

Laboratoire Génétique et Pathologie
BP 133
Ronce les Bains
17390 La Tremblade

Marianne URCUN
Juin/Août 1998

BTS Anabiotec

CRYOPRESERVATION DES GAMETES DE MOLLUSQUES BIVALVES



IFREMER

IFREMER - INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR L'ÉLEVAGE
ET LA PÊCHE MARINIÈRE

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

INTRODUCTION.....	1
1 PRÉSENTATION GÉNÉRALE.....	1
2 PRÉSENTATION DU LABORATOIRE.....	1
21 PRÉSENTATION D'IFREMER.....	1
211 <i>Mission de l'IFREMER</i>	1
212 <i>Structure interne de l'IFREMER</i>	2
22 LA STATION DE LA TREMBLADE.....	3
221 <i>Le laboratoire Génétique et Pathologie(LGP)</i>	3
2212 <i>Structure du LGP</i>	3
2212 <i>Budget du LGP en 1997</i>	3
222 <i>Activités de recherche du laboratoire</i>	4
23 PRESENTATION DES LOCAUX.....	5
231 <i>Extérieur</i>	5
232 <i>Intérieur</i>	5
2321 <i>Salle d'élevage larvaire</i>	5
2322 <i>Micronurserie</i>	5
2323 <i>Salles de phytoplancton</i>	6
2324 <i>Salle de maturation</i>	6
2325 <i>Serre</i>	6
2326 <i>Salle de quarantaine</i>	6
23 TECHNIQUES D'ECLOSERIE.....	6
231 <i>Production de phytoplancton</i>	6
232 <i>Origine, maintien et maturation des géniteurs</i>	7
233 <i>Prélèvement des gamètes</i>	7
234 <i>Elevage larvaire</i>	8
235 <i>Micronurserie</i>	8
GENERALITES.....	9
1 MATERIEL BIOLOGIQUE.....	9
11 RAPPEL HISTORIQUE	9
12 ELÉMENTS DE BIOLOGIE	9
121 <i>Systématique</i>	9
122 <i>Répartition géographique</i>	9
123 <i>Morphologie</i>	9
124 <i>Nutrition</i>	10
125 <i>Sexe de l'espèce</i>	10
126 <i>Saison de la gamétogénèse</i>	10
127 <i>Ponte</i>	10
128 <i>Vie larvaire</i>	11

13 ASPECTS ÉCONOMIQUES	11
2 TECHNIQUE DE CRYOPRESERVATION	11
21 INTÉRÊT	11
22 PRINCIPE	12
221 Congélation des gamètes	12
222 Les cryoprotecteurs.....	12
223 La conservation des cellules dans l'azote liquide.....	12
224 La décongélation des cellules	12
23 MATÉRIELS UTILISÉS	13
231 Analyseur d'image.....	13
232 Programmateur Minicool LC 40	13
233 Microscope à épifluorescence.....	14
<u>MATERIELS ET METHODES</u>	15
1 PROTOCOLE 1 : TESTS DES CRYOPRÉSERVATEURS	15
2 PROTOCOLE 2 : TESTS SUR LA DURÉE D'EXPOSITION DES CRYPROTECTEURS.	15
3 PROTOCOLE 3 : TESTS SUR LA VARIATION DE TEMPS ET DE TEMPÉRATURE LORS DE LA DÉCONGÉLATION.....	16
4 PROTOCOLE 4 : TESTS FINALS AVEC LES MEILLEURS DONNÉES DES DIFFÉRENTS PROTOCOLES RÉALISÉS.....	16
<u>RESULTATS</u>	18
1 RÉSULTATS DU PROTOCOLE 1 : EFFETS DES DIFFÉRENTS CRYPROTECTEURS LORS DE LA CONGÉLATION DES SPERMATOZOÏDES SUR LES TAUX DE FÉCONDATION.....	18
11 CINQ CRYPROTECTEURS TESTÉS	18
12 L'ACTION DU DMSO, SEUL ET COMBINÉ.	19
13 VÉRIFICATION DE L'ACTION DE LA GLYCINE	20
131 Vérification de l'action de la glycine	20
132 Variation de la glycine avec du DMSO 10%.....	20
133 Variation de la glycine avec du DMSO 15%.....	21
2 RÉSULTATS DU PROTOCOLE 2.....	21
21 LA VARIATION DE LA CONCENTRATION EN DMSO ASSOCIÉ À 0.6% DE GLYCINE	21
22 LA VARIATION DE GLYCINE ASSOCIÉE À 10% DE DMSO	22
23 VARIATION DE GLYCINE ASSOCIÉE À 15% DE DMSO	23
3 RÉSULTATS DU PROTOCOLE 3.....	24
31 DÉCONGÉLATION 1 : 45°C PENDANT 45s	24
32 DÉCONGÉLATION 2 : 35°C PENDANT 1MN15S.....	24
33 DÉCONGÉLATION 3 : 25°C PENDANT 1MN45S.....	24
4 RÉSULTATS DU PROTOCOLE 4.....	25
41 TEMPS DE CONTACT DE 5MN.....	25
42 TEMPS DE CONTACT DE 15MN.....	25

DISCUSSION..... 26

CONCLUSION..... 26

ANNEXES ET TABLEAUX

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1 Présentation générale

L'étude, réalisée au laboratoire Génétique, Aquacole et Pathologie de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) à La Tremblade, a pour objet de déterminer une technique de conservation dans l'azote liquide du sperme d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*).

La cryopréservation des gamètes présentent plusieurs applications. Elle autorise des croisements ou des hybridations d'animaux qui ont une période de reproduction différente. Les gamètes des espèces désirées peuvent être gardées aussi longtemps que possible. Elle est indispensable pour effectuer de l'autofécondation chez l'huître.

Nous allons tenter de mettre au point une technique valable pour la préservation du sperme de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*.

Une optimisation du protocole sera effectuée en intervenant sur le choix et la concentration des cryoprotecteurs, la durée d'exposition de ceux-ci et le mode de réchauffement.

Les résultats seront évalués par la fécondation des lots expérimentaux reportée au témoin obtenu avec du sperme frais.

2 Présentation du laboratoire

21 Présentation d'IFREMER

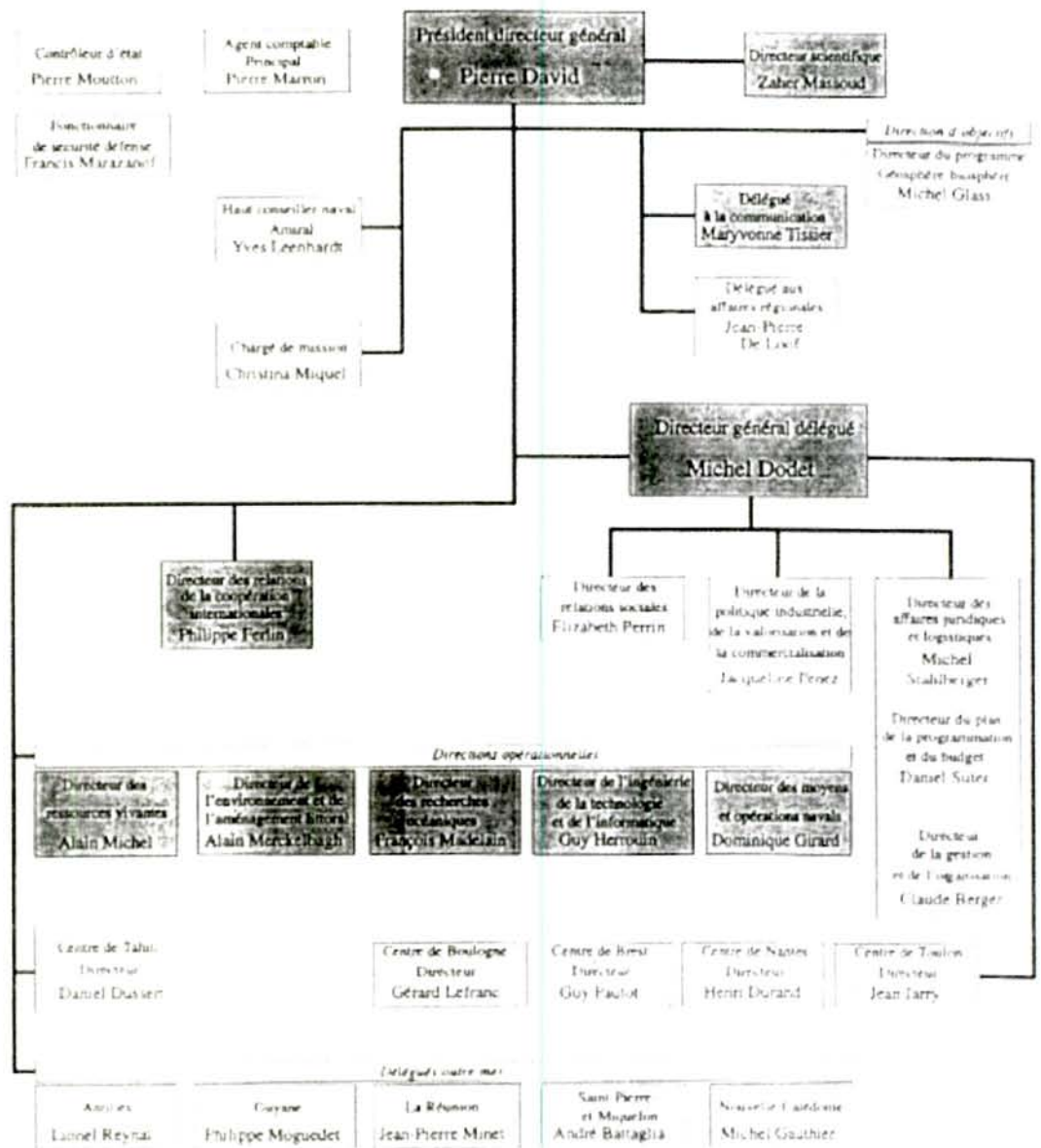
L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) gère un budget de 1 milliard de francs, dont l'origine provient en majeure partie de la subvention que lui verse l'Etat et à laquelle s'ajoutent des ressources propres dues à son statut d'EPIC (Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial).

Un peu plus de 1500 ingénieurs, chercheurs, techniciens et administratifs participent aux multiples missions de l'IFREMER (figure 1). Ces personnels travaillent au siège social à Issy les Moulineaux, dans 5 centres (Boulogne-sur-mer, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti), 5 délégations Outre-Mer, 15 stations et plusieurs points isolés répartis le long du littoral français (figure 2).

Mais l'IFREMER, c'est aussi un groupe : en effet à ces 1500 personnes, il faut ajouter environ 600 personnes qui travaillent dans des filiales et dont la vocation est de valoriser la politique de recherche de l'institut, auprès notamment des professionnels de la mer et gérer les moyens de la flotte océanographique.

211 Mission de l'IFREMER

L'IFREMER 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. C'est une spécificité importante.



Maple Document de base de données

Figure 1 : Organigramme de l'IFREMER



Figure 2 : IFREMER dans le monde

Dans ce cadre, il existe cinq missions :

1. Organisme de recherche, il mène ses actions propres dans le domaine des connaissances de base et des technologies liées à de grands enjeux scientifiques et technologiques ou de société (exploitation des ressources de la mer, protection de l'environnement littoral) souvent en collaboration avec d'autres organismes : CNRS, INRA, Universités.

2. Il doit aussi jouer un rôle d'agence d'objectifs stimulant sur les projets et programmes l'action de tous les acteurs de la recherche nationale en s'appuyant sur l'expertise de ses propres laboratoires.

Ces deux missions d'organisme de recherche pluridisciplinaire et d'agence d'objectifs sont complémentaires ; Elles font de lui une force de propositions pour une politique de recherche nationale en liaison avec les ministères chargés de la recherche et de l'espace, de l'environnement et de la défense. Cela constitue un atout aussi pour une politique de coopération internationale, prolongement naturel de sa mission de recherche.

3. Agence de moyens, il a la charge de la construction, de la programmation et de la mise en œuvre de la flotte océanographique française et des moyens lourds associés. Ceux-ci doivent être au service de la communauté scientifique nationale. Par ses actions de recherche technologique, l'institut contribue à perfectionner et à renouveler les engins et l'instrumentation nécessaires à la recherche océanographique.

4. L'IFREMER exerce une mission de service public : suivi des ressources de la mer (principalement de la pêche et de la conchyliculture) et protection de l'environnement littoral, notamment par le contrôle de la qualité des eaux.

5. En tant qu'EPIC, il a la mission de valoriser le résultat de ses travaux dans les entreprises. Il doit donc développer et mobiliser ses compétences pour renforcer la compétitivité des entreprises françaises du secteur maritime (industrie, pêche, aquaculture) pour la concurrence internationale. L'IFREMER contribue aussi à la formation par la recherche d'ingénieurs et de techniciens dans un domaine de la technologie maritime.

212 Structure interne de l'IFREMER

Comme le montre l'organigramme, l'IFREMER se compose de 5 directions opérationnelles :

- La Direction des Moyens Navals (DMN).
- La Direction de l'Ingénierie de la Technologie et de l'Informatique (DITI).
- La Direction de l'Environnement Littoral (DEL)
- La Direction des Ressources Vivantes (DRV) dont les activités couvrent l'étude de toutes les espèces vivantes de la mer, faune et flore, ainsi que l'exploitation qui en est faite. Le secteur économique de la pêche et de l'aquaculture est important, et la DRV travaille beaucoup en concertation avec les professionnels, les

administrations en charge de ce secteur, qu'elles soient nationales ou européennes.

22 La station de La Tremblade

La station de La Tremblade, située en Charente-Maritime, est composée de deux implantations, l'une à Mus de loup dépendant de la DEL et l'autre de la DRV à Ronce-les-Bains. C'est au sein de cette dernière implantation que se réalisent les travaux de recherche qui concernent la Génétique et la Pathologie (LGP) des mollusques bivalves.

221 Le laboratoire Génétique et Pathologie(LGP)

2212 Structure du LGP

Ce laboratoire, dont la direction a été confiée à André Gérard, développe deux activités de recherche dans les domaines de la pathologie et de la génétique des mollusques bivalves.

Dans l'effectif du laboratoire, sont enregistrés 1 responsable, 5 cadres, 6 techniciens, le personnel administratif et logistique et les stagiaires.

2212 Budget du LGP en 1997

(en KF)		IFREMER
Investissement	Infrastructures Equipement	582
Total investissement		582
Fonctionnement	Hors mission Mission	939 168
Total fonctionnement		1107
Cofinancement : Investissement et fonctionnement		
Plan Etat-Région Poitou-Charentes Pathologie		80
Plan Etat-Région Poitou-Charentes Génétique		270
Contrat Union Européenne "GENEPHYS"		490
Contrat Union Européenne "labo de référence"		510
Contrat FARI "Herpès virus"		84
Bureau des Ressources Génétiques		20
Total		1454

222 Activités de recherche du laboratoire

Les principaux objectifs du laboratoire tels qu'ils ont été définis dans les "cahiers des charges" de la DRV/RA, visent essentiellement à développer des programmes sur les mollusques bivalves, dans le domaine de la génétique quantitative, de la cytogénétique, des ressources génétiques et de la pathologie.

Les principaux objectifs du laboratoire en pathologie sont la surveillance des ressources conchylicoles, l'identification des agents pathogènes, la description de leur cycle de développement, la mise au point des techniques de reproduction expérimentales des maladies, le développement d'outils performants de diagnostic utilisables à des fins de recherche ou de contrôle, l'étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle.

Les principaux objectifs du laboratoire de génétique sont l'obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions ; La création de lignées ou de souches présentant des meilleures performances de croissance et de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques, pour améliorer la productivité des entreprises et le testage de nouvelles espèces, de nouvelles populations et d'hybrides pour limiter les risques liés à la monoculture.

Pour tenter de répondre à ces objectifs en tenant compte des moyens matériels et humains mis en œuvre, cinq programmes sont actuellement en cours de réalisation :

- Sélection de souches d'huître plate *Ostrea edulis* résistantes aux parasitoses.
- Sélection de souches d'huître creuse *Crassostrea gigas* sur des critères de qualité dans le cadre du programme européen(GENEPHYS).
- Polyploïdisation des principales espèces d'intérêt commercial.
- Obtention de lignées pures et recherche de marqueurs génétiques.
- Acclimatation et hybridations inter-spécifiques de différentes espèces du genre *Crassostrea*.

Infrastructures

Le laboratoire LGP est réparti sur deux bâtiments.

Le premier est principalement constitué de :

- 6 salles de laboratoire (1 salle des centrifugeuses, 1 salle d'histologie, 1 salle de préparation des échantillons pour la microscopie électronique, 1 salle de cultures cellulaires et 1 salle de bactériologie/électrophorèse, 2 salles réservées à la biologie moléculaire).
- 1 salle de manipulation des éléments.
- 1 salle climatisée pour le microscope électronique à transmission.
- 1 laboratoire photo, 1 salle de rangement des produits, 1 laverie.
- 8 bureaux, 1 salle de réunion et 1 bibliothèque.

Le deuxième bâtiment de 1200m², est principalement composé de :

- 5 salles humides (Quarantaine, Micronurserie, Maturation, Elevage larvaire, Serre).
- 2 salles de production de phytoplancton et une laverie.
- 1 laboratoire et une salle d'informatique.

Il a également en charge la gestion et l'entretien de tout le circuit hydraulique qui se compose de :

- 4 bassins de 300m³ de réserve d'eau de mer.
- 23 pompes de 10 à 300m³/h.
- plusieurs kilomètres de tuyauterie.
- 1 station de traitement de l'eau à l'ozone.
- 4 bassins de 20m³ pour la production en masse de phytoplancton.
- 1 station de traitement d'eau salée souterraine(eau de forage).

23 PRESENTATION DES LOCAUX

Le schéma (tableau 3) montre le fonctionnement de l'écloserie.

231 Extérieur

Les quatre bassins de stockage de 300 m³ reçoivent l'eau de mer, par l'intermédiaire de 460 m de tuyaux, la reliant à la station de pompage, située en pleine mer. Il s'agit d'effectuer une première purification par décantation.

Par contre, l'eau de forage (puisée à 110 mètres de profondeur et abiotique) est transférée dans les quatre bassins de 20 m³ pour la production du phytoplancton, celui-ci est produit selon la technique du bloom suivant un cycle de 4 jours.

Les 23 pompes du circuit hydraulique répartissent cette eau et le phytoplancton dans les différentes salles de l'écloserie.

232 Intérieur

2321 Salle d'élevage larvaire

Filtrée sur 3µm, l'eau est répartie dans des bacs cylindriques de 5 à 150 litres selon les besoins. Il s'agit d'un circuit fermé dont l'eau est renouvelée tous les deux jours.

2322 Micronurserie

Cette salle possède des bacs de 100 litres d'eau de mer contenant des tamis à différents maillages, variant selon la taille de la larve. Lors de sa métamorphose, la larve cherche un support ; C'est ainsi qu'elle est maintenue dans un environnement contrôlé avec des conditions particulières :

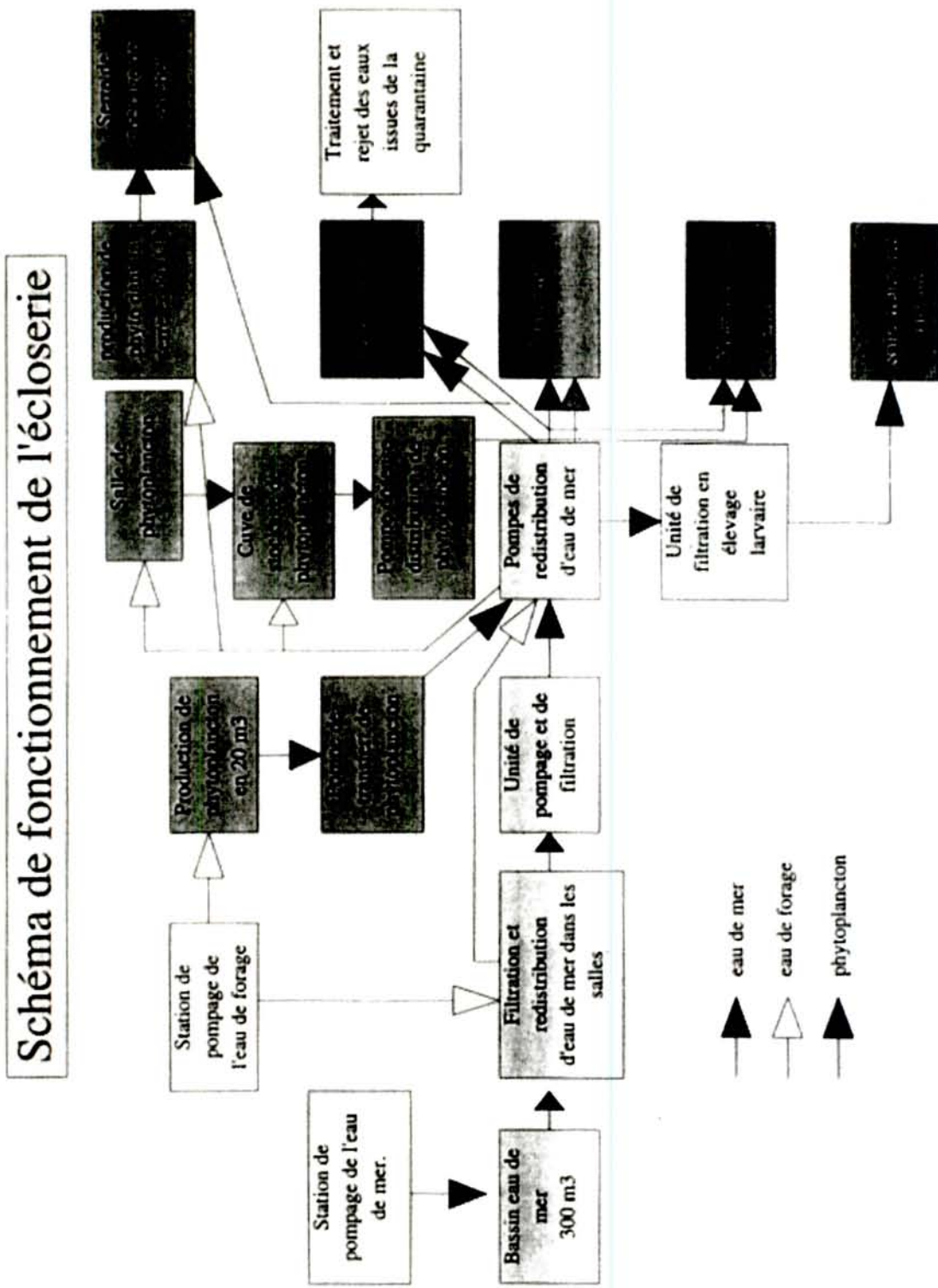


Figure 3 : Fonctionnement de l'écluserie

- eau filtrée à 30µm et enrichie en phytoplancton.
- température régulée à 21°C.
- renouvellement de l'eau (de 200 à 400 litres par heure).

2323 Salles de phytoplancton

L'eau de forage alimente ces salles. Elle est autoclavée pour les petits volumes (2 et 10 litres). La production de phytoplancton est ensuite distribuée dans les salles différentes (exception faite de la salle d'élevage larvaire) de façon automatique. 900 litres de phytoplancton sont distribués par jour par l'intermédiaire de pompes donneuses qui injectent automatiquement les algues dans le circuit hydraulique de chaque salle.

2324 Salle de maturation

Filtrée sur un filtre à sable et mélangée à du phytoplancton l'eau de mer enrichie arrive sur des raceways à un débit constant de 250 l/h. la moitié de la production de phytoplancton est consacrée à l'alimentation de cette salle.

2325 Serre

Les huîtres sont stockées dans cette salle ; Les adultes sont déposés dans des bacs à fond plat, les jeunes issus de la micronurserie sont placés dans des cylindres pourvus d'un fond de maillage suffisamment important (de 500µm à 2000µm). Le bullage est assuré par un système d'air lift. Dans chaque bac de 800 litres le renouvellement de l'eau est de 500l/h.

2326 Salle de quarantaine

Il s'agit de la salle où sont conservées les différentes espèces d'huîtres récoltées à travers le monde ("conservatoire de souches").

Avant rejet en mer, l'eau de mer est stérilisée par un système d'ozonisation afin d'éviter la propagation dans le milieu naturel d'espèces ou de maladies non-implantées localement.

Pour limiter l'utilisation d'eau de mer, les bacs fonctionnent en circuit fermé et sont équipés d'un filtre biologique. L'eau des bacs est renouvelée 3 fois par jour automatiquement.

23 TECHNIQUES D'ECLOSERIE

231 Production de phytoplancton

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

- *Tetraselmis suecica*
- *Pavlova lutheri*
- *Isochrysis galbana*

L'eau utilisée pour la culture des algues est une eau de forage pompée à - 110m de profondeur, avec les avantages d'être de qualité constante, limpide et abiotique. Malgré sa concentration élevée en métaux (Fer, Mn), elle n'a aucune incidence ni sur la qualité des souches, ni sur celle des larves.

- Ces cultures monospécifiques se font sur milieu de Conway (Walne, 1974) adapté à l'eau de forage (annexe1). La culture aseptique des souches en erlenmeyers de 500ml est conservée au froid à 10-12°C, avec une photo période de 12h/12h, les repiquages s'effectuent tous les mois.
- Les ensemencements se font successivement dans des ballons de 2 et 10l (figure 4 et 5).
- L'ensemencement dans les cuves transparentes de 300l est réalisé dans une salle climatisée à 18°C et à éclairage permanent. La distribution des microalgues s'effectue au bout de 5 jours de culture.

Espèces	Concentrations obtenues après 5 jours de culture
<i>Pavlova lutheri</i>	6 à 11 millions de cellules par ml
<i>Isochrysis galbana</i>	5 à 10 millions de cellules par ml
<i>Tetraselmis suecica</i>	0.2 à 0.8 millions de cellules par ml

232 Origine, maintien et maturation des géniteurs

Les géniteurs proviennent soit d'une production d'écloserie soit de captages naturels, ils sont âgés de 2 à 4 ans.

Dès le mois de février, la maturation sexuelle de l'huître débute dans le milieu naturel. Elles sont alors transférées dans la salle de maturation, dans une eau de mer à 18°C, débarrassée des matières en suspension et enrichie en phytoplancton. L'apport en oxygène est assuré par une circulation d'eau continue (200l/h). Pour assurer une qualité d'eau optimale, les bacs de maturation sont nettoyés quotidiennement.

Les huîtres, conservées dans ces conditions, sont une densité de 50 dans un bac de 100l. Elles sont mures et capables de se reproduire au bout de quinze jours à deux mois selon leur état de maturation à l'arrivée dans cette salle.

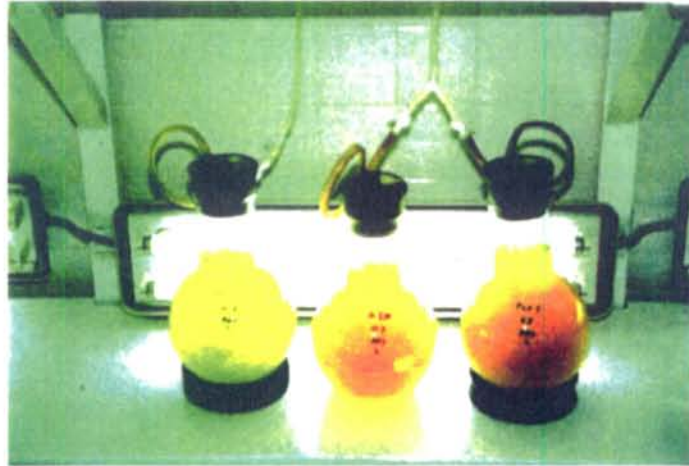


Figure 4 : Ballons de 2 et 10 litres

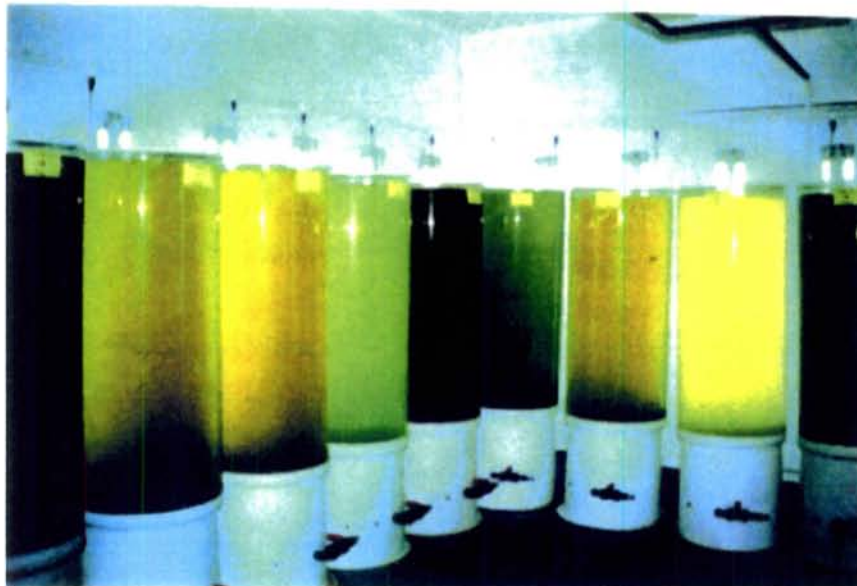


Figure 5 : Cuves de 300 litres

233 Prélèvement des gamètes

Pour les expériences de cryopréservation, la méthode utilisée est le stripping. Elle consiste en une scarification de la gonade à l'aide d'un scalpel.

Après reconnaissance du sexe au microscope, les gamètes sont récupérés par stripping et par rinçage de l'animal avec une pissette d'eau de mer filtrée (3µm), puis sont tamisés (spermatozoïdes sur 25µm et ovules sur 60µm) pour évacuer les débris cellulaires divers.

Leur qualité est alors vérifiée : la mobilité pour les spermatozoïdes et la présence d'une vésicule germinative pour les ovules.

Malgré les avantages que la technique par stripping apporte telles que l'absence de fécondation incontrôlée et le gain de temps, elle entraîne le sacrifice des animaux utilisés, nécessitant un stock de géniteurs suffisamment important, et présente le risque d'utilisation d'animaux insuffisamment mûres.

234 Elevage larvaire

Les œufs obtenus sont placés en incubation à 25°C dans des bacs de 30 ou 150l d'eau de mer filtrée, à faible bullage, à une densité de 100 embryons par ml.

Au bout de 24 heures, les larves D sont recueillies sur un tamis de 45µm, afin d'être triées, comptées et mesurées, leur densité est ramenée à 10 larves/ml.

Cette opération de tamisage est effectuée tous les deux jours jusqu'au transfert des larves en nurserie, au moment de la métamorphose.

Un suivi de leur évolution et un renouvellement de l'eau s'effectue régulièrement : un suivi de croissance et de mortalité et un dénombrement du taux de larves anormales. Durant cette période, la salinité peut varier de 25 à 33‰, selon la saison et la pluviométrie, mais n'a pas d'effets sur les performances larvaires. Les larves sont alimentées quotidiennement avec diverses souches phytoplanctoniques à des concentrations de 20 cellules par µl.

235 Micronurserie

A partir du vingtième jour, le naissain de l'huître creuse nécessite un support, sur lequel il va pouvoir se fixer lors de sa métamorphose.

Dès l'apparition du pied et de la tâche oculaire annonçant celle-ci, les larves sont placées sur un tamis de maille 150µm dont le fond est tapissé de microbrisures de coquilles huîtres (obtention huîtres une à une). Afin d'éviter la fixation des larves sur les bords du support, ceux-ci sont paraffinés.

Tant qu'il n'a pas atteint une taille de quelques millimètres, le naissain doit être conservé dans des conditions contrôlées :

- Eau filtrée à 30µm et enrichie en phytoplancton.
- Température régulée à 21°C.
- Renouvellement de l'eau.

GENERALITES

GENERALITES

1 MATERIEL BIOLOGIQUE

11 Rappel historique

Les premiers spécimens de *C. gigas* furent implantés officiellement dans le bassin de Marennes Oléron par un professionnel en 1966 à la suite d'un voyage personnel au Japon (Barre, 1981). Il s'en suit un développement très rapide de la production dès 1972. Ainsi, en 1984, la production d'huîtres françaises (100000 tonnes) est constituée à 98% par la culture d'huître creuse *C. gigas*, cultivée sur une superficie de 20000 ha

Cette nouvelle venue fut remarquée par ses performances de croissance nettement supérieures à la portugaise *C. Angulata*, dès les premières années qui suivirent son importation.

12 Eléments de biologie

121 Systématique

- Embranchement des Mollusques.
- Classe des Bivalves.
- Ordre des Filibranches.
- Familles des Ostreidea.
- Genre des *Crassostrea* Sacco (1897).
- Espèce *gigas*.

122 Répartition géographique

L'huître creuse est présente dans l'océan Pacifique, en ex-Union Soviétique, au Japon avec deux races locales, en Corée et sur la côte pacifique d'Amérique du Nord, de l'Alaska à la Colombie britannique, puis aux Etats-Unis jusqu'en Californie.

En France, elle vit dans les zones de variations des marées sur la côte atlantique, et supporte les changements de température et de salinité.

123 Morphologie

La coquille se compose de deux valves asymétriques. Le ligament, fixé aux bords dorsaux des valves, provoque leur écartement. Les muscles adducteurs s'opposent à l'action mécanique du ligament et ferment la coquille. L'œsophage est court, il aboutit dans un vaste estomac possédant un "stylet cristallin" dont l'extrémité

antérieure bute contre une plaque cuticulaire denticulée de la paroi stomacale. Entraîné par des cils vibratiles, le stylet cristallin tourne sur lui-même (10 à 80 fois/mn) broyant les aliments contre la plaque cuticulaire. En libérant des enzymes, il participe également à la digestion. L'intestin, plus ou moins enroulé, traverse le ventricule cardiaque inclus dans un péricarde. Le pied est absent chez l'huître creuse adulte. Entre chaque pan du manteau et le corps, s'insèrent les branchies. Les bords du manteau de l'huître sont pourvus de terminaisons tactiles, les tentacules (figure 6).

124 Nutrition

Ils se nourrissent de particules phytoplanctoniques, de 2 à 10 μ m, en suspension dans l'eau ambiante. Ils aspirent l'eau en créant un courant inhalant grâce aux battements des cils branchiaux. Les particules sont poussées par ces cils vers les palpes labiaux qui les convoient vers la bouche. Trop volumineuses, elles sont rejetées par les palpes labiaux ou par le siphon exhalant, quand il existe. La branchie possède également la faculté d'absorber directement des particules organiques de petites tailles. Elle joue probablement, de ce fait, un rôle non négligeable dans la nutrition des bivalves.

125 Sexe de l'espèce

L'huître creuse est une espèce à hermaphrodisme successif, alternativement sexe mâle puis femelle. Ce changement de sexe s'effectue après la saison de reproduction.

126 Saison de la gamétogénèse

La gamétogénèse des bivalves présente un caractère rythmique qui n'est pas toujours identique d'un biotope à l'autre. Elle comprend généralement une phase de repos hivernal, une phase de production, de multiplication et de maturation des gamètes au printemps, suivie d'une période d'émission des produits sexuels à la fin du printemps ou au cours de l'été. Il existe également une possibilité de reconstitution des gonades et de nouvelles émissions au milieu ou à la fin de l'automne, en fonction des conditions climatiques. Selon les biotopes, les différentes étapes du cycle gonadique annuel débutent et s'achèvent plus ou moins tardivement.

127 Ponte

Dès la fin de l'hiver, les réserves disparaissent au profit de la glande génitale et lorsque celle-ci arrive à maturité en mai-juin, la coloration blanchâtre du tronc de l'huître est essentiellement due à l'accumulation de produits génitaux. L'émission des gamètes s'effectue dans l'eau ambiante et la fécondation est livrée au hasard. Les femelles élaborent par leur gonade une substance qui, provoque l'éjaculation des mâles voisins. A son tour, le sperme déversé déclenche la ponte des femelles. La

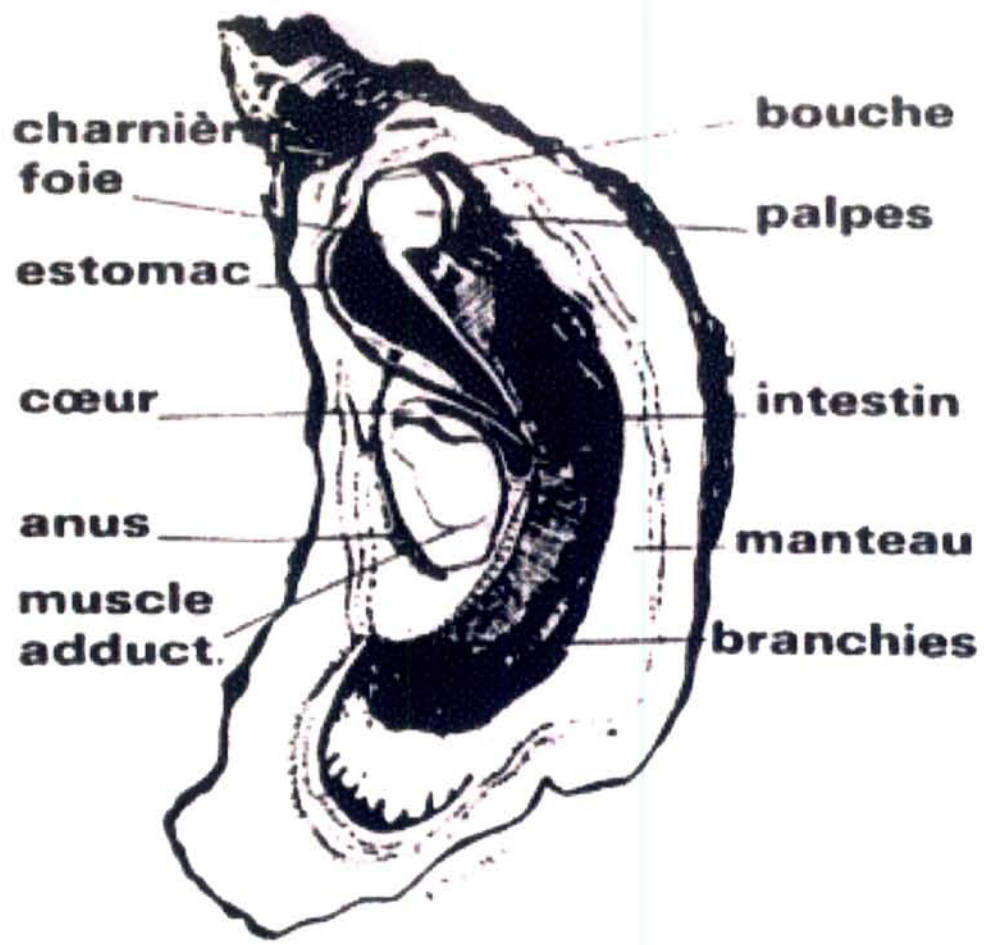


Figure 6 : Anatomie de l'huître creuse *C. gigas*

synchronisation des émissions de gamètes augmente les chances de rencontre des ovocytes et des spermatozoïdes. Les substances en cause sont des fertilisines. Les huîtres creuses émettent de grande quantité d'ovocytes, estimée à 20-30 millions par animal. Ces ovocytes ont un diamètre moyen de 55µm. Les ovocytes émis sont bloqués au stade vésicule germinale (GV), soit la prophase de la méiose 1, ou occasionnellement, immédiatement après la rupture de la vésicule germinale (GVBD), stades auxquels s'effectue la fécondation. Consécutivement à sa pénétration par le spermatozoïde, l'ovocyte émet ses deux globules polaires. Simultanément, les deux pronucléi, mâle et femelle, se forment puis migrent l'un vers l'autre. Les membranes nucléaires se vésicularisent alors et les chromosomes (2n=20) se condensent, s'associent puis se mélangent au niveau de ce qui sera la plaque métaphasique du premier fuseau de clivage.

128 Vie larvaire

Lors du développement embryonnaire, plusieurs stades apparaissent. Après la fécondation, la première heure consiste d'une part à la formation puis à la séparation des deux globules polaires, et d'autre part à la division embryonnaire vérifiée par la présence soit de macromères soit de micromères. Après 5 heures, l'embryon nage.

Le stade ultime de la gastrulation est la formation de la larve trochophore, caractérisée par l'apparition du système digestif et d'un anneau cilié.

Après 24 heures, le développement aboutit à une larve D (ou larve veligère) présentant une coquille, un tube digestif différencié et une vie exotrophe.

Pendant les 2 à 3 semaines de vie qui suivent, la coquille s'accroît, se renforce et la larve acquiert les caractères morphologiques des huîtres. Il s'ensuit une série de transformations, c'est la métamorphose (figure 7 et 8).

13 Aspects économiques

La production actuelle d'huîtres creuses en France oscille autour de 100000 tonnes, ce qui place l'ostréiculture française au quatrième rang mondial, derrière les Etats-Unis, le Japon et la Corée.

L'huître est l'espèce dont le chiffre d'affaires est le plus élevé des pêches maritimes françaises, représentant 1,044 millions de francs.

L'ostréiculture est implantée sur une grande partie du littoral atlantique et dans les étangs méditerranéens. Elle occupe en 1989 près de 24000ha de concessions.

2 TECHNIQUE DE CRYOPRESERVATION

21 Intérêt

La cryopréservation des gamètes d'huîtres creuses a pour but la congélation du sperme à différentes fins prédéfinies. Premièrement, la conservation du sperme dans l'azote liquide facilitera les croisements entre individus tout au long de l'année, puisque l'huître n'est mûre qu'une partie de l'année. Elle facilitera les recherches

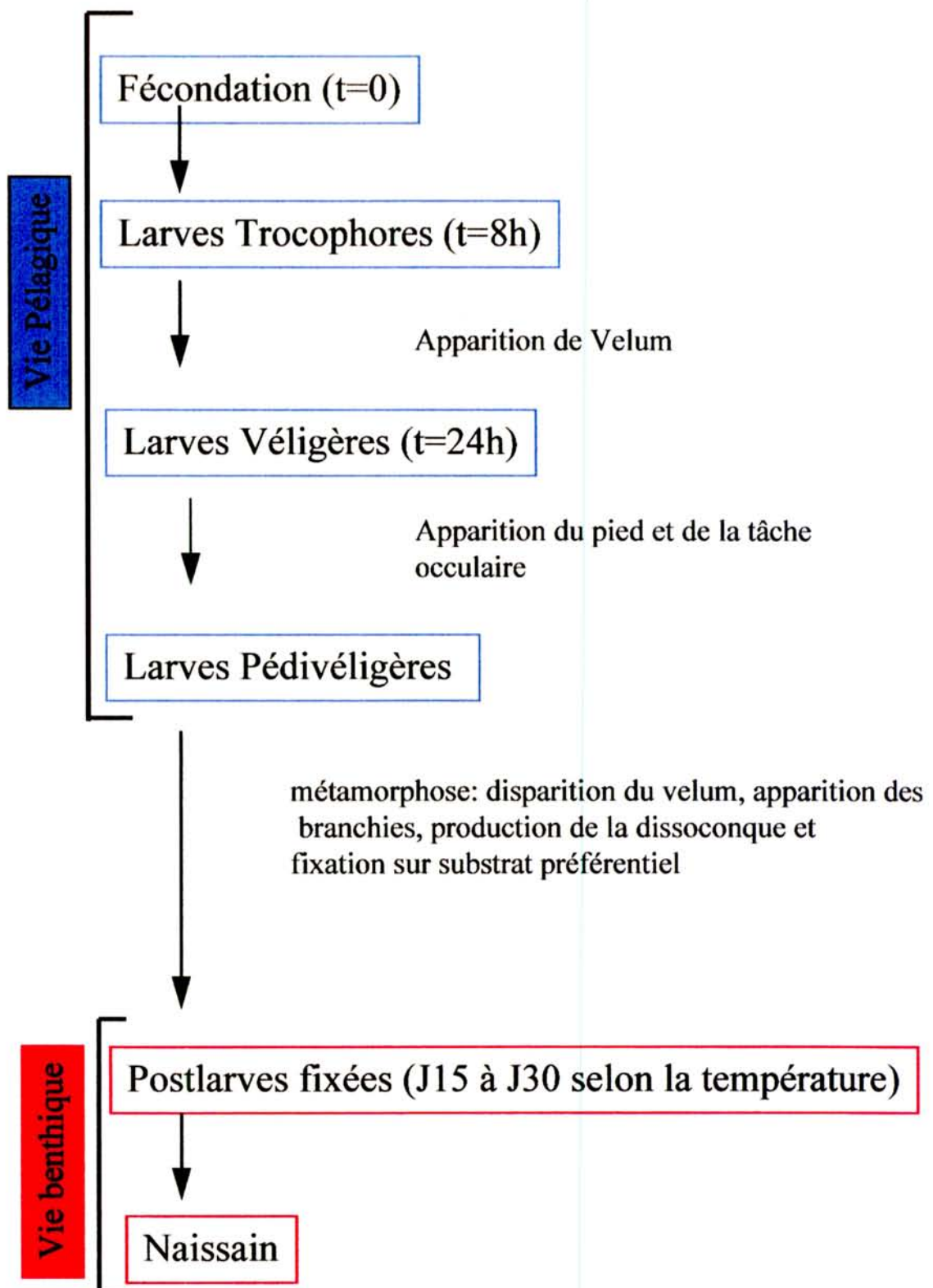


Figure 7 : Cycle de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Cycle de développement de *Crassostrea gigas*

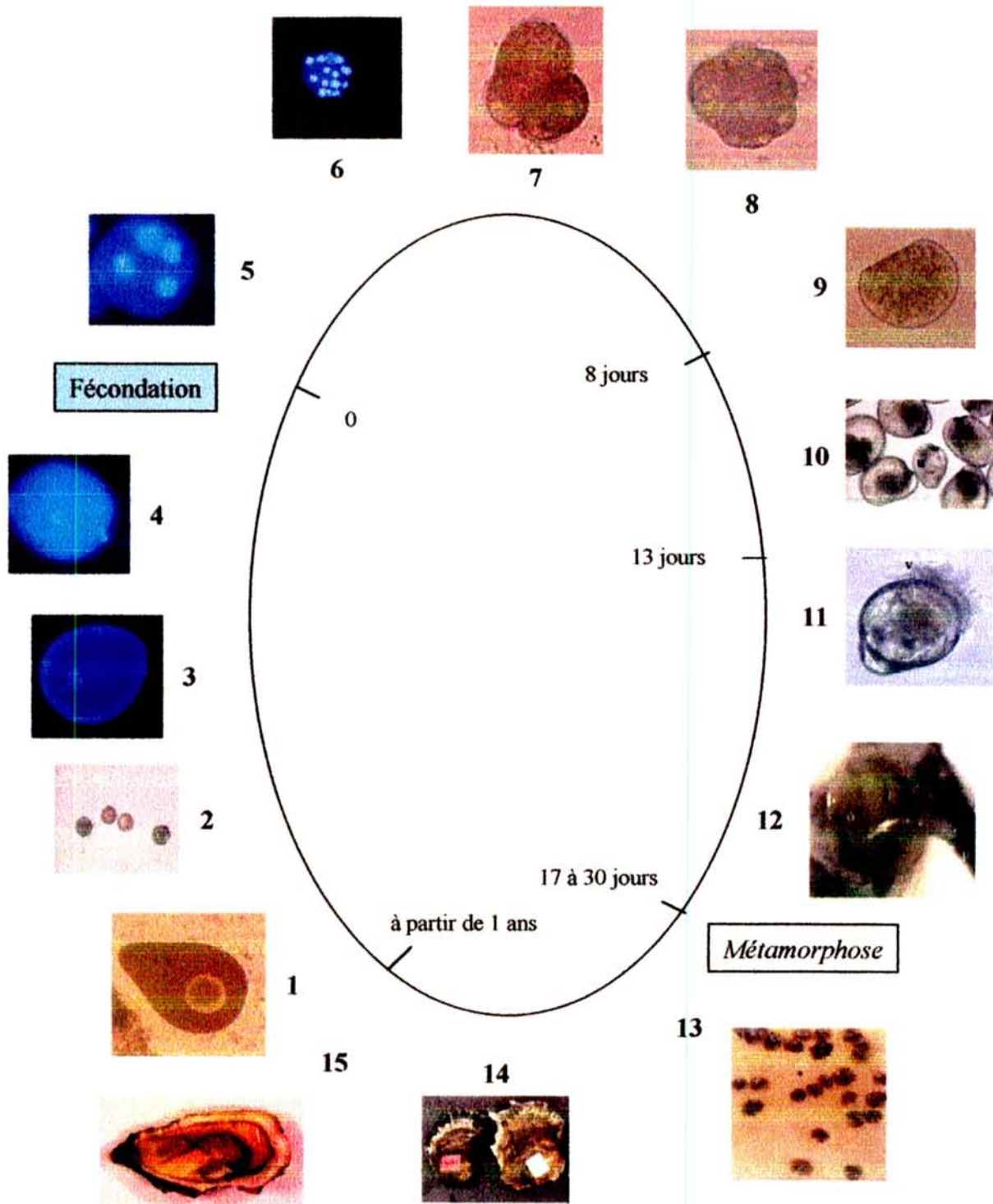


Figure 8 : Cycle de développement de *c. gigas*. 1. Ovocyte en cours de maturation; 2., 3. et 4. Ovocyte mature; 5. Embryon stade 4 cellules; 6. Embryon stade 16 cellules; 7. et 8. Embryon stade Morula; 9. Larve stade D; 10. et 11. Larve à J13 (u: umbo, v: velum); 12. Larve stade pédivéligère (p: pied, o: organe sensoriel); 13. Post-larves fixées sur plaque PVC; 14. Juvéniles (environ 6 mois); 15. Géniteur mature.
Par Bertrand COLLET.

sur les espèces étrangères en limitant le stockage d'huîtres dans le conservatoire de souches.

22 Principe

221 Congélation des gamètes

La congélation des spermatozoïdes consiste à la descente en température de ceux-ci, suivant une programmation donnée qui intègre une température finale. Les spermatozoïdes évitent la cristallisation de leurs cellules, grâce à la présence de cryoprotecteurs.

La survie des cellules est liée à leur vitesse de congélation et de décongélation. Suivant la vitesse de congélation, une différence de pression osmotique entre les milieux intra et extracellulaires crée une diminution de volume de la cellule, sans modifier sa masse.

La vitesse optimale de congélation dépend de plusieurs facteurs, qui sont modifiés en présence de cryoprotecteurs :

- La taille des cellules.
- La perméabilité de la membrane.
- La variation de celle-ci avec la température.

222 Les cryoprotecteurs

La conservation du sperme à très basse température nécessite l'emploi de substances appelées cryoprotecteurs, qui diminuent les effets engendrés par les changements de phase de l'eau.

Les cryoprotecteurs peuvent pénétrer ou pas dans la cellule, mais assurer une bonne cryoprotection.

L'effet toxique des cryoprotecteurs est attribué à une action osmotique ou/et biochimique. L'effet osmotique résulte de changements du volume cellulaire provoqués par l'introduction ou/et le retrait du cryoprotecteur. L'effet biochimique reflète une toxicité inhérente à celui-ci pouvant rester constante ou croître avec le temps d'exposition des cellules.

223 La conservation des cellules dans l'azote liquide

La congélation dans l'azote liquide (-196°C) arrête l'activité biologique de la cellule rendant sa durée de conservation infinie.

224 La décongélation des cellules

La vitesse de décongélation dépend des conditions de congélation subies par les cellules.

Lors de la décongélation du sperme durant les différents protocoles utilisés, une température mesurée au bain-marie et un temps défini servent de référence : 55°C pendant 20s.

23 Matériels utilisés

231 Analyseur d'image

Il s'agit d'un appareil muni d'un microscope, d'une caméra et d'un micro-ordinateur (figure 9), servant dans le laboratoire aux comptages des spermatozoïdes et des ovules.

Pour réaliser le comptage (figure 10 et 11), il faut suivre un protocole :

- Les spermatozoïdes :

- Prendre 100µl de spermatozoïdes purs.

- Y ajouter 100µl d'éosine.

- Puis les mélanger à 48 ml d'eau de mer filtrée (1 ou 3 µm) pour réaliser une dilution au 50^{ième}.

- Et sur une cellule de Thomas, y déposer une infime quantité.

- Réaliser le comptage.

- Les ovules :

- Lors de la récupération des gamètes, une première dilution est réalisée ; Elles sont de l'ordre d'1/1000ième à 1/4000ième, suivant les besoins de l'expérience.

- Pour la fécondation, une dilution au ½ est faite avec de l'eau de mer filtrée.

- Sur une cellule de Malassaz, y déposer une infime quantité.

- Réaliser le comptage.

Les résultats sont donnés sous la forme de X cellules par ml, qu'il faut réadapter suivant les dilutions faites auparavant.

232 Programmateur Minicool LC 40

Le Minicool est un appareil composé d'un programmateur, d'une enceinte de congélation et d'une ligne de transfert reliant le dispositif au réservoir d'azote.

Le principe est de congeler des cellules suivant un programme enregistré faisant intervenir :

- La température initiale : Ti.

- La vitesse de décongélation.

- La température finale désirée : Tf.

La descente en température peut s'effectuer suivant des paliers de température et faire intervenir des temps de refroidissement.

Le refroidissement est obtenu par pulvérisation d'azote liquide à partir d'une buse d'injection placée à l'extrémité de la turbine. Elle assure la circulation du gaz en courant ascendant dans la double paroi et en courant descendant dans la cuve intérieure.

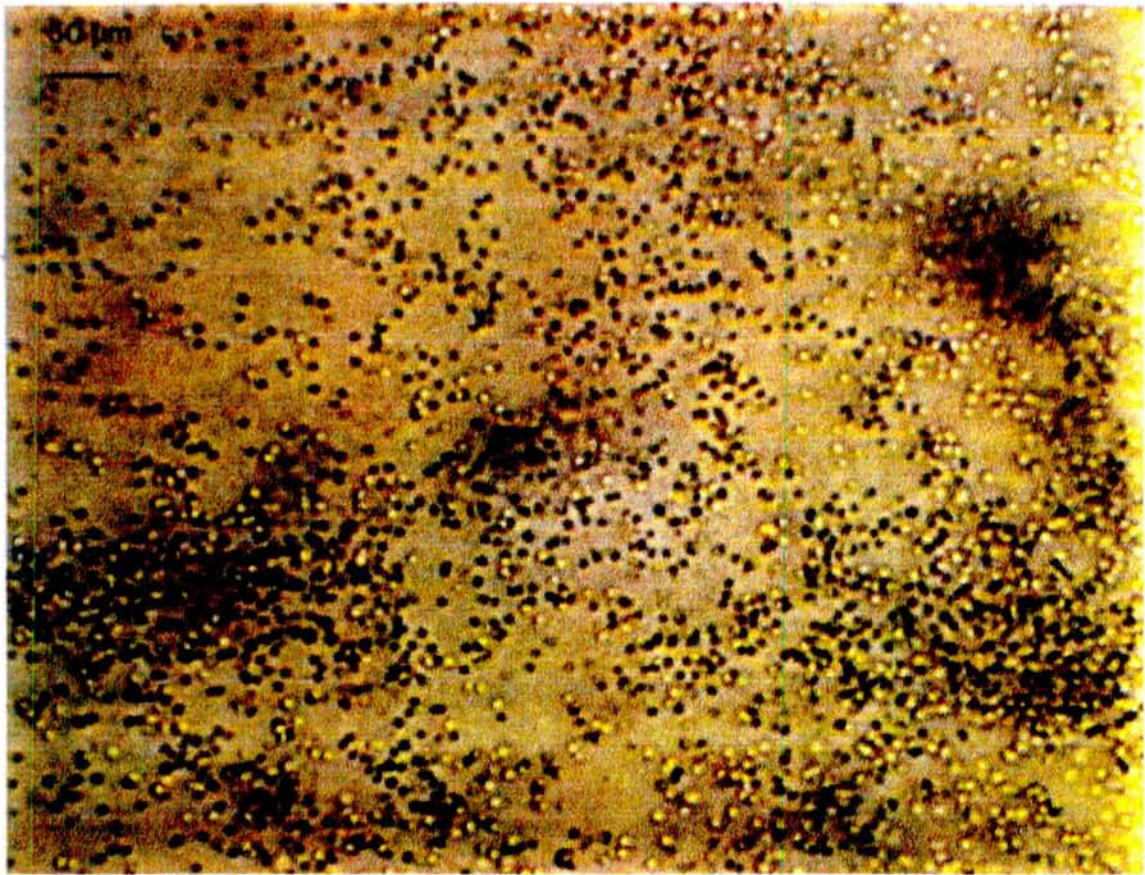


Figure 10 : Spermatozoïdes

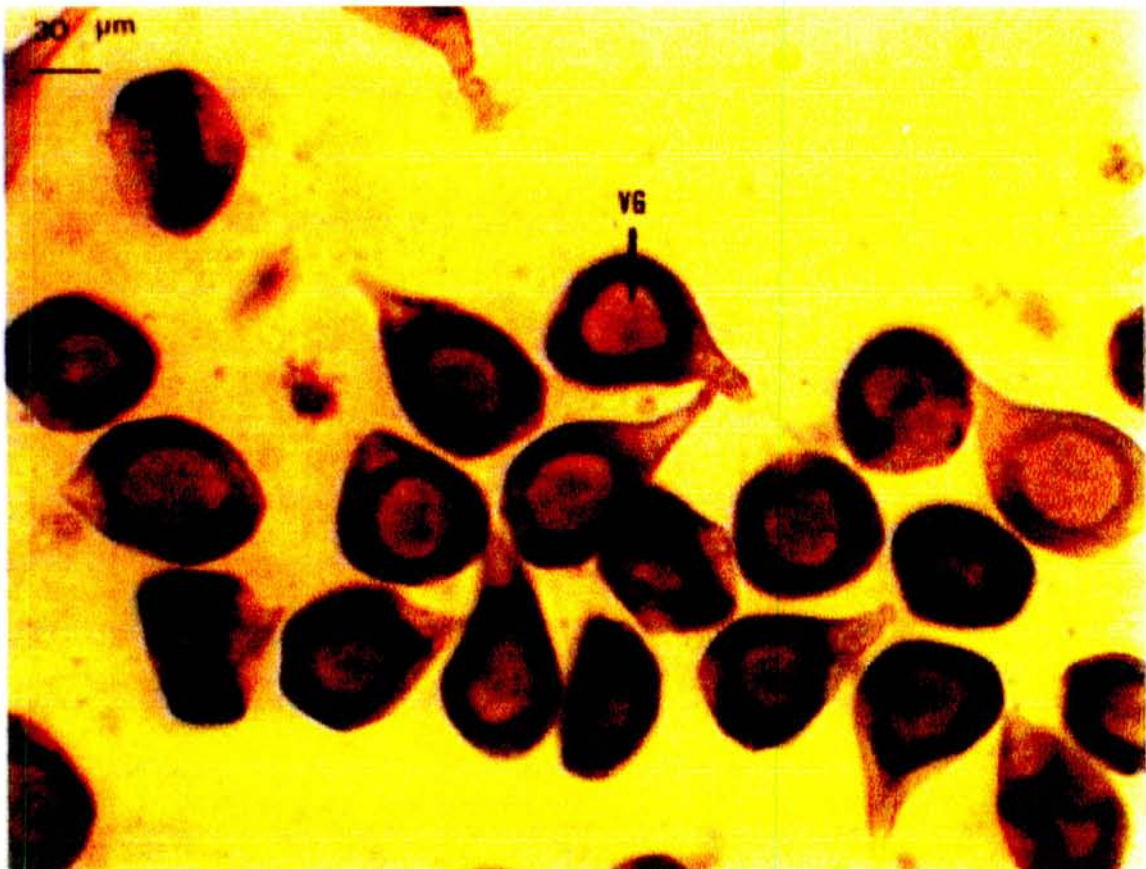


Figure 11 : Ovules avec la présence de vésicule germinative centrale.

Le stockage des gamètes se fait dans un réservoir d'azote liquide à -196°C contenant des paillettes pour la récupération des cryotubes.

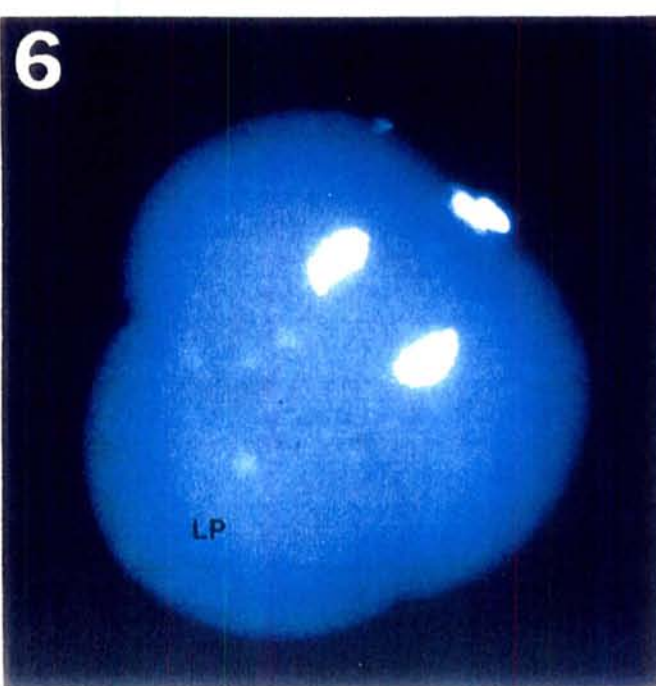
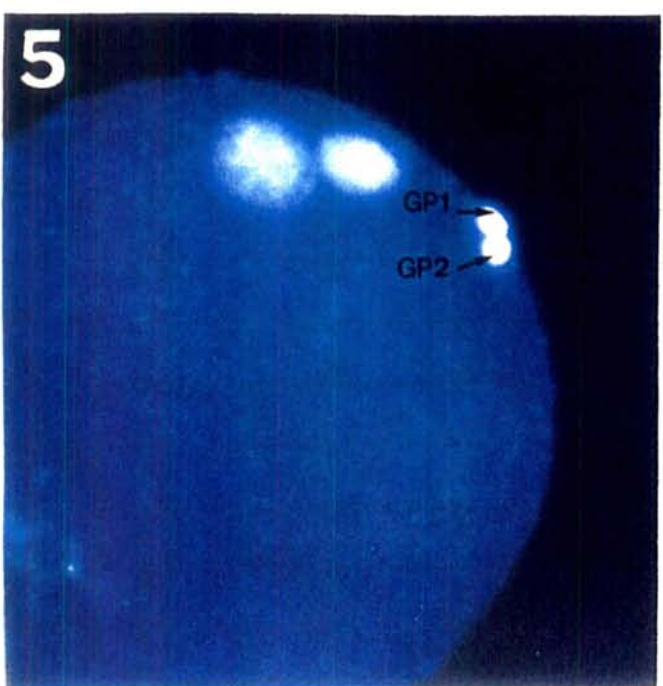
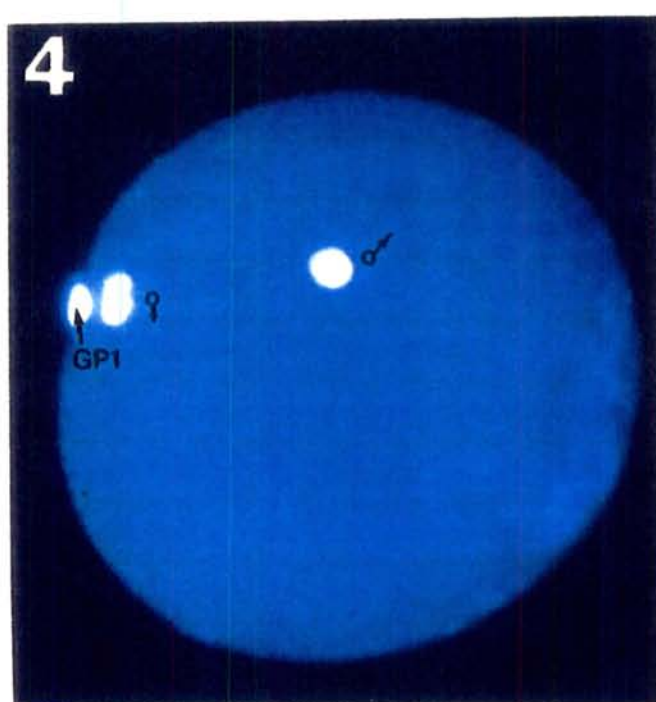
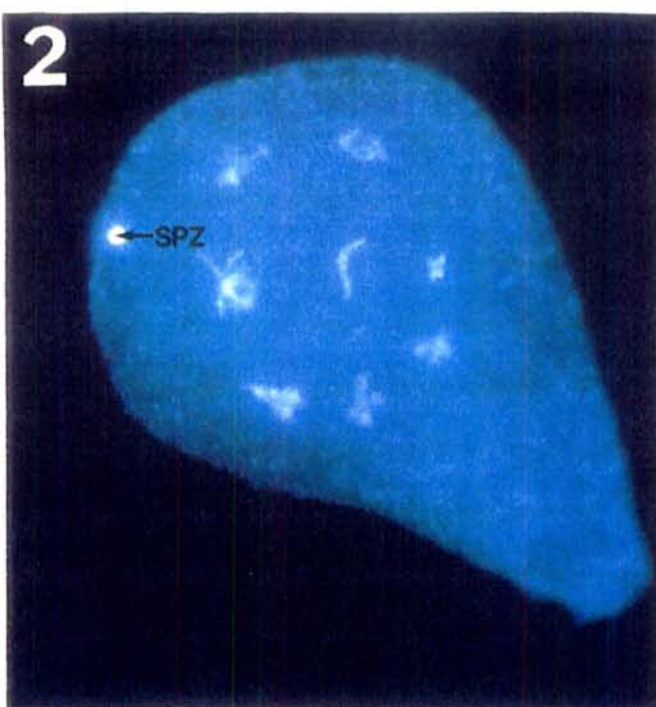
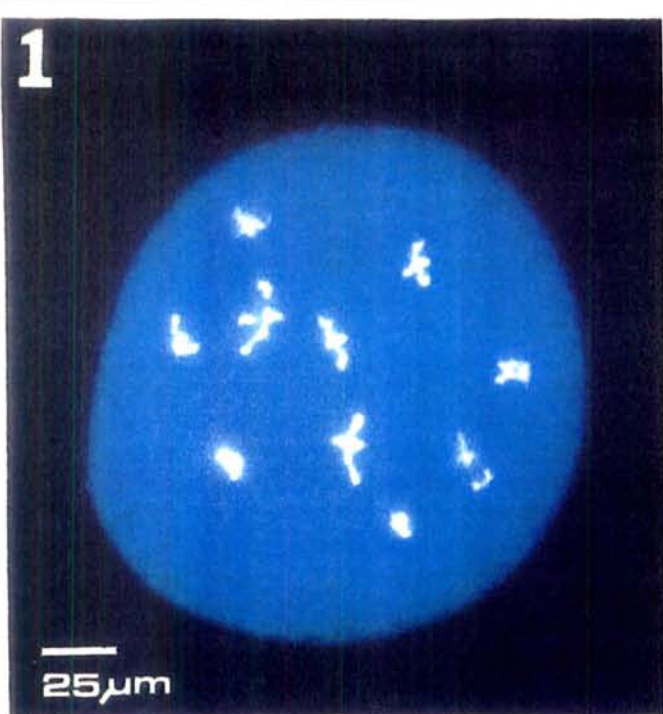
233 Microscope à épifluorescence

L'observation au microscope des ovules fécondés ou non, se déroule suivant un protocole très précis assurant la coloration de l'ADN, et montrant ainsi le stade de développement de la cellule (figure 13) ; Il s'agit de la coloration des cellules au HOESCHST : c'est une coloration "in vitro".

Le comptage s'effectue manuellement. Les pourcentages de fécondation se calculent par rapport à un lot témoin possédant un pool mâle et femelle.



Figure 9 : Analyseur d'image



MATERIELS

ET

METHODES

MATERIELS ET METHODES

1 Protocole 1 : Tests des cryopréservateurs

A partir des travaux scientifiques antérieurs, réalisés par K. Yankson et J. Moyses sur la cryopréservation des spermatozoïdes d'huîtres (1991), un protocole est élaboré.

En se basant sur les différentes publications, plusieurs cryoprotecteurs à différentes concentrations, 5%, 10% et 15%, sont testés : le glycérol, le sucre, le méthanol, le DMSO et le PVP.

En associant le protocole et les différents cryoprotecteurs, une étude a été réalisée :

- La préparation de 50 ml de diluant est effectuée.
- Le cryopréservateur est dilué dans l'eau de mer filtrée à 1 ou 3 µm.
- Dans les cryotubes, 1.5ml de diluant et 0.2ml de spermatozoïdes frais sont mélangés.
- Le temps de contact est de 45mn.
- La programmation :
 - *10°C de Ti.
 - *Vitesse de congélation : 4.7°C/mn.
 - *-70°C de Tf.
 - *48 h à -196°C.
- Le réchauffement s'effectue à 55°C durant 20s au bain-marie.
- La fécondation se déroule d'1 heure 30 à 4 heures.
- Pour l'observation au microscope, les ovocytes sont colorés, puis fixés au HOESCHST(annexe2 et 3).

Pour cette étude, 2 modes de congélation sont réalisés :

1. Congélation indirecte avec une programmation, soit une descente progressive de la température.
2. Congélation directe sans programmation, soit un plongeon direct dans le réservoir d'azote.

2 Protocole 2 : Tests sur la durée d'exposition des cryoprotecteurs.

En l'absence du programmeur de descente en température, une étude sur le temps de contact entre les cryoprotecteurs et le sperme est effectuée. A partir du protocole initial, nous avons fait varier la durée d'exposition de 5mn à 1h.

Les résultats obtenus sont, donc, effectués sans congélation.

Le protocole suivi est :

- La préparation de 50 ml de diluant est réalisée.
- Le cryoprotecteur utilisé combine le DMSO et la glycine à différentes concentrations.
- Le cryopréservateur est dilué dans l'eau de mer filtrée à 1 ou 3µm.

- Dans les cryotubes, 1.5ml de diluant et 0.2ml de spermatozoïdes frais sont mélangés.
- Aucune congélation n'est effectuée lors des différentes manipulations.
- La fécondation se déroule pendant 4 heures.
- Pour l'observation au microscope, les ovocytes sont colorés, puis fixés au HOESCHST.

3 Protocole 3 : Tests sur la variation de temps et de température lors de la décongélation.

La survie des spermatozoïdes est liée à la vitesse de congélation, mais également à la température et à la durée de réchauffement du sperme après le stockage dans l'azote. Pour confirmer cette idée, une étude est réalisée sur ce phénomène, en variant ces 2 paramètres.

- Une préparation de 50 ml de diluant est réalisée.
- Le cryopréservateur est dilué dans l'eau de mer filtrée à 1 ou 3 μm .
- Le cryoprotecteur utilisé combine le DMSO et la glycine à différentes concentrations.
- Dans les cryotubes, 1.5ml de diluant et 0.2ml de spermatozoïdes frais sont mélangés.
- Le temps de contact est de 45mn.
- La programmation :
 - *10°C de Ti.
 - *Vitesse de congélation : 4.7°C/mn.
 - *-70°C de Tf.
 - *48 h à -196°C.
- Trois types de réchauffement sont testés, au bain-marie :
 - *45°C pendant 45s.
 - *35°C pendant 1mn15s.
 - *25°C pendant 1mn45s.
- La fécondation se déroule pendant 4 heures.
- Pour l'observation au microscope, les ovocytes sont colorés, puis fixés au HOESCHST.

4 Protocole 4 : Tests finaux avec les meilleures données des différents protocoles réalisés.

Après l'étude des différents paramètres de la cryopréservation, plusieurs données sont distinguées par une meilleure congélation du sperme. Ce protocole a pour but de conclure les recherches effectuées durant ces 3 mois.

- Une préparation de 50 ml de diluant est réalisée.
- Le cryopréservateur est dilué dans l'eau de mer filtrée à 1 μm .
- Les cryoprotecteurs utilisés combinent le DMSO à, 10% et 15%, avec une variation de glycine de 0.2 à 1%.
- Dans les cryotubes, 1.5ml de diluant et 0.2ml de spermatozoïdes frais sont mélangés.

- Le temps de contact est de 5mn et 10mn.
- La programmation :
 - *10°C de Ti.
 - *Vitesse de congélation : 4.7°C/mn.
 - *-70°C de Tf.
 - *48 h à -196°C.
- Le réchauffement s'effectue à 35°C durant 1mn15s au bain-marie.
- La fécondation se déroule pendant 4 heures.
- Pour l'observation au microscope, les ovocytes sont colorés, puis fixés au HOESCHST.

RESULTATS

RESULTATS

1 Résultats du protocole 1 : Effets des différents cryoprotecteurs lors de la congélation des spermatozoïdes sur les taux de fécondation

11 Cinq cryoprotecteurs testés

Différents cryoprotecteurs sont donc testés (Tableau 1) : Glycine, Sucrose, Méthanol, DMSO (diméthylsulfoxyde) et PVP (polyvinylpolypyrrolidone), à différentes concentrations sur un pool de 3 mâles.

Le témoin qui est utilisé, est constitué de 0.2ml de spermatozoïdes provenant de 3 mâles différents et de 100ml d'ovocytes provenant de 5 femelles.

Après 3 heures de fécondation, les ovocytes sont fixés, puis colorés.

Tableau 1 : Pourcentage de fécondation en fonction des différents cryoprotecteurs et des différentes concentrations.

		% de fécondation		
		POOL MALE		
		Essai 1	Essai 2	Essai 3
Congélation		indirecte		directe
Glycérol	5%	0	0	0
	10%	0	0	0
	15%	0	0	0
Méthanol	5%	0	0	0
	10%	0	0	1.43
	15%	1.43	1.43	0
Sucrose	5%	0	0	1.43
	10%	2.86	2.86	1.43
	15%	1.43	5.72	5.72
DMSO	5%	0	0	0
	10%	0	0	0
	15%	0	0	0
PVP	5%	0	1.43	0
	10%	0	0	0
	15%	0	0	0
Témoin		67%		

D'après le tableau, aucun des cinq cryoprotecteurs ne semble intéressant pour la conservation dans l'azote liquide du sperme. Utilisés à différentes concentrations, le glycérol, le méthanol, le DMSO et le PVP donnent des taux de fécondation nuls. Le sucrose donne quelques résultats mais ne dépassant pas 5.72%.

Si elles sont utilisées seules, aucune des cinq solutions présentées, ne sera utile pour la cryopréservation des gamètes mâles.

12 L'action du DMSO, seul et combiné.

Afin de confirmer l'action du sucrose et de vérifier l'effet de la glycine associée au DMSO, une étude plus précise (tableau 2), sur un pool de 4 mâles, est réalisée pour déterminer quel cryoprotecteur sera utilisé par la suite.

Le témoin qui est utilisé, est constitué de 0.2ml de spermatozoïdes provenant de 3 mâles différents et de 100ml d'ovocytes provenant de 7 femelles.

Après 4 heures de fécondation, les ovocytes sont fixés, puis colorés.

Tableau 2 : Pourcentage de fécondation en fonction de différentes concentrations de DMSO, seul ou combiné.

	% de fécondation	
	POOL MALE	
	Essai 1	Essai 2
DMSO 10%	0	0
DMSO 15%	1.23	0
DMSO 20%	1.23	0
DMSO 10%+Gly0.6%	14.81	18.52
DMSO 15%+Gly0.6%	11.11	12.35
DMSO 20%+Gly0.6%	1.22	0
DMSO 10%+Suc15%	3.70	4.94
DMSO 15%+Suc15%	3.70	2.47
DMSO 20%+Suc15%	2.47	3.70
Gly0.6%+suc15%	0	0
Témoin	81%	

Les résultats du DMSO seul appliqué aux différentes concentrations : 10%, 15% et 20%, sur les spermatozoïdes, nous confirment que les taux de fécondité restent quasi nuls dans les 3 cas où le DMSO est utilisé seul.

Exposés au mélange du DMSO et de la glycine à 0.6%, plusieurs spermatozoïdes gardent leur pouvoir fécondant. Les taux de fécondité varient de 0% à 18.52%, respectivement pour une concentration en DMSO de 10% associée à 0.6% de glycine. Cependant les taux de fécondation des combinaisons, DMSO10% et glycine0.6% et DMSO15% et glycine0.6%, sont relativement proches, il est donc préférable d'utiliser les deux concentrations en DMSO, dans la suite des manipulations.

En revanche, l'addition de sucrose à 15% avec le DMSO aux différentes concentrations influe les taux de fécondation ; L'ajout de sucrose dans la dilution protège le sperme, cependant, pas suffisamment. Les taux restent faibles de 0% à 4.94%.

13 Vérification de l'action de la glycine

131 Vérification de l'action de la glycine

Trois concentrations en DMSO : 10%, 15% et 20%, combinées à 0.6% de glycine sont testées sur un pool de 3 mâles différents (tableau 3).

Le témoin utilisé, est constitué de 0.2ml de spermatozoïdes, provenant de 3 mâles différents et de 100ml d'ovocytes provenant d'une femelle.

Après 2 heures de fécondation, les ovocytes sont colorés, puis fixés.

Tableau 3 : Pourcentage de fécondation en fonction de 3 concentrations en DMSO et 0.6% de glycine

	% de fécondation	
	POOL MALE	
DMSO10%+gly0.6%	22.41	24.16
DMSO15%+gly0.6%	19.83	24.09
DMSO20%+gly0.6%	12.38	11.97
Témoin	41%	

Les résultats de la dilution : DMSO20% et glycine0.6%, confirme les premiers tests réalisés. En effet sur les deux essais, les taux de fécondité varient de 11.97% à 12.38%. Ceux sont les plus faibles.

Cependant les deux autres mélanges ont des résultats contradictoires par rapport aux résultats du tableau 1. Il en ressort que la dilution : DMSO10% additionné à la glycine 0.6% serait plus efficace que celle à 15% de DMSO.

Le taux de fécondation du témoin est faible : 41%

132 Variation de la glycine avec du DMSO 10%

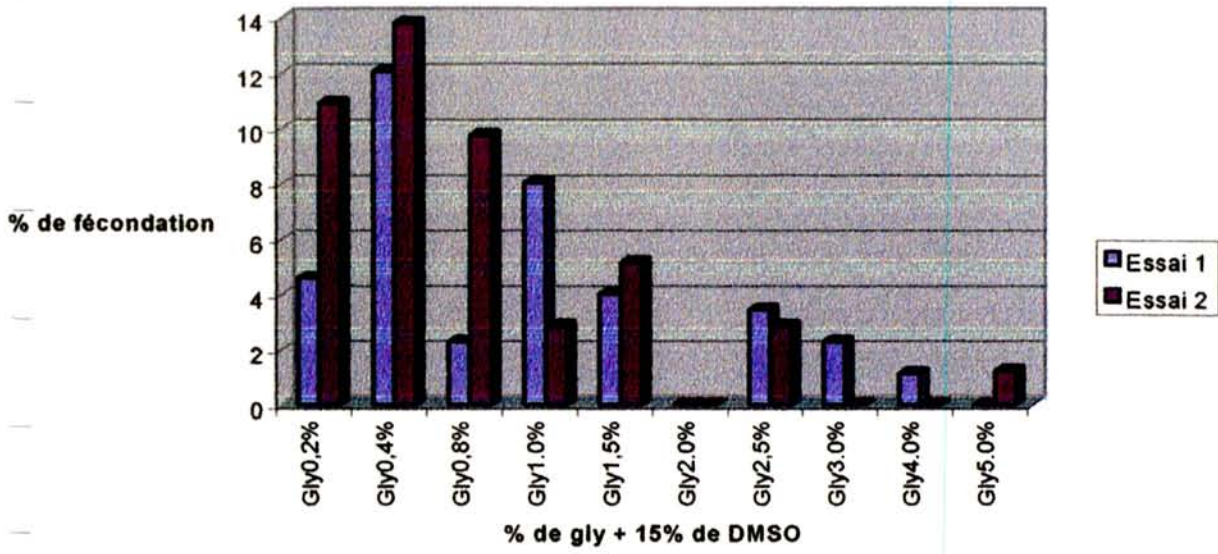
Les associations du DMSO à 10% et des différents pourcentages de glycine sont testées sur un pool de 4 mâles différents (tableau 4 et graphique 1).

Le témoin utilisé, est constitué de 0.2ml de spermatozoïdes, provenant de 3 mâles différents et de 100ml d'ovocytes de 7 femelles.

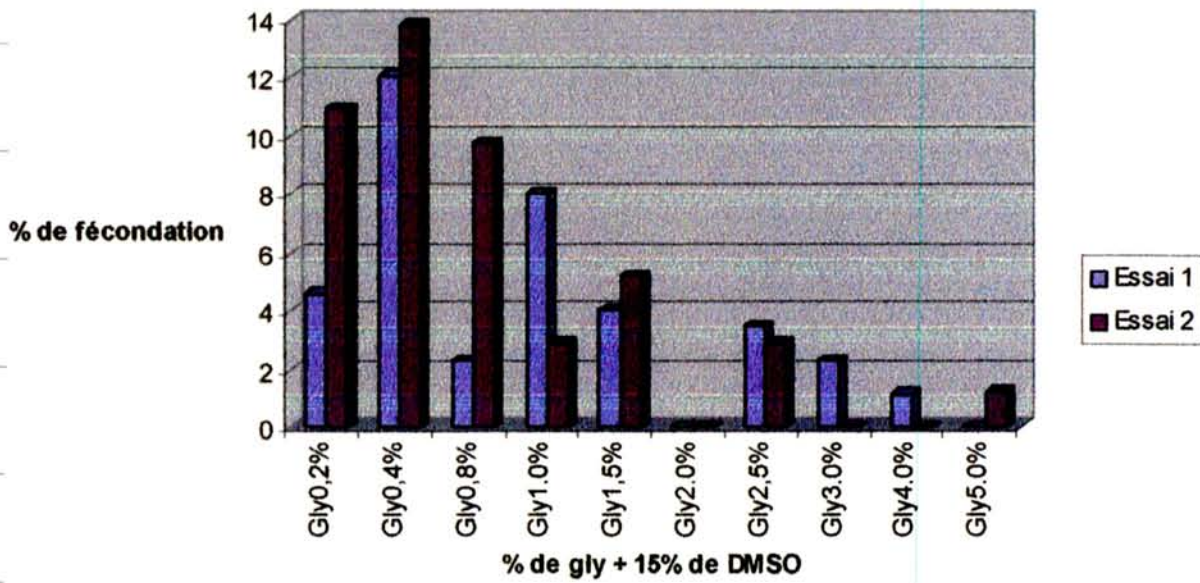
Après 4 heures de fécondation, les ovocytes sont colorés, puis fixés.

La combinaison du DMSO à 10% et des différents taux de glycine paraît ambiguë. En effet, les résultats montrent les meilleurs taux pour des concentrations en glycine de 0.2% et 0.4%. De plus, la glycine à 0.6% ne semble pas la plus favorable à la cryopréservation, avec des taux de fécondation de 7.41% et 9.88%. Enfin, les résultats nous démontrent qu'un seuil de concentration en glycine existe, il ne doit pas être supérieur à 1%.

VARIATION DE GLYCINE AVEC 15% DE DMSO



VARIATION DE GLYCINE AVEC 15% DE DMSO



Graphique 1 : Variation de glycine avec 10% et 15% de DMSO

133 Variation de la glycine avec du DMSO 15%

Les associations du DMSO à 15% et des différents pourcentages de glycine sont testées sur un pool de 2 mâles différents (tableau 5 et graphique 1).

Le témoin utilisé, est constitué de 0.2ml de spermatozoïdes, provenant de 3 mâles différents et de 100ml d'ovocytes de 6 femelles.

Après 4 heures de fécondation, les ovocytes sont colorés, puis fixés.

Lors de la descente en température, la température s'est arrêtée à -50°C, en raison d'une panne d'azote.

En se basant sur le pourcentage de glycine à 0.6%, des protocoles réalisés auparavant, les résultats nous montrent que les meilleurs taux de fécondation se situent à proximité de ce pourcentage, soit 0.2% et 0.4%.

Le phénomène observé à partir de 1%, nous montre un seuil de concentration en glycine de 1.5%.

2 Résultats du protocole 2.

21 La variation de la concentration en DMSO associé à 0.6% de glycine en fonction du temps de contact

Trois concentrations de DMSO (10%, 15% et 20%) additionnées à 0.6% de glycine sont testées, sur un pool de 3 mâles (tableau 6 et graphique 2).

Le témoin utilisé, est constitué de 0.2ml de spermatozoïdes provenant de 3 mâles et de 100ml d'ovocytes de 5 femelles.

Après quatre heures de fécondation, les ovocytes sont colorés, puis fixés.

Les résultats obtenus ne peuvent servir de référence, car il n'y a pas eu de congélation. Ils nous indiquent une voie à suivre.

- Temps de contact de 15mn :

La principale observation qui ressort de cette expérience, nous confirme l'idée que le DMSO à 10% additionné à la glycine 0.6% est la dilution optimale à la conservation du sperme dans l'azote liquide. Les taux de fécondité varient de 32.85% à 58.21%.

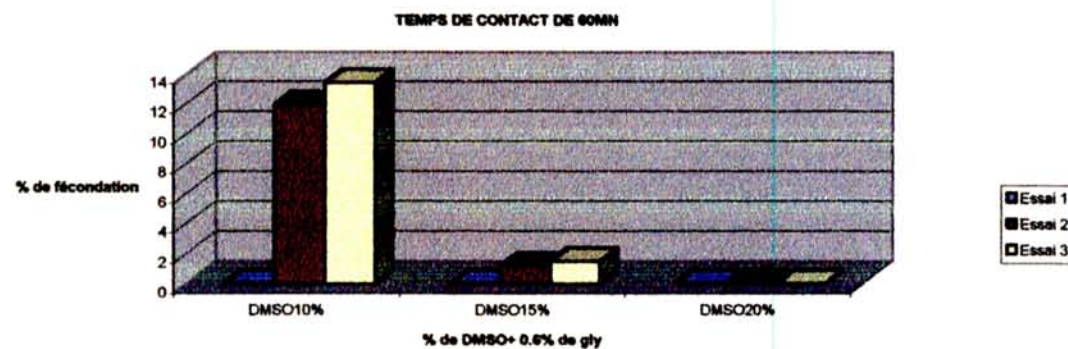
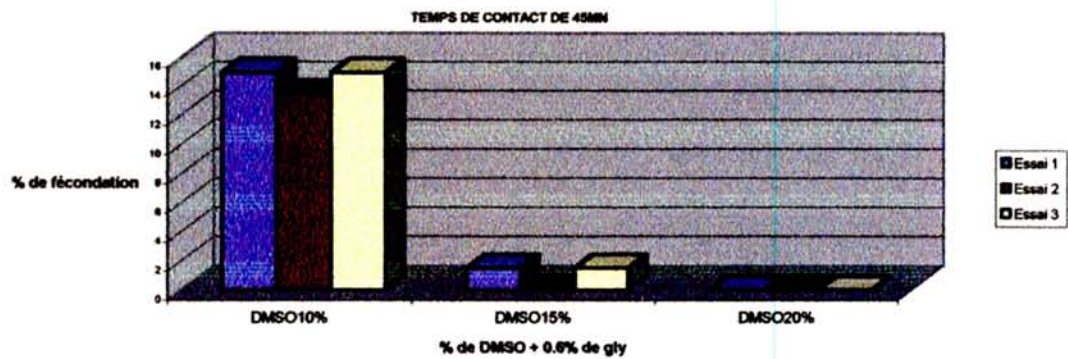
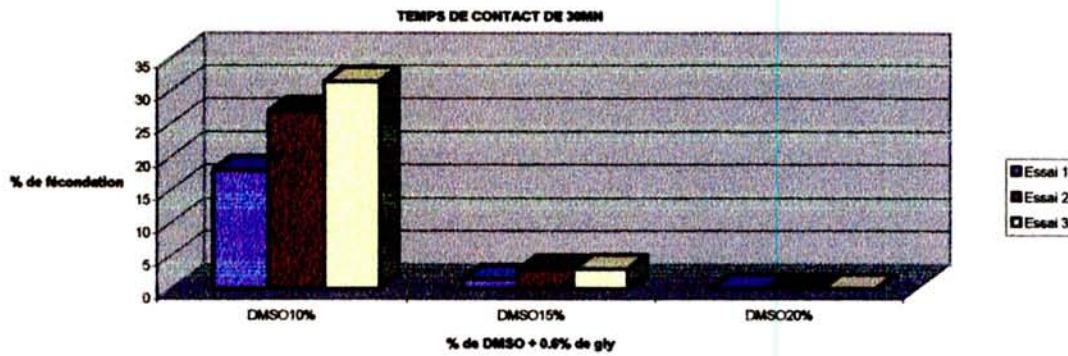
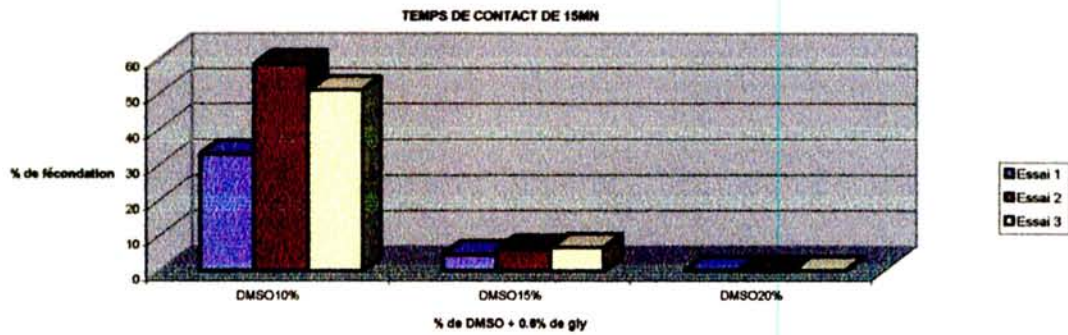
Le mélange DMSO à 15% et 0.6% de glycine ne donne pas de résultats satisfaisants (4.48% à 6.46%).

Le DMSO à 20% combiné à la glycine à 0.6% accentue le fait que cette dilution ne corresponde pas au rôle défini pour un cryoprotecteur à savoir protéger le sperme ; En effet, le taux de fécondation reste constant à 0%.

- Temps de contact de 30mn :

La dilution possédant 10% de DMSO reste optimale, avec des taux de fécondation variant de 17.91% à 31.34%.

Les taux de fécondation du DMSO à 15% restent faibles, avoisinant les 0% : 1.49% à 2.98%.



Graphique 2 : Pourcentage de fécondation en fonction des 3 concentrations en DMSO additionné à 0.6% de glycine et la durée de contact du cryoprotecteur.

Pour le mélange contenant le DMSO à 20%, les taux n'évoluent pas, ils sont de 0%.

- Temps de contact de 45mn :

La dilution contenant 10% de DMSO, reste toujours supérieure avec des taux constants, variant de 13.43% à 14.92%.

Le DMSO à 15% a un taux de fécondation très faible, oscillant de 0% à 1.49%.

Les taux de fécondation du DMSO à 20% sont toujours de l'ordre de 0%.

- Temps de contact de 60mn :

Malgré l'augmentation du temps de contact et la diminution générale des ovules fécondés, le DMSO à 10% détient encore les meilleurs taux de fécondité : de 0% à 13.43%.

Les taux de fécondation du DMSO à 15% saturent à 0% ou 1.49%, ils se stabilisent par rapport au temps T45mn.

Les taux de la dilution du DMSO à 20% sont constants à 0%.

22 La variation de glycine associée à 10% de DMSO en fonction du temps de contact

La variation de glycine associée à 10% de DMSO est testée, sur un pool de sept mâles (tableau 7 et graphique 3).

Le témoin utilisé, est constitué de 0.2ml de spermatozoïdes provenant de 7 mâles et de 100ml d'ovocytes de 7 femelles.

Après 4 heures de fécondation, les ovocytes sont colorés, puis fixés.

Pour cette étude, un changement de géniteurs est effectué afin d'obtenir un meilleur taux de fécondation.

- Temps de contact de 5mn :

Les deux concentrations en glycine, 0.2% et 0.4%, ont des taux de fécondation constants. Ils sont de l'ordre 57%.

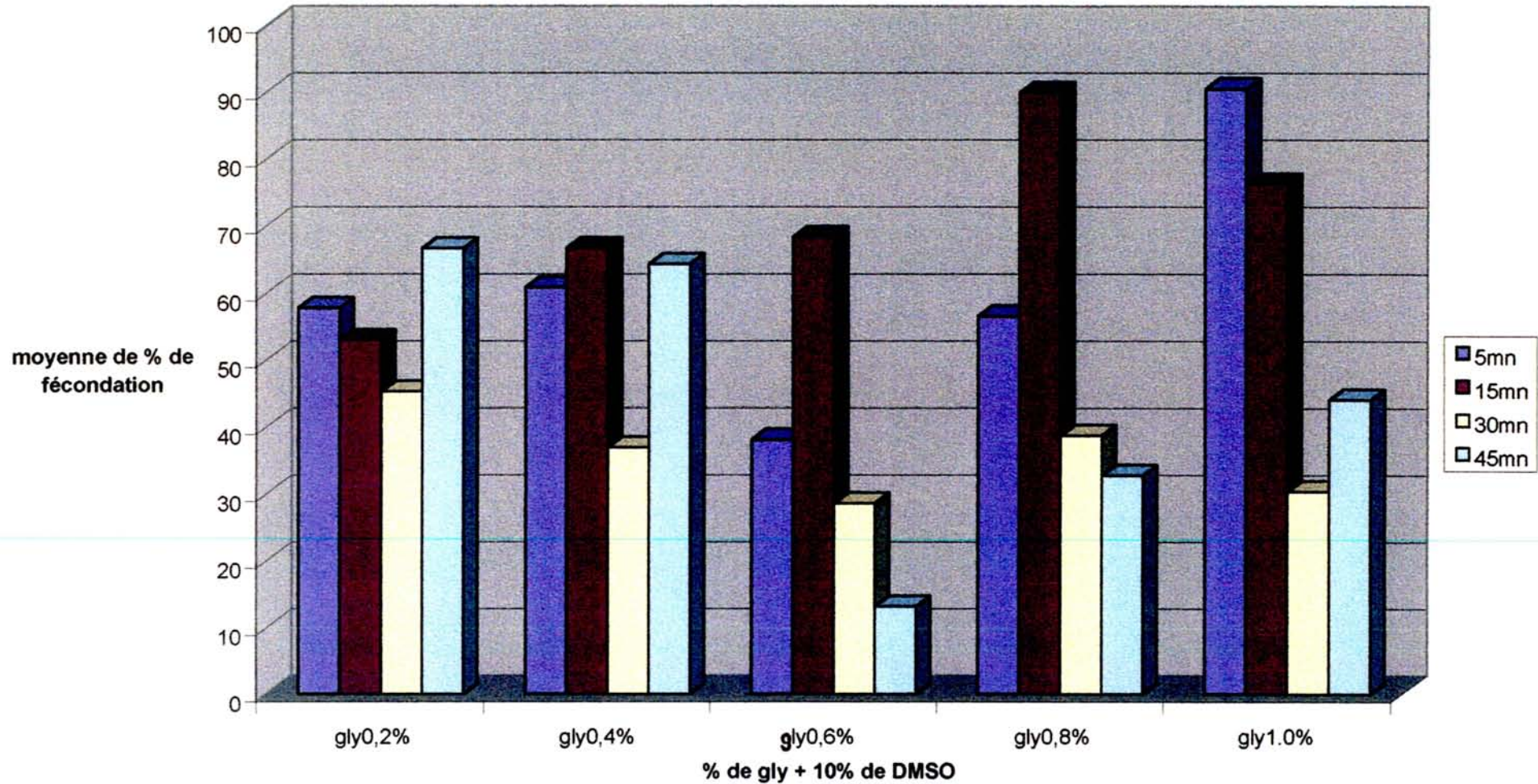
La concentration de la glycine à 1% a le taux le plus élevé, à 90%.

La glycine à 0.6% a le taux le plus bas.

- Temps de contact de 15mn :

Le meilleur taux de fécondation est associé à 0.8% de glycine et à 10% de DMSO, qui est de l'ordre de 90%.

VARIATION DE GLYCINE AVEC 10% DE DMSO EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT



Graphique 3 : Moyenne de fécondation en fonction de la variation de glycine combiné à 10% de DMSO et au temps de contact

Les autres concentrations de glycine possèdent des taux de fécondation du même ordre, soit de 51.19% à 72.62%. Exception fait de la concentration en glycine à 1%, pour laquelle les taux sont plus élevés de l'ordre de 76%.

- Temps de contact de 30mn :

Le meilleur taux de fécondation est pour la glycine à 0.2% avec 50% et 40.48%.

Les différentes concentrations de glycine restantes sont peu variables, de 23.81% à 41.67%

- Temps de contact de 45mn :

La glycine à 0.2% a le pourcentage de fécondation le plus élevé, avec 64.29% et 69.05%.

De très près, la glycine à 0.4% talonne avec 69.05% et 59.52%.

La glycine à 0.6% a encore, le taux de fécondation le plus bas.

Avec ce temps de contact de 45mn, il s'agit des mêmes conditions que le tableau 4 (mise à part la congélation des spermatozoïdes), dans lequel les concentrations à 0.2% et 0.4% en glycine sont le plus favorable à la congélation du sperme, et la concentration à 0.6% la moins idéale. Les résultats obtenus ne sont donc pas en accord avec le protocole de référence de Yankson et Moyse.

En conclusion, les combinaisons de glycine à 0.8% et 1% et de DMSO à 10%, mis au contact du sperme pendant 5mn ou 15mn serait l'idéale pour la congélation.

23 Variation de glycine associée à 15% de DMSO

Les associations du DMSO à 15% et des variations de glycine sont testées, sur 6 mâles différents (tableau 8 et graphique 4).

Le témoin utilisé, est constitué de 0.2ml de spermatozoïdes provenant de 7 mâles et de 100ml d'ovocytes de 7 femelles.

Après 4 heures de fécondation, les ovocytes sont colorés, puis fixés.

- Temps de contact de 5mn :

Les meilleurs taux de fécondation varient de 44.07% à 57.63% pour des concentrations en glycine de 0.4% et 1%.

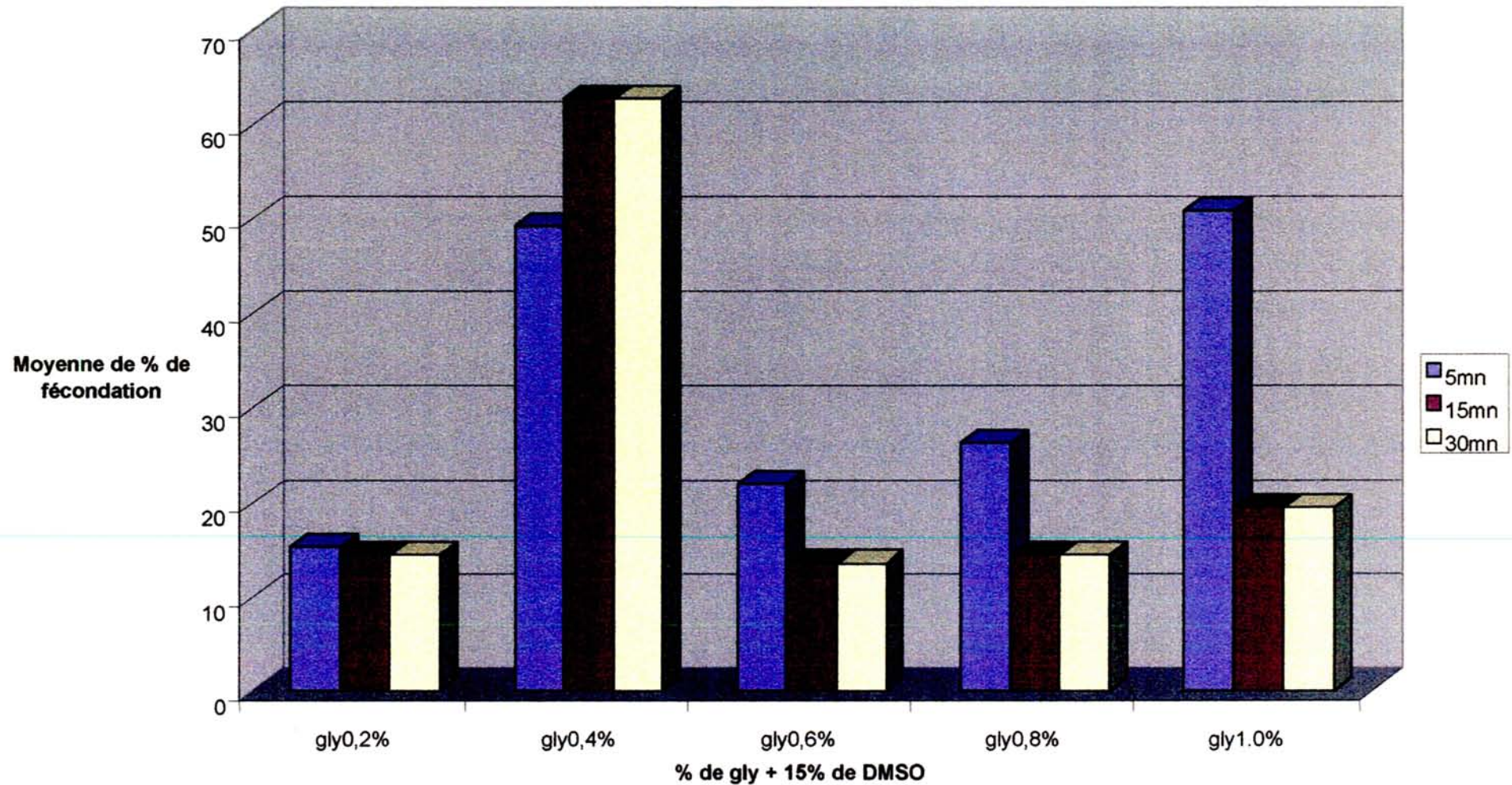
Le taux le plus bas est de l'ordre de 15%, avec de la glycine à 0.2%.

- Temps de contact de 15mn :

La glycine à 0.4% possède le taux de fécondation le plus élevé, variant de 59.32% à 66.10%.

Les autres concentrations sont du même ordre, à savoir de 11.86% à 22.03%.

VARIATION DE GLYCINE AVEC 15% DE DMSO EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT



Graphique 4 : Moyenne de fécondation en fonction de la variation de glycine combiné à 15% de DMSO et au temps de contact

- Temps de contact de 30mn :

Le meilleur taux de fécondation est de l'ordre de 52%, pour une concentration en glycine de 0.4%

Les différentes concentrations restantes varient de 8.47% à 23.73%.

Ces résultats sont en accord avec le tableau 5, qui favorise une concentration à 0.4% de glycine.

En conclusion, l'association de la glycine à 0.4% et de 15% de DMSO, mis en contact pendant 15mn ou 30mn, est la combinaison optimale.

3 Résultats du protocole 3

Pour les trois types de décongélation, trois concentrations de DMSO additionnées à la glycine à 0.6% sont testées sur un pool de 3 mâles. Pour chaque protocole, le même sperme est utilisé (graphique 5).

Le témoin utilisé pour les protocoles, est constitué de 0.2ml de spermatozoïdes provenant 3 mâles et 100ml provenant de 5 femelles. Le témoin est identique pour les trois manipulations.

Après 3h30mn de fécondation, les ovocytes sont colorés, puis fixés.

31 Décongélation 1 : 45°C pendant 45s

Les associations de la glycine à 0.6% et de trois concentrations en DMSO, sont évaluées, selon un temps de réchauffement de 45s et une température de 45°C (tableau 9).

Malgré l'échec des deux essais de l'association du DMSO à 15% et de la glycine à 0.6%, du à l'addition de 2 cryotubes dans un même bêcher contenant 100ml d'ovocytes, les résultats nous révèlent des taux de fécondation importants pour la concentration en DMSO à10%.

32 Décongélation 2 : 35°C pendant 1mn15s

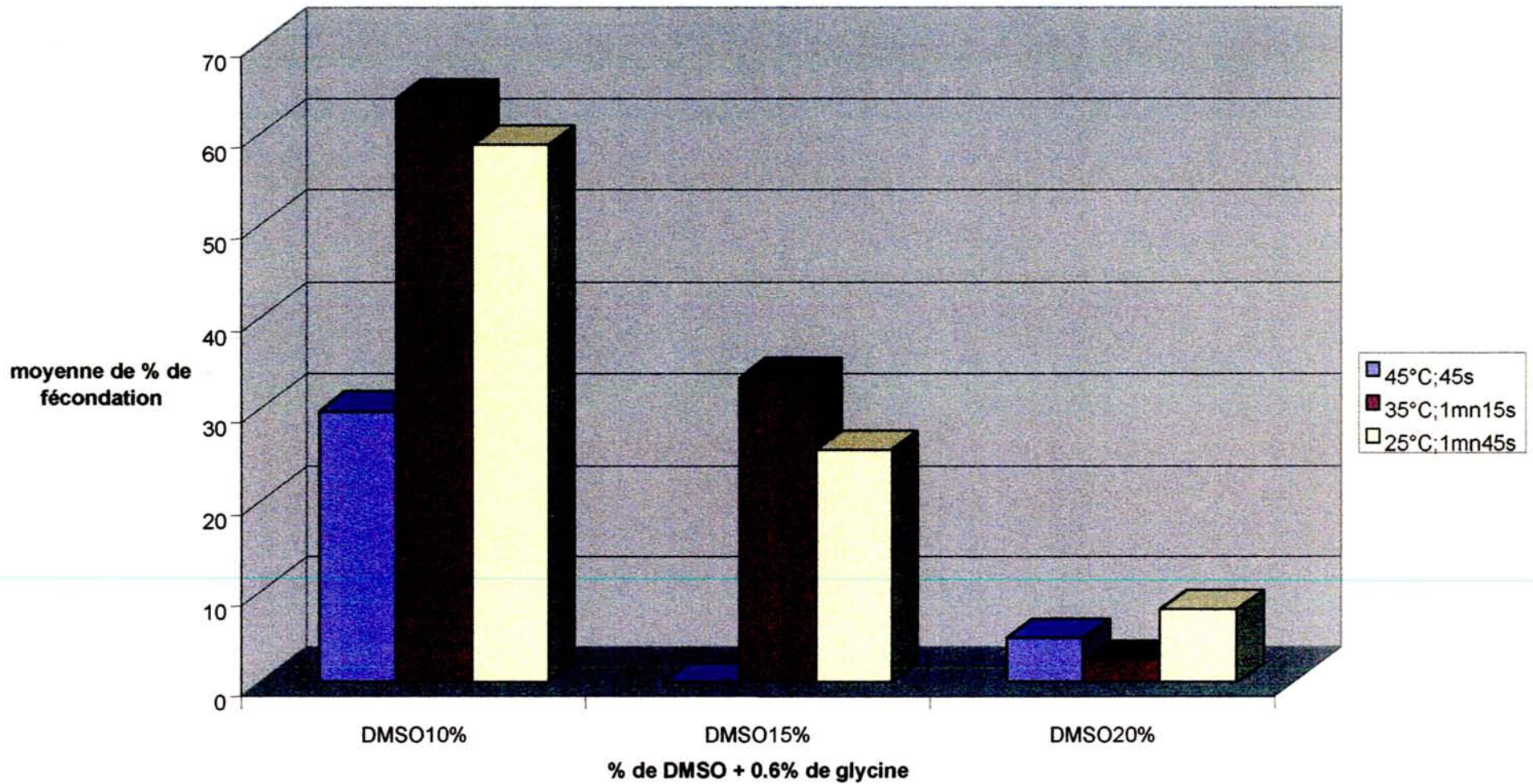
Les associations de la glycine à 0.6% et de trois concentrations en DMSO, sont évaluées, selon un temps de réchauffement de 1mn15s et une température de 35°C (tableau 10).

Ce tableau confirme l'hypothèse que le DMSO à10% est le plus efficace que le DMSO à15%. Ses forts taux de fécondation varient de 53.62% à 72.46%.

Le DMSO à 15% a cependant des taux intéressants, de 26.09% à 44.93%.

33 Décongélation 3 : 25°C pendant 1mn45s

VARIATION DE DMSO AVEC 0.6% DE GLYCINE EN FONCTION DU MODE DE RECHAUFFEMENT



Graphique 5 : Moyenne de fécondation en fonction de la variation de DMSO combiné à 0.6% de glycine et au mode de réchauffement

Les associations de la glycine à 0.6% et de trois concentrations en DMSO, sont évaluées, selon un temps de réchauffement de 1mn45s et une température de 25°C (tableau 11).

Le mode de réchauffement semble moins efficace que le précédent. L'addition de glycine à 0.6% au DMSO à 10% reste le mélange de cryoprotecteurs le plus approprié à la congélation du sperme.

4 Résultats du protocole 4

Les associations du DMSO à 10% et 15% et des différents pourcentages de glycine sont testées sur un pool de 3 mâles différents.

Les 2 durées de contact sont 5mn (tableau 12), et 15mn (tableau 13).

Le mode de réchauffement choisi est : 35°C pendant 1mn15s.

Le témoin utilisé, est constitué de 0.2ml de spermatozoïdes, provenant de 3 mâles différents et de 100ml d'ovocytes de femelles.

Après 4 heures de fécondation, les ovocytes sont colorés, puis fixés.

Ces 2 protocoles se différencient par la durée de contact entre les cryoprotecteurs et le sperme. Les cryoprotecteurs sont choisis en raison de leur non-toxicité sur les spermatozoïdes et à la capacité de survie de ceux-ci.

41 Temps de contact de 5mn.

Ce protocole a un temps de contact de 5mn. Plusieurs tests ont été réalisés, il ne s'agit qu'une vérification de l'effet de la durée d'exposition (tableau 12).

Il s'agit de déterminer également la meilleure association de cryoprotecteurs.

Les résultats de la durée d'exposition de 5mn nous confirment qu'il s'agit du DMSO à 10% qui est associé de meilleurs taux de fécondation.

Ce tableau est en accord avec plusieurs tableaux. La combinaison du DMSO à 10% et de la glycine à 1%, pour un temps de contact de 5mn, est le plus efficace, comme le montraient les résultats du tableau 7. Et L'addition de 1% de glycine à 15% de DMSO est, également, la plus intéressante, comme les résultats du tableau 8.

42 Temps de contact de 15mn.

Ce protocole a un temps de contact de 15mn. Il a pour but de déterminer la durée d'exposition idéale lors d'une congélation (tableau 13).

Les meilleurs taux de fécondation sont de 43.21% et 38.27%, pour le mélange de 10% de DMSO et 0.8% de glycine. Ces taux sont plus importants que pour un temps de contact de 5mn.

Ces résultats sont en accord avec les deux tableaux 7 et 8, dans lesquels, l'association du DMSO à 10% et de la glycine à 1%, et celle du DMSO à 15% et de la glycine à 0.4%, sont les plus favorables à la cryopréservation de sperme.

DISCUSSION

DISCUSSION

La survie du sperme d'huîtres *C. gigas* dépend de la nature et la concentration du cryoprotecteur, du temps d'exposition du sperme avec ce la nature et la concentration du cryoprotecteur et du mode de réchauffement du sperme.

Nos résultats montrent clairement que les différents cryoprotecteurs, le glycérol, le méthanol, le sucrose, le DMSO et le PVP, utilisés seuls, ont un effet toxique sur la survie du sperme. Ces différents cryoprotecteurs utilisés seuls entraînent la formation d'agglomérats de spermatozoïdes, qui perdent ainsi leur pouvoir fécondant et leur mobilité

La détermination des cryoprotecteurs les mieux adaptés à la congélation du sperme d'huîtres est réalisée grâce à des combinaisons entre différents cryoprotecteurs à des concentrations différentes. Avec une combinaison DMSO à différentes concentrations et de la glycine à 0.6%, la cryopréservation est correct par rapport au mélange DMSO10% et sucrose15%. De nos expériences, il ressort que la concentration en DMSO à 15% est la plus favorable. Ce résultat est en désaccord avec les résultats trouvés par K. Yankson et J. Moyses (1991), lesquels trouvent un taux de fécondation de 71.4% avec une concentration en DMSO de 10% et de la glycine à 0.6%.

Il faut noter cependant que d'autres expériences effectuées pour tester la concentration optimale de glycine, montrent une concentration en DMSO à 10% et 15% avec une concentration à 0.6% de glycine. Le mélange de la concentration en glycine à 10% et en DMSO à 10% a un meilleur pouvoir de cryopréservation comme l'indiquait K. Yankson et J. Moyses (1991).

La concentration optimale en glycine est corrélée négative par le temps de contact. Ainsi plus le temps d'exposition est long, plus la concentration optimale en glycine diminue. Il s'avère que les taux de glycine les mieux appropriés, sont 0.8% et 1%, respectivement pour 5mn et 15mn. Cependant ces résultats ne sont pas observés avec le DMSO à 15%, pour laquelle la concentration optimale en glycine est 0.4% avec 15mn de temps de contact.

D'après les différents résultats obtenus, nous nous dirigeons vers une concentration en DMSO de 10%, une concentration en glycine de 0.8% et 1%, et 2 temps d'exposition de 5mn et 15mn. Après ce délai, les cryoprotecteurs combinés sont trop toxiques pour le sperme. Pour minimiser les risques d'erreurs, la concentration en DMSO à 15% sera encore utilisée.

Les différents modes de réchauffement testés indiquent une vérification des résultats déjà obtenus. Pour un temps de contact de 45mn, un DMSO à 10% et 0.6% de glycine, et 35°C pendant 1mn15s, les taux de fécondation obtenus sont optimales. Les différents modes de réchauffement sont déterminés par la logique suivante : pour 10°C en moins, 30s en plus du temps de départ. Cependant aucune variation de glycine n'a été effectuée, et le temps d'exposition est le moins favorable à la congélation du à l'effet toxique de l'association des 2 cryoprotecteurs, comme l'ont montrées les expériences sur les temps d'exposition, réalisées après les manipulations sur les modes de réchauffement du sperme. L'origine de ce problème est l'absence du programmeur, en effet ces cryotubes ont été congelés, alors même que le protocole sur le temps de contact soit réalisé.

L'optimisation des paramètres testés donne des résultats cohérents. La synthèse de nos résultats vérifie le travail de recherche effectué durant 3 mois. Nous

pouvons en conclure que pour obtenir les meilleurs taux de fécondation, il faut réunir ces 3 paramètres :

- La combinaison de 10% de DMSO et 0.8% de glycine utilisé comme cryoprotecteur.
- Un temps de contact de 15mn avec le sperme d'huîtres.
- Un temps de réchauffement de 1mn15s à 35°C.

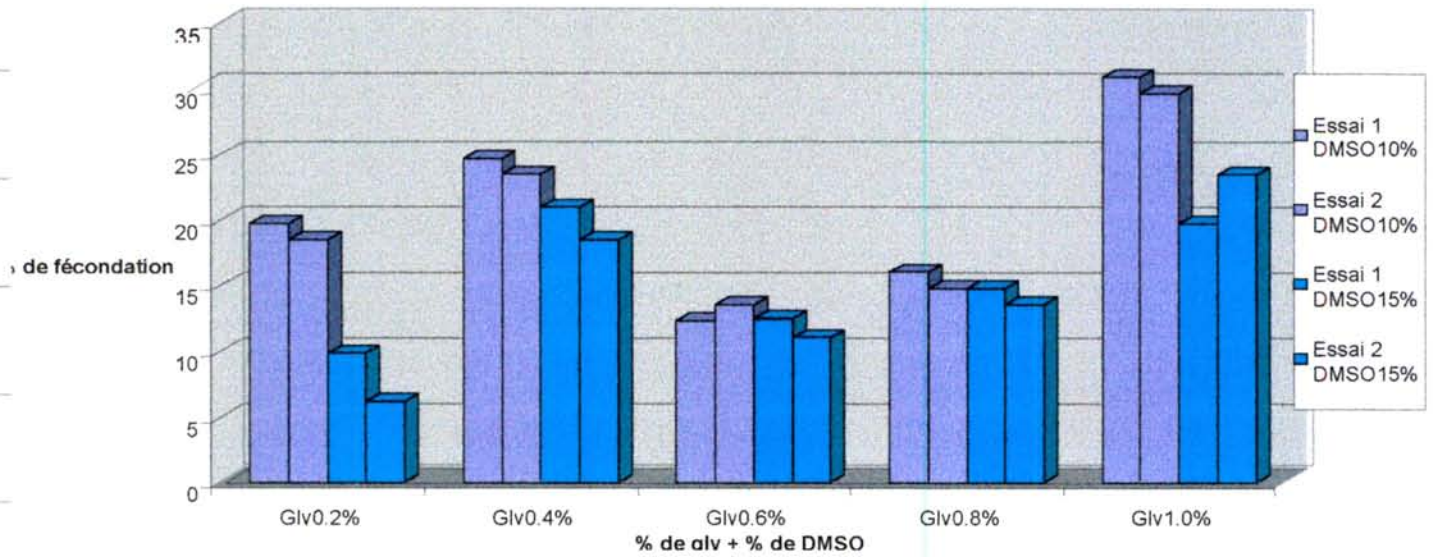
Il s'est avéré nécessaire que la fécondation se réalise pendant 4 heures pour une meilleure lecture.

Dans nos expériences, la durée de stockage s'est limitée de 1 à 3 jours ce qui semble minimiser la portée des conclusions, comme l'étude réalisée sur le cryopréservation du sperme d'huîtres creuses et plates par L. D. Rabenomanana en 1983.

Lors des différentes manipulations effectuées, plusieurs problèmes pratiques apparaissent. En effet, il a fallu apprendre le fonctionnement du programmeur, qui est un appareil dont le produit de base est l'azote. De plus, lorsque les cryotubes en cours de congélation, s'arrêtent à -70°C, leur température finale, le transfert du programmeur au réservoir d'azote fait chuter la température de plusieurs degrés, aucune solution n'a été trouvée à ce problème, qui a des conséquences évidentes sur les spermatozoïdes. Enfin, lors du réchauffement des cryotubes à une température définie, le temps varie car au bout d'un temps défini, les solutions ne sont pas décongelées, il faut terminer la décongélation entre les mains, pour que les solutions tombent dans la solution d'ovules.

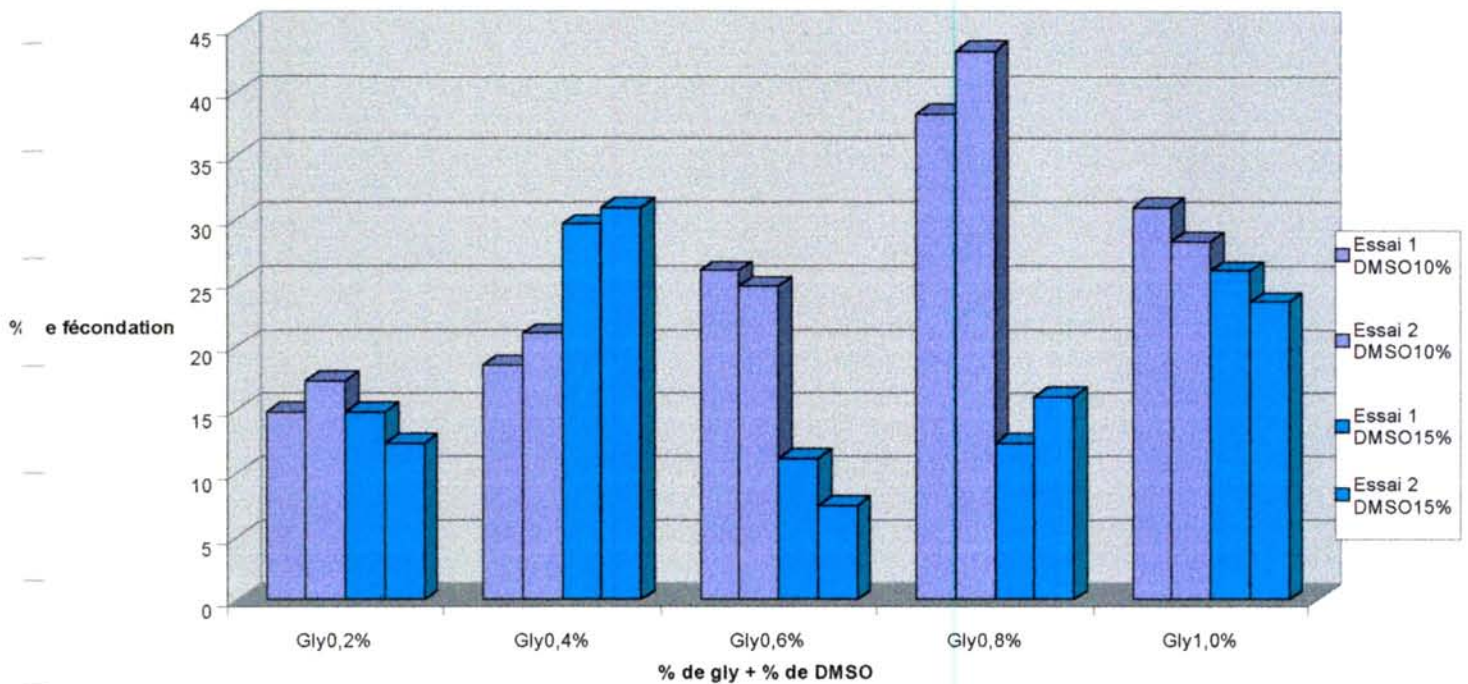
Différents paramètres, qui ne sont pas en rapport avec le principe de la manipulation, ont causé une baisse des taux de fécondation. En effet la qualité des gamètes mâles et femelles n'est pas vérifiable par des tests simples, en effet un spermatozoïde peut avoir une bonne mobilité et être priver de son pouvoir fécondant, et la présence de vésicule germinative chez les ovocytes n'est pas une certitude sur sa qualité lors d'une fécondation. De plus, l'IFREMER La Tremblade, a eu quelques problèmes de qualité d'eau de mer, or son utilisation en était courante lors des manipulations, pour la dilution des cryoprotecteurs et pour la fécondation. Enfin, la période de maturation des huîtres creuses arrivant à sa fin, la difficulté de trouver des huîtres mûres s'accroît.

VARIATION DE GLYCINE ASSOCIE AU DMSO EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT DE 5MN



Graphique 6 : Pourcentage de fécondation en fonction de la variation de concentration de la glycine et du DMSO et le temps de contact

FECONDATION EN FONCTION DE LA VARIATION DE GLYCINE ET LE TEMPS DE CONTACT DE 15MN



Graphique 7 : Pourcentage de fécondation en fonction de la variation de glycine associé à du DMSO et le temps de contact

CONCLUSION

CONCLUSION

L'étude démontre l'effet toxique pour la survie du sperme, du glycérol, du méthanol, du sucrose, du DMSO et du PVP, suivant leur concentration, la durée d'exposition et le mode de réchauffement.

L'association de plusieurs cryoprotecteurs s'avère plus intéressant pour la congélation du sperme. Le DMSO et la glycine se complémentarisent, nos résultats démontrent que la glycine réduit l'effet toxique du DMSO.

L'effet toxique des cryoprotecteurs limite leur capacité à protéger les spermatozoïdes à -196°C , dans l'azote liquide. Ainsi, nos travaux démontrent que la diminution du temps d'exposition réduit l'effet toxique des cryoprotecteurs. Cependant, la durée doit être suffisamment importante pour que le cryoprotecteur pénètre dans les cellules et protège celles-ci.

Le type de réchauffement est lié à la vitesse de congélation. Le mode de réchauffement idéale est 35°C pendant 1mn15s.

Cependant, un certain nombre de points restent à vérifier et à approfondir avant l'application à grande échelle :

- Rechercher une méthode de récolte du sperme sans sacrifier l'animal.
- Tester d'autres associations de cryoprotecteurs.
- Etudier différents types de dilution entre le cryoprotecteur et le sperme.
- Tester de 1mn en 1mn les différents temps d'exposition jusqu'à 30mn.
- Essayer différentes vitesses de congélation, différents temps finaux et les paliers de congélation.
- Améliorer le passage du programmateur au réservoir d'azote.
- Réaliser une congélation à effectif plus important pour un élevage larvaire.
- Tester la conservation à longue durée.

ANNEXES

ET

TABLEAUX

ANNEXE 1

1. Milieu de culture pour les souches d'algues.

Produits	Grammes
NaCl	200g
MgCl	87.0g
Na ₂ SO ₄	32.4g
CaCl ₂	18.0g
KCl	5.5g
NaHCO ₃	1.6g
NaSiO ₃	0.88g
KBr	0.8g
KNO ₃	0.5g
SrCl ₂	0.33g
H ₃ BO ₃	0.21g
NaH ₂ PO ₄	0.069g
FeCl ₃	0.027g
NaF	0.024g
NH ₄ NO ₃	0.016g
MnSO ₄	0.011g
TRIS	10g
ZnSO ₄	0.0057g
Na ₂ MoO ₄	0.024g
CuSO ₄	0.00025g
EDTA	0.081g

Ajuster à pH 7.4 dans 10l eau distillée

2. Milieu de CONWAY

Nitrate de sodium	1000g
Dihydrogénophosphate de sodium	200g
EDTA	450g
Acide borique	336g

3. Vitamines.

	Glaçons(216ml)	Solution(1L)
Thiamin	8.1g	5g
Vit B12	0.033g	0.02g
Biotine	0.0162g	0.01g

ANNEXE 2

Coloration des cellules au HOESCHST (Observation au microscope à épifluorescence)

- Hoeschst 33342: Coloration « in vivo »
- Hoeschst 33258: Coloration « in vitro »

Concentration d'utilisation: 0.5µg/ml

1 Coloration « in vivo »

- Ajouter 1µl de Hoeschst à 1 ml d'œufs
- Laisser à l'obscurité pendant 5-10 mn
- Observer entre lame et lamelle (lumière UV, excitation à 350 nm, stop LP240)

2 Coloration « in vitro »

- Fixer les cellules pendant 60 mn dans le tampon GA + Formol 6% : 1 volume d'ovocytes + 1 volume de tampon fixateur
- Enlever le tampon fixateur par aspiration
- Laver 60 mn dans le tampon GA (2 lavages de 30 mn)
- Colorer 60 mn dans GA + Hoeschst (1 µl de solution stock pour 1 ml d'œufs)
- Laver 60 mn dans le tampon GA (2 lavages de 30 mn)
- Observer au microscope à épifluorescence

ANNEXE 3

1 Tampon GA

<u>Produit</u>	<u>Molarité</u>	<u>g/l de solution</u>
N-Méthylglucamine	250Mm	48.8g
K-Gluconate	250mM	58.6g
Hepès	50mM	13.0g
EGTA	10mM	3.8g

Ajuster à pH 7.4 avec de l'acide acétique glacial.

2 Tampon de fixation

Ex: préparation de 500ml

79ml de Formaldéhyde 38%, compléter à 500ml avec le tampon GA

Tableau 4 : Pourcentage de fécondation en fonction d'une concentration en DMSO de 10% et d'un taux de glycine.

	% de fécondation	
	POOL MALE	
	Essai 1	Essai 2
DMSO10%+Gly0,2%	18.52	17.26
DMSO10%+Gly0,4%	16.05	13.58
DMSO10%+Gly0,6%	7.41	9.88
DMSO10%+Gly0,8%	12.35	11.11
DMSO10%+Gly1.0%	14.81	13.58
DMSO10%+Gly1.5%	0	0
DMSO10%+Gly2.0%	1.23	0
DMSO10%+Gly3.0%	0	0
DMSO10%+Gly4.0%	0	0
DMSO10%+Gly5.0%	1.23	1.23
Témoin	81%	

Tableau 5 : Pourcentage de fécondation en fonction d'une concentration en DMSO de 15% et d'un taux de glycine.

	% de fécondation	
	POOL MALE	
	Essai 1	Essai 2
DMSO10%+Gly0,2%	4.6	10.91
DMSO10%+Gly0,4%	12.07	13.79
DMSO10%+Gly0,6%	2.3	9.77
DMSO10%+Gly0,8%	8.04	2.87
DMSO10%+Gly1.0%	4.02	5.17
DMSO10%+Gly1.5%	0	0
DMSO10%+Gly2.0%	3.45	2.87
DMSO10%+Gly3.0%	2.3	0
DMSO10%+Gly4.0%	1.15	0.57
DMSO10%+Gly5.0%	0	1.15
Témoin	67%	

Tableau 6 : Pourcentage de fécondation en fonction des trois concentrations de DMSO additionné à 0.6% de glycine et la durée de contact du cryoprotecteur.

	% de fécondation		
	POOL 1-2-3		
	Essai 1	Essai 2	Essai 3
	15 mn		
DMSO10%+gly0.6%	32,85	58,21	50,75
DMSO15%+gly0.6%	4,48	5,97	6,46
DMSO20%+gly0.6%	0	0	0
	30 mn		
DMSO10%+gly0.6%	17,91	26,87	31,34
DMSO15%+gly0.6%	1,49	2,93	2,98
DMSO20%+gly0.6%	0	0	0
	45 mn		
DMSO10%+gly0.6%	14,92	13,43	14,92
DMSO15%+gly0.6%	1,49	0	1,49
DMSO20%+gly0.6%	0	0	0
	60 mn		
DMSO10%+gly0.6%	0	11,94	13,43
DMSO15%+gly0.6%	0	1,19	1,49
DMSO20%+gly0.6%	0	0	0
Témoin	67%		

Tableau 7 : Pourcentage de fécondation en fonction de la variation de glycine combinée à 10% et la durée de contact du cryoprotecteur.

	% de fécondation	
	POOL MALE	
	Essai 1	Essai 2
	5 mn	
DMSO10%+ gly0,2%	50	65.46
DMSO10%+ gly0,4%	53.77	67.86
DMSO10%+ gly0,6%	30.95	45.24
DMSO10%+ gly0,8%	47.62	65.45
DMSO10%+ gly1.0%	96.43	84.52
	15mn	
DMSO10%+ gly0,2%	51.19	54.76
DMSO10%+ gly0,4%	69.05	64.29
DMSO10%+ gly0,6%	64.29	72.62
DMSO10%+ gly0,8%	100	79.76
DMSO10%+ gly1.0%	70.24	82.14
	30mn	
DMSO10%+ gly0,2%	50	40.48
DMSO10%+ gly0,4%	41.67	32.14
DMSO10%+ gly0,6%	23.81	33.33
DMSO10%+ gly0,8%	41.67	35.71
DMSO10%+ gly1.0%	35.71	25
	45mn	
DMSO10%+ gly0.2%	69.05	64.29
DMSO10%+ gly0,4%	69.05	59.52
DMSO10%+ gly0,6%	11.9	14.29
DMSO10%+ gly0,8%	25	40.48
DMSO10%+ gly1.0%	40.48	47.62
Témoin	84%	

Tableau 8 : Pourcentage de fécondation en fonction de la variation de glycine combinée à 10% et la durée de contact du cryoprotecteur.

	% de fécondation	
	POOL MALE	
	Essai 1	Essai 2
	5 mn	
DMSO15%+ gly0,2%	13.56	16.95
DMSO15%+ gly0,4%	52.54	45.76
DMSO15% gly0,6%	23.73	20.34
DMSO15%+gly0,8%	20.34	32.20
DMSO15%+ gly1.0%	57.63	44.07
	15mn	
DMSO15%+ gly0,2%	15.25	13.56
DMSO15%+ gly0,4%	66.10	59.32
DMSO15%+ gly0,6%	15.25	11.86
DMSO15%+ gly0,8%	15.25	13.56
DMSO15%+ gly1.0%	22.03	16.95
	30mn	
DMSO15%+ gly0,2%	22.03	23.73
DMSO15%+ gly0,4%	45.76	59.32
DMSO15%+ gly0,6%	16.95	16.95
DMSO15%+ gly0,8%	8.47	8.47
DMSO15%+ gly1.0%	13.56	15.25
Témoin	59%	

Tableau 9 : Pourcentage de fécondation en fonction de la variation de concentration en DMSO associé à 0.6% de glycine et de la première décongélation (45°C, 45s).

	POOL MALE		
	Essai 1	Essai 2	Essai 3
DMSO10%+0.6%gly	17.39	23.19	36.23
DMSO15%+0.6%gly	ND	ND	0
DMSO20%+0.6%gly	14.49	0	0
Témoin	69%		

Tableau 10 : Pourcentage de fécondation en fonction de la variation de concentration en DMSO associé à 0.6% de glycine et de la seconde décongélation (35°C, 1mn15s).

	POOL MALE		
	Essai 1	Essai 2	Essai 3
DMSO10%+0.6%gly	72.46	53.62	65.22
DMSO10%+0.6%gly	26.09	28.98	44.93
DMSO10%+0.6%gly	4.35	2.90	0
Témoin	69%		

Tableau 11 : Pourcentage de fécondation en fonction de la variation de concentration en DMSO associé à 0.6% de glycine et de la troisième décongélation (25°C, 1mn45s).

	POOL MALE		
	Essai 1	Essai 2	Essai 3
DMSO10%+0.6%gly	62.32	56.52	60.87
DMSO10%+0.6%gly	28.98	27.54	21.74
DMSO10%+0.6%gly	5.80	4.35	11.59
Témoin	69%		

Tableau 12 : Pourcentage de fécondation en fonction de la variation de concentration du DMSO et de la glycine, et le temps de contact.

	% de fécondation	
	POOL MALE	
	Essai 1	Essai 2
DMSO10%+Gly0,2%	19.75	18.52
DMSO10%+Gly0,4%	24.69	23.46
DMSO10%+Gly0,6%	12.36	13.58
DMSO10%+Gly0,8%	16.05	14.81
DMSO10%+Gly1,0%	30.86	29.63
DMSO15%+Gly0,2%	9.88	6.17
DMSO15%+Gly0,4%	20.99	18.52
DMSO15%+Gly0,6%	12.54	11.11
DMSO15%+Gly0,8%	14.81	13.58
DMSO15%+Gly1,0%	19.75	23.46
Témoin	81%	

Tableau 13 : Pourcentage de fécondation en fonction de la variation de concentration du DMSO et de la glycine, et le temps de contact.

	% de fécondation	
	POOL MALE	
	Essai 1	Essai 2
DMSO10%+Gly0,2%	14.81	17.28
DMSO10%+Gly0,4%	18.52	20.99
DMSO10%+Gly0,6%	25.93	24.69
DMSO10%+Gly0,8%	38.27	43.21
DMSO10%+Gly1,0%	30.86	28.21
DMSO15%+Gly0,2%	14.81	12.35
DMSO15%+Gly0,4%	29.63	30.86
DMSO15%+Gly0,6%	11.11	7.41
DMSO15%+Gly0,8%	12.35	16.05
DMSO15%+Gly1,0%	25.93	23.45
Témoin	81%	