

**LYCEE DE LA VALLEE DE CHEVREUSE
GIF SUR YVETTE**

**BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES**

Rapport de Stage

**Karine HOUDUSSE
Juin 1992**

**POLYPLOIDISATION
CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES**

**Maître de Stage
André GERARD**

**UNITE DE RECHERCHE EN GENETIQUE ET ECLOSERIE
B.P. 133 - 17390 LA TREMBLADE**



SOMMAIRE

INTRODUCTION

1ère PARTIE : STRUCTURES ET ORGANISATION.

1- L'IFREMER

1.1-MISSIONS ET OBJECTIFS DE L'IFREMER

1.2-ORGANISATION DE L'IFREMER

2- LA STATION DE LA TREMBLADE

2.1-SES DIFFERENTES UNITES

2.2-OBJECTIFS DU LABEIM

3- L'UNITE DE RECHERCHE EN GENETIQUE ET ECLOSERIE

3.1-OBJECTIFS ET PROGRAMMES

3.2-PERSONNEL ET EQUIPEMENTS

3.3-GESTION FINANCIERE DE L'UNITE

3.4-INSERTION DU STAGE DANS LES PROGRAMMES

2nde PARTIE : GYNOGENESE ET ELECTROPHORESE CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES

INTRODUCTION

1- INDUCTION DE LA GYNOGENESE CHEZ L'HUITRE *CRASSOSTREA GIGAS*

BUT

1.1-PRINCIPE GENERAL

1.2-TECHNIQUES MISES EN PLACE

1.3-RESULTATS OBTENUS

1.4-CONCLUSION

1.5-PERSPECTIVES

2- ELECTROPHORESE DES PROTEINES CHEZ L'HUITRE *CRASSOSTREA GIGAS*

BUT

2.1-PRINCIPE GENERAL

2.2-TECHNIQUES MISES EN PLACE

2.3-RESULTATS OBTENUS

2.4-CONCLUSIONS

2.5-PERSPECTIVES

CONCLUSIONS

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La station IFREMER de La Tremblade se situe dans la région Poitou-Charentes qui est au premier rang des régions françaises pour l'aquaculture et la conchyliculture. Elle est implantée dans le bassin de Marennes-Oléron (Département de la Charente Maritime). Dans ce département, la conchyliculture occupe la première place du secteur primaire, tant par le chiffre d'affaire dégagé que par le nombre d'emplois que génère cette activité. C'est dire l'importance des recherches dans ce domaine et l'impact potentiel que peuvent avoir des transferts de technologies vers les entreprises.

C'est dans ce cadre que s'inscrit le travail de l'Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (URGE), qui tente par le biais de différents programmes de recherche, d'améliorer la qualité des produits, de sélectionner des souches plus performantes, d'introduire de nouvelles espèces....

C'est également dans ce contexte que s'inscrit le présent rapport. Durant le stage dont il rend compte, deux aspects des recherches menées à l'URGE ont été abordés :

- la mise au point du protocole d'induction de la gynogenèse chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*,

- la mise au point de protocoles pour la recherche de marqueurs par électrophorèse enzymatique.

Adresses des centres et délégations de l'IFREMER

Siège social

Technopolis 40 - 155, rue Jean-Jacques Rousseau
92138 Issy-les-Moulineaux cedex
Tél. 46.48.21.00

Centre de Boulogne

150, quai Gambetta - BP 699
62321 Boulogne-sur-Mer Cedex
Tél. 21.99.56.00
Directeur : Gérard Lefranc

Centre de Brest

BP 70 - 29280 Plouzané
Tél. 98.22.40.40
Directeur : Jean-Max de Lamare

Centre de Nantes

BP 1049 - 44037 Nantes cedex 01
Tél. 40.37.40.00
Directeur : Henri Durand

Centre de Toulon/La Seyne

BP 330 - Zone portuaire de Brégaillon
83507 La Seyne-sur-Mer cedex
Tél. 94.30.48.00
Directeur : Jean Jarry

Centre de Tahiti

BP 7004 - Taravao - Tahiti - Polynésie française
Tél. 689.57.12.74
Directeur : Jean-Michel Griessinger

Délégation de Saint-Pierre et Miquelon

Quai de l'Alysse - BP 4240
97500 Saint-Pierre et Miquelon
Tél. 508.41.30.83
Délégué : Philippe Moguedet

Délégation de Nouvelle-Calédonie

Quai des Scientifiques - BP 2059
Nouméa - Nouvelle-Calédonie
Tél. 687.28.51.71
Délégué : Michel Gauthier

Délégation de La Réunion

BP 60 - 97822 Le Port cedex - La Réunion
Tél. 262.42.03.40
Délégué : Jean-Pierre Minet

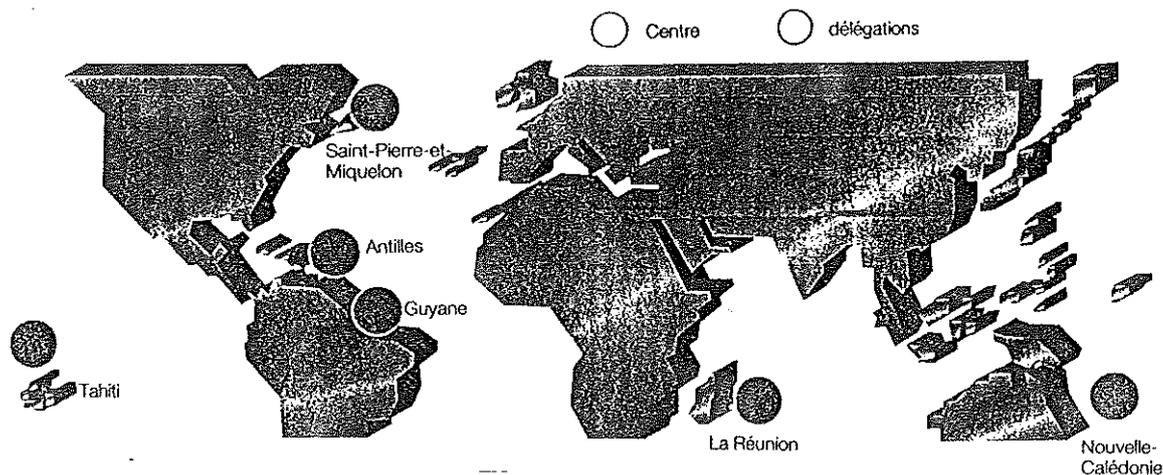
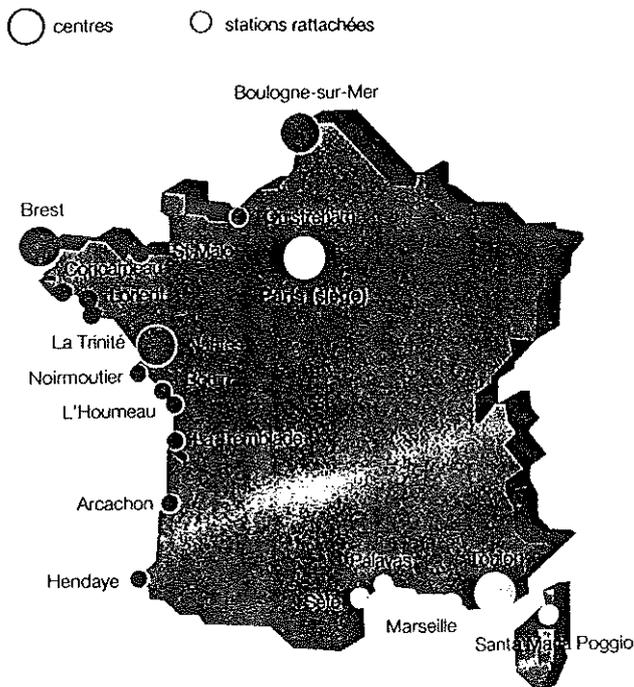
Délégation des Antilles

Le Robert - Pointe Fort - 97231 Le Robert
Martinique
Tél. 596.65.11.54
Délégué : Jean-Marc Ricard

Délégation de Guyane

BP 477 - 97302 Cayenne - Guyane française
Tél. 594.30.22.00
Délégué : Jean Marin

Implantation de l'IFREMER en Métropole et Outre-Mer



STRUCTURE ET ORGANISATION

1. L'IFREMER

"Le monde océanique, 70% de la surface de la planète, reste encore aujourd'hui largement à découvrir et à comprendre."

Pierre PAPON, P.D.G. de l'IFREMER

1.1 Missions et objectifs de l'IFREMER

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) a reçu des missions multiples par le texte fondateur de l'Institut (décret du 5 juin 1984). Il est le seul organisme de recherche français dont la vocation est exclusivement maritime. L'IFREMER est ainsi :

1. un organisme de recherche menant des actions propres dans le domaine des connaissances de bases et des technologies qui leurs sont associées,
2. une agence d'objectifs qui, en s'appuyant sur ses propres laboratoires, stimule l'action d'autres acteurs de la recherche nationale,
3. une agence de moyens qui a la charge de la construction, de la programmation et de la mise en oeuvre de la flotte océanographique française,
4. l'IFREMER assure également une mission de service public : suivi des ressources, protection de l'environnement, contrôle de la qualité des eaux,
5. enfin en tant qu'EPIC (Etablissement Public à caractères Industriel et Commercial), l'IFREMER a mission de valoriser le résultat de ses travaux dans les entreprises, et de mobiliser ses compétences pour renforcer la compétitivité des entreprises françaises du secteur maritime.

Dans le cadre de ces missions, l'IFREMER s'est donné 5 objectifs prioritaires de recherche pour lesquels un effort financier important a été consenti dès 1990. Chaque objectif est sous la responsabilité d'un Directeur qui assure une fonction consultative et de conseil pour les domaines concernés.

Le premier objectif correspond à la valorisation des substances marines ainsi que des biotechnologies associées. Les principaux thèmes abordés sont la prévention, le contrôle, l'amélioration des cheptels et enfin la valorisation des organismes et produits de la mer.

Le second objectif concerne la connaissance de l'environnement et l'aménagement du littoral. Leur maîtrise est indispensable à la recherche maritime associée aux producteurs, d'où des études axées sur : le flux, l'évolution des écosystèmes marins, les eaux, les micro-organismes et l'économie de l'environnement.

Le troisième objectif correspond au programme Géosphère-Biosphère pour lequel les études ne portent pas sur des zones géographiques limitées (bassins ostréicoles par exemple) mais sur l'ensemble de l'écosystème planétaire : c'est à l'échelle planétaire que l'environnement et son évolution sont étudiés.

Le quatrième objectif regroupe les actions de l'Institut en matière d'océanographie. Cet aspect recouvre le renouvellement de la flotte océanographique ainsi que la programmation et le fonctionnement nécessaire aux expéditions.

Le dernier objectif concerne les études juridiques et socio-économiques liées à l'activité maritime.

1.2 Organisation de l'IFREMER.

L'IFREMER est divisé en 6 directions. Les 3 premières sont sous la responsabilité du directeur général délégué, Madame Françoise BOUZITAT. Il s'agit de la Direction des relations sociales, de la Direction de la politique industrielle, de la valorisation et de la commercialisation et de la Direction rassemblant les services administratifs et financiers, les services du plan, de la programmation et du budget, et les services des affaires juridiques et logistiques. Les autres directions sont sous la responsabilité directe du P.D.G. Pierre PAPON. Il s'agit de la Direction scientifique, des Directions opérationnelles (au nombre de 5) et de la Direction des relations et de la coopération internationale.

Les 5 Directions opérationnelles ont chacune la responsabilité d'un secteur d'activité. La station de La Tremblade dépend de la Direction des Ressources Vivantes (DRV), ainsi que de la Direction de l'Environnement Littoral (DEL). Les trois autres directions sont : la Direction des Recherches Océaniques (DRO), la Direction de l'Ingénierie de la Technologie et de l'Informatique (DITI) et la Direction des Opérations et Moyens Navals (DOMN).

FIG 1

2. Station de La Tremblade

2.1 Ses différentes unités.

Créé en octobre 1990, le Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins (LBEIM), placé sous la responsabilité de Maurice HERAL, comporte quatre unités de recherche (Figure 1):

l'Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles (UREA), sous la responsabilité de Maurice HERAL,

l'Unité de Recherche Régionale Aquacole (URRA), sous la responsabilité d'Alain BODOY,

l'Unité de Recherche en Pathologie, Immunologie et Génétique Moléculaire (URPIGM), sous la responsabilité d'Evelyne BACHERE,

l'Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (URGE), sous la responsabilité d'André GERARD.

Fig 2

2.2 Objectifs du LBEIM

Les objectifs du LBEIM s'inscrivent dans les thèmes déclarés prioritaires par l'IFREMER. Il s'agit par exemple de l'étude de l'évolution du domaine littoral et de l'impact de la qualité des eaux sur la conchyliculture (UREA). Le thème concernant la valorisation des produits de la pêche et de l'aquaculture est abordé par l'URGE par le biais de la production de souches plus performantes et plus résistantes aux pathogènes. L'URRA participe à quelques uns de ces derniers programmes et assure également une fonction d'institut technique fournissant études et conseil aux administrations et collectivités locales. L'URPIGM contribue à l'apport de connaissances fondamentales en

pathologie, histopathologie, épidémiologie et immunologie des mollusques.

FIG 3

3. Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (URGE).

3.1. Objectifs et programmes

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

l'obtention de souches résistantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent régulièrement en cause la conchyliculture,

la création de lignées ou de souches présentant de meilleures performances de croissance et de qualité de chair pour valoriser et promouvoir les activités conchylicoles,

l'acclimatation de nouvelles espèces et l'hybridation pour limiter les risques liés à la monoculture,

la recherche de marqueurs, qu'ils soient morphologiques ou électrophorétiques.

L'URGE travaille, dans le cadre de ces différents axes de recherches, sur 5 espèces de mollusques bivalves : l'huître creuse *Crassostrea gigas*, l'huître américaine *Crassostrea virginica*, l'huître plate *Ostrea edulis*, la palourde européenne, *Ruditapes decussatus* et la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*.

Fig 4 et 5

3.2. Personnel et équipements

L'équipe complète de l'URGE comporte 5 personnes à temps complet dont 2 cadres et 3 techniciens. Cette équipe est complétée par 4 administratifs qui partagent leur temps entre les différentes unités du LABEIM (Figure 5).

En équipement, l'URGE dispose d'un bâtiment aquacole de 1200m² qui se divise en 6 salles distinctes :

La salle de maturation dans laquelle les individus adultes sont amenés à produire des gamètes grâce à des traitements appropriés : température élevée (20-22°C) et nourriture abondante.

C'est dans la salle d'élevage larvaire, thermostatée à 25°C, qu'ont lieu les pontes de mollusques. Les pontes sont, le plus souvent, provoquées par choc thermique induit par des alternances de bains chauds (jusqu'à 32°C) et froids (environ 18°C). Une autre technique consiste à sacrifier les géniteurs et à récolter les gamètes par scarification des gonades mâles et femelles. La fécondation s'effectue dans des béciers d'1 litre à raison de 100 spermatozoïdes par ovule. Au bout de 10mn, les larves sont transférées dans des bacs de 30 litres d'eau de mer filtrée. Les larves sont nourries quotidiennement. L'eau des bacs est filtrée puis renouvelée tous les 2 ou 3 jours. La croissance et la mortalité sont alors enregistrées.

La micro-nurserie accueille les larves, à la sortie de la salle d'élevage larvaire, au moment de la métamorphose qui correspond à la fixation des animaux sur un support solide (brisure de coquille...). La taille des larves est alors d'environ 200 à 300µm selon les espèces. Le naissain est élevé dans cette salle jusqu'à une taille moyenne de 5mm.

La salle de quarantaine permet d'isoler les lots contaminés et de conserver des souches provenant d'importation.

C'est en salle d'algues qu'est produit le phytoplancton nécessaire à la bonne croissance des élevages et à la maturation des géniteurs.

Fig 6

3.3. Gestion financière de l'Unité

Chaque Unité de Recherche se voit accorder, en début d'année, des crédits d'investissement et de fonctionnement. Ces crédits sont alloués par la direction, en fonction d'EPRD (Etablissement Prévisionnel des Recettes et Dépenses) établis l'année précédente par chacune des Unités. Le montant des crédits dépend fortement de la priorité des programmes et des recettes enregistrées par les Laboratoires (Contrats Régionaux, départementaux ou communautaires).

Les crédits d'investissement servent à couvrir les besoins en matériel scientifique dont le coût est supérieur à 2500F. Les crédits de fonctionnement recouvrent les besoins du laboratoire en :

- produits chimiques et produits d'entretien,
- petit matériel de coût inférieur à 2500F.

Pour 1992, l'URGE a reçu en investissement 355 000F (dont 200 000F de la Région Poitou-Charentes, 60 000F du Département Charente Maritime, 75 000F de la Région Bretagne et 20 000F de l'IFREMER). Toujours pour la même année, l'URGE a reçu 195 000F en fonctionnement.

Il existe également un compte "Station", géré par le chef de Station, pour l'ensemble des dépenses en logistique, ce qui comprend :

- les grosses dépenses en infrastructure (bâtiment neuf, aménagement de nouveaux laboratoires...)
- le fonctionnement général de la Station (eau, électricité, gaz, photocopieuses, gestion du courrier, véhicules de service...)

3.4. Insertion du stage dans les programmes.

Le sujet du stage a été déterminé par le programme des opérations en cours : à l'URGE, le mois de juin a été consacré à la mise au point de protocoles, d'une part pour l'obtention de lignées gynogénétiques, et d'autre part pour la recherche de marqueurs électrophorétiques.

FIG : 1

ORGANIGRAMME

Juln 1991

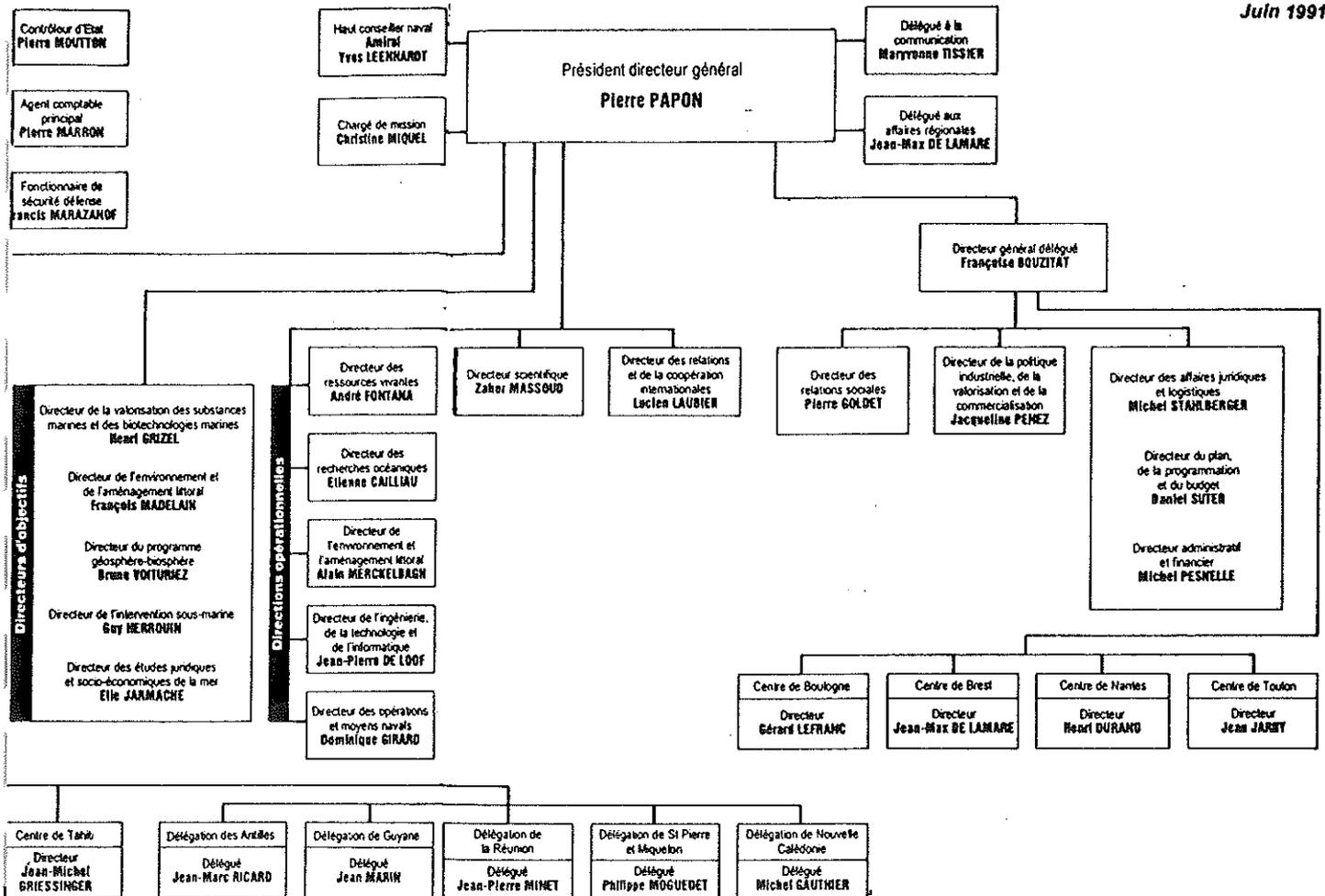


Fig:2

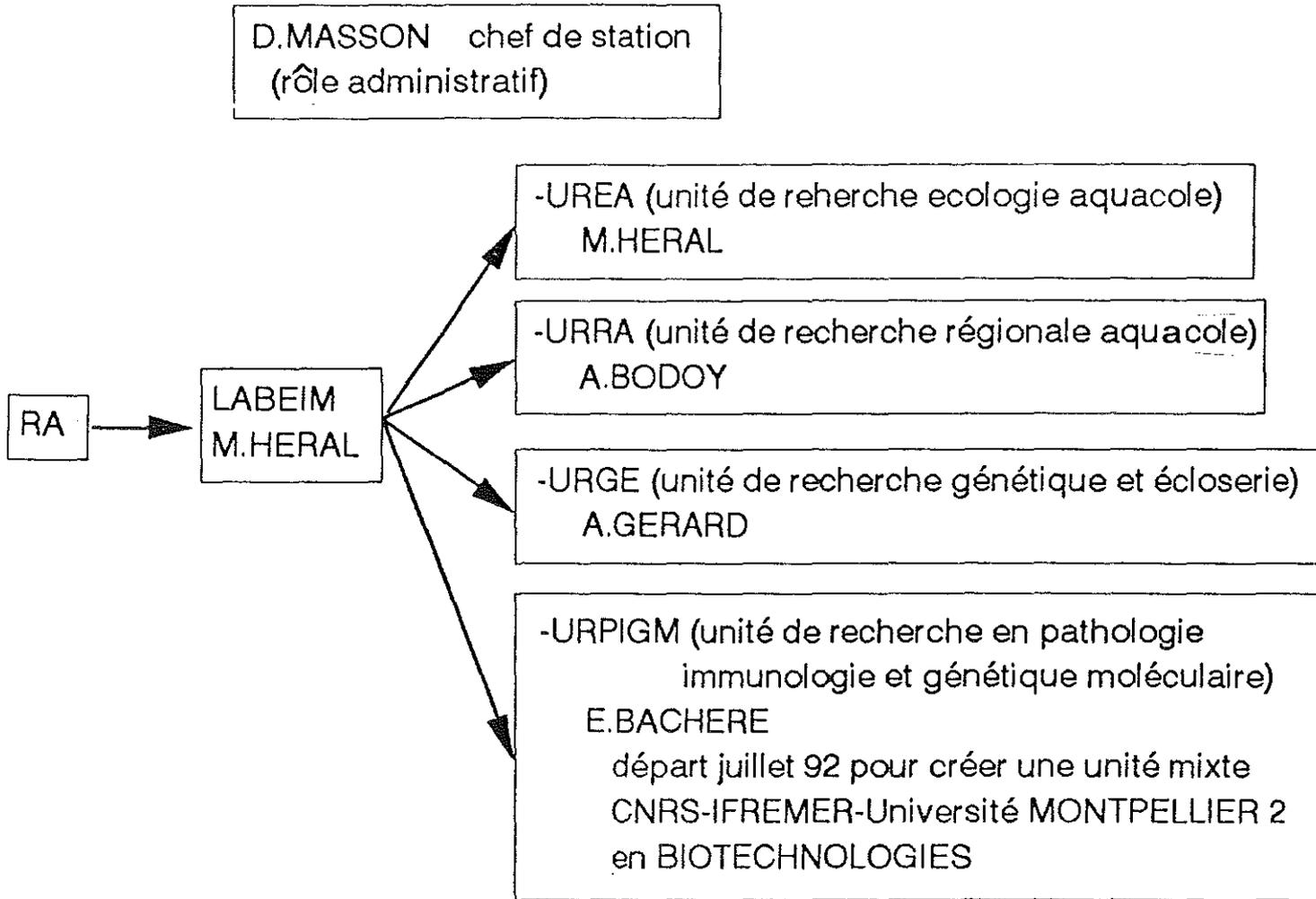


FIG :3

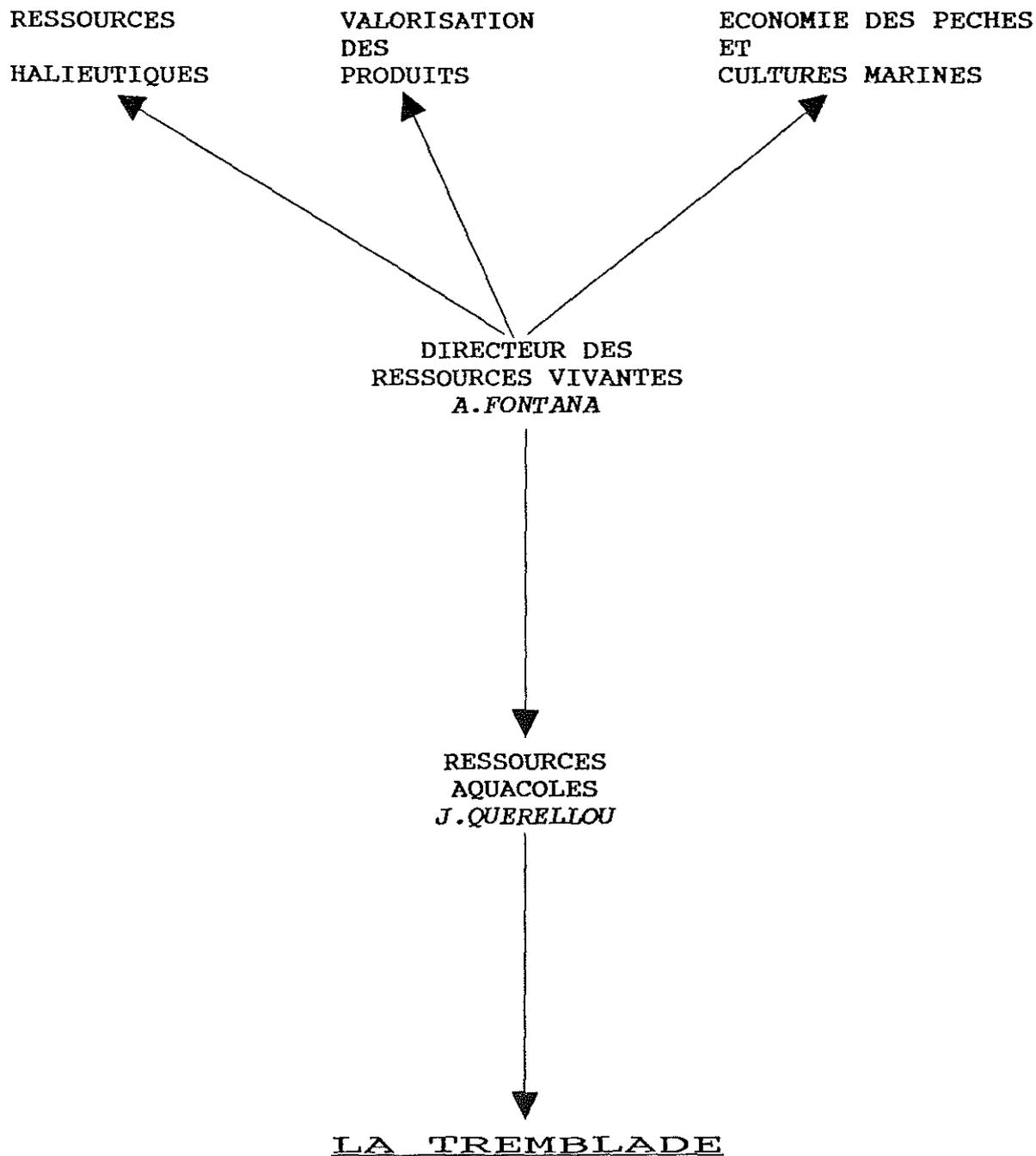
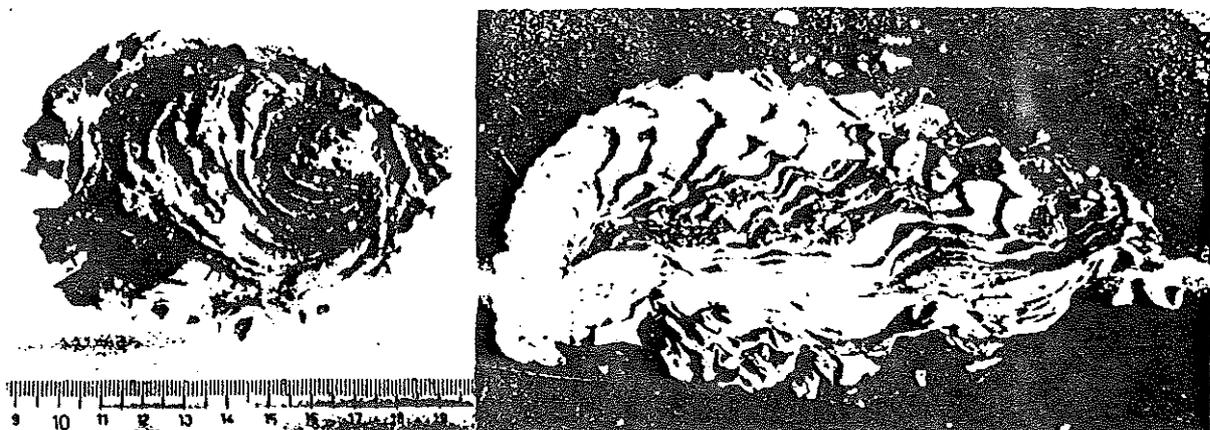
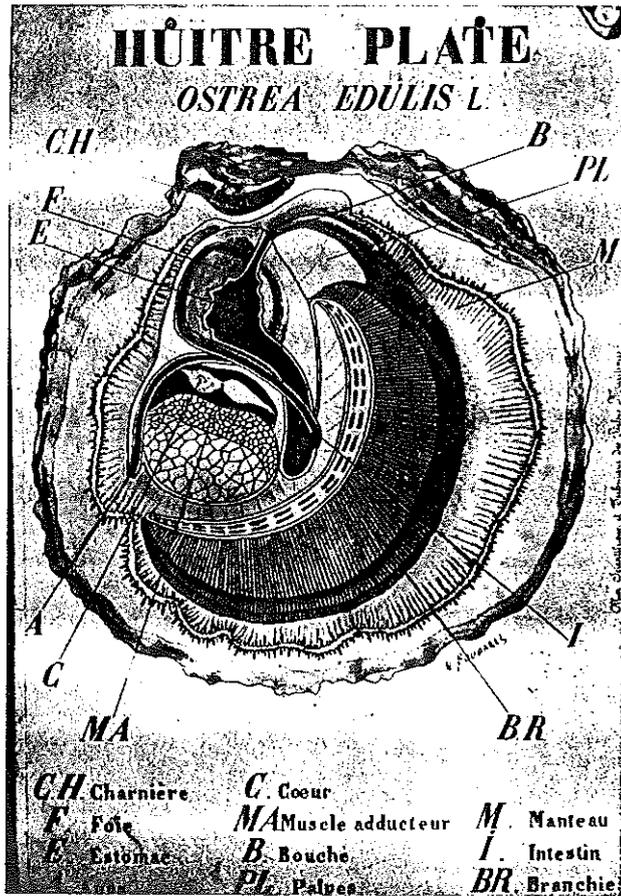


FIG : 4



— *Crassostrea gigas* ou *huitre du Pacifique* (huitre japonaise). A gauche : forme habituelle obtenue en France ;
à droite : forme habituelle obtenue au Japon (photo I.S.T.P.M.).

FIG : 5



— Planche anatomique d'*Ostrea edulis* (d'après BODAREL).

PRESENTATION DE L'UNITE DE RECHERCHE EN GENETIQUE ET ECLOSERIE

OUTILS

ECLOSERIE comprenant:

- 1200 m2 de bâtiment aquacole
- 22 points de pompage
- 4 bassins de stockage de 300 m3
- 1 station de stérilisation des eaux de rejet

PERSONNEL

CADRES:

- André Gérard
- Yamama Naciri

TECHNICIENS:

- Jean-Marie Peignon
- Pascal Phelipot
- Christophe Ledu

ADMINISTRATIF:

- Ginette Cailleateau
- Yvette Simian
- Martine Grasset
- Yvonne Favino

**GYNOGENESE ET ELECTROPHORESE
CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES**

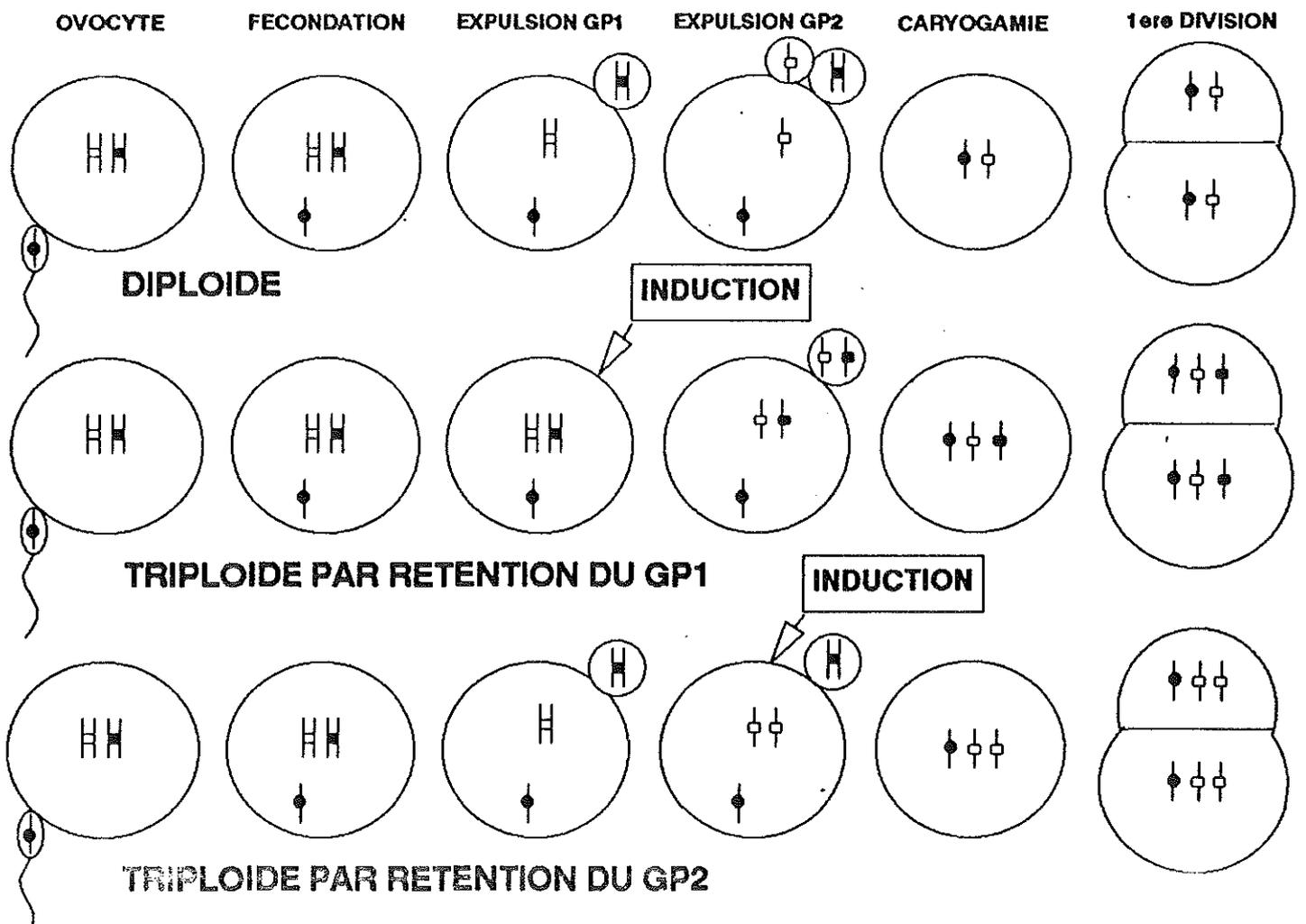
INTRODUCTION.

Il faut savoir que l'effort de reproduction chez les mollusques bivalves est prioritaire sur la croissance somatique*. Il monopolise le métabolisme énergétique dès le printemps pour la gamétogénèse*, induisant un retard de croissance et une modification des qualités organoleptiques de la chair (chute du taux de glycogène). Il est notamment responsable d'une perte d'énergie de 63% chez l'huître *Crassostrea gigas* âgée de 2 ans (HERAL et DESLOU-PAOLI, 1983).

La triploidisation doit permettre par réduction ou blocage de la gonadogénèse* de réorienter ce flux énergétique vers la croissance somatique et la constitution de réserves glucidiques. Elle est obtenue par doublement de la contribution génétique maternelle en appliquant des chocs physiques (température, pression) ou chimiques (cytochalasine B) quelques minutes après la fécondation, afin de retenir un des deux Globules Polaires (GP1 et GP2) dont l'expulsion marque l'achèvement de la méiose* maternelle.

FIG : 8

FIG : 8



De ce fait la "gynogénèse chez les mollusques bivalves" fait partie des principaux programmes de l'URGE.

L'objectif de ce programme de cytogénétique* est l'obtention de souches conchylicoles performantes par polyploidisation des principales espèces Françaises d'intérêt commercial :

- *Crassostrea gigas* (l'huître creuse),
- *Ostrea edulis* (l'huître plate),
- *Ruditapes philippinarum* (palourde du pacifique),
- *Ruditapes decussatus* (palourde autochtone).

Par la suite, la mise en place de techniques électrophorétiques permettrait le suivie des populations.

1- INDUCTION DE LA GYNOGENESE CHEZ L'HUITRE *CRASSOSTREA GIGAS* :

BUT :

Mise en place d'un protocole reproductible visant à obtenir des embryons haploïdes par irradiation des gamètes males.

Par la suite il y aura restauration de la diploïdie pour reproduire une gynogénèse, mode de reproduction de certains eucaryotes au terme duquel la descendance ne possède que des chromosomes d'origine maternelle.

FIG : 9

L'intérêt est d'obtenir des individus parfaitement homozygotes en induisant la reproduction uniparentale, méthodes plus rapides que les classiques croisements d'individus apparentés.

Un autre intérêt est de disposer de souches génétiquement identiques (clones) qui constituent un atout majeur pour de nombreuses études tant génétiques (sélection, transfert de gène) qu'en pathologie et en physiologie...

Le clonage d'animaux par simple reproduction d'individus gynogénétiques est une voie beaucoup plus prometteuse que celle de la transplantation nucléaire (CHOURROUT, 1989).

1.1- PRINCIPE GENERAL :

-> Toutes les manipulations se font avec de l'eau de mer filtrée.

-> Destruction d'un génome parentale :

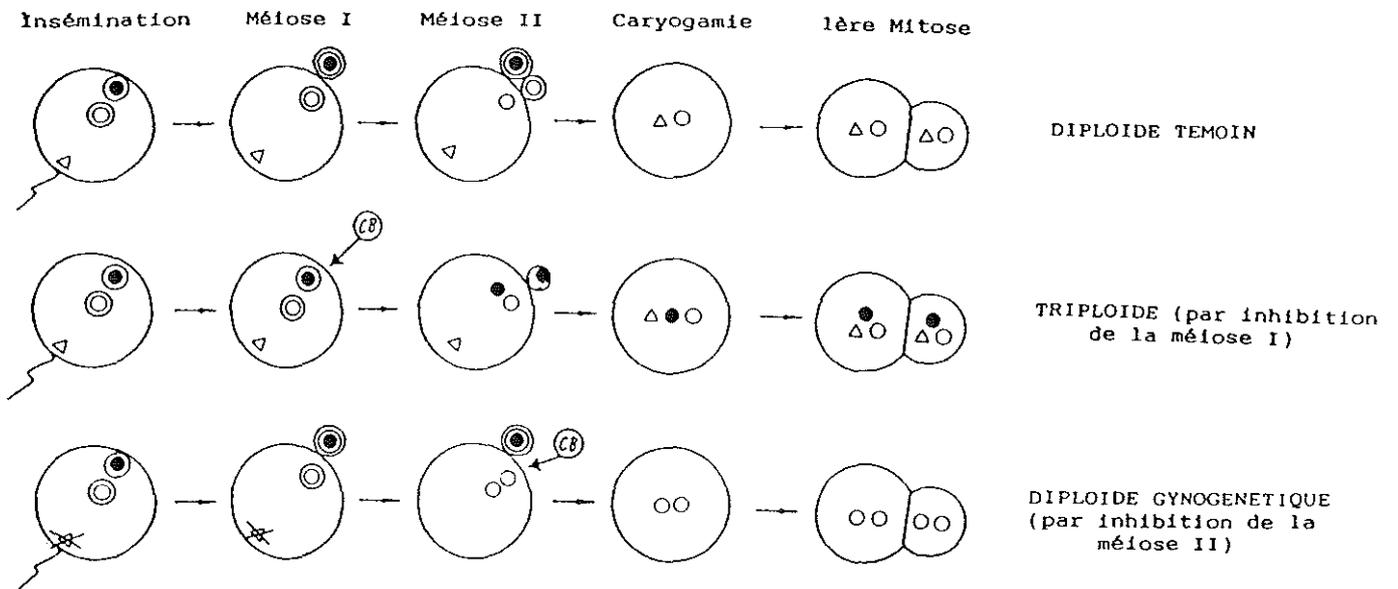
Les agents conduisant à l'inactivation d'un génome parentale sont multiples (rayons ionisants et ultraviolets, mutagènes chimiques), mais leur efficacité est variable.

Les rayons ultraviolets sont souvent préférés en raison de leur faible coût d'utilisation. De plus ils conduisent à une inactivation complète du stock chromosomique.

Des essais préalables sont indispensables pour déterminer le temps optimal d'irradiation, le sperme immobile n'étant plus fécondant. Il faut donc chercher le temps limite de mobilité de sperme, car celui-ci varie d'une huître à l'autre.

FIG : 10

FIG : 9



Effets recherchés par le traitement avec la cytochalasine B et types d'individus attendus après une insémination par du sperme irradié ou intact.

FIG : 10

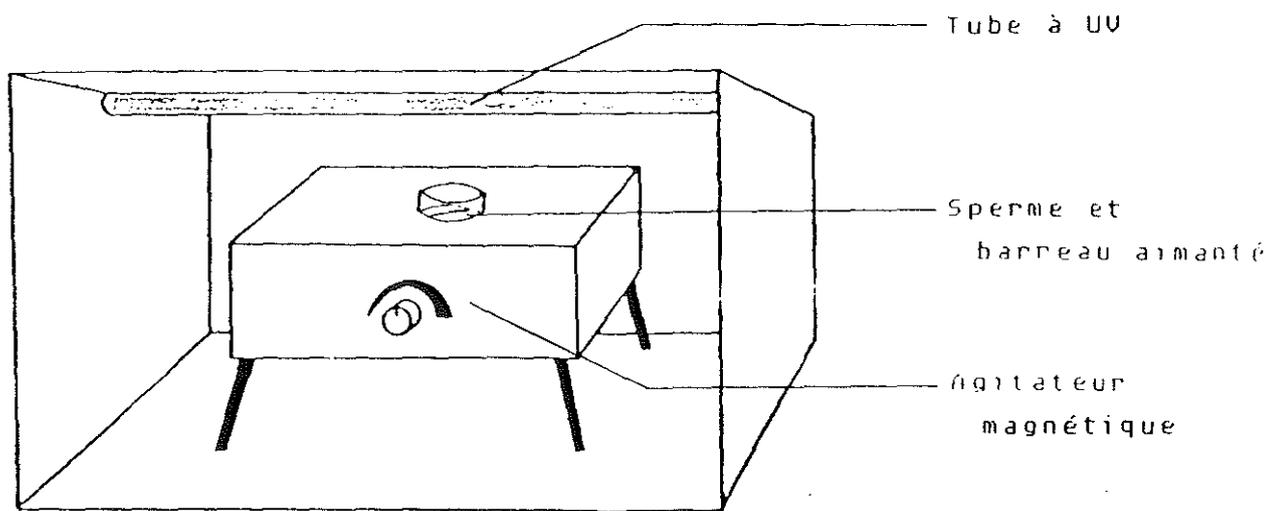


Schéma du montage employé pour l'inactivation génétique du sperme par les rayons ultraviolets.

-> Fécondation in vitro :

Des études précédentes ont montré qu'un rapport d'1 ovocyte pour 100 spermatozoïdes était nécessaire pour obtenir une fécondation optimale chez les mollusques bivalves.

Donc il est nécessaire de procéder à une numération des gamètes pour instaurer un tel rapport.

-> Traitement à l'APHIDICHOLINE et à l'HYDROXYUREE :

L'APHIDICHOLINE empêche la synthèse de l'ADN dans les embryons d'oursin en clivage ; suivant les espèces il y a rupture du noyau ou non.

L'HYDROXYUREE a comme action l'inhibition réversible de la synthèse d'ADN.

Donc ces deux produits ont pour effet de bloquer les mitoses de l'embryon, ce qui permet de déterminer, à un temps t donné, la quantité d'ADN dans une population de cellules se trouvant alors au même stade.

-> Analyse d'image :

L'imagerie numérique permet, par mesure photométrique et par comparaison avec un témoin, de quantifier l'ADN des animaux traités.

FIG : 11

Donc l'analyse d'image permet de déterminer le degré d'haploïdie en fonction du temps d'irradiation.

Différentes techniques de préparation histologiques, correspondant chacune à une période de la vie de l'animal ont été mises au point.

1.2- TECHNIQUES MISES EN PLACE

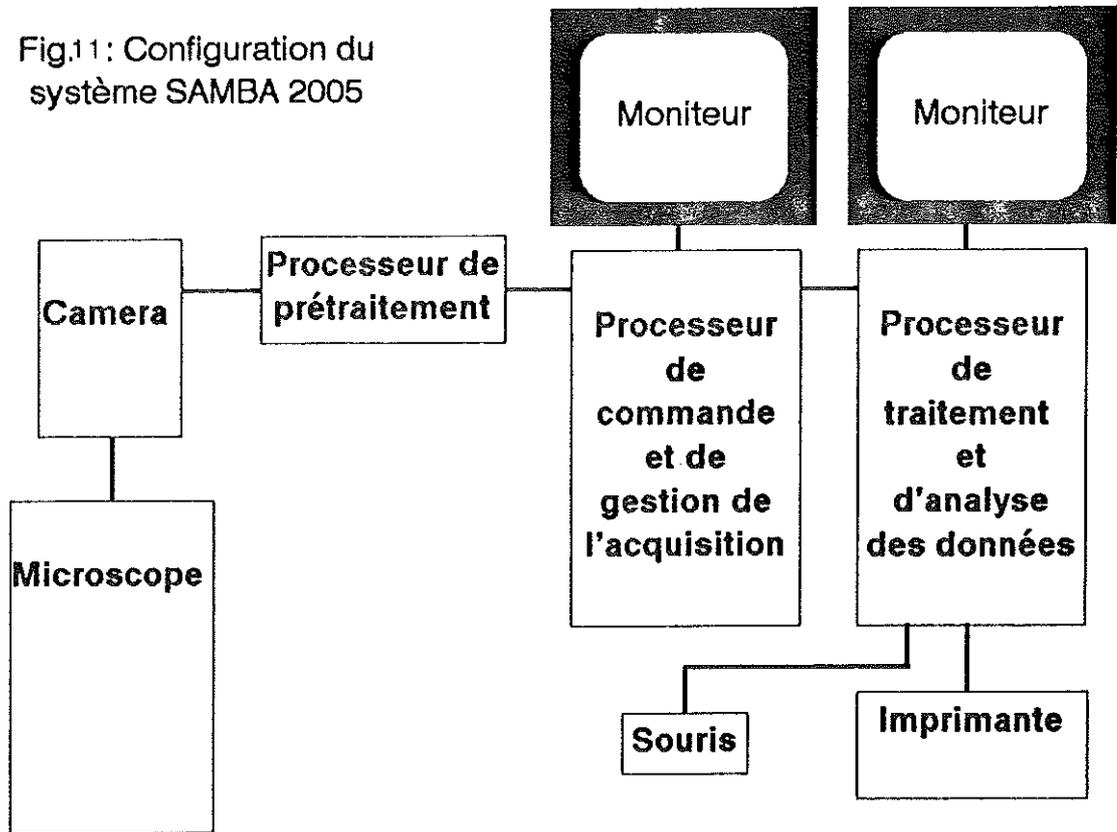
A- *Stripping** de trois mâles *Crassostrea gigas*.

Prélèvement des spermatozoïdes et filtration sur un tamis pour se débarrasser des chairs et des morceaux de coquille.

Dilution de la solution de spermatozoïdes obtenue en vue d'une numération.

Dilution au 1/20 d'un aliquote de la solution mère; on obtient un échantillon que l'on dilue au 1/2 dans de l'éosine (l'éosine permet de visualiser les spermatozoïdes).

Fig.11: Configuration du système SAMBA 2005



La numération se fait dans une "cellule de Thomas" grâce à l'analyseur d'image, on obtient :

1,1 10 cellules ml⁻¹ dans la dilution finale

donc

44 10 cellules ml⁻¹ dans la solution mère

B- *Stripping* de trois femelles adultes *Crassostrea gigas*.

Prélèvement des ovocytes et filtration sur un tamis pour se débarrasser des chairs et des morceaux de coquille.

La numération se fait dans une "cellule de Malassez" grâce à l'analyseur d'image, on obtient :

62 10 cellules ml⁻¹ dans la solution mère

Le nombre optimal d'ovocytes nécessaires à la fécondation in vitro a été estimé à 200 000, donc 3,2 ml de cette solution sont nécessaires.

Donc le volume nécessaire et suffisant de spermatozoïdes est de 0,1 ml de solution mère diluée au 1/2.

C- On recherche le temps limite de mobilité du sperme après irradiation par les UV pour déterminer une gamme de temps d'irradiation.

On peut donc dire, après différents essais d'irradiation du sperme sur différentes plages de temps d'exposition, que le temps limite est de 10 mn.

D- L'étape qui suit se déroule en deux temps ; la fécondation se fait dans un petit volume (0,1 ml de sperme irradié ou non + 3,2 ml de solution contenant des ovocytes) pendant un quart d'heure, pour favoriser le contact entre spermatozoïdes et ovocytes, donc pour favoriser la fécondation in vitro ; la seconde se fait dans un bac d'un litre d'eau de mer filtrée et oxygénée pendant quatre heures (cette phase a lieu dans l'écloserie).

Après quatre heures, on récupère les embryons dans 10 ml d'eau grâce à un tamis de 10 microns.

Chaque échantillon est alors traité soit par de l'APHIDICHOLINE (A), soit par de l'HYDROXYUREE (H) pour stopper les mitoses.

E- Il s'agit à présent de définir les essais et les témoins.

Le rôle des témoins est primordial : avant toute interprétation il est indispensable de définir le résultat attendu des témoins, et par la suite de vérifier ce résultat. Si ce dernier est différent, aucune interprétation ne peut être faite.

Les différents témoins sont :

T : sperme non irradié
aucun traitement
les embryons obtenus doivent être normaux et en division mitotique lors de l'observation.

To : sperme non irradié (to de la manipulation)
traitement A
il permet de tester l'efficacité de l'Aphidicholine par l'analyse d'image (témoin 2n)
les embryons obtenus doivent être normaux et diploïdes, cela permet de vérifier l'intégrité des résultats.

Tf : sperme non irradié (fin de la manipulation)
traitement H
idem To
les embryons obtenus doivent être normaux et diploïdes, cela permet de vérifier que le sperme n'a pas été endommagé pendant toute la durée de la manipulation.

T- : sperme irradié (10 mn)
aucun traitement
il s'agit de vérifier que le sperme a bien été inactivé par les UV, aucune fécondation ne doit être visible.

FIG : 12

F- L'analyse d'image se fait par l'intermédiaire d'un microscope (fig 10), ainsi avant toute observation il faut fixer le sujet sur une lame.

Pour obtenir une meilleure observation des noyaux, il faut dissocier les cellules qui constituent les embryons. Pour cela, il faut traiter mécaniquement et chimiquement ces derniers (annexe 1).

Les cellules, une fois obtenues sur lame, sont fixées dix minutes par le CARNOY, puis colorées au FEULGEUN (annexe 2) pour permettre leur observation au microscope et leur analyse.

G- L'analyse peut alors être faite, le résultat apparaît à l'écran sous forme d'histogrammes de fréquences relatives à la Densité Optique Intégrée.

La lecture se fait sur une centaine de cellules, ceci pour permettre l'utilisation de tests statistiques. Dans tous les cas, le témoin doit être réalisé à partir d'au moins cents cellules.

1.3- RESULTATS OBTENUS :

Observations microscopiques :

Avant tout traitement, et avant même l'analyse d'image, il est utile d'observer les témoins :

T- : aucune fécondation

l'irradiation de 10 minutes a été suffisante et efficace
aucune contamination visible

To : fécondation observée

les embryons ont un aspect normal
aucune contamination visible

L'observation des témoins nous permet de continuer la manipulation, en effet les résultats observés sont ceux attendus.

Les résultats des essais sont représentés sur : FIG 13 a et b

FIG 14 a et b

FIG 15 a et b

FIG 16 a et b

FIG 17 a et b

FIG 18

1.4- CONCLUSION :

D'après les résultats, on peut définir le meilleur temps d'irradiation ; en effet après trois minutes d'exposition sous UV, le taux d'haploïdie est de 69,76 %, il s'agit du meilleur pourcentage d'haploïdie observé.

Ce résultat a été par la suite corroboré par d'autres manipulations, les embryons étant traités par Aphidicholine.

Grâce à ces manipulations on peut déterminer une plage optimale d'exposition sous UV. Ces plages de temps seront reprises par la suite pour observer une possible reproductibilité des manipulations, ce qui n'est pas forcément évident.

FIG : 13 a

ANALYSE DE PLOIDIE

Le
Référence de la lame
Examen reçu le

: 5/6/1992
: TEMOIN NON IRRADIE
: 5/6/1992

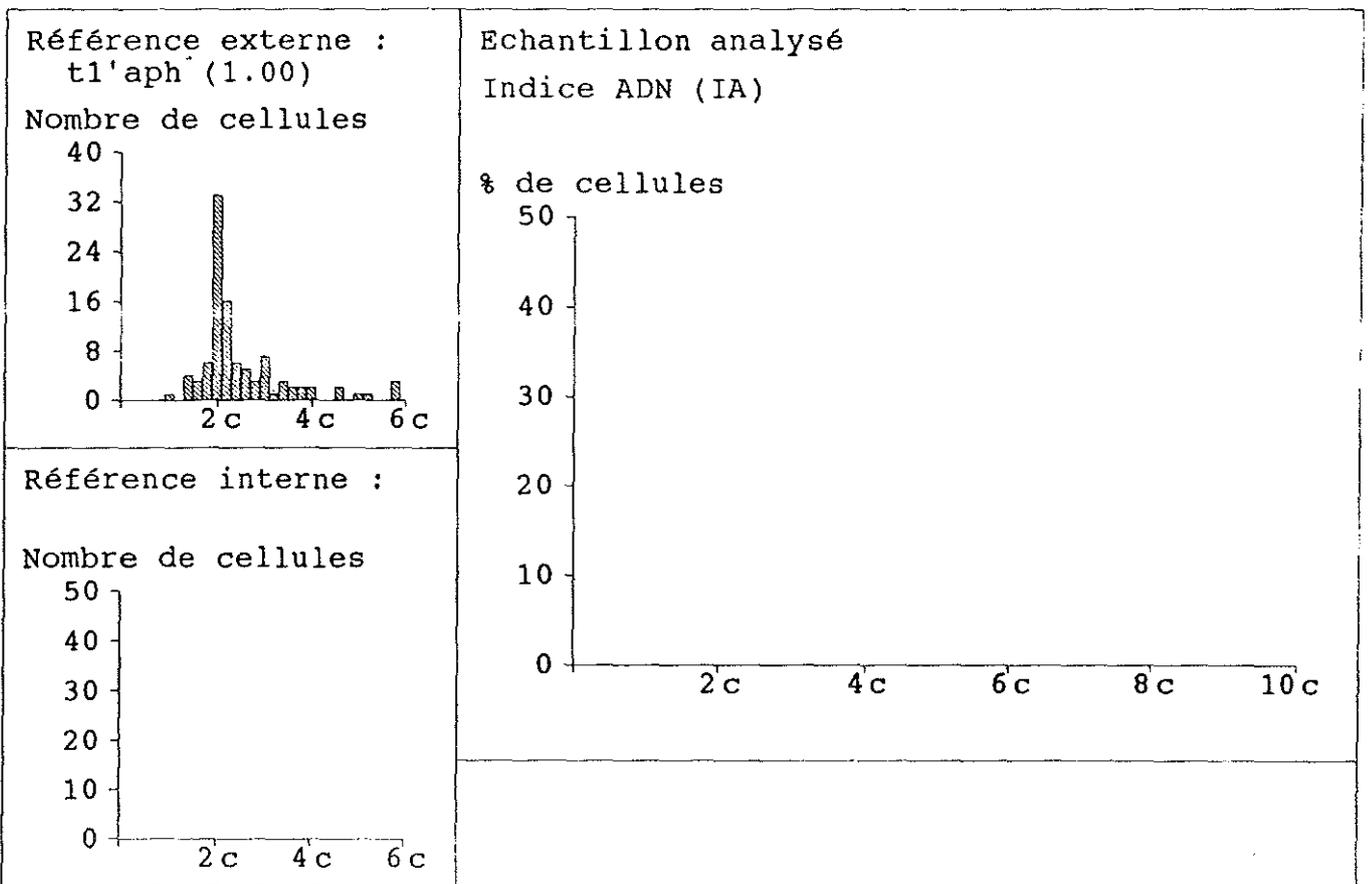


FIG : 13 b

Le Vendredi 12 Juin 1992 à 12:54
Fichier : T1'APH.SRC
Objets : 96

Décomposition en Gaussiennes

	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	13835.27083	3960.91188	1.0000	96

Fréquence (%)

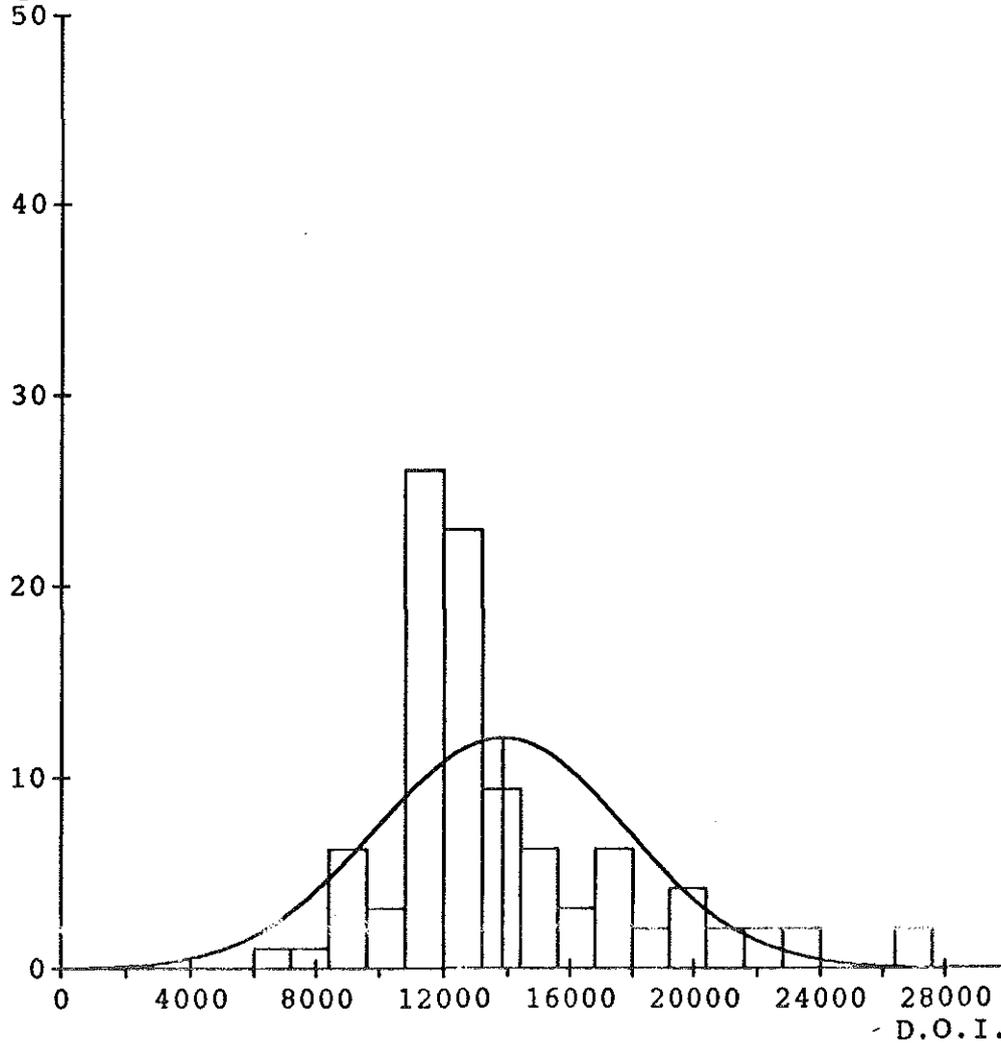


FIG : 14 a

ESSAI A 1min D'IRRADIATION

ANALYSE DE PLOIDIE

Le :
Référence de la lame :
Examen reçu le :

5/6/1992
UV'1MIN!
5/6/1992

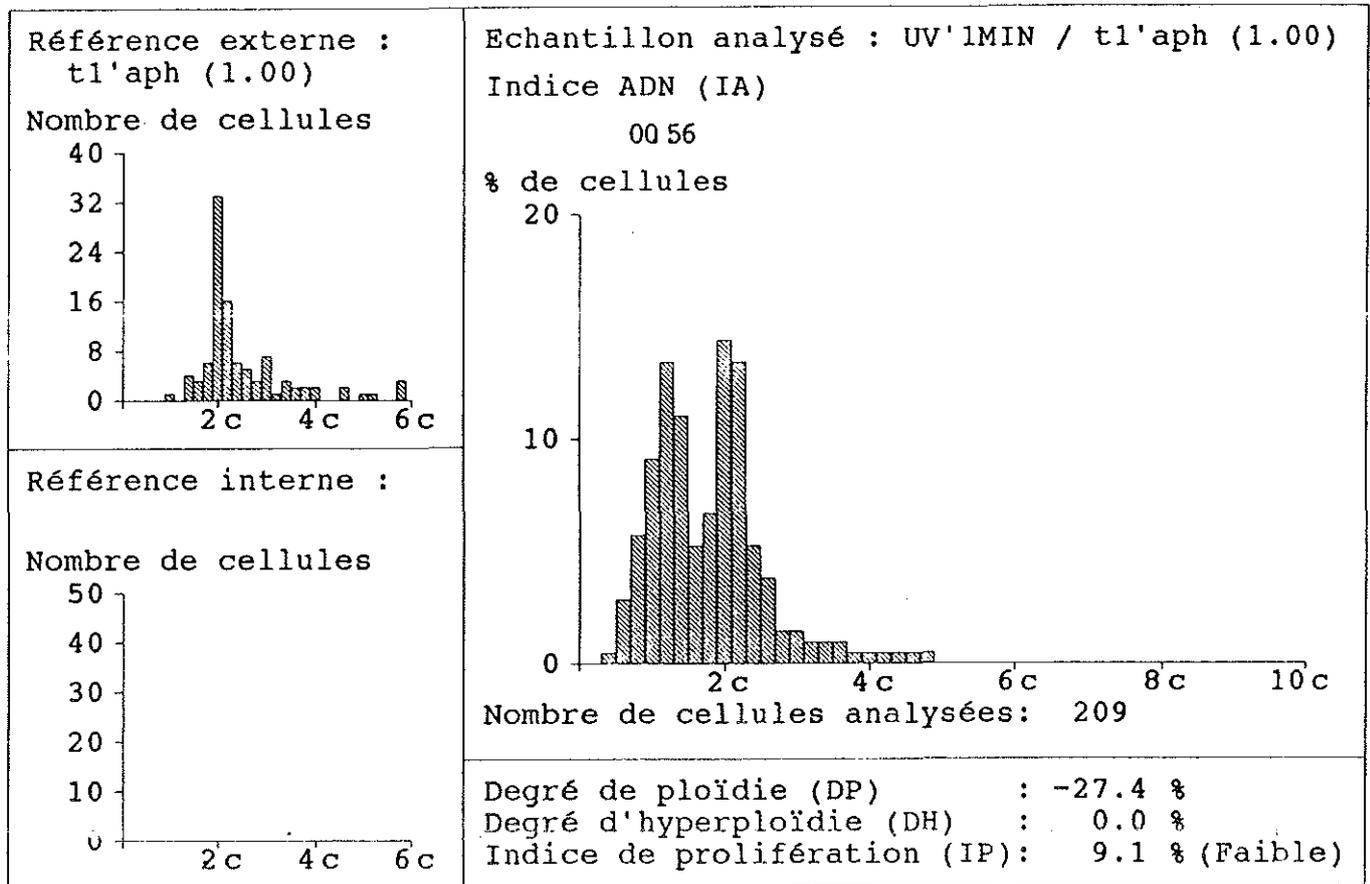


FIG : 14 b

Le Vendredi 12 Juin 1992 à 12:58
Fichier : UV'1MINA.SRC
Objets : 198

Décomposition en Gaussiennes				
	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	6800.90909	1634.18207	0.5000	99
2:	12862.52525	1733.91076	0.5000	99

Fréquence (%)

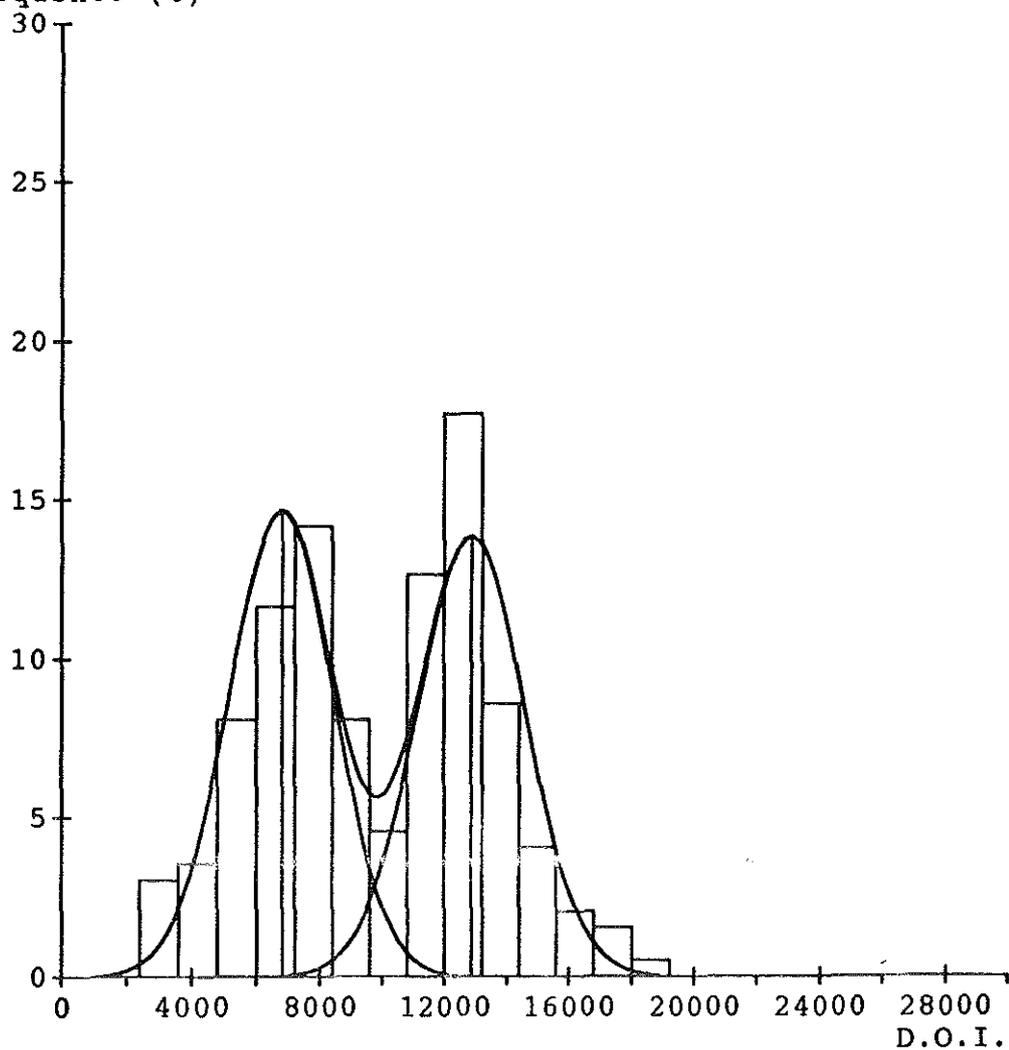


FIG : 15 a

ESSAIS A 2 min D'IRRADIATION

ANALYSE DE PLOIDIE

Le : 6/6/1992
Référence de la lame : UV'2MIN
Examen reçu le : 6/6/1992

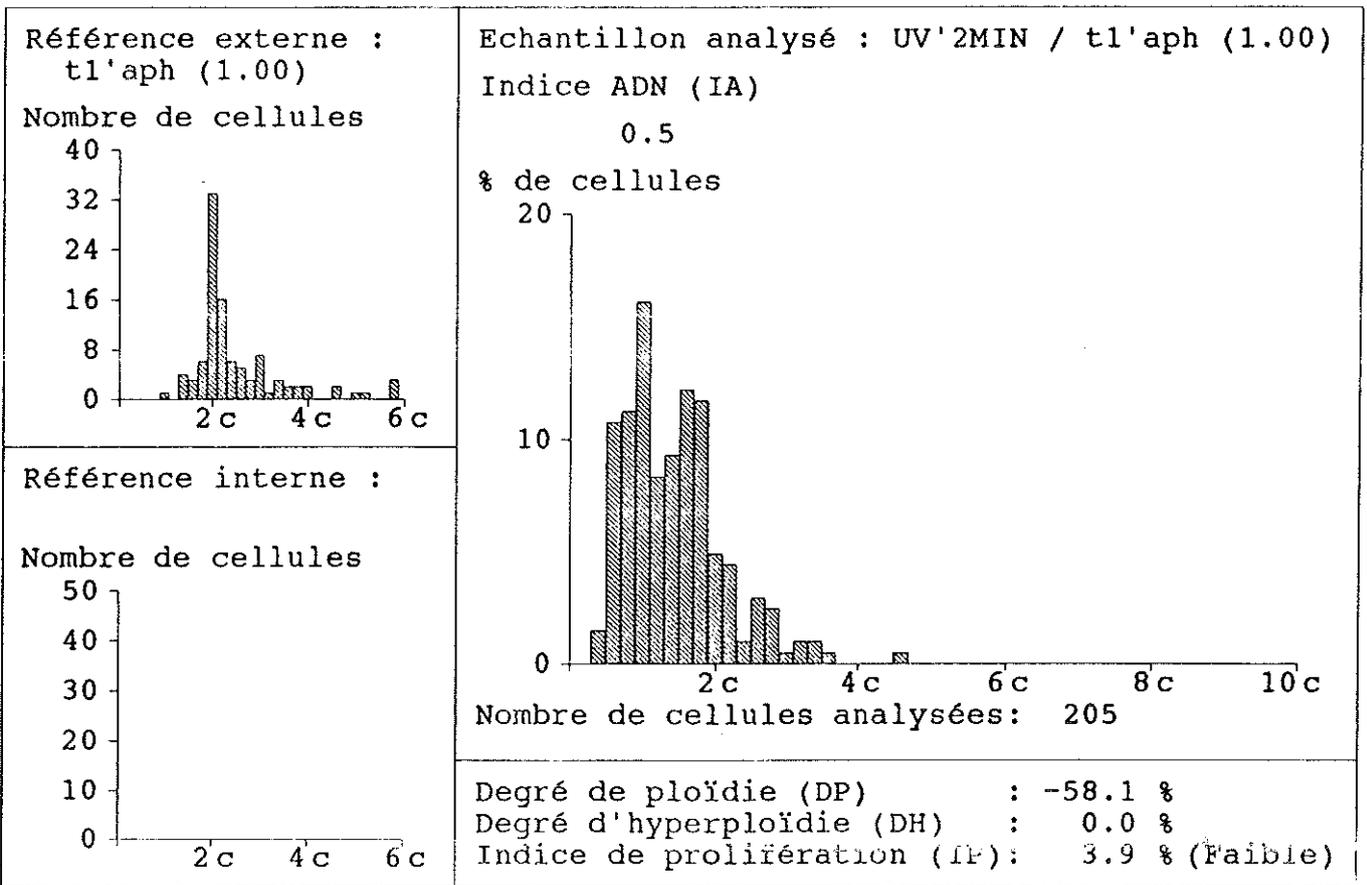


FIG : 15 b

Le Vendredi 12 Juin 1992 à 13:01
Fichier : UV'2MINA.SRC
Objets : 196

Décomposition en Gaussiennes				
	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	5294.88119	1363.03734	0.5153	101
2:	10796.30526	2125.65415	0.4847	95

Fréquence (%)

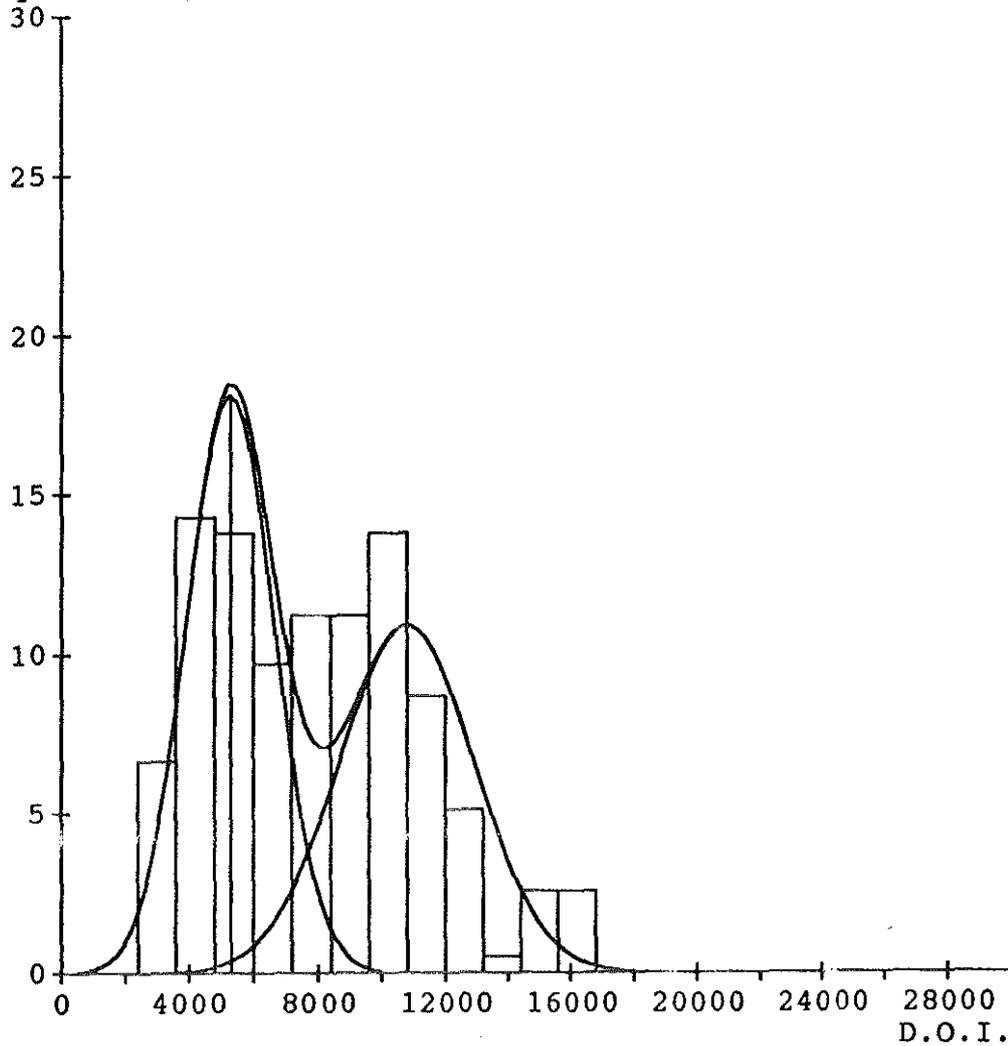


FIG : 16 a

ESSAIS A 3min D'IRRADITION

ANALYSE DE PLOIDIE

Le : 6/6/1992
 Référence de la lame : UV'3MIN
 Examen reçu le : 6/6/1992

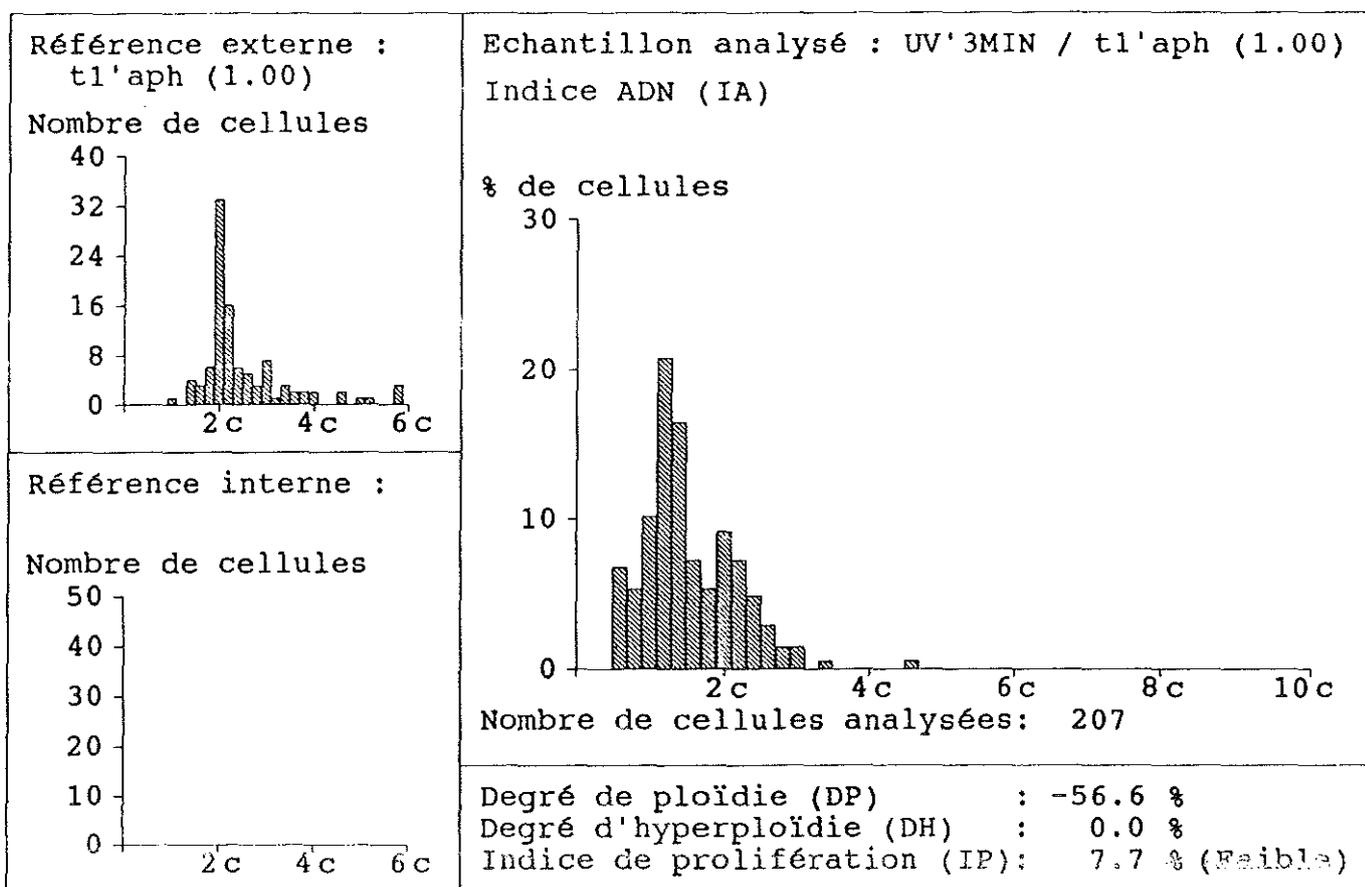


FIG : 16 b

Le Vendredi 12 Juin 1992 à 13:03
Fichier : UV'3MINA.SRC
Objets : 205

Décomposition en Gaussiennes

	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	6956.86713	1777.25649	0.6976	143
2:	13085.33871	1884.39119	0.3024	62

Fréquence (%)

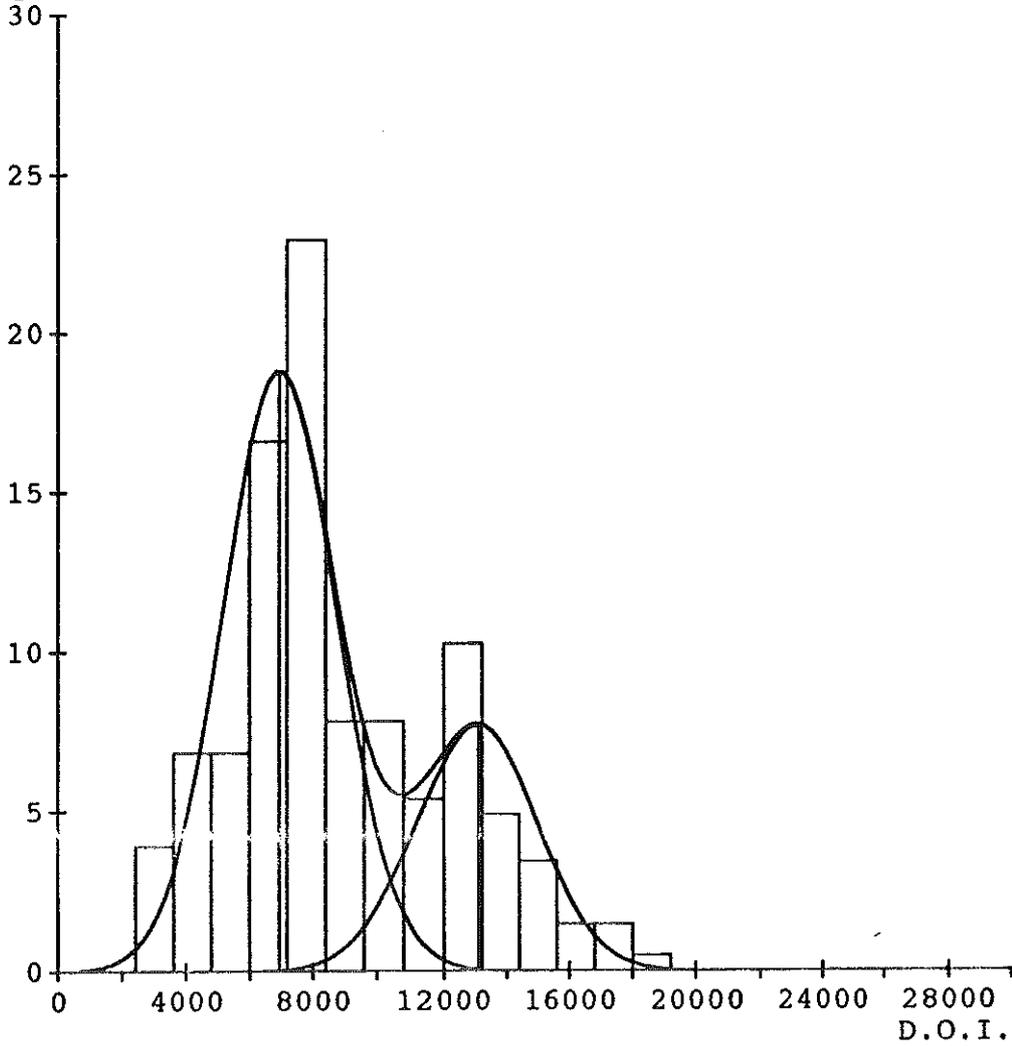


FIG : 17 a

ESSAIS A 4min D'IRRADIATION

ANALYSE DE PLOIDIE

Le : 6/6/1992
 Référence de la lame : UV'4MIN
 Examen reçu le : 6/6/1992

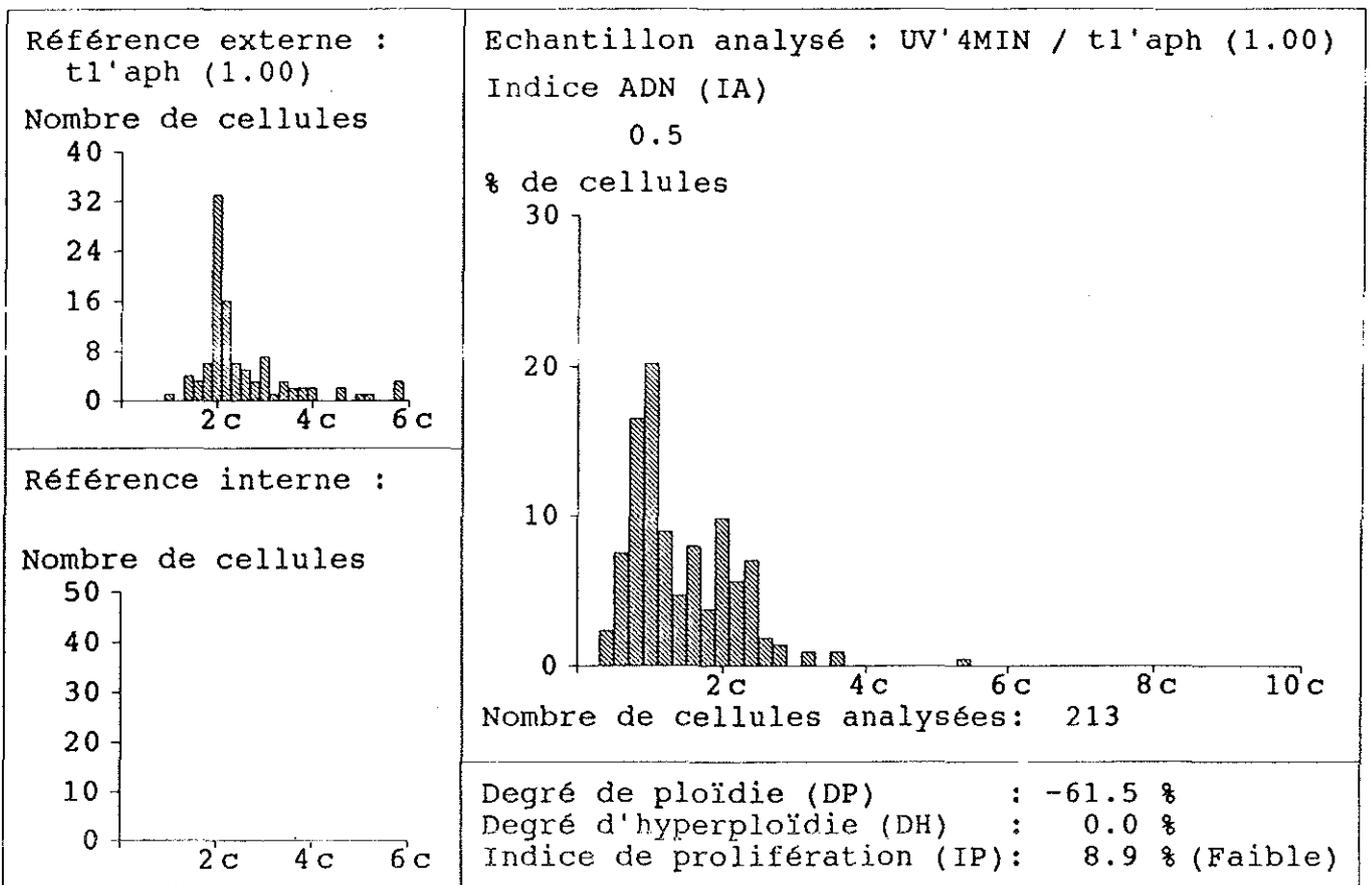


FIG : 17 b

Le Vendredi 12 Juin 1992 à 13:05
Fichier : UV'4MINA.SRC
Objets : 208

Décomposition en Gaussiennes

	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	6749.04615	1485.19872	0.6250	130
2:	13409.96154	1896.19441	0.3750	78

Fréquence (%)

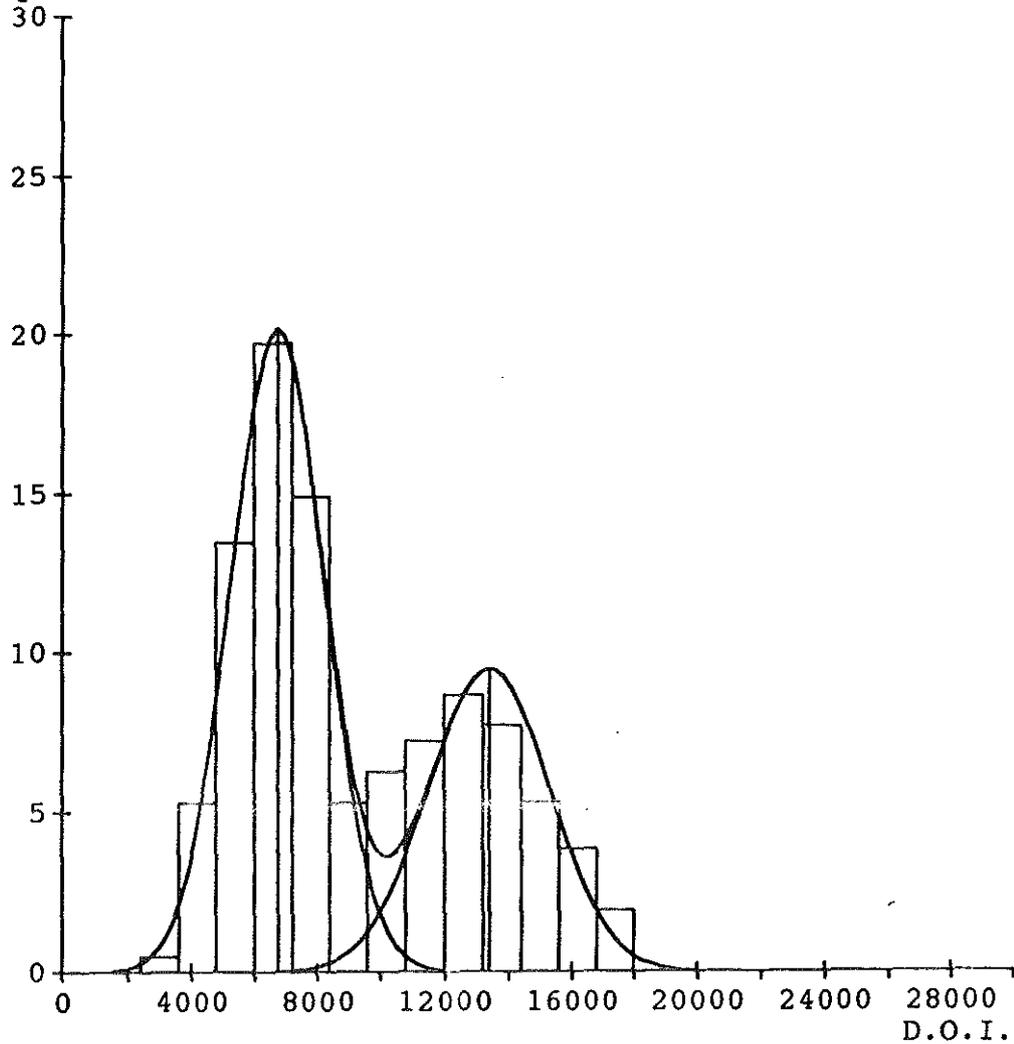
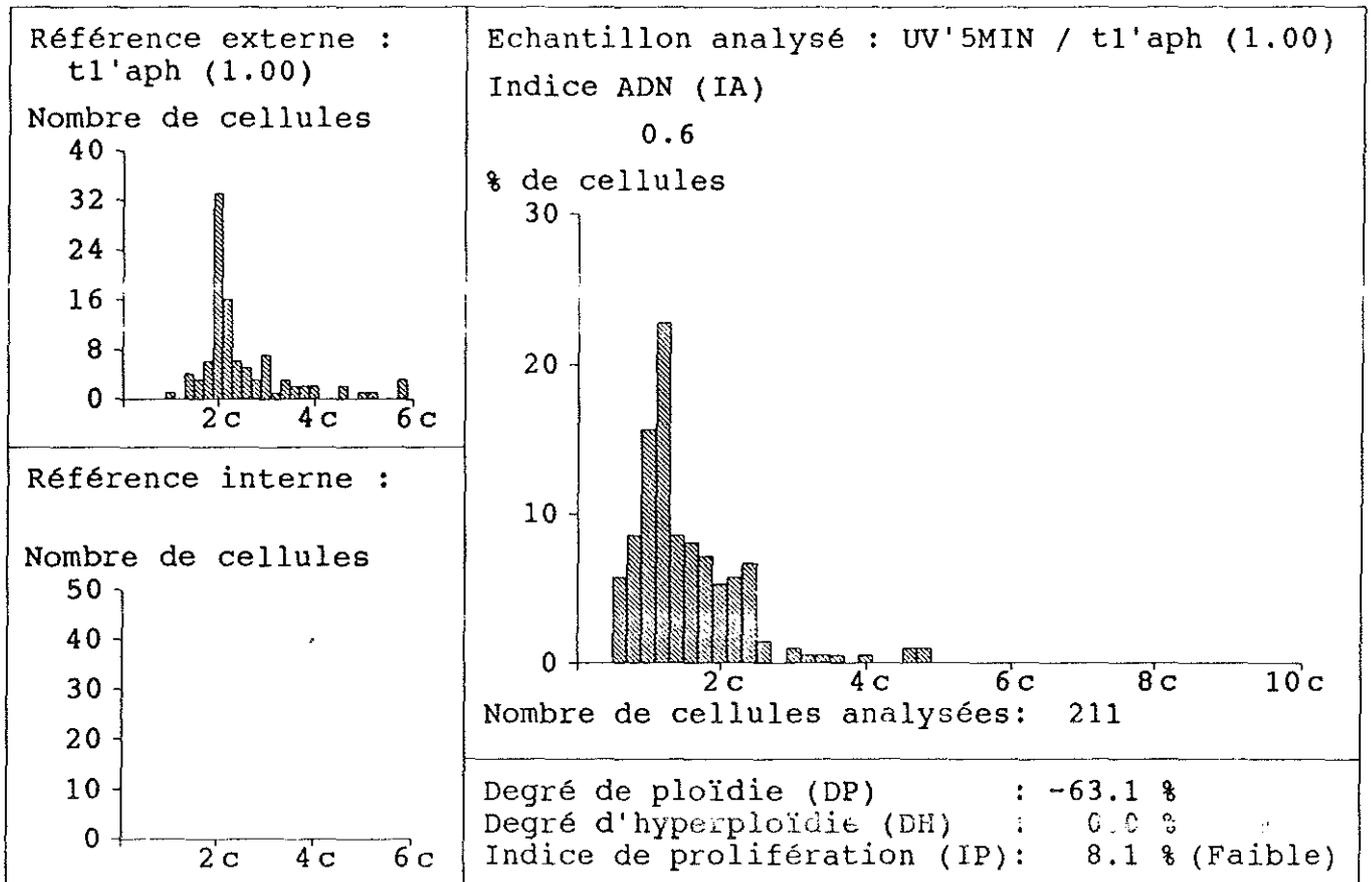


FIG : 18

ESSAIS A 5 min D'IRRADIATION

ANALYSE DE PLOIDIE

Le : 6/6/1992
 Référence de la lame : UV'5MIN
 Examen reçu le : 6/6/1992



1.5- PERSPECTIVES :

La suite de ces manipulations est caractérisée par la restauration de la diploïdie pour obtenir une gynogénèse. Cette restauration se fera grâce à la Cytochalasine B.

Puis il y aura un suivi des larves en éclosérie pour déterminer le taux de survie, et ainsi déterminer l'intérêt ou non de ce type de manipulations.

2- ELECTROPHORESES DES PROTEINES CHEZ L'HUITRE *CRASSOSTREA GIGAS* :

BUT :

Il s'agit de mettre en place des protocoles reproductibles d'électrophorèses de protéines ; l'objectif étant de rechercher des marqueurs génétiques pour la caractérisation des animaux, dans la protection des produits issus de schémas d'amélioration génétique, comme aide à la sélection, et pour permettre le suivi des populations.

La recherche de marqueurs génétiques est indispensable pour caractériser les animaux, vérifier leur degré d'homozygotie, et mettre en évidence leur origine parentale.

Deux types de marqueurs sont utilisables en routine :

- les marqueurs mendéliens :
caractères morphologiques à déterminisme génétique de type mendélien.

- les marqueurs enzymatiques :
ce sont les plus couramment employés, l'électrophorèse d'isoenzymes* représente l'outil de base pour l'analyse génétique de populations et le contrôle de lots d'animaux.

D'autres marqueurs sont également envisageables, mais ils nécessitent l'application de techniques plus lourdes :

- les marqueurs chromosomiques.

- les marqueurs génétiques dans l'ADN mitochondrial.

2.1- PRINCIPE GENERAL :

Le principe de l'électrophorèse (mot dérivé du grec, qui désigne le transport par électricité) est connu depuis la fin du XIXe siècle.

Il est possible, à partir d'extraits bruts n'ayant subi aucune purification préalable, et contenant des milliers de protéines différentes, de caractériser des isoenzymes. Les isoenzymes (ou isozymes) désignent des grandes classes d'enzymes : estérases, phosphatases, kinases, alkalases... Chaque individu les possède toutes : elles sont indispensables au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire.

On ne cherche donc pas à montrer que deux individus différents le sont sur l'existence ou l'absence d'estérases ou de phosphatases, mais sur les types d'estérases ou de phosphatases présents.

Dans chaque organisme, le nombre d'isoenzymes ayant une activité catalytique donnée est généralement faible ; de plus un petit nombre de bandes colorées apparaissent sur les gels (on parle alors de zymogramme). Chaque bande correspond à une protéine distincte dont la synthèse est contrôlée par un, deux, ou plusieurs gènes.

A l'heure actuelle, l'électrophorèse des protéines est la seule technique qui permette d'étudier sur un même individu, plusieurs dizaines de gènes à la fois.

Les techniques d'électrophorèse sur gel en plaque permettent d'analyser simultanément, d'une vingtaine à une trentaine d'individus, ainsi de grands échantillons de la même espèce ou d'espèces voisines peuvent être directement comparés.

-> Préparation des échantillons :

Il faut travailler sur un échantillon du manteau de l'huître, mais le prélèvement ne doit pas entraîner la mort de l'individu. L'extraction et le broyage se font dans des tampons préalablement définis.

-> Fabrication du gel d'amidon :

Le gel d'amidon est préparé en portant à ébullition un mélange d'amidon hydrolysé et d'une solution tampon convenablement choisie. Le tampon avec lequel sera réalisé le gel dépendra donc du système de tampon d'électrophorèse que l'on aura choisi.

-> Introduction des échantillons dans le gel :

Il faut tout d'abord percer des puits verticaux en utilisant le peigne à gel, puis introduire un peu de Bleu de Bromophénol dans les puits. Ensuite on trempe un rectangle de papier Wattman dans chacun des extraits, et on l'introduit dans les fentes du gel.

-> Migration électrophorétique :

Il faut placer le gel dans la cuve à électrophorèse, la remplir de tampon d'électrodes (correspondant au tampon de gel).

Puis on met en route le système de refroidissement (glace pilée ou eau réfrigérée en continue). Les électrodes sont alors reliées aux bornes de l'alimentation en courant continu, et le voltage délivré est réglé de sorte que le produit de la tension par l'intensité ne dépasse pas 10 watts.

-> Préparation des solutions de révélation :

L'immense majorité des protéines solubles sont incolores et la visualisation de leur emplacement sur le gel, après électrophorèse, s'effectue par des procédés histochimiques, qui permettent soit de colorer les produits de dénaturation de la protéine, ou un corps chimique qui lui est associé ; soit d'obtenir un précipité coloré à l'emplacement de cette protéine en utilisant ses propriétés catalytiques.

Ces solutions peuvent être conservées.

-> Préparation des gels en vue de révélations enzymatiques :

Quand la migration électrophorétique est jugée suffisante, on débranche l'alimentation et on sort le gel du bac.

Le gel, après avoir été entaillé (marque sur la partie anodique qui permet de repérer l'orientation), est découpé en fines tranches horizontales qui seront placées dans des bacs à coloration.

-> Coloration du gel

Chaque tranche peut alors être colorée par une solution de révélation différente. Il faut ensuite fixer cette coloration.

2.2- TECHNIQUES MISES EN PLACE :

A- Préparation de l'huître.

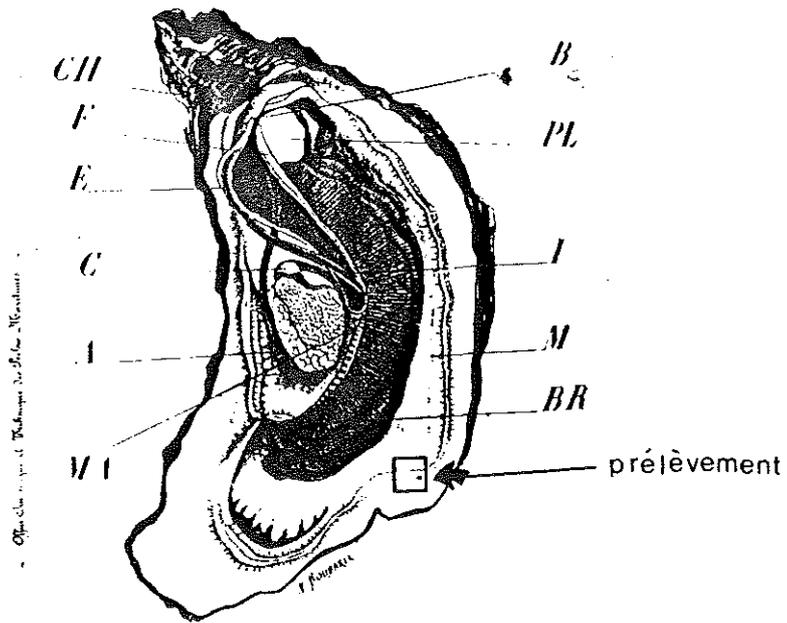
Le but est ici de pratiquer une biopsie afin de ne pas sacrifier l'animal. En effet ce protocole servira à l'analyse d'individus dont la survie est souvent primordiale (géniteurs).

Après avoir pratiqué une ouverture dans la coquille de l'huître, il faut immerger cette dernière dans une solution (chlorure de magnésium - 100 gl^{-1}), qui aura pour effet de paralyser son système nerveux, l'huître va "bailler" sans avoir le réflexe de se refermer au moindre contact. Cette préparation peut durer toute une demie journée. Il faut ensuite prélever un morceau du manteau de l'huître.

FIG : 19

HÛÎTRE PORTUGAÏSE

GRYPHAEA ANGULATA L.



- | | | |
|----------------------|-------------------------|-----------------------|
| CH. Charnière | C. Coeur | PL. Palpes |
| F. Foie | A. Anus | I. Intestin |
| E. Estomac | M. Muscle adduct | M. Manteau |
| | B. Bouche | BR. Branchies. |

— Plaque anatomique de *C. angulata* (anciennement *Gryphaca*).

B- Préparation des échantillons.

Quatre tampons d'extractions ont été essayés (annexe 3), l'extraction est identique pour les quatre tampons.

Pour éviter toute dégradation des protéines, l'extraction se fait dans la glace pilée ; deux techniques de broyage ont été mises en place :

- broyage manuel

Le morceau de manteau est placé au fond d'un potter de 2ml avec 100 ul de tampon d'extraction, le broyage avec le piston se fait pendant plusieurs minutes avec de la glace pilée. Les gros morceaux de manteau restant sont retirés à l'aide d'une pipette Pasteur, le broyage reprend avec 100ul de tampon supplémentaire pendant plusieurs minutes, toujours dans la glace pilée.

L'échantillon est alors transvasé (grâce à une pipette) dans un eppendorf, et conservé dans de la glace pilée.

- broyage mécanique (Ultra Turax)

Le morceau de manteau est placé au fond du potter avec 2ml de tampon d'extraction. Le broyage par l'Ultra Turax se fait dans la glace pilée pendant environ deux minutes. On prélève 200 ul broyat liquide que l'on place dans un eppendorf et que l'on conserve dans de la glace pilée.

Au niveau de l'extraction, le protocole est identique quelle que soit la technique de broyage utilisée.

Centrifugation des eppendorfs : - 4°C
- 5 mn
- 2 000 tr/mn

Les eppendorfs sont conservés à -180°C (culot + surnageant), il s'agit toujours de bloquer l'activité enzymatique ; de plus cela facilite l'extraction en favorisant l'éclatement des cellules (les cristaux de glace qui se forment dans le cytoplasme des cellules perforent les membranes).

C- Préparation du gel.

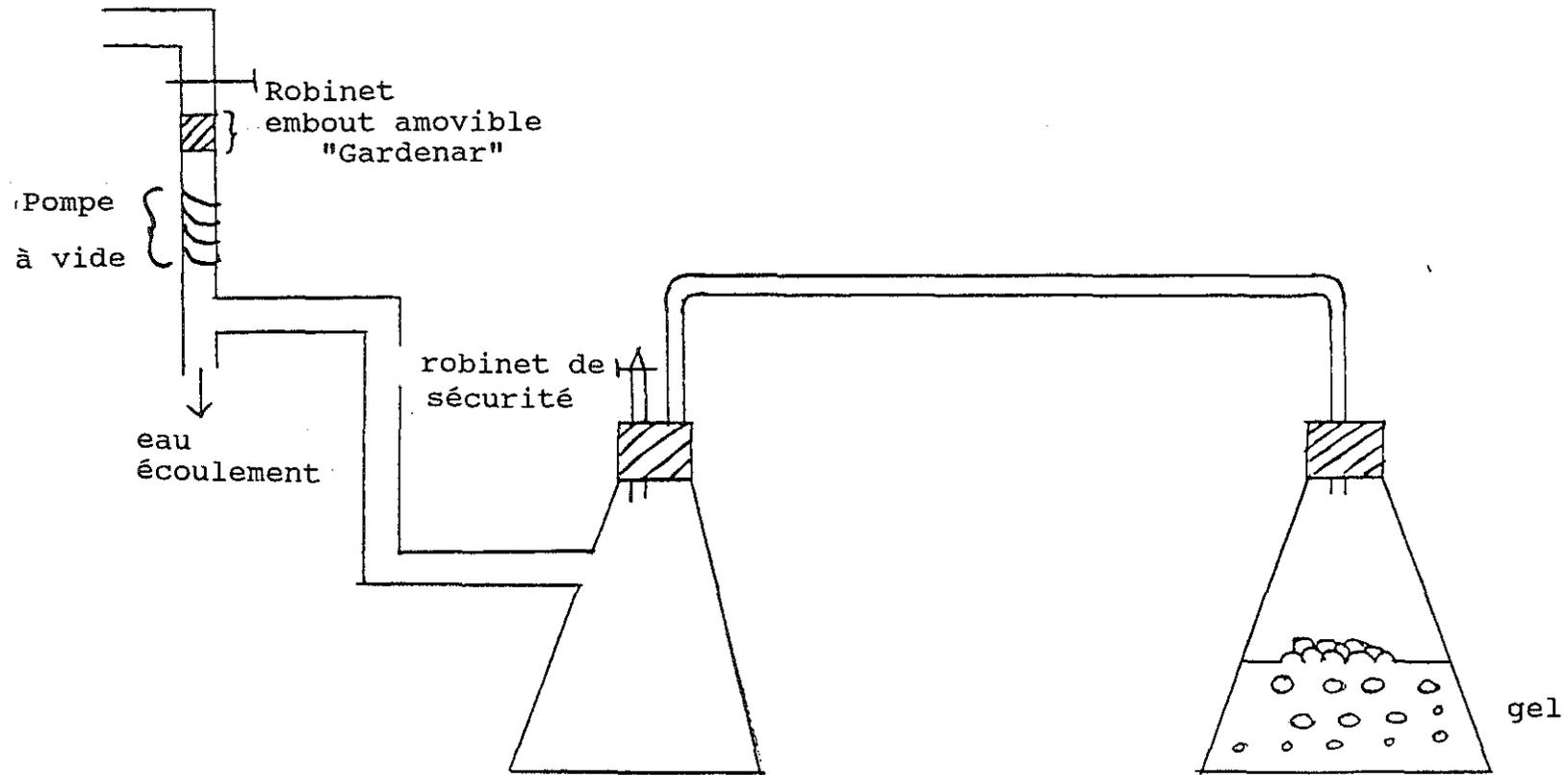
La préparation du gel se fait à chaud :

- 400 ml de tampon de gel (annexe 4)
- 48 g d'amidon

Le problème qui se pose est la formation de bulles dans le gel, bulles qu'il faut éliminer car elles freinent ou empêchent la migration des protéines. Pour pallier à ce problème, il faut effectuer un dégazage grâce à un système de trompe à vide.

Fig 20

FIG : 20



Installation de la pompe à vide

NB : le vide peut créer une implosion, d'où une surveillance continue de la pression.

Le gel peut alors être coulé sur son support, les puits seront faits après sa prise en masse.

D- Electrophorèse.

Les échantillons sont sortis du congélateur, à température ambiante, la décongélation est rapide.

Des lamelles de papier Wattman ont été découpées en fonction des dimensions des puits. Le papier est plongé dans un des eppendorfs, et placé dans le puits.

NB : avant de placer les échantillons dans les puits du gel, il faut relever le plan des échantillons, c'est à dire, repérer les puits pour savoir ce qu'ils contiennent.

Tous les puits sont recouverts de bleu de Bromophénol, colorant inerte qui permettra au manipulateur de repérer l'avancée du front de migration tout au long de l'électrophorèse.

La migration peut alors commencer, le gel est placé dans une cuve à électrophorèse, et recouvert de tampon à électrode (annexe 4) qui permet d'établir la jonction entre les électrodes et le gel.

Le problème qui se pose alors se situe au niveau du choix de la tension, de l'intensité, ou de la durée de migration. En effet, de ces trois critères dépend la migration des protéines.

E- Préparation des solutions de révélation.

Les systèmes de révélations (annexe 5) seront modifiés et remplacés au cours des différentes électrophorèses. En effet, certains pourront donner des résultats intéressants, d'autre aucun résultats, ils seront donc mis de côté.

F- Révélation.

La migration, si elle jugée suffisante, peut être stoppée ; le gel est alors sorti de la cuve et peut être préparé en vue des différentes révélations.

Le côté droit anodique du gel est coupé en biais, de façon à conserver au cours des manipulations, un repère de l'ordre du dépôt des échantillons. Les papiers au niveau de l'origine sont enlevés.

Le gel est alors placé sur une planche à découper, sur laquelle on va séparer de manière horizontale, plusieurs tranches (cinq tranches dont quatre utilisables), avec "un fil à couper le beurre". Les différentes tranches sont placées dans

des bacs de coloration et recouvertes de solutions de révélations.

Lors de la révélation, l'attente est fonction du système de révélation utilisé (annexe 5).

G- Conservation.

Une fois la révélation faite, il faut la fixer pour la conserver. Pour cela il faut rejeter la solution de révélation en retenant le gel et la remplacer par le fixateur (annexe 6).

Pour garder une trace de l'électrophorèse, il est souhaitable de prendre une photographie sur une table lumineuse.

2.3- RESULTATS OBTENUS :

Electrophorèse 1 :

Deux huîtres *Crassostrea gigas* broyées manuellement.

Une huître *Crassostrea gigas* broyée mécaniquement.

Tampons d'extraction : THE pH 7

TH pH 7

THE pH 6,9

TS pH 7,4

Tampon de gel et d'électrode : TRIS CITRATE

Migration : 40 -> 50 mA
6h30mn

FIG : 21

Avec le système Pgi, on ne peut observer aucune différence entre les huîtres, mais la coloration est nette, il y a donc une bonne réactivité (FIG : 21a).

Avec le système Aat, on peut observer une nette différence entre les deux huîtres broyées manuellement (bande bleue), et l'huître broyée mécaniquement (aucune bande), il semblerait que ce système de révélation soit sensible (FIG : 21b).

Avec le système Mdh, aucune révélation n'est visible (FIG : 21c).

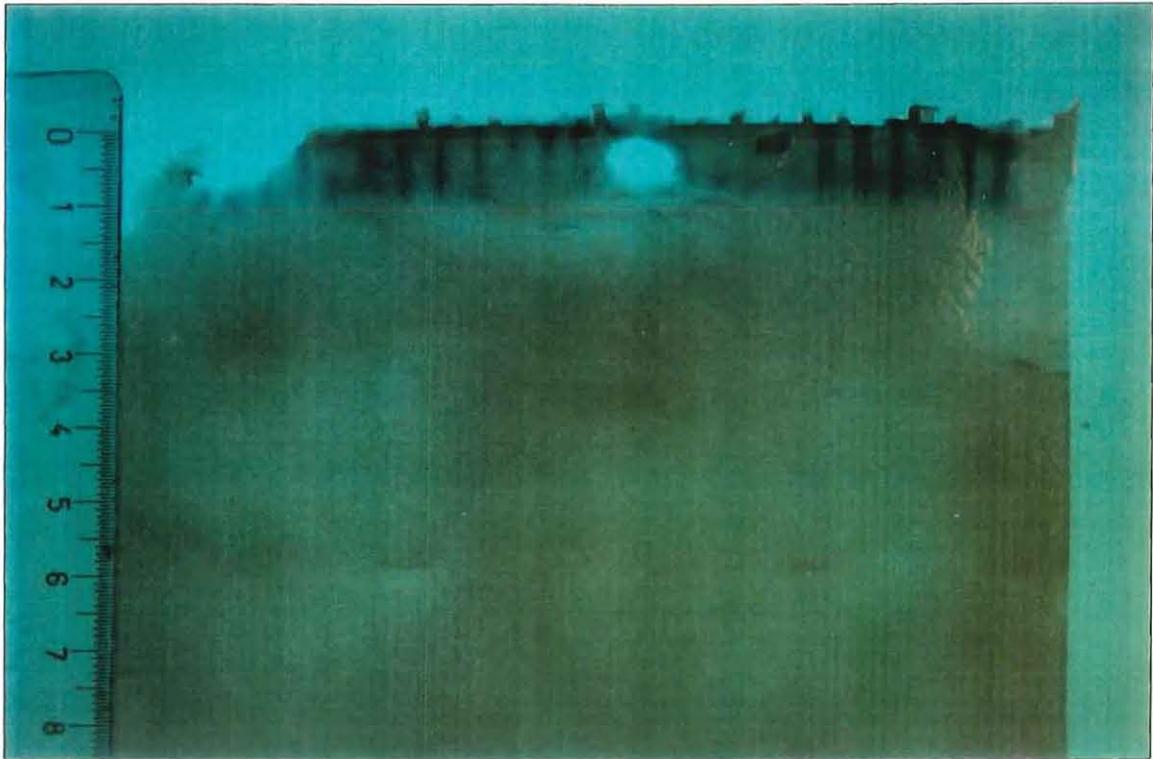
Avec le système Pgm, on observe une coloration, il y a donc eu réaction, mais il ne s'agit que de traces (mauvais état du gel). Ce système est donc à reprendre.

Electrophorèse 2 :

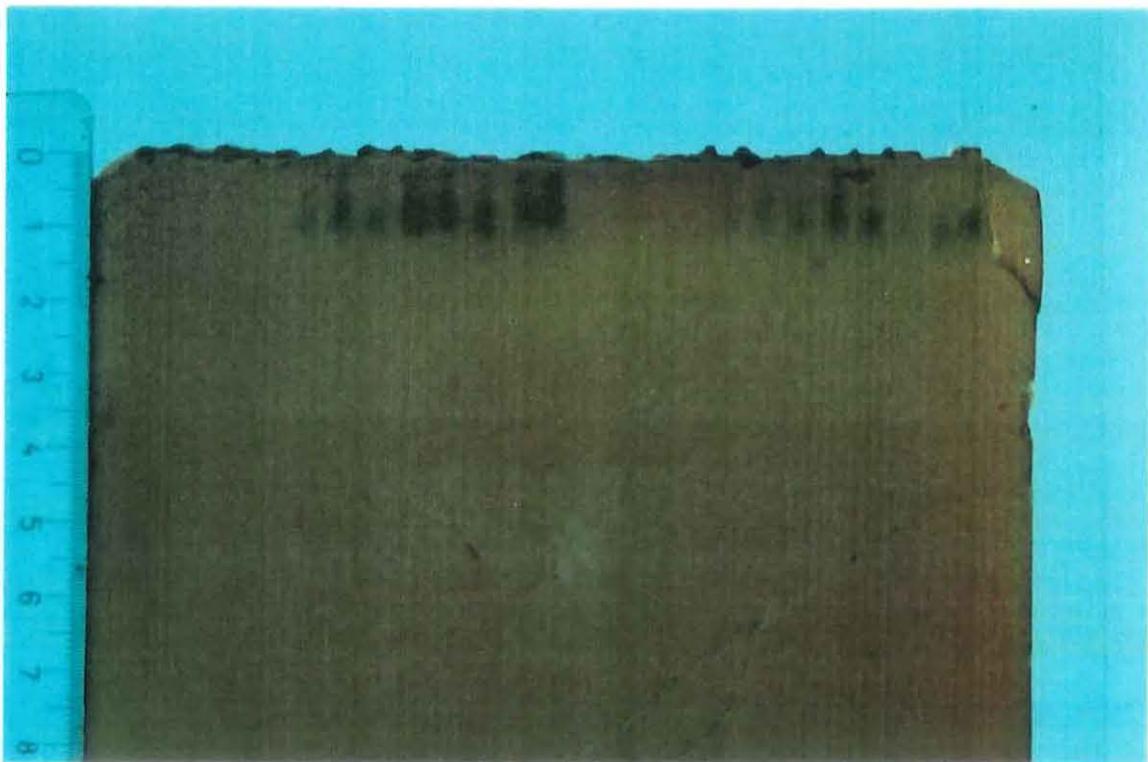
Deux huîtres *Crassostrea gigas* broyées manuellement.

Deux huîtres *Crassostrea gigas* broyées mécaniquement.

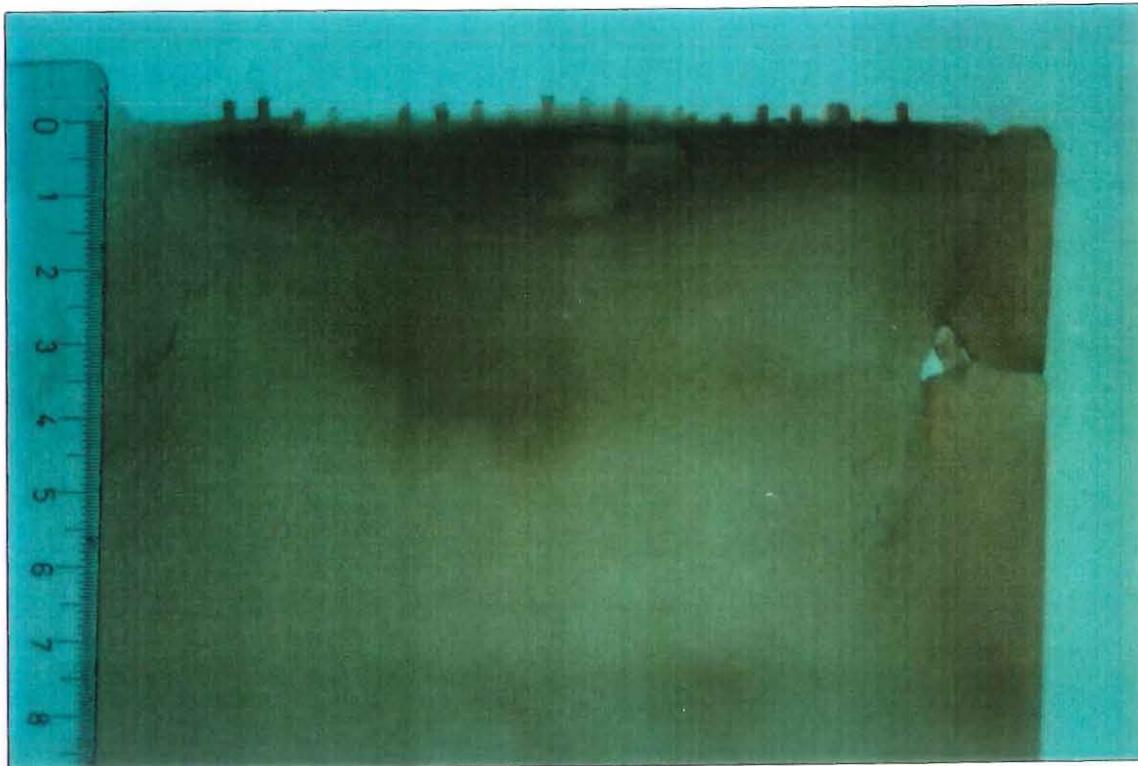
ELECTROPHORESE 1



a : système de révélation Pgi.



b : système de révélation Aat.



a : système de révélation Mdh.

Tampons d'extraction : THE pH 7

TH pH 7

THE pH 6,9

TS pH 7,4

Tampon de gel et d'électrode : TRIS CITRATE

La longueur du gel a été réduite pour augmenter le rapport mA/cm³ de gel.

Migration : 45 mA
6 heures

FIG 22

Avec le système Pgi, on observe une bonne révélation, mais aucune différence n'est visible entre les huîtres (FIG : 22a).

Avec le système Aat, on observe des traces, mais le mauvais état du gel ne permet pas de déterminer s'il existe une différence entre les huîtres (FIG : 22b).

Avec le système Pgm, on observe des différences entre les huîtres, de plus la migration permet d'obtenir un zymogramme relativement net.

Electrophorèse 3 :

Deux huîtres *Crassostrea gigas* broyées manuellement.
Deux huîtres *Crassostrea gigas* broyées mécaniquement.

Tampons d'extraction : THE pH 7

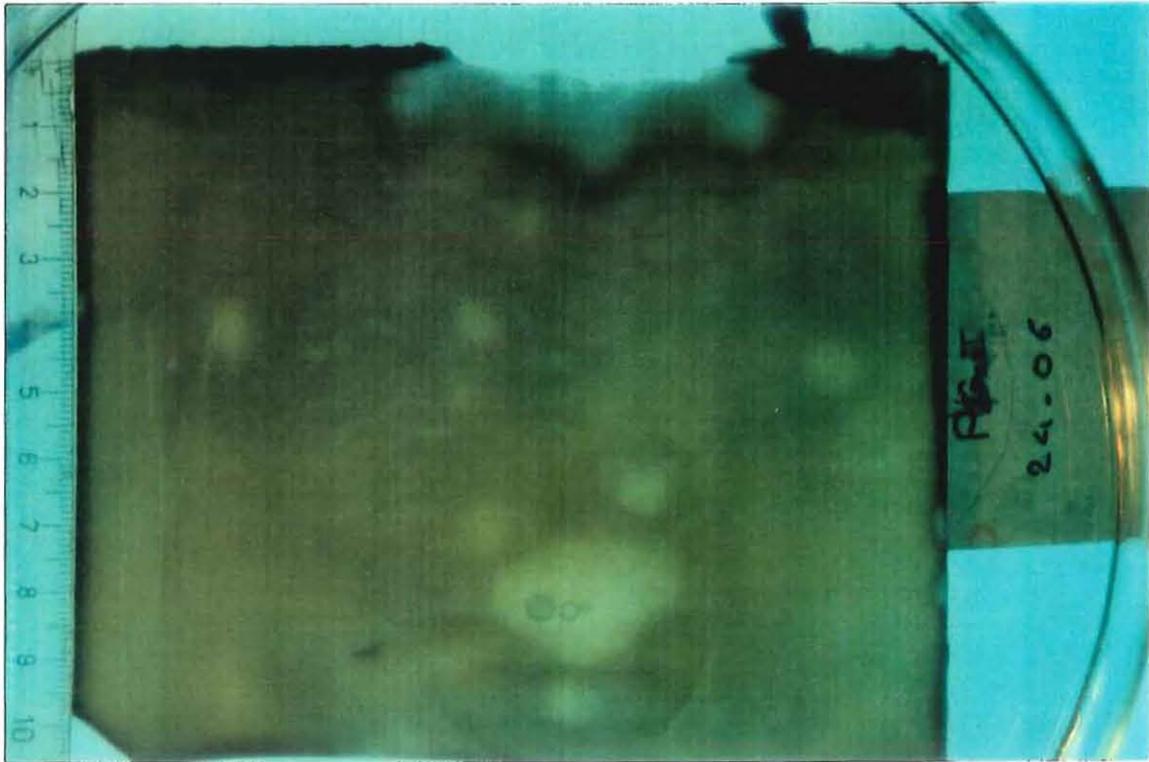
TH pH 7

THE pH 6,9

TS pH 7,4

Tampon de gel et d'électrode : TRIS CITRATE

ELECTROPHORESE 2

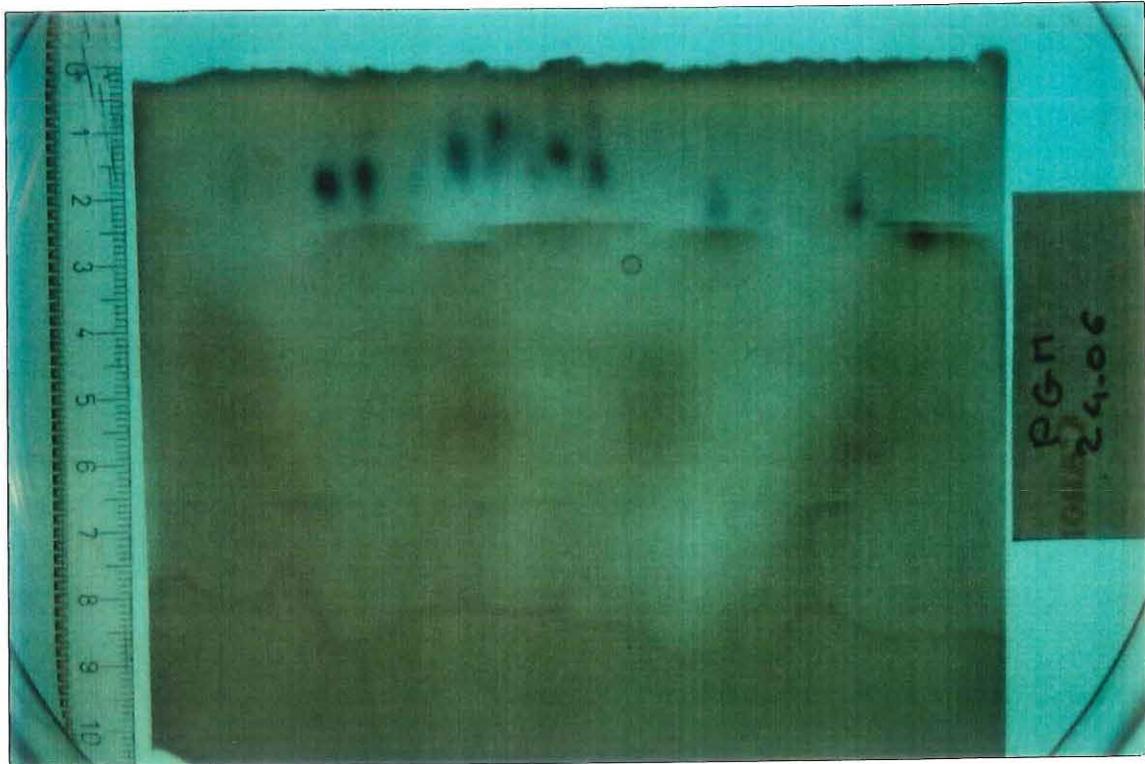


a : système de révélation Pgi.



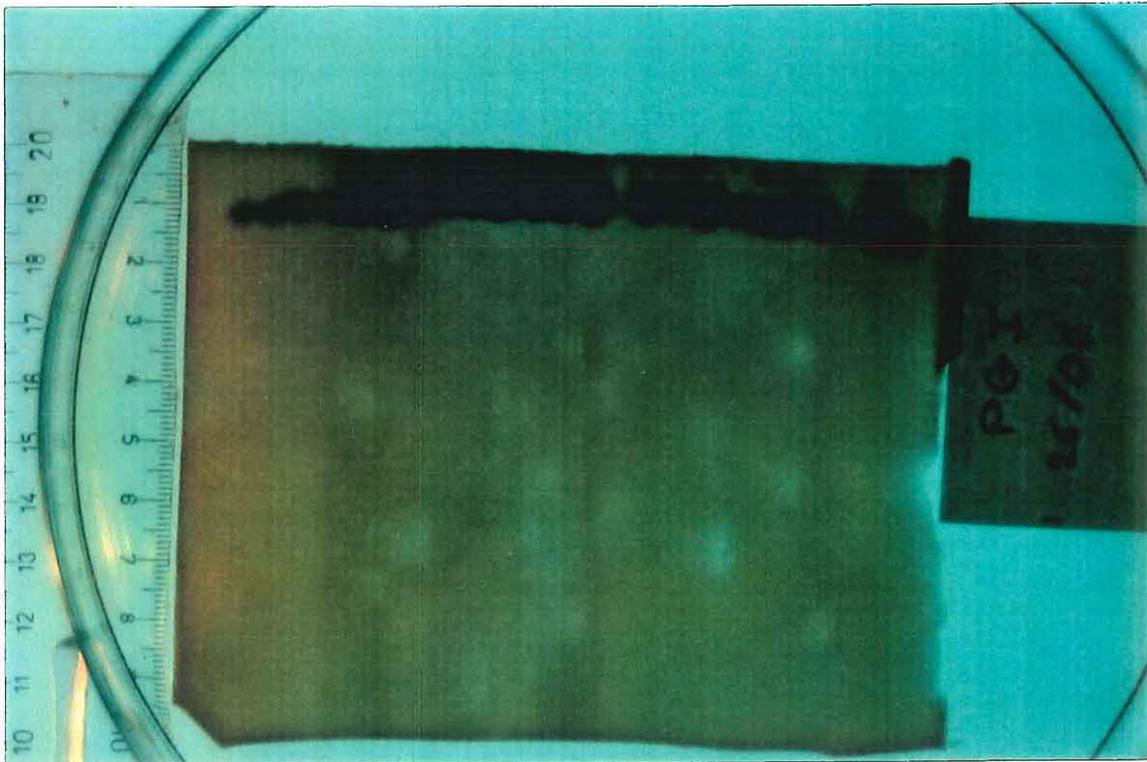
b : système de révélation Aat.

FIG : ' 22 (suite)

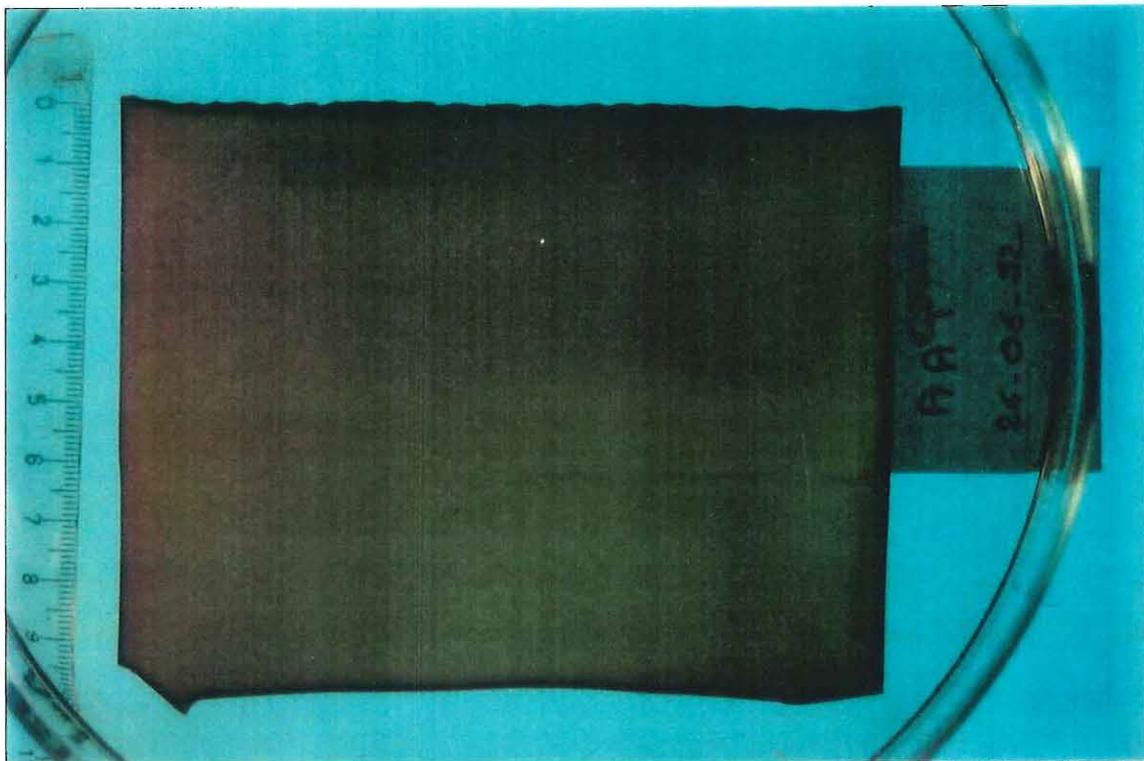


a : système de révélation Pgm.

ELECTROPHORESE 3

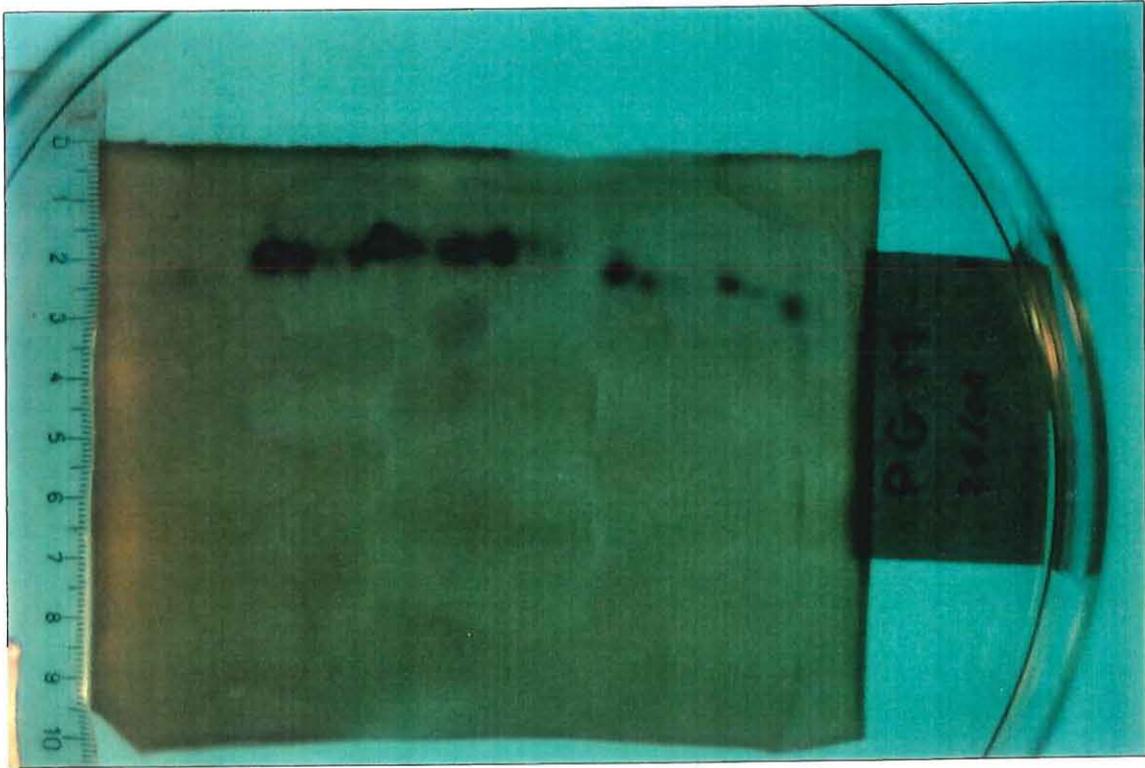


a : système de révélation Pgi.

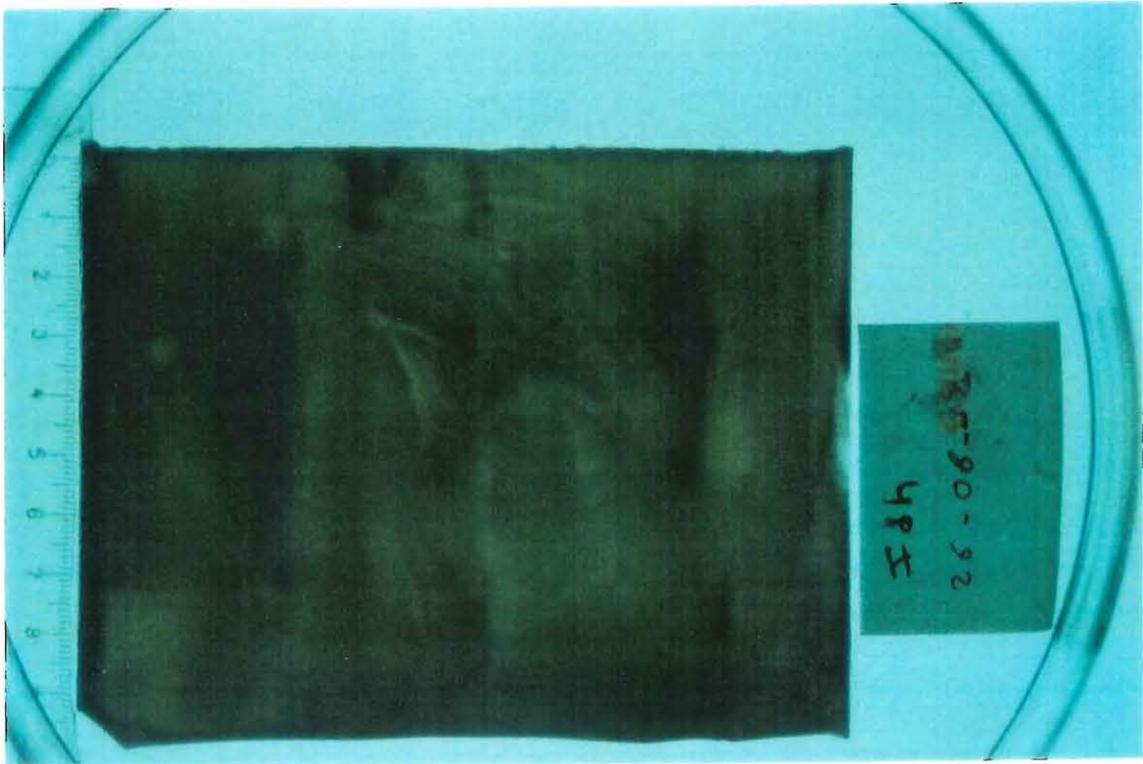


b : système de révélation Aat.

FIG : ' 23 (suite)



a : système de révélation Pgm.



b : système de révélation Idh.

La longueur du gel a été réduite pour augmenter le rapport mA/cm³ de gel.

Migration : 45 mA pendant 5 heures
40 mA pendant 1 heure
6 heures

FIG : 23

Avec le système Pgi, on observe une bonne révélation, mais toujours aucune différence entre les huitres (FIG : 23a).

Avec le système Aat, la révélation est moins nette, mais une différence est observable entre les huitres (FIG : 23b).

Avec le système Pgm, le zymogramme est net malgré la mauvaise migration ; de plus les différences observées avec le système Aat se retrouvent ici (FIG : 23c).

Avec le système Idh, on observe quelques traces (FIG : 23d).

2.4- CONCLUSIONS :

Au cours de ces premières manipulations, il évident que les résultats obtenus ne permettent aucune conclusion quant au marqueurs recherchés. En effet, malgré différentes sources bibliographiques, une électrophorèse de ce type ne peut s'improviser. De plus l'achat d'un kit d'électrophorèse a soulevé plusieurs problèmes techniques :

- le peigne de gel, trop épais, a du être limé de moitié afin de favoriser le contact entre les échantillons et le gel.
- La mise en route du système de refroidissement.
- Le choix de la tension et de l'intensité délivrées par le générateur.
- La fabrication du "fil à couper le beurre" dont la tension doit être adaptée à la résistance du gel.

Malgré ces problèmes, des différences sont apparues, surtout au niveau des systèmes de révélation. Il est évident que

certains sont plus sensibles que d'autres, ou complètement inadaptés.

Quelques systèmes peuvent toutefois être retenus :

- Pgi,
- Aat,
- Pgm,
- Idh.

Mais de nombreux autres restent encore à tester.

Il faudrait insister sur le fait que ce sont là les premières expériences faites sur électrophorèse au laboratoire, d'ou les nombreux problèmes rencontrés.

2.5- PERSPECTIVES :

Y. NACIRI, responsable des manipulations, a souhaité obtenir l'avis d'un expert en matière d'électrophorèse (GUILLAUMAR, de l'INRA de Jouy-en-Josas), qui a soulevé deux points intéressant à noter :

- des tampons ayant été trop concentrés, il préconise du 0,1 M pour le tampon de migration et du 0,01 M pour le tampon de gel.
- des conditions de migration inadaptées, il propose de fixer une tension de 300 V et une intensité de 200 mA.

Au moment de la rédaction de ce rapport, aucune manipulation n'avait encore pu corroborer ces suggestions.

Il reste donc beaucoup de chemin à parcourir avant l'exploitation des résultats.

CONCLUSION

La mise au point de protocoles permet d'acquérir une vision toute différentes des expériences en laboratoire. En effet, l'approche est différente des expériences scolaires, il ne s'agit plus d'exécuter, mais de comprendre pourquoi et comment fonctionne une technique de laboratoire.

Il faut également se demander si une expérience déjà pratiquée, et qui a donné des résultats, peut se réaliser dans un contexte différent, si le matériel est adapté.

Mais il faut bien noter que les résultats ne sont pas immédiats et qu'il est constamment nécessaire de répéter et modifier la technique ; de plus, le temps requis est très important.

GLOSSAIRE.1

IFREMER :

Institut Francais de Recherche pour l'Exploitation de la MER.

LABEIM :

Laboratoire de Recherche et d'Ecologie des Invertébrés Marins.

UREA :

Unité de Recherche Ecologie Aquacole.

URRA :

Unité de Recherche Régionale Aquacole.

URGE :

Unité de Recherche Génétique et Ecloserie.

URPIGM :

Unité de Recherche en Pathologie Immunologie et Génétique Moléculaire.

RA :

Ressources Aquacoles.

GLOSSAIRE. 2

CONCHYLICULTURE :

Culture des mollusques.

EPIZOOTIE :

Nom générique pour désigner les diverses maladies contagieuses atteignant un grand nombre d'animaux.

CASSE :

En conchyliculture il s'agit d'un très fort taux de mortalité au sein d'un cheptel.

HAPLOIDE :

Se dit du noyau d'une cellule contenant n chromosomes.

DIPLOIDE :

Se dit du noyau d'une cellule contenant 2n chromosomes.

TRIPLOIDE :

Se dit du noyau d'une cellule contenant 3n chromosomes.

POLYPLOIDIE :

Etat d'une cellule , d'un tissu ou d'un organisme qui possède plus de deux génomes de base, ceux-ci pouvant être homologues ou non selon que la ploïdie provient d'un doublement chromosomique ou d'une hybridation interspécifique naturelle ou artificielle.

MOLLUSQUES BIVALVES :

Mollusques aquatiques dont le manteau dorsale présente deux zones symétriques droite et gauche de calcification, qui s'étendent en direction ventrale et sont à l'origine des deux valves de la coquille (= BIVALVES).

Exemples :

 moule
 huître
 coque
 couteau ...

CROISSANCE SOMATIQUE :

Croissance qui concerne les cellules non germinales , il s'agit d'une augmentation de la taille et de la masse de l'individu.

HYBRIDATION :

Union fertile entre deux individus appartenant à deux espèces animales (ou végétales) différentes.

PARASITOSE :

Maladie provoquée par un parasite.

GONADOGENESE :

Synthèse des organes sexuels au sein desquels se forment les cellules reproductrices (gamètes).

STRIPPING :

De l'anglais "striped" rayé, zébré.

Il s'agit de scarifier les gonades avec un scalpel pour récupérer les gamètes.

GAMETOGENESE :

Synthèse des cellules reproductrices spécialisées.

ISOENZYMES :

Types moléculaires possédant la même activité catalytique.

CYTOGENETIQUE :

Partie de la génétique consacrée à l'étude des relations entre, d'une part, l'origine la morphologie le nombre les variations au cours des divisions cellulaires des structures génétiques nucléaires et cytoplasmiques et d'autre part la transmission et l'expression des gènes portés par ces structures.

ANNEXE : 1

TRAITEMENT DES EMBRYONS

- Faire un choc hypotonique (eau de mer filtrée : 1 ; eau distillée : 3) pendant 20 minutes.

- Eliminer l'eau par centrifugation (1000 rpm, 5 mn).

- Faire trois bains successifs de 15 minutes chacun dans le fixateur de **CARNOY** (éthanol absolu : 3 ; acide acétique : 1), entre chaque bain centrifuger 5 minutes à 1000 rpm.

- Après le dernier bain, enlever le maximum de carnoy.

- Tremper les embryons dans 200 µl d'acide acétique à 50 % pendant 10 minutes (la dissociation est favorisée par quelques pipetages).

- Déposer cette solution sur lame chaude quelque secondes, puis réaspirer la goutte à l'aide de la même pipette (2 dépos par échantillons).

ANNEXE : 2

REACTION DE FEULGEN ROSALINE

Cette réaction n'utilise pas de colorant à proprement parlé.

L'hydrolyse acide des ponts ribose-purine de l'ADN donne des résidus aldéhydes qui en réagissant spécifiquement avec le réactif de Schiff donnent une coloration rose.

La densité de la coloration sera d'autant plus important qu'il y aura d'ADN.

Matériel :

- HCL 5N pour l'hydrolyse acide :
 - HCL concentré (37 %) 431 ml
 - EAU désionisée 569 ml
- Réactif de Schiff
- Bain sulfureux 1l :
 - Métabisulfite de Na/k 0,5 mg
 - HCL 5N 1 ml
 - EAU distillée qsp 1l

Méthode :

- Hydratation à l'eau distillée
10 mn
- Hydrolyse acide
1 heure
- Rinçage à l'eau distillée
4 fois 1 mn
- Réactif de Schiff
1 h 30 (couvert et à l'obscurité)
- Bain sulfureux
4 fois 1 mn
- Eau courante
10 mn
- Eau distillée
3 mn
- Ethanol 100
2 fois 3 mn
- Xylène
2 fois 3 mn
- Monter à l'Eukitt

ANNEXE : 3

TAMPONS D'EXTRACTION

- tampon TRIS-EDTA pH 6,8

TRIS 1,2 g/l à 0,01 M

EDTA 0,37 g/l à 0,001 M

NADP 4 ml à 1 %

Ajuster à pH 6,8 avec de l'HCL concentré

- tampon TRIS-HCL pH 7,0

TRIS 4,84 g/l à 40 mM

Ajuster à pH 7,0 avec de l'HCL concentré

- tampon TRIS-HCL-EDTA pH 7,0

TRIS 1,2 g/l à 0,01 M

EDTA 0,38 g/l à 0,001 M

MnCl₂ 0,198 g/l à 0,001 M

NADP 4 mg/l à 0,005 mM

Ajuster à pH 7,0 avec de l'HCL concentré

- tampon SUCROSE pH 7,4

SUCROSE 70 g à 7 %

TRIZMA 6,06 g/l à 0,05 M

H₃PO₄ 7,80 g à 0,05 M

Ajuster à pH 7,4

ANNEXE : 4

TAMPONS DE GEL ET DE MIGRATION

- tampon TRIS CITRATE pH 8,0
(Aat-Glo-Idh-Mdh-Me-Np-Opdh-Pgm-Pgi-Sod)

tampon d'électrode 5 litres

TRIS à	0,62 M
Acide citrique monohydraté à	0,14 M
H ₂ O 5000 ml	
Ajuster à pH 8 avec TRIS à	1 M
ou Acide citrique à	1 M

tampon de gel 5 litres

tampon d'électrode 160 ml	
H ₂ O 4800 ml	
Ajuster à pH 8 avec TRIS à	1 M
ou Acide citrique à	1 M

- tampon LITHIUM CITRATE BORATE pH 7,0
(Lap-Muest-Npest-est)

tampon d'électrode 5 litres

LITHIUM hydroxyde à	0,05 M
Acide borique à	0,19 M
H ₂ O 5000 ml	
Ajuster à pH 7 avec LiOH à	1 M
ou Acide borique à	1 M

tampon de gel 5 litres

TRIS à	0,046 M
Acide citrique monohydrate à	0,007 M
tampon d'électrode 500 ml	
H ₂ O 4500 ml	
Ajuster à pH 7 avec TRIS à	1 M
ou Acide citrique à	1 M

ANNEXE : 5

SYSTEMES DE REVELATION

- Phospho gluco mutase (Pgm)

Tampon TRIS A	50 ml
MgCl ₂ à 0,5 M	5 ml
Glucose 1 Phosphate	500 mg
NAD à 1 %	1,7 ml
NADP à 1 %	0,8 ml

Ajuster avant l'emploi :

Glucose 1,6 Diphosphate	1,7 mg
Glucose 6 Phosphate Déhydrogénase	10 ul à 17 U
MTT à 1 %	1,7 ml
PMS à 1 %	0,8 ml

Incubation à l'obscurité (30 à 60 mn)

- Phospho gluco isomérase (Pgi)

Tampon TRIS A	25 ml
MgCl ₂ à 0,5 M	2,5 ml
Fructose 6 Phosphate	25 mg
NAD à 1 %	2,5 ml
NADP à 1 %	1,25 ml

Ajuster avant l'emploi :

Glucose 6 Phosphate Déhydrogénase	15 ul à 17 U
PMS à 1 %	1,25 ml
NBT à 1 %	1,25 ml
MTT à 1 %	1,25 ml

Incubation à l'obscurité (réaction tres rapide).

- Malate Déhydrogénase (Mdh)

Tampon TRIS A	44 ml
Acide malique à 2 M	6,25 ml
MgCl ₂ à 0,5 M	0,375 ml
NAD à 1 %	2,5 ml

Ajuster avant l'emploi :

NBT à 1 %	1,25 ml
PMS à 1 %	0,626 ml
MTT à 1 %	1,25 ml

Incubation à l'obscurité (30 à 60 mn).

ANNEXE : 6

TAMPON DE REVELATION

**- Tampon TRIS A
(Pgm-Sod-Aat-Pgi)**

EGTA	2,0 g/l
TRIS	121 g/l
H ₂ O	5000 ml

Ajuster à pH 8,0 avec environ 55 ml d'HCl concentré.

FIXATEUR STANDARD

- Fixateur

METHANOL	400 ml
H ₂ O	500 ml
Acide acetique	100 ml