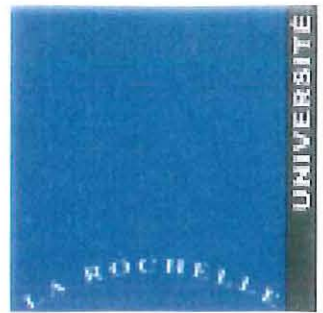


Laboratoire de Génétique et Pathologie
Station IFREMER de La Tremblade
Avenue de mus du Loup
17390 La Tremblade



Valentine Benech
Licence 3 de Biochimie
Faculté des sciences de La Rochelle
Juin 2005

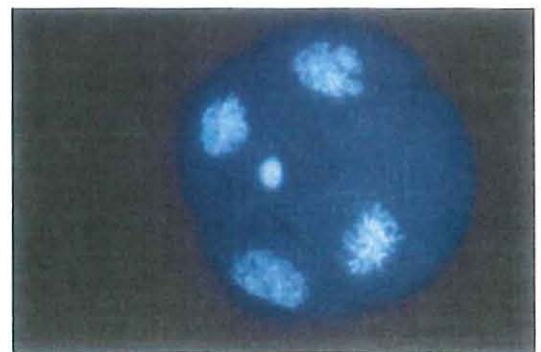
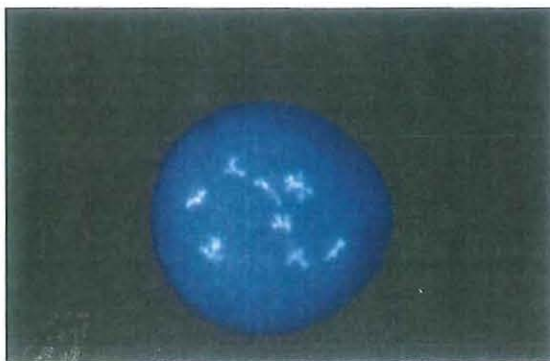
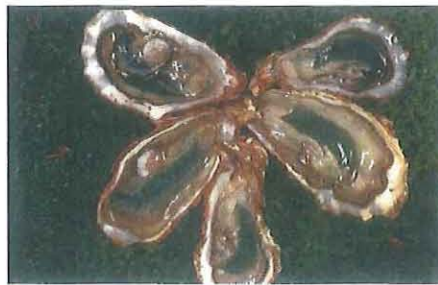
Maître de stage : Pierre Boudry

67058

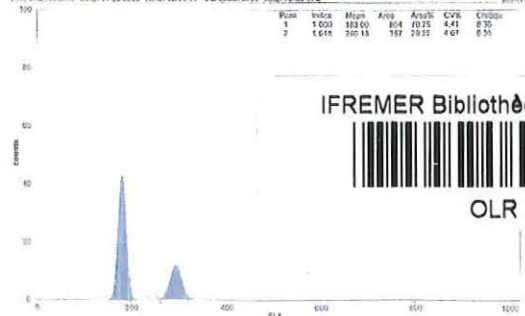
E400. BEN. E

ifremer

Etude de la viabilité comparée des gamètes de
géniteurs diploïdes et tétraploïdes d'huîtres
creuses, *Crassostrea gigas*, et compétition
gamétique



File: OLR 0267.mda Date: 11-05-2006 Time: 12:16:11 Particles: 2000 Avg-Trans: 85.4



IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02667

SOMMAIRE

<u>REMERCIEMENTS :</u>	I
<u>Presentation de l'IFREMER :</u>	II
<u>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES :</u>	1
<u>1/ CRASSOSTREA GIGAS :</u>	1
<u>2/ LA REPRODUCTION IN VITRO CHEZ CRASSOSTREA GIGAS :</u>	7
<u>3/ L'EPIFLUORESCENCE :</u>	8
<u>4/ LA CYTOMETRIE EN FLUX :</u>	11
<u>I/ INTRODUCTION :</u>	16
<u>II/ EXPERIENCE PRELIMINAIRE : DECROISSANCE DU POUVOIR FECONDANT DES GAMETES MALES DE C. GIGAS :</u>	17
<u>1) MATERIELS ET METHODES :</u>	17
<u>2) RESULTATS :</u>	20
<u>3) DISCUSSION :</u>	23
<u>4) CONCLUSION :</u>	23
<u>III/ MANIPULATION : ETUDE DE LA VIABILITE COMPAREE DES GAMETES DE GENITEURS DIPLOÏDES ET TETRAPLOÏDES DE C .GIGAS :</u>	23
<u>1) MATERIELS ET METHODES :</u>	23
<u>2) RESULTATS :</u>	27
<u>3) DISCUSSION :</u>	31
<u>4) CONCLUSION :</u>	35
<u>IV/ CONCLUSION :</u>	35
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	37
<u>ANNEXES :</u>	38

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Phillippe Gouletquer pour m'avoir accueillie au sein de la station de La Tremblade et Tristan Renault pour l'accueil au sein de son Laboratoire.

Je souhaite adresser tous mes remerciements à mon maître de stage : Pierre Boudry pour m'avoir permis cette expérience.

Je voudrais remercier tout particulièrement Sylvie Lapègue pour m'avoir encadrée tout au long de ces expériences (*en se levant très tôt ou en se couchant très tard, et pour toutes les analyses...*) et pour avoir chassé toutes les fautes d'orthographe (*entre autres*) de mon rapport : dieu sait qu'il y en a !!!

Je voudrais remercier Florence Cornette pour m'avoir accueillie et expliquée tout le fonctionnement du laboratoire, pour s'être levée très tôt aussi, et pour m'avoir aidée dans les analyses de cytométrie en flux.

Je remercie Christophe Ledu de m'avoir donné ses femelles pondeuses et de m'avoir initiée à l'épifluorescence. Je le remercie aussi pour avoir supporté le froid hivernal de la clim...

Je remercie Stéphanie pour la bonne humeur qui arrive avec elle dans le labo et pour m'avoir piquée mes copains.....

Je remercie Julien pour m'avoir aidée chaque fois que j'avais un petit soucis d'analyse et pour avoir trouvé des larves nageuses là où il ne devait pas y en avoir.

Je remercie Nicolas (irlandais d'adoption), le pro des stat, pour m'avoir aidé à traiter mes données statistiques.

Je remercie toute l'équipe qui m'a permis de comprendre le fonctionnement du labo et m'a aidée dans mes manips : J.C, Pascal l'indestructible, Raphaël, Serge...

Je remercie Yann pour ses petites sessions de surf et surtout celle sous l'orage..... Et Jean-Côme pour ses rares présences avec moi dans l'eau et son aide informatique....

Je remercie tous les stagiaires pour leur aide et tous le monde pour l'ambiance vraiment trop cool du site.

PRESENTATION DE L'IFREMER :

L'Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation des produits de la mer) est un établissement à caractère public et commercial (EPIC) placé sous la tutelle conjointe des ministères chargés de la Recherche, de l'Agriculture et de la Pêche, de l'Équipement, des Transports et du Logement et de l'Environnement.

Cet institut résulte de la fusion de l'ISPTM (institut scientifique et technique des Pêches Maritimes) et du CNEXO (centre national pour l'exploitation des océans) en 1984. Il a pour mission d'évaluer, de prévoir l'évolution des ressources des océans, de protéger le littoral marin et côtier et de favoriser le développement socio-économique du monde maritime.

Divisé en cinq grands centres sous le contrôle du siège social de Paris : Boulogne sur mer, Brest, la Méditerranée, les Dom Tom et Nantes. Ce dernier se divise en cinq stations : Bouin, la Rochelle, Arcachon, Bidart et La Tremblade.

PRESENTATION DE LA STATION DE LA TREMBLADE :



Elle est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture, où ses compétences géographiques s'étendent sur l'ensemble des pertuis charentais, depuis le sud de la Vendée jusqu'à l'estuaire de la

Gironde, et dans la surveillance de l'environnement littoral dont sa compétence géographique s'étend de la rive gauche de la Charente Maritime à la Gironde. Elle se divise en deux laboratoires :

_ Depuis le 1^{er} janvier 2004, le laboratoire côtier de la direction de l'environnement littoral (DEL) et le laboratoire de Poitou-Charentes (LCPC) de la Tremblade ont fusionné avec le laboratoire de la DEL de l'IFREMER de l'Houmeau pour donner le Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (LER/PC).

_ Le laboratoire de génétique et pathologie (LGP)

Présentation du LGP :

Le LGP est spécialisé dans les domaines de la génétique et de la pathologie des invertébrés marins et plus spécifiquement des mollusques bivalves. Ce laboratoire dépend du département de l'AGSAE : amélioration génétique, santé animale.

Les principaux objectifs du LPG visent essentiellement à développer des recherches dans les domaines de :

⇒ La pathologie, par la surveillance des ressources conchyliques et l'identification des agents pathogènes

⇒ La génétique :

- par l'étude des ressources génétiques, le testage de nouvelles espèces, de nouvelles populations hybrides pour limiter les risques liés à la monoculture.
- l'obtention de souches résistantes et tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions.
- la créations de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissances, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques, pour améliorer la productivité des entreprises.

Mon sujet de stage s'insère dans le programme « Durabilité des Systèmes de Production » et plus précisément le projet « Interaction Génétique entre Elevages et Ressources ». Il s'agit d'étudier la viabilité comparée des gamètes 2N et 4N dans le temps, et la compétition gamétique entre les géniteurs 2N et 4N.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1/ CRASSOSTREA GIGAS :

A) HISTORIQUE :

Les premiers parcs à huîtres apparaissent vers 1780. On se contentait de prendre des huîtres sauvages adultes et de les cultiver ensuite quelques temps dans des bassins. Alors, seules régnaient les huîtres plates. L'ostréiculture de l'huître creuse a débuté en France dans les années 1860. Les huîtres dites portugaises, de l'espèce *Crassostrea angulata* étaient importées pour la consommation. Suite à une tempête, un bateau dut décharger sa cargaison dans l'estuaire de la Gironde, cette espèce s'acclimata et se répandit jusque sur les côtes de Vendée. Dans les années 20, elle remplaça l'huître plate *Ostrea edulis* décimée par la maladie des branchies.

Frappée par une épizootie dans les années 1970, la production d'huîtres portugaises décline. On introduit alors l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* permettant la reprise de l'élevage de l'huître creuse en France.

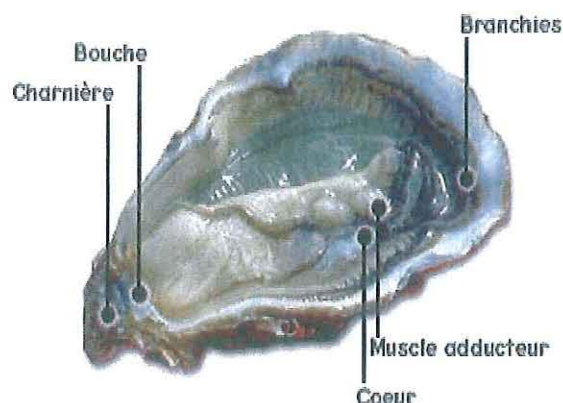
En 2001, la production totale française de coquillages est estimée à 194 000 tonnes. Les espèces élevées en France sont peu nombreuses, ce sont essentiellement des bivalves tels que l'huître plate, l'huître creuse, la moule, la palourde et la coquille St Jacques. L'ostréiculture est la première filière de ce secteur, elle représente 65% des tonnages produits. La production ostréicole nationale en 2000/2001 est estimée à 126 000 tonnes par an (Len-Corail, juin 2003).

B) REPRODUCTION ET DEVELOPPEMENT :

L'huître creuse, *C. gigas*, est un mollusque bivalve filtreur à hermaphrodisme protandre de type alternatif. C'est un ovipare. Elle possède des branchies qui filtrent et conduisent la nourriture jusqu'à sa bouche au moyen de ses cils branchiaux : c'est un

lamellibranche. Elle possède aussi un cœur, et un muscle adducteur qui permet l'ouverture et la fermeture de la coquille supérieur ancrée à la coquille inférieure par une charnière (voir figure 1).

Figure 1 : Morphologie de *C. gigas* (source : www.ifremer.fr)



Lors de la fécondation, dite externe, la femelle expulse ses œufs non fécondés (figure 2) et le mâle ses spermatozoïdes (figure 3) dans le milieu, par des battements de valves. La fécondation se produit ensuite dans le milieu externe.



Figure 2 : Ovocyte non fécondé de *C. gigas* (X200) Photo V. Benech



Figure 3 : Spermatozoïdes de *C. gigas* (X400) photo V. Benech

Durant les 24 heures qui suivent la fécondation, plusieurs stades de division sont visibles mais 5 stades du développement de la larve sont vraiment caractéristiques : 6 à 8 heures après la fécondation, la larve est appelée larve trochophore et mesure 50µm (figure 4), puis à 24 heures, elle présente une première coquille en forme de D d'où son appellation de larve D (figure 5). La présence d'une couronne ciliée permet son déplacement.



Figure 4 : Larves trochophores de *C. gigas* (X100) Photo V. Benech



Figure 5 : Larves D de *C. gigas* (X200) Source : www.ifremer.fr

A 8-10 jours, la différenciation des valves se produit, c'est la larve umbo (*figure 6*). Ensuite, on peut observer le développement de la larve œillée (*figure 7*) par l'apparition d'une tâche ocellaire dans l'organisme visible par transparence au microscope. Quelques jours après, elle devient pédivéligère (*figure 8*).

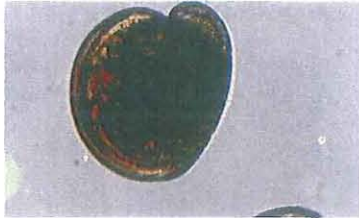


Figure 6 : Larve umbo de *C. gigas* Photo F. Cornette

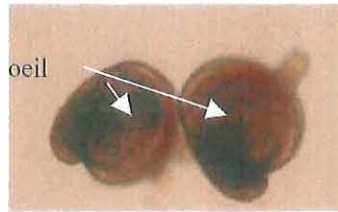


Figure 7 : Larves œillées de *C. gigas* Photo R. Brizard

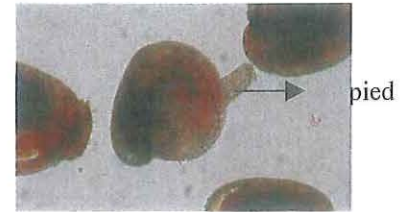


Figure 8 : Larves pédivéligère de *C. gigas* Photo R. Brizard

La présence d'un pied provenant de la métamorphose se traduit par le développement de branchies alors que le vélum et le pied disparaissent, elle est alors fixée par sa coquille. La fixation dépend essentiellement de la température du milieu. Elle se produit 15 à 28 jours après la fécondation en milieu contrôlé, et jusqu'à 60 à 70 jours en milieu naturel. L'ensemble du cycle de développement est présenté par la figure 9.

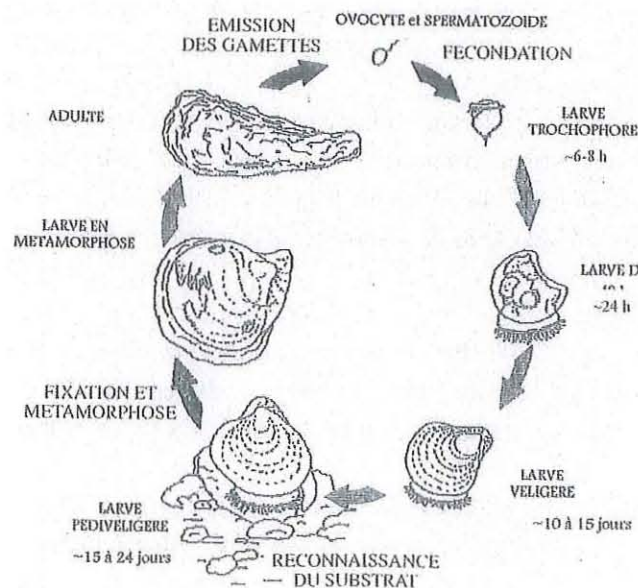


Figure 9 : Cycle de développement de *C. gigas* à 25°C (d'après Lelong, 1999)

C) PHYSIOLOGIE DE LA MATURATION :

En France, *C. gigas* effectue un cycle de reproduction qui dépend du climat et de l'environnement, en passant par trois stades :

→ une phase de repos sexuel,
→ un démarrage de la gamétogenèse en fin d'hiver pour une maturité sexuelle en début d'été,

→ Une phase d'émission des gamètes de l'été jusqu'à l'automne.

La durée de chaque stade varie selon les régions. Elle est directement liée aux paramètres physico-chimiques et au milieu d'élevage, notamment en raison de la température et de la richesse trophique. Ainsi, on pourra observer des pontes au mois de juin dans l'étang de Thau où la température est élevée, ou bien, sur des sites à forte capacité trophique. Ces pontes hâtives génèrent souvent des pontes successives mais, de moins bonne qualité pour le mois de septembre. Cependant, dans certaines régions, comme la Bretagne ou la Normandie, il y a peu de pontes et quasiment pas de captage naturel.

Une huître âgée d'un an peut être mature si sa taille dépasse les 50 mm. Cependant, la ponte s'effectue en général chez des individus de 2 ou 3 ans. Une huître mature peut avoir une gonade représentant 60 à 80% de son poids de chair. Une huître femelle adulte émet entre 20 et 100 millions d'ovocytes selon sa taille, quant au mâle, il peut émettre plusieurs milliards de spermatozoïdes (*voir figure 10*).



Figure 10 : Huître mature en train de pondre photo F. Cornette

Lors de la maturation, la taille de la gonade dépend essentiellement de la température de l'eau et de la capacité trophique qui, dans le milieu naturel, dépend lui-même de la production primaire : le phytoplancton.

Dans des conditions artificielles, l'huître est mise en maturation par le contrôle de la température et de l'apport en phytoplancton qui permettent la production de géniteurs matures une grande période de l'année en 6 à 10 semaines, selon la saison.

D) LES HUITRES TRIPLOÏDES :

a) LE BUT :

L'objectif du programme « triploïdie de l'huître » de l'IFREMER a été d'obtenir des animaux stériles. En effet, l'huître diploïde, ($2n = 20$ chromosomes en tout) consacre environ $2/3$ de son énergie à la reproduction et utilise ses réserves en sucre (glycogène et glucose) pour sa reproduction. Par la triploïdisation ($3n$), on réoriente cette énergie vers d'autres fonctions comme la croissance et on permet la consommation d'huîtres non laiteuses même en période estivale.

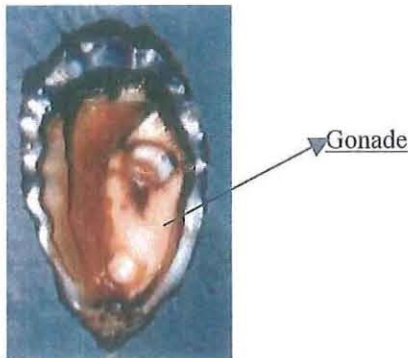


Figure 11 : Huître diploïde ($2n$) au moment de la maturité sexuelle, pendant « les mois sans r » Source www.ifremer.fr.



Figure 12 : Huître triploïde ($3n$), quelque soit la saison Source www.ifremer.fr.

Qu'elles soient diploïdes (figure 11) ou triploïdes (figure 12), les huîtres sont consommables toute l'année. Toutefois, les huîtres triploïdes présentent, du fait de leur stérilité, une qualité constante tout au long de l'année, ce qui est apprécié par certains consommateurs.



Figure 13 : Différence entre les Triploïdes et les Diploïdes en terme de poids. (Source Ifremer/REGEMO)

A Marennes-Oléron, le CREEA a obtenu des huîtres triploïdes présentant en moyenne, à l'âge de deux ans, un poids de 15% supérieur à celui du témoin diploïde et de 41% à l'âge de trois ans (études de 1995 à 1997).

Des études complémentaires ont montré que l'on peut raccourcir le cycle d'élevage de 6 à 24 mois par rapport au cycle de référence selon la période de mise en élevage et la méthode d'élevage. A Thau, les élevages de triploïdes ont permis d'obtenir une huître commercialisable en moins de 9 mois (*figure 13*).

b) LES HUITRES TRIPLOÏDES NE SONT PAS DES OGM :

Les OGM sont obtenus par transgénèse. Cette technique consiste à transférer des gènes, éléments de bases du patrimoine génétique contenus dans les chromosomes, d'une espèce vers une autre, ou d'un endroit à un autre dans un même organisme, et à les faire s'exprimer dans leur nouvel environnement. Cette pratique permet à un organisme d'acquérir un caractère nouveau qui n'aurait pu être obtenu par croisement. C'est le cas notamment du maïs résistant à la pyrale - un insecte parasite - ou des plantes résistantes aux herbicides. Ce n'est pas le cas dans les techniques de ploïdisation, (ajout d'un jeu de chromosome parent), comme pour l'huître.

Les différentes formes de polyploïdisation consistent à augmenter le nombre de jeux de chromosomes transmis par les parents à leurs descendants, donc sans introduction de gènes nouveaux en provenance d'une autre espèce : ce ne sont donc pas des OGM.

Les végétaux et les animaux polyploïdes (comportant plus de deux génomes) existent dans la nature : blé (6n), pomme de terre (4n), banane (3n), clémentine sans pépin (3n). C'est une « innovation » de la nature que l'homme n'a pas créée mais seulement « maîtrisée » pour utiliser les caractéristiques particulières associées, comme la stérilité dans le cas des triploïdes (clémentine sans pépin, huître non laiteuse et/ou des performances de croissance supérieures).

c) LA PRODUCTION :

1) Production de 3N par choc chimique :

On appelle cette manipulation l'induction de triploïdes. Le produit chimique est ajouté peu de temps après la fécondation (*entre deux parents diploïdes*) afin d'empêcher l'expulsion du deuxième globule polaire de l'ovocyte. Il est ensuite enlevé par rinçage.

2) Production de 3N par croisement de 2N et de 4N :

Les huîtres triploïdes (3n) peuvent être obtenues par croisement entre des huîtres femelles diploïdes (2n) et des mâles tétraploïdes (4n). Ceci correspond au mode de production de triploïdes exploité par les écloséries actuellement.

e) LES PRECAUTIONS :

Bien que les polyploïdes « spontanés » existent à l'état naturel, la lignée de reproducteurs tétraploïdes est maintenue en milieu confiné afin d'éviter sa dissémination. Le principe de précaution s'applique tant que les conséquences pour l'environnement restent incertaines. Ce principe de précaution est complété par une biovigilance dans le milieu naturel.

Afin de mieux connaître le comportement et la biologie de ces nouvelles générations d'huîtres tétraploïdes, Plusieurs études sont menées sur ces individus, en milieu confiné.

2/ LA REPRODUCTION IN VITRO CHEZ CRASSOSTREA GIGAS :

A) HISTORIQUE :

La fécondation in vitro est née en 1982 chez l'homme mais avait déjà été largement expérimentée chez les chevaux et les bovins. Elle reste cependant beaucoup plus triviale chez les animaux à fécondation externe comme *Crassostrea gigas* car il ne faut pas réimplanter l'embryon dans l'utérus de la femelle. Elle est utilisée dans les écloséries de mollusques afin d'obtenir des productions homogènes, sur une grande période de l'année, d'huîtres une à une, et ne nécessitant pas de phase de détroquage lorsqu'il s'agit de naissain recruté dans les bassins naisseurs.

B) PRINCIPE :

a) RECUPERATION DES SPERMATOZOÏDES ET DES OVOCYTES:

‣ Dans un premier temps il faut sexer les huîtres afin d'avoir directement le nombre de géniteurs de chaque sexe que l'on souhaite. Ceci évite les pertes. Pour ce faire, on doit tout d'abord anesthésier l'huître dans un bain de $MgCl_2$ et prélever ses ovocytes ou ses spermatozoïdes à l'aide d'une seringue. Puis, on laisse l'huître se réveiller dans un bain d'eau de mer.

‣ Ensuite, en vue d'une fécondation in vitro, on souhaite récupérer des ovocytes et des spermatozoïdes. Il faut alors sacrifier des individus matures, en pratiquant un stripping des gonades après ouverture des huîtres. Enfin, on filtre la solution de gamètes obtenue afin d'éliminer les gros déchets issus des membranes de la gonade ou autres, et on les conserve dans des béchers séparé d'eau de mer pour effectué un comptage.

b) FÉCONDATION IN VITRO :

La fécondation in vitro, en écloserie, se fait après le comptage des gamètes afin de mettre en présence 100 spermatozoïdes par ovocyte, ce qui correspond aux conditions optimum de fécondation définies par le LGP, permettant une fécondation quasi immédiate d'une majorité des ovocytes. La fécondation se fait alors dans un bûcher avec de l'eau de mer filtrée et en présence de bullage afin d'éviter la sédimentation. Ensuite, les ovocytes fécondés sont introduits en bacs d'élevage larvaire où l'eau et l'apport nutritif sont contrôlés.

3/ L'ÉPIFLUORESCENCE :

A) INTRODUCTION :

Cette technique permet d'observer l'ADN des cellules en le colorant à l'aide d'un microscope équipé en épifluorescence. Elle sert donc, dans notre cas, à savoir si l'ovocyte est fécondé ou non afin de recenser les taux de fécondations.

Un microscope à fluorescence est un microscope photonique équipé de deux lampes, une lampe ordinaire pour une observation classique par transmission et une lampe à arc pour la fluorescence. Il doit posséder aussi des filtres d'excitations qui permettent de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres d'émissions (*ou d'arrêts*) qui permettent de sélectionner les radiations émises par l'objet excité.

B) LE MICROSCOPE :

Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorochromes les plus habituellement utilisés. Chaque jeu de filtres est constitué d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission. Les fluorochromes les plus classiques sont la rhodamine et ses dérivés, la fluorescéine et ses dérivés, le DAPI utilisé aussi en cytométrie en flux et le réactif d'Hoeschst. Ils émettent respectivement dans le rouge, le vert et le bleu.

La fluorescence observée peut avoir plusieurs origines :

- Fluorescence naturelle d'une substance située dans la cellule, exemple : la chlorophylle fluoresce naturellement en rouge.
- Utilisation d'une substance non spécifique fluorescente naturellement, exemple : rhodamine et fluorescéine. Ces substances se fixent sur un anticorps spécifique d'un antigène. La spécificité est due à l'anticorps. La fluorescence observée permet de localiser l'antigène.
- Traceurs de lignage cellulaire en biologie du développement : la rhodamine, la fluorescéine, le Texas red ou autre est fixé sur une molécule de dextran. Le tout est microinjecté dans une cellule, et les cellules filles seront marquées au cours du développement embryonnaire.
- Intégration d'une séquence qui code pour une protéine naturellement fluorescente dans le "gène" codant pour une protéine. La protéine recherchée devient naturellement fluorescente et les observations peuvent se réaliser "in vivo"

- Utilisation d'une substance fluorescente se fixant spécifiquement sur une structure. Il s'agit là d'un test de type cytochimique. Ainsi, le DAPI, le réactif d'Hoeschst se fixent spécifiquement sur l'ADN et fluorescent en bleu. Ceci correspond à la méthode que nous allons utiliser.

Le microscope doit être équipé d'un jeu de filtres correspondant aux caractéristiques du fluorochrome :

- un filtre d'excitation permettant la sélection des radiations absorbées par le fluorochrome (environ 380nm),
- un miroir dichroïque réfléchissant les radiations absorbables vers l'échantillon et ne laissant passer par transmission que les radiations bleues et au-dessus (>400nm),
- un filtre d'émission ne laissant passer par transmission que les radiations bleues et au-dessus (>400nm).

Le filtre d'excitation sélectionne les radiations spécifiques du fluorochrome qui sont réfléchies par le miroir et éclairent l'échantillon, celui-ci émet des radiations de fluorescence qui seules, atteignent l'oculaire (*figure 14*).

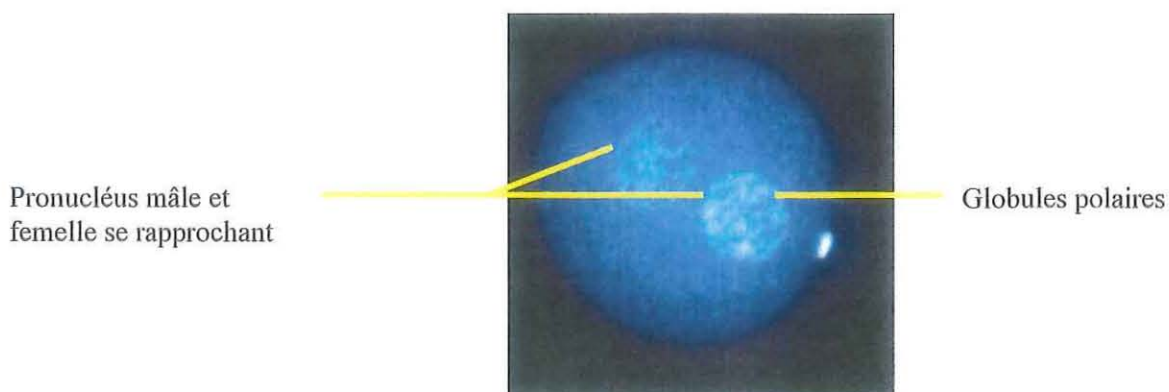


Figure 14 : Fécondation de *C.gigas* observée en épifluorescence
Photo C. Ledu

3/ LA CYTOMETRIE EN FLUX :

La cytométrie en flux permet de mesurer qualitativement et quantitativement plusieurs paramètres différents (*taille, granulosité, fluorescence,...*) sur des cellules, bactéries, mitochondries, en suspensions dans un liquide, alors qu'elles défilent une à une, à grande vitesse, devant une source lumineuse.

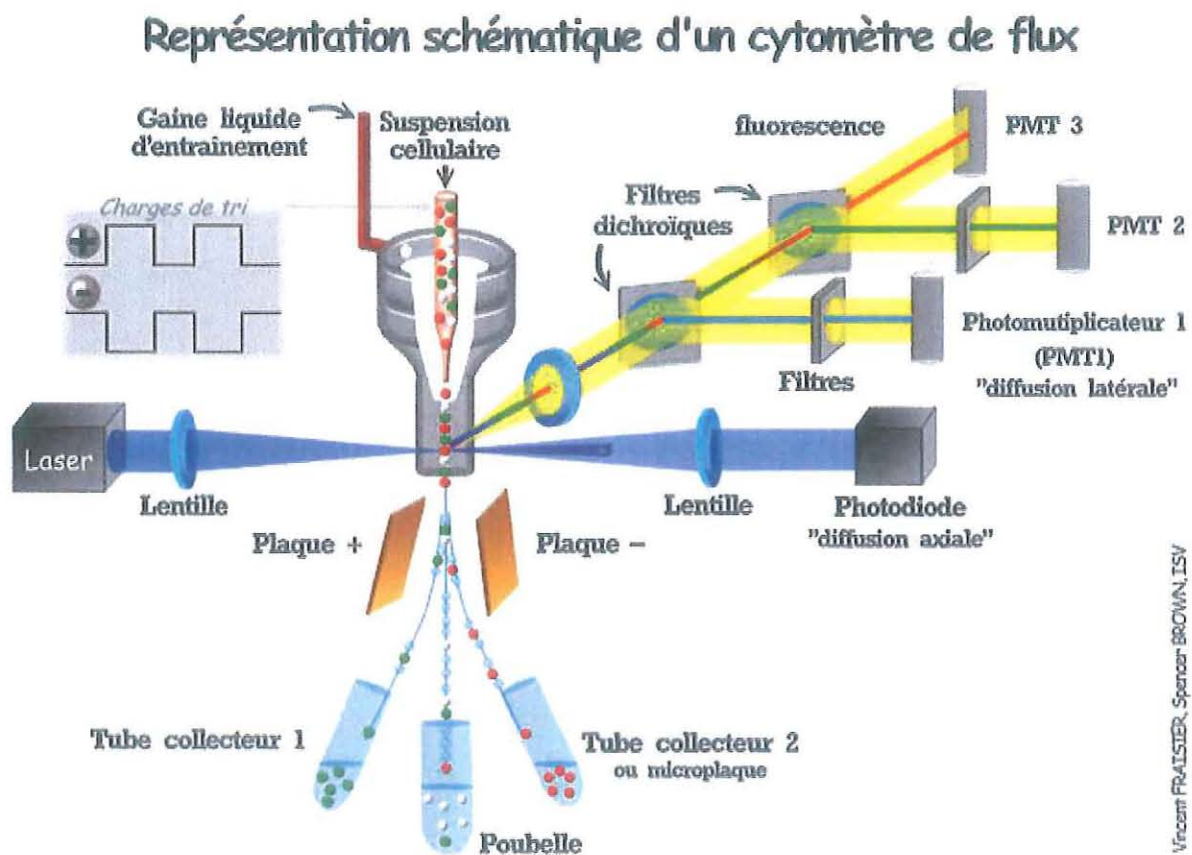


Figure 15 : Principe de la cytométrie de flux :

(<http://www.ifr87.cnrs-gif.fr/platefor/imagerie/outils/cmfc/cmfc.html>)

C) HISTORIQUE :

Cette technique est née du besoin d'automatiser le comptage des constituants cellulaires du sang. C'est en 1934 que Moldovan conçut le 1^{er} appareil qui réalisait des numérotations cellulaires en faisant défiler des cellules dans un fin capillaire où elles étaient

vues par un capteur photo électrique. Puis, en 1949, W.Coulter a mis au point un appareil qui associait la numérotation des cellules et la mesure de la taille par la variation de résistivité du courant liquidien.

Au cours des 35 dernières années, de nombreux progrès techniques (*évolution de l'informatique, utilisation du laser comme source lumineuse, ...*) ont conduit à la mise au point de méthodes de plus en plus fines pour analyser des populations de constituants hétérogènes.

B) PRINCIPE :

Le principe réside en la mesure de cellules défilant rapidement dans un flux liquidien devant une source lumineuse. Prenons l'exemple de l'analyse de cellules sanguines pour comprendre le principe de la cytométrie en flux. Les cellules sanguines regroupent des populations de cellules nucléées de grandes tailles comme les polynucléaires (12 à 15 μm) et les monocytes (15 à 20 μm) et des cellules de petites tailles comme les lymphocytes (6 à 12 μm) aisément différenciable des hématies qui sont de petites cellules anucléées. Leur analyse et leur numération au microscope sont longues et laborieuses et la cytométrie permet de plus une analyse plus performante.

Un cytomètre est constitué de trois systèmes :

- Fluidique
- Optique
- Électronique et informatique

a) LE SYSTEME FLUIDIQUE :

Le système fluidique permet d'entraîner la suspension cellulaire à l'intérieur d'une chambre d'analyse ou buse. Le tube échantillon contenant la suspension cellulaire à analyser est mis en place, la suspension progresse dans la tubulure jusqu'à la buse. Suivant le principe d'hydrofocalisation, le flux contenant la suspension cellulaire est entraîné passivement dans un second flux appelé liquide de gaine. Les deux flux sous pression arrivent alors conjointement dans la buse et entraînent les cellules vers la source lumineuse focalisée au point d'impact devant laquelle celles-ci défilent une à une à grande vitesse. En fin de

parcours, la suspension cellulaire peut être triée et récupérée, ou évacuée vers un flacon de collection des déchets. (Voir figure 15).

b) LE SYSTEME OPTIQUE :

Le système optique est constitué de la source lumineuse et d'un jeu de filtres et de miroirs faisant cheminer la lumière émise par les cellules jusqu'à des photodétecteurs convertissant l'information lumineuse en un signal électrique.

Le laser est la source lumineuse utilisée sur les cytomètres pour ses propriétés de puissance, stabilité, focalisation et surtout son monochromatisme. Le faisceau lumineux interagit avec la cellule et une partie du rayonnement est dévié.

La lumière diffusée, de même longueur d'onde que celle de la lumière excitatrice est recueillie dans deux directions :

- suivant un même axe que le rayon laser qui renseigne sur la taille relative de la cellule
- un rayon à 90° par rapport au faisceau laser qui renseigne sur la structure interne de la cellule (noyau, granulosité...)

Une cellule de petite taille diffuse moins de lumière qu'une cellule de grande taille. Des filtres et des miroirs orientent la lumière vers les différents photodétecteurs. Chaque détecteur ou photomultiplicateur, spécifique d'un intervalle de longueur d'onde, transforme la lumière émise en une impulsion électrique dont l'intensité est proportionnelle à l'énergie lumineuse. (voir figure 15).

c) ELECTRONIQUE ET INFORMATIQUE :

Le signal recueilli par chaque détecteur est envoyé au système informatique qui numérise, stock et traite les données. L'axe des abscisses représente l'intensité du signal numérique. L'axe des ordonnées donne le nombre d'évènements comptabilisés par le canal d'intensité.

L'analyse de la ploïdie des larves d'huîtres se fait grâce aux différences d'intensité lumineuse de l'ADN dû à sa coloration par le DAPI (voir figure 16). En effet, moins l'individu comprend de chromosomes, et donc d'ADN, et moins l'intensité lumineuse est

importante. C'est grâce à la fluorescence associée à l'ADN que l'on peut analyser les différents niveaux de ploïdie par la cytométrie en flux. Ceci s'explique par le fait que nous avons rendu l'ADN des cellules détectable par un fluorochrome (*substance chimique capable d'absorber l'énergie photonique d'une source lumineuse incidente de longueur d'onde donnée, et d'émettre un rayonnement de longueur d'onde supérieure*).

Chaque signal optique est envoyé vers l'ordinateur à l'aide de miroirs dichroïques 488 qui réfléchissent la lumière de longueur d'onde inférieur ou égal à 488nm vers le premier détecteur, et transmet la lumière de longueur d'onde supérieur à 488nm vers un miroir dichroïque 550. L'aiguillage effectué, le signal lumineux transmis par les différents miroirs dichroïques doit encore être filtré avec, par exemple, des filtres « passe bande » 488, 550 ou 675. (Voir figure 15).

d) LES REGLAGES :

Avant toute analyse d'un échantillon dans le cytomètre, il faut effectuer différents réglages et vérifications.

Tous d'abord, il est nécessaire de vérifier l'alignement du cytomètre à l'aide de l'étalon interne : les billes de latex colorées. L'alignement doit être optimisé : cela consiste à positionner au mieux le point de rencontre du laser et de la buse afin d'obtenir le maximum de lumière diffusée émise.

Les photomultiplicateurs doivent également être réglés de façon à ce que les forts signaux ne saturent pas l'échelle de détection et que les faibles signaux soit détectable.

Il faut aussi régler les compensations de fluorescence, en effet plusieurs fluorochromes peuvent être utilisés en même temps et donc se chevaucher. Il est donc indispensable d'éliminer ces émissions contaminantes.

c) UTILISATION :

Dans notre cas, la cytométrie en flux est utilisée afin de déterminer la ploïdie des larves obtenues après fécondation lors de l'expérience de compétition gamétique, déterminant ainsi la proportion d'ovocytes 2n et 4n fécondés par les spermatozoïdes 4n et 2n. En effet, les ovocytes fécondés par les gamètes 2n et 4n donneront des larves de ploïdie différentes et seront ainsi séparées en trois pics après analyse par le cytomètre.

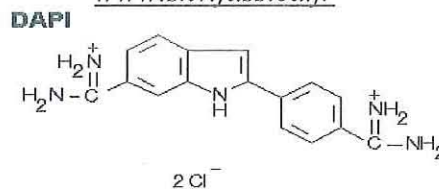
On observera un pic correspondant aux individus triploïdes qui proviennent d'une fécondation entre gamètes 2n et 4n, un pic d'individus diploïdes correspondant à la fécondation de deux gamètes 2n et un pic d'individus tétraploïdes correspondant à la fécondation entre deux gamètes 4n.

D) PRESENTATION DU DAPI, UTILISE LORS DE NOS ANALYSES :

Les colorants fluorescents en bleu sont nombreux. L'exemple choisi est celui du DAPI (*Di Aminido Phenyl Indol*), qui est un colorant utilisé en cytochimie et qui est spécifique de l'ADN.

Eclairé en lumière violette (*max 372nm*), il émet une fluorescence bleue (*max 456nm*). (voir figure 6)

Figure 16 : formule chimique du DAPI
www.snv.jussieu.fr



Un fluorochrome est caractérisé par deux spectres : le spectre d'absorption (de la lumière incidente) et le spectre d'émission de fluorescence.

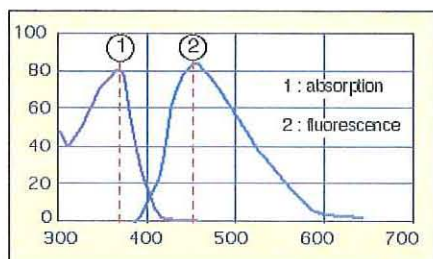


Figure 17 : courbes des spectres d'émission et d'absorption du DAPI (www.snv.jussieu.fr)

Comme on le voit, le DAPI absorbe les radiations violettes (*max 372nm*) et restitue une fluorescence bleue (*max 456nm*).

I/ INTRODUCTION :

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dite « huître japonaise » est l'espèce d'huître majoritairement produite et consommée dans le monde. Cependant, la production ostréicole Française peut être considérée comme « extensive ». Elle repose en effet sur l'exploitation des sites côtiers (*les estrans*) où les huîtres croissent et se reproduisent dans le milieu naturel. Le travail de l'ostréiculteur consiste en la récolte de juvéniles issus de reproduction spontanée et de leur élevage, sans apport alimentaire ni traitements sanitaire. L'huître est donc l'une des rares espèces cultivée à être encore considérée par le consommateur comme un produit alimentaire totalement « naturel ». Ainsi, la récolte annuelle des jeunes huîtres, appelé naissain, est à la base de l'ensemble de la production Française. L'ensemble des populations y est diploïde. La maîtrise de la reproduction de cette espèce ayant été acquise au début des années 1970, la production de naissain issu d'écloserie est venue compléter le naissain issu de captage naturel. Ceci a permis d'envisager une amélioration génétique de l'espèce dont une voie a été la triploïdisation.

L'obtention d'huîtres triploïdes (3N) se fait soit par obtention direct à partir d'huîtres diploïdes (2N), soit par le croisement de diploïdes avec des tétraploïdes (4N). Par la création des tétraploïdes (Guo et Allen, 1994), la production à grande échelle d'huîtres triploïdes est ainsi devenue plus facile. Par crainte des conséquences possibles d'un échappement dans le milieu naturel, les huîtres tétraploïdes étant fertiles au contraire des triploïdes, elles sont maintenues en conditions confinées.

Même si cette production ne représente aujourd'hui qu'une faible part du marché du naissain français, la demande s'intensifie. Cependant, ce produit ne fait pas l'unanimité dans le milieu ostréicole. De nombreuses questions se posent dans les rangs des ostréiculteurs mais aussi, plus récemment, des organisations de consommateurs. Les oppositions sont motivées par des craintes, ou des interrogations sur l'impact de ce produit issu des biotechnologies sur l'agro-système ostréicole.

Afin de pouvoir évaluer les risques de dissémination d'individus tétraploïdes, due aux gamètes, dans le milieu, nous avons effectué des expériences sur la viabilité comparée des gamètes 2N et 4N dans le temps, ainsi qu'une compétition gamétique entre les gamètes 2N et

4N. Pour connaître la ploïdie des larves issues de chaque croisement, nous avons utilisé la cytométrie en flux. Et, afin de suivre l'évolution du pouvoir fécondant dans le temps, nous avons observé les taux de fécondations par épifluorescence.

II/ EXPERIENCE PRELIMINAIRE : DECROISSANCE DU POUVOIR FECONDANT DES SPERMATOZOÏDES 2N AU COURS DU TEMPS :

Cette expérience préliminaire est effectuée dans le but de déterminer la durée et les plages de prélèvements qu'il faudra effectuer lors de l'étude de la viabilité comparée des gamètes mâles et femelles de géniteurs d'huîtres creuses tétraploïdes et diploïdes.

On va donc déterminer si les spermatozoïdes de géniteurs d'huîtres creuses diploïdes sont toujours féconds jusqu'à 24 heures après la récupération des gamètes, et si oui, de combien est le taux de fécondation et de même pour les ovocytes 2N et 4N mais seulement durant 6 heures.

1) MATERIELS ET METHODES :

A) LE SEXAGE :

Cette étape permet de connaître le nombre exact de géniteurs de chaque sexe dont nous disposons, d'éviter de choisir les rares animaux hermaphrodites simultanés, mais aussi de pouvoir réadapter le protocole en cas de manque et d'éviter le sacrifice inutile d'individus.

Le sexage se fait en anesthésiant les huîtres dans un bain de $MgCl_2$ composé de : 2 litres d'eau de mer + 3 litres d'eau douce + 250g de $MgCl_2$

On y ajoute du phytoplancton pour que les huîtres le filtrent et s'ouvrent. Ceci permet d'effectuer la biopsie. Une fois les huîtres anesthésiées, on prélève quelques gamètes dans la gonade à l'aide d'une seringue. On observe ensuite les gamètes au microscope afin de pouvoir déterminer le sexe de l'huître. On remet les huîtres dans de l'eau de mer pour qu'elles se réveillent.

B) LA FECONDATION IN VITRO :

On ouvre les huîtres sans abîmer les gonades et on vérifie à nouveau le sexe en prélevant à la pipette quelques gamètes. Ensuite, on scarifie les géniteurs pour obtenir le

maximum de gamètes. Puis, on filtre et on ajuste les ovocytes dans un volume de 400 ml et les spermatozoïdes dans 150 ml.

On effectue un comptage sur cellule de Thoma pour les spermatozoïdes et sur cellule de Malassez pour les ovocytes. Le comptage se fait à l'aide du logiciel de comptage SAMBA.

Ceci va nous permettre de mettre en présence 50 000 ovocytes avec 5 000 000 de spermatozoïdes à raison donc de 100 spz.ovo^{-1} dans un volume total de 600ml. Ce sont les conditions optimum de fécondation en éclosérie définies par le LGP.

C) COMPTAGE DES GAMETES ET VOLUME DE DISTRIBUTION :

Pour calculer le volume d'ovocytes à prélever, il a été effectué l'opération suivante : 50 000 divisé par la concentration en ovocytes donné par le logiciel Samba.

Et pour les spermatozoïdes, étant donné qu'ils ont été dilués au dixième pour le comptage, on a effectué l'opération suivante : 5 000 000 divisé par 10 fois la concentration en spermatozoïdes trouvée avec le logiciel Samba.

D) LES DIFFERENTS ECHANTILLONS :

➤Le pool de spermatozoïdes 2N prélevés à T0 est conservé à 23.5°C en présence de bullage. Le pool de mâles témoins est constitué de spermes « frais » à chaque fécondation. Il en est de même pour le pool des ovocytes.

Les fécondations ont été effectuées toutes les 6 heures durant 24 heures.

Ceci nous permet de connaître le taux de fécondation du départ est d'observer la décroissance de la fécondité des gamètes mâles dans le temps.

Dans le cas où un pool de femelles aurait des gamètes peu fécondantes, on l'observerait par la présence de nos trois répliquats de témoins.

Le tableau suivant présente les différents échantillons réalisés pour le vieillissement des spermatozoïdes:

	Pool de 3 femelles 2N T0		Pool de 3 femelles 2N T1								Pool de 3 femelles 2N T5		Pool de 3 femelles 2N T6	
pool de 3 mâles 2N T0	R1/ R3	R2/ R3	R1/ R3	R2/ R3							R1/ R3	R2/ R3	R1/ R3	R2/ R3
Pool de 3 mâles témoin 2N			t1/ t2/ t3								t1/ t2/ t3		t1/ t2/ t3	

➤ Pour les femelles, étant donné que le sperme peut se conserver à 4°C sans perdre de son pouvoir fécondant, on utilise toujours les mêmes spermatozoïdes mis au frais : nous n'avons donc pas besoin de témoins. Les ovocytes sont conservés à 18°C en présence de bullage. Les fécondations ont été effectuées toutes les heures durant 6 heures.

Le tableau suivant présente les différents échantillons réalisés pour le vieillissement des ovocytes à chaque fécondation (*toutes les heures*) :

mâle/ femelle	2N v	4N v	
2N frigo	R1/R2/R3	R1/R2/R3	2N v = ovocytes 2N vieillis à 18°C en présence de bullage
4N frigo	R1/R2/R3	R1/R2/R3	4N v = ovocytes 4N vieillis à 18°C en présence de bullage
			Frigo = conservation spermatozoïdes à 4°C

E) PREPARATION POUR L'OBSERVATION A L'EPIFLUORESCENCE :

a / Arrêt de la fécondation :

Au bout de 2 heures après la fécondation, on stoppe le développement en prélevant un millilitre (ml) des solutions R1, R2, R3 ... que l'on met dans 1ml de tampon GA avec du formol (*en deux réplicats lorsque le prélèvement est insuffisant : un minimum d'une centaine de cellules étant nécessaire à l'analyse*). Ceci permet de stopper le développement au stade de 4 cellules maximum et, de préparer la coloration au réactif de Hoeschst pour la mesure du taux de fécondation par épifluorescence.

Parallèlement, on conserve le reste de la solution (*dans le cas où il y aurait un problème avec le prélèvement fait pour l'analyse en épifluorescence*) en y ajoutant 500µl de formol, on laisse décanter les ovocytes pendant 1 heure et on les récupère dans des piluliers de 50 ml.

b / fixation et coloration des embryons :

Le colorant Hoeschst 33258 est réservé aux colorations in vitro. On le prépare en solution stock à 0,5mg.ml⁻¹.

Protocole :

🔍 On fixe les cellules pendant un minimum de 60 minutes dans le tampon GA + formol à 6% avec : un volume de tampon fixateur pour un volume de prélèvement.

☞ On enlève le tampon fixateur.

☞ On lave au tampon GA en ajoutant 1ml. On laisse pendant 30 minutes et on recommence ce lavage au tampon GA.

☞ On colore pendant 60 minutes en présence de tampon GA + Hoescht (0,5µl de solution stock pour 1ml de prélèvement).

☞ On refait 2 lavages de 30 minutes dans du tampon GA.

On peut ensuite observer au microscope à l'épi fluorescence.

Fabrication du tampon GA :

Produit	Molarité	g/l de sol
N-methylglucamine	250mM	48,8
K-gluconate	250mM	58,6
Hepes	50mM	13
EGTA	10mM	3,8

Il faut ensuite ajuster le pH à 7.4 avec de l'acide acétique glacial.

Fabrication du tampon de fixation (tampon GA + formol):

Exemple pour 500ml : il faut 79ml de formaldéhyde à 38% complété à 500ml avec du tampon GA.

F) TRAITEMENT STATISTIQUE :

Afin d'observer les variations du pouvoir fécondant des différents types de gamètes, nous avons effectué des tests d'égalités de moyennes : lorsque le test de Fischer annonçait des variances égales, nous avons utilisé le test de Student, et dans le cas inverse, un test non paramétrique, le test de Mann-Withney. Les résultats de ces test sont présentés à 5% dans les annexe 1,2 et 3 avec un code couleur.

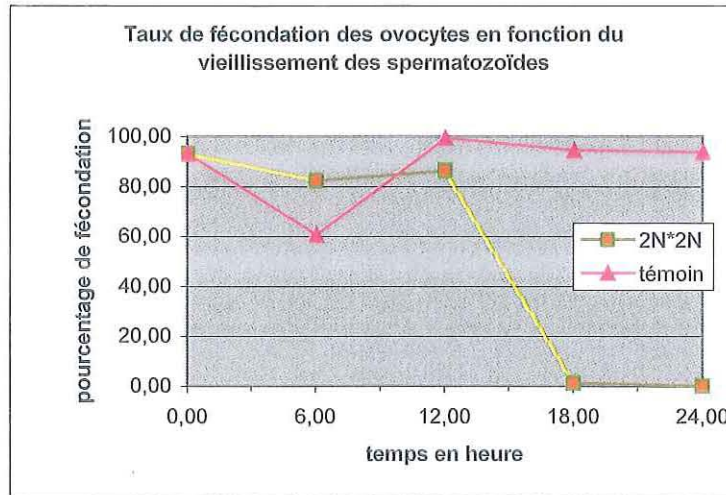
2) RESULTATS :

➤ Les résultats de l'expérience sur le vieillissement des spermatozoïdes nous montrent une zone durant les 12 premières heures où le taux de fécondation ne varie pas significativement passant de 93% à 82,33% puis 86,33%. On y observe aussi que la perte du pouvoir fécondant des spermatozoïdes se fait de façon très significative et quasiment

totalément entre 12 et 18 heures passant de 86,33% à 1,33% (les résultats des test statistiques se trouvent en annexe 1).

On observe que le pouvoir fécondant des spermatozoïdes disparaît complètement au bout de 24 heures.

◆ Graphique 1 : représente le taux de fécondation des spermatozoïdes vieillissant d'huitres 2N jusqu'à 24 heures après prélèvement.



Les Traits en jaune indiquent un écart significatif, selon les tests statistiques, entre les deux moyennes concernées.

➤ Les résultats de l'expérience sur le vieillissement des ovocytes sont présentés sur 4 graphiques, sur la page de gauche (les traitements statistiques sont en annexe 1).

On observe une légère hausse du pouvoir fécondant au bout d'une heure mais qui n'est pas significative pour tous les croisements : de 60,33% à 80% pour 2N*2N, de 35,33 à 60% pour 2N*4N, de 56% à 70,33% pour 4N*2N et de 31% à 45,67% pour 4N*4N.

Durant ces 6 heures, on ne voit pas de variation significative du pouvoir fécondant des ovocytes 2N et 4N.

Lorsque les ovocytes 2N et 4N sont fécondés par les spermatozoïdes 2N, on n'observe pas de différence significative entre les taux de fécondations initiaux : respectivement 60,33% et 56%. On observe une plus forte fécondation des ovocytes 2N avec les spermatozoïdes 2N qu'avec tous les croisements effectués avec du sperme de 4N : respectivement 60,33% et 35,33% et 31%.

3) DISCUSSION :

➤ On observe sur ce pool de spermatozoïdes une disparition du pouvoir fécondant entre 12 et 18 heures après scarification. Ceci est relativement faible car il avait été montré précédemment par le LGP que les spermatozoïdes étaient encore féconds au bout de 24 heures.

Ceci peut s'expliquer par la température de conservation des spermatozoïdes qui était de 18 à 20°C lors de la conservation, pendant plus de 24 heures, alors que, lors de cette expérience préliminaire elle était de 23.5°C, favorisant ainsi le développement de bactéries dans notre milieu de conservation et diminuant le temps de vie des spermatozoïdes.

➤ Nous avons pu constater que la durée de vie des ovocytes est supérieure à 6 heures et que par conséquent, nous ne sommes pas allés assez loin dans cette expérience. Nous avons observé une différence du taux de fécondation des ovocytes 2N selon que la fécondation est effectuée avec des spermatozoïdes 2N ou 4N et ceci, en faveur des 2N. De plus, il semblerait que les spermatozoïdes 2N offrent un taux de fécondation équivalent avec les ovocytes 2N et 4N.

4) CONCLUSION :

Nous avons donc décidé de mettre en marche la climatisation à 18°C dans le laboratoire. Ceci, afin de faire l'étude de la viabilité comparée des gamètes 2N et 4N de *C. gigas* ainsi que l'étude de la compétition gamétique. Nous espérons que l'expérience durera plus longtemps pour les spermatozoïdes. Nous avons décidé, de plus, de prolonger le temps de vieillissement des ovocytes jusqu'à un minimum de 24 heures avec des fécondations un peu plus espacées.

III/ VIABILITE COMPAREE DES GAMETES 2N ET 4N AU COURS DU TEMPS ET COMPETITION GAMETIQUE DE GENITEURS D'HUITRES CREUSES (C.GIGAS) :

1/ MATERIELS ET METHODES :

Le sexage, le comptage des gamètes, la fécondation in vitro, l'arrêt du développement des larves, le prélèvement et la lecture en épifluorescence et le traitement statistique des

données se font de la même façon que pour l'expérience préliminaire. A cela s'ajoute l'ouverture d'huîtres 4N et les pools sont constitués de deux individus.

A/ LA CYTOMETRIE EN FLUX :

L'analyse par cytométrie en flux ne s'effectue que pour la compétition gamétique où nous avons laissé les larves se développer durant 24 heures. Il faut tout d'abord prélever une centaine de larves de la solution, dans 1 ml, à l'aide d'un filtre, pour une récupération plus facile. On y ajoute 500µl de tampon et de billes (*le témoin interne*).

On broie afin de casser les coquilles, et on filtre sur 30µm pour éliminer les gros débris. Enfin, on rince avec du tampon : d'abord avec 0.25 ml puis avec 0.5ml.

On laisse à l'obscurité pendant 30 minutes et on analyse les échantillons avec le cytomètre.

B/ LA PREPARATION DU TAMPON :

	pour 100ml de tampon
MgCl ₂ / 6H ₂ O	0,107g
NaCl	0,5g
Tnzmabase	1,211g
DAPI solution	1 ml
Triton * 100	0,1ml = 0,0939g
H ₂ O bidistillée	100 ml

On ajuste le pH avec HCl à 7.0 et il se conserve à 4°C pendant 1 mois. On y ajoute le témoin interne, les billes :
une goutte de solution de billes dans 14 ml de tampon que l'on conserve à 4°C pendant 15 jours.

La préparation de la solution de DAPI se fait de la façon suivante : on prélève 1mg de DAPI sigma D9548 que l'on met dans 10ml d'H₂O, elle se conserve à -20°C dans l'obscurité.

C/ LES DIFFERENTS PLANS DE CROISEMENTS :

a) LE VIEILLISSEMENT DES OVOCYTES :

Les fécondations ont été effectuées à T0, puis 1 heure après (T1) et ensuite, dû à un manque d'ovocytes 4N, le protocole a été réadapté. Pour les 2N, les fécondations ont eu lieu toutes les 3 heures durant 28 heures à partir de T1, ainsi qu'une fécondation au bout de 43 heures. Pour les 4N, les fécondations ont été faites à 1heure puis à 7 et 13 heures.

Les ovocytes sont restés à 18°C en présence de bullage tandis que les spermatozoïdes ont été conservés à 4°C (*pas de diminution du pouvoir fécondant sur 48 heures à 4°C*).

Le tableau suivant présente le plan de croisement :

mâle/ femelle	2N v	4N v
2N frigo	R1/R2/R3	R1/R2/R3
4N frigo	R1/R2/R3	R1/R2/R3

2N v = ovocytes 2N qui ont vieilli à 18°C en présence de bullage
 4N v = ovocytes 4N qui ont vieilli à 18°C en présence de bullage
 Frigo = conservation des spermatozoïdes à 4°C

b) LE VIEILLISSEMENT DES SPERMATOZOÏDES :

Les fécondations ont été effectuées, en 3 réplicats, toutes les 6 heures durant 30 heures puis, il y a eu une fécondation au bout de 46 heures (*M0, ...M6*) de vieillissement des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes ont été conservés à 18°C en présence de bullage et les ovocytes ont été prélevés sur de nouvelles femelles. Il a donc été effectué des fécondations témoins dès 6 heures de vieillissement afin de vérifier la qualité des nouveaux ovocytes.

Le tableau suivant présente le plan de croisement M0.

mâle/ femelle	2N fraîches	4N fraîches
2N v	R1/R2/R3	R1/R2/R3
4N v	R1/R2/R3	R1/R2/R3

Le tableau suivant présente les plans de croisements M1, ..., M6.

mâle/ femelle	2N fraîches	4N fraîches
2N v	R1/R2/R3	R1/R2/R3
4N v	R1/R2/R3	R1/R2/R3
2N frais	T1/T2/T3	T1/T2/T3
4N frais	T1/T2/T3	T1/T2/T3

c) LA COMPETITION GAMETIQUE :

Les fécondations ont été effectuées à la même heure, avec les mêmes individus en deux réplicats. Lorsque nous avons introduit des gamètes 2N et 4N du même sexe dans le même bûcher, nous avons mis ½ de 2N et ½ de 4N, soit 25 000 ovocytes de chaque ou 2 500 000 spermatozoïdes de chaque. Nous avons laissé les larves se développer pendant 24 heures, il n'y a pas eu introduction de formol.

Le tableau suivant présente le plan de croisement :

Mâle/femelle	2N	2N + 4N	4N
2N	R1 et R2	R1 et R2	R1 et R2
2N + 4N	R1 et R2	R1 et R2	R1 et R2
4N	R1 et R2	R1 et R2	R1 et R2

2/ RESULTATS :

A/ VIEILLISSEMENT DES OVOCYTES :

Les résultats de l'expérience sur le vieillissement des ovocytes sont présentés sur 4 graphiques, sur la page de gauche (*les traitements statistiques sont en annexe 2*).

On observe une légère tendance à la hausse durant les 4 premières heures pour les ovocytes 2N (*graphiques 6 et 7*) : de 65,67% à 85,33% pour 2N*2N et de 53,33% à 70% pour 2N*4N d'ovocytes fécondés. Cependant, on ne voit pas de différences significatives du taux de fécondation durant les 16 premières heures. On peut donc assimiler ces 16 heures à un palier avec une chute importante (*de 70,33% à 31% pour 2N*2N et de 86% à 43,67% pour 2N*4N*) du pouvoir fécondant entre 16 et 18 heures, donnant lieu à un deuxième palier entre 18 et 25 heures. Puis, deux autres chutes de 25 à 28 et de 28 à 43 heures. On observe ceci sur les deux croisements avec des ovocytes 2N qu'ils soient fécondés par des spermatozoïdes 2N ou 4N.

Les ovocytes 2N sont encore fécondants jusqu'à 43 heures avec 0,67% pour le croisement 2N*4N et ne le sont plus pour 2N*2N. Les ovocytes 4N ont, quant à eux, un taux de fécondation très faible et proche de 0 dès 13 heures : respectivement 5% et 1,33% pour les croisements 4N*2N et 4N*4N.

Les graphiques 8 et 9 montrent que le pouvoir fécondant des ovocytes 4N augmente significativement au bout d'une heure : de 8,33% à 43,33% pour le croisement 4N*2N et de 26,67% à 57% pour le croisement 4N*4N. Puis, il diminue vite dès 1 heure jusqu'à 13 heures.

Les tests statistiques nous permettent de dire que les ovocytes 2N ont un taux de fécondation initial significativement supérieur au 4N et que les ovocytes 4N sont plus fécondants lors de croisements avec des spermatozoïdes 4N qu'avec des 2N.

B/ VIEILLISSEMENT DES SPERMATOZOÏDES :

Les résultats de l'expérience sur le vieillissement des spermatozoïdes sont présentés sur 4 graphiques, sur la page de gauche (*les traitements statistiques sont en annexe 3*).

Les test statistiques nous permettent de dire que la décroissance du pouvoir fécondant des spermatozoïdes est bien due, dans la plupart des cas, au vieillissement de ces derniers. En effet, les taux de fécondation témoin nous le montrent, sauf dans le croisement 4N*2N à 12 et à 24 heures. Pour corriger l'erreur et donner une approximation du taux auquel on pourrait s'attendre, nous avons estimé que le taux de fécondation de ce témoin, 17,33%, était égal à 100%, permettant alors de donner celui du réplicat à 15,41%, ce qui est sans doute plus proche de la réalité.

Les graphiques 10 et 11 nous permettent d'observer la décroissance du pouvoir de fécondation des spermatozoïdes 2N : de 65,67% en taux de fécondation initial jusqu'à 2% au bout de 46 heures de vieillissement et de 53,67% à 0% au bout de 24 heures (*respectivement pour les croisements 2N*2N et 4N*2N*).

Cependant, on observe aussi la présence d'un mauvais pool témoin à 24 heures. On ne peut donc pas savoir si le taux de 0% sur le croisement 4N*2N est dû aux vieillissement des spermatozoïdes, ou à la mauvaise qualité des gamètes femelles avec lesquels ils ont été croisés. Car, dans ce cas présent la méthode d'estimation utilisée dans le mauvais pool de 12 heures n'est pas applicable.

Parallèlement, on constate que le taux initial de fécondation des spermatozoïdes 2N est plus élevé (65,67% et 53,67%) que celui des 4N (19,67% et 39%). De plus, les spermatozoïdes 4N sont significativement plus féconds avec les ovocytes 4N (39%) qu'avec les 2N (19,67%), ce qui n'est pas le cas des spermatozoïdes 2N.

Enfin, on observe que la durée de vie des spermatozoïdes 4N (*dés 6 heures de vieillissement, il ne reste respectivement que 1% et 1.33% de fécondation pour atteindre 0% à 12 heures*) est moins élevé que celle des 2N (*jusqu'à 24 et 46 heures*).

C/ COMPETITION GAMETIQUES (RESULTATS CYTOMETRE EN ANNEXE 4) :

Les 2 graphiques, sur la page de gauche, présentent les différents pourcentages d'individus 2N, 3N et 4N obtenus, après analyse des échantillons en cytométrie en flux, lors des différents croisements de la compétition gamétique, et en comparaison avec les résultats attendus :

Comme attendu, les témoins 2N*2N donnent 100% de 2N, 2N*4N et 4N*2N donnent 100% de 3N et 4N*4N donnent 100% de 4N.

Cependant, les croisements où il a été mis en compétition des spermatozoïdes 2N et 4N ne donnent pas les résultats attendus : respectivement 74% au lieu de 50% de 2N (*f2N*M2N et 4N*), 90,5% au lieu de 33,33% de 2N (*f2N et 4N*M2N et 4N*) et 84,5% au lieu de 50% de 3N (*f4N*M2N et 4N*), c'est à dire une majorité de fécondation par le sperme 2N.

De même, les croisements où il a été introduit des femelles 2N et 4N ne donnent pas les résultats attendus : respectivement 13,5% au lieu de 50% de 2N (*F2N et 4N*M2N*), 25% au lieu de 50% de 3N (*F2N et 4N*M4N*) et, paradoxalement de 90,5% au lieu de 33,33% de 2N (*F2N et 4N*M2N et 4N*). Ce qui nous permet de dire qu'il y a une plus forte fécondité des ovocytes 4N sur les deux premiers croisements et des ovocytes 2N pour le dernier croisement.

3/ DISCUSSION :

A/ VIEILLISSEMENT DES OVOCYTES :

Pour l'expérience portant sur le vieillissement des ovocytes, les fécondations n'ont pas été effectuées dans les mêmes intervalles de temps, ceci est dû à un manque d'ovocytes 4N. En effet, ces dernières ayant pondu la veille de la scarification, il n'a pu être récupéré qu'une faible quantité d'ovocytes.

A la suite de ces expériences, nous avons observé une augmentation significative du pouvoir fécondant des ovocytes 4N au bout d'une heure, comme cela avait été observé lors de l'expérience préliminaire. On peut supposer que ce temps correspond au temps nécessaire à l'activation des ovocytes. En effet, lorsque les ovocytes sortent de la gonade, ils ont une forme de poire et leurs chromosomes sont dispersés dans la cellule. Au contact de l'eau de mer, l'ADN se regroupe et l'ovocyte s'arrondie (*voir annexe 5*). On peut donc supposer que le taux de fécondation est plus important lorsque cette activation a eu lieu, soit environ 1 heure après la scarification. Cette augmentation n'est malheureusement pas observable avec certitude chez les ovocytes 2N. Ceci a sans doute pour origine les temps de scarification. En effet, les 2N ont été scarifiées en premiers et ont donc été en contact dans l'eau de mer avant les 4N. La différence de temps est d'autant plus grande que le manque d'ovocytes observé a conduit à reprendre des géniteurs trois fois, obligeant ainsi à rouvrir des individus, recompter les gamètes et retourner en chercher jusqu'à épuisement du stock.

De plus, il est clairement montré que le pouvoir de fécondation des ovocytes 4N diminue plus vite que celui des 2N (*respectivement 13 et 43 heures*).

Parallèlement, le taux maximum de fécondation des ovocytes 4N est nettement inférieur à celui des 2N : de 43,33% contre 85,33% avec les spermatozoïdes 2N et de 57% contre 86% avec les spermatozoïdes 4N.

Au niveau des ovocytes 2N, on observe deux paliers dans le suivi du pouvoir fécondant : le premier dure les 16 premières heures et le deuxième de 19 heures à 25 heures. Ceci peut être dû aux différentes qualités de gamètes venant de différents individus. On peut penser qu'au bout de 16 heures les ovocytes de certains individus ne sont plus fécondant tandis que ceux d'autres individus le restent, il en est peut-être de même à 25 heures. Ceci n'est pas observable chez les 4N car les temps entre les fécondations sont plus éloignés et sont effectués sur une durée moins longue, dû au manque d'ovocytes 4N. De plus, la décroissance de fécondité observée est beaucoup plus rapide.

Il serait donc intéressant de refaire cette expérience en utilisant une femelle par croisement afin de voir si les ovocytes perdent de leur pouvoir fécondant progressivement, ou subitement, et afin d'observer la diversité de qualité des gamètes.

B/ VIEILLISSEMENT DES SPERMATOZOÏDES :

On peut suivre l'évolution du pouvoir fécondant des spermatozoïdes 2N au cours du temps à l'aide de deux croisements : l'un avec les ovocytes 2N ($2N*2N$) et l'autre, avec les ovocytes 4N ($4N*2N$).

A l'aide du graphique 10, on observe la décroissance du pouvoir fécondant des spermatozoïdes 2N au cours du temps de 65,67% à M0 à 2% à M6 (*46 heures*) avec cependant une forte perte durant les 12 premières heures (*de 65,67% à 9,33%*).

Le graphique 11 montre que le taux de fécondation des spermatozoïdes 2N avec les ovocytes 2N n'est pas significativement supérieur de celui obtenu les ovocytes 4N, respectivement 65,67% et 53,67%. De plus, la perte totale du pouvoir fécondant des spermatozoïdes 2N avec les ovocytes 4N est plus rapide (*24 heures, au lieu de 46 heures pour les 2N*).

Le pic observé à 18 heures sur le croisement $4N*2N$ est expliqué par la présence d'un mauvais pool témoin à 12 heures montré par les statistiques. Le point approximatif montre

qu'il n'y a pas de pic donc pas d'augmentation du pouvoir fécondant mais une diminution non significative de celui-ci.

On prend donc en compte la donnée approximative à 12 heures de ce croisement et on conclut que le pouvoir fécondant des spermatozoïdes 2N décroît de façon importante durant les 12 premières heures et plus doucement ensuite pour finir par être nul au bout de 24 et 43 heures selon le croisement. Cependant, à 24 heures, on ne sait pas si le taux de fécondation trouvé est due au temps ou au témoin et de plus il y a une donnée manquante à 30 heures.

L'évolution du pouvoir fécondant des spermatozoïdes 4N est observée à l'aide de deux croisements : un avec des ovocytes diploïdes ($2N*4N$) et un avec des ovocytes tétraploïdes ($4N*4N$). Les graphiques 12 et 13 montrent que les spermatozoïdes 4N perdent la totalité de leur pouvoir fécondant au bout de 12 heures avec un maximum de perte durant les 6 premières heures : de 39% à 1,33% pour $4N*4N$ et de 19,67% à 1% pour $2N*4N$. On peut voir de plus que le taux de fécondation des spermatozoïdes 4N en présence d'ovocytes 4N est plus élevé qu'avec les 2N (*respectivement 39% et 19,67%*).

On peut donc dire que les spermatozoïdes 4N sont moins féconds que les 2N (*65,67% à 53,67% pour 2N contre 39% à 19,67% pour 4N*), et moins viables dans le temps (*24 à 46 heures pour 2N contre 12 heures pour 4N*).

Lors de l'expérience préliminaire, nous avons observé que les spermatozoïdes 2N n'étaient plus féconds au bout de 18 heures et que leur pouvoir fécondant se maintenait durant les 12 premières heures. On suppose alors que la température de conservation (*18°C ici et 23,5°C lors de la prémanipulation*) joue un rôle important : une plus faible température augmente la conservation des gamètes et de leur pouvoir fécondant. De plus, il faut prendre en compte le fait que chaque individu possède un sperme de qualité différente.

C/ COMPETITION GAMETIQUE :

a) OBSERVATIONS 2005 :

Pour cette expérience, il manque des réplicats de fécondation et des réplicats d'analyse en cytométrie. En effet, nous n'avons pas pu effectuer davantage de réplicats de fécondation. De même, à cause d'un manque de larves dans les milieux, nous n'avons pu

effectuer qu'un seul réplicat de chaque bêcher en analyse au cytomètre. Du fait de ce manque de données, les traitements statistiques de comparaison de moyennes observées par rapport à l'attendu n'ont pu être effectuées.

Le graphique 14 montre que lorsqu'il y a un mélange de spermatozoïdes diploïdes et tétraploïdes dans le milieu ce sont les 2N qui fécondent les ovocytes en grande majorité : 74% sur le croisement avec des ovocytes 2N, un minimum de 90,5% sur le croisement avec des ovocytes 2N et 4N, et 84,5% avec des ovocytes 4N.

En compétition gamétique, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes 2N est plus important que celui des 4N. On peut émettre l'hypothèse que la motilité des spermatozoïdes et leur taille jouent un rôle sur leur pouvoir fécondant. En effet les spermatozoïdes 4N sont dit moins motiles et plus gros que les 2N (Qiaoxiang Dong *et al*, 2005).

Au niveau de la compétition gamétique des ovocytes, il est difficile de tirer des conclusions cette année. En effet sur les croisements avec les mâles 2N ou avec les mâles 4N, ce sont à chaque fois les ovocytes 4N qui ont été choisis à 86,5% et 75% respectivement. Cependant, sur le croisement avec les spermatozoïdes 2N et 4N, ce sont à 90,5% au minimum que les ovocytes 2N ont été choisis.

b) COMPARAISON 2004(RESULTATS EN ANNEXE 6)/2005 :

En 2004, il n'avait pas été observé de grandes différences entre les pouvoirs fécondants des spermatozoïdes 2N et 4N, avec tout de même un léger avantage pour les 2N(S. Lapègue *et al*). On peut donc en conclure, d'après les résultats 2004 et 2005, que les spermatozoïdes 4N sont au mieux de qualité semblable aux 2N, mais ne possèdent pas un pouvoir fécondant supérieur à ces derniers.

Au niveau des ovocytes, la qualité des gamètes en 2004 avait joué un rôle très important. Etant donné que les 4N étaient de mauvaise qualité, le taux de fécondation de ces gamètes fût très faible. Cette année, au vu de la qualité des ovocytes 2N et 4N (*relativement équivalente*), on peut donc supposer que nos résultats sont plus fiables que ceux de 2004. On suppose que lorsque la maturation des ovocytes est effectuée de façon optimum, les chances de fécondation d'un ovocyte 2N ou 4N, par un spermatozoïde, sont les mêmes. Mais il reste difficile de tirer des conclusions sur les ovocytes car il y a un manque de données.

Il serait donc intéressant de refaire cette expérience en augmentant le nombre de réplicats de fécondation, et le nombre d'analyses en cytométrie en flux de chaque réplicat. Ceci, afin de pouvoir tirer des conclusions basées sur des faits reproductibles. De plus, les pools de gamètes en 2005 ont été effectués avec seulement 2 individus (*manque de géniteurs*), ce qui est faible pour avoir une bonne estimation de ce qui se passe dans le milieu naturel. Afin d'éviter la présence de mauvais pools 2N ou 4N, il faudrait donc utiliser plus d'animaux pour ce type d'expérience.

4/ CONCLUSION :

D'une part, les résultats de l'expérience sur le vieillissement des gamètes est à relativiser, car il ne faut pas oublier que la qualité des gamètes est fonction des individus. Afin d'avoir des données moyennes sur la durée minimale et maximale de viabilité des gamètes d'huîtres dans le temps, il faudrait reconduire ces expériences avec un individu par croisement. Ceci permettrait alors, de savoir si la diminution du pouvoir fécondant des gamètes est progressive ou instantanée.

D'autre part, dans le but d'éliminer tous les problèmes liés à la maturité des gamètes, on pourrait refaire ces expériences en attendant la ponte naturelle d'individus de même génération, et en les faisant murer dans les mêmes conditions (*nourriture, température, âge...*). Ceci favoriserait ainsi la qualité et l'égalité de leur maturation. Cependant, étant donné que les pontes n'ont lieu qu'en présence d'individus de chaque sexe, il est difficile de ne récupérer que des ovocytes ou que des spermatozoïdes. De plus, les individus tétraploïdes devant être conservés dans un milieu confiné, il n'est pas possible de les mettre dans les mêmes bacs de maturation que des diploïdes.

A la suite de ces expériences, on a pu observer que les gamètes d'individus tétraploïdes sont moins viables dans le temps que ceux de diploïdes mais ne sont pas, de façon indiscutable, moins performants que ces derniers. On peut en conclure qu'au temps zéro, les gamètes de tétraploïdes sont, au maximum, aussi fécondantes que ceux des diploïdes mais pas supérieurs à ceux-ci. On observe de plus que le pouvoir de fécondation des ovocytes augmente au bout d'une heure (*au minimum*) de contact avec l'eau de mer ; ce que l'on attribue au temps nécessaire à leur activation dans le cas d'une scarification. Il faudrait donc examiner les résultats dans le cas d'une ponte naturelle.

Afin d'avoir davantage de données sur la compétition gamétique dans le temps, on pourrait penser à tester cette compétition, en utilisant des gamètes de qualité relativement équivalente avec un grand nombre d'individus par pool (*élimination des mauvais individus*). Ceci nous permettrait de mieux nous rapprocher de ce qui pourrait se passer dans le milieu, dans le cas d'une dissémination de gamètes de tétraploïdes. Il serait intéressant aussi, de poursuivre cet élevage plus de 24 heures, afin de voir la viabilité des larves de ploïdie différentes, en fonction des parents et du temps de vieillissement des gamètes.

IV/ CONCLUSION :

A la suite de ces différentes expériences, on peut donc observer que lorsque les gamètes 4N ont subi une bonne maturation, ils sont, au mieux, de qualité égale aux 2N mais restent, dans la majorité des cas, moins compétitifs.

Dans le cas où des individus tétraploïdes s'échapperaient dans le milieu naturel, on peut estimer que les risques de leur propagation restent très faibles étant donné la masse de diploïdes existant dans ce milieu. La probabilité que ces gamètes 4N se fécondent entre eux est très faible. On verrait peut-être apparaître quelques individus 3N stériles ne pouvant donc pas être source de dissémination de tétraploïdes.

De plus, dans le cas où des gamètes 4N seraient émis dans le milieu naturel, il faudrait une fécondation rapide de ces derniers, ceux-ci ayant une vie beaucoup plus courte que les 2N, leur chance d'être fécondés en serait d'autant plus réduite.

Afin d'approfondir cette étude, il reste à tester la viabilité des larves que nous avons obtenues en compétition gamétique. Car, il reste à étudier les différentes compétitivités des individus ayant un parent 4N par rapport à ceux issus de deux parents 2N, dans le milieu naturel.

BIBLIOGRAPHIE

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Microscopie/fluo/fluobleue.htm>

<http://www.ifremer.fr>

<http://www.ifr87.cnrs-gif.fr/platefor/imagerie/outils/cmfc/cmfc.html>

<http://www.canalu.fr/canalu/>

Len-Corail, 2003. AGLIA- Observation des pêches et des cultures marines du golfe de Gascogne.

Barnabé G., 1989. Aquaculture volume 1. Paris. 565p

Guo X.M., Allen S.K., 1994. Viable tetraploids in the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3, 42-50.

Lapègue S., Heurtebise S., Cornette F., Brizard R., Sharbel T., et Boudry P., 2004. Impact de la dissémination accidentelle d'huîtres tétraploïdes : potentiel de dispersion et succès reproducteur. Rapport de fin de contrat entre l'IFREMER et le CNRS concernant l'appel d'offres 2002 « Impact des biotechnologies dans les agro-écosystèmes »

Dong Q., Eudeline B., Huang C., Allen S. K. Jr., Tiersch T. R., 2005. Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Cryobiologie* 50 1-16.

ANNEXE 1 :

Résultats statistiques des expériences préliminaires

Vieillessement des mâles : comparaison avec les témoins

moyenne testée	test de fischer	test de student	test non paramétrique
T1 et R1			
T2 et R2			
T3 et R3			
T4 et R4			

moy =
moy non =
var non =
var =

Vieillessement des mâles : comparaison dans le temps

moyenne testée	test de fischer	test de student	test non paramétrique
R0 et R1			
R1 et R2			
R2 et R3			
R3 et R4			

Test d'égalité des moyennes au temps 0 des différents croisements

test	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
2N*2N avec 4N*2N			
2N*2N avec 2N*4N			
2N*2N avec 4N*4N			
2N*4N avec 4N*2N			
2N*4N avec 4N*4N			
4N*2N avec 4N*4N			

Vieillesse des femelles : comparaison dans le temps

2N par 2N			
moyenne testée	test de fischer	test de student	test non paramétrique
T0 et T1			
T1 et T2			
T2 et T3			
T3 et T4			
T4 et T5			
T5 et T6			
2N par 4N			
moyenne testée	test de fischer	test de student	test non paramétrique
T0 et T1			
T1 et T2			
T2 et T3			
T3 et T4			
T4 et T5			
T5 et T6			
4N par 2N			
moyenne testée	test de fischer	test de student	test non paramétrique
T0 et T1			
T1 et T2			
T2 et T3			
T3 et T4			
T4 et T5			
T5 et T6			
4N par 4N			
moyenne testée	test de fischer	test de student	test non paramétrique
T0 et T1			
T1 et T2			
T2 et T3			
T3 et T4			
T4 et T5			
T5 et T6			

ANNEXE 5 :

Résultats statistiques du vieillissement des femelles :

Test d'égalité des moyennes au temps 0 des différents croisements

test	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
2N*2N avec 4N*2N			
2N*2N avec 2N*4N			
2N*2N avec 4N*4N			
2N*4N avec 4N*2N			
2N*4N avec 4N*4N			
4N*2N avec 4N*4N			

Vieillessement des femelles : comparaison dans le temps

2N par 2N			
moyenne testée	test de fischer	test de student	test non paramétrique
T0 et T1			
T0 et T2			
T1 et T2			
T2 et T3			
T3 et T4			
T4 et T5			
T5 et T6			
T6 et T7			
T7 et T8			
T8 et T9			
T9 et T10			
T10 et T11			
2N par 4N			
moyenne testée	test de fischer	test de student	test non paramétrique
T0 et T1			
T0 et T2			
T1 et T2			
T2 et T3			
T3 et T4			
T4 et T5			
T5 et T6			
T6 et T7			
T7 et T8			
T8 et T9			
T9 et T10			
T10 et T11			
4N par 2N			
moyenne testée	test de fischer	test de student	test non paramétrique
T0 et T1			
T1 et T3			
T3 et T5			
4N par 4N			
moyenne testée	test de fischer	test de student	test non paramétrique
T0 et T1			
T1 et T3			
T3 et T5			

ANNEXE 3 :

Résultats statistiques du vieillissement des mâles :

Test d'égalité des moyennes au temps 0 des différents croisements

test	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
2N*2N avec 4N*2N			
2N*2N avec 2N*4N			
2N*2N avec 4N*4N			
2N*4N avec 4N*2N			
2N*4N avec 4N*4N			
4N*2N avec 4N*4N			

Vieillissement des mâles : comparaison avec les témoins

2N par 2N			
Moyenne testé	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
M1 et T1			
M2 et T2			
M3 et T3			
M4 et T4			
M5 et T5			
M6 et T6			
2N par 4N			
Moyenne testé	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
M1 et T1			
M2 et T2			
M3 et T3			
4N par 2N			
Moyenne testé	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
M1 et T1			
M2 et T2			
M3 et T3			
M4 et T4			
M5 et T5			
M6 et T6			
4N par 4N			
Moyenne testé	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
M1 et T1			
M2 et T2			
M3 et T3			

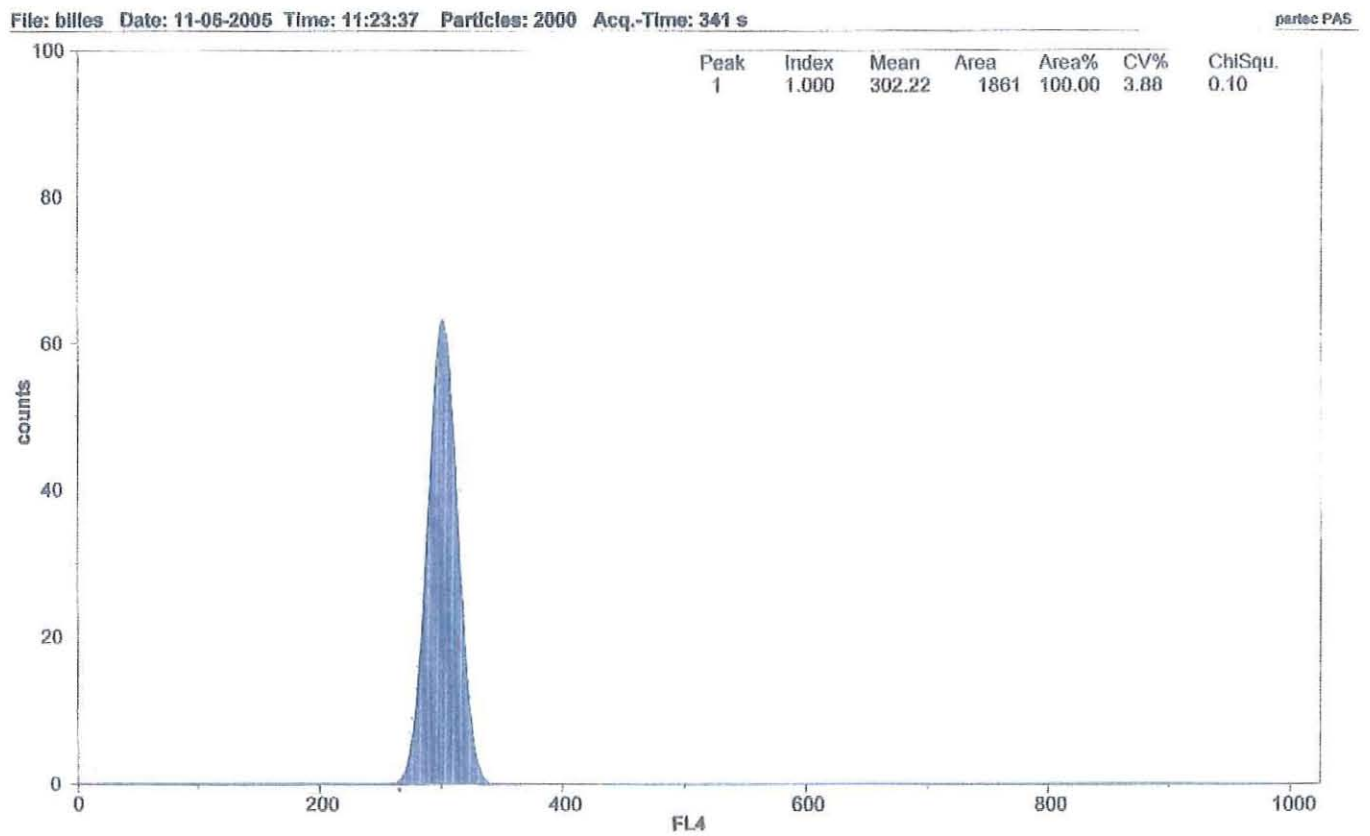
Vieillissement des mâles : comparaison dans le temps

2N par 2N			
Moyenne testé	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
M0 et M1			
M0 et M2			
M1 et M2			
M2 et M3			
M3 et M4			
M4 et M5			
M5 et M6			
2N par 4N			
Moyenne testé	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
M0 et M1			
M1 et M2			
M2 et M3			
4N par 2N			
Moyenne testé	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
M0 et M1			
M0 et M2			
M1 et M2			
M2 et M3			
M3 et M4			
M4 et M5			
M5 et M6			
4N par 4N			
Moyenne testé	Test de fischer	test de student	test non paramétrique
M0 et M1			
M1 et M2			
M2 et M3			

ANNEXE 4 :

Résultats de la cytométrie en flux

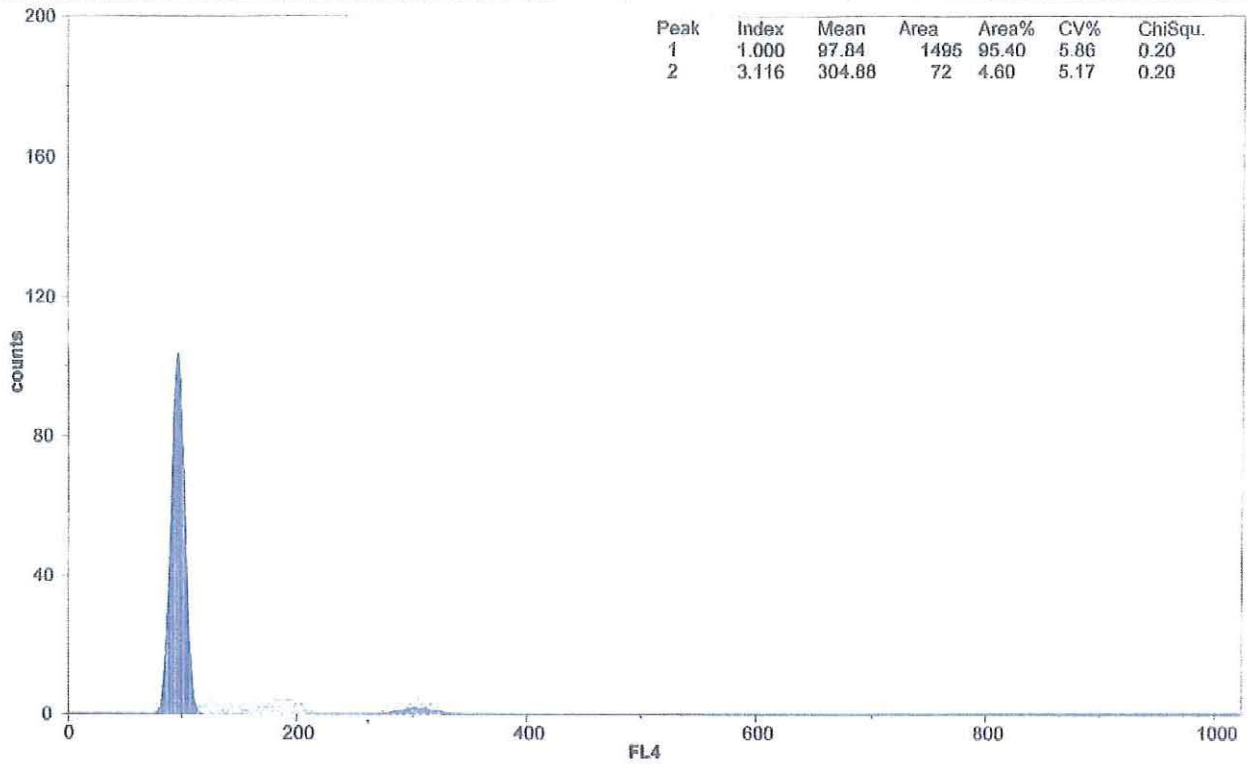
Etalon interne



Réplicats 1 et 2 du croisement femelles 2N avec mâles 2N

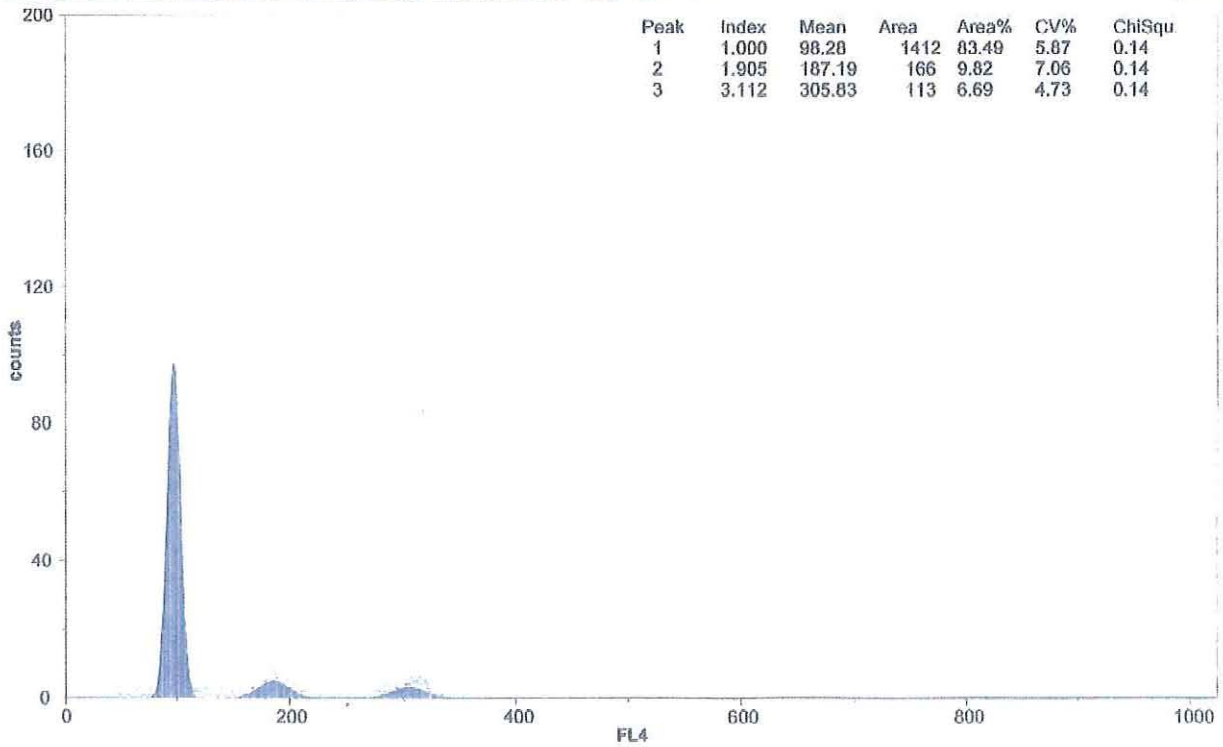
File: CR1 2n2n Date: 11-05-2005 Time: 11:44:07 Particles: 2000 Acq.-Time: 2 s

partec PAS



File: CR2 2n2n Date: 11-05-2005 Time: 11:44:58 Particles: 2000 Acq.-Time: 11 s

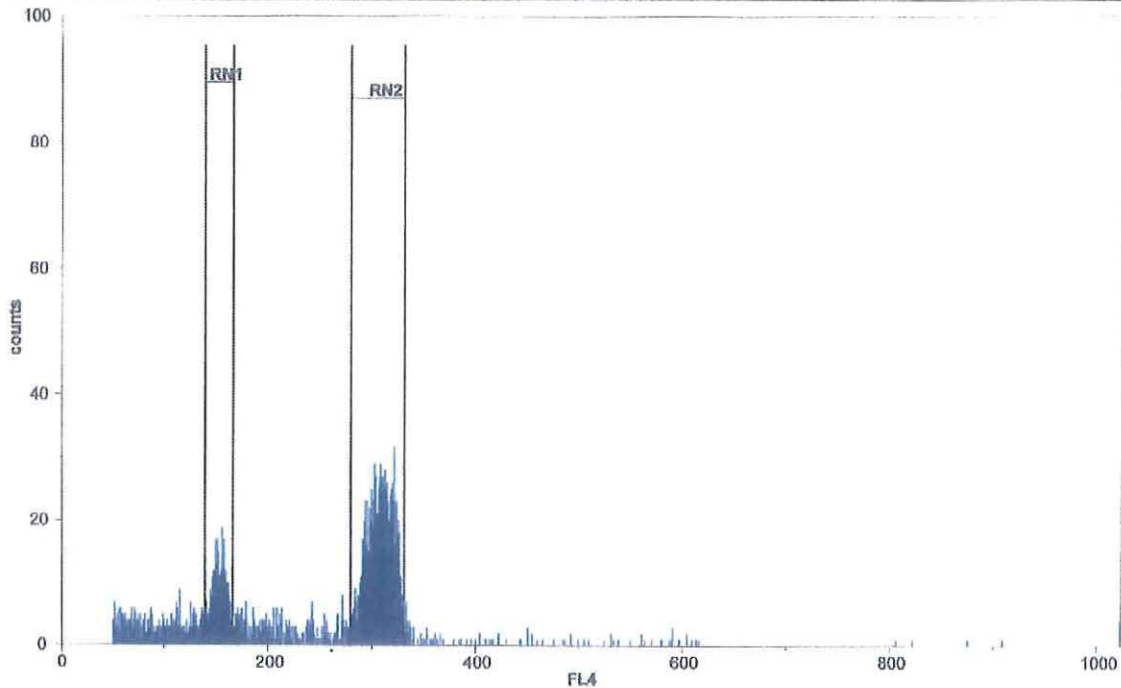
partec PAS



Réplicats 1 et 2 du croisement femelle 2N avec mâles 4N :

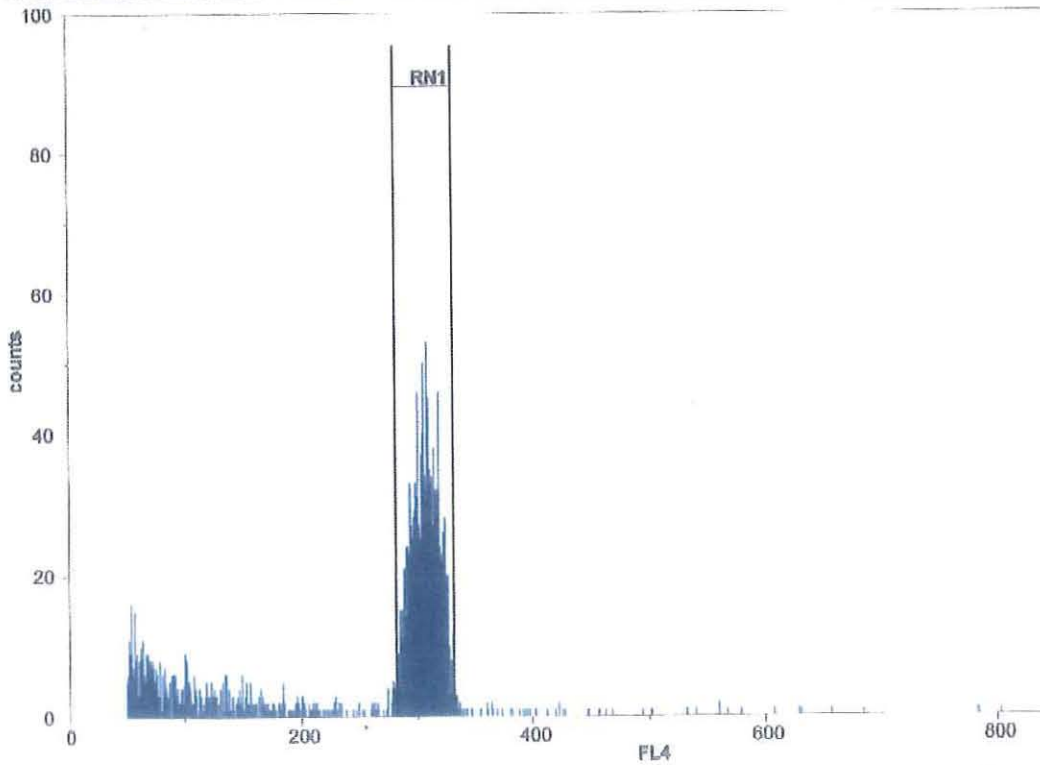
File: CR1 f2nm4 Date: 11-05-2005 Time: 11:38:58 Particles: 2000 Acq.-Time: 78 s

partec PAS



Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	283	283	-	14.16	163.70	153.84	4.31	-	-	-
RN2	<None>	959	959	-	47.95	307.59	307.83	3.97	-	-	-

File: CR2 f2nm4 Date: 11-05-2005 Time: 11:42:11 Particles: 2000 Acq.-Time: 144 s

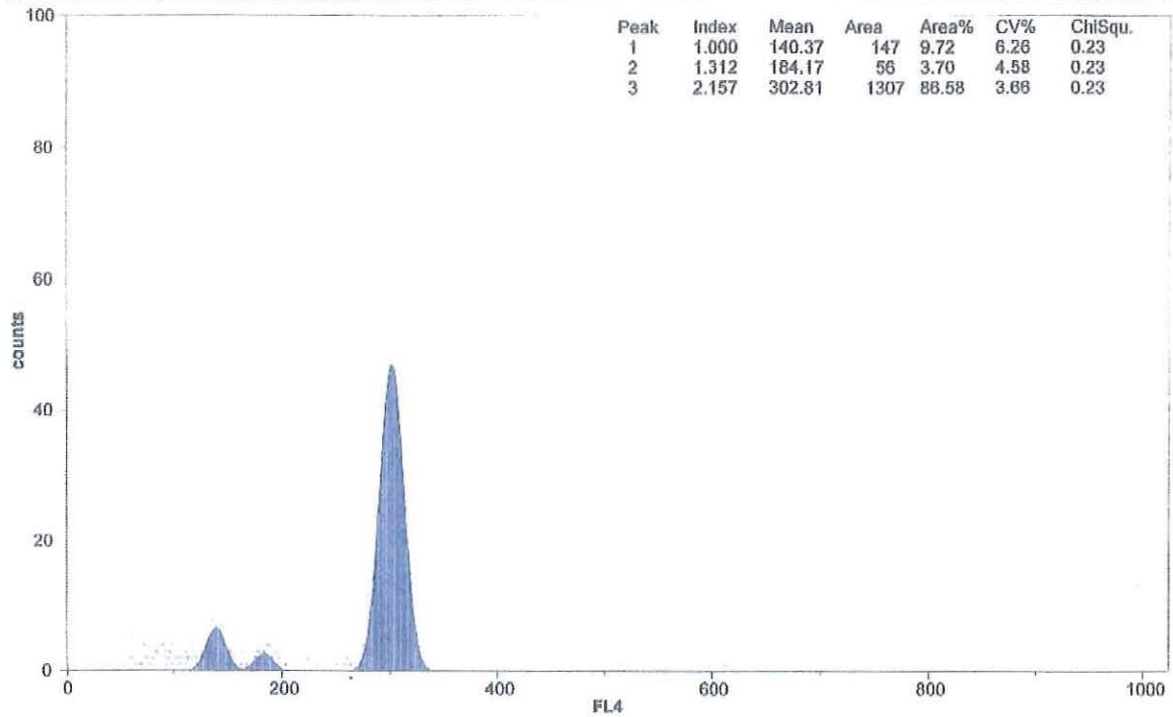


Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y
RN1	<None>	1293	1293	-	64.65	307.76	307.98	3.76	-	-

Réplicats 1 et 2 du croisement femelle 4n avec mâles 2n :

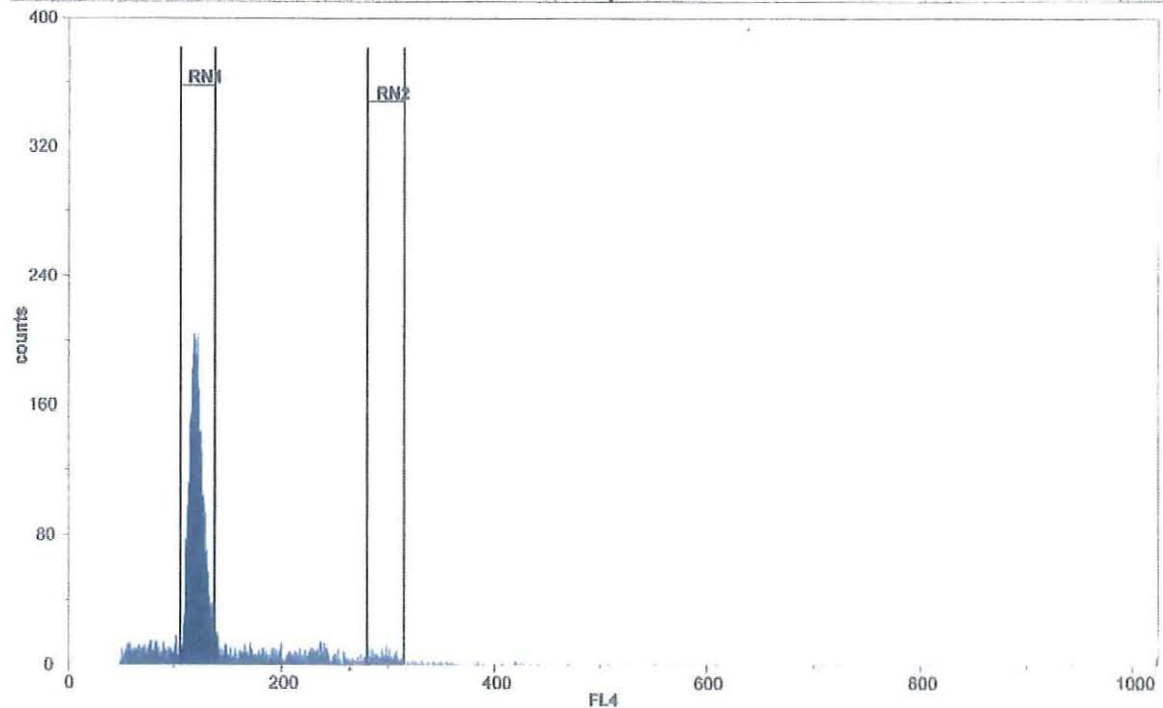
File: CR1 f4n m2n Date: 11-05-2005 Time: 12:01:29 Particles: 2000 Acq.-Time: 157 s

partec PAS



File: CR2 f4n m2n Date: 11-05-2005 Time: 12:08:37 Particles: 5000 Acq.-Time: 31 s

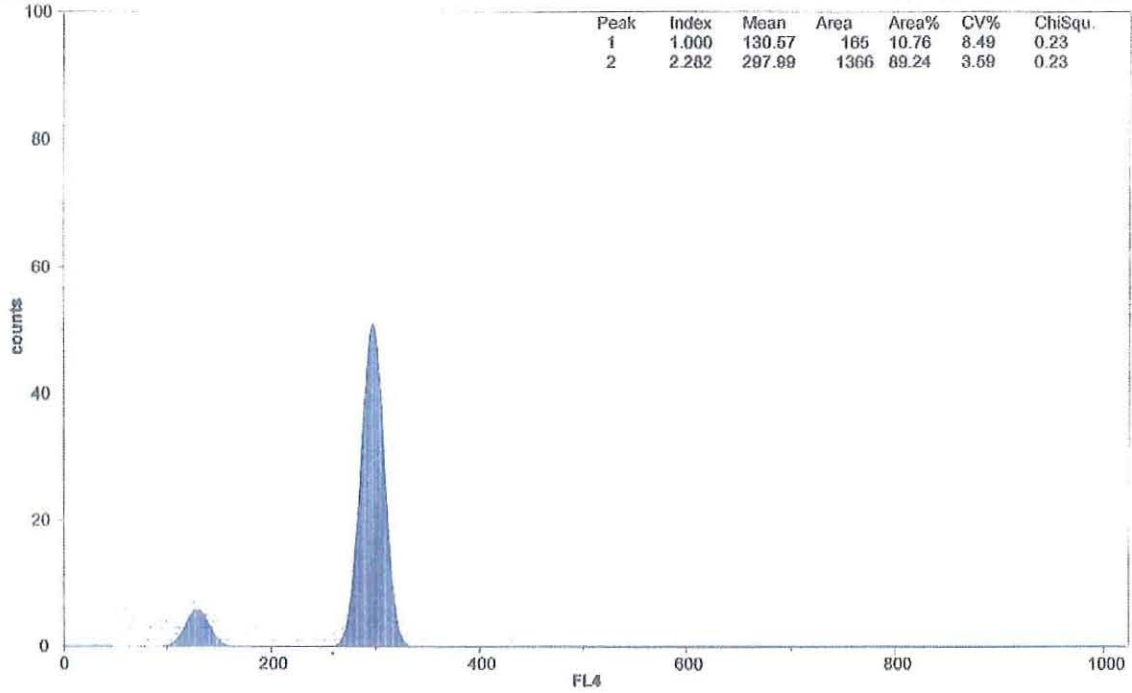
partec PAS



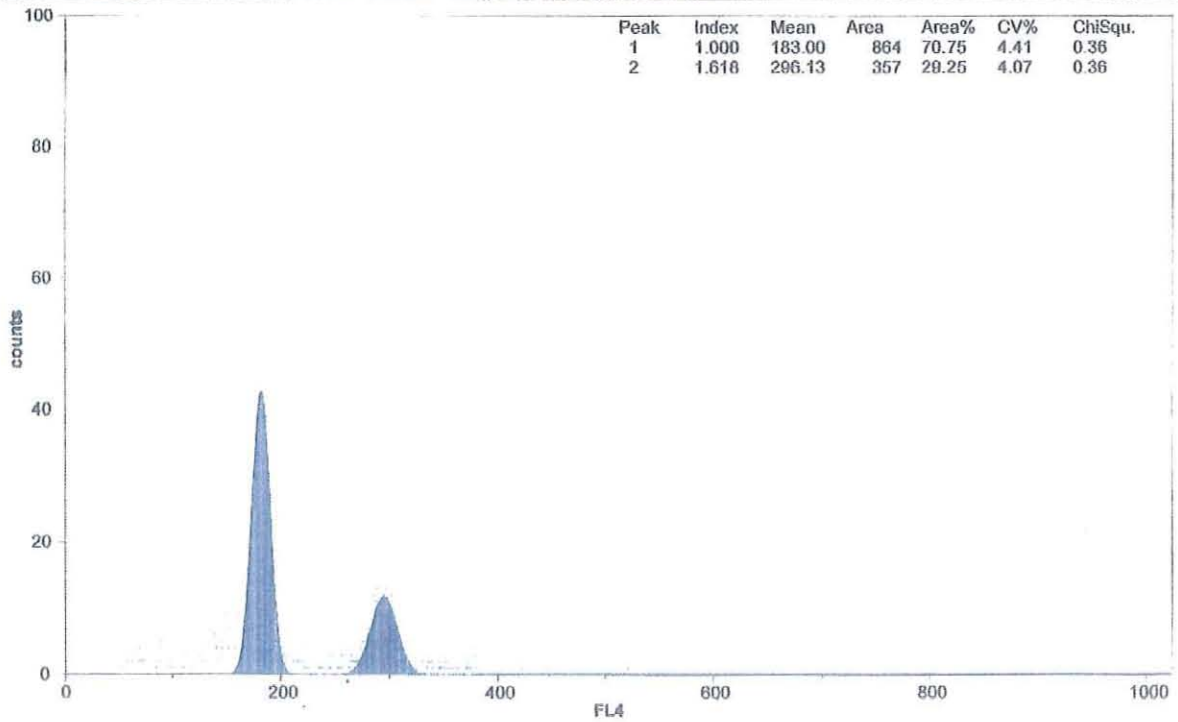
Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	3216	3216	-	64.32	121.62	121.79	5.36	-	-	-
RN2	<None>	197	197	-	3.94	296.51	296.66	3.27	-	-	-

Réplicats 1 et 2 du croisement femelle 4n avec mâles 4n :

File: CR1 f4n m4n Date: 11-05-2005 Time: 12:12:32 Particles: 2000 Acq.-Time: 165 s partec PAS

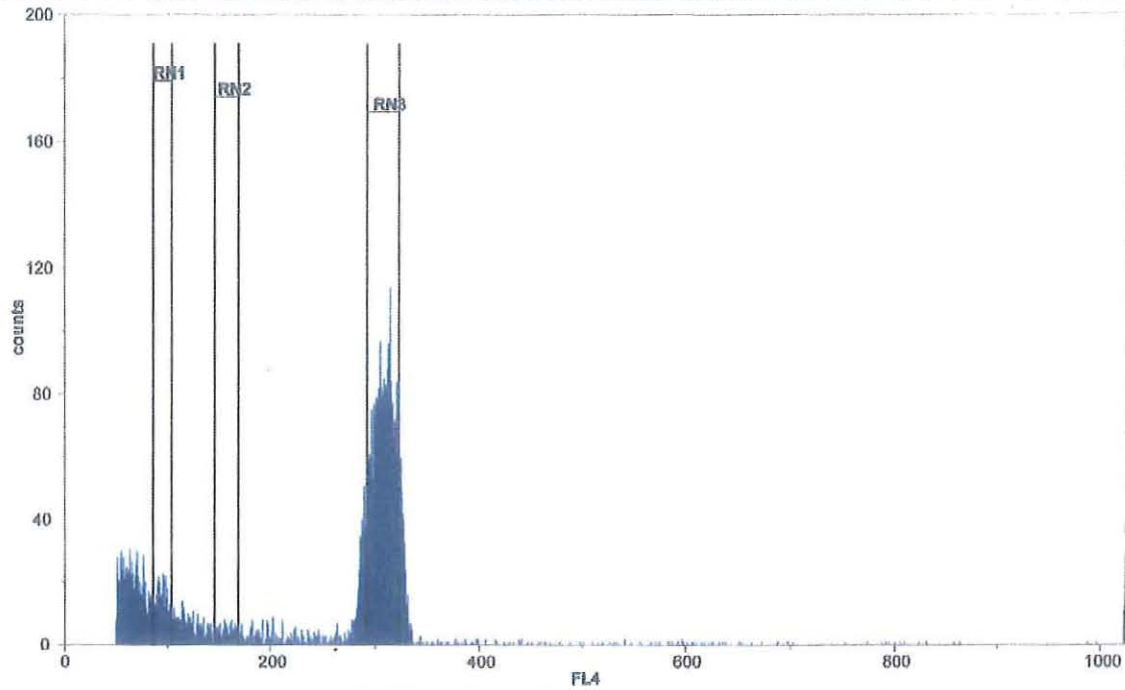


File: CR2 f4n m4n Date: 11-05-2005 Time: 12:14:11 Particles: 2000 Acq.-Time: 44 s partec PAS



Réplicats 1 et 2 du croisement femelles 2n avec mâles 2n et 4n :

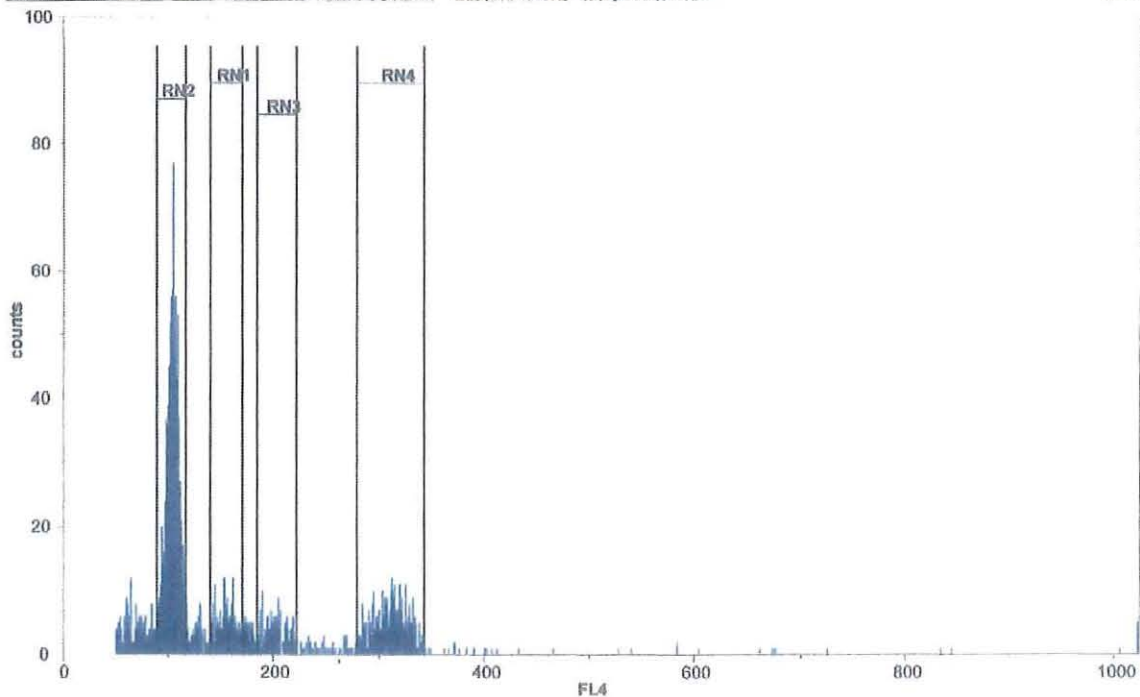
File: CR1 f2nm4n2n5000 Date: 11-05-2005 Time: 11:34:12 Particles: 6000 Acq.-Time: 358 s Concentration: 995 / ml partec PAS



Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	305	305	75	6.10	95.17	95.30	5.23	-	-	-
RN2	<None>	127	127	5	2.54	158.11	158.25	4.27	-	-	-
RN3	<None>	2347	2347	570	46.94	308.04	308.15	2.67	-	-	-

File: CR2 f2nm4n2n Date: 11-05-2005 Time: 11:36:18 Particles: 2000 Acq.-Time: 23 s

partec PAS

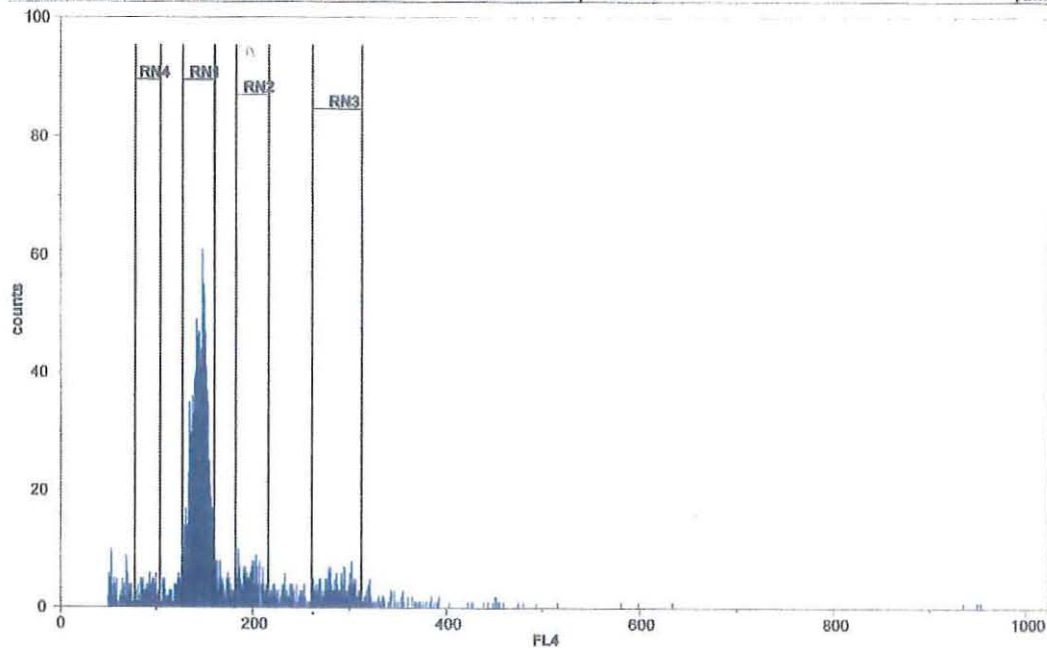


Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	179	179	-	8.95	155.64	155.85	5.25	-	-	-
RN2	<None>	869	869	-	43.45	104.46	104.61	5.49	-	-	-
RN3	<None>	162	162	-	8.10	202.47	202.73	5.06	-	-	-
RN4	<None>	379	379	-	18.95	310.09	310.49	5.07	-	-	-

Réplicats 1 et 2 du croisement femelles 4n avec mâles 2n et 4n :

File: CR11 f4n m2n4n Date: 11-05-2005 Time: 11:50:28 Particles: 2000 Acq-Time: 5 s

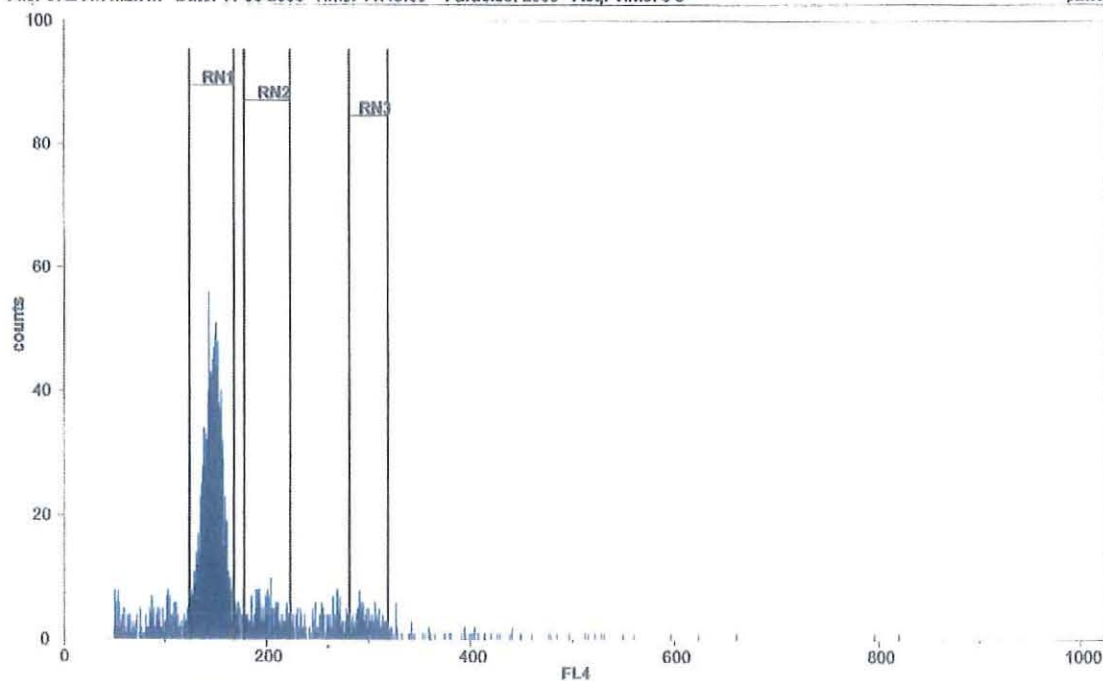
partec PAS



Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	1054	1054	-	52.70	144.40	144.60	5.19	-	-	-
RN2	<None>	179	179	-	8.95	197.42	197.63	4.61	-	-	-
RN3	<None>	200	200	-	10.00	267.43	267.77	4.88	-	-	-
RN4	<None>	91	91	-	4.55	91.55	91.81	7.46	-	-	-

File: CR2 f4n m2n4n Date: 11-05-2005 Time: 11:48:56 Particles: 2000 Acq-Time: 3 s

partec PAS

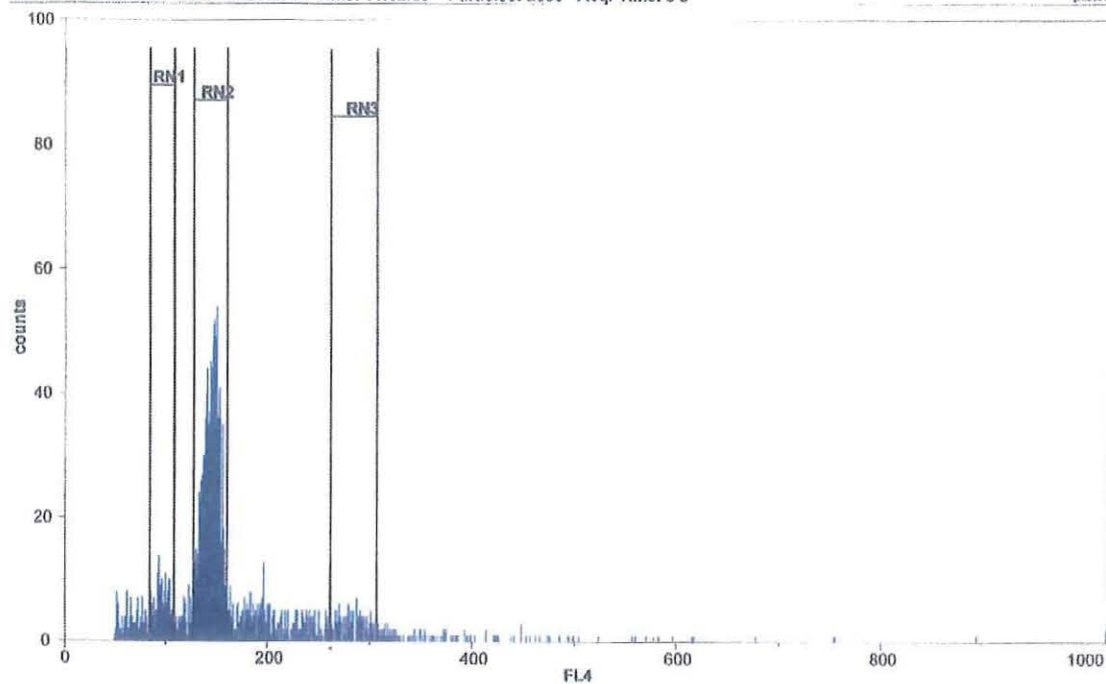


Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	1127	1127	-	56.35	146.82	147.10	6.18	-	-	-
RN2	<None>	210	210	-	10.50	200.62	201.00	6.16	-	-	-
RN3	<None>	135	135	-	6.75	299.27	299.44	3.32	-	-	-

Réplicats 1 et 2 du croisement femelle 2n et 4n mâles 2n :

File: CR1 4n2n m2n Date: 11-05-2005 Time: 11:52:53 Particles: 2000 Acq.-Time: 3 s

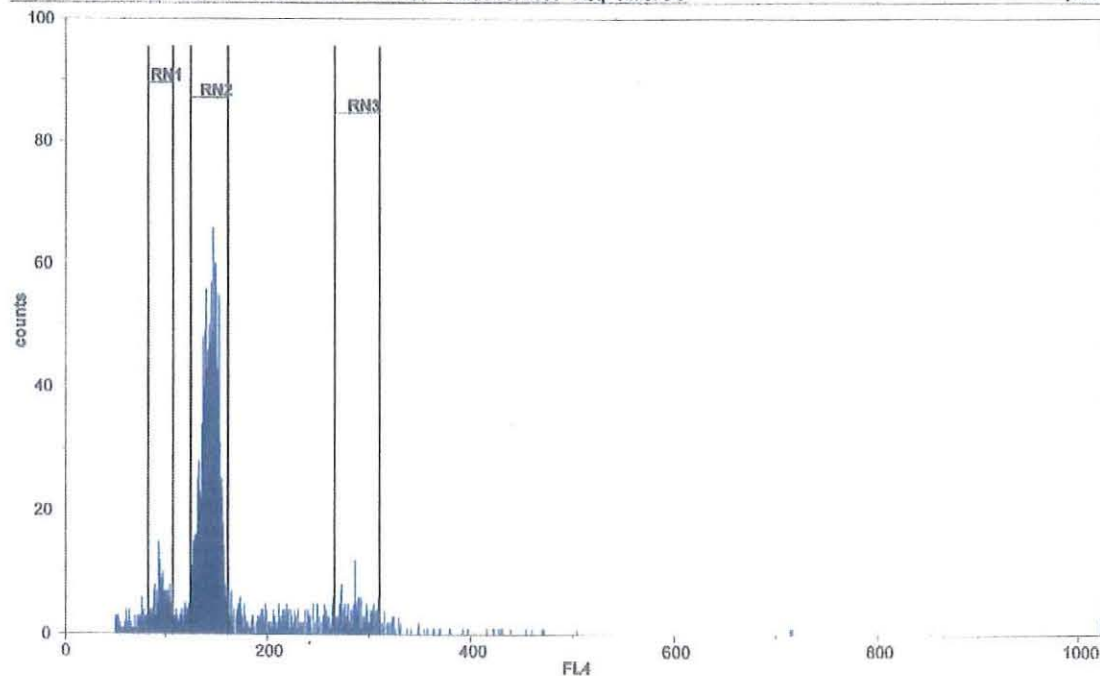
partec PAS



Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	171	171	-	8.55	96.43	96.63	6.50	-	-	-
RN2	<None>	1000	1000	-	50.00	144.23	144.42	5.16	-	-	-
RN3	<None>	136	136	-	6.80	283.78	284.03	4.23	-	-	-

File: CR2 4n2n m2n Date: 11-05-2005 Time: 11:51:50 Particles: 2000 Acq.-Time: 6 s

partec PAS

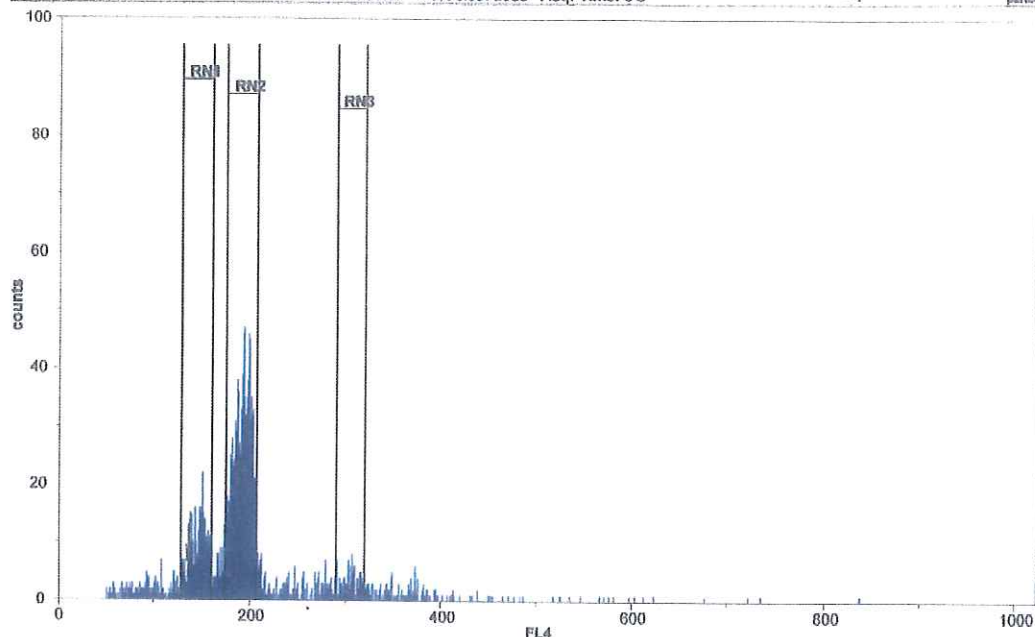


Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	163	163	-	8.15	95.66	95.86	6.46	-	-	-
RN2	<None>	1201	1201	-	60.05	143.24	143.46	5.50	-	-	-
RN3	<None>	166	166	-	8.30	288.45	288.72	4.29	-	-	-

Réplicats 1 et 2 du croisement femelles 2n et 4n avec mâles 4n :

File: CR1 f4n2n m4n Date: 11-05-2005 Time: 11:53:37 Particles: 2000 Acq.-Time: 6 s

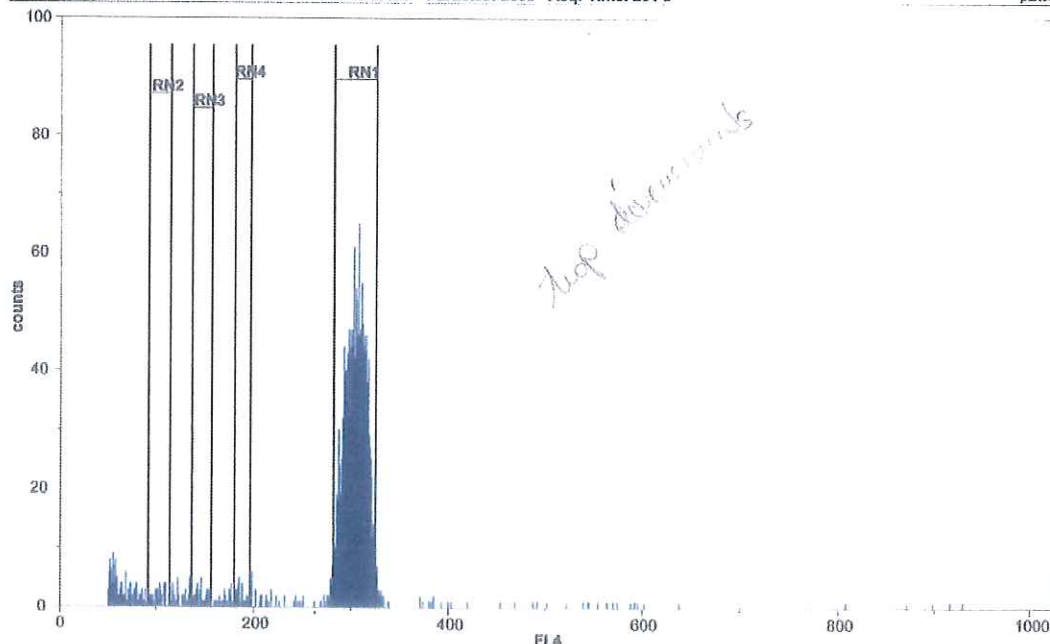
partec PAS



Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	321	321	-	16.06	145.90	146.12	5.52	-	-	-
RN2	<None>	964	964	-	48.20	191.88	192.06	4.31	-	-	-
RN3	<None>	103	103	-	5.15	305.43	305.64	2.69	-	-	-

File: CR2 f4n2n m4n Date: 11-05-2005 Time: 11:57:54 Particles: 2000 Acq.-Time: 201 s

partec I

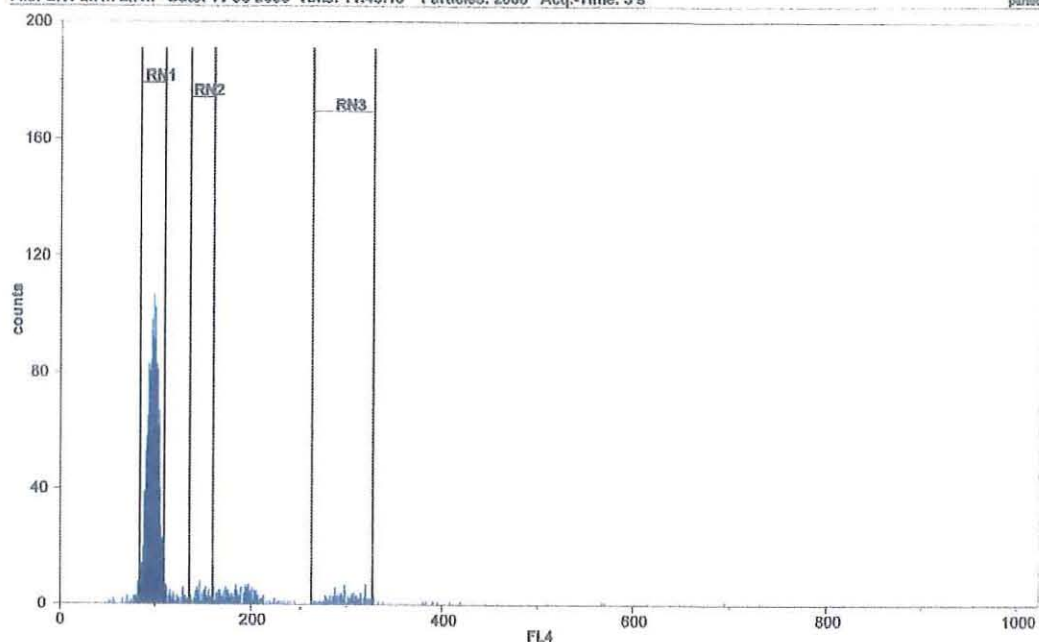


Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	1533	1533	-	76.65	304.51	304.68	3.32	-	-	-
RN2	<None>	47	47	-	2.35	103.94	104.13	6.04	-	-	-
RN3	<None>	39	39	-	1.95	146.47	146.58	3.90	-	-	-
RN4	<None>	33	33	-	1.65	186.56	186.61	2.39	-	-	-

Réplicats 1 et 2 du croisement femelles 2n et 4n avec mâles 2n et 4n :

File: CR1 2n4n 2n4n Date: 11-05-2005 Time: 11:46:16 Particles: 2000 Acq.-Time: 3 s

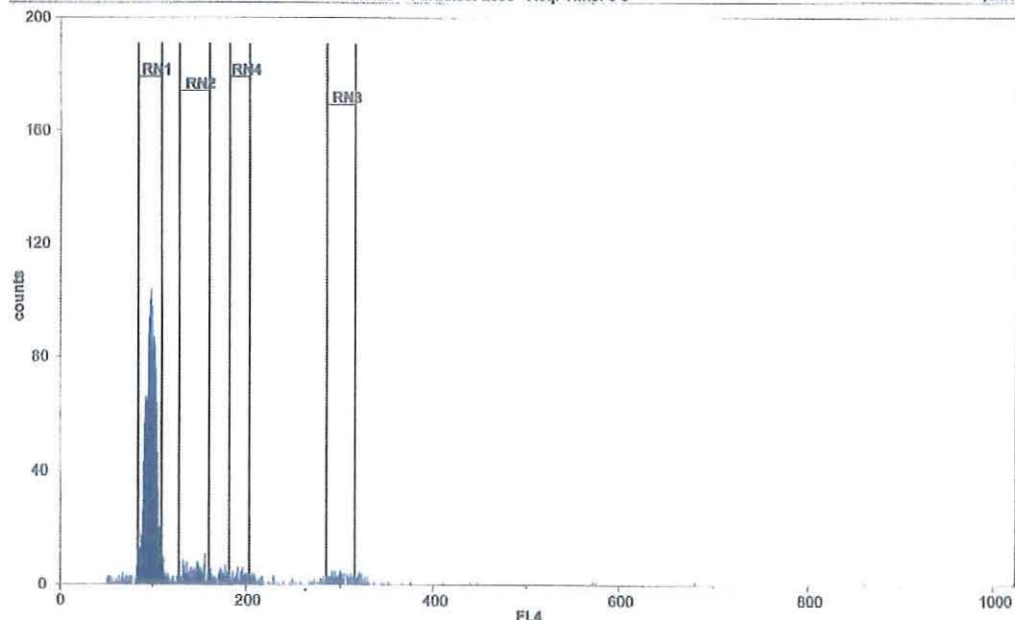
parlec PAS



Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	1448	1448	-	72.40	97.44	97.58	5.43	-	-	-
RN2	<None>	84	84	-	4.20	149.81	149.96	4.48	-	-	-
RN3	<None>	134	134	-	6.70	298.97	299.37	6.13	-	-	-

File: CR2 2n4n 2n4n Date: 11-05-2005 Time: 11:47:28 Particles: 2000 Acq.-Time: 8 s

parlec PAS



Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	1376	1376	-	68.80	97.92	98.05	5.19	-	-	-
RN2	<None>	156	156	-	7.80	144.77	145.05	6.21	-	-	-
RN3	<None>	85	85	-	4.25	300.33	300.45	2.77	-	-	-
RN4	<None>	66	66	-	3.30	193.39	193.47	2.87	-	-	-

ANNEXE 5 :

Ovocytes pas encore activé par l'eau de mer et non fécondé : forme de poire et ADN dispersé

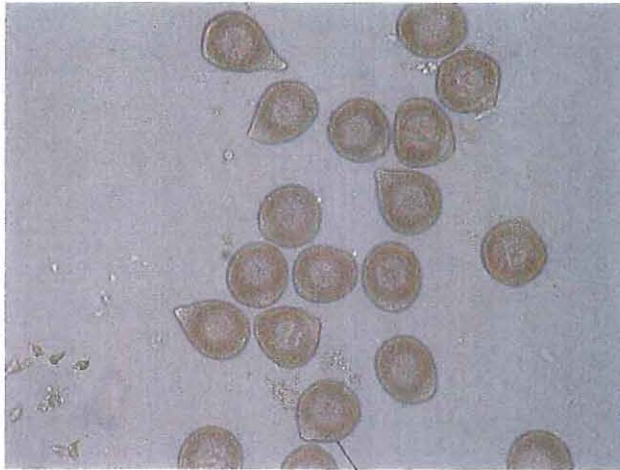


Photo : P. Phelipot

Observation en épifluorescence

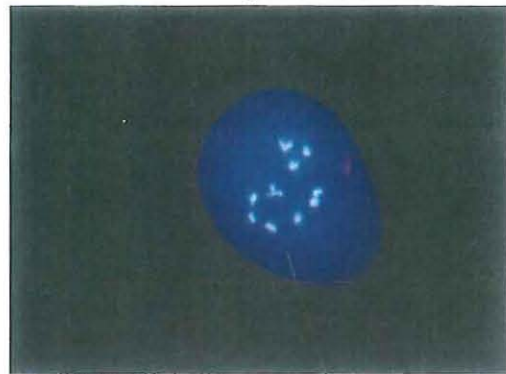


Photo : C. Ledu

Zone claire= noyau avec
ADN dispersé

Chromosome rassemblés par paire,
étalées dans le noyau

Ovocyte activé par l'eau de mer mais non fécondé : forme arrondie et condensation de l'ADN

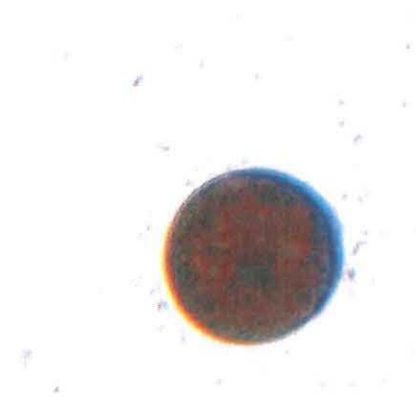


Photo V. Benech

Observation en épifluorescence



ADN condensé

Photo : C. Ledu

ANNEXE 6 :

Résultats de la compétition gamétique effectuée en 2004 :

