

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LA MER  
CHERBOURG

Conservatoire National des Arts et Métiers

DIPLOME DE TECHNICIEN SUPERIEUR DE LA MER  
GENIE BIOLOGIQUE ET PRODUCTIONS MARINES

Rapport de stage

**ESSAIS D'INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE  
ET DE LA GYNOGENESE CHEZ L'HUITRE CREUSE  
*CRASSOSTREA GIGAS***

PATRICIA TORTAY  
SEPTEMBRE 1994

MAITRE DE STAGE : ANDRE GERARD

UNITE DE RECHERCHE EN GENETIQUE ET ECLOSERIE  
BP 133 - RONCE LES BAINS  
17390 LA TREMBLADE



# REMERCIEMENTS

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à André Gérard, mon maître de stage, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe ainsi que pour ses conseils, sa disponibilité et surtout pour la patience dont il a fait preuve à mon égard.

J'associe à ces remerciements Yamama Naciri pour sa compétence, son soutien et sa gentillesse.

Je remercie vivement Christophe et Pascal pour leur accueil chaleureux et leur serviabilité.

Un très grand merci à Benoit pour son aide précieuse tout au long de ces cinq mois et sans qui rien n'aurait été pareil.

Au dernier arrivé qui y a cru, qui n'y croyait plus et qui n'y croira peut être pas, David, merci de m'avoir soutenue durant ces heures tardives.

Un clin d'oeil en particulier à Patou qui a sans doute désespéré mais qui jusqu'au bout était là, merci.

Je vous remercie Nathalie et son Matasamour, Bruno et son sourire, Fabien et ses nuages, Ginette et son café, Yvette et son soleil, Martine et son week-end, Rose-Marie et ses cellules, Tristan et son chou-rose, Serge et son panier, Jean-Marie et ses tatouages...merci pour cette ambiance amicale que vous m'avez fait partager.

## - SOMMAIRE -

<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1. OBJECTIFS ET PROGRAMMES DE L'URGE</b>	<b>2</b>
1.1.1. Objectifs	2
1.1.2. Programmes	2
1.1.3. Polyploidisation	3
<b>2. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>4</b>
<b>2.1. PRESENTATION DES LOCAUX</b>	<b>5</b>
2.1.1. Extérieur	5
2.1.2. Intérieur	5
2.1.2.1. Salle d'élevage larvaire	5
2.1.2.2. Micronurserie	5
2.1.2.3. Salles de phytoplancton	5
2.1.2.4. Salle de maturation	8
2.1.2.5. Serre	8
2.1.2.6. Salle de quarantaine	8
<b>2.2. TECHNIQUES D'ECLOSERIE</b>	<b>8</b>
2.2.1. Production de phytoplancton	8
2.2.2. Origine, maintien et maturation des géniteurs	10
2.2.3. Prélèvement des gamètes	11
2.2.4. Elevage larvaire	11
2.2.5. Micronurserie	12
<b>2.3. INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE ET DE LA GYNOGENESE</b>	<b>12</b>
2.3.1. Interet	12
2.3.2. Principe	13
2.3.2.1. Schéma classique : diploïdie	14
2.3.2.2. Triploïdie	14
2.3.2.2.1. - Rétention du GP1	14
2.3.2.2.2. - Rétention du GP2	15
2.3.2.3. Gynogénèse	15
2.3.2.3.1. - Rétention du G.P.2 :	16
2.3.3. Techniques utilisées	16
2.3.3.1. - Techniques physiques	16
2.3.3.2. - Techniques chimiques	16

2.3.3.2.1. - Traitement à la cytochalasine B (C.B.) :	16
2.3.3.2.2. - Traitement au 6-Diméthylaminopurine (6-D.M.A.P.)	17
2.3.3.3. Détermination du taux de ploïdie par imagerie numérique	17
2.3.3.3.1. Matériel : (SAMBA TM 2005 de TITN ALCATEL)	19
2.3.3.3.2. Principe :	19
<b>3. RESULTATS -DISCUSSION</b>	<b>20</b>
<b>3.1. INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE PAR RETENTION DU PREMIER OU DU SECOND GLOBULE POLAIRE</b>	<b>21</b>
3.1.1. Protocole de l'expérience	21
3.1.2. Résultats	22
3.1.2.1. Timing embryonnaire	22
3.1.2.2. Analyse de ploïdie	25
<b>3.2. GYNOGENESE</b>	<b>28</b>
3.2.1. Correspondance entre concentration et densité optique	29
3.2.1.1. Protocole	29
3.2.1.2. Résultats	30
3.2.1.3. Discussion	30
3.2.2. Etude de la motilité des spermatozoïdes	31
3.2.2.1. Protocole général	31
3.2.2.2. Essai A	31
3.2.2.2.1. Protocole	31
3.2.2.2.2. Résultats	32
3.2.2.2.3. Discussion	32
3.2.2.3. Essai B	32
3.2.2.3.1. Protocole	32
3.2.2.3.2. Résultats	33
3.2.2.3.3. Discussion	33
3.2.2.4. Essai C	34
3.2.2.4.1. Protocole	34
3.2.2.4.2. Résultats	34
3.2.2.4.3. Discussion	35
3.2.3. Essais basés sur le temps d'irradiation	35
3.2.3.1. Essai n°1	35
3.2.3.1.1. Protocole	35
3.2.3.1.2. Comptage des larves	36
3.2.3.1.3. Analyse de ploïdie	37

3.2.3.2. Essai n°2	39
3.2.3.2.1. <i>Protocole</i>	39
3.2.3.2.2. <i>Comptage des larves</i>	40
3.2.3.2.3. <i>Analyse de ploïdie</i>	41
<b>4. CONCLUSION</b>	<b>44</b>
<b>5. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>46</b>
<b>6. ANNEXES</b>	<b>50</b>

# **1. INTRODUCTION**

Le Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins (LBEIM), placé sous la responsabilité de Maurice HERAL, comporte quatre unités de recherche :

- l'Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles (UREA), sous la responsabilité de Maurice HERAL,
- l'Unité de Recherche Régionale Aquacole (URRA), placé sous la double responsabilité de Maurice HERAL et d'André GERARD,
- l'Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (URGE), sous la responsabilité d'André GERARD,
- l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générale (URPIG), sous la responsabilité de Tristan RENAULT.

## **1.1. OBJECTIFS ET PROGRAMMES DE L'URGE**

### ***1.1.1. OBJECTIFS***

Les principaux objectifs de l'URGE, tels qu'ils ont été définis dans les "cahiers d'objectifs" de la Direction des Ressources Vivantes (DRV) et du Département des Ressources Aquacoles (RA), visent essentiellement à développer des programmes sur les mollusques bivalves, dans le domaine de la génétique quantitative, de la cytogénétique, de l'acclimatation et de l'hybridation.

Les objectifs affichés sont l'obtention de lignées ou de souches présentant des caractères de résistance aux maladies parasitaires et/ou de meilleures performances de croissance et de qualité de chair.

### ***1.1.2. PROGRAMMES***

Pour tenter de répondre à ces objectifs tout en tenant compte des moyens matériels et humains mis en oeuvre, quatre programmes sont en cours de réalisation :

- Sélection de souches d'huîtres plates résistantes aux parasitoses et de souches de *Crassostrea gigas* sur des critères de qualité

- Polyploïdisation des principales espèces d'intérêt commercial
- Obtention de lignées pures et recherche de marqueurs génétiques
- Acclimatation et hybridations interspécifiques de différentes espèces du genre *Crassostrea*.

### **1.1.3. POLYPLOIDISATION**

Le programme de polyploïdisation des principales espèces d'intérêt commercial vise à obtenir des individus triploïdes stériles, dont l'énergie, utilisée normalement pour la fabrication de gamètes, est transférée vers la croissance somatique et la constitution de réserves glucidiques.

L'URGE travaille également en collaboration avec le Laboratoire de Biologie Marine de Plymouth et l'Institut de Biologie Marine de Crête, sur le programme de polyploïdisation "AIR1", dans le cadre d'un contrat avec la Communauté Economique Européenne.

Ce programme CEE-AIR1 est basé sur l'obtention de triploïdes chez *Crassostrea gigas* par rétention du premier (G.P.1) et du second globule polaire (G.P.2). Les techniques d'induction de la gynogénèse sont également développées en vue d'obtenir des diploïdes gynogénétiques. Tous ces animaux doivent servir à une étude de la relation entre le degré d'hétérozygotie et les performances biologiques et physiologiques.

Le sujet de stage proposé, visant à améliorer l'obtention des individus gynogénétiques, ainsi que des triploïdes G.P.1 et G.P.2, s'intègre donc dans le programme "AIR1" et se situe également dans la continuité des stages d'Isabelle Peudenier (1992) et Isabelle Roux (1993).

Deux problèmes ont cependant perturbé cette étude :

- la rétention du premier globule polaire est beaucoup plus difficile à obtenir que celle du G.P.2 (20% contre 90%)

- des huîtres gynogénétiques diploïdes viables jusqu'à la taille adulte n'ont pas encore été obtenues.

En outre, à partir du mois de juin, un problème pathologique est apparu, induisant de très fortes mortalités sur les larves et le naissain et empêchant ainsi de mener certains élevages à terme.

## **2. MATERIEL ET METHODES**

### **2.1.1. PRESENTATION DES LOCAUX**

(Voir plan et schéma de fonctionnement de l'écloserie)

### **2.1.2. EXTERIEUR**

- Les bassins de stockage de 300 m<sup>3</sup> reçoivent l'eau de mer directement pompée sur l'estran à marée haute. Ils sont au nombre de quatre (4<sup>ème</sup> non visible sur le schéma), permettant ainsi une première purification de l'eau par décantation.

- Le circuit hydraulique comprend 23 pompes qui répartissent cette eau (et du phytoplancton contenu dans les bassins de 20 m<sup>3</sup>) jusqu'aux salles concernées, son traitement et son rejet à la mer.

### **2.1.3. INTERIEUR**

#### **2.1.3.1. Salle d'élevage larvaire**

L'eau arrivant dans cette salle est filtrée sur trois micromètres et répartie dans des bacs cylindro-coniques de cinq à 150 litres selon les besoins. C'est un circuit fermé et l'eau doit être renouvelée manuellement tous les deux jours. Les larves sont alimentées quotidiennement avec des algues phytoplanctoniques dénombrées afin d'ajuster leur concentration au volume des bacs (environ 20 à 30 cellules par µl et par espèce d'algue).

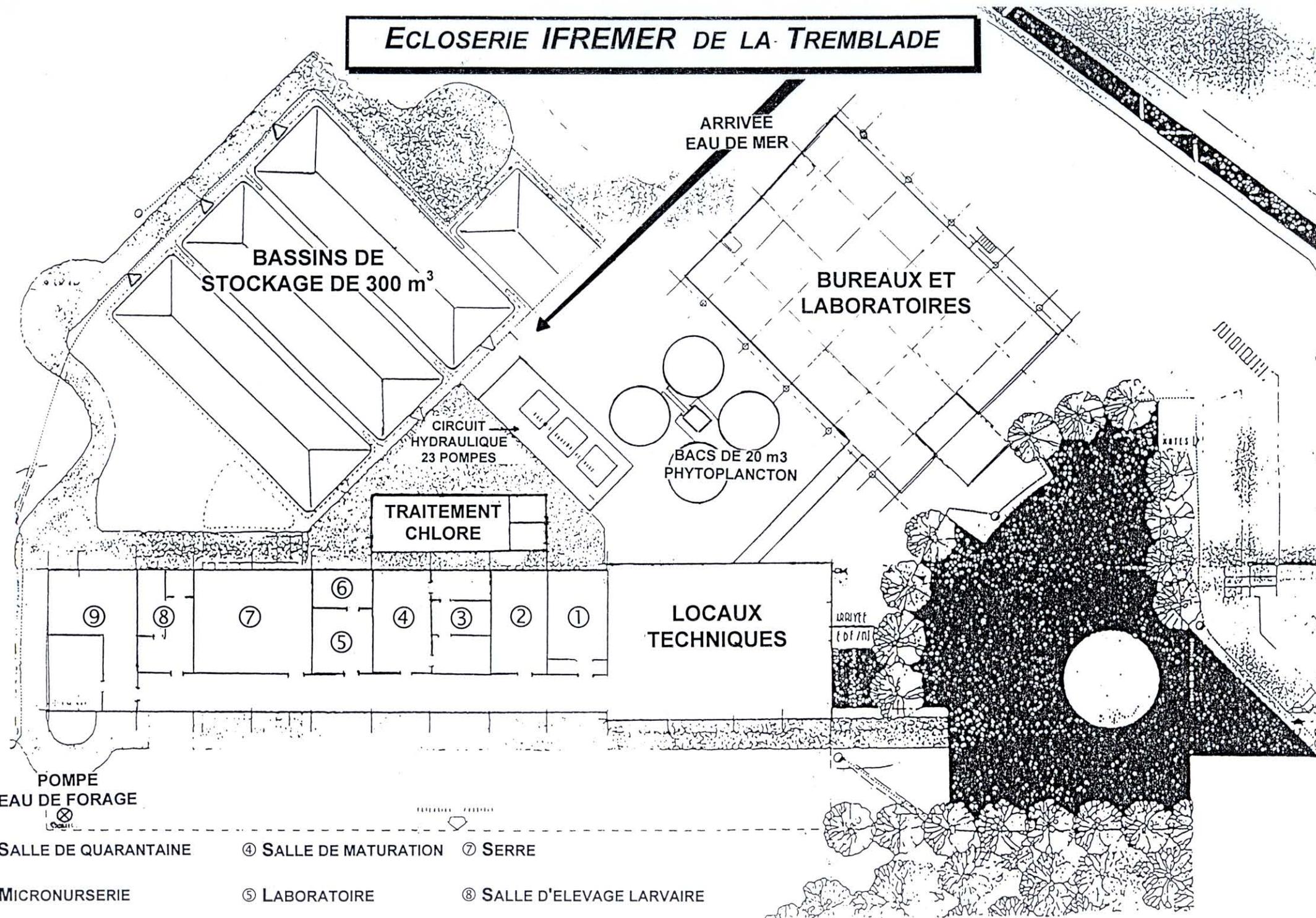
#### **2.1.3.2. Micronurserie**

Cette salle contient des raceways de 100 litres dans lesquels sont disposés des tamis dont le maillage varie selon la taille des larves. L'eau y est renouvelée à raison de 200 à 400 litres par heure, ce réglage s'effectuant sur débitmètre.

#### **2.1.3.3. Salles de phytoplancton**

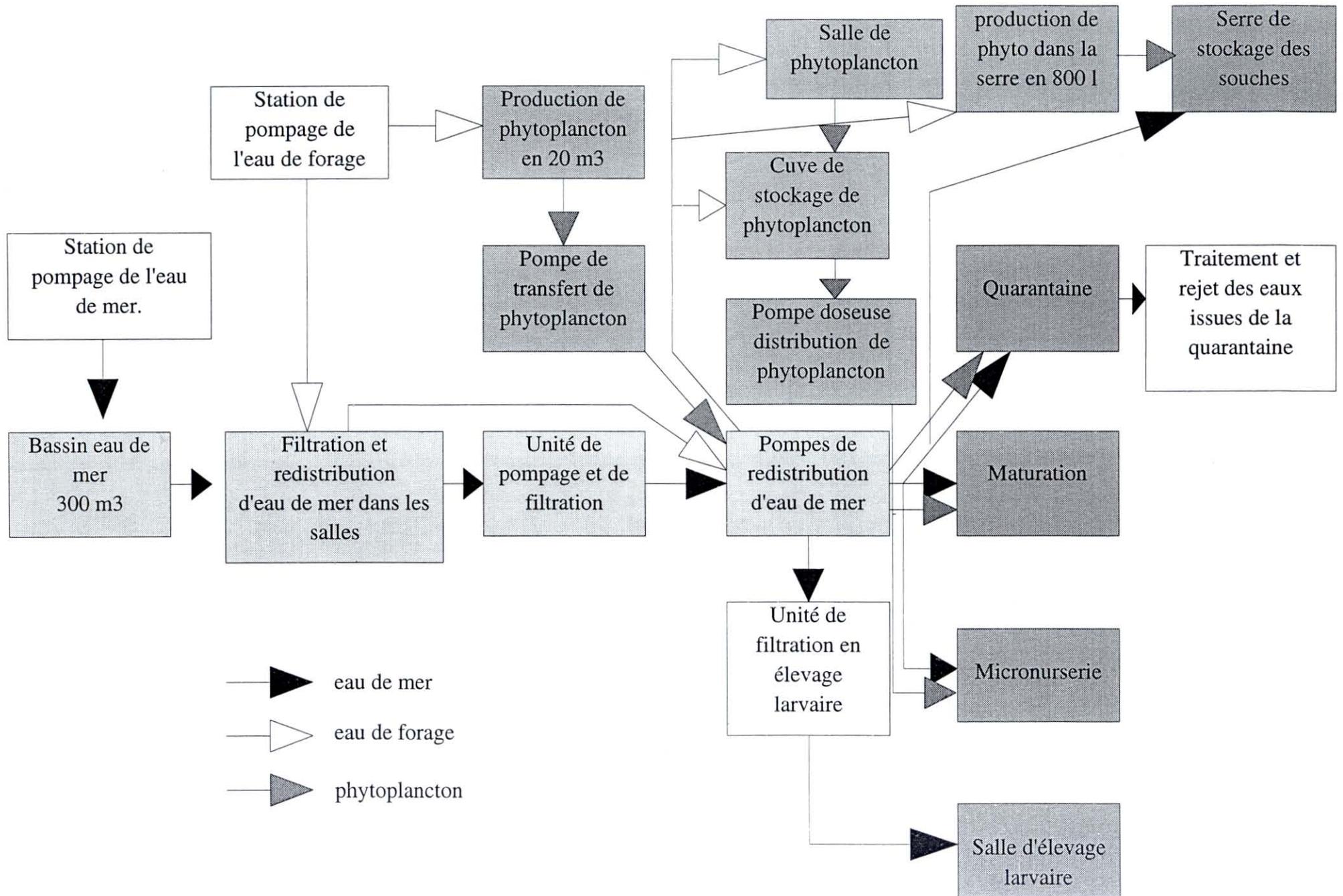
Ces salles ne nécessitent qu'une arrivée d'eau de forage, qui est autoclavée pour les petits volumes (deux à dix litres). La distribution des microalgues est manuelle dans la salle d'élevage larvaire mais est automatique dans celles de maturation, de quarantaine et de micronurserie.

# ECLOSERIE IFREMER DE LA TREMBLADE



- ① SALLE DE QUARANTAINE      ④ SALLE DE MATURATION      ⑦ SERRE
- ② MICRONURSERIE            ⑤ LABORATOIRE                ⑧ SALLE D'ELEVAGE LARVAIRE
- ③ SALLES DE PHYTOPLANCTON   ⑥ BUREAUX                      ⑨ SALLE DE PHYSIOLOGIE

# Schéma de fonctionnement de l'écloserie



#### **2.1.3.4. Salle de maturation**

L'eau de mer arrivant dans des raceways à un débit continu de 250 litres par heure est préalablement filtrée sur un filtre à sable, puis mélangée à du phytoplancton en excès.

#### **2.1.3.5. Serre**

Cette salle sert au stockage des huîtres. Les adultes sont entreposés dans des bacs à fond plat, les juvéniles dans des cylindres pourvus d'un fond de maillage assez gros et dont le bullage est assuré par un système d'air lift. Le renouvellement de l'eau se fait à raison de 20 m<sup>3</sup> par heure.

#### **2.1.3.6. Salle de quarantaine**

Les raceways sont équipés chacun d'un filtre biologique. Le renouvellement de l'eau s'effectue durant un quart d'heure toutes les trois heures. L'eau sortant de cette salle est stérilisée avec du chlore actif (10 ppm) puis neutralisée au thiosulfate dans la station d'épuration.

## **2.2. TECHNIQUES D'ECLOSERIE**

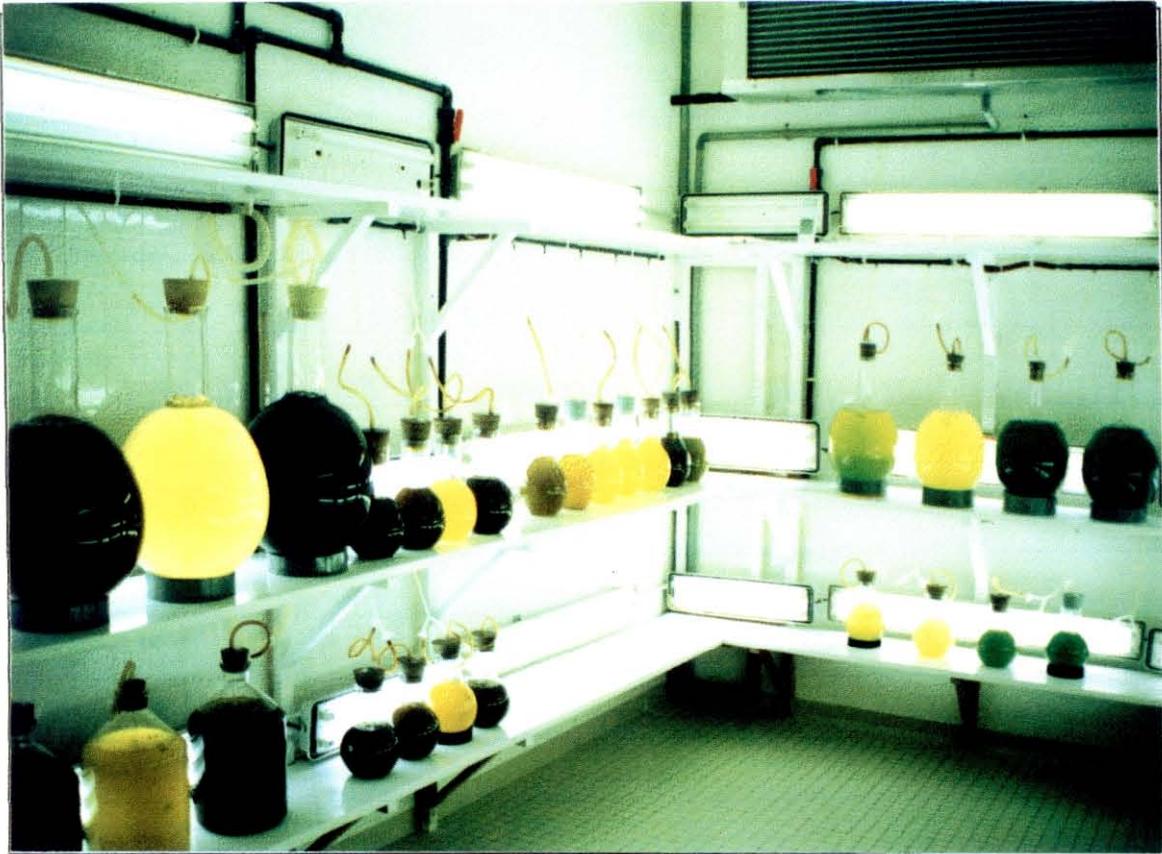
### **2.2.1. PRODUCTION DE PHYTOPLANCTON**

Le phytoplancton est la nourriture utilisée tout au long de la chaîne de l'écloserie. De sa quantité et de sa qualité dépendent les performances de croissance et de survie des mollusques. Les principales microalgues utilisées sont :

- ~ *Skeletonema costatum*
- ~ *Tetraselmis suecica*
- ~ *Isochrysis galbana*
- ~ *Chaetoceros calcitrans*
- ~ *Pavlova lutheri*

(*Chaetoceros calcitrans* variété *pumilum*, ainsi qu'une diatomée isolée à Ronce-les-Bains, sont aussi utilisées, uniquement en élevage larvaire, en raison de leur petite taille et de leurs qualités nutritives.)

## PLANCHE PHOTO 1



- BALLONS DE 2, 10 ET 20 LITRES -



Ces algues sont cultivées en eau de forage pompée à -110 m. Elle présente les principales qualités de l'eau de mer et a l'avantage d'être constante, limpide et aseptique. Sa concentration élevée en métaux (205 µg/l d'aluminium, 67 µg/l de zinc et 0.64 µg/l de manganèse) n'a aucune incidence sur la qualité du phytoplancton ni, par la suite, sur les larves qui le consomment. La salinité de cette eau est de 26 ‰.

L'écloserie comprend deux salles d'algues pour la production d'espèces de haute qualité nutritive. La culture monospécifique de ces espèces, sur milieu de Conway (Walne, 1974), modifié afin de l'adapter à l'eau de forage, est de type classique :

- les souches aseptiques, en erlenmeyer de 500 ml, sont conservées en phytotron à 10-12 °C, avec une photopériode de 12h/12h. Le repiquage se fait tous les mois.
- Lesensemencements se font successivement dans des ballons de deux, dix, 20 litres, puis dans des bacs cylindro-coniques transparents de 300 litres. La salle est thermostatée à 18 °C et l'éclairage est permanent.

L'écloserie dispose également de quatre bassins de 20 m<sup>3</sup> de *Skeletonema* dont le cycle de production est de trois à quatre jours en fonction de la saison. Des concentrations de un à deux millions de cellules par millilitre y sont atteintes en fonction de l'éclairage, de la température...

Un bassin est distribué chaque jour par injection automatique dans le circuit hydraulique alimentant toutes les salles de l'écloserie (mis à part la salle d'élevage larvaire). Il est ensuite lavé puis réensemencé avec environ 10 % du volume du bassin le plus concentré.

Par ailleurs il existe quatre bassins de 800 litres, stockés dans la serre, qui fonctionnent également sur un cycle de quatre jours. Ils servent principalement à nourrir les bacs expérimentaux stockés en serre et à ensemenecer les bassins de 20 m<sup>3</sup>, en cas de nécessité.

Les volumes de 300 litres, réalisés dans la salle d'algue, servent à diversifier la nourriture des bassins et sont distribués à raison de trois volumes par jour. Le cycle de production est ici de cinq jours, et les concentrations obtenues sont comprises entre quatre et 20 millions de cellules par millilitre selon les espèces. La distribution se fait à raison de 50 % vers la maturation, 25 % vers la quarantaine et 25 % vers la micronurserie.

### **2.2.2. ORIGINE, MAINTIEN ET MATURATION DES GENITEURS**

Les géniteurs proviennent de captage naturel ou de stocks naturels. Ils sont stockés en serre, en eau non chauffée, (dont la température dépendra de la saison), et sont ensuite

placés, selon les besoins, en salle de maturation. Il faut environ un mois à des animaux adultes pour atteindre, dans cette salle, une maturité suffisante pour la ponte.

En salle de maturation, l'eau de mer préalablement filtrée (filtre à sable) est maintenue à une température constante de  $21 \pm 1$  °C. Les géniteurs sont placés par catégories dans des raceways de 100 litres à raison d'environ un animal pour deux litres. Ce système permet d'obtenir des individus matures de février à septembre.

### **2.2.3. PRELEVEMENT DES GAMETES**

Pour les expériences de cytogénétique, la méthode utilisée, sur *Crassostrea gigas*, est le stripping. Elle consiste en une scarification de la gonade à l'aide d'un scalpel. Après sexage au microscope, les gamètes sont recueillis par rinçage de l'animal à l'aide d'eau de mer filtrée (trois micromètres) puis sont tamisés afin d'éliminer les plus grosses impuretés. Les spermatozoïdes sont filtrés sur un maillage de 45 µm, les ovules sur 100 µm.

Cette technique permet d'éviter toute fécondation incontrôlée, de gagner du temps par rapport aux autres méthodes pouvant être utilisées (chocs thermiques, physiques ou chimiques) et d'obtenir beaucoup plus facilement des oeufs que par la ponte naturelle qui est plus aléatoire. Elle entraîne cependant le sacrifice des animaux utilisés et elle nécessite donc un stock de géniteurs suffisamment important.

### **2.2.4. ELEVAGE LARVAIRE**

Les oeufs obtenus sont placés en incubation à une densité de 100 par millilitre dans des bacs cylindro-coniques de 30 ou 150 litres d'eau de mer filtrée, aérée par un faible bullage à la base et thermostatée à  $25 \pm 1$  °C.

Au bout de 24 heures, les larves véligères sont recueillies sur un tamis (45 µm) afin d'être triées. Elles sont comptées et mesurées, ce qui permet :

- un suivi de croissance et de mortalité
- un dénombrement du taux de larves anormales
- un ajustement de la densité à dix larves par millilitre.

Ce tamisage sera ensuite effectué tous les deux jours jusqu'au transfert des larves en nurserie. L'augmentation de la taille du tamis est fonction de la croissance des animaux. Un suivi régulier de leur évolution et un renouvellement de l'eau sont ainsi possibles. Pour les lots utilisés en cytogénétique, plus fragiles, de l'érythromicine est ajoutée à l'eau d'élevage à

raison de 10 mg/litre ; cet antibiotique limite le développement bactérien.

Durant cette période, la salinité est également suivie. Elle peut varier de 25 à 33 ‰, selon la saison et la pluviométrie, mais n'a que peu d'incidence sur les performances larvaires.

L'alimentation des larves est quotidiennement assurée par un mélange de deux souches de phytoplancton, à des concentrations de 20 cellules par microlitre et par espèce.

### **2.2.5. MICRONURSERIE**

Dès l'apparition du pied et de la tâche oculaire annonçant la métamorphose (arrêt de la phase nageuse et recherche d'un support pour se fixer), les larves pédivéligères sont tamisées et placées dans un tamis de 150 µm dont le fond est tapissé de microbrisures de coquilles (calibrées entre 180 et 300 µm). Cette méthode permet la fixation "une à une" des futures huîtres et le paraffinage des parois du tamis empêche une fixation non désirée.

Le naissain est laissé sur ces tamis durant huit à dix jours, le temps que les larves se fixent et grossissent. Ensuite, un tamisage à 350 µm élimine la plus grande partie de la brisure qui n'a pas servi et qui devient gênante.

Ce maillage sera conservé durant une dizaine de jours avant de passer à 500 µm pour enlever complètement le reste de microbrisure.

Dès que le naissain atteint un millimètre (au bout d'environ un mois), il est expédié à Bouin (Vendée), dans une autre station IFREMER, afin de poursuivre son développement en nurserie.

Durant toute la période en micronurserie l'environnement est contrôlé. L'eau enrichie en phytoplancton est renouvelée à raison de 200 litres par heure (pendant la phase de fixation), puis 400 litres par heure. Sa température est maintenue aux environs de 20 °C.

## **2.3. INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE ET DE LA GYNOGENESE**

### **2.3.1. INTERET**

Chez les huîtres creuses, la maturation sexuelle représente la part prépondérante des dépenses d'énergie. En effet, la ponte entraîne une perte de 64 % du poids sec total de chair (Allen et Downing, 1986) ou de 63 % en valeur énergétique de la chair (Héral et Deolous Paoli, 1983).

La stérilisation génétique (triploïdie) permet donc de réduire la gonadogénèse et ainsi de réorienter la production énergétique vers une meilleure croissance. Allen et Downing

(1986) ont observé une augmentation de poids sec de chair entre mai et novembre, de 172 % pour les triploïdes et de 36 % pour les diploïdes.

En outre, les huîtres stériles possèdent les mêmes qualités organoleptiques que les diploïdes d'hiver, ce qui devrait permettre une commercialisation toute l'année et hors régions ostréicoles.

La tétraploïdie serait, quant à elle, intéressante du point de vue des géniteurs car les gamètes libérés seraient diploïdes. La fusion avec un gamète haploïde (issu de géniteurs diploïdes) donnerait donc un zygote triploïde. Ceci a été vérifié chez les amphibiens (Beatscheen, 1962) et chez les poissons (Chourrout *et al*, 1986b ; Chourrout et Nakayama, 1987). Cette voie d'obtention de triploïdes autoriserait une meilleure pureté et une meilleure répétabilité des lots, et éviterait un traitement chimique à chaque génération.

En outre, la comparaison des performances de croissance et de survie entre des truites triploïdes obtenues par rétention d'un GP et des triploïdes issues d'un croisement tétraploïdes/diploïdes est en faveur de ces derniers (Chourrout *et al*, 1986b).

### **2.3.2. PRINCIPE**

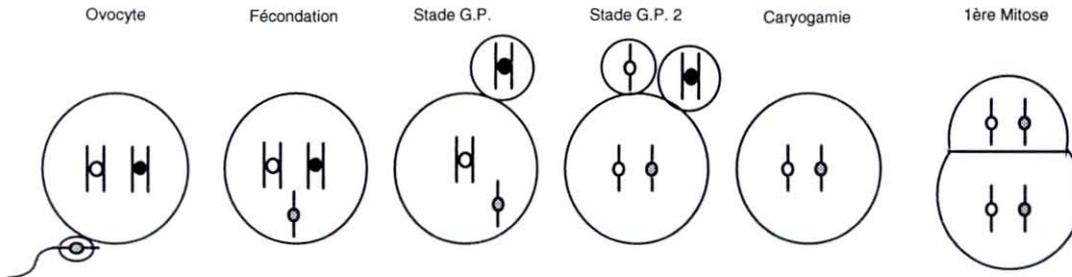
La triploïdie, chez les mollusques bivalves, correspond à une augmentation artificielle du nombre de chromosomes dans l'ensemble des cellules d'un individu.

Les spermatozoïdes émis résultent d'une méiose achevée et ne peuvent donc pas être traités.

En revanche, les gamètes femelles chez *Crassostrea gigas* sont pondus avant l'achèvement de la première division méiotique en fin de prophase ou en début de métaphase selon les espèces (Longo, 1983).

Il faut donc agir sur l'ovule avant la première division embryonnaire.

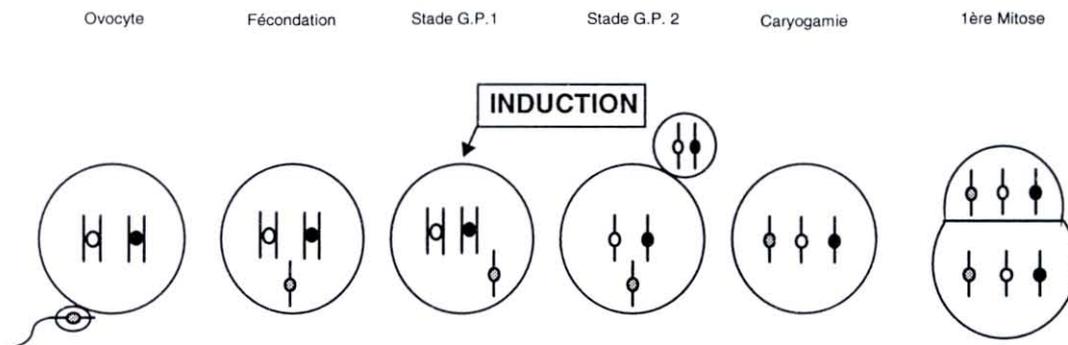
### 2.3.2.1. Schéma classique : diploïdie



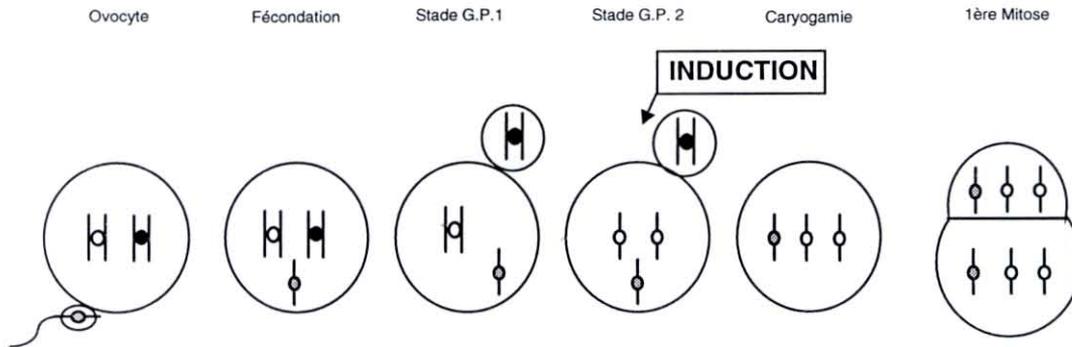
L'ovule est activé par l'entrée d'un spermatozoïde (N chromosomes), ce qui déclenche la fin de sa méiose avec l'expulsion du premier puis du second globule polaire. Les lots chromosomiques d'origine paternelle (N) et maternelle (N) fusionnent (caryogamie) pour donner, après divisions mitotiques, un embryon (2N).

### 2.3.2.2. Triploïdie

#### 2.3.2.2.1.- Rétention du GP1



### 2.3.2.2.2.- Rétention du GP2



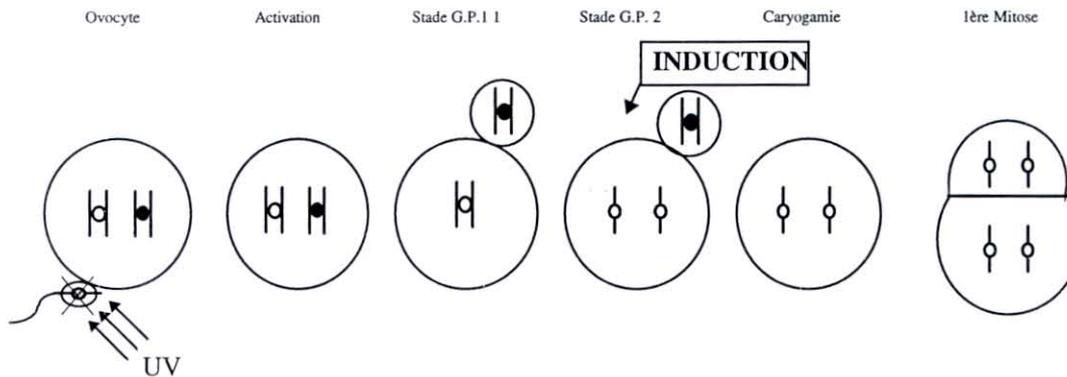
Le premier globule polaire contient la moitié du stock chromosomique de l'ovocyte : division réductionnelle. La division équationnelle qui suit expulse un jeu de chromatides dans un second globule polaire. L'un ou l'autre peut être retenu, et ainsi maintenir, au sein du futur embryon, un jeu supplémentaire de chromosomes. Il faut cependant remarquer que la rétention du G.P.1 mène à un individu plus hétérozygote que celui induit par le blocage du G.P.2.

### 2.3.2.3. Gynogénèse

La gynogénèse est l'appellation donnée au développement d'oeufs dans lesquels le patrimoine génétique paternel n'intervient pas (Chourrout, 1982). Les spermatozoïdes subissent un traitement mutagène afin que leur stock chromosomique soit détruit tout en conservant leur motilité et leur pouvoir d'activation de l'ovocyte.

L'ovocyte poursuit donc sa méiose et l'expulsion d'un des G.P. est alors empêchée. L'oeuf devient ainsi diploïde gynogénétique homozygote.

### 2.3.2.3.1.- Rétention du G.P.2 :



### **2.3.3. TECHNIQUES UTILISEES**

#### **2.3.3.1.- Techniques physiques**

Pour la destruction sélective du génome paternel, la méthode utilisée préférentiellement est l'irradiation aux rayons ultra-violet, ceci en raison :

- d'une facilité de mise en oeuvre
- d'un faible coût d'utilisation
- de l'inactivation complète du stock chromosomique.

Le faible pouvoir pénétrant de ces rayons oblige cependant à travailler avec du sperme dilué, sur une faible épaisseur et soumis à une agitation pendant l'irradiation.

#### **2.3.3.2.- Techniques chimiques**

Les méthodes chimiques s'appliquent pour la rétention des globules polaires.

##### 2.3.3.2.1.- Traitement à la cytochalasine B (C.B.) :

Les cytochalasines résultent du métabolisme de diverses espèces de champignons. Elles influent sur le degré de polymérisation des molécules d'actine et empêchent leur addition aux filaments, sans toutefois inhiber la mitose. Appliquées avant l'expulsion d'un des deux G.P. (méiose), ces substances désorganisent simultanément le réseau de filaments qui permet la migration des chromosomes (fuseau achromatique), ainsi que l'anneau fibrillaire servant à l'expulsion du G.P. (Gendreau, 1988).

L'optimisation du traitement a été étudiée pour différents paramètres tels la concentration du produit, la température d'incubation des embryons, le moment d'application et la durée du traitement. Il ressort de cette étude, adaptée de la méthode de Downing et Allen (1987), une dissociation du traitement en deux phases : une immersion des oeufs dans une solution de C.B. à un milligramme par litre suivie d'un rinçage, quinze minutes plus tard, dans une solution de diméthylsulfoxyde (D.M.S.O.).

La C.B., en solution dans le D.M.S.O., est versée dans le bécher contenant les oeufs agités et thermostatés à 25 °C. Après quinze minutes d'incubation, ceux-ci sont recueillis sur un tamis de dix micromètres, débarrassés du surplus de C.B. par une aspersion d'eau de mer, puis placés dans un bain de D.M.S.O. (0.1 %) durant vingt minutes afin de rincer la C.B. résiduelle.

Ce produit est dangereux (cancérogène et tératogène) et doit être manipulé avec précaution. Il est également coûteux (7900 F le gramme).

#### 2.3.3.2.2.- Traitement au 6-Diméthylaminopurine (6-D.M.A.P.)

Cet agent, analogue de la puromycine, a été signalé comme agent de blocage de l'expulsion des G.P. chez les étoiles de mer *Asteria rubens* et *Mathasterias glacialis* ( Néant et Guerrier, 1988). Il ne perturbe pas la synthèse des protéines mais agit sur l'activité phosphorylatrice des protéines kinases entraînant ainsi la décondensation de la chromatine.

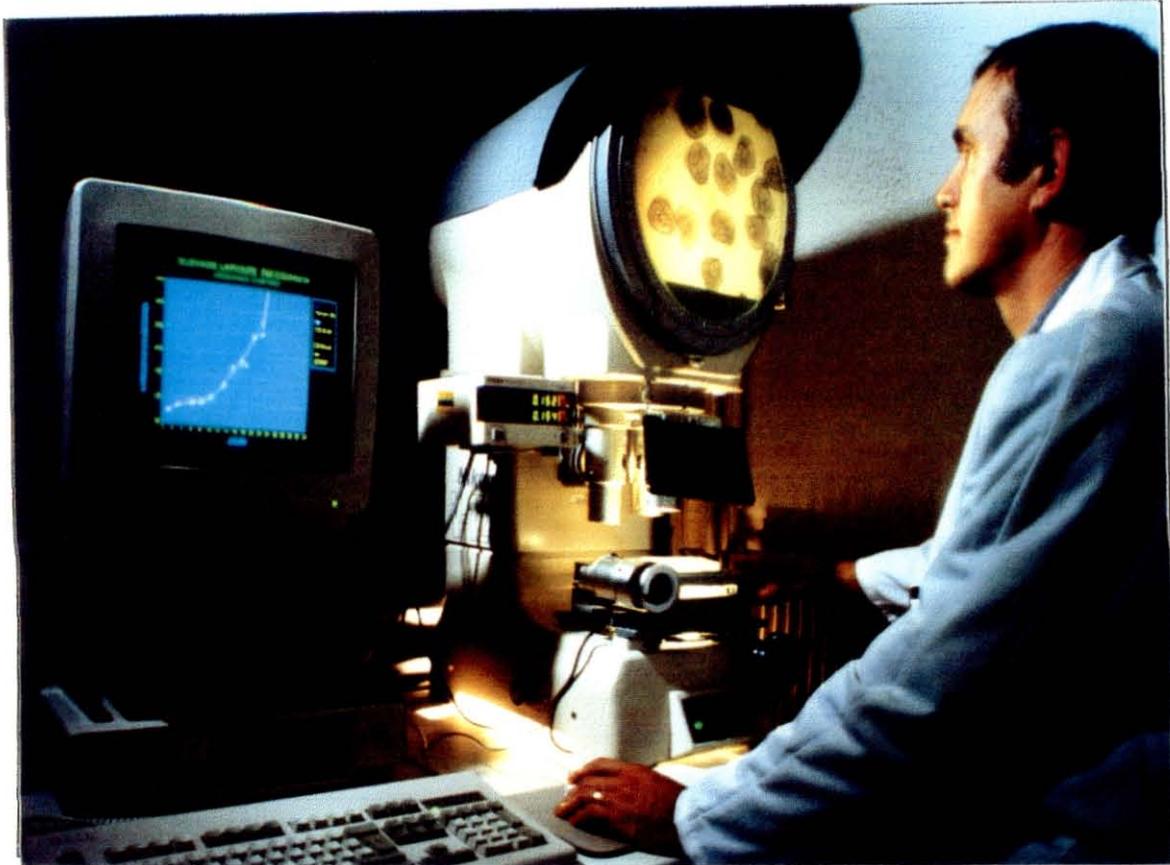
L'effet est réversible, un simple rinçage des embryons à l'eau de mer est suffisant pour que les protéines se rephosphorylent. Les chromosomes peuvent ainsi se recondenser et les microtubules se reformer. Le traitement au 6-D.M.A.P. est appliqué selon le protocole de Gérard *et al* (1993a) à une concentration de 450 µmol/l, administré quinze minutes après la fécondation, et ce pendant quinze minutes.

Ce produit a été proposé en remplacement de la C.B. (Desrosiers *et al*, 1993) car sa plus faible toxicité, sa facilité d'utilisation et son coût bien inférieur à celle-ci jouent en sa faveur. Cependant, les résultats d'induction de polyplôidie semblent, pour l'instant, légèrement inférieurs à ceux obtenus avec la C.B. ; c'est pourquoi les deux produits sont toujours utilisés en parallèle afin de comparer leurs intérêts respectifs.

#### **2.3.3.3. Détermination du taux de ploïdie par imagerie numérique**

La technique d'analyse de la ploïdie chez les bivalves par imagerie numérique, utilisée au laboratoire, a été mise au point par Gérard *et al*. (1991), et permet de suivre l'évolution du taux de polyplôïdes dans un lot traité, et ce, jusqu'à l'âge adulte.

## PLANCHE PHOTO 2



- SUIVI DE CROISSANCE DES LARVES -



Pour les embryons, larves et post-larves, l'analyse est effectuée sur une population cellulaire obtenue par broyage de l'échantillon. Le pourcentage des différentes classes de ploïdie est estimé par analyse statistique (décomposition en Gaussiennes).

En ce qui concerne les juvéniles et les adultes, l'analyse est faite individuellement sur une empreinte branchiale obtenue par biopsie ou sacrifice de l'animal. La lecture de la ploïdie est directe et ne nécessite pas d'analyse statistique ultérieure.

#### 2.3.3.3.1. Matériel : (SAMBA TM 2005 de TITN ALCATEL)

Une caméra, équipée en "Noir et Blanc", montée sur un microscope est connectée à un dispositif qui digitalise l'image en combinant un procédé de balayage et un photodétecteur. Chaque point image est représenté par ses coordonnées et par une valeur numérique correspondant à son niveau de gris (256 niveaux analysés). Le processeur interne de commande et de traitement permet la réalisation physique des mesures et des calculs.

#### 2.3.3.3.2. Principe :

L'ADN des noyaux est coloré par la réaction de Feulgen-Rosenbeck (cf annexe 1) : l'hydrolyse acide des ponts ribose-purine de l'ADN donne des résidus aldéhydes, qui, en réagissant spécifiquement avec le réactif de Schiff, donnent une coloration rose. La densité optique intégrée (D.O.I.) que mesure l'analyseur, sera d'autant plus importante qu'il y aura d'ADN. Un individu diploïde sert de témoin et toutes les valeurs de densité des échantillons à analyser seront exprimées en unités relatives à cette valeur. Le rapport est de 1 si l'animal est diploïde, de 0.5 s'il est haploïde et de 1.5 s'il est triploïde.

### **3. RESULTATS ET DISCUSSION**

### 3.1. INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE PAR RETENTION DU PREMIER OU DU SECOND GLOBULE POLAIRE

#### **3.1.1. PROTOCOLE DE L'EXPERIENCE**

Afin d'obtenir des individus triploïdes par rétention du premier ou du second globule polaire la fécondation in-vitro est réalisée par la mise en présence des produits génitaux de cinq femelles et de trois mâles.

Les gonades de ces animaux sont scarifiées avec les précautions nécessaires pour éviter toute fécondation incontrôlée.

Les gamètes mâles sont ensuite filtrés sur un tamis de 45 µm, tandis que le tamisage des gamètes femelles s'effectue sur 100 µm. Les ovules sont ensuite placées dans un volume ajusté à deux litres avec de l'eau de mer filtrée.

Pour optimiser le synchronisme d'expulsion des GP, le nombre de cent spermatozoïdes par ovule est nécessaire pour la fécondation et a été déterminé lors d'expériences précédentes (Gérard *et al*, 1993b). Les gamètes mâles sont donc comptés sur une cellule de Thomas, à l'aide de l'analyseur d'image, après avoir été dilués au 1/50<sup>ème</sup> dans de l'eau de mer et au demi dans de l'éosine (amélioration du contraste).

De la même manière, sauf pour la dilution, les gamètes femelles sont comptés sur une cellule de Malassez, afin de déterminer les volumes respectifs à prélever.

A partir de ces géniteurs, cinq lots sont produits.

	Intitulé	Produit	Doses	T°	Induction		Tamis	Rinçages	
					Début	Fin		Début	Fin
Lot 1	Témoin			25°C					
Lot 2	GP1 7,5-10	6-DMAP	450 µM/l	"	7'5	17'5	10 µm	17'5 *	
Lot 3	GP2 10-10	6-DMAP	450 µM/l	"	10'	20'	"	20' *	
Lot 4	GP1 10-15	CB	1 mg/l	"	10'	25'	"	25' **	40'
Lot 5	GP2 20-10	6-DMAP	450 µM/l	"	20'	30'	"	30' *	

\* : rinçage à l'eau de mer filtrée / la fin du rinçage est immédiate

\*\* : rinçage au DMSO

Un prélèvement de un ml, effectué dans chaque lot toutes les cinq minutes à partir de T0, est déposé dans une cuve contenant deux millilitres d'une solution tampon GA + formol (cf annexe 2). Ce produit a pour effet de bloquer le développement des oeufs.

Pour chaque lot, dix-huit cuves sont ainsi utilisées, numérotées de T0 à T85. Après une coloration à l'Hoescht (cf annexe 2) de celles-ci, une lecture sur microscope à épifluorescence permet de déterminer les "timing" embryonnaires.

Cette lecture consiste en un comptage de cinquante embryons par prélèvement. Pour chacun, le stade d'évolution (oeufs fécondés, expulsion d'un G.P., expulsion de deux G.P., stade deux cellules ou stade quatre cellules) est déterminé. Un pourcentage relatif est ensuite établi (Planche photo 3).

Les courbes obtenues permettent ainsi la vérification de la bonne marche de la manipulation comparativement au lot témoin, et également de déterminer si l'intervalle d'application choisi correspond bien à cette réalisation. En effet, une optimisation des moments d'application des différents produits et de leur impact a précédemment été réalisée (Roux, 1993) assurant ainsi la répétabilité des expériences et l'obtention en routine d'individus triploïdes.

Après les prélèvements précédents, tous les lots sont mis en élevage larvaire traditionnel (cf page 11). Ils sont comptés après 24 heures (J1), puis tous les deux jours, afin de déterminer le nombre de larves normales et anormales.

A trois périodes de l'élevage : début (J1), milieu (vers J9) et fin (vers J18), un prélèvement d'environ 50 000 larves est effectué afin de les soumettre à la coloration de Feulgen-Rosenbeck en vue d'une analyse de ploïdie sur l'analyseur d'image.

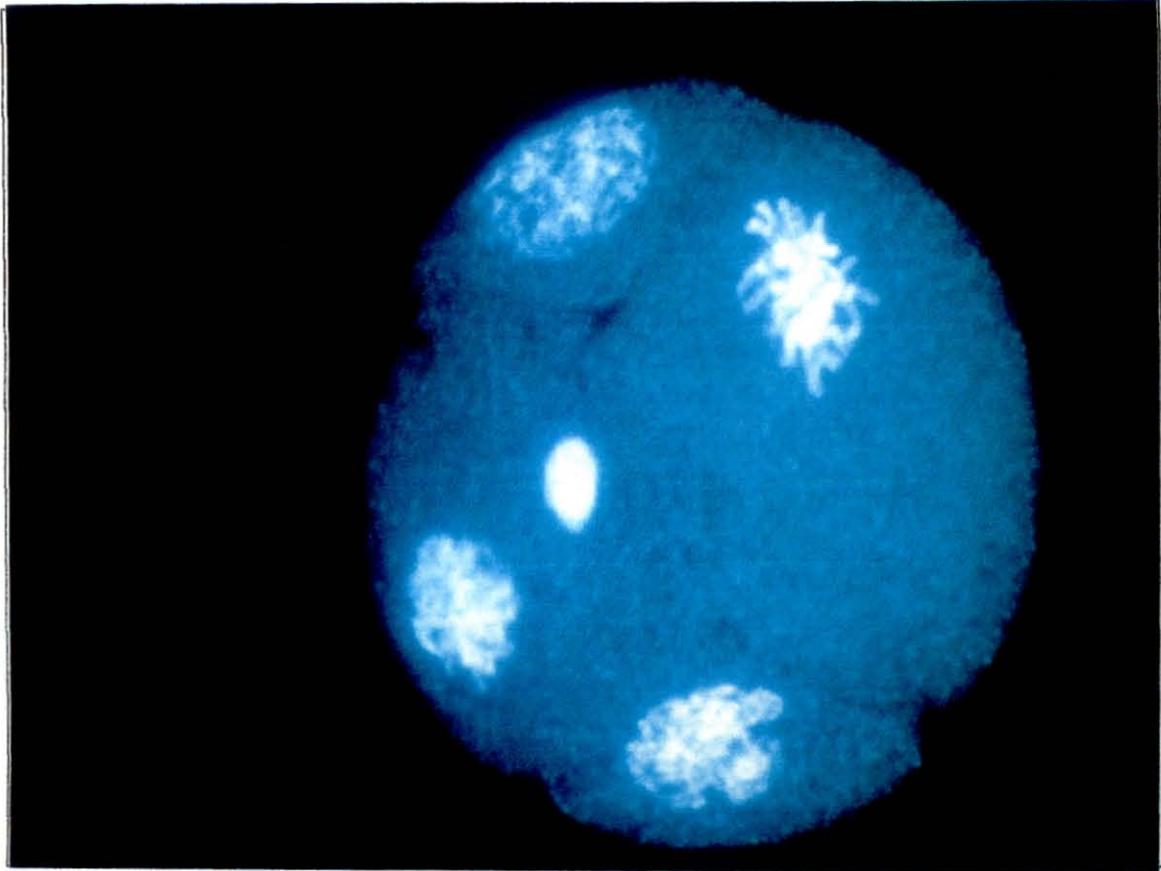
### **3.1.2. RESULTATS**

#### **3.1.2.1. Timing embryonnaire**

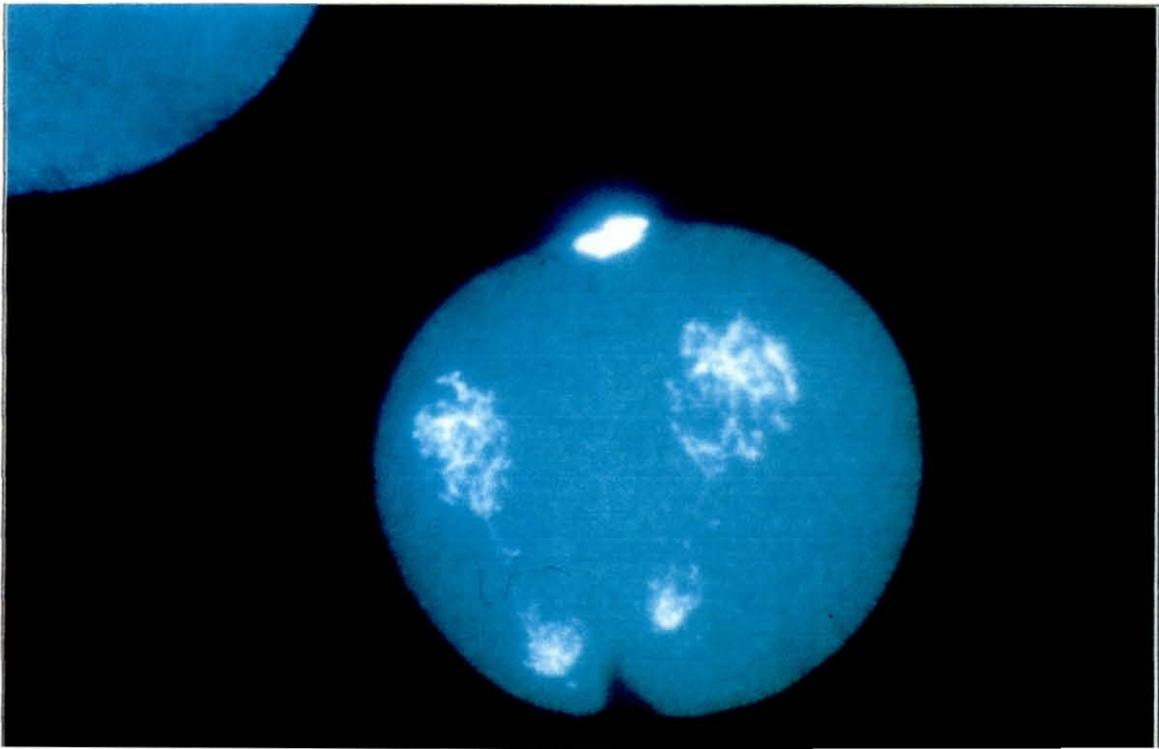
(VOIR PLANCHE 1)

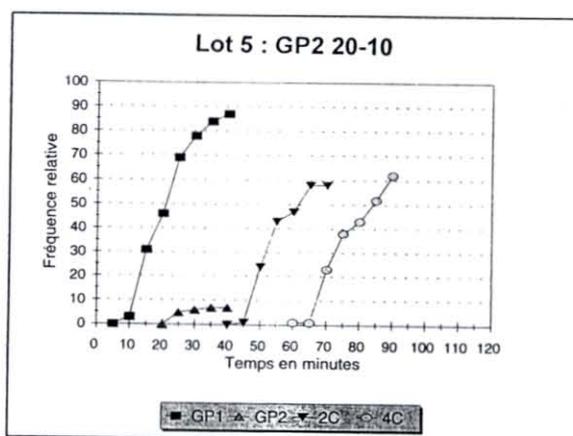
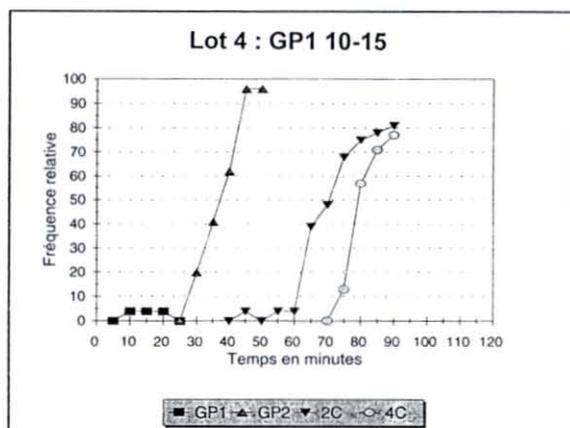
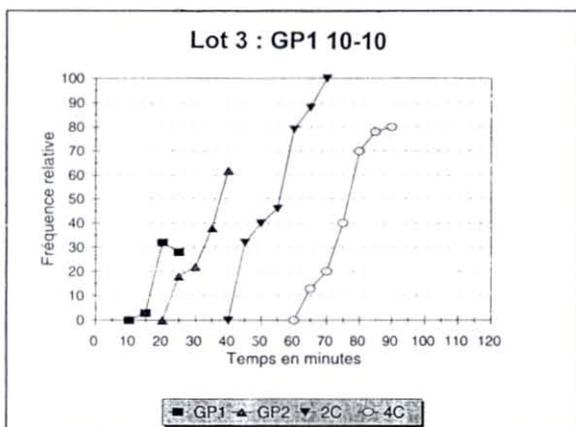
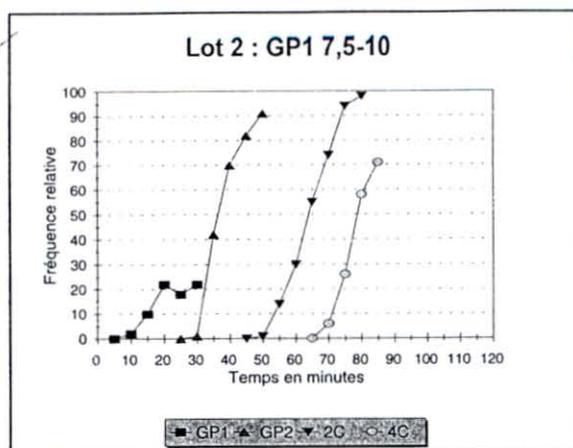
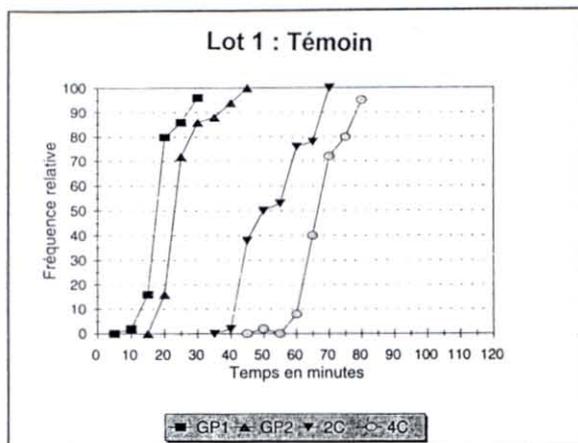
- Le lot 1 est le lot témoin représentatif d'une fécondation normale
- Les lots 2, 3 et 4 sont trois essais de rétention de GP1
  - pour les lots 2 et 3, les produits sont identiques, seuls les temps diffèrent
  - pour les lots 3 et 4, les temps sont identiques, seuls les produits diffèrent
- Le lot 5 est une rétention de GP2

## PLANCHE PHOTO 3



- TRIPLOIDE STADE 4 CELLULES : un seul GP expulsé -





# PLANCHE 1

	Lot 2 GP1 expulsés	Lot 3 GP1 expulsés	Lot 4 GP1 expulsés	Lot 5 GP2 expulsés
<b>Au moment du traitement</b>	10 %	30 %	0 %	6 %
<b>Après le traitement</b>	10 %	0 %	0 %	2 %
<b>Total</b>	20 %	30 %	5 %	8 %

Ces "timings" embryonnaires mettent en évidence la plus ou moins grande efficacité de rétention des globules polaires. Le plus remarquable est le lot n°4 avec 95 % de GP1 retenus. La CB semble donc plus efficace que le 6-DMAP, du moins pour le GP1, mais il faut tenir également compte de l'analyse de ploïdie.

Pour le lot n°5, le résultat obtenu est très bon. La rétention du GP2 ne pose pas de problème avec le 6-DMAP.

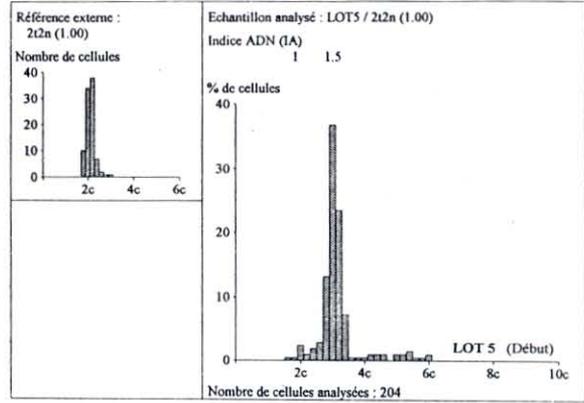
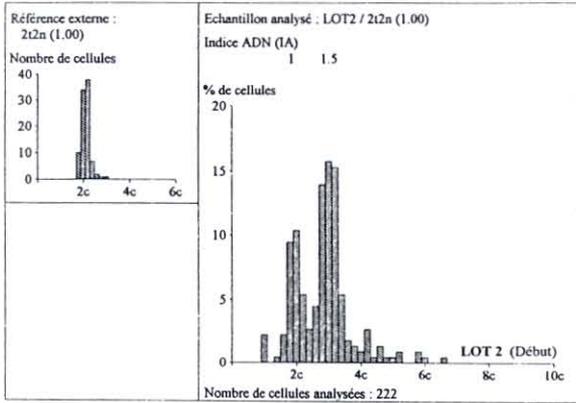
### **3.1.2.2. Analyse de ploïdie**

(VOIR PLANCHES 2 ET 3)

	DEBUT (J1)			FIN (J16)		
	% 2N	% 3N	% 4N	% 2N	% 3N	% 4N
<b>Lot 1</b>	100			100		
<b>Lot 2</b>	30	69		96	3	
<b>Lot 3</b>	44	52	3	89	10	
<b>Lot 4</b>	32	30	25	79	20	
<b>Lot 5</b>	4	96		37	62	

L'obtention de triploïdes par rétention du GP2 donne l'excellent résultat de 96 %. La chute de ce lot n°5, entre le début et la fin de l'élevage larvaire, est anormale. Elle est liée à l'apparition de problèmes pathologiques survenus durant cette période.

A présent cette méthode de triploïdisation est maîtrisée et pratiquée en routine, le problème résiduel concerne donc la rétention du GP1.



Décomposition en Gaussiennes					
	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre	
1:	11056.53731	1625.68654	0.43018	67	
2:	18513.0129	3721.48788	0.16982	155	

Décomposition en Gaussiennes					
	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre	
1:	11025.42857	445.15	0.0370	7	
2:	16403.92857	1550.90489	0.9629	182	

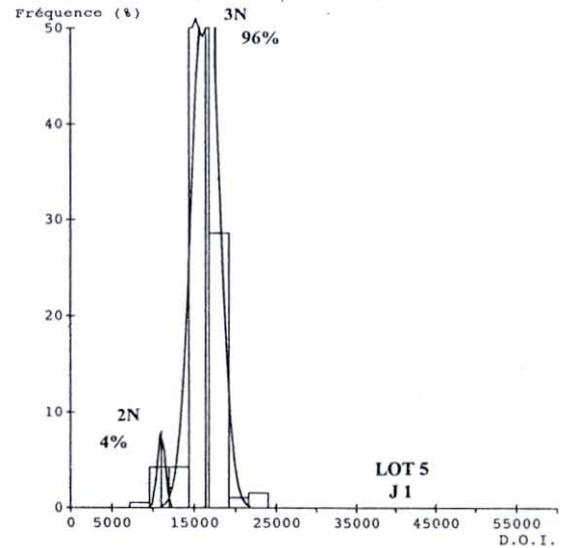
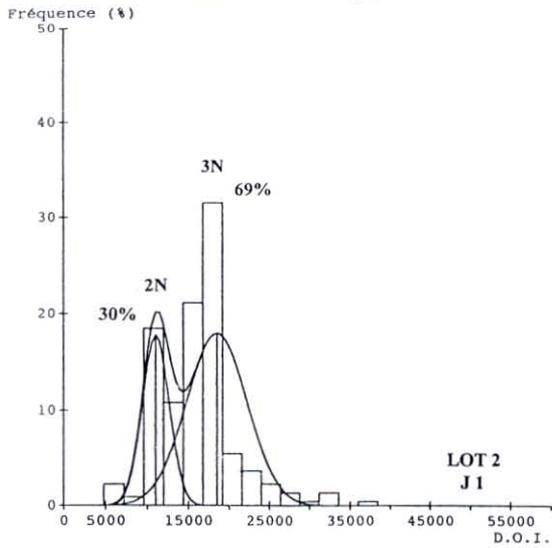
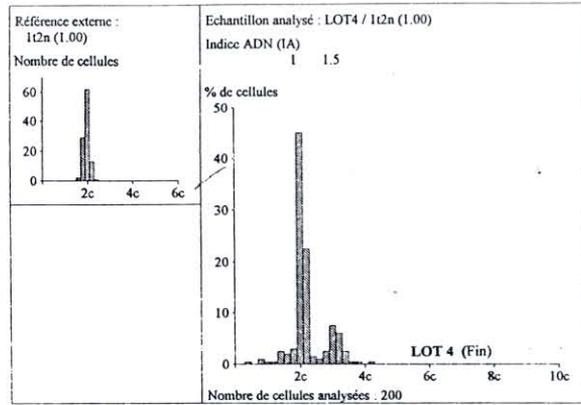
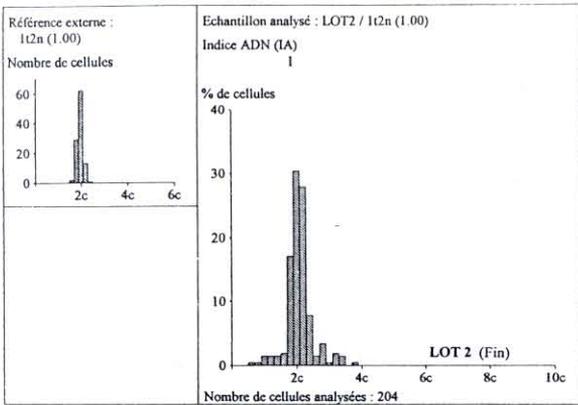
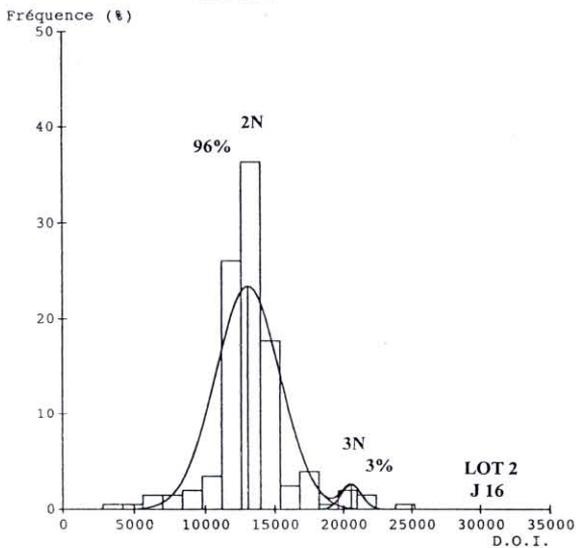


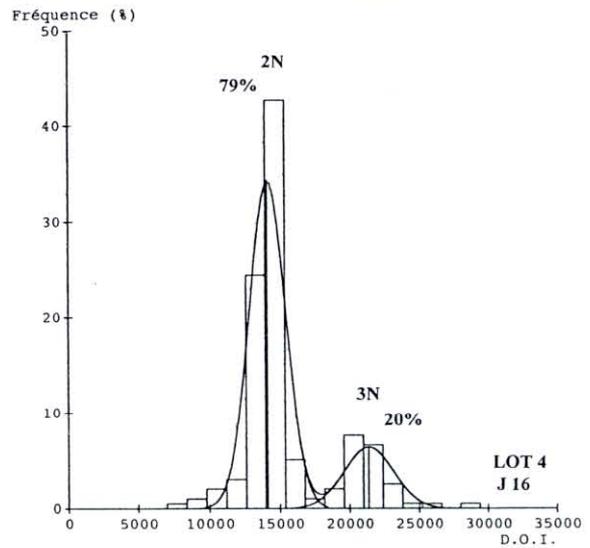
PLANCHE 2



Décomposition en Gaussiennes			
Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1: 13084.55329	2311.13154	0.9656	197
2: 20580	748.24174	0.0343	7



Décomposition en Gaussiennes			
Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1: 14155.07006	1298.23836	0.7969	157
2: 21381.425	1771.44278	0.2030	40



Décomposition en Gaussiennes			
Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1: 13988.38666	1630.15887	0.3768	75
2: 21696.70967	1584.58849	0.6231	124

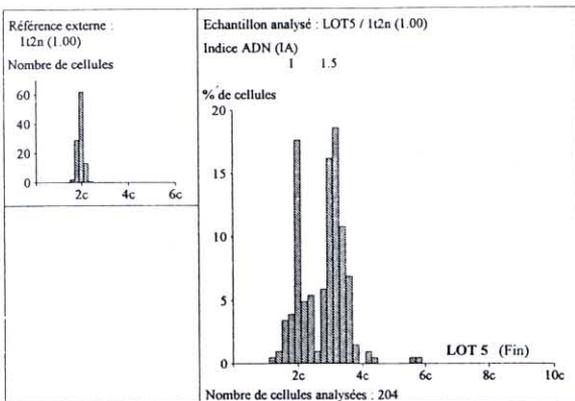
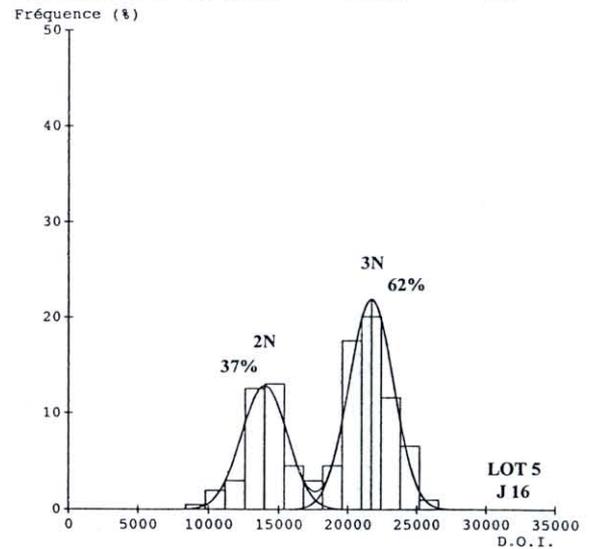


PLANCHE 3

L'inégalité des résultats entre 3N Méiose-I et 3N Méiose-II serait due, d'après Guo *et al* (1992) à une ségrégation aléatoire des chromosomes durant la seconde division méiotique. En effet, les vingt chromosomes maternels (après rétention du GP1), au lieu de se répartir en deux stocks le long d'un fuseau achromatique reliant deux centrioles, se trouvent confrontés à un fuseau triangulaire reliant trois centrioles (le troisième est induit par le traitement chimique). La répartition peut alors se faire de plusieurs manières aboutissant le plus souvent à des individus aneuploïdes.

Un animal est dit aneuploïde lorsque le nombre de ses chromosomes ne correspond ni au nombre de base de l'espèce ( $N = 10$  chez *Crassostrea gigas*), ni à l'un de ses multiples. La différence peut aussi bien porter sur une addition ( $2N+a$ ) que sur une soustraction ( $2N-a$ ) de chromosomes (Sournia *et al*, 1991)

Certains animaux comptabilisés comme triploïdes par l'analyseur d'image sont certainement aneuploïdes, et l'appareil n'est pas assez précis pour les différencier (une analyse caryologique serait nécessaire dans ce cas). L'importante baisse d'individus 3N, relevée en fin d'élevage, peut être provoquée par ces animaux qui sont susceptibles de mourir dans les premiers jours d'élevage.

Ce problème reste à résoudre car même si les triploïdes GP1 n'ont pas d'avenir au niveau économique, leur obtention est toutefois attendue pour les programmes de recherche fondamentale.

### **3.2. GYNOGENESE**

La gynogénèse artificielle nécessite l'activation d'oeufs par du sperme inactivé génétiquement, puis la restauration de la diploïdie de ces oeufs activés. Les chromosomes des spermatozoïdes peuvent être détruits par de nombreuses méthodes incluant les rayons X, les rayons gamma, les ultra-violets et une induction chimique.

Parmi ces méthodes, celle la plus couramment utilisée est l'irradiation par lampe UV, en raison de sa facilité d'utilisation et de son efficacité. Chourrout (1984, 1986a) considère les UV comme plus "propres" que les rayons X et qu'un mutagène chimique (diméthylsulfate), car ils induisent beaucoup moins de fragments chromosomiques.

### **3.2.1. CORRESPONDANCE ENTRE CONCENTRATION ET DENSITE OPTIQUE**

#### **3.2.1.1. Protocole**

L'irradiation du sperme doit s'effectuer dans des conditions standard, basées sur la mesure de la densité optique (DO) de la solution de sperme.

La densité optique est mesurée, par définition, à travers un milieu de un centimètre d'épaisseur. La hauteur de la couche de sperme irradiée est cependant beaucoup plus faible (inférieure à 2 mm) ; c'est pourquoi la DO est mesurée sur une dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  de la suspension irradiée. La concentration du sperme traité a été ajustée de sorte que sa dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  ait une DO de 0.55 à 265 nm (Diter, 1990).

(La longueur d'onde de 265 nm est prise comme référence car il s'agit de la longueur d'absorbance de l'ADN.)

Des gammes d'étalonnage sont donc effectuées afin d'établir une relation entre la concentration de spermatozoïdes et la densité optique.

Cinq mâles sont utilisés. Après scarification, tamisage et comptage des gamètes, les solutions sont diluées afin d'obtenir, pour chaque animal, sept lots allant de 5 à 35 millions de spermatozoïdes par millilitre.

Ces échantillons sont alors passés au spectrophotomètre afin de mesurer leur DO.

### 3.2.1.2. Résultats

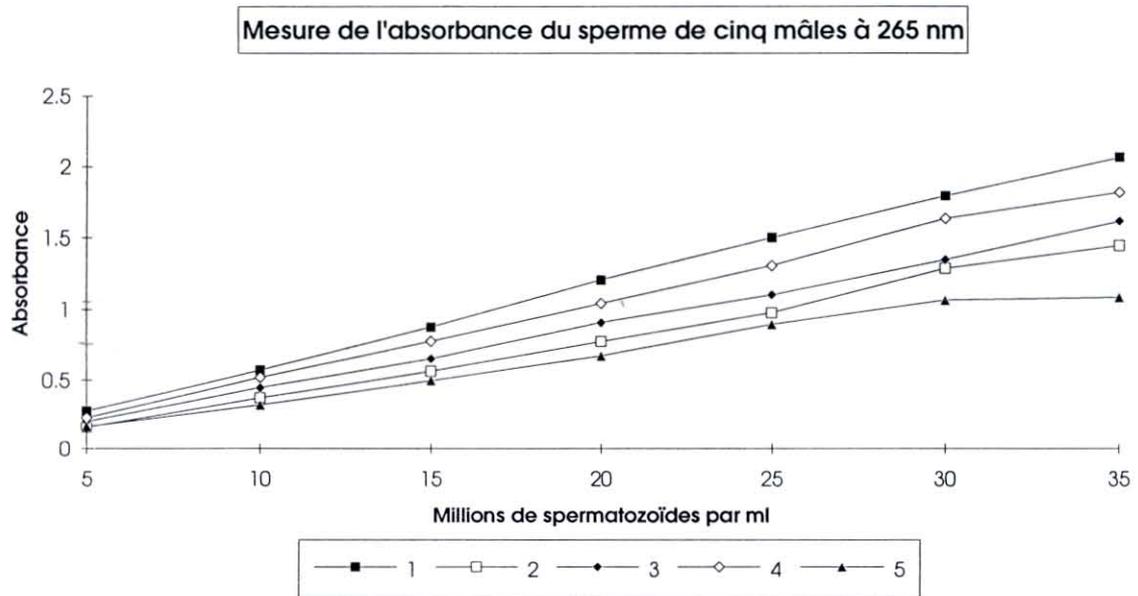


Figure A : mesure de l'absorbance du sperme de cinq mâles en fonction de leur concentration en millions de spermatozoïdes par millilitre.

### 3.2.1.3. Discussion

Pour les faibles concentrations (5 Millions/ml), les cinq absorbances sont relativement proches mais plus les concentrations augmentent, plus les résultats deviennent hétérogènes. Cela pose un problème concernant la faisabilité des expériences qui, elles, nécessitent de fortes concentrations.

Il ne semble donc pas y avoir de réelle concordance entre la concentration du sperme et sa DO. Cette discordance vient de l'hétérogénéité physiologique des animaux au départ. En effet, ils n'ont pas tous le même degré de maturation, la même motilité au niveau de leur spermatozoïdes, la même turbidité de liquide spermatique...

Cette méthode ne peut donc pas servir de modèle pour la standardisation de l'irradiation aux U.V.

### **3.2.2. ETUDE DE LA MOTILITE DES SPERMATOZOIDES**

#### **3.2.2.1. Protocole général**

Ces essais ont pour but de créer une échelle de motilité et d'en vérifier les différentes applications. Plusieurs problèmes vont alors se poser quant à :

- l'analogie possible entre le temps d'irradiation et la variation de motilité
- l'objectivité d'une telle échelle
- l'existence d'une correspondance entre la motilité et le pouvoir fécondant
- la reproductibilité des expériences.

Le même protocole sera utilisé pour toutes les irradiations :

- prélèvement de 5 ml de la suspension à irradier
- dépôt dans une boîte de Pétri en verre de 5 cm de diamètre
- agitation grâce à un barreau aimanté
- distance entre la boîte et la lampe UV : 30 cm
- références de la lampe : 2 rampes de 30 Watts, longueur d'onde 254 nm, puissance de 152  $\mu$ W à une distance de 2 mètres.

#### **3.2.2.2. Essai A**

##### 3.2.2.2.1. Protocole

En se basant sur les résultats précédents (Peudenier, 1992), cette première expérience va servir de vérification concernant les réactions des spermatozoïdes face à trois temps d'irradiation (1 minute 30, 2 et 3 minutes).

Pour cela trois mâles sont utilisés, leur sperme est ramené séparément à une concentration de 20 millions de gamètes par millilitre. A chaque temps d'irradiation correspondent huit mesures pour lesquelles la motilité est observée sur microscope photonique (grossissement x 200).

Parallèlement la mesure des densités optiques permet d'établir une correspondance possible.

### 3.2.2.2. Résultats

Irradiation séparée des spermatozoïdes de trois mâles avec observation des gamètes.

(L'interprétation du comportement des spermatozoïdes est une moyenne des huit tests effectués.)

	MALE N°1	MALE N°2	MALE N°3
<b>Concentration</b> (en million de gamètes/ml)	20	20	20
<b>Densité Optique à 265 nm</b>	1.044	0.825	0.828
<b>3 minutes</b>	tous les gamètes sont morts		tous les gamètes sont morts
<b>2 minutes</b>	légers mouvements sur quelques gamètes	tous les gamètes sont morts	légers mouvements sur quelques gamètes
<b>1 minute 30</b>	mouvements plus vifs que précédemment	quelques mouvements spasmodiques	mouvements plus vifs que précédemment

### 3.2.2.3. Discussion

La concentration du sperme de trois mâles est standardisée mais après irradiation les résultats obtenus sont cependant très dissemblables : ceux ayant les DO les plus proches (mâles n°2 et n°3) sont ceux qui réagissent le plus différemment.

La standardisation recherchée ne peut donc, *a priori*, se faire ni sur la concentration, ni sur un ajustement de densité optique. Il faudra cependant le vérifier (cf essai C).

### **3.2.2.3. Essai B**

#### 3.2.2.3.1. Protocole

Cette expérience a pour but d'étudier la motilité des gamètes afin d'obtenir une échelle composée de degrés les plus précis possibles.

Un mâle possédant des gamètes très mobiles (vérification préalable sur microscope) est scarifié. Après tamisage, dilution et comptage, les spermatozoïdes sont ajustés à 20 millions de gamètes par millilitre.

Les prélèvements sont ensuite irradiés pendant des temps variant de 30 secondes à quatre minutes puis sont observés au microscope.

### 3.2.2.3.2.Résultats

Les irradiations sous ultra-violet sont effectuées sur un seul mâle, avec une gamme de temps suffisamment étendue pour pouvoir observer des variations nettes de motilité. De ces observations est tirée l'échelle de motilité suivante :

DEGRE DE MOTILITE	OBSERVATION DES SPERMATOZOÏDES SOUS MICROSCOPE PHOTONIQUE (Grossissement x20)
5	Agitation très vive des spermatozoïdes, déplacements de tous les côtés
4	Les déplacements linéaires des gamètes sont plus nombreux que les déplacements tourbillonnants
3	Les déplacements tourbillonnants sont plus nombreux que les déplacements linéaires
2	Mouvements tourbillonnants spasmodiques seuls, le nombre de gamètes immobiles est très élevé
1	Les spermatozoïdes immobiles sont majoritaires, restent quelques mouvements spasmodiques
0	Immobilité totale de tous les gamètes

### 3.2.2.3.3.Discussion

Cette échelle est basée sur une observation visuelle c'est-à-dire dépendante d'un manipulateur et peut donc être controversée.

Cependant, cela paraît être, pour l'instant, la seule standardisation possible. Elle implique pourtant de procéder, avant chaque manipulation, à un étalonnage du temps d'irradiation en fonction de la motilité. L'hétérogénéité des mâles est ainsi prise en compte.

### 3.2.2.4. Essai C

#### 3.2.2.4.1. Protocole

Cette expérience porte sur la comparaison de deux méthodes de l'irradiation du sperme de quatre mâles : par ajustement des concentrations ou par ajustement des densités optiques.

Dans la première partie, les concentrations des différents spermatozoïdes sont ajustées à 20 millions de gamètes par millilitre. Ces solutions sont ensuite irradiées pour vérifier la reproductibilité de l'effet d'une même irradiation chez différents mâles. Les durées sont choisies en fonction d'essais préalables sur un des spermatozoïdes utilisés.

Dans la seconde partie, les densités optiques des solutions sont ajustées de manière à avoir des solutions mères dont les dilutions au 1/10ème ont une DO de 0.55 à 265 nm. Les échantillons sont ensuite également irradiés afin de comparer les deux méthodes.

#### 3.2.2.4.2. Résultats

Comparaison de l'irradiation de quatre mâles selon deux méthodes :

Concentration ajustée*		MALE 1	MALE 2	MALE 3	MALE 4
Temps d'irradiation (en minutes)	0'	4	3	4	3
	2'15	3	3	3	2
	2'45	3	2	3	1
	3'	2	1	2	1
Densité optique ajustée		MALE 1	MALE 2	MALE 3	MALE 4
Temps d'irradiation (en minutes)	0'	5	5	5	4
	3'	4	4	3	2
	4'	3	2	3	1
	4'15	3	2	2	0
	4'30	2	1	1	0

\* La concentration a été ajustée à 20 millions de spermatozoïdes par millilitre.

### 3.2.2.4.3.Discussion

Quelle que soit la méthode utilisée, les résultats sont très dissemblables. L'hétérogénéité est encore plus importante dans la partie inférieure du tableau.

Ceci est dû au fait que l'ajustement sur la DO donne des solutions plus concentrées que celles ajustées à 20 millions de gamètes par millilitre. Les UV ayant un faible pouvoir de pénétration, s'il y a de nombreux chevauchements de gamètes, ceux-ci ne seront pas irradiés de la même manière.

Cet essai va donc dans le même sens que l'essai A en précisant qu'aucune de ces deux méthodes ne peut être appliquée pour standardiser l'irradiation sous UV.

### **3.2.3. ESSAIS BASES SUR LE TEMPS D'IRRADIATION**

#### **3.2.3.1. Essai n°1**

##### 3.2.3.1.1.Protocole

Cette manipulation nécessite : - un mâle très mature  
- un nombre de femelles matures, suffisamment important pour le nombre de fécondations désirées; ici deux huîtres ont été utilisées.

Ces animaux sont "strippés" en séparant bien les deux sexes afin d'éviter toute fécondation incontrôlée. Après tamisages, les gamètes sont dénombrés sur l'analyseur d'image afin d'obtenir, par dilution 200 millilitres d'une suspension à 20 millions de spermatozoïdes par millilitre et 500 000 ovules par béccher de 500 millilitres. Les solutions en attente sont placées dans un bain thermostaté à 25° C.

Le sperme est ensuite irradié. Les fécondations sont effectuées à raison de 100 spermatozoïdes par ovule c'est-à-dire 50 millions de gamètes mâles par béccher soit 2,5 ml de sperme irradié.

Les lots sont donc au nombre de huit, répartis comme suit :

- Lot T0 : témoin de non fécondation
- Lot T1 : témoin fécondé avec du sperme non irradié
- Lot 1 : fécondé avec du sperme irradié 30 secondes
- Lot 2 : fécondé avec du sperme irradié 1 minute
- Lot 3 : fécondé avec du sperme irradié 1 minute et 30 secondes
- Lot 4 : fécondé avec du sperme irradié 2 minutes

- Lot 5 : fécondé avec du sperme irradié 2 minutes et 30 secondes
- Lot 6 : fécondé avec du sperme irradié 3 minutes
- Lot 7 : fécondé avec du sperme irradié 4 minutes

Tous ces lots sont laissés à incuber durant quatre heures, à 25° C avec agitation.

Cinquante millilitres sont alors prélevés dans chaque béccher (soit 50 000 embryons), les 450 ml restant sont mis en élevage larvaire dans des jarres de cinq litres (les larves D seront tamisées 24 heures plus tard afin d'être observées et comptées). Les huit prélèvements sont filtrés séparément (tamis de 10 µm) et les embryons recueillis dans des éprouvettes sont ajustés à dix millilitres avec de l'eau de mer filtrée. Ils sont ensuite préparés pour l'analyse de ploïdie selon le protocole proposé (cf annexe 3).

### 3.2.3.1.2. Comptage des larves

#### ◆ Résultats

Rappelons que dans chaque lot, 500 000 embryons ont été mis en élevage.

	DUREE D'IRRADIATION	NOMBRE DE LARVES NORMALES	NOMBRE DE LARVES ANORMALES
LOT T0	non fécondé	100 % d'ovules	
LOT T1	0	440 500	8 000
LOT 1	30"	0	16 000
LOT 2	1'	0	5 000
LOT 3	1'30"	0	3 000
LOT 4	2'	0	1 000
LOT 5	2'30"	0	0
LOT 6	3'	0	0
LOT 7	4'	0	0

### ◆ Discussion

Le lot témoin fécondé avec du sperme non irradié donne un résultat très satisfaisant : la quasi totalité des embryons a donné des larves.

Seules des larves anormales sont obtenues dans les lots traités. Ce résultat est assez inattendu, surtout pour les deux premiers lots dont les spermatozoïdes n'ont subi qu'une courte irradiation.

Apparemment ces rayons ont quand même suffisamment endommagé les noyaux mâles pour empêcher l'obtention d'individus normaux. Il ne peut cependant être défini si le génome paternel a été, comme prévu, complètement irradié. Pour que ces résultats soient probants, il faudrait que ces larves anormales soient haploïdes, ce que va nous indiquer l'analyse de ploïdie.

#### 3.2.3.1.3. Analyse de ploïdie

Références de l'élevage : CGTY9418

### ◆ Résultats

(VOIR PLANCHE 4)

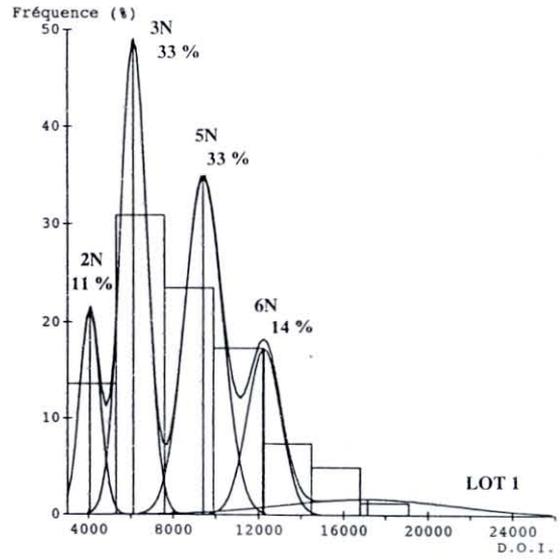
### ◆ Discussion

Tableau synthétique des résultats obtenus

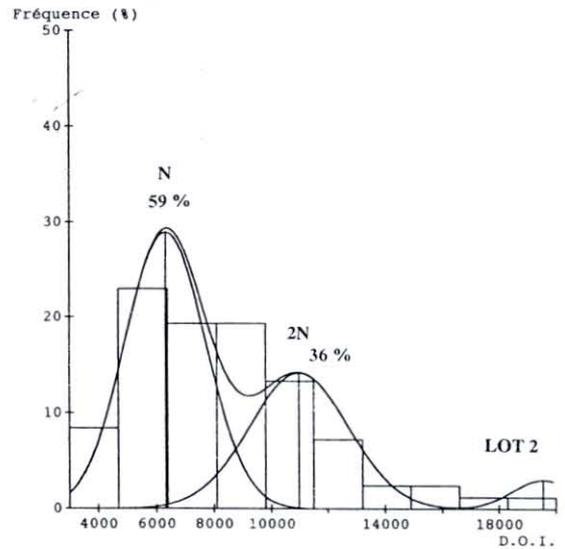
	% N	% 2N	% 3N
LOT 1	-	11	33
LOT 2	59	36	-
LOT 3	66	33	-

Il n'y a que ces trois lots qui ont pu être analysés car les larves obtenues dans les lots suivants étaient en trop faible quantité.

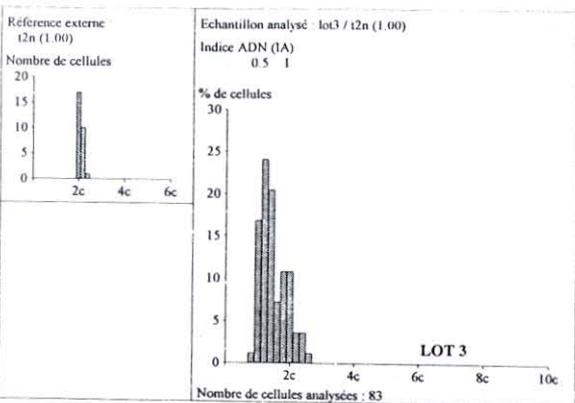
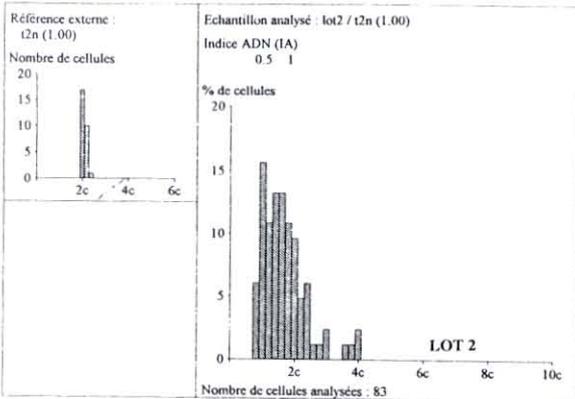
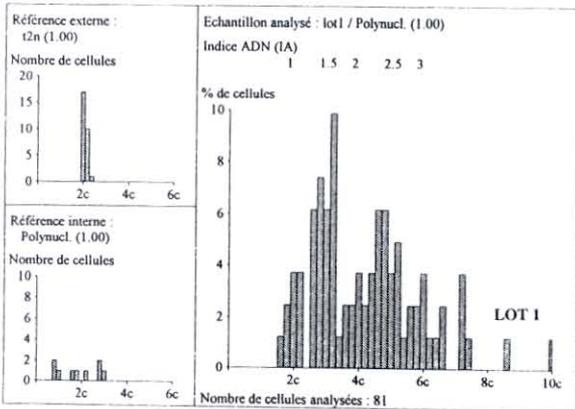
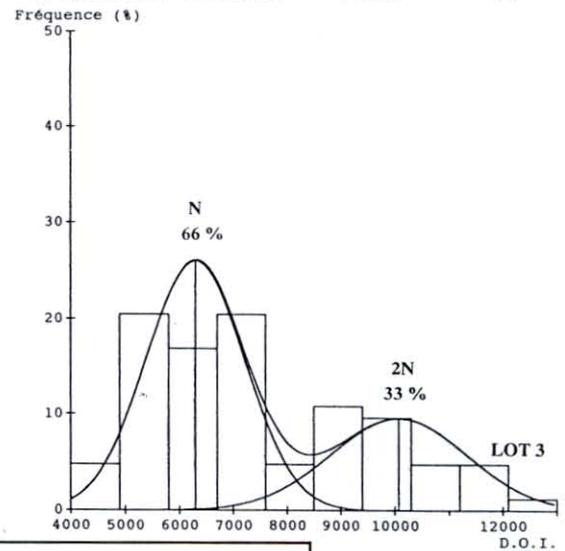
Décomposition en Gaussiennes				
	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	4057.11111	476.30509	0.1111	9
2:	6135.81481	623.46113	0.3333	27
3:	9430.37037	879.59743	0.3333	27
4:	12260.33333	788.33816	0.1481	12
5:	17156.83333	4076.44892	0.0740	6



Décomposition en Gaussiennes				
	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	6327.04081	1382.92604	0.5903	49
2:	10974.43333	1739.38584	0.3614	30
3:	19550.25	1085.55294	0.0481	4



Décomposition en Gaussiennes				
	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	6298.72727	913.43229	0.6626	55
2:	10070.42857	1264.62706	0.3373	28



Le lot 1 ne contient aucune larve haploïde, contrairement aux deux autres lots, ce qui voudrait dire que l'irradiation n'a pas été suffisante pour détruire le stock chromosomique paternel. Elle a pourtant été assez forte pour induire des aberrations chromosomiques chez ces larves. Il faut cependant remarquer que les pics pentaploïdes et ceux hexaploïdes sont inexplicables dans ce test. Des divisions cellulaires peuvent expliquer la présence d'individus allant de  $2N$  à  $4N$ .

Le pic  $3N$  ne représente pas des animaux triploïdes au sens propre du terme mais plutôt une quantité d'ADN qui proviendrait d'une irradiation ayant causé des dommages sur la moitié du stock chromosomique paternel.

Les variations entre les pics haploïdes et tétraploïdes sont représentatives de tous les cas de figure de noyaux en division.

Un problème a dû survenir au moment de la préparation des échantillons (fixation ou coloration) rendant impossible toute interprétation.

Les deux lots suivants obtiennent des chiffres proches de ceux attendus, notamment pour les haploïdes, ce qui correspond à une irradiation efficace. Le lot 2 a d'assez bons résultats mais l'allure de la courbe, ainsi que le pourcentage d'haploïdes, montre que l'irradiation est encore insuffisante car les deux pics ne sont pas nets et proviennent de cellules de ploïdie anormale en division.

Le troisième lot est assez satisfaisant, les pics  $N$  et  $2N$  sont bien distincts ce qui est le but recherché. Si ces chiffres sont fiables, cela voudrait dire qu'on obtiendrait avec la restauration environ 66 % de diploïdes gynogénétiques. Cela fait l'objet de l'expérience suivante.

On peut alors penser que une irradiation d'une minute trente serait proche de celle recherchée.

### **3.2.3.2.Essai n°2**

#### **3.2.3.2.1.Protocole**

Selon le même protocole de départ que l'essai précédent, cette fois-ci avec un mâle et quatre femelles, dix lots vont être obtenus. La différence va se trouver au niveau d'un traitement à la cytochalasine B, sur les lots numérotés de 0 à 3, débuté 20 minutes après la fécondation, d'une durée d'application de 15 mn et soumis ensuite à un rinçage au DMSO pendant une vingtaine de minutes. Ce traitement va permettre la restauration de la diploïdie.

Pour que les résultats soient utilisables , un témoin haploïde c'est-à-dire non traité à la C.B., est prévu pour chaque lot. Ils se répartissent donc comme suit :

Lot 0 : fécondé avec du sperme irradié 30 secondes, traité CB

Lot T0 : témoin haploïde du lot 0

Lot 1 : fécondé avec du sperme irradié 1 minute, traité CB

Lot T1 : témoin haploïde du lot 1

Lot 2 : fécondé avec du sperme irradié 2 minutes, traité CB

Lot T2 : témoin haploïde du lot 2

Lot 3 : fécondé avec du sperme irradié 3 minutes, traité CB

Lot T3 : témoin haploïde du lot 3

Tem 2N : témoin fécondé avec du sperme non irradié

Tem 3N : comme le témoin 2N mais traité à la CB

Puis, comme pour l'expérience précédente, 50 000 embryons sont prélevés en vue d'une analyse de ploïdie et les autres sont placés en élevage larvaire.

### 3.2.3.2.2.Comptage des larves

#### ◆ Résultats

LOTS	DUREE D'IRRADIATION	RESTAURATION A LA C.B.	NOMBRE DE LARVES NORMALES	NOMBRE DE LARVES ANORMALES
LOT T2N	0	non	400 000	27 500
LOT T3N	0	oui	1 500	500
LOT 0	30"	oui	15 500	9 500
LOT T0	30"	non	1 500	3 000
LOT 1	1'	oui	8 500	3 000
LOT T1	1'	non	0	0
LOT 2	2'	oui	500	0
LOT T2	2'	non	0	0
LOT 3	3'	oui	160	11
LOT T3	3'	non	0	0

### ◆ Discussion

Le lot témoin T2N, comme dans l'essai précédent, a donné de très bons résultats : 80 % des embryons ont abouti à des larves normales.

En revanche, le lot T3N n'a pas donné de résultats satisfaisants, les larves obtenues ne représentant que 0,3 % des animaux mis en élevage, alors que le résultat attendu aurait dû être proche de 90 %. Le nombre trop restreint d'embryons a empêché l'analyse de ploïdie. Il est toutefois possible de disculper la C.B. car elle a vraisemblablement été efficace pour les autres lots. Une erreur de manipulation est sans doute la cause de ce faible résultat.

L'irradiation a été plus efficace que celle de l'essai précédent car aucune larve n'est comptée dans les lots non restaurés dès la première minute.

La restauration permet heureusement d'obtenir assez de larves pour l'analyse de ploïdie de trois lots.

#### 3.2.3.2.3. Analyse de ploïdie

Références de l'élevage : GYNOGENE/2806

### ◆ Résultats

(VOIR PLANCHE 5)

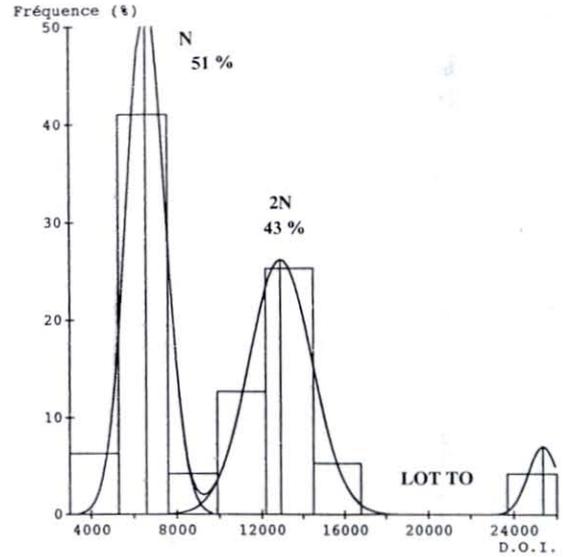
### ◆ Discussion

Tableau synthétique des résultats obtenus sur la Planche 5

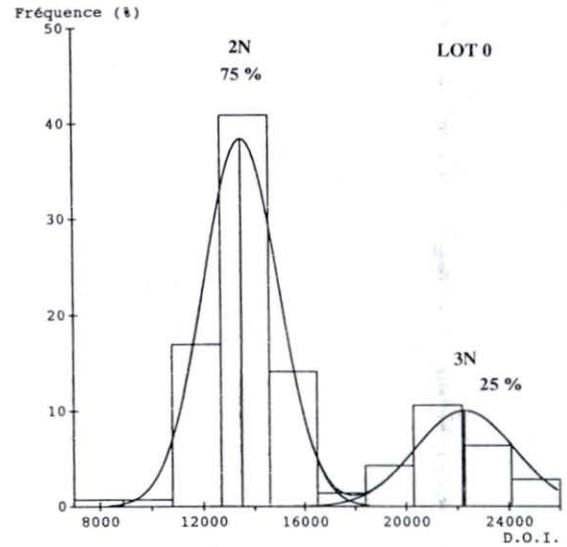
	% N	% 2N	% 3N
LOT T0	51	43	-
LOT 0	-	75	25
LOT 1	-	90	-

Le lot T2N a servi de référence durant l'analyse, mais il n'a été possible d'obtenir que trois courbes, le nombre d'embryons des autres lots étant trop faible.

Décomposition en Gaussiennes				
	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	6595.57142	892.82628	0.5157	49
2:	12927.26829	1513.17371	0.4315	41
3:	25357.6	687.61896	0.0526	5



Décomposition en Gaussiennes				
	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	13515.90566	1473.3928	0.7464	106
2:	22290.61111	1916.86164	0.2535	36



Décomposition en Gaussiennes				
	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Nombre
1:	13535.43333	2198.14726	0.9000	90
2:	26588.3	3962.1899	0.1000	10

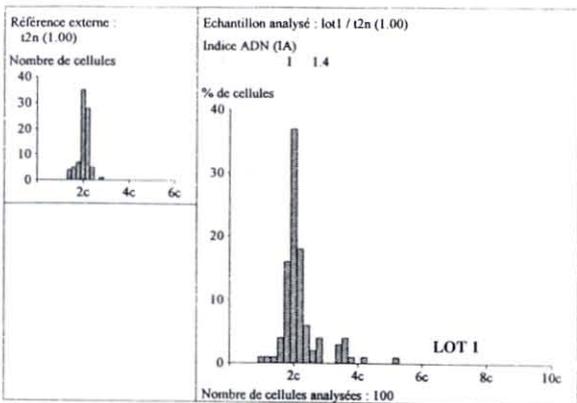
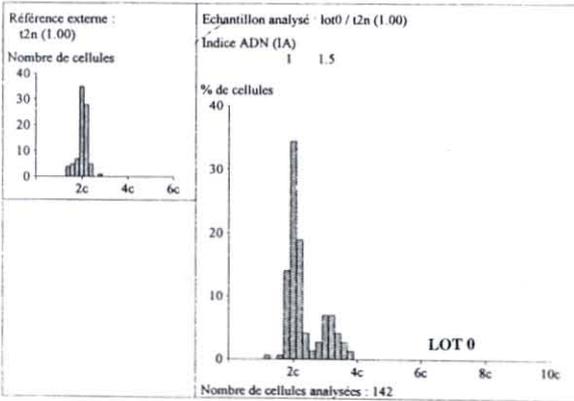
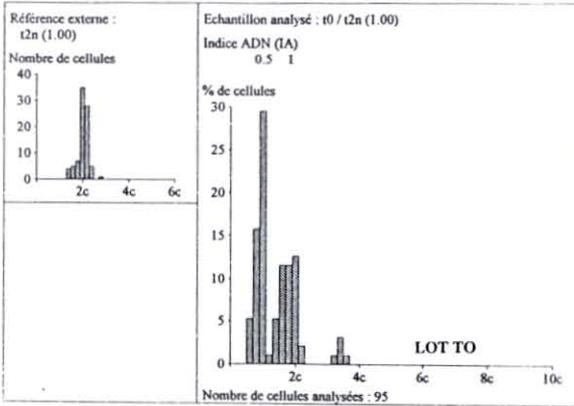
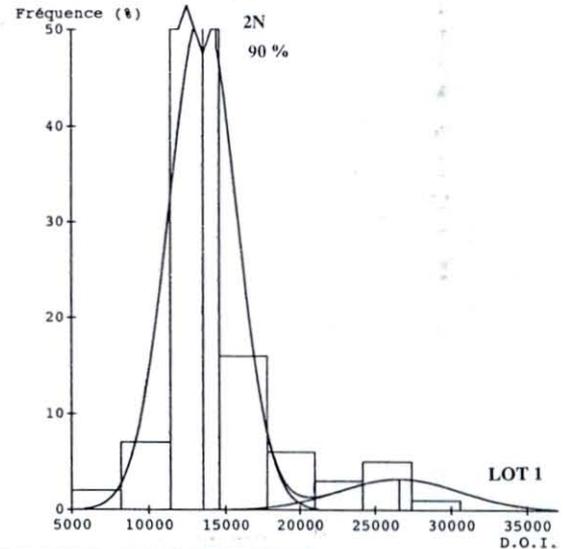


PLANCHE 5

Après restauration à la C.B., deux pics sont obtenus pour le lot 0. Le pic 2N est composé d'individus diploïdes gynogénétiques et de diploïdes normaux. Il faut donc le comparer au témoin qui n'a pas été mis en contact avec le produit.

Dans le témoin (T0), les diploïdes sont des animaux normaux et les haploïdes sont des embryons obtenus sans participation du stock chromosomique paternel. C'est donc ceux-là qui, s'ils avaient été restaurés, auraient donné des 2N-gynogénétiques. Une irradiation de 30 secondes donne donc environ 50 % d'individus gynogénétiques.

Ces 50 % sont enlevés aux 75 % de diploïdes obtenus pour le lot 0, il reste 24 % de 2N-normaux restants. Leur présence est explicable par le fait que l'induction à la C.B. pour la création de triploïdes n'est jamais efficace à 100 % (même par rétention du G.P.2). Ces 24 % font sans doute partie de la marge d'erreur.

En outre, si ces 24 % sont ajoutés aux 25 % de 3N du lot 0, réellement obtenus (venant d'individus 2N qui, traités à la C.B, sont devenus triploïdes), un résultat proche des 43 % de 2N du lot T0 obtenus sans restauration, est bien retrouvé.

Le résultat obtenu pour le lot 1 est encore meilleur avec 90 % de diploïdes mais la proportion de gynogénétiques qu'ils contiennent n'a pu être déterminée, la comparaison avec le lot non traité T1 n'ayant pas pu se faire.

Le temps d'irradiation optimum en vue de l'obtention d'individus gynogénétiques doit donc se trouver dans le cadre de cette expérience aux alentours de une minute. Il aurait été nécessaire de renouveler cette expérience afin de préciser cette durée, mais cela a malheureusement été impossible à réaliser en raison de problèmes pathologiques dans les élevages larvaires.

## **4. CONCLUSION**

Le développement des recherches dans la domaine de la cytogénétique des mollusques bivalves vise surtout l'obtention de méthodes et de produits présentant des caractéristiques intéressantes pour la profession conchylicole.

L'élevage d'individus triploïdes stériles est destiné à augmenter la production en la rendant possible sur toute l'année. Les problèmes rencontrés avec les lots 3N-Méiose-I n'ont pas de conséquence économique mais font défaut dans le domaine des connaissances génétiques, physiologiques et biochimiques des mollusques.

Les animaux N-Méiose-II, avec 96 % de réussite, sont aisés à obtenir et à élever si toutefois des incidents pathologiques ne surviennent pas durant la phase larvaire. En revanche, le meilleur résultat obtenu pour les N-Méiose-I n'est que de 20 %. Il provient d'une désorganisation précoce du fuseau achromatique, causée par l'induction chimique elle-même, cet aspect étant problématique.

La gynogénèse est, quant à elle, très employée chez les poissons pour l'amélioration des performances d'élevage (Diter, 1990). L'objectif est donc d'en obtenir l'application chez les huîtres creuses. Cette recherche se trouve cependant confrontée à des problèmes de variabilité de résultats et de viabilité des animaux obtenus. Le but est donc d'arriver à standardiser l'irradiation sous U.V. pour optimiser l'obtention de ces diploïdes.

Les essais de standardisation en vue de l'obtention d'individus gynogénétiques ont surtout montré les aspects n'étant pas réalisables. L'ajustement des densités optiques des solutions de sperme à irradier, ainsi que l'ajustement de la motilité des spermatozoïdes n'ont pas donné de résultat probant.

Les deux essais basés sur le temps d'irradiation ont ciblé des temps de une minute et une minute trente.

L'axe à suivre concernant la gynogénèse devrait porter sur de nombreuses pré-manipulations visant à cerner, si possible, un temps d'irradiation situé entre une minute et une minute trente temps qui conviendrait à toutes les expériences.

En outre, la viabilité des huîtres gynogénétiques au-delà du stade larve "D" n'a toujours pas été démontré. Les lots obtenus lors de ce stage ont été confrontés à un problème pathologique empêchant toute recherche dans ce sens. Ces problèmes périodiques depuis l'an passé déciment les élevages dès le mois de juin. Il faudrait donc tester la viabilité des diploïdes gynogénétiques à une autre période de l'année.

## **5. BIBLIOGRAPHIE**

**ALLEN, S.K. & DOWNING S.L., 1986.** "Performance of triploid oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), I : survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings". J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 102 : 197-208.

**BEETSCHEN, J.C., 1962.** "Sur la descendance des femelles tétraploïdes croisées avec des mâles diploïdes chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltlii*". Michah. C.R. Acad. Sci., 255 : 3068-3070.

**CHOURROUT, D. & NAKAYAMA, I., 1987.** "Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout". Theor. Appl. Genet., 74 : 687-692.

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

**CHOURROUT, D., 1984.** "Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout : production of all-triploids, all tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics". Aquaculture, 36 : 11-126.

**CHOURROUT, D., 1986a.** "Use of grayling sperm (*Thymallus thymallus*) as a marker for the production of gynogenetic rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". Theor. Appl. Genet., 72 : 633-636.

**CHOURROUT, D., CHEVASSUS, B., KRIEG, F., HAPPE, A., BURGER, G. & RENARD, P., 1986b.** "Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females". Potential of tetraploid fish. Theor. Appl. Genet., 72 : 193-206.

**DITER, A., 1990.** "Reproduction uniparentale et polyplôidie induites chez la truite arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*) et chez les bivalves (*Crassostrea gigas*, *Ruditapes philipinarum* et *Chlamys varia*). Thèse de doctorat de l'Université Paris VI, 60p.

**DESROSIER, R., GERARD, A., PEIGNON, J.M., NACIRI, Y., DUFRESNE, L., MORASSE, J., LEDU, C., PHELIPOT, P., GUERRIER, P. & DUBE, F., 1993.** "A novel method to produce triploid embryos in bivalve molluscs by the use of 6-Diméthylaminopurine". J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Décembre 1992.

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

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

**GERARD, A., NACIRI, Y., LEDU, C., PEIGNON, J.M. & PHELIPOT, P., 1993b.**

"Assessment of aquacultural advantages following the cytogenetic induction of polyploidy in commercialy important marine shellfish". First Report Project N° AIR1 3003 92 0168.

**GERARD, A., NACIRI, Y., PEIGNON, J.M., LEDU, C. & PHELIPOT, P., 1993a.**

"Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)". Aquaculture and Fisheries Management, Mars 1993.

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

**GUO, X., HERSHBERGER, W.K., COOPER, K. & CHEW, K.K., 1992.** "Genetic consequences of blocking polar body I with Cytochalasin B in fertilized eggs of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* : II. Segregation of chromosomes". Bio. Bull. 183 : 387-393.

**HERAL, M. & DESLOUS-PAOLI, J.M., 1983.** "Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* estimée par mesures microcalorimétriques et dosages biochimiques". Oceanologica Acta, Vol. 6, n°2 : 193-199.

**LONGO, F.J., 1983.** "Meiotic maturation and fertilization". In The Mollusca, Vol. 3, K.M. Wilbur De., Academic Press, New-York, pp. 49-89.

**NEANT, I. & GUERRIER, P., 1988.** "6-diméthylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity". Exp. Cell Res 176/ 68-79.

**PEUDENIER, I., 1992.** "Essai d'obtention de lignées pures chez *Crassostrea gigas* par gynogenèse". Mémoire de DTSM Intechmer. 36p.

**ROUX, I., 1993.** "Induction de la triploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par rétention du premier ou du second globule polaire". Mémoire de DTSM Intechmer. 45p.

**SOURNIA, J.C., AMOUREUX, C., BELLAR, J., CAUDERON, Y., DUPLAN, J., NACIRI, Y. et NOVEL, G., 1991.** "Dictionnaire de génétique". Conseil International de la Langue Française : 28.

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

## **6. ANNEXES**

## ANNEXE 1

### PREPARATION DES ECHANTILLONS D'ANALYSE D'IMAGE PAR COLORATION DE FEULGEN-ROSENBECK

#### Principe :

Les résidus aldéhydes résultant de l'hydrolyse acide des ponts ribose-purine réagissent spécifiquement avec le réactif de Schiff et donnent une coloration rose à l'ADN.

#### Méthode :

- Hydratation des lames pendant dix minutes à l'eau distillée
- Hydrolyse acide pendant une heure
- Rinçages à l'eau distillée : quatre fois une minute
- Réactif de Schiff : une heure trente. Couvrir avec du parafilm pour éviter les dégagements sulfureux et mettre au noir (sortir le réactif du réfrigérateur une heure avant utilisation)
- Bain sulfureux : quatre fois une minute
- Eau distillée : une fois dix minutes, une fois trois minutes
- Ethanol 100 : deux fois trois minutes
- Xylène : deux fois trois minutes
- Monter à l'Eukitt.

#### PRODUITS :

- HCl 5N pour hydrolyse : 431 millilitres d'HCl (37%) + 569 millilitres d'eau distillée
- Réactif de Schiff : MERCK, réactif pour électrophorèse et microscopie (réf. 9033)
- Bain sulfureux : 0,5 grammes de métabisulfite de sodium  
un millilitre d'HCl 5N  
compléter à un litre avec de l'eau distillée

## ANNEXE 2

### **COLORATION DES CELLULES AU HOESCHST (OBSERVATION AU MICROSCOPE A EPIFLUORESCENCE)**

#### **Coloration *in vivo* :** Hoeschst 33342

- Ajouter un microlitre de Hoeschst (solution mère à 0,5 mg/ml) à un millilitre d'oeufs
- Laisser à l'obscurité pendant cinq à dix minutes
- Observer entre lame et lamelle (lumière UV, excitation à 350 nm, stop LP420)

#### **Coloration *in vitro* :** Hoeschst 33258

- Fixer les cellules pendant 60 minutes dans le tampon GA + Formol 6% : un volume d'ovocytes + un volume de tampon fixateur (GA+Formol 6%)
- Enlever le tampon fixateur par aspiration grâce à une pompe à vide
- Laver 60 minutes dans le tampon GA (deux lavages de 30 minutes)
- Colorer 60 minutes dans GA + Hoeschst (un microlitre de solution mère pour un millilitre d'oeufs)
- Laver 60 minutes dans le tampon GA (deux lavages de 30 minutes)
- Observer au microscope à épifluorescence

#### **TAMPON GA :**

<u>Produit</u>	<u>Molarité</u>	<u>Grammes/litres de solution</u>
N-méthylglucamine	250 mM	48.8
K-gluconate	250 mM	58.6
Hepes	50 mM	13.0
EGTA	10 mM	3.8

- Ajuster à pH 7,4 avec de l'acide acétique glacial.

#### **TAMPON DE FIXATION :**

Pour la préparation de 500 millilitres :

79 millilitres de formaldéhyde (formol) 38%, compléter à 500 millilitres avec du tampon GA.

## ANNEXE 3

### PREPARATION DES EMBRYONS POUR L'ANALYSE D'IMAGE

#### Méthode :

Les embryons âgés de quatre heures sont immergés dans une solution d'aphidicholine à cinq microgrammes par litre pendant deux heures.

- Ajouter une goutte de formol pour les concentrer et les récupérer
- Choc hypotonique pendant quinze minutes (eau de mer 1 / eau distillée 3)
- Centrifuger à mille rpm pendant cinq minutes, puis éliminer le surnageant
- Fixation à 4°C au Carnoy froid (éthanol3 / acide acétique 1) pendant quatre centrifugations de dix, dix, vingt et vingt minutes (1000 rpm). Bien dissocier le culot entre chaque centrifugation. Les embryons peuvent être conservés dans le dernier bain
- Enlever le maximum de Carnoy
- Dissociation des embryons dans 400 microlitres d'acide acétique 50% pendant dix minutes (on favorise la dissociation par agitation sur vortex)
- Déposer une ou deux gouttes de 100 µl de suspension sur une lame chauffée à 45 °C
- Réaspirer doucement la goutte (les noyaux se déposent sur la lame), et retirer immédiatement la lame de la plaque chauffante
- Fixation pendant dix minutes au Böhm-Sprenger

#### PRODUITS :

- Aphidicholine : solution mère à 100 µg/ml (à conserver à + 4°C)

**produit dangereux à manipuler avec précaution**

- Böhm-Sprenger : méthanol 80%  
formaldéhyde 15%  
acide acétique 5%

## ANNEXE 3 bis

### PREPARATION DES LARVES D POUR L'ANALYSE D'IMAGE

#### Méthode :

Les larves sont laissées à jeûn pendant 12 heures environ.

- Récupérer les larves nageuses par tamisage et les concentrer avec une goutte de formol
- Broyer les larves avec un broyeur de Dounce
- Choc hypotonique pendant quinze minutes (eau de mer 1 / eau douce 1)
- Centrifuger à 1000 rpm pendant cinq minutes et éliminer le surnageant
- Fixation à 4° C au Carnoy froid pendant trois centrifugations de dix, dix et quinze minutes à 1000 rpm. Bien dissocier le culot entre chaque centrifugation
- Enlever le maximum de Carnoy
- Dissocier les cellules dans l'acide acétique à 50% pendant 10 mn (agitation sur vortex)
- Déposer une ou deux gouttes de 100 µl de suspension sur une lame chauffée à 45° C
- Réaspirer doucement les gouttes et retirer immédiatement la lame de la plaque chauffante
- Fixer dix minutes au Böhm-Sprenger

#### PRODUITS :

##### Carnoy :

Ethanol 3 / acide acétique 1

##### Böhm-Sprenger :

Méthanol 80%

Formaldéhyde 15%

Acide acétique 5%