et Maisse et Labbé (2002) respectivement désignés BC2 et MC2. qu'il importe de comparer afin de sélectionner le plus efficace.

La démarche suivie est la constitution durant la 1ere semaine d'un stock de paillettes de sperme de plusieurs mâles suivant les deux protocoles à valider. Dans la 2eme phase ces paillettes seront utilisés pour féconder plusieurs femelles.

Plan de travail.

Mardi 13 avril

- .- 7h00 GASPOL remplissage du Dewar norme IATA avec de l'azote liquide
- 8h30.- enregistrement du fret et départ de l'aéroport de Faa'a
- 10h00.- Arrivée de Vincent Vonau et Ariora Matehau
- 13h00 à 14h00 – Présentation des objectifs de la mission aux personnes du PRL RANGIROA.
- 1ere plongée avec récupération des chapelets de nacre sur la filère ? par les plongeurs du PRL.
- 14h00 à 17h00.- Détrouage et nettoyage des nacres récupéré par les plongeurs – conditionnement des animaux en salle d'algues au froid.
- Fin des travaux

Mercredi 14 Avril

- 7h30.-12h00- Installation et préparation du matériel pour la stimulation du 15 avril
- 13h00.-16h00 – Discussion et distribution des tâches et postes à toutes les personnes impliqués dans l'expérience du jeudi 15 avril.

Jeudi 15 Avril

- 7 h30.- préparation de l'expérience de stimulation,
- 8h10.- 1^{er} choc thermique sur quarante animaux
- 9h07.- changement d'eau
- 9h40.- fin de la stimulation,
- 12h00.- 2^{eme} choc thermique sur le reste du lot d'animaux stockés en salle d'algue,
- 12h30 - petite vidange de 15 % du volume du Bac de stimulation(300L),
- 12h42 - vidange et changement d'eau,
- 13h00 – fin de la stimulation,
- 13h30.- cryoconservation du sperme de 2 mâles et fécondation de la femelle sélectionnée avec le sperme frais de ces 2 mâles,
- 14h30 – 17h00 mise en eclosoir des lots d'ovocytes et contrôle de la fécondation,
- 17h00 – 18h30 relevé et traitement des informations et fin des opérations.

Vendredi 16 avril

- 7h30.- préparation de l'expérience de stimulation,
- 8h40.- démarrage de l'opération « émission des gamètes » pour réaliser l'ensemble des travaux prévus,
- 9h25- changement d'eau,
- 9h40 – fin de la stimulation,
- 9h45.-11h00 cryoconservation du sperme de 3 mâles et fécondation de la femelle sélectionnée avec le sperme frais de ces 3 mâles,
- 11h00 – 12h30 mise en eclosoir des lots d'ovocytes fécondés et prélèvement pour contrôle de la fécondation,
- 13h30.- 14h50 contrôle de la fécondation

- 14h50.- 19h00 évaluation des taux d'éclosion.

Samedi 17 avril

- 7h00.- 2eme plongée pour ramener sur la filière les animaux utilisés dans la semaine et récupération des nouveaux chapelets sur la filière ??,
- 8h00.-détroupage et nettoyage des nacres puis stockage à 20°C durant le week-end,
- 9h00.- 11h00 décongélation d'une paillette de chaque mâle de chaque protocole de cryoconservation, afin d'évaluer le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur indice de motilité.
- 11h00.-14h30 évaluations des taux d'éclosion de l'expérience de vendredi.
- 14h30 –16h00 mise en forme des résultats sous informatique et préparation de la semaine du 19 avril au 23 avril 2004.

Lundi 19 avril

- 7h30.- préparation de l'expérience de stimulation,
- 8h15.- démarrage de l'opération « émission des gamètes » pour réaliser l'ensemble des travaux prévus,
- 9h45 - ajout dans le bac de stimulation de la 2eme série de nacre,
- 10h00 - changement d'eau,
- 10h27 – fécondation de la femelle référencée F 03 avec les paillettes de sperme des mâles cryoconservé ref. MO 1, MO 2, MO 3 et MO 4.
- 10h30 - fin de la stimulation,
- 11h30 – 12h15 mise en éclosion des lots d'ovocytes fécondés et prélèvement pour contrôle de la fécondation,
- 13h00 –18h00 3eme plongée avec retour du lot de nacre utilisé sur filière et récupération de nouveaux chapelets pour les expérimentations du mercredi 27 avril,
- Détroupage et nettoyage des nacres récupérés par les plongeurs – conditionnement des animaux en salle d'algues au froid.
- Évaluations des taux de fécondation.

Mardi 20 avril

- 7h30.- 12h00 mise en forme des résultats de lundi 19 sous informatique
- réflexion avec M.Bellais sur la manip du mercredi 21 avril et préparation de cette dernière,

- 13h00.-17h00 récupération et évaluation des taux d'éclosion et traitement informatique des résultats.

Mercredi 21 avril

- 7h30.- préparation de l'expérience de stimulation,
- 8h30.- démarrage de l'opération « émission des gamètes » pour réaliser l'ensemble des travaux prévus,
- 9h25 .- changement d'eau,
- 8h48 - fécondation de la femelle référencée F 04 avec les paillettes de sperme des mâles cryoconservé réf. MO 1, MO 2, MO 3 et MO 4.
- 9h40 .- fin de stimulation
- 9h43 .- 11h30 mise en éclosion des lots d'ovocytes fécondés et prélèvement pour contrôle de la fécondation,
- 13h00.- 17h00 Évaluations des taux de fécondation

Jeudi 22 avril

7h30.- 11h30 traitement informatique des résultats du 21 avril.

- 13h00.-16h00 Évaluations des taux d'éclosion et traitement informatique des résultats.
- 16h00.-18h00 rangement du matériel.

Vendredi 23 avril

- 7h30.- 11h00 rangement du matériel
- 11h00.- 13h00 Débriefing avec l'équipe du PRL.
- 14h30 fin de la mission.

Tableau annexe 1 - Bilan général des fécondations de la mission d'Avril

Date	Femelle	lot	FECONDATION				ECLOSION		
			%Fécond	s	moyenne	s	nombre larve	taux d'éclosion	écart type
15 avril 2004	1	témoin	0,96	0,00	7,00	0,8	1400	0,71%	0,08%
15 avril 2004	1	Témoin fécondé	1,66	0,71	11,25	3,3	2250	1,14%	0,34%
15 avril 2004	1	M01 frais	3,81	1,41	8,00	1,2	1600	0,81%	0,12%
15 avril 2004	1	M02 frais	0,59	0,58	15,50	4,4	3100	1,57%	0,44%
15 avril 2004	1	M01 frais	0,82	0,84	10,50	2,6	2100	1,06%	0,27%
15 avril 2004	1	M02 frais	1,74	0,71	10,00	1,4	2000	1,01%	0,14%
15 avril 2004	1	M01 frais	1,11	3,37	9,00	2,0	1800	0,91%	0,20%
15 avril 2004	1	M02 frais	1,95	3,54	17,00	6,7	3400	1,72%	0,68%
16 avril 2004	2	témoin	1,42	1,41	17,00	6,7	1700	0,84%	0,33%
16 avril 2004	2	Témoin fécondé	2,62	1,00	8,75	4,2	875	0,43%	0,21%
16 avril 2004	2	M03 frais	2,08	0,82	11,75	4,3	1175	0,58%	0,22%
16 avril 2004	2	M04 frais	---	---	49,00	10,3	4900	2,43%	0,51%
16 avril 2004	2	M05 frais	---	---	21,00	5,7	2100	1,04%	0,28%
16 avril 2004	2	Mâle 03 frais	2,15	1,53	8,00	4,1	800	0,40%	0,20%
16 avril 2004	2	Mâle 04 frais	---	---	88,75	8,9	8875	4,41%	0,44%
16 avril 2004	2	Mâle 05 frais	---	---	12,00	3,6	1200	0,60%	0,18%
16 avril 2004	2	Mâle 03 frais	3,42	0,71	22,50	6,4	2250	1,12%	0,32%
16 avril 2004	2	Mâle 04 frais	---	---	68,25	10,6	6825	3,39%	0,52%
16 avril 2004	2	Mâle 05 frais	---	---	28,75	4,9	2875	1,43%	0,24%
19 avril 2004	3	témoin	0,00	0,00	2,25	0,5	225	0,14%	0,03%
19 avril 2004	3	Témoin fécondé	32,05	25,58	151,00	25,2	15100	9,43%	1,57%

Date	Femelle	lot	FECONDATION				ECLOSION			
			%Fécond	s	moyenne	s	nombre larve	taux d'éclosion	écart type	
19 avril 2004	3	BC2-M01	2,84	0,96	2,00	0,8	200	0,12%	0,05%	
19 avril 2004	3	BC2-M02	0,51	0,96	0,75	1,5	75	0,05%	0,09%	
19 avril 2004	3	BC2-M03	0,29	0,58	0,75	1,0	75	0,05%	0,06%	
19 avril 2004	3	BC2-M04	1,08	0,82	0,75	1,5	75	0,05%	0,09%	
19 avril 2004	3	MC2-M01	0,00	0,00	3,00	0,8	300	0,19%	0,05%	
19 avril 2004	3	MC2-M02	0,00	0,00	2,00	1,8	200	0,12%	0,11%	
19 avril 2004	3	MC2-M03	0,54	0,50	2,25	1,0	225	0,14%	0,06%	
19 avril 2004	3	MC2-M04	0,17	0,50	1,00	0,8	100	0,06%	0,05%	
21 avril 2004	4	témoin	2,76	0,96	3,50	1,3	350	0,20%	0,07%	
21 avril 2004	4	Témoin fécondé	8,88	5,32	5,25	3,7	525	0,30%	0,21%	
21 avril 2004	4	BC2-M01	4,15	2,45	7,75	4,9	775	0,44%	0,28%	
21 avril 2004	4	BC2-M02	6,91	1,50	8,75	2,5	875	0,50%	0,14%	
21 avril 2004	4	BC2-M03	5,12	1,29	9,00	4,2	900	0,52%	0,24%	
21 avril 2004	4	BC2-M04	3,21	3,79	5,75	1,5	575	0,33%	0,09%	
21 avril 2004	4	MC2-M01	6,41	1,71	4,25	4,0	425	0,24%	0,23%	
21 avril 2004	4	MC2-M02	6,39	2,22	4,50	1,9	450	0,26%	0,11%	
21 avril 2004	4	MC2-M03	5,36	1,26	7,50	2,1	750	0,43%	0,12%	
21 avril 2004	4	MC2-M04	4,05	1,89	10,25	1,5	1025	0,59%	0,09%	

Mission du 22 Novembre au 03 Décembre :

Objectif général

Validation du protocole MC2 de cryoconservation défini lors des travaux réalisés au centre Ifremer

Objectif : A l'issue du traitement des données de la mission d'Avril 2004, nous avons fait le choix de valider le protocole MC 2 pour cette mission qui sera articulée en deux phases :

- Constitution d'une réserve de paillettes suivant le protocole MC2.
- Fécondation sur plusieurs lots d'ovocytes avec les paillettes du protocole MC2.

Plan de travail

Première semaine

lundi matin ou après midi 22 novembre

- 1^{ère} plongée avec récupération de 40 mâles et 20 femelles, nettoyées et mises à 21°C durant 24 heures

mardi 23 Novembre

- Arrivée des missionnaires
- Une heure après fécondation prélèvement sur chaque lot pour estimation du taux de fécondation.
- 3^{ème} plongée avec récupération de 40 mâles et 20 femelles nettoyées et mises entre 20 à 23°C durant 24 heures

jeudi matin le 25 novembre

- 1^{er} choc thermique sur 20 mâles et 10 femelles pour appliquer le protocole MC 2 seront retenus en priorité les mâles d'indice 3, 4 et 5 (**minimum sur 3 mâles**) et congélation des paillettes dans N₂ liquide.
- **Les femelles et mâles seront utilisées en priorité pour la manip de Meriani et Christophe.**

jeudi après midi

- récupération des premières éclosions
- Évaluation des taux d'éclosions

Vendredi matin 26 Novembre

- 1^{er} choc thermique sur 20 mâles et 10 femelles pour appliquer le protocole MC 2 seront retenus en priorité les mâles d'indice 3, 4 et 5(**minimum sur 3 mâles**) **et congélation des paillettes dans N 2 liquide.**

Vendredi après midi

- 2^{ème} choc thermique sur 20 mâles et 10 femelles pour appliquer sur protocole MC2 et assurer la fécondation avec le sperme congelé. Ne pas oublier de faire trois témoins(T1) avec ovocytes sans sperme et trois témoins(T2) de fécondation avec du sperme frais de plusieurs mâles.
- Une heure après fécondation prélèvement sur chaque lot pour estimation du taux de fécondation.

Le samedi 27 Novembre

- Évaluation des taux d'éclosions

2^{ème} semaine***lundi matin 29 Novembre***

- 4^{ème} plongée avec récupération de 40 mâles et 40 femelles, nettoyées et mises à 21°C durant 36 heures
- 1^{er} choc thermique sur 10 mâles et 10 femelles pour appliquer sur protocole MC2 et assurer la fécondation avec le sperme congelé. . Ne pas oublier de faire trois témoins(T1) avec ovocytes sans sperme et trois témoins(T2) de fécondation avec du sperme frais de plusieurs mâles.

lundi après midi

- 2^{ème} choc thermique sur 10 mâles et 10 femelles pour appliquer sur protocole MC2 et assurer la fécondation avec le sperme congelé. . Ne pas oublier de faire trois témoins(T1) avec ovocytes sans sperme et trois témoins(T2) de fécondation avec du sperme frais de plusieurs mâles.

mardi matin 30 Novembre

- 1^{er} choc thermique sur 10 mâles et 10 femelles pour appliquer sur protocole MC2 et assurer la fécondation avec le sperme congelé. . Ne pas oublier de faire trois témoins(T1) avec ovocytes sans sperme et trois témoins(T2) de fécondation avec du sperme frais de plusieurs mâles.

mardi après midi

- 2^{ème} choc thermique sur 10 mâles et 10 femelles pour appliquer sur protocole MC2 et assurer la fécondation avec le sperme congelé. . Ne pas oublier de faire trois témoins(T1) avec ovocytes sans sperme et trois témoins(T2) de fécondation avec du sperme frais de plusieurs mâles.

mercredi matin 01 Décembre

- 1^{er} choc thermique sur 10 mâles et 10 femelles pour appliquer sur protocole MC2 et assurer la fécondation avec le sperme congelé. . Ne pas oublier de faire trois témoins(T1) avec ovocytes sans sperme et trois témoins(T2) de fécondation avec du sperme frais de plusieurs mâles.

mercredi après midi

- 2^{ème} choc thermique sur 10 mâles et 10 femelles pour appliquer sur protocole MC2 et assurer la fécondation avec le sperme congelé. . Ne pas oublier de faire trois témoins(T1) avec ovocytes sans sperme et trois témoins(T2) de fécondation avec du sperme frais de plusieurs mâles.
- Évaluation des taux d'éclosions

jeudi matin 02 Décembre

- Rangement d'une partie du matériel

jeudi après midi

- Évaluation des taux d'éclosions

Vendredi matin 03 Décembre

- Poursuite du rangement du matériel
- Fin de mission

Nota : Programme Écologie larvaire- Auguste Bennett présent pendant la période manip récupère les gamètes **non utilisés**, réalisera les fécondations et les élevages larvaires. Le 2eme jour il collectera et congèlera les larves ainsi produites pour retour ultérieur vers le COP.

Tableau annexe 2 - Bilan général des expériences de la mission de novembre 2004

Date	Femelle	Lot	FECONDATION		ECLOSION		
			%	sd	N larve	%	sd
24/11/2004	1	Témoin	5,30	1,11	8500	2,84	0,46
24/11/2004	1	Témoin	6,33	0,35	9400	3,14	0,35
24/11/2004	1	Mélange frais	11,10	3,81	10500	3,51	0,78
24/11/2004	1	Mélange frais+DCSB4	17,00	4,58	11800	3,94	0,80
24/11/2004	1	BC2-M27	13,67	1,53	7100	2,37	0,25
24/11/2004	1	BC2-M27	15,33	1,15	10900	3,64	0,64
24/11/2004	2	Témoin	5,67	0,58	16400	10,92	0,70
24/11/2004	2	Témoin	6,33	1,53	13200	8,79	2,60
24/11/2004	2	Mélange frais	6,67	2,89	11500	7,66	0,31
24/11/2004	2	Mélange frais+DCSB4	6,33	2,08	14000	9,32	0,90
24/11/2004	2	BC2-M27	7,33	2,52	9900	6,59	0,35
24/11/2004	2	BC2-M27	6,33	0,58	12700	8,46	1,14
25/11/2004	3	Témoin	0,33	0,58	0	0,00	0,00
25/11/2004	3	Témoin	0,33	0,58	600	0,20	0,17
25/11/2004	3	Témoin	0,67	0,58	200	0,07	0,12
25/11/2004	3	Mélange frais	7,00	1,00	3100	1,03	0,29
25/11/2004	3	Mélange frais	7,00	1,00	3600	1,20	0,40
25/11/2004	3	Mélange frais	7,67	0,58	5100	1,70	0,26
25/11/2004	3	Mélange frais	1,33	0,58	1600	0,53	0,23
25/11/2004	3	Mélange frais	0,33	0,58	1500	0,50	0,17
25/11/2004	3	Mélange frais	0,67	0,58	1300	0,43	0,21

Date	Femelle	Lot	FECONDATION		ECLOSION		
			%	sd	N larve	%	sd
25/11/2004	3	MC2-M05	2,33	0,58	3000	1,00	0,10
25/11/2004	3	MC2-M05	2,33	1,15	3500	1,17	0,32
25/11/2004	3	MC2-M05	3,33	1,53	4100	1,37	0,25
25/11/2004	3	MC2-M06	0,33	0,58	1300	0,43	0,15
25/11/2004	3	MC2-M06	0,67	0,58	900	0,30	0,10
25/11/2004	3	MC2-M06	0,33	0,58	1300	0,43	0,12
01/12/2004	5	Témoin	0,968	0,953	9800	0,88	0,10
01/12/2004	5	Témoin	0,508	0,500	3200	1,07	0,03
01/12/2004	5	Mélange frais	0,507	0,012	7600	2,54	0,08
01/12/2004	5	Mélange frais	0,351	0,330	8800	2,94	0,08
01/12/2004	5	Mélange frais +DCSB4	0,365	0,321	9600	3,21	0,12
01/12/2004	5	Mélange frais +DCSB4	0,662	0,447	7500	2,50	0,16
01/12/2004	5	MC2-M08+DCSB4	3,707	2,215	5200	1,74	0,15
01/12/2004	5	MC2-M08+DCSB4	4,774	0,895	7000	2,34	0,18
01/12/2004	5	MC2-M10+DCSB4	3,365	1,514	5500	1,84	0,07
01/12/2004	5	MC2-M10+DCSB4	5,181	1,592	3000	1,00	0,10
01/12/2004	5	MC2-M12+DCSB4	1,611	0,494	6600	2,20	0,16
01/12/2004	5	MC2-M12+DCSB4	2,788	0,072	7400	2,47	0,06

Mission du 17 Janvier 2005 au 27 Janvier 2005

Objectif général

Validation du protocole MC2 de cryoconservation défini lors des travaux réalisés au centre Ifremer

Objectif : Le traitement des données de la mission de Novembre révèlent clairement l'existence d'un problème de qualité de fécondation avec les animaux de Rangiroa. Aussi cette mission sera articulée en trois phases :

- Fécondations de plusieurs femelles à des temps différents
- Constitution d'une réserve de paillettes suivant le protocole MC2.
- Essai de centrifugation du sperme et constitution de paillettes suivant protocole MC2.
- Remplacement du diluant DCSB4 par un nouveau diluant « GIGASTOR »(GT)
- Fécondation sur plusieurs lots d'ovocytes avec les paillettes du protocole MC2.

Plan de travail

Première semaine

lundi après midi 17 Janvier

- 1ere plongée avec récupération de 124 animaux mâles et femelles, nettoyés et mis en conditionnement à 21°C.

mardi 18 Janvier

- Présentation des objectifs de la mission aux personnes du PRL RANGIROA.
- Discussion et distribution des tâches et postes à toutes les personnes impliqués dans l'expérience du jeudi 15 avril.
- Installation de tout le matériel nécessaire pour réaliser l'ensemble des expérimentations durant la mission.

mercredi matin 19 Janvier

1^{er} choc thermique sur 74 animaux pour appliquer le protocole MC 2 seront retenus en priorité les mâles d'indice 3, 4 et 5 (**minimum sur 3 mâles**) et **congélation des paillettes dans N₂ liquide.**

- **Une femelle est utilisée pour la fécondation retardé.**

mercredi après midi 19 Janvier

- 2eme choc thermique sur 50 huîtres perlières pour assurer la fécondation retardé avec sperme frais sur trois femelles.

jeudi matin 20 Janvier

1^{er} choc thermique sur 86 animaux pour appliquer le protocole MC2 seront retenus en priorité les mâles d'indice 3, 4 et 5. Récupération de la semence mâle par centrifugation. Puis fabrication de paillettes avec les diluants DCSB4 et GT(Gigastor) **et congélation des paillettes dans N 2 liquide.**

- Parallèlement sera faite une fécondation retardé avec sperme frais sur 3 femelles.

vendredi matin 21 Janvier

1^{er} choc thermique sur 86 animaux pour appliquer le protocole MC2 seront retenus en priorité les mâles d'indice 3, 4 et 5. Récupération de la semence mâle par centrifugation. Puis fabrication de paillettes avec les diluants DCSB4 et GT(Gigastor) **et congélation des paillettes dans N 2 liquide.**

- Parallèlement sera faite une fécondation sur 3 femelles référencés 1, 2 et 3 avec le sperme cryopréservé des mâles références M13, M14, M15, M16 et M17.

vendredi après-midi 21 Janvier

- Mise en éclosion des lots d'ovocytes de l'expérience du matin et prélèvement pour évaluation du taux de fécondation. Expérience d'activation du sperme avec diluant DCSB4 et GT.

samedi matin 22 Janvier

- 2eme plongée avec retour du lot de nacre utilisé sur filière et récupération de nouveaux chapelets pour les expérimentations du lundi 24 Janvier. Détroquage et nettoyage des nacres récupéré par les plongeurs – conditionnement des animaux en salle d'algues au froid.

samedi après-midi 22 Janvier

- évaluations des taux d'éclosion de l'expérience de vendredi. Relevé et traitement des informations et fin des opérations.

lundi matin 24 Janvier

- Démarrage de l'opération récupération des gamètes. Nouvelle fécondation sur 3 femelles référencées 4, 5, et 6 avec sperme cryogénique des mêmes mâles que pour l'expérience du vendredi matin 21 janvier(M13, M14, M15, M16 et M17).

lundi après-midi 21 Janvier

- Mise en éclosion des lots d'ovocytes de l'expérience du matin et prélèvement pour évaluation du taux de fécondation.

mardi matin 25 Janvier

- Dernière opération de récupération des gamètes. Nouvelle fécondation sur 3 femelles référencées 7, 8, et 9 avec sperme cryogénique des mâles référencés M13, M14, M15, M16 et M17.

mardi après-midi 25 Janvier

- Mise en éclosion des lots d'ovocytes de l'expérience du matin et prélèvement pour évaluation du taux de fécondation.
- évaluations des taux d'éclosion de l'expérience de lundi matin.
- Relevé et traitement des informations et fin des opérations.

mercredi matin 26 Janvier

- 3eme plongée avec retour du lot de nacre utilisé sur filière.
- Début du rangement d'une partie du matériel utilisé.

mercredi après-midi 26 Janvier

- évaluations des taux d'éclosion de l'expérience de mardi. Relevé et traitement des informations et fin des opérations.

jeudi matin 27 Janvier

- Rangement du reste matériel utilisé.
- Prélèvement de deux fois un litre d'eau de mer du lagon de Rangiroa et du réseau eau de mer de la station de Perliculture de Rangiroa.

jeudi après-midi 27 Janvier

- 13h00.- 14h00 débriefing avec les gens du PRL.
- 18h00 départ vers Papeete.

Tableau annexe 3 - Données des essais de fécondation retardée en janvier 2005 à Rangiroa

Date	Lot	DCSB4	Femelle	Mâle	Fécondés	Non fécondés	Taux de fécondation
19/01/2005	témoin	0	1	0	3	197	1,50
19/01/2005	2min	0	1	1	9	191	4,50
19/01/2005	10min	0	1	1	5	195	2,50
19/01/2005	30 min	0	1	1	3	197	1,50
19/01/2005	2minDCSB4	1	1	1	5	197	2,48
19/01/2005	10minDCSB4	1	1	1	8	192	4,00
19/01/2005	30 minDCSB4	1	1	1	137	67	67,16
19/01/2005	2min	0	1	2	9	191	4,50
19/01/2005	10min	0	1	2	4	196	2,00
19/01/2005	30 min	0	1	2	28	183	13,27
19/01/2005	2minDCSB4	1	1	2	42	158	21,00
19/01/2005	10minDCSB4	1	1	2	24	174	12,12
19/01/2005	30 minDCSB4	1	1	2	15	189	7,35
20/01/2005	Témoin		2		7	193	3,50
20/01/2005	5 min	0	2	3	33	207	13,75
20/01/2005	10 min	0	2	3	8	227	3,40
20/01/2005	30 min	0	2	3	7	207	3,27
20/01/2005	5 minDCSB4	1	2	3	181	22	89,16
20/01/2005	10 minDCSB4	1	2	3	154	83	64,98
20/01/2005	30 minDCSB4	1	2	3	157	8	95,15
20/01/2005	5 min	0	2	4	49	192	20,33

Date	Lot	DCSB4	Femelle	Mâle	Fécondés	Non fécondés	Taux de fécondation
20/01/2005	10 min	0	2	4	8	214	3,60
20/01/2005	30 min	0	2	4	7	22	24,14
20/01/2005	5 minDCSB4	1	2	4	201	45	81,71
20/01/2005	10 minDCSB4	1	2	4	107	101	51,44
20/01/2005	30 minDCSB4	1	2	4	25	188	11,74
20/01/2005	Témoin		3		17	177	8,76
20/01/2005	5 min	0	3	3	20	216	8,47
20/01/2005	10 min	0	3	3	14	214	6,14
20/01/2005	30 min	0	3	3	16	170	8,60
20/01/2005	5 minDCSB4	1	3	3	126	130	49,22
20/01/2005	10 minDCSB4	1	3	3	107	100	51,69
20/01/2005	30 minDCSB4	1	3	3	202	9	95,73
20/01/2005	5 min	0	3	4	16	193	7,66
20/01/2005	10 min	0	3	4	14	202	6,48
20/01/2005	30 min	0	3	4	14	210	6,25
20/01/2005	5 minDCSB4	1	3	4	101	138	42,26
20/01/2005	10 minDCSB4	1	3	4	162	70	69,83
20/01/2005	30 minDCSB4	1	3	4	26	188	12,15
20/01/2005	Témoin		4		4	210	1,87
20/01/2005	5 min	0	4	3	11	200	5,21
20/01/2005	10 min	0	4	3	8	176	4,35
20/01/2005	30 min	0	4	3	4	228	1,72

Date	Lot	DCSB4	Femelle	Mâle	Fécondés	Non fécondés	Taux de fécondation
20/01/2005	5 minDCSB4	1	4	3	207	4	98,10
20/01/2005	10 minDCSB4	1	4	3	198	10	95,19
20/01/2005	30 minDCSB4	1	4	3	93	120	43,66
20/01/2005	5 min	0	4	4	5	219	2,23
20/01/2005	10 min	0	4	4	4	195	2,01
20/01/2005	30 min	0	4	4	4	220	1,79
20/01/2005	5 minDCSB4	1	4	4	128	120	51,61
20/01/2005	10 minDCSB4	1	4	4	56	232	19,44
20/01/2005	30 minDCSB4	1	4	4	196	36	84,48

Tableau annexe 4 - Données des essais de fécondation et éclosion réalisés à Rangiroa en Janvier 2005

Date	Femelle	lot	Fécondation		Eclosion		
			%	s.d.	N. larves	%	s.d.
21/01/2005	1	Témoin	2,95	0,58	6733	1,34	0,18
21/01/2005	1	Mélange frais	4,70	0,58	11600	2,30	0,30
21/01/2005	1	M13 A	3,52	0,58	0	0,00	0,00
21/01/2005	1	M13 B	2,04	0,58	22733	4,51	0,36
21/01/2005	1	M14 A	4,82	0,58	15200	3,02	0,36
21/01/2005	1	M14 B	5,26	0,00	12467	2,47	0,34
21/01/2005	1	M15 A	2,24	0,58	10000	1,98	0,24
21/01/2005	1	M15 B	2,51	0,00	10533	2,09	0,22
21/01/2005	1	M16	3,89	0,58	12800	2,54	0,14
21/01/2005	1	M17	3,11	0,58	12533	2,49	0,27
21/01/2005	2	Témoin	7,69	0,00	5133	1,02	0,24
21/01/2005	2	Mélange frais	5,66	0,00	7600	1,51	0,26
21/01/2005	2	M13 A	19,23	1,53	9333	1,85	0,15
21/01/2005	2	M13 B	11,40	0,58	11800	2,34	0,45
21/01/2005	2	M14 A	12,09	2,08	8200	1,63	0,21
21/01/2005	2	M14 B	10,00	1,00	9600	1,90	0,17
21/01/2005	2	M15 A	12,08	1,53	9000	1,79	0,43
21/01/2005	2	M15 B	6,87	0,58	7867	1,56	0,30
21/01/2005	2	M16	7,11	0,58	6433	1,28	0,23
21/01/2005	2	M17	6,96	1,15	9067	1,80	0,27
21/01/2005	3	Témoin	1,99	0,00	5100	1,01	0,07

Date	Femelle	lot	Fécondation		Eclosion		
			%	s.d.	N. larves	%	s.d.
21/01/2005	3	Mélange frais	14,18	0,58	39733	7,88	0,71
21/01/2005	3	M13 A	3,54	0,58	7067	1,40	0,30
21/01/2005	3	M13 B	2,07	0,58	3200	0,63	0,27
21/01/2005	3	M14 A	3,21	0,00	4533	0,90	0,12
21/01/2005	3	M14 B	3,45	0,58	9600	1,90	0,17
21/01/2005	3	M15 A	1,83	0,58	10533	2,09	0,12
21/01/2005	3	M15 B	4,42	0,58	8000	1,59	0,14
21/01/2005	3	M16	3,70	0,00	8800	1,75	0,46
21/01/2005	3	M17	2,52	0,00	8000	1,59	0,16
24/01/2005	4	Témoin	10,15	4,51	333	0,07	0,08
24/01/2005	4	Témoin+DCSB4	11,92	0,58	10467	2,08	0,48
24/01/2005	4	spz frais M 1	12,68	4,00	11400	2,26	0,10
24/01/2005	4	spz frais M 2	42,95	2,65	31133	6,18	0,29
24/01/2005	4	M13 A	11,58	1,53	9667	1,92	0,35
24/01/2005	4	M13 B	6,90	1,00	5000	0,99	0,22
24/01/2005	4	M14 A	11,49	0,00	6000	1,19	0,32
24/01/2005	4	M14 B	13,62	1,53	10733	2,13	0,39
24/01/2005	4	M15 A	13,67	1,53	8933	1,77	0,16
24/01/2005	4	M15 B	20,53	2,08	7533	1,49	0,30
24/01/2005	4	M16	16,02	1,53	11467	2,28	0,44
24/01/2005	4	M17	7,83	0,58	9600	1,90	0,31
24/01/2005	5	Témoin	1,59	0,58	1267	0,25	0,05

Date	Femelle	lot	Fécondation		Eclosion		
			%	s.d.	N. larves	%	s.d.
24/01/2005	5	Témoin+DCSB4	2,03	0,00	6067	1,20	0,23
24/01/2005	5	spz frais M 1	1,41	0,58	6933	1,38	0,16
24/01/2005	5	spz frais M 2	5,97	0,58	20000	3,97	0,62
24/01/2005	5	M13 A	2,22	0,00	4533	0,90	0,18
24/01/2005	5	M13 B	2,68	0,00	5667	1,12	0,34
24/01/2005	5	M14 A	2,01	0,58	1900	0,38	0,20
24/01/2005	5	M14 B	3,47	0,58	3867	0,77	0,27
24/01/2005	5	M15 A	6,36	2,08	4867	0,97	0,18
24/01/2005	5	M15 B	6,24	1,00	3133	0,62	0,20
24/01/2005	5	M16	1,72	0,58	3667	0,73	0,19
24/01/2005	5	M17	2,59	1,00	6000	1,19	0,38
24/01/2005	6	Témoin	1,38	0,00	400	0,08	0,08
24/01/2005	6	Témoin+DCSB4	1,08	0,00	1667	0,33	0,02
24/01/2005	6	spz frais M 1	1,75	0,58	18000	3,57	0,86
24/01/2005	6	spz frais M 2	5,98	2,00	7200	1,43	0,30
24/01/2005	6	M13 A	0,60	0,58	2400	0,48	0,21
24/01/2005	6	M13 B	1,08	0,58	800	0,16	0,00
24/01/2005	6	M14 A	0,89	0,58	1533	0,30	0,18
24/01/2005	6	M14 B	0,68	0,58	1467	0,29	0,16
24/01/2005	6	M15 A	0,85	0,58	933	0,19	0,06
24/01/2005	6	M15 B	0,58	0,58	933	0,19	0,05
24/01/2005	6	M16	0,36	0,58	800	0,16	0,04

Date	Femelle	lot	Fécondation		Eclosion		
			%	s.d.	N. larves	%	s.d.
24/01/2005	6	M17	0,81	0,58	800	0,16	0,10
25/01/2005	7	Témoin	0,97	0,58	67	0,01	0,01
25/01/2005	7	Témoin+DCSB4	0,93	0,00	67	0,01	0,01
25/01/2005	7	spz frais M 3	1,37	0,58	300	0,06	0,02
25/01/2005	7	spz frais M 4	0,97	1,00	267	0,05	0,01
25/01/2005	7	M13 A	1,44	0,00	267	0,05	0,05
25/01/2005	7	M13 B	0,92	0,58	133	0,03	0,02
25/01/2005	7	M14 A	1,52	1,00	33	0,01	0,01
25/01/2005	7	M14 B	0,45	0,58	367	0,07	0,03
25/01/2005	7	M15 A	0,40	0,00	567	0,11	0,08
25/01/2005	7	M15 B	0,40	1,73	100	0,02	0,02
25/01/2005	7	M16	0,35	0,00	733	0,15	0,04
25/01/2005	7	M17	0,78	1,00	167	0,03	0,03
25/01/2005	8	Témoin	1,51	0,58	333	0,07	0,04
25/01/2005	8	Témoin+DCSB4	1,30	0,58	867	0,17	0,04
25/01/2005	8	spz frais M 3	1,32	1,15	567	0,11	0,05
25/01/2005	8	spz frais M 4	0,79	1,00	1100	0,22	0,02
25/01/2005	8	M13 A	2,12	1,00	2833	0,56	0,13
25/01/2005	8	M13 B	2,46	1,53	1400	0,28	0,03
25/01/2005	8	M14 A	1,51	1,00	1100	0,22	0,04
25/01/2005	8	M14 B	1,18	0,00	600	0,12	0,02
25/01/2005	8	M15 A	2,30	0,58	1600	0,32	0,12

Date	Femelle	lot	Fécondation		Eclosion		
			%	s.d.	N. larves	%	s.d.
25/01/2005	8	M15 B	0,89	0,58	267	0,05	0,03
25/01/2005	8	M16	1,46	0,00	1867	0,37	0,12
25/01/2005	8	M17	2,33	1,73	1400	0,28	0,09
25/01/2005	9	Témoin	1,37	1,00	267	0,05	0,01
25/01/2005	9	Témoin+DCSB4	1,33	1,15	400	0,08	0,00
25/01/2005	9	spz frais M 3	1,33	1,15	1133	0,22	0,03
25/01/2005	9	spz frais M 4	1,08	1,15	900	0,18	0,03
25/01/2005	9	M13 A	2,18	0,00	567	0,11	0,01
25/01/2005	9	M13 B	2,21	1,53	733	0,15	0,03
25/01/2005	9	M14 A	1,60	1,73	900	0,18	0,05
25/01/2005	9	M14 B	2,18	0,00	533	0,11	0,08
25/01/2005	9	M15 A	2,52	1,00	1333	0,26	0,06
25/01/2005	9	M15 B	1,26	1,00	433	0,09	0,06
25/01/2005	9	M16	1,74	1,00	1033	0,21	0,03
25/01/2005	9	M17	2,16	0,58	2133	0,42	0,03

Tableau annexe 5 - Données des essais réalisés au COP en Février

lot	Fécondation				ECLOSION		
	cpt1	%Fécond	moyenne	sd	nombre larve	% éclosion	sd
Témoin+DCSB4	2	1,56	186	31,3	37 200	8	1
Mélange frais	14	8,43	198	31,2	39 600	9	1
Mélange frais	3	2,63	347	13,3	69 467	15	1
M03 RG	9	4,81	362	14,6	72 333	16	1
M08 RG	0	0,00	0	0,0	0	0	0
M89 COP	5	3,11	398	6,0	79 600	18	0
M27 COP	8	6,72	292	20,3	58 400	13	1
Témoin+DCSB4	3	2,75	112	15,9	22 467	7	1
Mélange frais	8	7,41	84	6,1	16 867	5	0
Mélange frais	3	2,68	485	50,7	97 067	29	3
M03 RG	4	3,74	163	53,7	32 533	10	3
M08 RG	1	0,92	174	9,5	34 800	10	1
M89 COP	5	4,50	168	13,1	33 667	10	1
M27 COP	7	6,19	120	25,7	23 933	7	2
Témoin+DCSB4	1	0,88	272	9,6	54 333	19	1
Mélange frais	20	14,60	205	26,5	40 933	14	2
Mélange frais	6	4,72	1137	79,0	227 333	78	5
M03 RG	4	3,57	323	9,5	64 667	22	1
M08 RG	5	4,46	228	13,3	45 667	16	1

lot	Fécondation				ECLOSION		
	cpt1	%Fécond	moyenne	sd	nombre larve	% éclosion	sd
M89 COP	5	4,50	261	71,2	52 133	18	5
M27 COP	3	2,83	175	6,4	34 933	12	0
Témoin+DCSB4	5	1,49	82	5,5	16 333	3	0
Mélange frais	9	5,36	1476	110,5	295 267	45	3
M03 RG	5	3,82	131	65,3	26 267	4	2
M08 RG	5	2,82	186	112,1	37 200	6	3
M89 COP	5	4,00	67	6,4	13 467	2	0
M27 COP	6	4,88	96	12,7	19 267	3	0
Témoin+DCSB4	95	43,58	1607	107,0	321 400	57	4
Mélange frais	90	46,39	1708	107,8	341 533	61	4
M03 RG	102	48,80	2255	221,6	450 933	81	8
M08 RG	102	48,34	1268	164,9	253 600	45	6
M89 COP	99	45,41	2038	105,6	407 667	73	4
M27 COP	91	44,83	1618	76,1	323 667	58	3