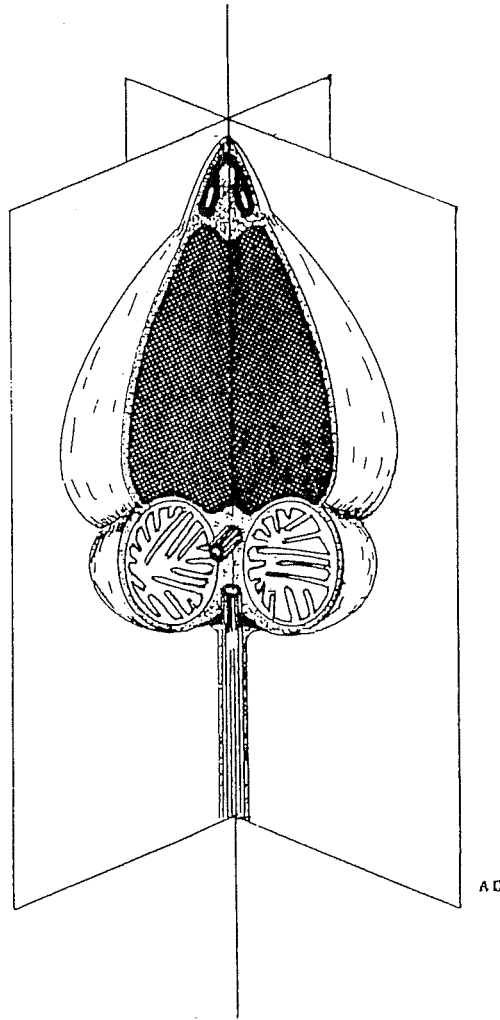


LES GAMETES DE *PECTEN MAXIMUS* L.

(MOLLUSCA , BIVALVIA)



B.U. DE BREST
D 109 227982 4

I - TEXTE

Germaine DORANGE

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Laboratoire de Biologie Marine

1989

CEDM
E330-DOR-G

N° d'ordre : 75

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

(Mention Océanologie Biologique)

par

Germaine DORANGE

LES GAMETES DE *PECTEN MAXIMUS* L.

(MOLLUSCA, BIVALVIA)

I - TEXTE

Soutenue le 10 février 1989 devant la Commission d'Examen :

- Président* : LEROY J.P., Professeur, U.F.R. Médecine
Université de Bretagne Occidentale
- Rapporteurs* : DAGUZAN J., Professeur, Faculté des Sciences
Université de Rennes I
- LUCAS A., Professeur émérite,
U.F.R. Sciences et Techniques
Université de Bretagne Occidentale
- Examineurs* : BOUCHER J., Chercheur, IFREMER
Centre de Nantes
- LE PENNEC M., Professeur, *Directeur de Thèse*,
U.F.R. Sciences et Techniques
Université de Bretagne Occidentale
- LUBET P., Professeur, Faculté des Sciences
Université de Caen



Les recherches réalisées dans le cadre de cette thèse ont bénéficié du soutien financier de l'IFREMER (Programme National de Déterminisme du Recrutement : responsable J. BOUCHER), du soutien technique de l'écloserie IFREMER d'Argenton (responsable J.C. COCHARD) et du comité d'expansion des Côtes d'Armor (C. HALARY).

Il m'est agréable de remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de cette étude, et tout particulièrement M. LE PENNEC et J.Y. MONNAT.

SOMMAIRE

	pages
INTRODUCTION	3
CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES	
<hr/>	
I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE	8
1. PRELEVEMENT DES REPRODUCTEURS	8
2. EMISSIONS DE GAMETES EN ECLOSERIE	9
II - LES METHODES	10
1. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES	10
2. TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES	11
2.1. Sur coupes en paraffine	11
2.2. Sur coupes à congélation	11
3. TECHNIQUES ENZYMOLOGIQUES ET HISTOENZYMOLOGIQUES	12
3.1. Microméthode enzymologique	12
3.2. Méthodes histoenzymologiques	15
4. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	17
4.1. Microscopie à balayage (M.E.B.)	17
4.2. Microscopie à transmission (M.E.T.)	21
5. ANALYSE D'IMAGE	24
CHAPITRE II : L'ENVIRONNEMENT DES GAMÈTES	
<hr/>	
I - INTRODUCTION	27
II - LE TEGUMENT	30
1. L'EPITHELIUM EXTERNE	30
1.1. Types cellulaires	30
1.2. Caractéristiques histoenzymologiques	32
2. LE TISSU SOUS-EPITHELIAL PERIGONADIQUE	35

III - LE TISSU CONJONCTIF INTERSTITIEL ET LES SINUS HEMOLYMPHATIQUES	38
1. LE TISSU CONJONCTIF INTERSTITIEL	38
2. LES SINUS HEMOLYMPHATIQUES ET LES HEMOCYTES	39
IV - LES ACINI ET LES CONDUITS EVACUATEURS	40
1. LES ACINI	40
2. LES CONDUITS EVACUATEURS	41
V - DISCUSSION	44
CHAPITRE III : LA GAMÉTOGENÈSE -----	
I - L'OVOGENESE	52
1. DONNEES ULTRASTRUCTURALES	52
1.1. Stade préméiotique	52
1.2. Stade prévitellogénique	52
1.3. Stade vitellogénique	53
2. DONNEES HISTOCHIMIQUES ET ENZYMOLOGIQUES	56
2.1. Données histochimiques	56
2.2. Données enzymologiques	65
II - LA SPERMATOGENESE	68
1. LA SPERMATOGENESE NORMALE	69
1.1. Données ultrastructurales	69
1.1.1. Les gonies et les cellules auxiliaires	
1.1.2. Les spermatocytes	
1.1.3. Les spermatides	
1.1.4. Les spermatozoïdes	
1.2. Données histochimiques et histoenzymologiques	78
1.2.1. Données histochimiques	
1.2.2. Données histoenzymologiques	
2. LA SPERMATOGENESE ANORMALE	80
III - DISCUSSION	80

CHAPITRE IV : LE DEVENIR DES GAMÈTES

I - LES GAMETES NON EMIS	95
1. DEGENERESCENCE DES CELLULES GERMINALES	95
1.1. Les ovocytes	95
1.1.1. Etude histologique et cytologique	
1.1.2. Données histochimiques et histoenzymologiques	
1.2. Les cellules germinales mâles	97
2. RESORPTION	98
2.1. Les hémocytes	98
2.2. Les cellules auxiliaires	99
2.3. L'épithélium des gonoductes	99
II - LES OVOCYTES EMIS PAR INDUCTION ARTIFICIELLE : RECHERCHE D'INDICES DE QUALITE	99
1. ETUDE CYTOLOGIQUE	99
1.1. Les trois catégories d'ovocytes émis	99
1.2. Anomalies ultrastructurales des ovocytes d'apparence normale	102
2. ETUDE CYTOCHIMIQUE	104
III - DISCUSSION	104
DISCUSSION GÉNÉRALE	112
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	126
ANNEXES	

- LÉGENDE DES TABLEAUX -

	pages
TABLEAU 1 - Détection des acides nucléiques.	11
TABLEAU 2 - Détection des composés glucidiques.	13
TABLEAU 3 - Détection des lipides.	14
TABLEAU 4 - Détection des protéines.	14
TABLEAU 5 - Techniques histoenzymologiques (réactions de précipitation).	18
TABLEAU 6 - Caractéristiques histochimiques et histoenzymologiques de l'épithélium externe du tégument.	33
TABLEAU 7 - Caractéristiques histochimiques et histoenzymologiques des macrophages.	40
TABLEAU 8 - Caractéristiques histochimiques et histoenzymologiques de l'épithélium des conduits évacuateurs.	43
TABLEAU 9 - Démarche d'identification de la nature chimique de l'enveloppe vitelline.	60
TABLEAU 10 - Nature chimique des inclusions cytoplasmiques de l'ovocyte.	62
TABLEAU 11 - Démarche d'identification de la nature chimique des inclusions cytoplasmiques II.	63
TABLEAU 12 - Résultats enzymologiques : tests API ZYM.	66
TABLEAU 13 - Caractéristiques histoenzymologiques des ovocytes.	67
TABLEAU 14 - Principales dimensions du spermatozoïde de <i>Pecten maximus</i> .	74
TABLEAU 15 - Caractéristiques histoenzymologiques de certaines cellules des acini mâles.	79
TABLEAU 16 - Caractéristiques de l'ovocyte de trois bivalves.	82
TABLEAU 17 - Caractéristiques des trois types ovocytaires chez <i>Pecten maximus</i> .	100
TABLEAU 18 - Modifications cytologiques au cours de la lyse ovocytaire chez quelques bivalves.	109

- LÉGENDE DES FIGURES -

	page
FIGURE 1 - Etapes successives de la préparation d'échantillons destinés à l'examen au microscope électronique à balayage.	20
FIGURE 2 - Vue générale de <i>Pecten maximus</i> , valve gauche et lobe du manteau enlevés.	27
FIGURE 3 - Evolution macroscopique de la gonade de <i>Pecten maximus</i> adulte en fonction du cycle sexuel (baie de St-Brieuc) en 1986.	28
FIGURE 4 - L'ovogenèse chez <i>Pecten maximus</i> .	57
FIGURE 5 - Tentative préliminaire de quantification de réactions histo-chimiques par analyse d'images.	59
FIGURE 6 - Caractéristiques ultrastructurales du spermatozoïde de <i>Pecten maximus</i> .	75
FIGURE 7 - La spermatogenèse chez <i>Pecten maximus</i> .	77
FIGURE 8 - Caractéristiques ultrastructurales des trois types d'ovocytes (1, 2, 3) différenciables par examen direct en microscopie photonique chez <i>Pecten maximus</i> .	101
FIGURE 9 - Ovocytes susceptibles d'être pondus en fonction du cycle sexuel.	106
FIGURE 10 - Corrélation entre l'indice des lipides, le taux d'éclosion à 2 jours (a) et le taux d'anomalies larvaires à 2 jours (b).	107

- INTRODUCTION -

INTRODUCTION

La coquille saint-jacques, *Pecten maximus*, vit en bancs plus ou moins dispersés le long des côtes atlantiques européennes, depuis la Norvège jusqu'à la péninsule ibérique (Tebble, 1966). On la rencontre à des profondeurs variables, du zéro des cartes marines à une centaine de mètres, exceptionnellement jusqu'à 200 m (Antoine, 1979), et à des densités pouvant atteindre 1 individu/1,65 m² (Baird & Gibson, 1956).

Mollusque apprécié par la qualité de sa chair, essentiellement le muscle et parfois la gonade, il est l'objet d'une pêche artisanale, notamment en France, en Grande-Bretagne et à l'île de Man. Dans notre pays, sa récolte à des fins commerciales est ancienne puisque dès 1900 les bancs de la rade de Brest étaient dragués (Le Pennec, 1974). Jusqu'à la dernière décennie, les tonnages débarqués en France ont fluctué selon les années en fonction de l'exploitation de nouveaux gisements et du déclin de gisements anciens. En Bretagne, les bancs ayant les biomasses les plus élevées sont concentrés dans la baie de St-Brieuc où ils sont exploités depuis 1960. A partir de cette année la production, pour l'ensemble de la baie, n'a cessé de croître atteignant environ 15 000 t en 1977, ce qui représentait la moitié du tonnage obtenu sur tout le littoral français.

On peut penser que les prélèvements intensifs ont provoqué, à moyen terme, la rupture de l'équilibre naturel des bancs, les adultes n'étant plus assez nombreux pour assurer la régénérescence des populations.

Ainsi, malgré une gestion rigoureuse de la pêche qui ne permet plus désormais que la capture de 2 000 à 3 000 t/an depuis 1985, on assiste à une diminution inquiétante de la densité des coquilles saint-jacques de la baie.

Outre la surexploitation, la principale raison du déclin de ces populations naturelles peut être corrélée aux variations annuelles du recrutement. *In situ*, l'émission des gamètes, sous la dépendance de facteurs externes, peut survenir à des périodes plus ou moins favorables du cycle sexuel (Paulet *et al.*, 1986). Les gamètes émis sont alors de qualité variable et la viabilité des larves, puis le recrutement, sont compromis. Les résultats obtenus en éclosérie confirment en effet la qualité non constante des gamètes expulsés au moment de la reproduction et son incidence sur le développement larvaire (Cochard, 1985 ; Paulet *et al.*, 1989).

Le déterminisme du recrutement est précisément un des thèmes de recherche qui a été développé par l'IFREMER, dès 1983, dans le cadre d'un programme privilégié : le Programme National sur le Déterminisme du Recrutement ou P.N.D.R.. L'une des espèces cibles prises en compte dans ce programme est la coquille saint-jacques et le gisement choisi est celui de la baie de St-Brieuc.

Selon Boucher (1987), la problématique du P.N.D.R. est :

- d'estimer le flux d'individus passant d'un stade de développement au suivant (pontes, larves, post-larves, juvéniles, adultes) ;
- de comparer les variabilités d'abondance entre stades, cohortes, années de reproduction, pour définir les stades critiques ;
- d'analyser les processus à l'origine de ces fluctuations et de définir les facteurs de l'environnement qui en sont responsables.

Le P.N.D.R. ouvre donc la voie à de nombreuses études scientifiques devant permettre une meilleure connaissance des facteurs biotiques et abiotiques susceptibles d'intervenir sur le recrutement de ce pectinidé.

Il oblige ainsi à parfaire notre savoir sur certains aspects de la biologie de cette espèce, notamment la reproduction, puisque c'est elle qui conditionne le développement larvaire, clé du recrutement.

C'est dans le cadre de la reproduction que nous avons mené notre étude, essayant d'apprécier la qualité des gamètes mâles et femelles émis par les géniteurs et de détailler, pour mieux les comprendre, les phénomènes de dégénérescence ovocytaire, déjà connus pour être fréquents et intenses chez *P. maximus* (Besnard, 1988 ; Paulet et al., 1988).

La qualité des gamètes est une notion complexe qui nécessite, pour l'appréhender :

- de mieux connaître les mécanismes intimes qui participent à l'élaboration des cellules sexuelles mâles et femelles ;
- de définir les caractéristiques ultrastructurales, histo-chimiques et histoenzymologiques des gamètes parvenus à maturité ;
- de mettre en évidence les processus qui conduisent à une dérive par rapport à la destinée originelle des gamètes et qui aboutissent à leur dégénérescence ;
- d'étudier le devenir des produits de la lyse gamétique.

Si les résultats obtenus par l'ensemble de ces démarches peuvent apporter des réponses à une question posée dans la problématique du recrutement, ils répondent aussi au désir de combler une lacune dans la littérature scientifique où les études ultrastructurales, histo-chimiques et histo-enzymologiques concernant la gamétogenèse des pectinidés sont encore fragmentaires.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES

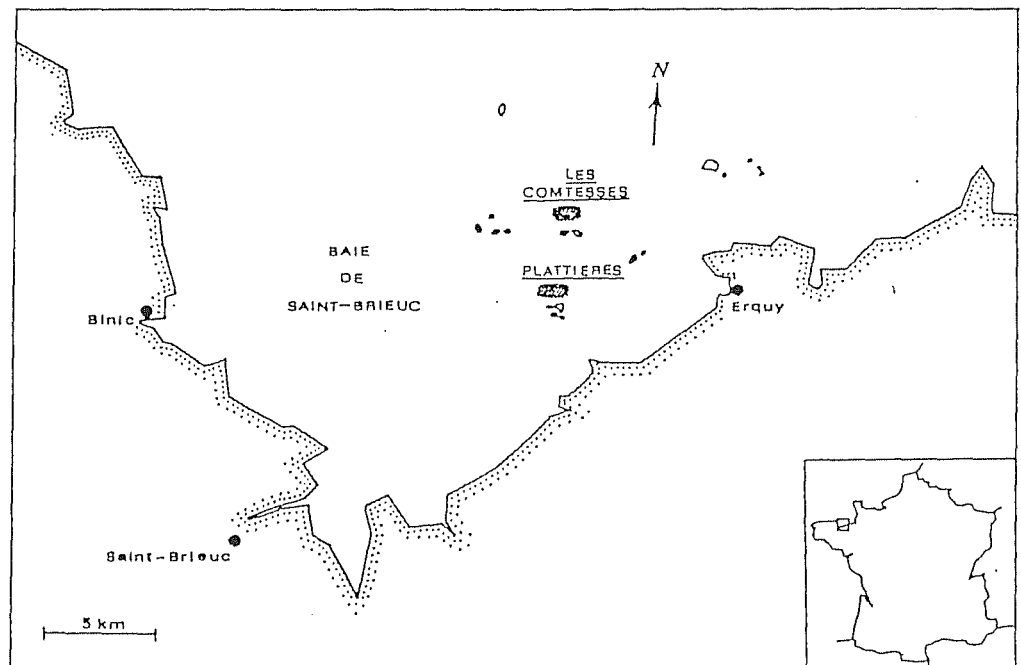
	pages
I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE	8
1. PRELEVEMENT DES REPRODUCTEURS	8
2. EMISSIONS DE GAMETES EN ECLOSERIE	9
II - LES METHODES	10
1. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES	10
2. TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES	11
2.1. Sur coupes en paraffine	11
2.2. Sur coupes à congélation	11
.Mise en évidence des glucides	
.Mise en évidence des lipides	
.Mise en évidence des protéines	
3. TECHNIQUES ENZYMOLOGIQUES ET HISTOENZYMOLOGIQUES	12
3.1. Microméthode enzymologique	12
3.2. Méthodes histoenzymologiques	15
4. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	17
4.1. Microscopie à balayage (M.E.B.)	17
4.2. Microscopie à transmission (M.E.T.)	21
.Fixation - inclusion - coupes	
.Traitement des coupes	
- Coupes semi-fines	
*Coloration au bleu de toluidine	
*Détection des lipides	
*Détection des protéines (protéines basiques)	
- Coupes ultra-fines	
*Contraste selon Reynolds (1963)	
*Détection du glycogène et des glycoprotéines	
*Extraction des lipides	
*Digestion enzymatique	
*Détection de la phosphatase acide	
5. ANALYSE D'IMAGE	24

I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE

Portant à la fois sur le déroulement de la gamétogenèse et sur la qualité des gamètes émis, l'étude a nécessité de recourir à deux types distincts de matériel : d'une part, des individus potentiellement reproducteurs prélevés dans le milieu naturel, d'autre part des ovocytes et des larves obtenus expérimentalement.

1. PRELEVEMENT DES REPRODUCTEURS

Les coquilles saint-jacques proviennent des populations naturelles de la baie de St-Brieuc où elles forment un vaste gisement de 160 000 hectares. Les prélèvements y ont été réalisés en 1986 et 1987 à des profondeurs variant entre 15 et 20 m, sur les bancs des Comtesses et des Plattières (carte n° 1).



Carte n° 1 - Sites de prélèvement.

Alors que les prélèvements étaient normalement effectués à des intervalles réguliers d'un mois, leur périodicité a été resserrée pendant la période d'émission des gamètes afin d'obtenir des individus susceptibles de pondre en laboratoire dans des conditions physiologiques aussi proches que possible de celles du milieu (cf. annexe I). La récolte a été réalisée à l'aide de la drague de type commercial normalement utilisée par les pêcheurs de la baie. Seuls les individus de trois ans ont été ramenés au laboratoire, en général trois par sortie pour les besoins des diverses études histologiques, et dix pour l'expérimentation en éclosion.

2. LES EMISSIONS DE GAMETES EN ECLOSERIE

Les coquilles saint-jacques destinées à l'étude de la qualité des ovocytes à l'émission ont été traitées à l'éclosion IFREMER d'Argenton (Finistère). Les émissions y ont été induites selon le protocole faisant appel aux chocs thermiques classiquement utilisé dans cet établissement (Cochard, 1983 ; Paulet *et al.*, 1988). Chez ces individus hermaphrodites simultanés, le sperme est, dans ces conditions, généralement émis d'abord, dans un délai variant de 1 à 4 h après le début de l'expérimentation. Dès l'émission des premiers ovocytes, les coquilles sont lavées de leur sperme et isolées pour limiter au maximum les cas d'autofécondation. Les stimulations sont interrompues si aucun résultat n'est obtenu à l'issue de deux jours de traitement. De nouveaux géniteurs sont alors soumis au même protocole.

Pour chaque géniteur, les ovocytes sont dénombrés en fonction de leur morphologie examinée en microscopie photonique. Un décompte des larves "D" est effectué pour une estimation du taux d'éclosion qui représente le nombre total de larves à deux jours par rapport au nombre total d'ovocytes fécondés.

Dès leur émission, des échantillons d'ovocytes sont concentrés par tamisage à 20 μm , puis rapidement fixés pour les examens cytologique et cytochimique. Des aliquots de 50 000 ovocytes par animal sont aussi rapidement congelés à -30°C . Après fécondation selon la méthode de Gruffydd et Beaumont (1970), les élevages larvaires sont conduits d'après la méthode de Loosanoff et Davis (1963), en bacs cylindro-coniques de 150 ou 450 l d'eau de mer filtrée à 1 μm et thermorégulée à 18°C . Après deux jours, les bacs sont vidangés et les larves récupérées sur des tamis de 45 μm de maillage. Aucune nourriture n'est distribuée pendant cette période endotrophe (Lucas, 1984).

II - LES METHODES

1. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Pour une étude topographique générale de la glande génitale et un contrôle du stade de maturité sexuelle, des échantillons de gonade mâle et femelle sont fixés au liquide de Bouin aqueux pendant 48 heures environ. Après déshydratation dans des bains d'éthanol de degré croissant et imprégnation par un solvant intermédiaire (toluène), les specimens sont inclus dans de la paraffine et coupés au microtome à 5 μm d'épaisseur. La coloration topographique choisie est le trichrome de Masson (Gabe, 1968). Les fibres de réticuline sont mises en évidence sur quelques coupes par imprégnation argentique, selon la technique de Gomori (Gabe, 1968). La présence de fibres élastiques est recherchée par une coloration à l'orcéine (Gabe, 1968).

2. TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES

2.1. Sur coupes en paraffine

Des colorations de deux types ont été réalisées pour caractériser les acides nucléiques. Elles figurent au tableau 1.

Tableau 1 - Détection des acides nucléiques.				
COMPOSÉS REVÊLÉS	COULEUR	TECHNIQUE	REFERENCE	CONTROLE (absence de coloration)
Acide ribonucléique (A.R.N.) Acide desoxyribo-nucléique (A.D.N.)	rouge verte	Vert de méthyle-pyronine	Lison (1960) d'après Ganter et Jolles (1970)	Procédé de Schneider (1946-1947) d'après Lison (1960) : extraction des acides nucléiques à l'acide trichloracétique 5% à 90°C pendant 15 mn.
Acide desoxyribo-nucléique (A.D.N.)	rose-rouge	Réaction de Feulgen	Feulgen et Rossenbeck (1924) d'après Ganter et Jolles (1970)	Absence d'hydrolyse par HCl

2.2. Sur coupes à congélation

Des échantillons de gonade sont prélevés et rapidement congelés dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide. Ils sont ensuite stockés jusqu'à la coupe dans un congélateur à -80°C. A la sortie du congélateur, les échantillons sont maintenus à -30°C, pendant une heure environ, dans l'enceinte réfrigérée d'un cryomicrotome Reichert Jung E avant d'être débités en coupes sériées de 8 µm d'épaisseur.

Pour éviter toute interférence avec la réaction histochimique mise en oeuvre, les diverses techniques de coloration sont appliquées sans contre-coloration. En revanche, une coloration rapide, le trichrome de Gomori selon Gabe (1968), est réalisée en parallèle sur des coupes voisines dans un but de repérage topographique.

.Mise en évidence des glucides

Les glucides ont été mis en évidence et ultérieurement plus précisément caractérisés à partir de coupes fixées pendant 5 mn au mélange de Carnoy (Gabe, 1968). Les techniques et les contrôles effectués sont présentés dans le tableau 2.

.Mise en évidence des lipides

Les diverses méthodes utilisées (tabl. 3) sont appliquées après fixation des coupes par l'alcool à 60° pendant une minute ou par le formol-calcium de Baker (+ 2,5 % NaCl) selon Ganter et Jolles (1970) pendant 15 mn.

.Mise en évidence des protéines

Les coupes sont également fixées au formol-calcium de Baker (+ 2,5 % NaCl) avant coloration (tabl. 4).

3. TECHNIQUES ENZYMOLOGIQUES ET HISTOENZYMOLOGIQUES

3.1. Microméthode enzymologique

L'étude des spectres d'activités enzymatiques des lots d'ovocytes est effectuée par la microméthode API ZYM. Cette technique permet, après 4 heures d'incubation à 37°C, d'étudier rapidement et simultanément 19 activités enzymatiques. C'est à cette analyse que sont destinés 16 aliquots de 50 000 ovocytes recueillis et congelés dès leur émission au cours de pontes induites. Après décongélation, les ovocytes sont centrifugés à 1000 tours/mn pendant 15 mn, à +4°C. Le culot est repris dans 1,5 ml d'eau de mer stérilisée par filtration à 0,2 µm, et broyé au potter dans de la glace pilée. Après centrifugation (3000 tours/mn, 20 mn, à +4°C), l'extrait est inoculé dans les cupules réactives (65 µl/cupule). Une galerie témoin estensemencée en parallèle par de l'eau de mer filtrée.

Tableau 2 - Détection des composés glucidiques.

COMPOSÉS REVELÉS	COULEUR	TECHNIQUE	REFERENCE
Composés glucidiques (polysaccharides, glycoprotéines, glycolipides mucosubstances neutres)	rose	Acide periodique-Schiff (A.P.S.)	Mo Manus (1946) d'après Gabe (1968)
Mucosubstances acides	bleue	Bleu alcian, pH 2.5	Mowry (1956) d'après Gabe (1968)
Mucosubstances acides Composés APS' Coexistence de groupements glycol-1,2 et acides	bleue rose pourpre à pourpre-bleuâtre	Bleu alcian + A.P.S.	Mowry (1956), Vialli (1956) d'après Gabe (1968)
Glucides (groupements glycol-1,2 ou hydroxy-1 amino-2)	pas de coloration	Acétylation + A.P.S.	Gabe (1968) Ganter et Jolles (1970)
Glycogène	rose pas de coloration	A.P.S. Contrôle: amyloglucosidase (Sigma) à 0,07% dans tampon citrate de sodium, pH 4.25, 1h, 37°C + A.P.S.	Carr et Neff (1983)
Glycolipides	rose pas de coloration	A.P.S. Contrôle: méthanol/chloroforme (v/v), 2h, 60°C + A.P.S.	Gabe (1968) modifié
Glycoprotéines	rose pas de coloration	A.P.S. Contrôle: pronase (Sigma) 0.05% dans eau distillée, pH 7.4, 35 mn, 37°C + A.P.S.	Monneron et Bernhard (1966) modifié

Tableau 3 - Détection des lipides.

COMPOSES REVELES	COULEUR	TECHNIQUE	REFERENCE	CONTROLE Extraction des lipides
Lipides totaux	noire	Noir Soudan B	Gabe (1968)	Méthanol/Chloroforme v/v, 2h, 60°C
Phospholipides Lipides neutres (triglycérides, cholestérides) Acides gras libres	bleue rose rouge	Sulfate de bleu de Nil	Dunnigan (1968) d'après Ganter et Jolles (1970)	idem
Phospholipides Triglycérides et cholestérides	rouge-orange noire	Méthode "OTAN" d'Adams (1959)	Ganter et Jolles (1970)	Acétone, 1h, t' ambiante (Phospholipides non extraits rouge-orange)
Caroténoïdes	jaune-vert	Fluorescence directe	Ganter et Jolles(1969)	-

Tableau 4 - Détection des protéines.

COMPOSES REVELES	COULEUR	TECHNIQUE	REFERENCE	CONTROLE Digestion enzymatique des protéines
Protéines basiques et acidophiles	jaune	Jaune Naphtol	Ganter et Jolles (1970)	Pronase (Sigma) 0,05 % dans eau distillée 35 mn, 37°C
Protéines basiques (surtout histones et protamines)	verte	Fast Green F.C.F.	Gabe (1968)	idem + extraction préalable des acides nucléiques
Protéines acidophiles	rouge	Ponceau 2r	Gori (1977)	-

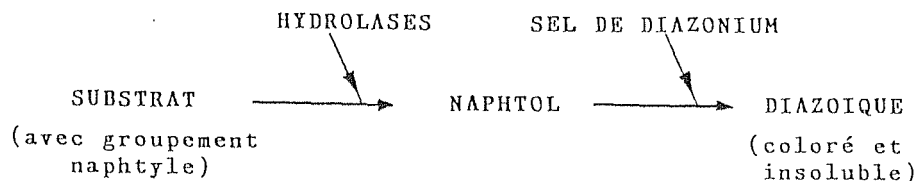
3.2. Méthodes histoenzymologiques

Si les résultats globaux obtenus à l'aide de la méthode précédente sont un préalable utile pour la sélection des techniques histoenzymologiques, des tests complémentaires doivent être appliqués pour détecter des activités enzymatiques, non prévues par la microméthode API ZYM, mais susceptibles d'intervenir dans l'ontogenèse, la dégénérescence et la résorption des gamètes.

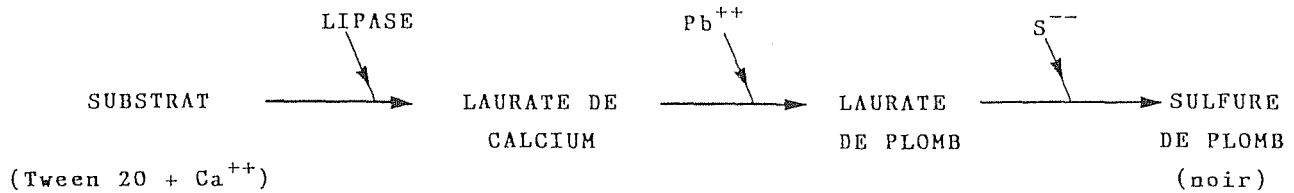
Les réactions histoenzymologiques sont toutes effectuées sur des coupes à congélation fixées pendant 15 mn au formol-calcium de Baker. Deux à trois individus sont examinés pour chaque date de prélèvement. Les individus traités sont les mêmes que pour l'étude histochimique proprement dite.

La plupart des enzymes étudiées ici sont mises en évidence par des techniques de précipitation. Le principe des procédés utilisés pour la localisation des activités enzymatiques est une réaction de couplage simultané (C.S.) ou de post-couplage (P.C.). Le tissu est incubé dans une solution tamponnée contenant le substrat spécifique de l'enzyme recherchée. Un réactif, ou agent de couplage, permettant de révéler l'un des produits de la réaction, est introduit soit directement dans le milieu d'incubation (C.S.), soit dans un second bain (P.C.). Deux types de substances sont utilisées comme agents de couplage :

- les sels de diazonium ; ils réagissent avec des groupements fonctionnels comme le naphthol pour donner des composés azoïques insolubles et colorés :



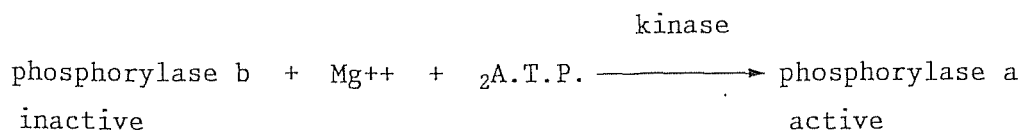
- un ion métallique ; lorsque le produit de la réaction est un composé anionique, on le précipite sous forme d'un sel de calcium, puis l'ion calcique est échangé par un cation lourd (plomb, cobalt) que l'on met en évidence sous forme de sulfure noir :



Les techniques utilisées ainsi que les contrôles négatifs effectués sont résumés dans le tableau 5. Les protocoles détaillés sont donnés en annexe II.

La recherche de l'amylase est effectuée par la technique d'empreinte selon la méthode de Shear et Pearse (1963). Les coupes sont directement appliquées sur un film d'amidon recouvrant les lames. Après incubation, l'amidon non dégradé est révélé par le lugol. Les conditions opératoires sont décrites en annexe II.

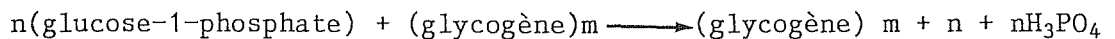
La détection de la phosphorylase est réalisée suivant le protocole décrit par Chayen et al. (1969). L'activité phosphorylasique potentielle totale est étudiée par conversion enzymatique de la phosphorylase b inactive, en phosphorylase a active, impliquant l'addition au milieu d'incubation d'A.T.P. et d'ions magnésium :



Du fluorure de sodium est aussi introduit dans le milieu pour éviter la dégradation de la phosphorylase a par action d'une phosphorylase phosphate. La phosphorylase a catalyse la réaction réversible :



L'équilibre dépend du pH et favorise la synthèse du glycogène :



$(\text{glycogène})_m$: représente la chaîne primaire qui s'accroît en $m+n$ sous l'action de la phosphorylase a.

Pour un maximum d'activité, de l'adénosine-5-phosphate (A.M.P.) est ajoutée comme activateur. De l'insuline est aussi présente in vitro pour accroître l'activité de la phosphorylase. Le glycogène formé est révélé par addition d'iode qui provoque une coloration bleue ou rouge-brun à l'emplacement de synthèse du polysaccharide.

Deux témoins sont réalisés, l'un par omission de glucose-1-phosphate, l'autre en provoquant la digestion par l'amylo-glucosidase du glycogène tissulaire.

4. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

4.1. Microscopie à balayage (M.E.B.)

Cette technique a été utilisée dans le but d'examiner le tégument externe de la gonade, la structure interne de la glande fixée au Bouin et incluse en paraffine, et la morphologie des gamètes mâles et femelles à l'émission.

Tableau 5 - Techniques histoenzymologiques
(réactions de précipitation).

ENZYME RECHERCHER	SUBSTRAT	AGENT DE COUPLAGE	COULEUR DE LA REACTION	REFERENCE	CONTROLE
Lipase	-Tween 20 -Tween 80	Ca ⁺⁺ puis Pb ⁺⁺ et S ⁻⁻	marron-noir	Gomori (1952) d'après Gabe (1968)	Dénaturation des enzymes (15mn, 100°C)
Estérases non spécifiques	Acétate α naphthyl AS-LC	Fast Blue B	violet-noir	Burstone (1956) d'après Gabe (1968)	Omission du substrat
Phosphatase alcaline	α naphthyl phosphate sodique	Fast Garnet G.B.C.	pourpre foncé	Gomori (1952) d'après Gabe (1968)	Omission du substrat
Phosphatase acide	α naphthyl phosphate sodique	Fast Garnet G.B.C.	rouge brun	Grogg et Pearse (1952) d'après Gabe (1968)	Omission du substrat
Arylsulfatase	Naphtol ASBI sulfate	Fast violet B	rose-violet	Lowe, Moore et Bayne (1982)	Omission du substrat
N-acétyl glucosaminidase	Naphtol ASBI glucosaminide	Fast Red violet	rouge-brun	Moore (1976)	Omission du substrat
β glucuronidase	Naphtol ASBI glucuronide	Fast Red violet	rouge-brun	Moore (1976)	Omission du substrat
Leucine amino peptidase	L leucyl β naphthyl amide	Fast Garnet GBC	rouge	Burstone et Folk (1955)	Omission du substrat

La gonade entière de *P. maximus*, les ovocytes et les spermatozoïdes sont fixés à +4°C pendant 1 heure au glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon cacodylate 0,2 M de pH 7,3, ajusté à 1300 mosm par NaCl. La fixation est arrêtée par un lavage dans le tampon cacodylate. Cette étape nécessite une récupération préalable des spermatozoïdes par filtration sur membrane Nucléopore en polycarbonate, de porosité 0,2 µm, et une centrifugation des ovocytes à +4°C à 1000 tours/mn pendant 15 mn. Les échantillons sont ensuite déshydratés par des bains d'éthanol de degré croissant (70° à 100°). Dans le cas des ovocytes, des centrifugations intermédiaires sont nécessaires entre chaque bain. Une récupération des ovocytes sur membrane filtrante est réalisée à la fin de ce traitement. La déshydratation complète est alors effectuée dans un appareil à point critique type Balzers Union CPD 020 où l'alcool est remplacé par du CO₂ liquide. L'évacuation du CO₂ sous forme gazeuse permet d'éviter toute déformation des structures. La gonade entière et les filtres portant les gamètes sont ensuite collés sur des plots métalliques à l'aide de ruban adhésif double face. Ils sont placés dans un métalliseur Jeol JFC 1100 dans lequel les échantillons sont recouverts d'une mince pellicule d'or. L'observation des spécimens est effectuée à l'aide d'un microscope JEOL JSM 35.

En outre, des fragments de lames portant des coupes transversales de gonade incluse en paraffine sont traités selon la technique décrite par Prieur (1981). Après déparaffinage au toluène, la méthode de préparation des spécimens est identique à celle décrite pour les échantillons précédents.

Un schéma synoptique des étapes de préparation des trois types de prélèvements est donné par la figure 1.




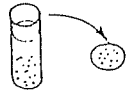



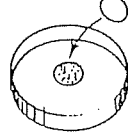
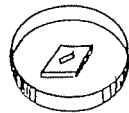
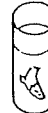

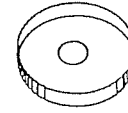
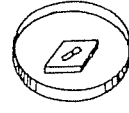

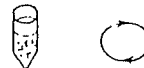
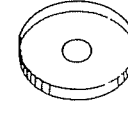
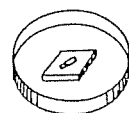

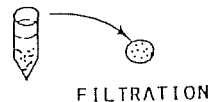
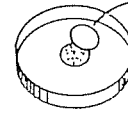
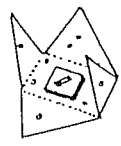
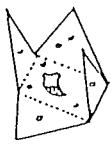
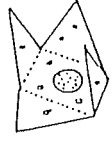
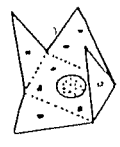




COUPES EN PARAFFINE	GONADE ENTIERE	OVOCYTES	SPERMATOZOIDES
FIXATION (BOUIN) INCLUSION-COUPES	FIXATION (GLUTARALDÉHYDE)		
			
DÉPARAFFINAGE	LAVAGE (TAMPON)		
			
DÉSHYDRATATION			
		ALCOOL 70° 2 x 15 mn 	
		ALCOOL 95° 2 x 15 mn 	
		ALCOOL 100° 3 x 15 mn 	
POINT CRITIQUE			
			
MÉTALLISATION			
			

Figure 1 - Etapes successives de la préparation d'échantillons destinés à l'examen au microscope électronique à balayage.

4.2. Microscopie à transmission (M.E.T.)

. Fixation - inclusion - coupes :

Des échantillons de gonade mâle et femelle d'une part, des ovocytes émis d'autre part ont été traités en vue de leur examen en microscopie à transmission.

Leur fixation est réalisée pendant 1 h à + 4°C dans du glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon cacodylate 0,2 M, pH 7,3, ajusté à 1 300 mosm par NaCl. Un lavage par le tampon cacodylate 0,2 M (+ NaCl), pH 7,3, est ensuite effectué (2 bains de 1 h). Une post-fixation de 1 h à + 4°C est assurée par le tetroxyde d'osmium à 1 % en tampon cacodylate 0,2 M (+ NaCl). Un nouveau lavage par le tampon cacodylate arrête cette post-fixation (2 bains de 1 h). Une déshydratation est ensuite réalisée à température ambiante par deux bains d'éthanol 70° et 95° et par 3 bains d'alcool à 100° (15 mn par bain). Enfin, une imprégnation par le mélange éthanol 100°/résine de Spurr (1969) (V/V) pendant 1 h 30 précède l'infiltration de résine pure (1 h 30 à 12 h).

Après l'inclusion, la polymérisation des blocs s'effectue à 60°C durant 48 h.

Le traitement des ovocytes nécessite une centrifugation à 1 000 tours/mn pendant 15 mn avant chaque changement de bain puis la remise en suspension des cellules, y compris dans la résine. Une centrifugation de 20 mn à 3 000 tours/mn en résine finale précède la polymérisation afin de concentrer les gamètes dans un culot.

Des coupes semi-fines ($e = 1 \mu\text{m}$) et ultra-fines ($e = 60 \text{ nm}$) sont réalisées à l'ultramicrotome Reichert-Jung OMU 35. Les coupes ultra-fines sont recueillies sur grilles en cuivre/ rhodium (Mesh 300) et quelques unes le sont sur grilles en or.

.Traitement des coupes :-

- Coupes semi-fines

* Coloration au bleu de toluidine

Toutes les coupes semi-fines sont colorées à chaud pendant 30 sec par le bleu de toluidine à 0,5 % dans une solution de $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ à 2,5 %.

* Détection des lipides

Les coupes semi-fines de tous les lots d'ovocytes recueillis en 1986 et 1987 au cours des pontes induites sont colorées par le Rouge à l'huile 0 pour la mise en évidence des lipides (lipides neutres). La coloration dure 24 h à 37°C. Sa spécificité est vérifiée sur des témoins par extraction des lipides à la pyridine ou par un mélange méthanol-chloroforme (V/V) pendant 6 h à 60°C selon Ferrand et Delavault (1973). Ces coupes étant destinées à une quantification des lipides à l'analyseur d'images, chaque étape de la technique est standardisée au maximum. Deux autres lysochromes ont également été testés dans les mêmes conditions, le Noir Soudan et le bleu B.Z.L..

* Détection des protéines (protéines basiques)

Quelques coupes d'ovocytes ont été traitées par le Ponceau 2R dans de l'acide sulfurique (pH 2) à 40°C pendant 1 h après action de l'acide periodique à 1,5 % à 40°C selon Gori (1977).

- Coupes ultra-fines

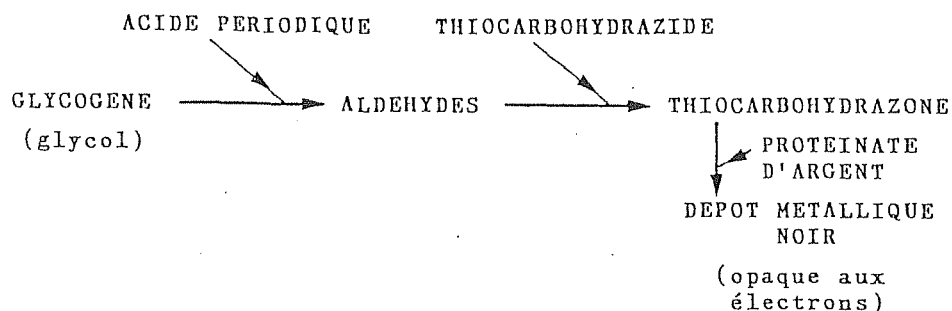
* Contraste selon Reynolds (1963)

Les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle puis au citrate de plomb et observées au microscope JEOL 100CX.

* Détection du glycogène et des glycoprotéines

Quelques coupes recueillies sur grilles en or sont traitées par l'acide periodique, le thiocarbohydrazide, puis le protéinate d'argent selon la technique de Thiery et Rambourg (1974). Le protocole suivi est décrit en annexe III. Les aldéhydes formés par oxydation periodique des groupements glycol-1, 2 des unités glucose du glycogène ou autres composés polysaccharidiques réagissent avec le thiocarbohydrazide pour donner une

thiocarbohydrazone. Une teinte noire apparaît par action du protéinate d'argent sur le groupement thiocarbonyle de la thiocarbohydrazone.



* Extraction des lipides

Afin de caractériser les globules lipidiques sur les coupes de gonade femelle, des échantillons sont immergés pendant 2 h à 60°C dans un mélange méthanol/chloroforme (V/V) (Ferrand & Delavault, 1973) après fixation au glutaraldéhyde et lavage en tampon. Ils sont ensuite post-fixés, inclus dans la résine et coupés pour une observation au M.E.T..

* Digestion enzymatique

Des essais de digestion enzymatique ont été faits sur coupes puis sur blocs prélevés dans la zone femelle de la gonade avant fixation osmiée. L'action pendant 1 h et 6 h à 37°C de la pronase à 0,1 % dans de l'eau à pH 7,4 et de la pepsine à 0,1 % dans HCl 0,1 N a été testée.

* Détection de la phosphatase acide

La phosphatase acide a été recherchée au M.E.T. après traitement de très petits échantillons de gonade fixée brièvement pendant 25 mn au glutaraldéhyde selon la technique de Hourdry (1974), puis redécoupée. La méthode utilisée est détaillée en annexe IV. A pH 5, la phosphatase acide libère les anions phosphate du β glycérophosphate de sodium. En présence de nitrate de plomb ces derniers précipitent sous forme de phosphate de plomb.

5. ANALYSE D'IMAGE

Les lipides des ovocytes sont quantifiés sur coupes semi-fines à l'aide d'un analyseur d'images, couplé à un microordinateur.

Les coupes colorées sont placées sur la platine d'un microscope photonique couplé à une caméra vidéo CCD (Cohu). L'image est visualisée sur un écran de contrôle et numérisée en une grille de 512 sur 512 pixels (points images).

Un seuil d'intensité du gris correspondant à la fraction lipidique est choisi après observation d'un grand nombre de coupes. Le niveau de gris sélectionné est ensuite introduit dans le programme de traitement. Un indice de lipides est défini par le pourcentage de surface de la coupe de l'ovocyte occupée par la fraction lipidique. Une correction des défauts d'éclairage (effet de dôme) est réalisée par soustraction d'un blanc obtenu sur la lame hors des objets à étudier.

Cette technique a aussi été utilisée pour quantifier, sur coupes à congélation, l'intensité des diverses réactions nécessaires à l'identification des composés glucidiques.

CHAPITRE II

L'ENVIRONNEMENT DES GAMETES

CHAPITRE II : L'ENVIRONNEMENT DES GAMÈTES

	pages
I - INTRODUCTION	27
II - LE TEGUMENT	30
1. L'EPITHELIUM EXTERNE	30
1.1. Types cellulaires	30
.Les cellules à microvillosités	
.Les cellules ciliées	
.Les mucocytes	
1.2. Caractéristiques histoenzymologiques	32
2. LE TISSU SOUS-EPITHELIAL PERIGONADIQUE	35
.Fibroblastes	
.Hémocytes	
.Cellules musculaires	
.Cellules nerveuses	
III - LE TISSU CONJONCTIF INTERSTITIEL ET LES SINUS HEMOLYMPHATIQUES	38
1. LE TISSU CONJONCTIF INTERSTITIEL	38
2. LES SINUS HEMOLYMPHATIQUES ET LES HEMOCYTES	39
IV - LES ACINI ET LES CONDUITS EVACUATEURS	40
1. LES ACINI	40
2. LES CONDUITS EVACUATEURS	41
V - DISCUSSION	44

I - INTRODUCTION

L'aspect macroscopique et l'anatomie de la glande génitale de *P. maximus*, bivalve hermaphrodite simultané, ont été décrits par plusieurs auteurs (Dakin, 1909 ; Tang, 1941 ; Coe, 1943 ; Reddiah, 1962 ; Mason, 1958, 1983).

Comme chez tous les Pectinidae, cette glande est nettement individualisée par rapport au pied, au manteau et à la glande digestive (fig. 2). Elle est divisée en deux régions, bien distinctes pendant toute la période de maturation sexuelle. La partie proximale, de couleur blanchâtre, correspond au compartiment germinale mâle ; la partie distale, dont la couleur varie du rose à l'orange vif, représente le compartiment femelle (pl. 1). L'évolution saisonnière de la gonade a été décrite par Mason (1958) qui distingue sept stades macroscopiques successifs. Appliquée aux prélèvements effectués en 1986 en baie de St-Brieuc (Paulet *et al.*, 1988), cette échelle permet de décrire le cycle annuel des populations étudiées (fig. 3 et pl. 1).

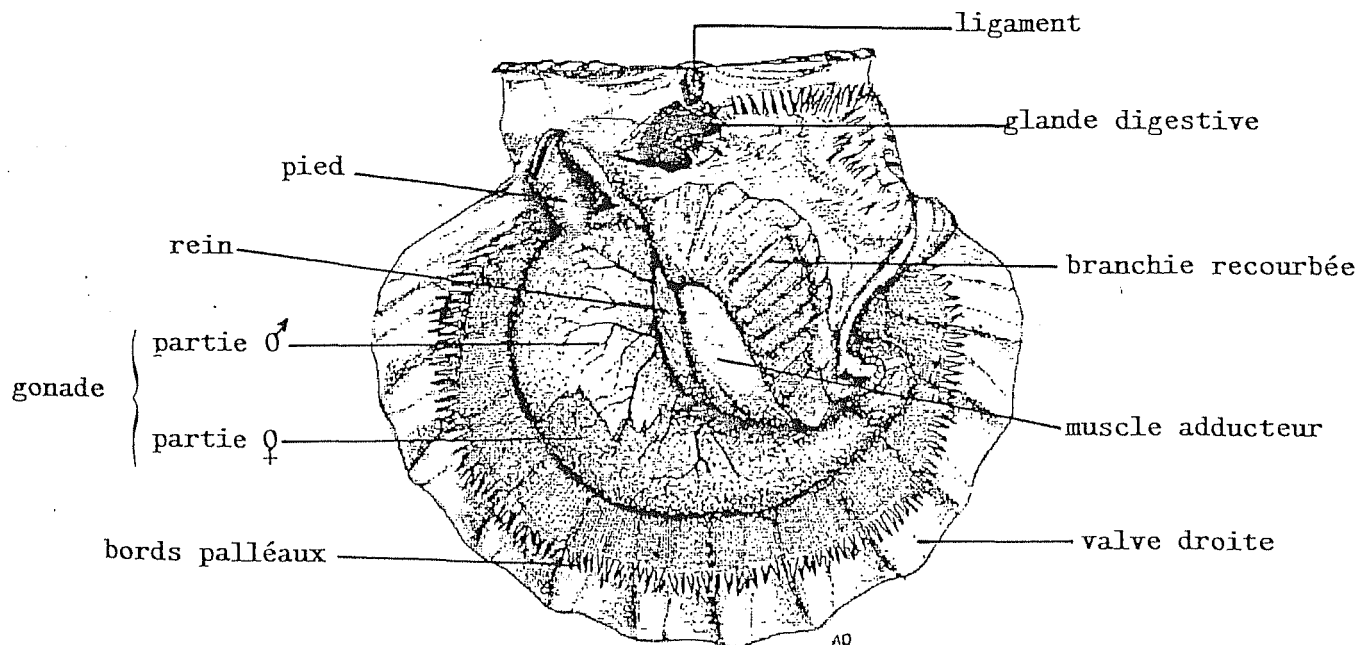


Figure 2 - Vue générale de *Pecten maximus*, valve gauche et lobe du manteau enlevés.







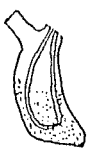
STADE	ASPECT MACROSCOPIQUE (d'après MASON, 1958)		CYCLE ANNUEL																				
			J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D									
I		.Gonade plate et angulaire. .Sexes mâle et femelle non différentiables à l'oeil nu. .Intestin visible.																					
II		.Gonade en croissance, plate et angulaire. .Sexes mâle et femelle différentiables (mâle : blanc ; femelle : saumon à orange). .Intestin toujours visible.																					
III		.Gonade plus large et plus épaisse, encore angulaire. .Couleur des sexes mâle et femelle plus prononcée. .Intestin encore visible. .Acini espacés.																					
IV		.Gonade encore plus épaisse, moins angulaire. .Intestin toujours visible dans la partie mâle, invisible dans la partie femelle. (possibilité de ponte en août seulement).																					
V		.Gonade encore plus large et plus épaisse, ferme, arrondie, de couleur vive. .Partie mâle blanchâtre, partie femelle rose à orange. .Intestin invisible. .Acini plus serrés.																					
VI		.Gonade à son maximum de taille, ferme, très colorée. .Acini très compacts ; partie mâle crème, partie femelle généralement orange.																					
VII		.La ponte partielle ou totale a eu lieu. .Gonade affaissée, flasque. .Intestin de nouveau visible. .Aspect équivalent à celui de II à III.																					

Figure 3 - Evolution macroscopique de la gonade de *Pecten maximus* adulte en fonction du cycle sexuel (baie de St-Brieuc) en 1986.

P : possibilité de ponte.

Observée sur coupes transversales en microscopie photonique et en M.E.B. (pl. 2 : 1 ; pl. 3 : 1 ; pl. 4 : 1 à 4 ; pl. 5 : 1 ; pl. 6 : 1), la glande génitale de *P. maximus* apparaît limitée par un tégument plus ou moins plissé selon la période de l'année, constitué d'un épithélium externe de revêtement reposant sur une lame basale qui le sépare du tissu conjonctif sous-jacent. Celui-ci s'infiltré parfois vers l'intérieur de la gonade sous forme de travées interstitielles. Sous ce tégument, et le long des travées conjonctives, on peut observer des lacunes qui correspondent aux sinus hémolymphatiques (pl. 3 : 2 ; pl. 6 : 1 ; pl. 10 : 2). De place en place, des faisceaux de fibres musculaires relient transversalement les faces opposées de la gonade (pl. 2 : 1).

Dans cette glande acineuse en grappes, le tissu interstitiel est réduit ; ce sont les acini eux-mêmes qui occupent la majeure partie de l'espace, quelle que soit l'époque du cycle sexuel (pl. 2 : 1 à 5). Ils s'ouvrent sur des conduits évacuateurs dont la lumière est limitée par un épithélium cilié (pl. 2 : 1-2 ; pl. 9 ; pl. 10 : 1-2). Ces conduits fusionnent en deux gonoductes principaux qui pénètrent dans les reins. L'intestin, qui décrit une boucle dans la glande génitale, est aisément différenciable sur les coupes (pl. 25 : 4) par son épithélium prismatique constitué, selon les zones, de cellules ciliées plus ou moins hautes.

A l'heure actuelle, les études ultrastructurales sur l'environnement des gamètes de Pectinidae se résument aux travaux de Motavkine et Varaksine (1983) sur le tégument et le système vasculaire gonadiques de *Patinopecten yessoensis*, de Lubet et al. (1987b) sur le gonoducte de *P. maximus* et de Dorange et al. (1989a) sur les tissus somatiques de la glande génitale de *P. maximus*. Les études histochimiques dans ce domaine sont encore plus limitées puisqu'elles ne sont qu'abordées par ces mêmes auteurs. Les références sont cependant plus nombreuses et plus complètes pour les bivalves à gonade diffuse, notamment la moule *Mytilus edulis* (Lubet, 1959 ; Herlin-Houtteville & Lubet, 1975 ; Lowe et al., 1982 ; Pipe, 1987b) et la palourde *Ruditapes philippinarum* (Medhioub & Lubet, 1988).

II - LE TEGUMENT

1. L'EPITHELIUM EXTERNE

1.1. Types cellulaires

En hiver, quand la glande génitale est vide, sa surface, examinée au M.E.B., apparaît fortement plissée (pl. 3 : 3). Entre les replis émergent, de place en place, des touffes de cils (pl. 3 : 5). La ciliature est nettement plus dense au voisinage du pied et sur le bord antérieur de la gonade que sur le bord postérieur accolé au muscle (pl. 3 : 6). A maturité, la surface de la gonade reste irrégulière, mais les replis sont moins nombreux et beaucoup moins profonds surtout dans la partie femelle (pl. 3 : 4). Par endroit, des globules de mucus en cours d'excrétion sont visibles en surface. On peut aussi noter la présence de bactéries disséminées sur toute la surface (pl. 3 : 6).

Observé sur coupes transversales, l'épithélium apparaît de type simple et cubique (pl. 4 : 1-3) dans la partie distale de la glande. Cependant, sa structure est plus complexe par endroits, notamment dans les zones plus plissées proches de la partie mâle ou dans cette zone même (pl. 4 : 2-4 ; pl. 6 : 1). Plusieurs assises cellulaires sont alors visibles au M.E.T..

Les assises basales de ce tissu épithélial pseudostratifié sont constituées de cellules au cytoplasme dense et au rapport nucléocytoplasmique élevé ; il s'agit probablement de cellules indifférenciées et de cellules de transit amoéboïdes (pl. 4 : 4).

Les cellules épithéliales superficielles de ces zones complexes, comme celles que l'on peut observer au niveau des zones simples, sont unies latéralement par diverses différenciations de leur membrane plasmique. Les surfaces membranaires elles-mêmes sont étroitement intriquées. A la partie apicale des cellules, les membranes montrent en outre des régions de jonctions serrées. Ces systèmes jonctionnels, tels que les définissent Lane (1978) et Boucaud-Camou (1980), sont constitués d'un court belt-desmosome auquel fait suite une longue jonction septée (pl. 4 : 5). Les jonctions septées entre les cellules épithéliales sont considérées comme un lieu privilégié de communications intercellulaires (Loewenstein & Kanno, 1964). Elles semblent caractéristiques des épithéliums d'invertébrés (Michel, 1969 ; Fain-Maurel & Cassier, 1969 ; Hollande, 1972 ; Boucaud-Camou, 1973 ; Donval-Hily, 1984).

Les cellules épithéliales sont différenciées en trois catégories : les cellules à microvillosités, les cellules ciliées et les mucocytes.

- Les cellules à microvillosités (pl. 4 : 3-4 ; pl. 5 : 1-2) constituent l'essentiel de l'épithélium. Leurs microvillosités, triangulaires en coupes transversales, sont longues de 1 à 2 μm . Elles sont reliées entre elles, à leur extrémité distale, par une trame fibrillaire sous laquelle s'observe un glycocalyx positif au bleu Alcian et à l'A.P.S.. A la base des microvilli, la membrane plasmique présente de nombreuses invaginations qui évoquent des phénomènes d'endocytose (pl. 5 : 3). Le noyau, riche en chromatine, ovoïde, en position moyenne ou basale, montre une hétérochromatine essentiellement marginale. Le cytoplasme contient de nombreuses vacuoles à contenu clair aux électrons. Celles-ci sont parfois volumineuses puisqu'elles peuvent atteindre 3 μm de diamètre. Les divers organites cytoplasmiques sont disséminés entre ces vacuoles : mitochondries, reticulum endoplasmique, appareil de Golgi ainsi que des petites vacuoles au contenu modérément contrasté et des inclusions denses dont certaines sont identifiées comme étant de nature lipidique (tabl. 6) et d'autres de type lysosomal.

- Les cellules ciliées, plus ou moins nombreuses selon les zones (pl. 3 : 5-6), ont un cytoplasme clair et un noyau moins contrasté que celui des cellules à microvillosités (pl. 4 : 4 ; pl. 5 : 4). A l'apex, elles sont aussi pourvues de microvillosités intercalées entre les cils. Des mitochondries de grande taille, des vésicules au contenu hétérogène, des inclusions denses de même type que celles des cellules à microvillosités sont abondamment réparties entre les racines ciliaires. Le reticulum endoplasmique et quatre à cinq dictyosomes sont également visibles au sein de leur cytoplasme.

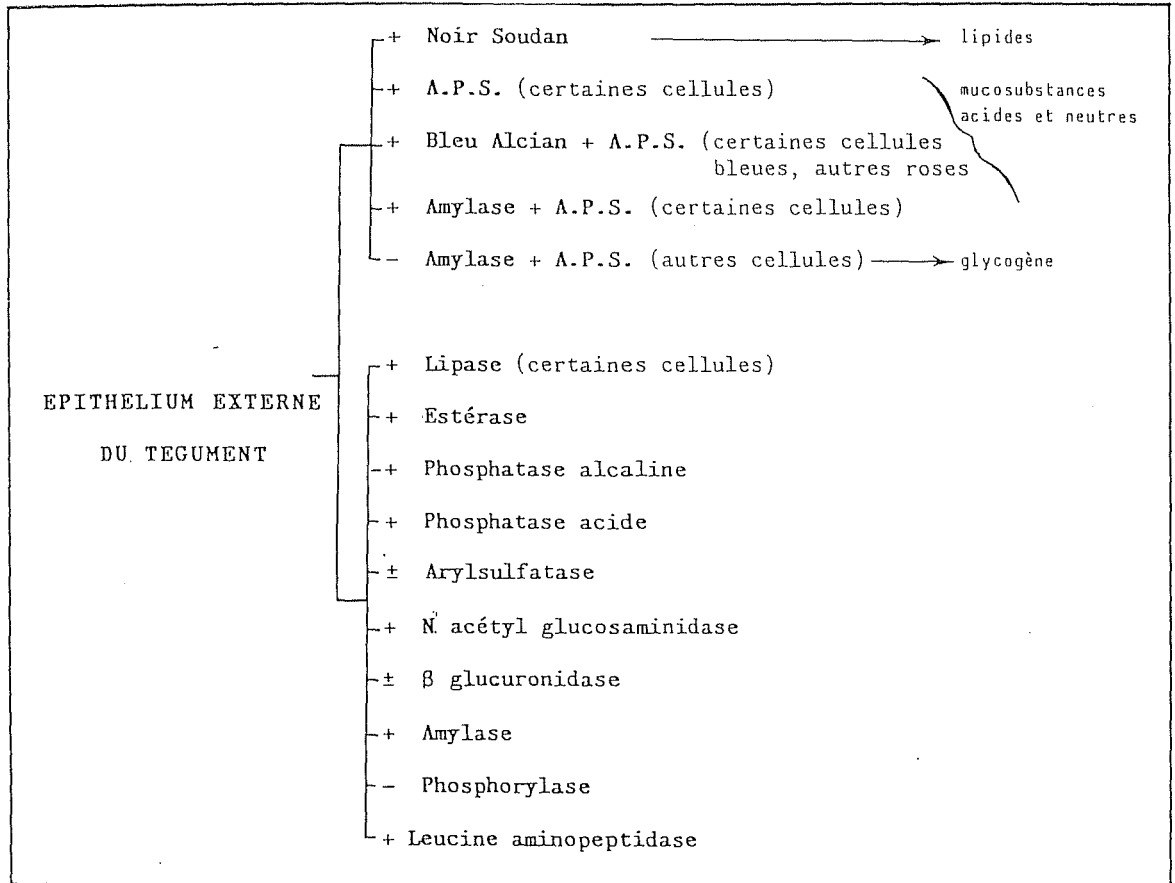
- Les mucocytes sont sporadiquement distribués entre les deux autres catégories de cellules. L'étude histochimique permet de les caractériser par leur réaction positive à l'A.P.S. et au bleu Alcian (tabl. 6). D'aspect caliciforme typique (pl. 5 : 5), ils sont parfois remplis de grains de mucus qui apparaissent au M.E.T. sous forme de grosses inclusions claires limitées par une membrane. Leur cytoplasme basal est riche en reticulum endoplasmique granuleux et en dictyosomes. Leur noyau est généralement basal. Des mitochondries et un saccule de reticulum endoplasmique sont parfois discernables entre les grains de mucus.

Ces diverses catégories cellulaires reposent sur une lame basale présentant par endroit de profondes indentations (pl. 7 : 1).

1.2. Caractéristiques histoenzymologiques

Les techniques histoenzymologiques mises en oeuvre ont permis la détection d'un certain nombre d'activités enzymatiques localisées au niveau de cet épithélium externe de la gonade. Les résultats sont réunis dans le tableau 6 et illustrés par la planche 6.

Tableau 6 - Caractéristiques histochimiques et histoenzymologiques de l'épithélium externe du tégument.



Il convient cependant d'assortir ces données de quelques réserves. En effet, les résultats histoenzymologiques doivent parfois être interprétés avec précaution en raison d'une spécificité discutable de certains substrats (voir notamment Boucaud-Camou, 1973 et Donval-Hily, 1984), ou de problèmes concernant la localisation de l'activité enzymatique.

Dans le cas de la détection de la leucine-aminopeptidase, le substrat utilisé, la leucine β naphtylamide, n'est pas spécifique de cette enzyme, mais peut aussi être hydrolysé par d'autres endopeptidases et par des aminopeptidases (Patterson et al., 1961 ; Sylven & Bois, 1962, 1963). Pour le même type de raisons, l'activité histochimique des estérases non spécifiques n'est pas facile à distinguer de celle des lipases (Lison, 1960 ; Gabe, 1968 ; Pearse, 1972). La gamme d'action de ces catégories



d'enzymes est en effet assez étendue. Ainsi les estérases agissent-elles préférentiellement sur les esters d'acides gras à courte chaîne (C2-C4), mais certaines hydrolysent aussi, quoique lentement, des acides gras à longue chaîne (C8 et plus) (Pearse, 1972). De même, les lipases dégradent surtout les acides gras à longue chaîne (Pearse, 1972), mais elles peuvent également agir sur des esters aromatiques ainsi que sur des esters aliphatiques à chaîne courte. Par ailleurs, la méthode de détection de l'amylase est peu précise. Elle ne permet pas de localiser nettement le site enzymatique, car des phénomènes de diffusion peuvent accroître la surface hydrolysée.

Compte-tenu des réserves précédentes, il est possible de dégager les constatations suivantes :

. L'épithélium du tégument apparaît comme le siège d'activités enzymatiques variées. Il possède diverses hydrolases dont certaines sont impliquées dans les processus de dégradation de composés glucidiques, protéiques et lipidiques. Mais d'autres enzymes que celles qui ont été spécifiquement recherchées sont susceptibles d'y être présentes. Le site d'action des enzymes détectées est intracellulaire ; l'amylase fait exception, son activité paraissant au moins partiellement extracellulaire.

. La présence de lipases et d'estérases témoigne d'une activité lipolytique des cellules épithéliales. Si l'activité estérasique concerne l'ensemble des cellules, l'activité lipasique est plus sporadique.

. L'épithélium est apte à exercer une activité aminopeptidasique catalysant la rupture des liaisons $-CO-NH-$. Etant donné le manque de spécificité du substrat utilisé, des endopeptidases de type cathepsine, ou diverses amino-peptidases peuvent être concernées (Pearse, 1972).

. La recherche des glucosidases a abouti à une réaction faiblement positive pour la N acétyl glucosaminidase et la β glucuronidase, beaucoup plus nette pour l'amylase. La première dégrade, en sucres simples, les oligosaccharides produits par action de polysaccharidases sur des chaînes polysaccharidiques (Pearse, 1972). La seconde hydrolyse la liaison glycosidique de glucuronides porteurs d'un groupement carboxyle en 6 (Lison, 1960).

. Une autre enzyme lysosomale, l'arylsulfatase, a également été mise en évidence.

. Les phosphatases non spécifiques acide et alcaline sont aussi présentes au niveau de l'épithélium. Ces enzymes hydrolysent, à des pH différents, les monoesters de l'acide orthophosphorique. La phosphatase acide est localisée dans les lysosomes pour lesquels elle sert de marqueur cytochimique. La phosphatase alcaline est associée à la membrane plasmique (Cvancara & Huang, 1978). Elle serait impliquée dans les processus actifs de transport membranaire (Posen, 1967).

2. LE TISSU SOUS-EPITHELIAL PERIGONADIQUE

Comme les autres tissus de la gonade, les assises tégumentaires sous-jacentes à l'épithélium gonadique ont fait l'objet de tests enzymologiques. Les quelques foyers réactifs correspondent selon toute vraisemblance à l'emplacement des hémocytes ; ces résultats seront donc exposés dans le paragraphe consacré à l'hémolymphe et à ses éléments figurés. Seule la description structurale du tissu sous-épithélial périgonadique est traitée ci-après.

Il s'agit d'un tissu épais (30-40 μ m) et complexe (pl. 4 : 1-2 ; pl. 6 : 1). Il est constitué d'un matériel fibrillaire abondant, correspondant essentiellement à des fibres de collagène dépourvues de striation transversale, sans orientation préférentielle, mais parfois

regroupées en faisceaux (pl. 7 : 1). Des fibres de réticuline sont mises en évidence par imprégnation argentique. En revanche, les fibres élastiques paraissent absentes (coloration à l'orcéine). Au sein de ce matériel fibrillaire, on observe de nombreuses enclaves de grains denses dont la nature est actuellement indéterminée (pl. 7 : 1). Ces grains denses sont fréquents notamment à proximité de la basale. Diverses catégories cellulaires ont pu y être régulièrement discernées :

- Fibroblastes

Ils sont bien représentés dans ce tissu conjonctif périgonadique. Leur noyau est parfois allongé, ovale (pl. 7 : 2) ou nettement irrégulier. Dans certains cas, un gros nucléole est visible. La chromatine se présente en amas épars et sous forme d'un liseré périphérique. Le cytoplasme est plus ou moins abondant, vraisemblablement en fonction du degré de différenciation des cellules. Dans les fibrocytes, il est réduit à une mince lame qui s'étend dans les prolongements cellulaires. Des vacuoles de reticulum lisse, quelques profils de reticulum granuleux et des mitochondries éparses peuvent y être observés.

- Hémocytes

Ce sont des cellules polymorphes (pl. 7 : 3), au faible rapport nucléocytoplasmique. Souvent dissymétriques, ils présentent d'un côté un cytoplasme dense et des expansions cytoplasmiques plus ou moins longues, de l'autre, un cytoplasme envahi de vésicules de reticulum lisse entre lesquelles des inclusions denses hétérogènes sont parfois discernables.

Leur noyau, de forme variable, est petit, sombre, et possède une chromatine très mottée. Les caractéristiques structurales de ces cellules correspondent à celles des hémocytes de type II, tels que les définit Auffret (1985) dans l'hémolymphe de *P. maximus*. Ces cellules sont surtout observées près de l'épithélium, ainsi qu'à proximité des acini ou des sinus hémolympatiques.

- Cellules musculaires

Les cellules musculaires sont fréquentes et se présentent soit de manière dispersée, soit groupées en faisceaux (pl. 4 : 1). Qu'elles soient étirées ou non, elles s'amenuisent vers leurs extrémités. Leur longueur est variable. Leur largeur est de l'ordre de 2 μ m dans la région renflée du noyau. Ce dernier n'a pas une position fixe. Il présente généralement des contours irréguliers, parfois profondément échancrés, et une chromatine abondante en périphérie (pl. 7 : 4). Les myofibrilles occupent la majeure partie du cytoplasme. Les organites cellulaires, des mitochondries notamment, sont essentiellement concentrés dans le péricaryon. Il est cependant possible d'observer des vacuoles et des mitochondries disséminées le long du sarcolemme. La membrane plasmique ne montre pas ces invaginations de type pinocytaire si caractéristiques des myocytes des mammifères.

- Cellules nerveuses

Des profils axonaux (pl. 7 : 4-5) sont souvent visibles à proximité de la membrane plasmique de ces cellules musculaires, la touchant presque, sans qu'une relation synaptique soit, semble-t-il, établie. Les extrémités axonales sont remplies de vésicules de sécrétion, variables en densité et en taille (80 à 160 nm de diamètre). Des mitochondries sont également présentes au niveau de ces terminaisons nerveuses.

III - LE TISSU CONJONCTIF INTERSTITIEL ET LES SINUS HEMOLYMPHATIQUES

1. LE TISSU CONJONCTIF INTERSTITIEL

Le tissu conjonctif interstitiel présente les mêmes types de fibres et de cellules que le tissu sous-épithélial périgonadique. On y observe en outre de volumineuses cellules, rondes ou ovales, mesurant environ 10 à 15 μm de diamètre (pl. 8 : 1-2). Quelques-unes, allongées, peuvent atteindre 30 μm de long. Elles sont surtout abondantes en période hivernale, notamment dans la partie mâle de la gonade. Ce type cellulaire est aussi présent sous le tissu conjonctif du tégument de la glande génitale ou des conduits évacuateurs, et dans les lacunes hémolymphatiques où elles adhèrent largement à la lame basale.

Sur coupes en paraffine ou semi-fines, elles sont repérables par leur aspect vacuolaire, par la présence d'un ou de plusieurs globules cytoplasmiques et par leur noyau excentré (pl. 8 : 1 ; pl. 19 : 1). En microscopie électronique, la membrane plasmique de ces cellules présente d'innombrables invaginations dont les points de départ sont soulignés, de part et d'autre, par une densification de la membrane elle-même. L'ensemble montre un aspect plissé et pointillé caractéristique (pl. 8 : 3-4). L'extrémité interne des digitations est parfois renflée et échinulée, ce qui pourrait s'expliquer par la formation de vacuoles d'endocytose ou d'exocytose ; des vacuoles semblablement échinulées sont en effet abondantes à proximité de la surface cellulaire, dans le prolongement des invaginations (pl. 8 : 4).

Les globules cytoplasmiques discernables en microscopie photonique apparaissent au M.E.T. (pl. 8 : 2) comme des inclusions osmiophiles de type lipidique ou s'apparentant à des corps résiduels. Leur taille, variable, peut atteindre 6 μm de diamètre. L'aspect des cellules varie selon l'époque du prélèvement. Tantôt les cellules paraissent presque vides, présentant de grandes plages claires et des vacuoles volumineuses.

Tantôt le reticulum lisse et l'appareil de Golgi sont très développés ; les mitochondries sont alors abondantes et polymorphes. Dans tous les cas des globules osmiophiles sont présents. Le noyau, en général excentré, est rond ou ovale. Il mesure environ 3 μm dans sa plus grande dimension. Son aspect est variable, mais il possède généralement une chromatine dense en périphérie. De rares cellules binucléées ont été observées.

L'aspect et l'épaisseur de ce tissu conjonctif interstitiel varie en fonction de la période du prélèvement. En hiver, quand la gonade est vide, le tissu interstitiel est épais, oedémateux (pl. 2 : 1 à 3), et ses contours sont très plissés (pl. 8 : 5). Dans les gonades matures, en revanche, il est fin et presque rectiligne (pl. 2 : 4-5 ; pl. 8 : 6).

2. LES SINUS HEMOLYMPHATIQUES ET LES HEMOCYTES

Aisément discernables à l'oeil nu sous le tégument transparent des gonades matures (pl. 1 : 5-6), les sinus de l'hémolymphe courent sous le tissu conjonctif périgonadique, le long des travées interstitielles, ainsi qu'à la périphérie des gonoductes (pl. 3 : 2 ; pl. 6 : 1 ; pl. 10 : 2 et pl. 11 : 1) et de l'intestin.

Dans ces sinus, les deux types morphologiques d'hémocytes décrits par Auffret (1985) ont été retrouvés. Les plus fréquents sont les hémocytes de type II (pl. 11 : 1) déjà décrits dans le tissu épithélial périgonadique. Plus rares sont les hémocytes de type I (pl. 11 : 1) qui mesurent de l'ordre de 8 μm dans leur plus grande dimension. Leur cytoplasme est abondant et renferme des mitochondries éparses, quelques citernes de reticulum granuleux, de nombreuses vésicules de reticulum lisse et des vacuoles de taille et de forme variables, au contenu plus ou moins dense. Leur noyau, d'environ 5 μm , est de forme irrégulière. Plus clair que celui des hémocytes II, il possède un liseré périphérique discontinu de chromatine et de petits amas chromatinien. Les contours cellulaires, bien qu'irréguliers, ne présentent que de courts prolongements.

En outre, les volumineuses cellules vacuolaires, déjà décrites à propos du tissu conjonctif interstitiel, ont été observées dans les sinus hémolymphatiques, notamment sous le tégument et les conduits évacuateurs, toujours fixées à la lame basale (pl. 11 : 1), ce qui laisse supposer qu'il ne s'agit pas de cellules circulantes.

Quelques hydrolases ont été détectées dans ces hémocytes (tabl. 7).

Tableau 7 - Caractéristiques histochimiques et histoenzymologiques des macrophages.

CELLULES MACROPHAGIQUES (tissu sous-épithélial tégumentaire, tissu interstitiel, acini en hiver, sinus hémolymp- hatiques)	+	Lipase
	+	Estérase
	+	Phosphatase alcaline
	+	Phosphatase acide
	+	Arylsulfatase
	+	N acétyl glucosaminidase
	+	β glucuronidase
	-	Amylase
	-	Phosphorylase
	+	Leucine aminopeptidase

IV - LES ACINI ET LES CONDUITS EVACUATEURS

1. LES ACINI

Les acini ont l'aspect classique d'ampoules s'ouvrant sur un conduit évacuateur (pl. 9). Leur diamètre, en période de maturité sexuelle, est de l'ordre de 400-500 μ m.

Sur leur pourtour, délimité par le tissu conjonctif interstitiel, on peut aisément discerner les gamètes, aux différents stades d'évolution selon les périodes de prélèvement (cf. Chap. III).

Des hémocytes libres à fonction macrophagique sont parfois présents dans la lumière des acini ainsi qu'à la jonction acinus-gonoducte (pl. 29 : 1 à 7), tant dans la partie mâle que femelle.

2. LES CONDUITS EVACUATEURS

Ils sont limités par un épithélium simple, prismatique, dont la hauteur varie selon les conduits (pl. 10 : 1-2). De l'ordre de 4 à 5 μm au départ des acini, elle peut atteindre 10-12 μm dans le cas des plus grands conduits, dont la surface est plissée (pl. 10 : 1).

Cet épithélium repose sur une lame basale plissée qui décrit de nombreuses circonvolutions à la jonction acinus-gonoducte puis présente, irrégulièrement, de multiples indentations (pl. 10 : 4).

Deux types de cellules épithéliales peuvent être différenciés : les cellules ciliées d'une part, catégorie largement prédominante (pl. 10 : 3), et quelques mucocytes d'autre part, révélés par la coloration bleu Alcian - A.P.S.. Ces cellules sont réunies, à leur partie apicale, par des complexes de jonction identiques à ceux décrits pour l'épithélium externe de la gonade, c'est-à-dire par un court belt-desmosome auquel fait suite un système de jonctions septées (pl. 10 : 5).

La partie apicale des cellules ciliées est bordée par de longs cils (7-8 μm pour les plus grands conduits) de structure classique. Neuf doublets de microtubules entourent un doublet central. Une membrane irrégulière les limite (pl. 11 : 2-3). A la base du cil, une cloison, ou septum, le sépare des corpuscules basaux ou cinétosomes sur lesquels sont fixées les racines ciliaires, à striation périodique transversale, qui s'enfoncent dans les cellules. Des microvillosités, d'aspect variable, alternent avec les cils : elles sont parfois presque droites mais peuvent aussi montrer des bords festonnés (pl. 11 : 2-3). Toujours à l'apex de la cellule, le cytoplasme est riche en mitochondries, en inclusions denses de type

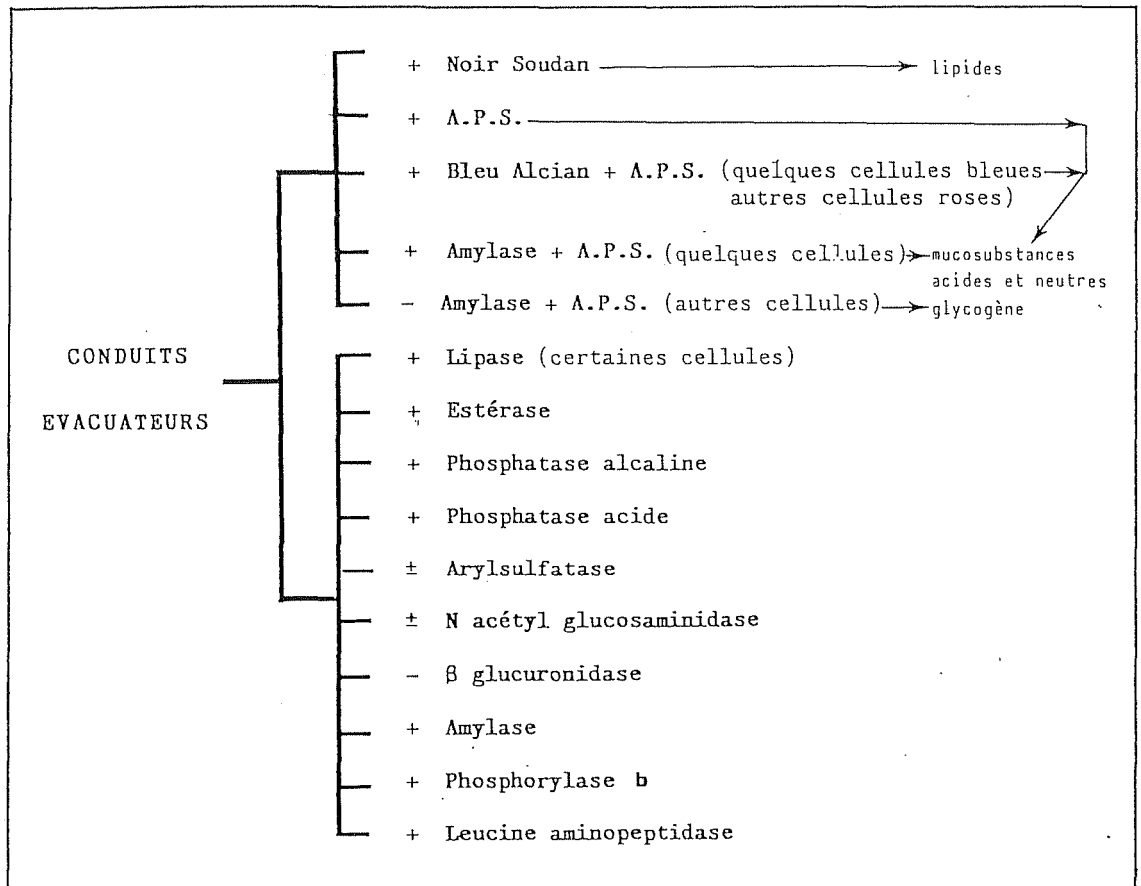
lysosomal ou de nature lipidique (tabl. 8) comme le montre la coloration au noir Soudan sur coupes à congélation. Des vacuoles, parfois assez grandes, peuvent être accolées à la membrane cellulaire (pl. 11 : 3). Du glycogène y a été localisé histochimiquement par la réaction à l'A.P.S. associée à un contrôle par digestion enzymatique à l'amylase (tabl. 8). Le contenu en glycogène, comme l'illustre la planche 12 : 1-2, est plus ou moins abondant selon l'état de maturité de la glande génitale. En hiver, quand la gonade est vide, il est peu abondant. En revanche, la réaction à l'A.P.S. est très positive en période de maturation sexuelle. L'étude au M.E.T. confirme ces observations (pl. 11 : 1 à 3).

Le noyau des cellules ciliées est généralement en position basale ; il est de forme variable, plutôt allongée, aux contours irréguliers. La chromatine est condensée en amas et liseré périphérique (pl. 10 : 3 ; pl. 11 : 1).

Les mucocytes (pl. 10 : 3) ne diffèrent ni dans leur structure ni dans leur disposition de ceux décrits pour l'épithélium externe de la gonade. Les cellules mucipares, chargées de grains de sécrétion, sont nettement plus fréquentes en période de maturation sexuelle qu'en hiver quand les gonades sont pratiquement vides.

Les résultats histoenzymologiques obtenus pour l'épithélium des gonoductes sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8 - Caractéristiques histochimiques et histoenzymologiques de l'épithélium des conduits évacuateurs.



A part la phosphorylase b, uniquement présente au niveau des conduits évacuateurs, les enzymes détectées sont les mêmes que celles de l'épithélium du tégument. La phosphorylase, en association avec la glycogène synthétase, régule le métabolisme du glycogène, catalysant *in vivo* sa dégradation (Krebs & Fisher, 1962 ; Leloir, 1967). Seule la forme b inactive a pu être détectée.

V - DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent que le tissu épithélial de recouvrement est susceptible d'exercer plusieurs fonctions :

- activité ciliaire,
- absorption,
- synthèse,
- digestion.

Par ses mouvements ciliaires, l'épithélium peut permettre la rétention et/ou la dispersion d'éléments particulaires, travaillant donc pour son propre compte ou pour d'autres organes. En effet, la situation de la gonade entre les branchies, laisse penser que les cellules ciliées de cette glande contribuent aux mouvements d'eau, sans doute dans des proportions mineures, et éventuellement à l'acheminement de particules vers les palpes labiaux. La plus grande fréquence de cils à proximité du pied et sur le bord antérieur de la gonade est peut-être un élément en faveur de cette hypothèse.

L'omniprésence des microvillosités à la partie apicale des cellules suggère que l'une des fonctions essentielles de cet épithélium a un rapport avec les phénomènes d'absorption. Une forte majorité des cellules épithéliales est en effet caractérisée par leur surface à microvilli. En outre, les cellules ciliées et les mucocytes eux-mêmes en sont également pourvus.

La présence de nombreuses vacuoles dans le cytoplasme traduit par ailleurs l'existence de phénomènes d'endocytose et/ou d'exocytose. De plus, une activité phosphatasique alcaline y est mise en évidence. Une telle fonction d'absorption est aussi envisagée chez *P. yessoensis* (Motavkine & Varaksine, 1983), et démontrée dans l'épithélium palléal de *Mytilus edulis* (Rice & Stephens, 1987) et dans l'épiderme de divers échinodermes (Bamford, 1982).

Toutes ces cellules épithéliales possèdent de nombreux organites cellulaires, y compris les cellules ciliées, ce qui peut être corrélé à l'activité mucosécrétoire des mucocytes, à l'activité ciliaire et à l'activité enzymatique générale de l'épithélium.

Outre les propriétés lubrifiantes et protectrices d'un épithélium en contact avec le milieu extérieur, le mucus synthétisé peut intervenir dans le captage de substances dissoutes ou de matériel particulaire en suspension.

Enfin, l'épithélium externe de la gonade est le siège de phénomènes de digestion, ce qu'atteste la présence de diverses hydrolases lysosomales (De Duve, 1969 ; Pearse, 1972 ; Mazliak, 1975 ; Dingle, 1977). Cette activité digestive peut correspondre à deux fonctions. Ce peut être une activité autonome de maintenance de l'épithélium lui-même ; mais il peut aussi s'agir d'une activité participant plus largement à la nutrition du mollusque, au bénéfice notamment des tissus sous-jacents. Si la première fonction paraît évidente (Lawrence, 1982), la seconde ne peut être écartée, divers arguments structuraux et histochimiques plaidant en sa faveur. Il s'agit notamment de la présence, dans les couches immédiatement sous-jacentes, de macrophages comportant certaines hydrolases, de l'existence de cellules de transit amoeboïdes entre les cellules épithéliales, de l'indentation ultrastructurale de la lame basale et de la proximité des sinus hémolympatiques. Une hypothèse du même type a déjà été émise dans le cas des échinodermes (Bamford, 1982). Elle mériterait d'être vérifiée par l'étude du catabolisme à l'aide de traceurs radioactifs.

Comme l'avait montré Lucas (1965) chez *Chlamys varia*, le tissu sous-jacent à l'épithélium gonadique de *P. maximus* est également de nature essentiellement conjonctive avec, en son sein, de nombreuses cellules musculaires disséminées ou regroupées en faisceaux. Le qualificatif de tissu musculo-conjonctif utilisé par Motavkine et Varaksine (1983) pour *P. yessoensis* peut donc aussi s'appliquer à la coquille saint-jacques. Il est vraisemblable que les myocytes, ceux du tissu sous-jacent à l'épithélium gonadique, comme ceux qui soulignent les conduits

évacuateurs, assistent les cellules ciliées des gonoductes lors de l'émission et de la dispersion des gamètes (Mason, 1958, 1983 ; Motavkine & Varaksine, 1983) ; ils sont d'ailleurs en contact avec des terminaisons axonales. Il est aussi possible qu'ils interviennent dans la circulation de l'hémolymphe.

Les hémocytes étudiés chez de nombreuses espèces de bivalves (par exemple Cheng & Foley, 1975 ; Cheng, 1975 chez *Mercenaria mercenaria* ; Rudell, 1971 chez *Crassostrea gigas* ; Feng et al., 1971, Cheng, 1975 ; Cheng & Rodrick, 1975 chez *Crassostrea virginica* ; Moore & Lowe, 1977 ; Rasmussen et al., 1985 chez *Mytilus edulis*) ont été décrits pour la première fois au plan ultrastructural chez *P. maximus* par Auffret (1985).

Hors des lacunes hémolympatiques, c'est-à-dire dans le tissu conjonctif, ce sont semble-t-il essentiellement des hémocytes de type II qui sont présents. Dans la lumière des acini et des gonoductes, il s'agit d'hémocytes à fonction macrophagique qui interviennent dans la résorption des débris cellulaires. Conformément aux travaux de Cheng (1975), Cheng et Rodrick (1975), Moore et Eble (1977), leur étude histochimique montre la présence de diverses enzymes lysosomales, ce qui leur permet de digérer les éléments qu'ils phagocytent.

Les volumineuses cellules vacuolaires du tissu conjonctif interstitiel et des lacunes hémolympatiques sont décrites pour la première fois chez *P. maximus*. Apparemment peu ou pas mobiles, elles se caractérisent par leurs globules denses et leur membrane plasmique très particulière. D'après leur aspect en microscopie photonique, elles pourraient s'apparenter aux globulocytes de *P. yessoensis* (Motavkine & Varaksine, 1983). Leurs caractéristiques ultrastructurales sont identiques à celles des "brown cells" de l'huître (Ruddell & Wellings, 1971).

Leur fonction reste à ce jour inconnue, mais aujourd'hui l'hypothèse la mieux étayée au plan ultrastructural est qu'il s'agit de cellules à fonction d'échanges. La surface échinulée des extrémités renflées de certaines digitations de la membrane plasmique évoque le revêtement de clathrine des puits et vacuoles d'endocytose (De Duve, 1987). Quoique

apparemment peu mobiles chez *P. maximus*, de telles cellules pourraient jouer un rôle trophique ; Motavkine et Varaksine (1983) l'envisagent d'ailleurs pour les globulocytes de *P. yessoensis* qu'ils considèrent comme des cellules polyfonctionnelles, mobiles, en provenance de l'intestin.

D'autres hypothèses ont cependant été envisagées à partir d'études entreprises sur l'huître *Crassostrea virginica* comme celle de l'intervention dans des processus de défense ou d'osmorégulation (Haigler, 1964). Certaines analogies de structure avec les cellules de Leydig pourraient enfin évoquer une intervention dans la régulation hormonale de la gamétogenèse.

En ce qui concerne les gonoductes, diverses observations faites au cours de ce travail incitent à penser qu'une certaine digestion des reliquats de la lyse ovocytaire se déroule à leur niveau, comme l'ont indiqué Lubet *et al.* (1987b) chez *P. maximus* et Pipe (1987a) chez *Mytilus edulis*. Les arguments dans ce sens sont, pour l'essentiel, les mêmes que ceux évoqués pour l'épithélium externe de la gonade.

- En premier lieu, les cellules ciliées possèdent une surface d'échange accrue par l'existence de microvillosités intercalées entre les cils. L'aspect variable de ces microvilli, associé à la présence de vacuoles proches de la membrane plasmique, traduit vraisemblablement l'intervention de phénomènes d'endocytose.
- De la phosphatase alcaline, enzyme associée aux tissus impliqués dans un transfert actif (Lawrence, 1982 ; Donval-Hily, 1984 ; Lubet *et al.*, 1987b), y a été détectée.
- Elles renferment l'équipement en hydrolases lysosomales nécessaire à une digestion intracellulaire. De l'amylase est aussi synthétisée.

- L'aspect ultrastructural des cellules épithéliales est variable, essentiellement en raison d'un contenu plus ou moins abondant en glycogène, selon le stade de maturation des produits sexuels. L'étude histochimique confirme cette variabilité.

- De la phosphorylase, enzyme intervenant dans le catabolisme du glycogène, a aussi pu être détectée.

Tous ces éléments histochimiques et ultrastructuraux étayent donc l'hypothèse d'une réabsorption de métabolites, de leur stockage sous forme de glycogène et d'une réutilisation de ce composé pour les besoins physiologiques des cellules épithéliales elles-mêmes ; une redistribution de nutriments aux tissus sous-jacents est également possible, d'autant que sa surface très plissée confère à la lame basale de l'épithélium une surface d'échange accrue.

CHAPITRE III

LA GAMETOGENESE

CHAPITRE III : LA GAMÉTOGÈSE

	pages
I - L'OVOGENESE	52
1. DONNEES ULTRASTRUCTURALES	52
1.1. Stade préméiotique	52
1.2. Stade prévitellogénique	52
1.3. Stade vitellogénique	53
2. DONNEES HISTOCHIMIQUES ET ENZYMOLOGIQUES	56
2.1. Données histochimiques	56
.L'enveloppe vitelline	
.Les inclusions cytoplasmiques	
2.2. Données enzymologiques	65
.Résultats des tests Api Zym	
.Résultats histoenzymologiques	
II - LA SPERMATOGENESE	68
1. LA SPERMATOGENESE NORMALE	69
1.1. Données ultrastructurales	69
1.1.1. Les gonies et les cellules auxiliaires	
1.1.2. Les spermatocytes	
1.1.3. Les spermatides	
1.1.4. Les spermatozoïdes	
1.2. Données histochimiques et histoenzymologiques	78
1.2.1. Données histochimiques	
1.2.2. Données histoenzymologiques	
2. LA SPERMATOGENESE ANORMALE	80
III - DISCUSSION	80

Plusieurs articles de synthèse traitent des modalités de la gamétogenèse chez les Mollusques (Raven, 1966 ; Lucas, 1971 ; Sastry, 1979 ; Dohmen, 1983). Chez les bivalves, les espèces étudiées, tant en microscopie photonique qu'électronique, appartiennent essentiellement à deux familles, les Ostreidae et les Mytilidae. Pour ce qui concerne les Pectinidae, on dispose de nombreuses études en microscopie photonique (Dakin, 1909 ; Tang, 1941 ; Coe, 1943 ; Mason, 1958, 1983 ; Lubet, 1959 ; Reddiah, 1962 ; Sastry, 1962, 1979 ; Lucas, 1965 ; Naidu, 1970 ; Allarakh, 1979 ; Lubet *et al.*, 1987 a et b), mais les observations ultrastructurales et histochimiques sont rares. Elles se résument, à notre connaissance, aux seuls travaux de Motvakine et Varaksine (1983) consacrés à l'ovogenèse et à la spermatogenèse de *Patinopecten yessoensis*, à ceux de Lubet *et al.* (1987 a et b) sur l'ovogenèse de *Pecten maximus*, de Dorange et Le Pennec (1989a et b), de Dorange *et al.* (1989b) sur l'ovogenèse et la spermatogenèse de *P. maximus* et, dans une moindre mesure, à ceux de Anderson et Personne (1970a et b, 1976) qui font référence à la présence de glycogène dans le spermatozoïde de *P. maximus*. Une brève description des gamètes de *Chlamys hastata* en microscopie à balayage est également donnée par Hodgson et Burke (1988).

Les recherches ultrastructurales et histochimiques entreprises sur la gamétogenèse de *P. maximus* visent à mieux comprendre les mécanismes concourant à l'élaboration des cellules sexuelles. Il s'agit donc, dans ce chapitre, de décrire l'évolution ultrastructurale des lignées germinales mâle et femelle et d'apporter quelques précisions histo-chimiques et structurales sur les gamètes matures de *P. maximus*.

Cette étude est complétée par la présentation d'une spermatogenèse anormale.

I - L'OVOGENESE

Divers chercheurs ont mis en évidence la participation de cellules somatiques auxiliaires dans la gamétogenèse des bivalves. De telles cellules ont été décrites chez les Teredinidae, les Mytilidae, les Myidae (Coe, 1943 ; Pipe, 1987a). Bien qu'elles aient été également observées en microscopie photonique (Coe, 1943 ; Mason, 1958, 1983 ; Giese et Pearse, 1979) chez *P. maximus*, leur participation active dans la gamétogenèse n'était pas connue à ce jour, ni leur organisation ultrastructurale. Leur évolution sera décrite parallèlement à celle des gamètes.

1. DONNEES ULTRASTRUCTURALES

1.1. Stade préméiotique

Les ovogonies primaires sont des cellules allongées qui mesurent de 6 à 8 μm de long sur 3 à 5 μm de large, et dont le rapport nucléocytoplasmique est élevé (pl. 13 : 1). Leur chromatine est condensée en petits amas et sous forme d'un fin liseré périphérique. Un nucléole est parfois visible. Par mitose, elles donnent naissance à des ovogonies secondaires, de taille et de structure analogues (pl. 13 : 2), qui entrent en méiose pour évoluer en ovocytes.

1.2. Stade prévitellogénique

Aux stades leptotène, zygotène-pachytène, et début du diplotène, les jeunes ovocytes sont identifiables à l'aspect ultrastructural du noyau. Dès le stade pachytène-diplotène, on constate leur association intime à des cellules somatiques auxiliaires.

- Au stade zygotène-pachytène, caractérisé par les complexes synaptonémaux (pl. 13 : 3-4), les ovocytes, ronds ou ovoïdes, atteignent une taille de 10 à 15 μm . Leur cytoplasme s'est enrichi en ribosomes et en mitochondries souvent allongées. Quelques saccules de reticulum endoplasmique et quelques vacuoles peuvent y être observés.

- Au début du stade diplotène, la cellule germinale, adhérant largement au tissu interstitiel sous-jacent, s'allonge. Au sein du noyau, le nucléole, parfois en anneau (pl. 13 : 5), réapparaît en position souvent excentrée. La chromatine se disperse progressivement. Simultanément, des agrégats denses, constitués de sous-unités de taille variable et dépourvues de membrane, s'accumulent dans le cytoplasme (pl. 13 : 6 et encart). Divers auteurs (Raven, 1966 ; Ubbels, 1968 ; Silberzahn, 1979 ; Kessel, 1982 ; Dohmen, 1983 ; Albertini, 1985) interprètent ces agrégats comme des extrusions nucléolaires riches en ribonucléoprotéines. L'enveloppe nucléaire est alors percée de pores. Dans le cytoplasme, les organites cellulaires déjà présents se multiplient. Un dictyosome peut être observé.

Au stade pachytène-diplotène, des cellules auxiliaires, de 5 à 7 μm de long sur 2 à 3 μm de large, migrent depuis la périphérie des acini (pl. 13 : 4-5) et s'accolent étroitement aux ovocytes. En s'étirant, elles développent des expansions de type pseudopodial. Leur noyau possède une euchromatine dense et une hétérochromatine condensée en quelques amas et à la périphérie du noyau. Elles montrent parfois un gros nucléole (pl. 13 : 5). Le cytoplasme de ces cellules peut contenir des inclusions denses de type lysosomal (pl. 13 : 5).

1.3. Stade vitellogénique

Bloqués au stade diplotène de la première division de méiose, les ovocytes entrent en vitellogenèse. Leur taille s'accroît pour atteindre 65 à 70 μm en fin de maturation. Ils acquièrent peu à peu une forme pédonculée et sont le siège de diverses modifications nucléaires,

cytoplasmiques et membranaires ; on assiste en particulier à la prolifération des organites cellulaires. Puis les gamètes se détachent de la paroi de l'acinus et s'individualisent.

- Lorsque l'ovocyte atteint environ 25 μm de longueur (pl. 14 : 1), et alors qu'il est encore largement adhérent au tissu conjonctif sous-jacent, un premier type de grains de sécrétion (I) apparaît dans le cytoplasme. Il s'agit d'inclusions moyennement denses, limitées par une membrane ondulée et présentant sur les coupes, soit une forme régulièrement arrondie, soit un profil en raquette (pl. 14 : 3). Leur contenu granulaire s'opacifie progressivement (pl. 14 : 1). Ils se forment près des mitochondries, du reticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Des formes de transition sont fréquemment visibles à proximité de la face de maturation des dictyosomes (pl. 14 : 2). Ce sont ces grains de sécrétion qui, à terme, vont devenir les granules corticaux, abondants en périphérie de l'ovocyte en fin de vitellogenèse et qui vont participer à l'élaboration d'une membrane de fécondation (pl. 31 : 5-6). A ce stade, le noyau mesure 12 à 15 μm et renferme un volumineux nucléole (6 μm) qui présente une zone très dense (pl. 14 : 1).

- Dans l'ovocyte plus âgé, où les granules corticaux sont déjà abondants, la prolifération de l'appareil de Golgi se poursuit, puisque trois à quatre dictyosomes sont visibles. Il y a une intense production de reticulum endoplasmique vésiculaire et lamellaire ; deux à trois empilements juxtanucléaires de reticulum granuleux sont souvent observables. On constate alors la formation de deux autres catégories d'inclusions vitellines qui, par leur évolution et leur multiplication, vont constituer les réserves vitellines (pl. 14 : 5). Elles diffèrent les unes des autres par leur taille, leur forme et leur osmiophilie. Les unes (inclusions II), petites et rondes, plus denses au centre que sur les pourtours, sont dépourvues de membrane limitante. Les autres (inclusions III), plus volumineuses et de forme irrégulière, sont parfois entourées de profils de reticulum endoplasmique. L'identité chimique de ces deux types d'inclusion, ainsi que celle des granules corticaux, est discutée au paragraphe suivant.

Des figures d'endocytose ont pu être observées dans les cellules germinales au niveau de la zone d'adhérence de la cellule auxiliaire sur l'ovocyte (pl. 15 : 2-3).

A ce stade, les cellules auxiliaires accolées aux ovocytes (pl. 14 : 5 ; pl. 15 : 1) se sont développées et modifiées (pl. 14 : 5 ; pl. 15 : 4). L'abondant reticulum qu'elles ont notamment acquis constitue leur caractéristique structurale essentielle et témoigne d'une activité protéosynthétique intense. En outre, plusieurs mitochondries, des vésicules de reticulum lisse, un dictyosome (pl. 15 : 5), du glycogène sous forme α , des ribosomes et des inclusions de type lipidique sont présents dans le cytoplasme.

- Lors de la phase d'individualisation de l'ovocyte, la membrane plasmique se transforme. Elle émet des microvilli qui sont rapidement enrobés dans une matrice fibrillaire de glycocalyx (pl. 15 : 6), comme le confirment les colorations A.P.S. et bleu Alcian (tabl. 9), constituant ainsi l'enveloppe vitelline. A la base des microvilli, des échancrures longues et fines sont parfois visibles. L'enveloppe vitelline se forme à partir de la périphérie de la cellule auxiliaire (pl. 15 : 6-7) et progresse de manière concentrique sur toute la surface de l'ovocyte. On constate alors que les deux cellules ont établi entre elles un système jonctionnel de type "*zonula adherens*" (pl. 15 : 6-7-8). De volumineuses vacuoles au contenu fibrillaire sont visibles dans les cellules auxiliaires, à proximité de la zone d'adhérence (pl. 15 : 7). Tandis que l'enveloppe vitelline contourne progressivement l'ovocyte en cours d'individualisation, la cellule auxiliaire conserve temporairement d'étroits contacts avec le gamète pendant toute la durée de la vitellogenèse, puis elle s'en sépare. Son cytoplasme, chargé de grains denses, se vacuolise (pl. 16 : 1) et des figures myéliniques sont parfois visibles.

En fin de vitellogenèse (pl. 16 : 2), le gamète femelle s'est individualisé. L'ovocyte mesure 65 à 70 μm de diamètre. Déformé par tassement dans les gonades matures (pl. 16 : 3), il apparaît fréquemment polyédrique au centre de l'acinus. Il est pourvu d'une enveloppe vitelline

épaisse (5 à 6 μm) qui se décolle légèrement de sa surface, ménageant ainsi un mince espace périvitellin (pl. 16 : 2). Des microfilaments sont visibles au contact des microvilli (pl. 16 : 7). Les granules corticaux (I) sont très nombreux à la périphérie du gamète. Les réserves vitellines II et III abondent dans le cytoplasme (pl. 16 : 2-4). Des inclusions glycogéniques (inclusions IV) sont présentes sous forme de particules β de 30 nm et de leurs sous-unités (cf. paragraphe 2.1. ci-après). Ponctuellement, des lamelles annelées typiques, dont la signification fonctionnelle n'est pas précisément connue, ont pu être observées (pl. 16 : 6). La vésicule germinale présente des contours irréguliers et une chromatine finement grenue (pl. 16 : 2). Les pores nucléaires sont nombreux (pl. 16 : 5).

Ces divers stades d'évolution des cellules germinales femelles sont schématisés sur la figure 4.

2. DONNEES HISTOCHIMIQUES ET ENZYMOLOGIQUES

2.1. Données histochimiques

Les techniques histochimiques associées aux observations de cytochimie ultrastructurale (tentatives de digestion enzymatique, extraction par solvant, réaction de Thiery) permettent d'apporter quelques précisions sur certains constituants des ovocytes, et en particulier sur l'identité chimique des granules corticaux I et des inclusions vitellines II, III et IV.

- L'enveloppe vitelline

Les réactions A.P.S. et bleu Alcian associées aux différents contrôles (tabl. 9 et fig. 5) trahissent, dans l'enveloppe vitelline, la présence de glycoprotéines et de mucosubstances acides enrobant les microvillosités de la membrane plasmique.

Figure 4 - L'ovogenèse chez *Pecten maximus*.

g : gonie - ca : cellule auxiliaire - ov : ovocyte.

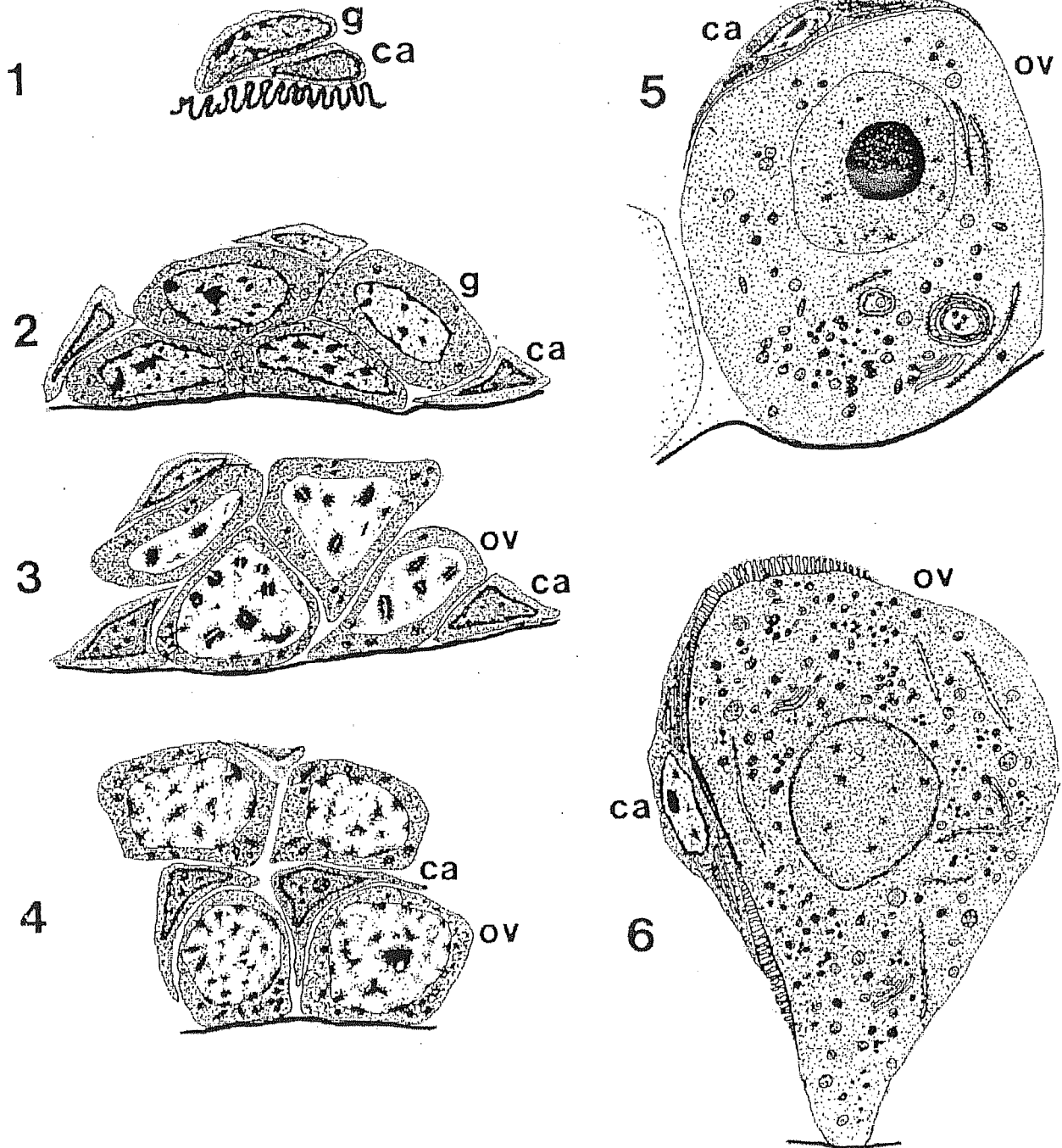
1 et 2 : Stade préméiotique.

3 : Ovocytes prévitellogéniques au stade zygotène-pachytène.

4 : Ovocytes prévitellogéniques au stade diplotène.

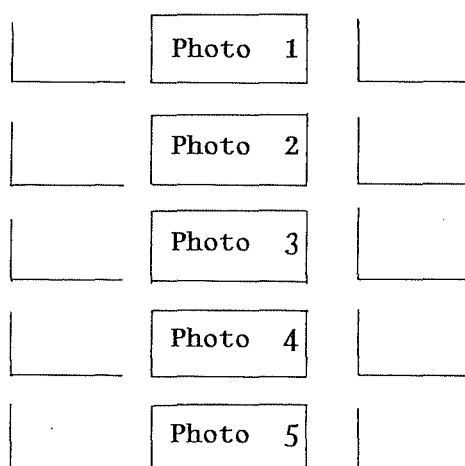
5 : Ovocyte en début de vitellogenèse.

6 : Ovocyte vitellogénique pédonculé :
élaboration de l'enveloppe vitelline.



- LEGENDE DE LA FIGURE 5 -

Pour les échantillons 1 et 2, prélevés à la même époque, les graphes représentent le taux d'occupation (en pourcentage) ou indice d'abondance des composés positifs à la réaction à l'acide periodique - Schiff (A.P.S.). Après numérisation de l'image, un seuillage permet de dénombrer les points images superposés aux composés A.P.S.+. Le nombre de points sélectionnés est rapporté au nombre de points constituant l'image, ce qui permet de calculer un indice d'abondance et d'évaluer l'intensité de la réaction A.P.S.



Echelle : 25 μ m

- Photo 1** - Réponse positive de l'ovocyte à la réaction A.P.S.
- Photo 2** - Composés ovocytaires A.P.S. positifs après acétylation : glycoprotéines au niveau d'inclusions cytoplasmiques et de l'enveloppe vitelline.
- Photo 3** - Composés A.P.S. positifs après digestion enzymatique à l'amylase : le glycogène a disparu ; il reste les glycoprotéines et les mucosubstances acides de l'enveloppe vitelline.
- Photo 4** - Composés A.P.S. positifs après extraction des lipides : l'intensité de coloration est équivalente à la réaction 1.
- Photo 5** - Composés A.P.S. positifs après digestion à la protéinase : il reste essentiellement le glycogène.

Effectif : nombre de champs images.

FIGURE 5 - TENTATIVE PRÉLIMINAIRE DE QUANTIFICATION DE RÉACTIONS HISTOCHIMIQUES PAR ANALYSE D'IMAGES.

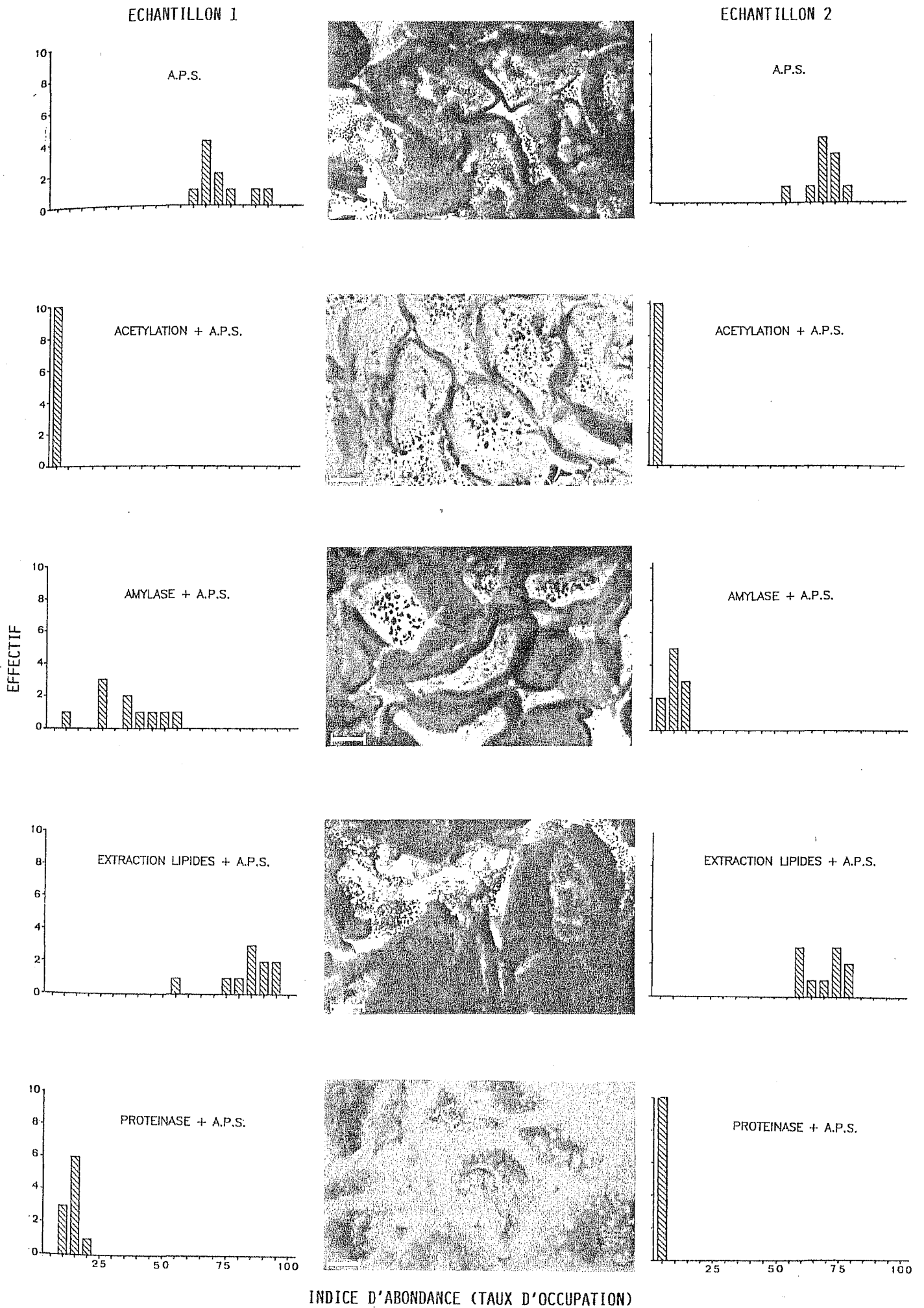


Tableau 9 - Démarche d'identification de la nature chimique de l'enveloppe vitelline.

ENVELOPPE VITELLINE	A.P.S.	<i>rose</i>	} GLUCIDES MUCOSUBSTANCES NEUTRES
	Acétylation + A.P.S.	<i>rose très clair</i>	
	Acétylation + Saponification + A.P.S.	<i>rose</i>	
	Bleu Alcian	<i>bleue</i>	} COEXISTENCE DE MUCOSUBSTANCES ACIDES ET NEUTRES
	Bleu Alcian + A.P.S.	<i>pourpre</i>	
	Trypsine + Bleu Alcian + A.P.S.	<i>bleue</i>	} MUCOSUBSTANCES NEUTRES = Glycoprotéines

- Les inclusions cytoplasmiques

.Les granules corticaux I

Les colorations au jaune naphthol et au "fast green" appliquées sur les coupes à congélation révèlent dans le cytoplasme de l'ovocyte la présence de protéines basiques, voire très basiques. La réaction au ponceau de xylidine, effectuée sur coupes semi-fines (pl. 17 : 1), permet de préciser la localisation de certaines au moins de ces protéines basiques dans des globules plus abondants en périphérie de l'ovocyte, ce qui correspond bien à la distribution des granules corticaux.

La nature protéinique de ces inclusions est alors confirmée sur coupes ultra-fines par des tentatives de digestion à la pepsine et à la protéinase : infructueuses au bout d'une heure de traitement, ces réactions se sont révélées positives à l'issue de six heures, le contenu des granules corticaux étant seul entièrement digéré (pl. 17 : 2). La possibilité d'une nature glycoprotéique de ces inclusions paraît pouvoir être écartée par l'absence de réaction à la coloration de Thiery et Rambourg appliquée aux coupes ultra-fines pendant 72 h, et cela en dépit d'une réaction positive à l'A.P.S. de globules cytoplasmiques situés approximativement dans les mêmes zones que les granules corticaux. Les résultats sont regroupés dans le tableau 10.

.Les inclusions II

La présence de lipides dans le cytoplasme des ovocytes est mise en évidence sur coupes à congélation par la coloration au noir Soudan associée à un contrôle par extraction au mélange méthanol-chloroforme (pl. 17 : 4). L'augmentation d'intensité de la coloration avec la maturité traduit l'accumulation de ces composés pendant la phase de maturation ovocytaire.

Deux catégories de lipides sont identifiées par la réaction d'Adams et celle au sulfate de bleu de Nil sur coupes à congélation (pl. 17 : 5) : d'une part, sous forme de gros globules, des lipides neutres (triglycérides et cholestérides), très abondants dans les ovocytes d'apparence matures du centre de l'acini ; d'autre part des phospholipides, plus petits et plus rares, qui, contrairement aux précédents, ne sont pas extraits par l'acétone à froid pendant une heure (tabl. 11).

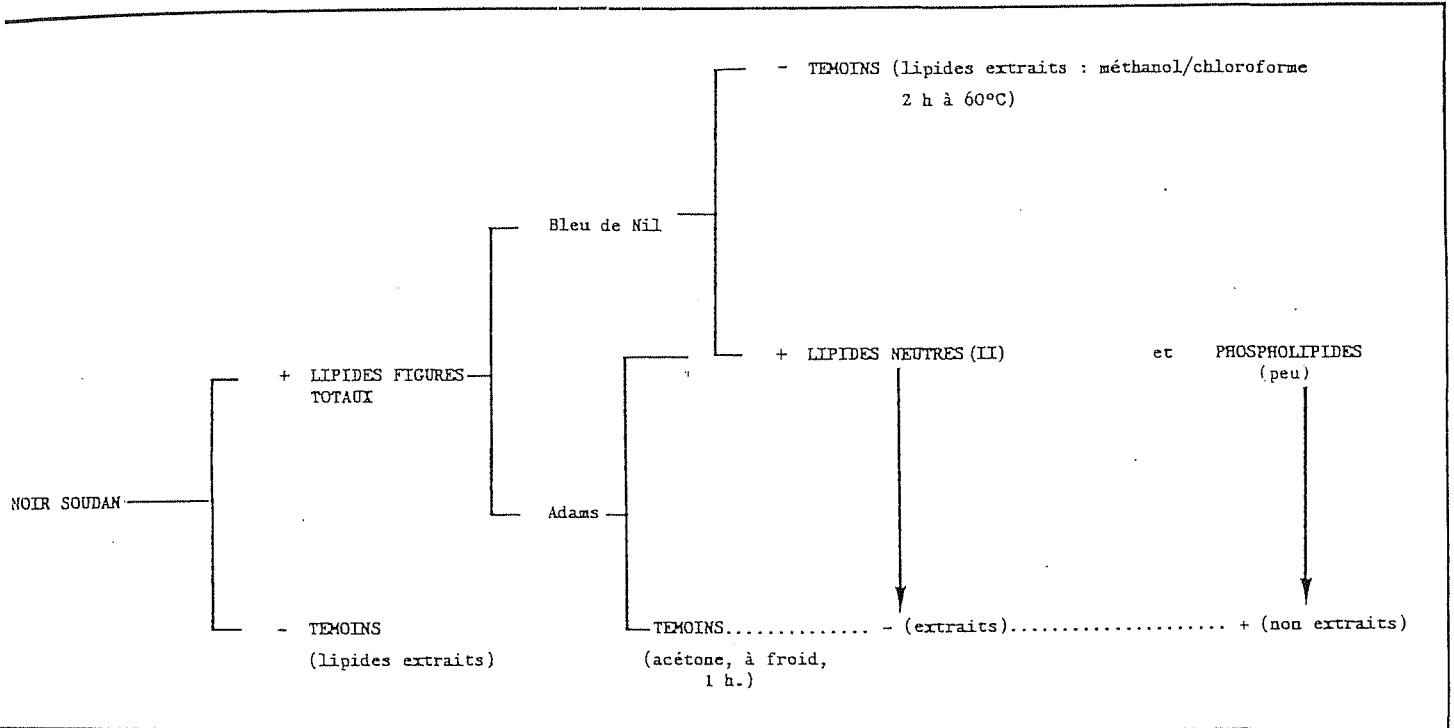
La localisation ultrastructurale des lipides est précisée par l'examen comparatif au M.E.T. de coupes réalisées à partir d'échantillons normalement traités, et d'échantillons ayant subi, avant l'inclusion, une extraction des lipides au mélange méthanol-chloroforme. Bien que ce traitement occasionne une rétraction des tissus, gênante pour l'observation, les lipides apparaissent localisés au niveau des inclusions I (pl. 17 : 3-6).

Tableau 10 - Nature chimique des inclusions cytoplasmiques de l'ovocyte.

INCLUSIONS I	<ul style="list-style-type: none"> + Jaune naphtol + Fast Green + Ponceau 2 R + Protéinase (6 h) (= digestion) - Réaction de Thiery et Rambourg (72 h) 	protéines basiques
Granules corticaux		
INCLUSIONS II	<ul style="list-style-type: none"> + Noir Soudan + Bleu de Nil (rose) + Adams (noir) + Méthanol/Chloroforme (= extraction) 	lipides neutres
INCLUSIONS III	<ul style="list-style-type: none"> + A.P.S. - Bleu Alcian ± Acétylation + A.P.S. + Amyloglucosidase + A.P.S. + Méthanol-Chloroforme + A.P.S. ± Protéinase + A.P.S. ± Protéinase (léger) + Réaction de Thiery et Rambourg (dès 1 H ?) 	glycoprotéines
INCLUSIONS IV	<ul style="list-style-type: none"> + A.P.S. - Amyloglucosidase + A.P.S. + Réaction de Thiery et Rambourg 	glycogène β

Le tableau 11 schématise l'ensemble de la démarche expérimentale.

Tableau 11 - Démarche d'identification de la nature chimique des inclusions cytoplasmiques II.



.Les inclusions IV

La réaction à l'A.P.S., sur coupes à congélation, montre l'existence, dans le cytoplasme de l'ovocyte, de deux types d'inclusions glucidiques différents par leur taille. Divers tests (tabl. 10 ; fig. 5), réalisés parallèlement à la coloration simple à l'A.P.S., précisent leur nature chimique. Le test de digestion par l'amylase montre immédiatement que, outre leur taille, ces inclusions diffèrent par leur nature chimique : ce sont les petites inclusions (type IV) qui disparaissent. Elles sont donc de nature glycogénique. La réaction de Thiery sur coupes ultra-fines précise que ce glycogène est sous la forme β (pl. 14 : 4).

.Les inclusions III

Les grosses inclusions (type III) réagissant positivement à l'A.P.S., mais résistantes à l'amylase, sont de surcroît difficilement acétylées : l'acétylation par le mélange anhydride acétique-pyridine diminue très nettement l'intensité globale de la coloration à l'A.P.S., mais ne la supprime pas complètement malgré un traitement long de 24 h à 60°C (tabl. 10 ; fig. 5). Cela permet d'envisager qu'il s'agit, au moins pour l'essentiel, de composés glucidiques complexes. Ce ne sont pas des glycolipides puisqu'une extraction préalable par le mélange méthanol-chloroforme ne modifie pas la réactivité globale de l'ovocyte à l'A.P.S. (tabl. 10, fig. 5). On peut aussi affirmer l'absence de mucopolysaccharides acides, car ces inclusions ne sont pas colorées par le bleu Alcian (tabl. 10). Ces différents renseignements permettent d'avancer, conformément aux données de la littérature (Pearse, 1968 ; Zerbib, 1976 ; Varadarajan & Subramoniam, 1980 ; Albertini, 1985), que les inclusions de type III sont de nature glycoprotéique. Cette hypothèse est étayée par les tentatives de traitement par la protéinase : cette enzyme provoque une digestion, faible certes, mais observable tant en M.E.T. que sur coupes à congélation après coloration à l'A.P.S. (tabl. 10, fig. 5). Un doute subsiste cependant quant à la nature exclusivement glycoprotéique de ces éléments, en raison de la rapidité du marquage lors de la réaction de Thiery et Rambourg, ce qui signe habituellement la présence de glycogène (pl. 14 : 4).

.Autres éléments cytoplasmiques

Une fluorescence naturelle verdâtre (pl. 31 : 1), d'intensité variable selon les ovocytes, a également été observée. Elle pourrait signaler la présence de caroténoïdes, composés déjà isolés de la gonade de *P. maximus* et dont la structure chimique a été étudiée (Campbell et al., 1967). Ces pigments ont aussi été identifiés chimiquement dans la glande génitale femelle d'autres Pectinidae (Miki et al., 1982).

En outre, cette étude histochimique a montré une pyroninophilie croissante des ovocytes vitellogéniques, traduisant donc leur richesse de plus en plus grande en A.R.N., sans doute en relation avec l'abondance des ribosomes (pl. 18 : 7) impliqués dans les synthèses vitellines.

2.2. Données enzymologiques

- Résultats des tests Api Zym

Certaines hydrolases ont été décelées dans tous les lots d'ovocytes testés de cette manière, avec des niveaux d'activité variables selon les enzymes et selon les lots étudiés (tabl. 12) :

- la phosphatase acide, qui présente systématiquement une intense activité ;
- des enzymes lipolytiques (estérase (C4) et estérase-lipase (C8)) ;
- une arylamidase (leucine arylamidase) ;
- des glycosidases (β galactosidase, N acétyl glucosaminidase, fucosidase) ;
- la phosphatase alcaline, faiblement positive ;
- une phosphohydrolase.

D'autres enzymes ne sont qu'occasionnellement détectées ; elles n'apparaissent que dans quelques lots d'ovocytes et manifestent dans tous les cas un faible niveau d'activité :

- lipase (C14),
- valine et cystine arylamidases,
- β glucuronidase et α mannosidase.

D'autres enfin n'ont jamais été mises en évidence :

- les protéases (trypsine et chymotrypsine),
- des glycosidases (α galactosidase, α glucosidase, β glucosidase et α mannosidase).

A l'exception de la phosphatase alcaline, toutes les enzymes ovocytaires décelées sont susceptible d'être contenues dans les lysosomes (De Duve, 1969 ; Mazliak, 1975 ; Dingle, 1977). Elles révèlent l'aptitude permanente des gamètes femelles à hydrolyser des substrats protéiques, glucidiques et lipidiques. Mais aucune corrélation n'a pu être

Tableau 12 - Résultats enzymologiques : tests API ZYM.

N	Enzyme recherchée	Substrat	Intensité de l'activité														
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Temoin		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Phosphatase alcaline	2-naphtyl phosphate	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
3	Estérase(C 4)	2-naphtyl butyrate	1.5	2	3	2	3.5	4	3.5	4	2.5	3.5	3.5	2	2	2	1.5
4	Estérase Lipase(C 9)	2-naphtyl caprylate	1.5	0.5	1.5	1.5	2	2	2	2	1.5	2	2	2	2.5	2	1.5
5	Lipase (C 14)	2-naphtyl myristate	0	0	0	0	1	0	1	0.5	0	0	0.5	0	1	0	1
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphtyl amide	2.5	1	2	1	2	3.5	1	2	0.5	3.5	1	2	2	3	3
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphtyl amide	0.5	0	0	0	1	2	0	0.5	0	1	0	1	0	2	0.5
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphtyl amide	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.5
9	Trypsine	Nbenzoyl-DL-arginine -2-naphtylamide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	α chymotrypsine	Nglutaryl-phenyl alanine-2-naphtylamide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	Phosphatase acide	2-naphtylphosphate	2.5	4	3	4	4	5	4	5	3	5	5	4	3	5	4
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI-phosphate	2	4	1	1.5	3	4	2	4	1.5	5	5	4	1.5	4	1
13	α galactosidase	6-BR-2-naphtyl- β D-galactopyranoside	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	β galactosidase	2-naphtyl- β D-galactopyranoside	2	1	1	1	3	4	2	3	1	4	3	2	1.5	4	1
15	β glucuronidase	naphtol-AS-BI- β D-glucuronide	0	0	0	0	1	2	1	2	0	3	0.5	1	0	2	0
16	α glucosidase	2-naphtyl- α D-glucopyranoside	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	β glucosidase	6-BR-2-naphtyl- β D-glucopyranoside	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	1-naphtyl-N-acetyl- β D-glucosaminide	0.5	1	1.5	1	1	2	1	1	1	3	1	2	1.5	2	1
19	α mannosidase	6-Br-2-naphtyl- α D-mannopyranoside	0	0	0	0	1	1	0	1	0	2	1	0	0.5	1	0
20	α fucosidase	2-naphtyl- α L-fucopyranoside	2.5	2	1.5	2.5	2	4	2	3.5	1	4	2.5	2.5	2.5	3.5	1.5
		* Taux d'éclosion	76	74	68	67	60	48	47	45	41	38	30	23	17	5	4

Correspondance entre les unités du système API ZYM et la quantité de substrat exprimée en nanomoles

1 : 0,5 nanomoles ; 3 : 20 nanomoles

2 : 10 nanomoles ; 4 : 30 nanomoles ; 5 : > à 40 nanomoles

statistiquement établie entre l'intensité des diverses activités enzymatiques et le taux d'éclosion obtenu à deux jours pour les lots correspondants (annexe V).

- Résultats histoenzymologiques

Les études histoenzymologiques (tabl. 13) ont permis de retrouver et de localiser dans les ovocytes quatre types d'activités enzymatiques déjà décelées par les tests Api Zym, et de mettre en évidence une nouvelle catégorie d'hydrolases, l'arylsulfatase, dont la détection n'est pas prévue par cette technique.

La phosphatase acide s'est montrée la plus fortement positive. Les deux enzymes lipolytiques, l'estérase et la lipase, sont aussi révélées, de même que la leucine aminopeptidase. L'arylsulfatase quant à elle montre une faible réactivité. Les réactions les plus positives (estérase, phosphatase acide, leucine aminopeptidase) sont illustrées sur la planche 18 : 1 à 6.

La phosphatase alcaline, la N acétyl glucosaminidase et la β glucuronidase, mises en évidence par la technique Api Zym, n'ont pas été détectées dans le cadre des études histoenzymologiques. Cela pourrait être dû à leur faible réactivité déjà montrée par la méthode précédente ; par ailleurs le sel de diazonium utilisé pour révéler leur activité conférant, même aux témoins, une légère coloration de fond, il est possible qu'une faible réactivité enzymatique soit alors masquée.

Tableau 13 - Caractéristiques histoenzymologiques des ovocytes.

OVOCYTES D'APPARENCE MATURE	+	Lipase
	+	Estérase
	-?	Phosphatase alcaline
	++	Phosphatase acide
	±	Arylsulfatase
	-?	N acétyl glucosaminidase
	-?	β glucuronidase
	-	Amylase
	-	Phosphorylase
	+	Leucine aminopeptidase

Les divers résultats enzymologiques et histoenzymologiques convergent pour suggérer l'existence de lysosomes dans le cytoplasme des ovocytes de *P. maximus*. Une tentative d'identification de ce type d'organites a donc été faite sur coupes ultra-fines, en utilisant la phosphatase acide comme marqueur cytochimique. Dans les conditions expérimentales mises en oeuvre à ce jour, la réaction obtenue est très faible et localisée aux inclusions de type III.

II - LA SPERMATOGENESE

Les données bibliographiques, qui concernent la spermatogenèse chez les bivalves au point de vue ultrastructural et histochimique, sont encore plus modestes que celles qui traitent de l'ovogenèse. Chez les Pectinidae, elles se limitent, à notre connaissance, aux travaux de Motavkine et Varaksine (1983), Anderson et Personne (1970a et b, 1976) et Dorange et Le Pennec (1989a).

L'étude ultrastructurale de la spermatogenèse chez *P. maximus*, tout en précisant les données de microscopie photonique disponibles sur la spermatogenèse normale, et notamment celles de Mason (1958, 1983) qui sont les plus complètes, a révélé l'existence d'une spermatogenèse anormale.

1. LA SPERMATOGENESE NORMALE

1.1. Données ultrastructurales

1.1.1. Les gonies et les cellules auxiliaires

- Les gonies

Les gonies sont les plus grandes cellules de la lignée germinale mâle. Les observations réalisées sur les coquilles saint-jacques prélevées à diverses périodes de l'année (pl. 19 : 1-2-3 ; pl. 20 : 1 à 3, 5) permettent d'en différencier deux types.

- Les gonies primaires (pl. 19 : 1 à 3 ; pl. 20 : 1 à 3) adhèrent largement à la lame basale du tissu conjonctif interstitiel. Elles mesurent jusqu'à 13 μm de long sur 8 μm de large. Dans le noyau, ovale ou arrondi, dont la taille atteint 9 μm de longueur, la chromatine est répartie en petites mottes et liséré pariétal fin et discontinu. Un à deux nucléoles sont parfois visibles. Le cytoplasme sombre renferme de nombreuses mitochondries réparties en deux agrégats. Ces mitochondries, de forme variable, sont souvent allongées ou en haltères. Dans quelques cellules germinatives, elles sont circulaires, englobant un matériel clair d'aspect hétérogène (pl. 20 : 3). Le reticulum endoplasmique granuleux est représenté par un long profil périnucléaire. Quelques rares inclusions osmiophiles, des ribosomes, un dictyosome sont également présents. Les images de mitose sont fréquentes en début d'année (pl. 20 : 2).

- Les gonies secondaires, issues de ces mitoses (pl. 19 : 1 à 4 ; pl. 20 : 5) mesurent 6-7 μm de long sur 5 μm de large. Leur noyau est ovale ou arrondi. Un nucléole peut y être observé. Dans le cytoplasme plus réduit, on note la présence de mitochondries et d'un dictyosome, parfois deux. Le reticulum endoplasmique paraît faiblement représenté. Les centrioles peuvent y être observés ainsi que quelques inclusions denses. Ces cellules évoluent en spermatocytes.

- Les cellules auxiliaires

Comme dans le cas de l'ovogenèse, des cellules qui n'appartiennent pas à la lignée germinale interviennent aussi dans la spermatogenèse. Ces cellules auxiliaires somatiques sont présentes entre les gonies, adhérant parfois à la lame basale du tissu conjonctif délimitant les acini (pl. 20 : 2-3). Ce sont des cellules polymorphes, dont la cytostructure est extrêmement variable en fonction, apparemment, du cycle spermatogénétique. Elles peuvent être volumineuses et atteindre environ 13 μm , des mesures précises étant rendues difficiles par l'irrégularité de leurs contours. Elles possèdent en effet des prolongements cytoplasmiques qui s'infiltrant entre les gonies et peuvent même les entourer. Leur cytoplasme, très abondant, est parfois clair, lacunaire, ne renfermant que quelques inclusions denses, hétérogènes, de type lysosomal ou lipidique ainsi que d'abondantes particules de type glycogénique (pl. 20 : 3). C'est en période de gamétogenèse active que les cellules auxiliaires montrent le plus fréquemment cet aspect. Dans d'autres cas (pl. 20 : 2), après l'émission des gamètes en particulier, le cytoplasme est envahi d'inclusions denses, hétérogènes en forme, en densité et en taille, évoquant des phagosomes et des figures myéliniques. Des vacuoles sont aussi présentes. Le reticulum endoplasmique peut être développé. Un dictyosome est généralement visible ainsi que plusieurs mitochondries. Le noyau, de forme variable, est globalement clair (pl. 20 : 3) car la chromatine est plutôt diffuse, à l'exception de quelques amas disséminés, et d'un liseré périphérique continu. Un gros nucléole est parfois observable. De courtes jonctions serrées, de type desmosome, font la liaison entre les cellules auxiliaires elles-mêmes et entre celles-ci et les gonies (pl. 20 : 4).

Il est possible que ce soient ces mêmes cellules que l'on observe quand les gonades sont presque vides (pl. 20 : 2), en périphérie des acini, appliquées contre la lame basale du tissu conjonctif interstitiel. Elles sont alors étroites (3-4 μm de large) et montrent de part et d'autre du noyau un long prolongement cytoplasmique fin et irrégulier. Le noyau (3 μm de large et 6 μm de long) présente des contours variables. La chromatine est surtout condensée en périphérie. Au sein d'un cytoplasme réduit et dense, on observe quelques mitochondries et parfois quelques

inclusions denses ainsi qu'un dictyosome. Ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées de type desmosome. Elles sont aussi en contact avec les cellules épithéliales des gonoductes.

1.1.2. Les spermatocytes

- Spermatocytes de premier ordre

Trois types de spermatocytes prophasiques peuvent être différenciés sur les coupes, en fonction de la forme des cellules, mais surtout d'après la morphologie du noyau : forme, taille et aspect ultrastructural selon le degré de condensation de la chromatine.

En début de prophase (pl. 20 : 5), les spermatocytes mesurent 6-7 μm de long sur 5 μm de large environ, et le noyau de l'ordre de 5 μm . Ils ont à peu près la même morphologie que les gonies secondaires. La forme du noyau et celle de la cellule sont conservées. En revanche, la chromatine est plus dense et mottée. Elle dessine un réseau caractéristique qui ménage des espaces clairs où des formations membranaires délimitant une ou plusieurs petites vacuoles sont présentes. Le cytoplasme renferme les mêmes organites que celui des gonies.

Le stade pachytène (pl. 20 : 6) est aisément repérable par la présence des complexes synaptonémaux. Les contours cellulaires et nucléaires se sont très modifiés dans le sens d'une plus grande irrégularité. Le rapport nucléocytoplasmique a augmenté par gonflement du noyau. Dans le cytoplasme réduit à une mince enveloppe périnucléaire, un dictyosome, quelques mitochondries denses et les centrioles sont visibles.

En fin de prophase, au stade diplotène-diacinèse (pl. 21 : 1), le spermatocyte est caractérisé par un réseau chromatinien moins condensé, plus réticulé, en raison de la dispersion des chromosomes. Les complexes synaptonémaux disparaissent. Le noyau de ces deux types de spermatocytes renferme aussi des formations membranaires.

Les autres stades de la première division de méiose sont également observables sur les coupes (pl. 19 : 4 ; 21 : 2-3), notamment sur les échantillons récoltés entre avril et août.

Les spermatocytes sont souvent imbriqués par leurs prolongements (pl. 21 : 1) sans que de réels ponts cytoplasmiques aient pu être mis en évidence.

- Spermatocytes de second ordre

L'identification de ces cellules est toujours difficile en raison de leur transformation rapide et de l'espacement des dates de prélèvement. Elles sont groupées par paires. De forme plutôt polygonale (pl. 21 : 3), elles mesurent de l'ordre de 4-5 μm et sont surtout repérables à l'osmiophilie très intense de la chromatine. Celle-ci, très condensée malgré la persistance de quelques petits espaces clairs, se présente au centre de la cellule comme un amas d'aspect un peu spongieux, de forme variable et semble-t-il non limité par une enveloppe continue. Leur cytoplasme clair, pauvre en organites, renferme quelques mitochondries, de petites vacuoles et quelques grains denses épars. Les centrioles sont parfois visibles.

1.1.3. Les spermatides

Les spermatides nouvellement formées par division des spermatocytes de second ordre (pl. 21 : 4-5-6) ont un contour plutôt arrondi, mais encore irrégulier. Leur diamètre est voisin de 4 μm . Leur noyau est relativement sphérique et mesure environ 3 μm . La chromatine, modérément condensée, est disposée en un réseau irrégulier. Parfois des formations membranaires intranucléaires sont encore discernables à ce stade. Le cytoplasme comporte aussi une volumineuse vacuole et quelques sphérules osmiophiles. Un doublet centriolaire est visible ainsi qu'un dictyosome constitué de l'empilement de cinq ou six saccules arqués, au voisinage desquels on peut voir de nombreuses vésicules.

Au cours de la spermiogénèse, ces cellules vont subir les classiques remaniements de structure qui conduisent à leur transformation en spermatozoïdes. Elles acquièrent d'abord une forme globuleuse, puis leur

morphologie change dans la phase finale de différenciation au cours de laquelle elles deviennent piriformes. Leur diamètre diminue peu à peu, jusqu'à 2 μm , par perte de cytoplasme.

Le noyau, d'abord rond, devient tronconique. La chromatine granulaire se condense progressivement, d'abord en périphérie. Lorsque la compaction chromatinienne est maximale, il subsiste encore de rares plages claires de taille réduite. Les microtubules périnucléaires intervenant chez certains invertébrés en relation avec la compaction de la chromatine n'ont pas été observés au cours de l'évolution structurale nucléaire du spermatozoïde de *P. maximus*.

Les deux centrioles, de structure classique, sont situés à proximité du dictyosome (pl. 22 : 1). Celui-ci présente deux citernes internes concentriques. Les centrioles prennent une position presque orthogonale l'un par rapport à l'autre. Le centriole distal élabore, très tôt au cours de la spermiogenèse, un rudiment de flagelle caudal (pl. 22 : 1).

Alors que ce flagelle est déjà partiellement élaboré, les mitochondries, à l'origine claires et disséminées autour du noyau, se regroupent en une collerette typique dans la zone péricentriolaire, au futur pôle basal de la spermatide (pl. 21 : 6). Elles fusionnent en quatre sphères mitochondriales volumineuses et denses aux longues crêtes souvent sinueuses (pl. 22 : 2).

La vésicule acrosomiale, d'origine probablement golgienne, apparaît primitivement au pôle basal de la spermatide (pl. 22 : 2) alors que la fusion des mitochondries n'est pas achevée. Cette structure est une vésicule en forme de disque d'environ 0,5 μm de diamètre. Sa densité est irrégulière : du matériel dense s'accumule d'une part contre la membrane, d'autre part au centre de la vésicule, ces deux zones denses étant séparées par un anneau de faible densité électronique. Des vésicules denses et de petits granules sont souvent observés dans le cytoplasme de la spermatide, parfois à proximité du dictyosome (pl. 22 : 3). Une inclusion de plus grande taille (0,3 μm), de nature polysaccharidique, positive à la réaction de Thiery, a été détectée dans les spermatides

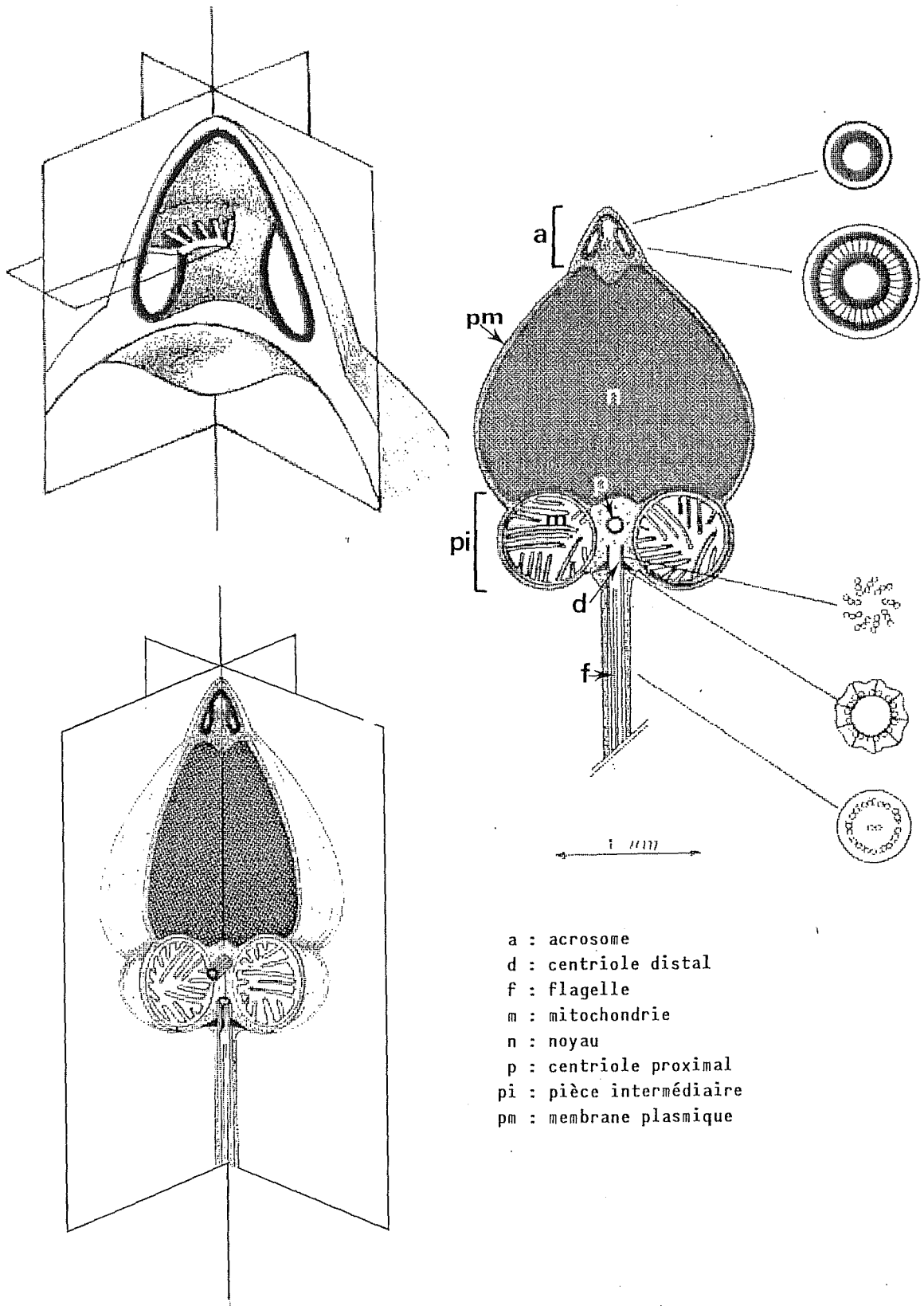
plus jeunes (pl. 22 : 4). Secondairement, la vésicule acrosomiale, sans doute accompagnée du dictyosome, migre au pôle apical de la spermatide (pl. 22 : 5). Elle s'aplatit, puis se déprime du côté du noyau pour acquérir progressivement une forme conique (pl. 22 : 6). Une structure de type myélinique est parfois visible à l'apex dans la spermatide âgée. En fin de différenciation, les masses de chromatine achèvent de se condenser et le cytoplasme en excès, contenant notamment du glycogène de type α , est éliminé (pl. 22 : 7).

1.1.4. Les spermatozoïdes

Le spermatozoïde de *P. maximus* (fig. 6 ; pl. 23 : 1-2) mesure 45-50 μm de long. La tête, piriforme, est surmontée d'un court acrosome de forme conique. La pièce intermédiaire est réduite. Les principales dimensions de ces structures sont indiquées dans le tableau 14. Le flagelle mesure environ 45 μm de long et se termine, sur une longueur d'environ 6 μm , par une partie de plus faible diamètre (pl. 23 : 1).

Tableau 14 - Principales dimensions du spermatozoïde de <i>Pecten maximus</i>	
- Longueur totale	45-50 μm
- Tête (du sommet de l'acrosome à la base de la pièce intermédiaire)	3,5 μm
. hauteur de l'acrosome	0,5 μm
. hauteur du noyau et diamètre maximum	2 μm
. profondeur de l'invagination sous-acrosomiale	0,2 μm
. profondeur de l'invagination postérieure	0,15 μm
- Pièce intermédiaire diamètre des mitochondries	0,8 μm
- Flagelle : longueur totale	45 μm
diamètre	0,3 μm
longueur de la partie distale effilée	6 μm

Figure 6 - Caractéristiques ultrastructurales du spermatozoïde de *Pecten maximus*.



- a : acrosome
- d : centriole distal
- f : flagelle
- m : mitochondrie
- n : noyau
- p : centriole proximal
- pi : pièce intermédiaire
- pm : membrane plasmique

En coupe longitudinale (fig. 6 ; pl. 23 : 2), l'acrosome, limité par une membrane ondulée au contenu très osmiophile, apparaît plus fin dans la partie apicale que dans la zone évasée et renflée, proche du noyau. Une coupe transversale (fig. 6 ; pl. 23 : 6), réalisée dans la partie inférieure de l'acrosome, montre qu'il est constitué dans cette zone de deux couches de matériel dense concentriques, séparées par une zone plus claire de structure lamellaire. Les lamelles, à disposition radiaire, sont orientées longitudinalement du sommet de l'acrosome vers la base (pl. 23 : 5). Une petite vacuole apparaît parfois sous le partie effilée de l'acrosome.

Le noyau tronconique est très dense et d'aspect granulaire. Il présente deux invaginations. L'une est sous acrosomiale. Elle est profonde de 0,2 μm . Il s'y accumule une substance moyennement dense et finement granuleuse qui s'insère aussi à la base de l'espace conique sous-acrosomien. L'autre est une dépression moins profonde (0,15 μm) située au pôle basal du noyau. Les contours nucléaires épousent la forme des quatre mitochondries de la pièce intermédiaire (pl. 23 : 2-4) où quelques inclusions glycogéniques de type α , caractérisées par la réaction de Thiery, sont présentes (pl. 23 : 4).

Le centriole proximal, logé sous la fossette basale du noyau, présente la structure classique de neuf triplets de microtubules (fig. 6 ; pl. 23 : 3). Le centriole distal est en position presque orthogonale par rapport au proximal (fig. 6 ; pl. 23 : 3). Des projections denses le relie à la membrane plasmique (fig. 6 ; pl. 23 : 7-8) qui prend de ce fait un aspect de plaque basale.

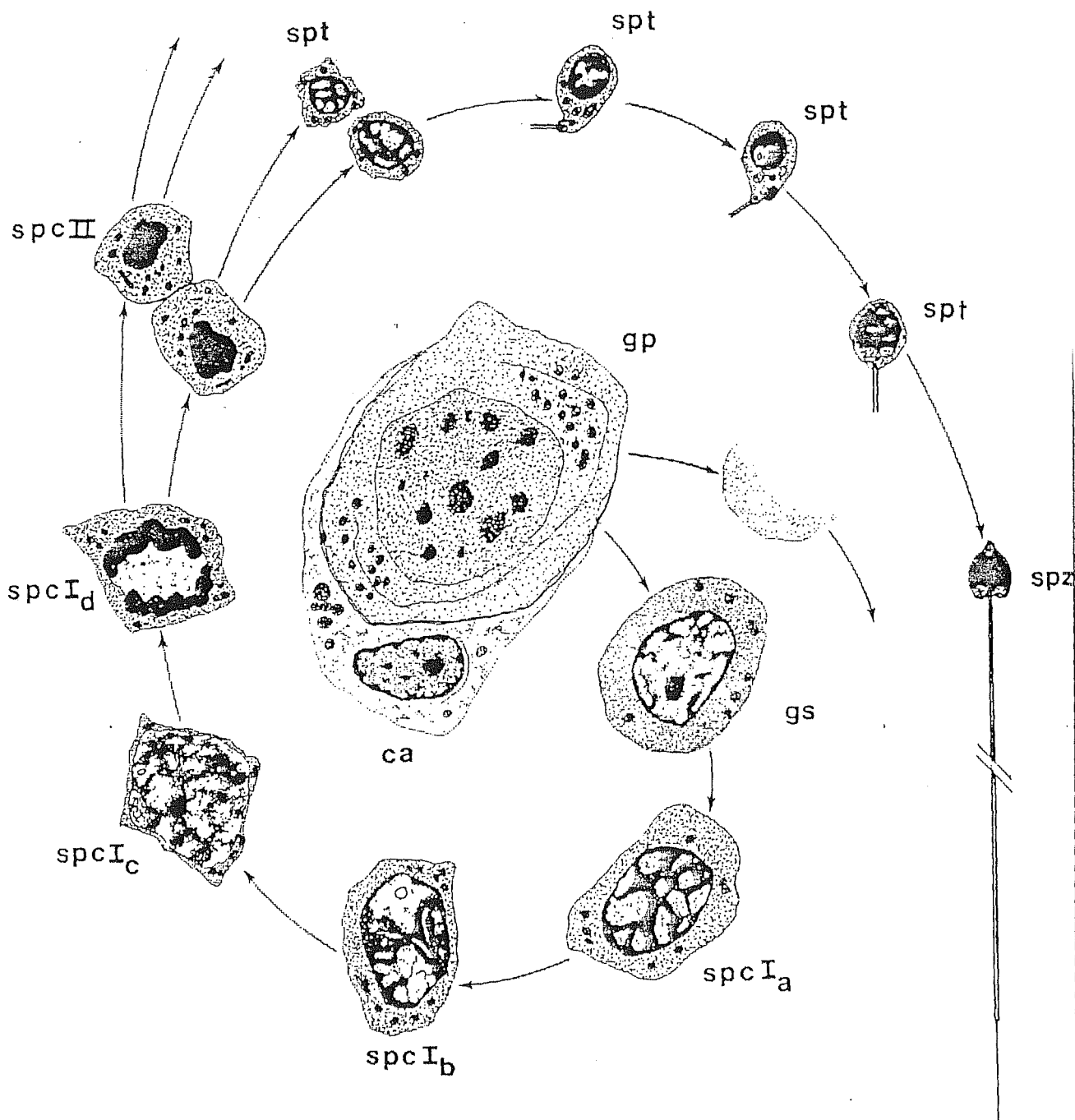
Le flagelle présente classiquement (fig. 6 ; pl. 23 : 9) les 9 doublets de microtubules périphériques + 1 doublet central.

La membrane plasmique qui entoure le spermatozoïde est légèrement ondulée (pl. 23 : 2).

Les divers stades d'évolution des cellules germinales mâles sont schématisés sur la figure 7.

Figure 7 - La spermatogenèse chez *Pecten maximus*.

- | | | | |
|------|-----------------------------|-------|-----------------------|
| gp | : gonie primaire. | spcII | : spermatocyte II. |
| gs | : gonie secondaire. | spt | : spermatides. |
| spcI | : spermatocyte I | spz | : spermatozoïde. |
| a | : stade leptotène | ca | : cellule auxiliaire. |
| b | : stade zygotène-pachytène | | |
| c | : stade diplotène-diacinèse | | |
| d | : anaphase. | | |



1.2. Données histochimiques et histoenzymologiques

1.2.1. Données histochimiques

La réaction de Feulgen donne aux noyaux des cellules germinales mâles une coloration rose, de plus en plus intense de la gonie au spermatozoïde. La réaction au vert de méthyle-pyronine, qui teinte en vert l'A.D.N. des cellules sexuelles, produit la même évolution dans l'intensité de la coloration. Seules les gonies présentent avec cette dernière technique un cytoplasme rose pyroninophile, donc riche en A.R.N.. L'intensité croissante des réactions s'explique par la condensation progressive de la chromatine. Une même intensification de la positivité des colorations est observée lors de la mise en évidence des protéines basiques (jaune Naphtol et "fast green") qui peuvent correspondre à des protamines ou à des histones.

Des lipides ont été mis en évidence par la coloration au noir Soudan, essentiellement en périphérie des acini mâles, mais aussi de place en place entre les cellules sexuelles plus centrales.

Des foyers réactifs à l'A.P.S. présentent la même distribution qui coïncide selon toute vraisemblance avec les cellules auxiliaires ou/et avec les cellules macrophagiques observées au M.E.T. dans les zones de résorption des débris cytoplasmiques de la maturation. La positivité à cette réaction disparaît par traitement à l'amylase, révélant la présence de glycogène. Une partie de la réactivité dans les zones les plus centrales est liée aux têtes regroupées des spermatozoïdes : sur coupes ultra-fines, la réaction de Thiery y a montré la présence de glycogène localisé au niveau de la pièce intermédiaire. Les flagelles des spermatozoïdes restent réactifs à l'A.P.S. après digestion amyliques.

1.2.2. Données histoenzymologiques

Quelques réactions enzymologiques positives ont également pu être observées en périphérie des acini mâles, et de place en place parmi les cellules sexuelles, en période de maturation comme dans les acini vides d'hiver.

Trois enzymes détectées sont des hydrolases lysosomales (tabl. 15). Elles sont vraisemblablement localisées au niveau des cellules auxiliaires qui interviennent dans la gamétogenèse, mais aussi dans les cellules macrophagiques parfois présentes dans les acini et dans lesquelles des inclusions de type lysosomal ont effectivement été vues sur coupes ultra-fines.

Tableau 15 - Caractéristiques histoenzymologiques de certaines cellules des acini mâles.

CELLULES PERIPHERIQUES DES ACINI MALES (cellules auxiliaires) OU ENTRE LES SPERMATIDES ET LES SPERMATOZOIDES (macro- phages)	+	Lipase
	+	Estérase
	+	Phosphatase acide
	+	Phosphatase alcaline (en début de gamétogenèse)
	-	Leucine aminopeptidase
	-	N acétyl glucosaminidase
	-	β glucuronidase
	-	Amylase
	-	Phosphorylase
	-	Arylsulfatase

2. LA SPERMATOGENESE ANORMALE

Parmi les cellules de la lignée germinale, des cellules atypiques ont été fréquemment observées sur les coupes, surtout en période de gamétogenèse active. Cette spermatogenèse anormale est due à des anomalies de mitose, de méiose ou à des anomalies de la spermiogenèse.

En période d'intense prolifération gamétique, il est fréquent d'observer des gonies plurinucléées, contenant jusqu'à cinq noyaux (pl. 24 : 1-2). Ces symplastes correspondent à un ensemble de gonies qui ne sont pas individualisées par défaut de cytodierèse. Des spermatocytes en début de prophase sont aussi assez fréquemment binucléés (pl. 24 : 3). En dehors de ces anomalies nucléaires, les caractéristiques structurales de ces cellules sont comparables à celles de la lignée normale.

Des anomalies de la méiose se traduisent par la présence occasionnelle de spermatides accolées (pl. 24 : 4) ou de spermatozoïdes bicéphales (pl. 24 : 5).

Des spermatides à flagelle intracellulaire (pl. 24 : 8) et des spermatozoïdes à cinq sphères mitochondriales (pl. 24 : 6) ou à flagelle dédoublé (pl. 24 : 7) ont aussi pu être observés. De telles anomalies s'expliquent vraisemblablement par des troubles de la spermiogenèse.

III - DISCUSSION

L'étude ultrastructurale des modalités de la gamétogenèse de *P. maximus* montre que l'évolution cytologique des lignées germinales mâle et femelle est comparable, dans ses grandes lignes, à celle qui est décrite pour d'autres mollusques, bivalves en particulier (Lucas, 1971 ; Roosen-Runge, 1977 ; Dohmen, 1983 ; Motavkine & Varaksine, 1983 ; Albertini, 1985 ; Pipe, 1987a).

MATURATION

En ce qui concerne l'ovogenèse, la séquence d'apparition des granules corticaux (I) et des inclusions vitellines (II, III) dans les ovocytes vitellogéniques, paraît tout à fait comparable à celle de *M. edulis* (Pipe, 1987a). Les abondants métabolites requis pour la synthèse de ces diverses inclusions ont apparemment une origine soit autosynthétique, soit hétérosynthétique comme c'est communément le cas chez les mollusques (Dohmen, 1983) et chez d'autres invertébrés (Eckelbarger, 1980 ; Olive & Pillai, 1983 ; Blades-Eckelbarger & Youngbluth, 1984 ; Eckelbarger & Rice, 1988). L'hétérosynthèse serait le fait des cellules auxiliaires dont la cytostructure évolue parallèlement à la maturation des ovocytes, avec notamment l'acquisition d'un reticulum granuleux très développé.

L'élaboration des granules corticaux débute apparemment avant celle des lipides et des plaquettes vitellines, alors que la structure des cellules auxiliaires est probablement encore en cours d'évolution. Elle semble en revanche nécessiter surtout la participation conjointe du reticulum granuleux et de l'appareil de Golgi de l'ovocyte lui-même, comme le suggère la présence, à proximité immédiate de ces organites, de vésicules à tous les stades de remplissage en matériel dense.

L'intense prolifération d'organites cellulaires dans le cytoplasme ovocytaire au cours de la maturation, et notamment celle des mitochondries, du reticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, traduit une importante activité autosynthétique contribuant non seulement à l'élaboration des granules corticaux, mais aussi selon toute vraisemblance à celle des réserves vitellines. Dans ce dernier cas cependant, des métabolites exogènes, synthétisés par les cellules auxiliaires, sont apparemment réabsorbés par endocytose dans l'ovocyte. Il est vraisemblable, en outre, qu'une absorption de métabolites simples, qu'elle soit passive ou non, se produise vers les jeunes ovocytes, notamment au niveau de la zone d'adhérence à la matrice conjonctive interstitielle.

L'évolution ultrastructurale des cellules germinales mâles de *P. maximus* est elle aussi similaire dans ses grandes lignes à celle d'autres bivalves (Lucas, 1971 ; Dohmen, 1983 ; Motavkine & Varaksine, 1985). Cependant, contrairement à ce qui a été décrit ailleurs, l'existence de réels ponts cytoplasmiques entre cellules sexuelles n'a pas été mise en évidence ici, même si des prolongements cytoplasmiques ont été observés dans le cas des spermatoocytes I. En outre, l'origine golgienne de la vésicule acrosomiale reste encore hypothétique : malgré l'examen d'un grand nombre de spermatides, la preuve d'une filiation directe entre les vésicules denses proches du dictyosome et cette structure n'a pu être établie.

LES GAMETES MURS

L'ovocyte d'apparence mature de la coquille saint-jacques présente un certain nombre de caractères ultrastructuraux qui le différencient de celui d'autres espèces de bivalves comme *M. edulis* (Albertini, 1985 ; Pipe, 1987a) ou *Crassostrea virginica* (Daniels et al., 1973). Des différences concernent notamment l'enveloppe vitelline, les granules corticaux et les inclusions vitellines (tabl. 16).

Tableau 16 - Caractéristiques de l'ovocyte de trois bivalves.

	<i>Pecten maximus</i>	<i>Crassostrea virginica</i> Daniels et al. (1973)	<i>Mytilus edulis</i> Albertini (1985) Pipe (1987a)
Enveloppe vitelline	5 - 6 µm	0,9 µm	6 µm
Gangue muqueuse	-	-	+
Inclusions cytoplasmiques			
granules corticaux I	+	?	+
arrangement subcristallin	-		+
lipides II	+	-	+
plaquettes vitellines III	+	+	+
glycogène IV	+	?	+
Lamelles annelées	+	-	+

En corrélant les données de l'histoenzymologie et de la cytochimie ultra-structurale, quelques précisions ont pu être apportées sur la nature chimique des divers types d'inclusions ovocytaires observées chez *P. maximus*, permettant d'apprécier leur rôle après l'émission des gamètes.

De nature très probablement protéique, les granules corticaux interviennent au moment de la fécondation et provoquent la formation d'une membrane de fécondation. Ils participent donc à l'établissement d'une barrière à la polyspermie, comme c'est le cas chez les échinodermes par exemple (Kane, 1970 ; Ishikawa, 1975). Des études histochimiques et cytochimiques plus approfondies seront nécessaires pour mieux préciser la nature chimique de ces granules qui sont généralement considérés dans la littérature comme étant de nature glycoprotéique (Albertini, 1985). Cela permettrait aussi de mieux comprendre leur mode d'action au cours des trois processus dans lesquels ils interviennent ou pourraient intervenir :

- la formation de la membrane de fécondation (intervention prouvée ici) ;
- les étapes suivant immédiatement la fécondation, puisqu'ils ne se vident pas tous à cette occasion (intervention éventuelle des granules encore intacts) ;
- la lyse ovocytaire, phase au cours de laquelle ils se dissocient (intervention probable).

Les inclusions II, III et IV constituent les réserves vitellines.

Localisés au niveau des inclusions II, les lipides les plus abondants sont des lipides neutres, et plus précisément des triglycérides. Besnard (1987, 1988) les avait déjà identifiés dans la gonade de *P. maximus* où il avait évalué leur participation pondérale à 60 % environ des lipides totaux. Les nombreuses études histochimiques et biochimiques menées chez divers bivalves donnent des résultats comparables (Raven, 1966 ; Bayne et al., 1978 ; Helm et al., 1973 ; Holland & Spencer, 1973 ; Gallagher &

Mann, 1986 ; Lubet et al., 1986, 1987b). Ces lipides constituent la source énergétique de la phase endotrophe et mixotrophe du développement larvaire (Giese, 1966, 1969).

Les inclusions III sont de nature complexe. Plusieurs observations histochimiques et cytochimiques incitent à penser qu'elles correspondent en fait à une forme de lysosomes.

- 1) L'histoenzymologie a montré l'existence dans l'ovocyte d'hydrolases apparemment localisées au niveau de globules cytoplasmiques qui sont donc de nature lysosomale.
- 2) Beaucoup d'hydrolases lysosomales sont de nature glycoprotéique (Dingle, 1977). Leur réactivité à l'A.P.S., associée à leur résistance à l'amylase, est d'ailleurs parfois utilisée pour localiser les lysosomes de certains types cellulaires (Dingle, 1977). Les glycoprotéines que renferment les inclusions III sont donc susceptibles de correspondre à de telles hydrolases.
- 3) Le fait que ces inclusions réagissent légèrement au test de caractérisation de la phosphatase acide, marqueur cytochimique des lysosomes, viendrait conforter cette hypothèse ; la faiblesse de la réaction rend toutefois indispensable la mise en oeuvre de manipulations complémentaires pour vérifier cette première observation.

Les inclusions IV sont glycogéniques. Comme c'est le cas chez d'autres animaux, bivalves (Pipe, 1987a), mollusques (Bretschneider & Raven, 1951), ou invertébrés (Dhainaut & Porchet, 1977a et b), le glycogène de *P. maximus* est sous forme particulière. De manière attendue, il est un constituant mineur des réserves vitellines. Selon Lubet et al. (1987b), il ne représente que 0,5 % du poids frais de la gonade femelle.

La présence d'hydrolases associées aux inclusions vitellines a déjà été observée dans les ovocytes de nombreux mollusques (Pasteels, 1973 ; Arni, 1974 ; Jong-Brink *et al.*, 1983 ; Pipe, 1985 ; Pipe & Moore, 1985). Leur rôle précis n'est pas encore parfaitement établi. Il paraît probable que chez *P. maximus*, comme chez les diverses espèces déjà étudiées, ces enzymes soient sous forme latente et permettent après la fécondation, pendant l'embryogenèse et la période larvaire endotrophe, l'utilisation des réserves vitellines accumulées pendant l'ovogenèse (Pasteels, 1973 ; Masuda & Dan, 1977 ; Decroly *et al.*, 1979 ; Jong-Brink *et al.*, 1983 ; Dohmen, 1983).

Chez *P. maximus*, ces hydrolases interviennent aussi dans les phénomènes de dégénérescence cellulaire, comme c'est le cas chez d'autres mollusques (Jong-Brink *et al.*, 1983 ; Albertini, 1985 ; Pipe & Moore, 1985).

Chez certaines espèces enfin, elles permettent l'utilisation de macromolécules incorporées par endocytose dans l'ovocyte au cours de la vitellogenèse (Pipe, 1987a). Les tests de caractérisation de la phosphatase acide, mis en oeuvre au niveau ultrastructural dans la présente étude, ont été trop faiblement positifs pour permettre de conclure dans ce sens.

L'ovocyte prêt à être pondu est riche en enzymes dont la nature est en rapport avec celle des réserves vitellines. En effet, outre la phosphatase acide, enzyme la mieux représentée, on note en particulier d'importantes activités lipasique et estérasique, vraisemblablement en relation avec l'abondance des réserves vitellines de nature lipidique. Les résultats histoenzymologiques obtenus chez *P. maximus* sont, dans l'ensemble, comparables aux observations effectuées chez d'autres bivalves, comme *Mytilus edulis* (Albertini, 1985), ou chez d'autres invertébrés (Ceccaldi & Trellu, 1975).

Le gamète mâle de *P. maximus* correspond au "spermatozoïde de type primitif" tel que le définit Franzen (1955, 1956, 1970, 1983). Ce type se rencontre chez des animaux à fécondation externe, ou qui émettent leur sperme dans l'eau (Franzen, 1956, 1970). Parmi les caractéristiques de

cette catégorie de spermatozoïdes, il possède un noyau de taille réduite, ce que Dakin (1909) et Mason (1958) avaient déjà observé en microscopie photonique. Cette particularité peut être reliée à la dimension elle-même réduite de l'ovocyte (Franzen, 1983). De la même manière, la pièce intermédiaire, d'ailleurs décrite comme une structure stable chez les bivalves par Franzen (1983), est similaire à celles observées chez de nombreuses espèces de ce groupe. Comme l'ont noté Anderson et Personne (1970, 1976), du glycogène est présent au niveau de cet élément : il constituerait la source d'énergie pour la mobilité du spermatozoïde et son métabolisme.

En dehors de ces traits structuraux strictement conformes au type primitif général, le gamète mâle de *P. maximus* possède des caractéristiques qui lui sont propres. L'acrosome diffère en effet par sa taille, sa forme, sa position, sa structure, ou par une combinaison de ces divers éléments, de celui des nombreux autres bivalves déjà étudiés au M.E.T., comme le montrent les synthèses de Popham (1979) et Franzen (1983), ainsi que les travaux de Hodgson et Bernard (1986). Il est par ailleurs dépourvu de bâtonnet axial contrairement, par exemple, à de nombreuses espèces de Mytilidae (Dan & Wada, 1955 ; Bourcart *et al.*, 1965 ; Nijima & Dan, 1965 ; Longo & Dornfeld, 1967 ; Galangau, 1969 ; Grant *et al.*, 1984 ; Hodgson & Bernard, 1986), de Veneridae (Pochon-Masson & Gharagozlou, 1970 ; Gharagozlou-Van Ginneken & Pochon-Masson, 1971), ou d'Ostreidae (Galtsoff & Philpott, 1960 ; Daniels *et al.*, 1971 ; Guttierrez *et al.*, 1978). Il est enfin possible que ses particularités atteignent le niveau spécifique, puisqu'il est même différent par sa taille et sa morphologie générale du spermatozoïde d'un autre pectinidé, *Chlamys hastata*, décrit au M.E.B. par Hodgson et Burke (1988).

Cette observation apporte donc un argument supplémentaire aux auteurs qui considèrent les caractéristiques ultrastructurales des spermatozoïdes comme un critère taxonomique ou phylogénétique pertinent (Daniels *et al.*, 1971 ; Gharagozlou-Van Ginneken & Pochon-Masson, 1971 ; Popham *et al.*, 1974 ; Franzen, 1956, 1970, 1983 ; Hodgson & Bernard, 1986).

CELLULES AUXILIAIRES

L'étude ultrastructurale de la gamétogenèse chez *P. maximus* a aussi permis de mettre en évidence la participation active, à l'ovogenèse et à la spermatogenèse, de cellules somatiques auxiliaires. Le rôle apparemment trophique de telles cellules vis-à-vis des cellules germinales n'était pas connu chez *P. maximus*, bien que leur existence ait été décelée depuis longtemps lors d'exams de la gonade en microscopie photonique (Coe, 1943 ; Mason, 1958, 1983). Divers travaux ultrastructuraux récents montrent également l'intervention de cellules somatiques dans la gamétogenèse d'autres bivalves. C'est le cas chez *M. edulis* (Pipe, 1987a) où des "cellules folliculaires" ont été décrites pour l'ovogenèse, et des "cellules de Sertoli" pour la spermatogenèse ; il en va de même chez *P. yessoensis* et *Crenomytilus grayana* où des "cellules auxiliaires" encore appelées "trophocytes" jouent un rôle actif vis-à-vis des cellules germinales mâles et femelles (Motavkine & Varaksine, 1983).

En ce qui concerne l'ovogenèse, les modalités de l'association entre cellules auxiliaires et ovocytes diffèrent quelque peu selon les espèces. Chez *M. edulis* (Pipe, 1987a), le jeune ovocyte est complètement entouré par quelques cellules folliculaires qui se détachent de l'apex du gamète quand celui-ci fait saillie dans la lumière de l'acinus. Elles sont alors localisées dans la région pédonculée de la cellule germinale. Pour *P. yessoensis* et *C. grayana*, c'est quand l'ovocyte est libre dans l'acinus que le rôle trophique des cellules auxiliaires s'affirmerait, car le gamète est alors entouré par ces cellules somatiques (Motavkine & Varaksine, 1983). Chez *P. maximus* enfin, l'association prend fin quand l'ovocyte devient libre ; elle ne semble concerner qu'une cellule auxiliaire par gamète comme c'est le cas chez l'annélide polychète *Kefersteinia cirrata* (Olive & Pillai, 1983).

Les caractères ultrastructuraux de ces cellules auxiliaires, et notamment l'abondant reticulum endoplasmique granuleux, paraissent comparables à ceux d'autres espèces animales (Eckelbarger, 1980 ; Eckelbarger & Grassle, 1982, 1983 ; Olive & Pillai, 1983 ; Pipe, 1987a). Leurs changements cytologiques observés au moment de la vitellogenèse ont aussi été notés par Eckelbarger (1980) et Eckelbarger et Grassle (1983). De même, la présence de systèmes jonctionnels a été relevée par divers auteurs (Eckelbarger, 1980 ; Blades-Eckelbarger & Youngbluth, 1984 ; Pipe, 1987a).

Plusieurs arguments autorisent l'hypothèse de leur participation active, hétérosynthétique, à l'ovogenèse de *P. maximus* :

- leur aptitude à exercer une fonction digestive clairement suggérée par la présence d'inclusions lysosomales permettra d'envisager outre une capacité de nutrition de la cellule elle-même, une éventuelle redistribution de catabolites, processus envisagé par divers auteurs pour d'autres bivalves (Motavkine & Varaksine, 1983);
- leur cytostructure se modifie au moment de la vitellogenèse ; elles deviennent sécrétrices par acquisition de divers organites et notamment d'un reticulum endoplasmique granuleux abondant ;
- l'observation de phénomènes d'endocytose dans l'ovocyte en vitellogenèse au niveau de la zone d'adhérence cellule auxiliaire-ovocyte ;
- l'association intime et provisoire des cellules auxiliaires et des gamètes, renforcée par des systèmes jonctionnels lors de l'élaboration de l'enveloppe vitelline de l'ovocyte ; il est d'ailleurs possible que ces cellules participent à l'élaboration de l'enveloppe vitelline.

Les cellules auxiliaires intervenant dans la spermatogenèse présentent aussi des analogies structurales et fonctionnelles avec les "cellules de Sertoli" récemment décrites chez *M. edulis* (Pipe, 1987b). Leur rôle

trophique ne s'exerce apparemment que vis-à-vis des gonies, contrairement à ce qui est observé chez *P. yessoensis* (Motavkine & Varaksine, 1983), chez de nombreux gastéropodes (Jong-Brink *et al.*, 1977 ; Bukland-Nicks & Chia, 1977, 1986 ; Parivar, 1980 ; Rigby, 1982) ou chez les mammifères (Russel, 1980). Dans tous les cas, elles sont en relation fonctionnelle avec les cellules de la lignée germinale à tous les stades de leur évolution. La présence d'un système lysosomal parfois important dans ces cellules, ainsi que la variabilité de leur cytostructure, traduisent probablement leur aptitude à la résorption.

Cette étude montre aussi, que bien qu'assurant une même fonction trophique vis-à-vis des cellules germinales, les cellules auxiliaires qui interviennent dans la spermatogenèse de *P. maximus* présentent des caractéristiques structurales différentes de celles qui participent à l'ovogenèse. Cela s'explique aisément par le fait que les cellules sexuelles des deux lignées n'ont pas les mêmes besoins trophiques. De plus, dans le cas de la spermatogenèse, l'association intime des cellules auxiliaires aux cellules germinales est limitée au stade gonial alors que pour l'ovogenèse elle est durable puisque, débutant au stade prévitelllogénique, elle ne s'achève que lorsque l'enveloppe vitelline est élaborée.

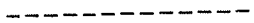
SPERMATOGENESE ANORMALE

Enfin, cette étude a révélé, en période d'active prolifération des gamètes, l'existence d'une spermatogenèse anormale qui se traduit par la présence de gonies géantes plurinucléées, et de spermatocytes binucléés. Les mêmes observations ont été faites chez *P. yessoensis* (Motavkine & Varaksine, 1983).

En microscopie photonique, la présence de cellules anormales a aussi été observée chez *Chlamys opercularis* (Allarakh, 1979), *Mercenaria mercenaria* (Loosanoff, 1937), *Diplodon chilensis* (Peredo & Parada, 1984) et *Mya arenaria* (Coe & Turner, 1938 ; Porter, 1974 ; Allen et al., 1986). La signification de ces formations n'est pas claire (Mackie, 1984) et les interprétations les concernant sont divergentes.

Il semble que chez *P. maximus*, comme le pensent aussi Motavkine et Varaksine (1983) à la suite des travaux de Danilova (1976), ces formations n'engendrent pas de spermatozoïdes normaux, mais dégénèrent dans les étapes suivantes du développement. Elles correspondent probablement à des éléments anormaux dus à une déviation accidentelle de la spermatogenèse plutôt qu'à un phénomène pathologique. Il en est de même vraisemblablement pour les spermatides et spermatozoïdes anormaux.

CHAPITRE IV



LE DEVENIR DES GAMETES

CHAPITRE IV : LE DEVENIR DES GAMÈTES

	pages
I - LES GAMETES NON EMIS	95
1. DEGENERESCENCE DES CELLULES GERMINALES	95
1.1. Les ovocytes	95
1.1.1. Etude histologique et cytologique	
1.1.2. Données histochimiques et histoenzymologiques	
1.2. Les cellules germinales mâles	97
2. RESORPTION	98
2.1. Les hémocytes	98
2.2. Les cellules auxiliaires	99
2.3. L'épithélium des gonoductes	99
II - LES OVOCYTES EMIS PAR INDUCTION ARTIFICIELLE : RECHERCHE D'INDICES DE QUALITE	99
1. ETUDE CYTOLOGIQUE	99
1.1. Les trois catégories d'ovocytes émis	99
1.2. Anomalies ultrastructurales des ovocytes d'apparence normale	102
2. ETUDE CYTOCHIMIQUE	104
III - DISCUSSION	104

A maturité, la coquille saint-jacques libère ses gamètes dans l'eau de mer où se produit la fécondation. Pour un même individu, les gamètes mâles sont généralement émis avant les gamètes femelles (Gruffydd & Beaumont, 1970). En baie de St-Brieuc, deux à trois émissions se succèdent sur une courte période de l'année. Une première, partielle à l'échelle individuelle et ne concernant qu'une partie de la population, a lieu entre la fin du mois de juin et le début du mois de juillet. Elle est suivie d'une restauration rapide de la glande génitale. A la fin du mois de juillet, une deuxième émission, massive celle-ci, laisse chez tous les individus une gonade à peu près vide macroscopiquement (Paulet *et al.*, 1988). La connaissance des divers facteurs conditionnant l'émission des gamètes est encore lacunaire.

Comme chez les autres bivalves, ce seraient des ovocytes diploïdes préméiotiques qui seraient pondus (Lucas, 1984). Chez la coquille saint-jacques, ils seraient libérés au stade diplotène de la première prophase méiotique. La pénétration du spermatozoïde déclenche d'une part l'exocytose des granules corticaux à l'origine de la membrane de fécondation, et provoquerait d'autre part le déblocage de la méiose, suivi de l'émission des deux globules polaires. L'amphimixie et la segmentation se produisent ensuite rapidement (Lucas, 1980). Le développement larvaire de *P. maximus* est de type planctotrophique (Ockelmann, 1965) ; son déroulement peut être subdivisé en trois phases (Lucas *et al.*, 1986) : une phase lécithotrophe pendant laquelle l'embryon, puis la toute jeune larve, vivent sur les réserves vitellines accumulées dans l'ovocyte, une phase mixotrophe où les larves utilisent ce qui reste des réserves vitellines et le phytoplancton, et une phase planctotrophe au cours de laquelle les larves tirent exclusivement leur nourriture du milieu environnant.

Les résultats obtenus sur des élevages réalisés en éclosérie à partir des géniteurs matures provenant du milieu naturel révèlent, au cours d'une même saison de reproduction, de fortes fluctuations dans le pourcentage de larves viables issues des pontes expérimentales. Le problème qui se pose alors concerne la recherche d'indices permettant d'évaluer la qualité des cellules sexuelles, et notamment celle des ovocytes, au moment de la ponte.

L'essentiel des problèmes de compétence des ovocytes doit se poser au cours de la période endotrophe, puisque c'est dès le comptage des larves de stade D de deux jours que les fluctuations dans les taux de survie sont décelées en éclosérie. Or, tout au long de cette phase, ce sont les lipides neutres accumulés dans l'ovocyte au cours de la vitellogenèse qui constituent la source énergétique essentielle de l'embryon puis de la larve (Bayne *et al.*, 1975 ; Holland, 1978 ; Gabbott, 1983 ; Lubet *et al.*, 1987b et c ; Besnard, 1988). Cela justifie l'étude particulière consacrée à la caractérisation cytochimique de ces substances dans l'ovocyte.

Au delà de leur incompétence en matière de développement, les ovocytes surmatures posent d'intéressants problèmes dans le domaine de la stratégie de reproduction et de nutrition des bivalves (Herlin-Houtteville & Lubet, 1975 ; Lubet *et al.*, 1987b et c ; Morvan, 1987 ; Besnard, 1988). Si, pour des raisons extrinsèques et/ou intrinsèques, l'émission des gamètes ne peut avoir lieu, les ovocytes entrent en surmaturité, c'est-à-dire deviennent atrétiques et se lysent progressivement *in situ*. Les phénomènes de dégénérescence affectent également les gamètes mâles et femelles qui subsistent après la vidange partielle de la gonade, ainsi que diverses cellules de la lignée germinale mâle qui n'ont pas abouti à la formation de spermatozoïdes normaux. Ce chapitre aborde donc aussi la description de l'ensemble de ces processus de dégénérescence et de résorption aux plans ultrastructural et cytochimique.

I - LES GAMETES NON EMIS

1. DEGENERESCENCE DES CELLULES GERMINALES

1.1. Les ovocytes

Quel que soit le mois de l'année, mais surtout en période de maturation sexuelle, ce sont généralement des ovocytes en fin de vitellogenèse qui montrent des phénomènes de dégénérescence. Parfois, de plus jeunes ovocytes manifestent aussi des signes d'altération (pl. 26 : 1).

1.1.1. Etude histologique et cytologique

Sur coupe en paraffine, l'un des premiers signes décelables de la dégradation ovocytaire est une modification des affinités tinctoriales de la cellule, avec en particulier une perte de basophilie nucléaire. A un stade de dégénérescence plus avancée, les ovocytes apparaissent globalement clarifiés (pl. 25 : 1-2). Lorsqu'ils se lysent et se vident de leur contenu, leurs enveloppes tassées dans l'acinus s'imbriquent comme les pièces d'un "puzzle" (pl. 25 : 3-4). Loin d'être régulière dans la gonade, la distribution des zones atrétiques est plutôt de type mosaïque : des acini dont les cellules sont apparemment toutes altérées en côtoient fréquemment d'autres dont le contenu paraît normal (pl. 2 : 5). Il est enfin fréquent d'observer des ovocytes lysés dans les gonoductes (pl. 25 : 3), et jusque dans la lumière de l'intestin (pl. 25 : 4).

La première modification structurale discernable sur coupes ultra-fines concerne le reticulum granuleux qui prend l'aspect d'un ou de deux nodules constitués par l'empilement concentrique d'une dizaine de citernes emprisonnant quelques organites cellulaires (pl. 26 : 2). La totalité du reticulum endoplasmique, lisse et granuleux, se dilate, donnant à la cellule un aspect vacuolaire plus ou moins envahissant

(pl. 26 : 3). Parallèlement, les mitochondries deviennent atypiques par perte de leurs crêtes. Tuméfiées, déformées et clarifiées, elles contribuent à l'aspect vacuolaire des ovocytes (pl. 26 : 4).

A ce stade, les altérations ont gagné ou gagnent le noyau qui présente de profondes invaginations et qui apparaît parfois exagérément polylobé. Le nucléoplasme montre des zones anormalement condensées (pl. 26 : 5). L'enveloppe nucléaire, dilatée (pl. 26 : 5), peut parfois se rompre. Une nécrose, essentiellement périphérique, intervient alors (pl. 26 : 6). Un espace apparaît à la base de la zone des microvillosités. Dans cet espace se produit plusieurs phénomènes : ruptures dans la membrane plasmique, vacuolisation, accumulation de glycogène (pl. 27 : 1), apport de matériel provenant de la dissociation d'inclusions cytoplasmiques dont l'identité n'est pas formellement établie en raison de leur état de dégradation (pl. 26 : 6) ; il est toutefois probable qu'elles correspondent, au moins pour partie, aux granules corticaux qui, à ce moment, ne sont plus identifiables dans le cytoplasme, alors que des inclusions II, III et IV y sont toujours présentes et intactes (pl. 26 : 6). Des particules de glycogène ont également pénétré jusque dans l'enveloppe vitelline (pl. 27 : 2).

Au stade de dégénérescence le plus avancé, l'enveloppe vitelline s'altère (pl. 27 : 3), puis se rompt (pl. 27 : 4), libérant le contenu de l'ovocyte dans l'acinus. Les noyaux nus et les divers débris de la cellule se répandent entre les cellules intactes (pl. 27 : 4 à 6), et des macrophages affluent parmi les reliquats de la lyse (pl. 29 : 3), surtout à la jonction entre les gonoductes et les acini (pl. 29 : 4).

1.1.2. Données histochimiques et histoenzymologiques

L'étude histochimique confirme les observations faites au M.E.T. concernant l'infiltration des acini par des lipides neutres et des composés glucidiques provenant des ovocytes lysés.

Les hydrolases déjà détectées dans les ovocytes d'apparence normale sont retrouvées entre les cellules nécrosées, au niveau des plages de lyse. La libération de ces enzymes pourrait expliquer l'altération précoce des jeunes cellules germinales voisines ainsi que l'atrésie complète du contenu de certains acini.

1.2. Les cellules germinales mâles

Diverses altérations nucléocytoplasmiques ou seulement nucléaires peuvent affecter des cellules germinales mâles et provoquer leur nécrose puis leur lyse, notamment en période de gamétogenèse active. La destructuration plus ou moins complète rend parfois difficile leur affectation à une catégorie cellulaire précise. Cependant, leur taille, leur rapport nucléocytoplasmique et leur position dans l'acinus permettent de penser que les cellules germinales peuvent être altérées aux divers stades de leur évolution. Des lésions nucléaires sont aussi observées sur les coupes dans les cellules plurinucléées de la spermatogenèse anormale.

Sur coupes semi-fines (pl. 28 : 1), l'altération nucléaire se présente généralement comme une caryolyse, le noyau perdant sa forme et son affinité pour les colorants. Sur coupes ultra-fines (pl. 28 : 2 à 4), la caryolyse se manifeste par une perte de contraste, c'est-à-dire par une uniformisation progressive du contenu nucléaire. Ce phénomène est observable dans des cellules qui présentent ou non des mitochondries tuméfiées et aux crêtes raréfiées (pl. 28 : 2-3).

Dans certains cas, l'altération nucléaire se manifeste à la fois par une hypercondensation de l'hétérochromatine et par une dilatation de l'enveloppe nucléaire (pl. 28 : 5) ; elle est associée à une densification cytoplasmique et parfois à une altération des mitochondries. Les spermatozoïdes eux-mêmes peuvent présenter des mitochondries altérées (pl. 28 : 6), une membrane cytoplasmique lysée et un noyau dont le réseau de chromatine est plus ou moins relâché selon les cas (pl. 28 : 6-7).

2. LA RESORPTION

Les éléments provenant de la dégénérescence partielle ou totale des cellules germinales peuvent être évacués. Il est aussi possible qu'ils soient résorbés in situ. Dans ce cas, trois types cellulaires sont susceptibles d'intervenir au sein de la gonade.

2.1. Les hémocytes

Des cellules macrophagiques ont été observées au M.E.T., tant dans les acini mâles que femelles, tout au long de l'année. De forme et de taille variables, elles présentent un cytoplasme généralement riche en inclusions osmiophiles de type lysosomal et chargé d'éléments résiduels. Ces caractéristiques reflètent leur aptitude à la résorption.

Dans la partie femelle de la gonade, les zones dans lesquelles les macrophages sont le plus aisément observés diffèrent selon les circonstances. En période d'atrésie des gamètes, ils s'infiltrèrent à la jonction entre acinus et gonoductes, parmi les débris de la lyse ovocytaire (pl. 29 : 4). Après les pontes et plus généralement pendant la période hivernale, ils sont présents dans la lumière des acini (pl. 29 : 1 à 3).

Dans les acini mâles, le même type d'hémocytes est présent en période de maturation sexuelle, résorbant probablement les résidus cytoplasmiques de la spermiogenèse entre les spermatides et les spermatozoïdes (pl. 29 : 7). Lors de la reprise de l'activité gamétogénétique, les macrophages sont visibles ici et là entre les gonies, parfois même au contact de la lame basale du tissu interstitiel. Après les émissions, ils phagocytent les spermatozoïdes résiduels, d'apparence normale ou altérée (pl. 29 : 5-6).

2.2. Les cellules auxiliaires

Cette étude ultrastructurale a aussi permis de relever la présence d'inclusions de type lysosomal dans les cellules auxiliaires associées aux cellules germinales mâles et femelles (pl. 13 : 5 ; pl. 20 : 2). Ces inclusions, dont la fonction a été évoquée dans le chapitre précédent, sont surtout visibles en début de période gamétogénétique.

2.3. L'épithélium des gonoductes

Un certain nombre de caractéristiques de l'épithélium des gonoductes associées à la présence d'ovocytes atrésiés et de débris de lyse dans la lumière de ces conduits ont permis d'envisager, à la suite de Lubet et al. (1987b), qu'ils jouent un rôle dans les processus généraux de résorption concernant la gonade : existence de microvillosités, membrane basale plissée, phénomènes d'endocytose, variabilité du contenu en glycogène et en lipides, présence d'hydrolases et d'une enzyme de transfert, proximité des sinus hémolymphatiques.

II - LES OVOCYTES EMIS PAR INDUCTION ARTIFICIELLE : RECHERCHE D'INDICES DE QUALITE

1. ETUDE CYTOLOGIQUE

1.1. Les trois catégories d'ovocytes émis

Parmi les ovocytes obtenus en éclosérie, par stimulation thermique de géniteurs prélevés dans le milieu naturel pendant la période présumée des pontes, trois catégories peuvent être différenciées dès l'abord : des ovocytes immatures, d'apparence matures et surmatures.

MICROSCOPIE PHOTONIQUE
DIRECTE

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

1- OVOCYTES IMMATURES → Cytostructure équivalente à 2a

2a-Cytostructure normale

- Enveloppe vitelline épaisse (5-6,1 μm)
- Noyau:contours irréguliers chromatine grenue
- Nombreuses inclusions denses
 - * granules corticaux(I)(moyennement denses, membrane limitante ondulée, contenu granulaire)
 - * inclusions lipidiques(petites et osmiophiles)(II)
 - * plaquettes vitellines(volumineuses et denses)(III)
 - * inclusions glycogéniques(IV)

2a1-Beaucoup d'inclusions lipidiques

2a2-Peu d'inclusions lipidiques

2- OVOCYTES D'APPARENCE MATURE ET NORMALE

2b-Cytostructure altérée

2b1	2b2	2b3	2b4	2b5	2b6
Nodules anormaux de R.E.G. Mitochondries altérées. Noyau:contours très irréguliers.	R.E.G. plus ou moins dilaté. Mitochondries altérées Noyau:contours très irréguliers.	Enveloppe vitelline altérée. Altérations de 1b1 et 1b2 possibles.	Enveloppe vitelline rétractée. Densification de l'ovocyte.	Enveloppe vitelline absente. Polarisation de certains organites	Enveloppe vitelline altérée (ou absente). Polyspermie.

3a-Cytostructure équivalente à 2b (b1 à b3)

3- OVOCYTES SURMATURES ATRETIQUES

3b-Nécrose essentiellement périphérique

- Enveloppe vitelline décollée
- Membrane plasmique intacte ou rompue
- Noyau altéré (chromatine modifiée, enveloppe dilatée)
- Granules corticaux éclatés

3c-Nécrose généralisée

- Clarification globale de l'ovocyte
- Rupture de l'enveloppe vitelline et de la membrane plasmique : vidange de l'ovocyte
- Seules inclusions intactes:inclusions lipidiques(II) et plaquettes vitellines(III)

Tableau 17 - Caractéristiques des trois types ovocytaires chez *Pecten maximus*.

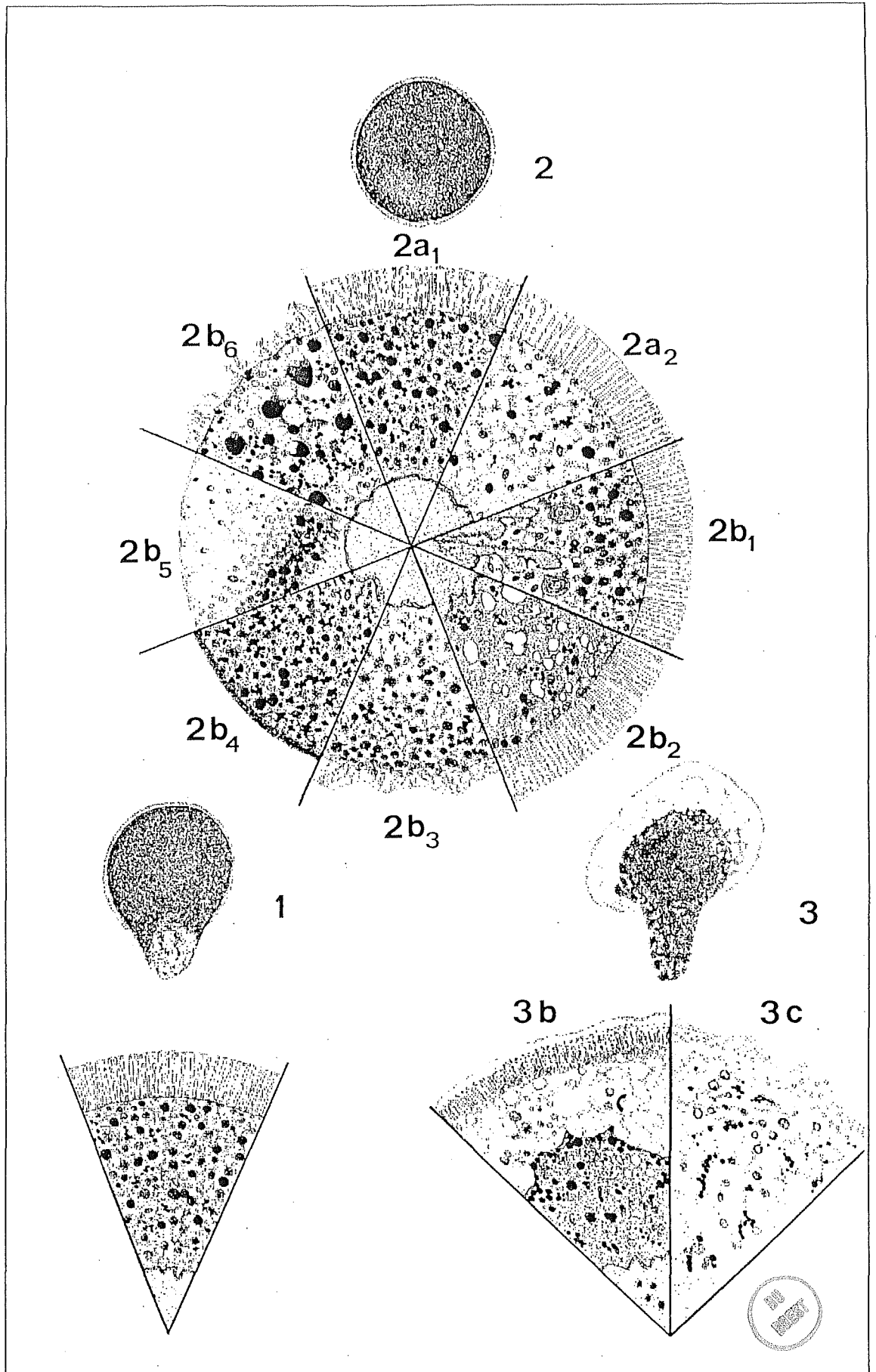


Figure 8 - Caractéristiques ultrastructurales des trois types d'ovocytes (1, 2, 3) différenciables par examen direct en microscopie photonique chez *Pecten maximus*.

Les ovocytes immatures sont pédonculés (pl. 30 : 1 ; fig. 8 ; tabl. 17), leur contenu est clair, et les tentatives de fécondation n'ont jamais donné de résultat. Les ovocytes matures d'apparence normale s'arrondissent à l'émission. Leur contenu est homogène (pl. 30 : 3 ; fig. 8, tabl. 17). Les ovocytes surmatures, également qualifiés d'atrétiques (pl. 30 : 5 ; fig. 8 ; tabl. 17), ont un contenu anormalement clair, surtout en périphérie. Leur enveloppe vitelline irrégulière est souvent rompue, libérant le contenu de l'ovocyte dans le milieu. Ces trois catégories cellulaires sont présentes en proportions très variables selon les pontes (pl. 30 : 7-8).

La présence d'une enveloppe secondaire épaisse de type "jelly-coat" a été remarquée autour de certains ovocytes observés en microscopie à contraste de phase (pl. 31 : 2). Elle est aussi discernable sur coupes semi-fines (pl. 31 : 3) et ultra-fines (pl. 31 : 4). On constate alors la présence de spermatozoïdes piégés. Ce type d'enveloppe a été décrit chez d'autres bivalves, *Laternula limicola* (Kubo et al., 1979), *Chlamys hastata*, *Patinopecten yessoensis* et *Crassadoma gigantea* (Hodgson & Burke, 1988).

La microscopie électronique à balayage (pl. 30 : 2-4-6) précise la morphologie des trois catégories d'ovocytes et la microscopie à transmission permet d'en détailler la structure. Les caractéristiques ultrastructurales des ovocytes ayant déjà fait l'objet d'une description dans le chapitre III, elles seront simplement résumées dans le tableau 17 et illustrées par la figure 8 et partiellement par la planche 33.

1.2. Anomalies ultrastructurales des ovocytes d'apparence normale

Parmi les ovocytes matures d'apparence normale, certains présentent des lésions élémentaires affectant divers organites cellulaires. Ne modifiant pas l'aspect morphologique global des ovocytes, de telles anomalies ne peuvent être décelées lors d'un examen direct en microscopie photonique. Certaines d'entre elles sont, en revanche, déjà observables sur les coupes semi-fines (pl. 32 : 2 à 4). Ces lésions, qui affectent les mitochondries, le reticulum endoplasmique, le noyau et l'enveloppe

vitelline (2b1 à 2b3 : pl. 32 : 2 à 4 ; tabl. 17 ; fig. 8) sont en fait identiques à celles observées dans les acini lors des phases précoces de la dégénérescence ovocytaire. Ce type de cellules est donc à classer parmi les ovocytes surmatures en dépit de leur apparence superficielle.

Trois autres types d'anomalies ont été détectés chez certains ovocytes d'apparence morphologique normale (2b4 à 2b6 : pl. 32 : 3, 5 à 7 ; tabl. 17 ; fig. 8). Ils ont en commun une altération plus ou moins profonde de l'enveloppe, pouvant aller jusqu'à sa régression totale. Il n'est cependant pas possible de préciser la source des anomalies constatées qui peuvent avoir pour origine l'immaturité, la surmaturité ou des défauts structurels ou génétiques non révélés.

L'hyperbasophilie sur coupes semi-fines (pl. 32 : 5) et l'hyperosmiophilie sur coupes ultra-fines (pl. 33 : 3 ; tabl. 17 ; fig. 8), de certains ovocytes (2b4) présents en petit nombre dans tous les lots étudiés, ont vraisemblablement pour cause immédiate une rétraction anormale des cellules au cours des différents traitements nécessaires à leur inclusion. Mais sans doute ces traitements n'ont-ils fait rien de plus que révéler une sensibilité particulière des ovocytes correspondants, peut-être liée à une perméabilité ou une fragilité anormale de l'enveloppe vitelline.

Le même type de raisons peut être invoqué pour rendre compte de la polarisation du contenu cytoplasmique chez d'autres ovocytes plus rarement et plus irrégulièrement rencontrés dans les lots étudiés (2b5 : pl. 32 : 6 ; pl. 33 : 4 ; tabl. 17 ; fig. 8). Dans ce cas, l'enveloppe vitelline a complètement disparu, et les grosses inclusions se regroupent vers l'un des pôles de la cellule. Ces artefacts pourraient témoigner d'une plus grande sensibilité de ces cellules aux centrifugations, pourtant effectuées à faible vitesse, mais techniquement nécessaires.

Enfin, des cas de polyspermie ont été constatés, mais surtout dans les lots d'ovocytes du début de la saison de ponte (ov. 2b6 : pl. 32 : 7 ; pl. 33 : 5 ; tabl. 17 ; fig. 8).

2. ETUDE CYTOCHIMIQUE

L'étude cytochimique des ovocytes émis n'a porté que sur la détection et la quantification des lipides neutres dans des ovocytes considérés comme normaux, puisque ces substances constituent la ressource nutritive fondamentale pendant la phase endotrophe et que c'est au cours de cette phase que se pose l'essentiel des problèmes de viabilité du développement.

L'examen des coupes semi-fines colorées au rouge à l'huile 0 révèle une forte variabilité du contenu lipidique des ovocytes émis, y compris dans les cellules de cytostructure normale (pl. 32 : 1). Cette variation concerne la quantité et la taille des inclusions lipidiques.

La quantité de lipides neutres dans l'ovocyte est décrite par l'indice de lipides qui correspond au rapport de la surface occupée par ces substances à la superficie totale de la cellule, mesurée à l'analyseur d'images. Dans l'ensemble des lots étudiés, l'indice moyen par lot varie de 10 à 60, et les trois-quarts des pontes ont un indice moyen compris entre 20 et 45. Par ailleurs, 65 % des pontes peuvent être considérées comme homogènes à cet égard en raison d'une valeur de l'indice de dispersion inférieure à 2 (Dorange et al., 1989c).

III - DISCUSSION

Ce chapitre aborde la question du devenir des cellules germinales en fin de gamétogenèse : leur émission, qui pose le problème de leurs capacités de développement, ou leur dégénérescence qui conduit à s'interroger sur l'éventuelle utilisation ultérieure de la source d'énergie qu'elles représentent.

L'examen direct des pontes de *P. maximus* en microscopie photonique permet déjà de constater qu'elles ne sont pas homogènes puisqu'elles comportent,

en proportions variables, des ovocytes immatures, surmatures et d'apparence mature. Ces deux premières catégories contribuent de toute évidence aux fluctuations de la qualité des pontes, les immatures parce qu'ils ne sont pas fécondables, et les surmatures parce qu'ils avortent rapidement, même s'ils sont parfois fécondés. Aisément identifiables sur des critères morphologiques simples, ces deux catégories peuvent être immédiatement retranchées des statistiques portant sur la viabilité des oeufs. Une variabilité du même ordre a notamment été observée dans les pontes de *Mytilus edulis* par Aldana Aranda (1984) qui propose pour la moule une classification des ovocytes émis, basée sur divers critères morphologiques.

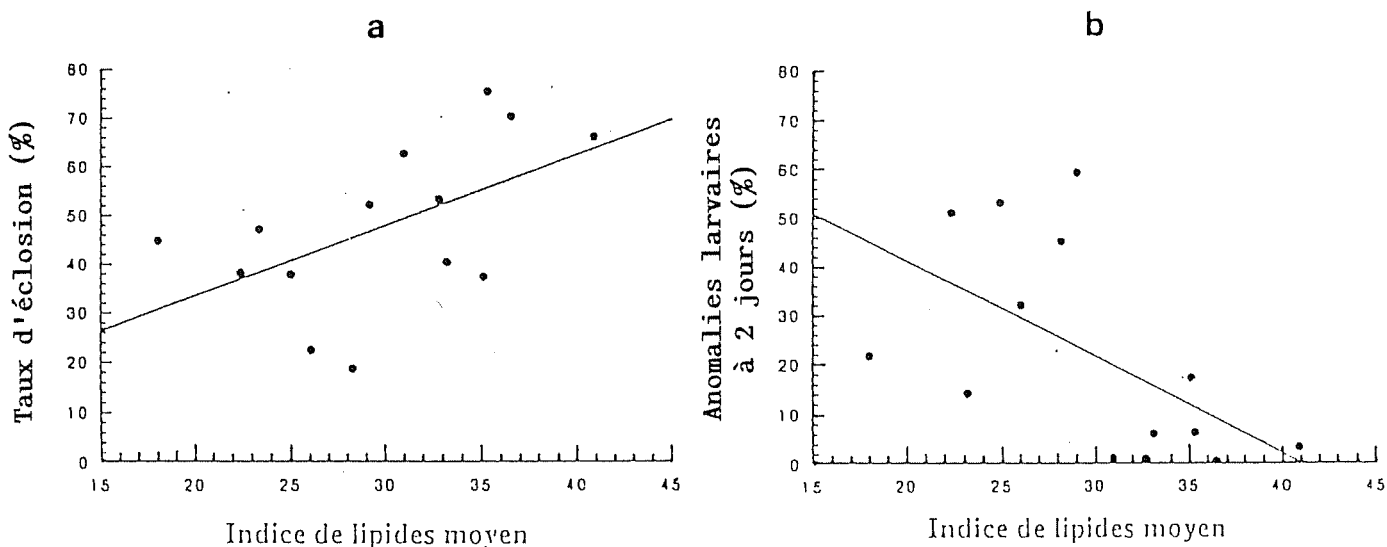
Lorsque les ovocytes immatures et surmatures ne sont pas pris en compte dans les effectifs des pontes, il s'avère que le taux d'éclosion des ovocytes d'apparence mature eux-mêmes est encore très variable, et n'atteint probablement jamais 100 % (Paulet, Comm. pers.). Dans ce cas, la recherche de critères de qualité nécessitait la mise en oeuvre de techniques plus fines, ultrastructurales et cytochimiques. Les observations en M.E.T. ont révélé, dans la population des ovocytes d'apparence mature et normale, des cellules présentant diverses catégories d'anomalies dont les causes peuvent relever de phénomènes d'immaturité, de surmaturité ou de malformation. Certains de ces ovocytes sont faciles à classer dans la catégorie des cellules dont les anomalies ont pour origine la dégénérescence : les lésions qu'elles présentent montrent qu'elles correspondent aux stades les plus précoces de l'atrésie ovocytaire. Pour les autres, dont les défauts ont, dans certains cas, été révélés de manière artéfactuelle par les techniques d'étude, il n'est pas possible de faire la part des causes relevant de l'immaturité ou de malformations, celles-ci pouvant être génétiques ou non.

En fin de compte, une ponte de *P. maximus* est susceptible de comporter, en proportions évidemment variables selon les individus et selon le moment du cycle, des ovocytes immatures, des ovocytes surmatures à des

stades plus ou moins avancés de dégénérescence, probablement des ovocytes malformés, et enfin des gamètes de structure normale qui peuvent a priori être considérés comme matures et viables (fig. 9).

En fait, la recherche et la quantification des lipides neutres dans ces cellules présumées saines mettent en évidence une forte hétérogénéité d'une ponte à l'autre. Ce type de différence est cette fois de nature quantitative, les indices de lipides mesurés s'inscrivant dans un continuum de valeurs sans qu'il soit possible pour l'instant de déterminer avec précision un seuil minimum pour la viabilité des oeufs. L'indice de lipides n'en constitue pas moins un critère pertinent de qualité et donc de viabilité de la ponte, des corrélations ayant été établies entre ce paramètre et deux indices concernant la qualité du développement ultérieur : positive avec le taux d'éclosion et négative avec le pourcentage d'anomalies chez les larves de deux jours (fig. 10) (Dorange *et al.*, 1989c). Les premiers résultats obtenus mériteraient d'être confortés par une analyse d'images sur un plus grand nombre de pontes.

Figure 10 - Corrélation entre l'indice des lipides, le taux d'éclosion à 2 jours (a) et le taux d'anomalies larvaires à 2 jours (b).



Des anomalies ovocytaires, et en particulier des phénomènes de dégénérescence, ont régulièrement été décrits chez les bivalves par examen de coupes de gonades. Il semble cependant que ce soit la première fois qu'un tel travail soit réalisé sur des gamètes émis, tout au moins en faisant appel aux techniques ultrastructurales. Au plan biochimique, l'importance des lipides neutres dans l'alimentation embryonnaire et larvaire endotrophe a été soulignée depuis longtemps (Giese, 1966) et a motivé diverses études particulières. Besnard (1988) a notamment dosé diverses catégories de corps gras dans la gonade et les larves de *P. maximus*, mais cette technique ne pouvait permettre de déceler des variations individuelles de teneur lipidique dans les oeufs. L'étude de Gallagher et Mann (1986), qui utilise une coloration au rouge à l'huile O pour des ovocytes intacts de *Mercenaria mercenaria* et *Crassostrea virginica*, aboutit à des résultats analogues à ceux développés ici, avec une précision cependant moindre dans la quantification des réserves lipidiques des oeufs.

L'ensemble des résultats portant sur la qualité des gamètes femelles à l'émission doit être tempéré par le fait qu'il s'agit ici de pontes induites en écloserie, c'est-à-dire forcées. Les géniteurs ont certes été prélevés dans la nature de telle manière que les pontes artificielles soient autant que possible en phase avec les émissions naturelles ; on ne peut toutefois écarter l'hypothèse d'une sur-représentation des éléments immatures ou anormaux dans ces pontes forcées.

L'entrée en dégénérescence des ovocytes non émis est un processus courant chez les bivalves (Lubet, 1959 ; Pipe & Moore, 1985 ; Pipe, 1987a ; Allarakh, 1979 ; Peres, 1981 ; Epple et al., 1988 ; Barber et al., 1988). *P. maximus* a lui-même fait l'objet d'une étude ultrastructurale sur le sujet, accompagnée de données biochimiques (Lubet et al., 1987b ; Besnard, 1988). Les lésions élémentaires et la séquence des événements décrites dans la présente étude sont comparables pour l'essentiel aux données de la littérature (tabl. 18).

Tableau 18 - Modifications cytologiques au cours de la lyse ovocytaire chez quelques bivalves.

	<i>P. maximus</i>		<i>M. edulis</i>			<i>C. grayana</i> & <i>P. yessoensis</i>
	DORANGE et al. 1989	LUBET et al. 1987b	ALBERTINI 1985	LUBET et al. 1986	PIPE 1987	MOTAVKINE et VARAKSINE 1983
ALTERATIONS NUCLEAIRES						
. Changement d'affinité tinctoriale	+		+			
. déformation de l'enveloppe nucléaire (profondes invaginations)	+		+			
. dilatation de l'enveloppe nucléaire	+		+			
. vacuolisation du nucléoplasme	rare		+			
. condensation du matériel nucléaire	+		-			
. éclatement du noyau	rare		+			lyse du noyau
ALTERATIONS CYTOPLASMIQUES						
. vacuolisation du cytoplasme	+			+	+	
. <u>reticulum endoplasmique</u>						
nodules du R.E.G.	+	Prolifération	+	+	+ mais pas de	
dilatation du R.E.G.	+	de systèmes mem-	-	+	signification	
dilatation du R.E.L.	+	branaires" de	-		pathologique	corps résiduels
. <u>mitochondries altérées</u>	+	type myélinique	+		précisée	(formations membranaires complexes)
. <u>appareil de Golgi</u>						
dilatation	+		-			
fragmentation et disparition	+		+			
. Plages de lyse sous membranaire	+		+		+	
. éclatement des granules corticaux	+		-			
. accumulation du glycogène	+		+			
. Dégradation des inclusions vitellines	-		lipides: nombre et	lipides +		
			taille diminués	cavitation		
			vacuolisation			
. Augmentation des lysosomes	-	+(apparition)				+
. Vacuoles autophagiques						+
MEMBRANE PLASMIQUE. ENVELOPPE VITELLINE						
. perte des microfilaments	-		+			
. augmentation de l'espace perivitellin	+				+	
. rupture de la membrane plasmique	+	+	+	+	+	+
. rupture de l'enveloppe vitelline	+		+	+	+	
. perte de la gangue périphérique	+		+			
. vidange du contenu cellulaire dans l'acinus	+	+	+	+	+	+ avec fusion des ovocytes chez <i>M. grayana</i> seulement

La dégénérescence des cellules germinales mâles est en revanche beaucoup moins connue (Lucas, 1971). Il n'est cependant pas impossible que ce phénomène soit largement passé inaperçu, et qu'il révèle en fait une importance plus grande que celle qui lui est actuellement accordée. La fréquence des figures de caryolyse dans certains acini des animaux étudiés tendrait à le suggérer ; la question mérite en tout cas d'être approfondie.

L'opinion qui prévaut quant au devenir des produits de la lyse ovocytaire est qu'ils sont pour l'essentiel évacués par les gonoductes, mais qu'ils pourraient pour partie être réabsorbés dès ce niveau par des "cellules absorbantes" ou être récupérés dans le tube digestif après un passage dans la cavité palléale (Lubet *et al.*, 1987b ; Besnard, 1988). Certains des arguments ultrastructuraux et histochimiques présentés ici vont également dans ce sens. Il n'est pas rare, en période de lyse intense, de voir certaines portions de l'intestin littéralement remplies d'ovocytes à tous les stades de dégénérescence. Cependant, la fréquence des figures de phagocytose par des hémocytes à fonction macrophagique sur ce matériel de lyse, qu'il provienne des lignées mâles ou femelles, laisse présager une importante réabsorption *in situ*, c'est-à-dire dans les acini eux-mêmes, tout au moins chez *P. maximus*.

- DISCUSSION GENERALE -

DISCUSSION GENERALE

Conçu initialement comme une contribution à la connaissance ultra-structurale et histochimique des processus d'atrésie ovocytaire chez *Pecten maximus*, ce travail nécessitait l'acquisition préalable d'éléments permettant une bonne compréhension du déroulement normal de la gamétogenèse, tant au niveau des gamètes eux-mêmes que de leur environnement dans la gonade. Par la suite, la problématique a naturellement débouché sur l'étude du devenir des gamètes formés, et donc de leur qualité au moment de l'éclosion.

LA GAMETOGENESE

Résultat généraux

Dans l'ensemble, les résultats de l'étude ultrastructurale et histo- chimique de la gamétogenèse de *P. maximus* sont conformes à ceux des travaux antérieurs sur les bivalves et en particulier à ceux de Motavkine et Varaksine (1983) sur *Patinopecten yessoensis* et de Lubet et al. (1987b) sur *P. maximus*. La spermatogenèse de cette espèce n'avait jusqu'à présent fait l'objet d'exams détaillés, ni au plan ultrastructural, ni au plan histochimique. Dans ce domaine également la présente étude apporte, dans ses grandes lignes, la confirmation de ce qui était connu pour d'autres bivalves, et notamment pour quelques pectinidés (Motavkine & Varaksine, 1983).

Au delà de ces confirmations générales, les points forts de cette étude concernent trois domaines :

- la mise en évidence de cellules somatiques auxiliaires et de leur rôle actif dans les processus de maturation des lignées germinales mâle et femelle ;
- la mise en évidence de l'apparition précoce, au cours de la vitellogenèse, d'inclusions de type lysosomal ;
- l'identification des granules corticaux et la mise en évidence de leur rôle dans la constitution d'une membrane de fécondation.

Les cellules auxiliaires

Sur la base des études de microscopie photonique existant à l'époque, Raven (1966) considère que l'ovogenèse des bivalves est de type "solitaire", c'est-à-dire qu'elle se déroule sans l'intervention de cellules somatiques à fonction nourricière. En 1983, Dohmen écrit que les cellules nourricières semblent jouer un rôle négligeable dans l'ovogenèse des mollusques et souligne la nécessité de recourir à des techniques ultrastructurales pour asseoir la réalité de relations organiques étroites entre cellules nourricières et ovocytes. La participation de telles cellules à la spermatogenèse n'est apparemment pas mieux établie (Roosen-Runge, 1977). Les données publiées par Motavkine et Varaksine (1983) font état de l'intervention de "trophocytes" autour de l'ovocyte de *P. yessoensis*, mais elles manquent de précisions au plan ultrastructural. C'est Pipe (1987a) qui, pour la première fois chez les bivalves, montre en M.E.T. le caractère fonctionnel de l'association entre cellules somatiques et germinales femelles et mâles dans la gonade de *Mytilus edulis*. Le présent travail montre également l'existence de liaisons serrées de type desmosomal entre les cellules germinales et auxiliaires des deux sexes chez *P. maximus*, et suggère en outre l'intervention d'échanges dans le sens somatique-germinal, en raison de l'observation répétée de figures d'endocytose dans les ovocytes au niveau des zones de jonction.

Jong-Brink *et al.* (1983) proposent de distinguer trois principaux types de relations entre "cellules folliculaires" et ovocytes chez les mollusques, en fonction du nombre et de la disposition des cellules somatiques autour de l'ovocyte. Dans le premier cas, l'ovocyte est complètement entouré par un nombre croissant de cellules "folliculaires". Dans le deuxième cas, l'ovocyte n'est entouré que par un faible nombre de cellules et dans le troisième, les "cellules folliculaires" n'entourent l'ovocyte que pendant les premiers stades du développement. L'association est du troisième type chez *M. edulis* et *Sphaerium striatinum* (Pipe, 1987a). Elle serait plutôt de type deux chez *P. maximus*, dans la mesure où les cellules auxiliaires restent attachées aux ovocytes jusqu'à l'élaboration de l'enveloppe vitelline et si l'on considère que la présence d'une seule cellule somatique par ovocyte entre dans la définition de cette catégorie.

Les inclusions lysosomales de l'ovocyte

Les observations histoenzymologiques montrent que des globules cytoplasmiques contenant des hydrolases, et donc de nature lysosomale, apparaissent en cours de vitellogenèse. Tout laisse à penser que ces globules correspondent aux inclusions de type III dont on peut faire remonter la formation au début de la vitellogenèse. La présence d'hydrolases lysosomales dans des granules vitellins a été notée chez divers mollusques (Pasteels, 1973 ; Arni, 1974 ; Jong-Brink *et al.*, 1983) et bien documentée plus récemment chez *M. edulis* par Pipe (1985) et Pipe et Moore (1985) qui considèrent que les inclusions vitellines correspondantes constituent une forme de lysosomes. Chez *P. maximus*, des lysosomes ont déjà été détectés par Lubet *et al.* (1987b), qui corrélaient cependant leur apparition à un stade tardif, puisque correspondant au début de l'atrésie.

Granules corticaux et remaniements membranaires dans l'ovocyte

Chez divers organismes, les échinodermes par exemple (Kane, 1970 ; Ishikawa, 1975), la fonction des granules corticaux est généralement associée à des remaniements de l'enveloppe vitelline, et en particulier à la formation d'une membrane de fécondation permettant le blocage de la polyspermie. Chez les bivalves (Kubo *et al.*, 1979 ; Longo, 1976), un tel blocage n'est pas associé à la formation d'une membrane de fécondation, phénomène apparemment inconnu dans l'ensemble de la classe (Longo, 1983 ; Lucas, 1984). Ce travail apporte donc la première preuve de la formation d'une membrane de fécondation chez les bivalves, dans le cas de *P. maximus*. Il permet en outre de soupçonner l'intervention des granules corticaux dans les remaniements de l'enveloppe vitelline qui accompagnent la phase centrale de l'atrésie ovocytaire, ce qui avait déjà été noté pour *M. edulis* (Albertini, 1985).

DEGENERESCENCE GAMETIQUE ET PROBLEMES TROPHIQUES DANS LA GONADE

Ce travail étant à l'origine surtout consacré aux phénomènes liés à la dégénérescence des cellules germinales dans la gonade, de nombreux résultats exposés dans les chapitres II, III et IV sont susceptibles d'éclairer cette question. Ces résultats, associés aux acquis antérieurs de la littérature dans ce domaine, permettent de tenter une description générale des problèmes d'ordre nutritionnel dans la gonade, pour replacer les phénomènes atrétiques dans ce contexte.

Le cycle sexuel de *P. maximus* en baie de St-Brieuc

En baie de St-Brieuc, l'automne et l'hiver correspondent, pour schématiser, à la période de "repos sexuel" de la coquille saint-jacques (Paulet *et al.*, 1988 ; Ansell *et al.*, 1988). Dans la gonade pratiquement vide au stade macroscopique I, les acini ne contiennent guère que des éléments résiduels entre lesquels circulent des hémocytes. Dans les lignées germinales on assiste surtout à des mitoses goniales puis à l'apparition des premiers stades précoces de maturation. Le muscle adducteur commence à reconstituer ses réserves glycogéniques (Paulet *et al.*, 1988). La période de "repos sexuel" est particulièrement longue en baie de St-Brieuc ; elle est au contraire extrêmement courte en baie de Seine (Lubet *et al.*, 1987b) et en rade de Brest (Paulet *et al.*, 1988).

Toujours en baie de St-Brieuc, la gamétogenèse ne devient réellement active qu'à partir du mois de mars. Comme chez d'autres bivalves (Morvan, 1987), plusieurs cohortes ovocytaires entrent successivement en vitellogenèse. Pour les premières d'entre elles, jusqu'à la fin du mois de mai environ, la vitesse de développement reste lente (Paulet, Comm. pers.). Le rapport gonadique augmente régulièrement, alors que l'indice musculaire (poids du muscle adducteur/poids de la coquille x 100) continue de croître, lui aussi, atteignant son maximum à partir de la fin d'avril (Paulet *et al.*, 1988). Cette poursuite de la croissance pondérale du muscle adducteur incite à penser qu'au cours de cette phase encore précoce de la maturation, les ressources nutritives puisées dans le milieu sont suffisantes pour assurer à la fois l'essentiel du développement des lignées germinales et le stockage de réserves dans le compartiment musculaire. A ce stade il n'est peut être pas nécessaire d'envisager pour les besoins métaboliques de la gonade d'autre système que celui régissant globalement la nutrition du bivalve : l'appareil digestif relayé par l'hémocoèle.

Au mois de mai, l'indice musculaire atteint son point culminant (Paulet *et al.*, 1988). Les cohortes ovocytaires nouvellement apparues connaissent un développement fortement accéléré par rapport aux générations précédentes (Paulet, Comm. pers.). L'indice gonadique continue d'augmenter

jusqu'au moment des émissions, à la fin du mois de juin et en juillet (Paulet *et al.*, 1988). La chute brutale de l'indice musculaire, qui survient dès la fin du mois de mai, a été observée chez diverses espèces de bivalves et interprétée comme la réutilisation des réserves glycogéniques du compartiment musculaire pour les besoins de la gamétogenèse (Sastry, 1970 ; Ansell, 1972 ; Gabbot, 1975 ; Zaba, 1981 ; Lubet *et al.*, 1987b ; Medhioub & Lubet, 1988). Chez la palourde *Ruditapes philippinarum*, ce sont les muscles lisses du voisinage de la gonade qui stockent les réserves glycogéniques ; le transfert des métabolites provenant de leur dégénérescence, depuis ce compartiment vers les cellules germinales, pourrait se faire directement, ou par l'intermédiaire d'hémocytes (Medhioub & Lubet, 1988). Après la ponte principale de juillet, des émissions secondaires, probablement mineures, ont lieu en août alors que la gonade se vidange rapidement pour reprendre sa phase de "repos sexuel" à l'automne (Paulet *et al.*, 1988).

La dégénérescence des gamètes

Le paragraphe précédent résume et schématise, avec les particularités de déroulement propres à la baie de St-Brieuc, ce qui est connu et généralement admis du cycle sexuel de *P. maximus*. Reste à envisager les problèmes de dégénérescence gamétique et à évaluer la place qu'ils sont susceptibles de prendre dans ce schéma.

Résumé des travaux antérieurs

Les auteurs soulignent l'importance exceptionnelle que peuvent prendre les processus de lyse ovocytaire chez la coquille saint-jacques, spécialement en baie de St-Brieuc (Paulet *et al.*, 1988) et en baie de Seine (Besnard, 1988). En fait, des figures d'atrésie ovocytaire sont observables pendant toute la durée de la gamétogenèse et après les émissions qui ne sont jamais totales et où les ovocytes subsistant dégèrent. A l'évidence, elles prennent cependant de l'ampleur à mesure que la maturation avance pour atteindre, en baie de St-Brieuc, leur maximum

d'intensité à la fin du mois de juin selon Paulet *et al.* (1988). Ces auteurs font par ailleurs remarquer que l'importance de la lyse à ce moment pourrait être associée à l'épuisement parallèle des réserves glycogéniques musculaires, des observations analogues, à la saison près, ayant été faites en rade de Brest (Cochard & Gérard, 1987).

Des phénomènes de lyse ovocytaire ont été décrits chez de nombreux bivalves, par exemple *Mercenaria mercenaria* (Veneridae) (Loosanoff, 1937), *Mytilus edulis* (Mytilidae) (Lubet, 1959), *Chlamys varia* (Pectinidae) (Lucas, 1965), *Lucinoma borealis* (Lucinidae) (Monnat, 1970), *Chlamys opercularis* (Pectinidae) (Allarakh, 1979), *Pecten ziczac* (Pectinidae) (Peres, 1981), *Argopecten irradians irradians* (Pectinidae) (Epp *et al.*, 1988), *Placopecten magellanicus* (Pectinidae) (Barber *et al.*, 1988), *Crenomytilus grayana* (Veneridae), *Glycymeris glycymeris* (Glycymeridae) (Morvan, 1987) et *Cerastoderma edule* (Cardiidae) (Dorange, non publié). Les études récentes réalisées sur les bivalves de l'écosystème hydrothermal profond révèlent aussi l'intensité de ces phénomènes atrétiqes, notamment chez le Mytilidae *Bathymodiolus thermophilus* (Herry & Le Pennec, 1987) que ces auteurs lient à l'instabilité de l'environnement de ce milieu. Selon Besnard (1988) la dégénérescence ovocytaire peut être induite par divers types de stress. Mais le phénomène est également une composante naturelle du cycle sexuel de certaines espèces, dont *P. maximus*. Plusieurs auteurs se sont interrogés sur sa signification et ont été récemment amenés à en soupçonner l'importance trophique (Motavkine & Varaksine, 1983 ; Pipe, 1987a ; Lubet *et al.*, 1987b ; Morvan, 1987 ; Besnard, 1988 ; Paulet *et al.*, 1988 ; Dorange *et al.*, 1989a et b ; Dorange & Le Pennec, 1989b). Les observations les plus significatives à cet égard sont celles de Lubet *et al.* (1987b) sur *P. maximus* et de Pipe (1987a) sur *M. edulis*, qui, se basant sur l'ultrastructure et l'activité enzymatique des cellules épithéliales des conduits génitaux évacuateurs, émettent l'hypothèse d'une résorption des produits de la lyse à ce niveau.

Catégories cellulaires impliquées dans la résorption

Les résultats obtenus au cours de la présente étude confirment et complètent, dans ce domaine, ceux de la littérature.

Les observations portant sur le revêtement épithélial cilié des gonoductes confirment en tous points celles de Lubet *et al.* (1987b) chez *P. maximus* : présence de microvillosités entre les cils, manifestations d'endocytose, présence de lysosomes et de phosphatase alcaline, enzyme de transfert. En outre, la présente étude montre que l'ensemble des conduits évacuateurs de la gonade, quel que soit leur diamètre, est tapissé de cellules épithéliales ciliées à microvilli. En accord avec les recherches de Pipe (1987a) sur la moule, l'abondance du contenu glycogénique de ces cellules s'est révélée variable selon les périodes du cycle sexuel, avec un maximum en période de maturité alors que l'atrésie est souvent active et que l'on voit des débris de lyse ovocytaire dans la lumière des gonoductes. Enfin, la présence de lysosomes est mise en évidence par la caractérisation de diverses enzymes connues pour faire partie de l'équipement habituel de ces inclusions.

Le rôle d'hémocytes à fonction macrophagique dans la résorption des produits de la lyse ovocytaire, ou de cellules mâles résiduelles (Dorange & Le Penec, 1989a), est démontré pour la première fois chez *P. maximus*. En période de maturation sexuelle, ces hémocytes sont observables en grand nombre, baignant dans les accumulations de débris de lyse à la jonction entre acinus et gonoducte ; ils sont alors remplis d'inclusions denses et de corps résiduels dont l'origine ne fait guère de doute. En période hivernale ils résorbent les reliquats cellulaires dans la partie femelle, et même des gamètes entiers, parfaitement identifiables, dans la zone mâle.

Les résultats précédents montrent qu'une partie des produits de la dégénérescence des gamètes est résorbée *in situ* par des hémocytes. Selon Lubet *et al.* (1987b), une fraction des métabolites libérés pourrait être directement utilisée sur place par une nouvelle génération ovocytaire.

Pour ces auteurs toutefois, l'essentiel de ce matériel est libéré dans les gonoductes où une absorption, également étayée ici, se produit selon toute évidence. La présence d'ovocytes en cours de lyse dans la lumière de l'intestin (Lubet *et al.*, 1987b ; Besnard, 1988 ; Paulet, Comm. pers.) suggère qu'une fraction des produits de l'atrésie est évacuée dans la cavité palléale et récupérée dans le cycle habituel de l'alimentation particulière ; c'est là un autre site possible de réabsorption. Enfin, lors du passage dans la cavité palléale, il n'est pas impossible qu'une partie du matériel évacué, mis en contact du tégument périgonadique par la circulation ciliaire, soit piégée à cet endroit par le mucus et subisse l'action des cellules épithéliales qui présentent une ultra-structure (microvillosités, "vacuoles" fréquentes) ainsi qu'un équipement enzymatique permettant, voire suggérant, une fonction d'absorption et de digestion.

La question du transfert des produits de la lyse

Pour que les produits de la dégénérescence des gamètes puissent entrer dans le cycle de nutrition du bivalve, il est nécessaire que des mécanismes de translocation interviennent. Sur ce point, les données expérimentales faisant défaut, on en est réduit aux hypothèses.

A partir des divers sites de réabsorption mis en évidence ou présumés, le transfert des métabolites peut se faire par diffusion et perméation ou pinocytose, par l'intermédiaire de l'hémolymphe circulante et par le transport puis la redistribution par certains hémocytes. L'incorporation directe de macromolécules dans les ovocytes a été observée chez la moule : elle se fait par pinocytose dans les stades jeunes de l'ovogénèse, avant la formation de l'enveloppe vitelline (Albertini, 1985 ; Pipe, 1987a), et au cours de la lyse ovocytaire (Lubet *et al.*, 1987b). Cela n'a pas été démontré chez *P. maximus*.

Le rôle des hémocytes dans le transfert et la redistribution des métabolites n'est pas vraiment élucidé. Ce qui est certain, c'est que des invasions se produisent dans les tissus et l'hémocoèle sous-jacents à certaines zones comme l'épithélium des gonoductes et le tégument externe que l'on peut considérer comme capables d'assurer une absorption et une digestion de métabolites. Il est intéressant de noter que ces phénomènes sont tout à fait comparables à ce qu'il est possible d'observer entre les parois intestinales, non étudiées dans le cadre de ce travail, et le tissu germinal environnant.

L'origine et le devenir des cellules auxiliaires, dont le rôle dans le transfert de métabolites vers l'ovocyte a été démontré ici, sont loin d'être clairs. Pour Loosanoff (1937) ce seraient les mêmes hémocytes, à rôle macrophagique et nourricier, qui d'une part assureraient le rôle de cellules nourricières des gamètes en formation, d'autre part élimineraient les résidus de la lyse ovocytaire, chez *Mercenaria mercenaria*. L'hypothèse d'une telle filiation entre des hémocytes et les cellules auxiliaires ne peut être totalement écartée chez *P. maximus*. En effet, dans les échantillons du coeur de l'hiver, au début de la période des mitoses goniales, des hémocytes à fonction macrophagique typiques côtoient des cellules déjà accolées aux gonies. Ces macrophages et ces jeunes cellules auxiliaires présentent quelques analogies : leur taille, leur capacité à développer des expansions pseudopodiales, la présence d'inclusions lysosomales. Les cellules auxiliaires sont en tout cas, elles aussi, des structures de transfert, à coup sûr en direction des cellules germinales, mais probablement aussi à partir de leur environnement dont on sait qu'il peut être riche en matériel résiduel. Aucune figure claire de pinocytose n'a à ce jour pu être observée dans le sens acinus-cellule auxiliaire, mais la présence des lysosomes est le signe morphologique d'une aptitude à la digestion.

Les divers résultats actuellement acquis en matière de réabsorption et de translocation montrent donc que la coquille saint-jacques, comme probablement d'autres bivalves, est équipée pour la récupération du matériel cellulaire qu'elle détruit, parfois massivement.

Quand une cohorte d'ovocytes arrive à maturité, son avenir peut prendre trois directions : l'émission, et si celle-ci ne peut avoir lieu pour des causes endogènes ou exogènes, le stockage ou la dégradation. En l'absence de techniques de marquage des cohortes, il n'est pas possible de dire combien de temps les ovocytes matures peuvent être conservés intacts dans les acini. La lyse est toutefois le témoignage de l'impossibilité d'un stockage indéfini sans altération, au moins pour une partie des ovocytes matures.

Si la cohorte ovocytaire parvient à maturité alors que les conditions ne sont pas réunies pour le déclenchement de la ponte, le processus de lyse est engagé. En soi, il s'agit très probablement d'une déviation du fonctionnement normal des lysosomes ovocytaires formés pendant la vitellogenèse : destinés normalement à l'utilisation des réserves vitellines accumulées pour la nutrition de l'embryon, ils se trouvent alors impliqués dans un processus d'autophagie. Les enzymes libérées par la rupture des parois des ovocytes dans la phase ultime de la cytolyse sont susceptibles d'accélérer, voire de provoquer la dégradation des cellules voisines. Des acini entiers peuvent ainsi se structurer, notamment dans les décades précédant la phase de développement maximal de la gonade jusqu'à la ponte.

Qu'une part importante du produit des vagues successives de lyse soit réabsorbée et réincorporée par le bivalve paraît probable, au vu notamment des divers dispositifs successifs dont il dispose pour cela :

- d'abord *in situ*, soit directement, soit par l'intermédiaire des cellules auxiliaires ou des hémocytes ;
- ensuite, au moment de sa libération, au niveau des gonoductes ;
- enfin, après évacuation dans la cavité palléale, dans le tube digestif et peut-être directement par les téguments.

Pour répondre à l'énorme demande énergétique que représente le démarrage et la maturation de cohortes ovocytaires imbriquées, la réutilisation, aussi permanente et complète que possible du matériel germinal qui ne peut être conservé jusqu'à la ponte, est aussi plausible que celle du

glycogène stocké dans le compartiment musculaire. Les deux hypothèses ne s'excluent pas : elles peuvent se compléter dans le temps, en particulier avant le début de la fonte du muscle adducteur et lorsque celui-ci commence à s'épuiser. Ces hypothèses pèchent actuellement l'une comme l'autre par le manque de preuves directes de transferts entre compartiments (muscle-gonade), ou entre générations.

QUALITE DES PONTES

Au moment où les agents responsables du déclenchement de la ponte interviennent, la gonade contient nécessairement des ovocytes de qualités très diverses : des cellules à différents stades de maturation, des cellules matures appartenant peut-être à des cohortes successives, si l'intervalle de temps séparant les cohortes concernées est inférieur ou égal à la durée d'un stockage éventuel, et enfin des cellules à différents stades de dégénérescence. L'examen du produit d'émissions artificiellement induites montre que, dans des conditions forcées, les pontes peuvent refléter cette diversité qualitative. On y trouve en effet plusieurs catégories d'ovocytes immatures et surmatures et des ovocytes apparemment sains et matures qu'un examen cytochimique et des tentatives d'élevages expérimentaux révèlent de qualité variable. Les différences portent sur la quantité de lipides accumulés dans la cellule : les ovocytes les moins pourvus ont une probabilité d'éclosion significativement moins élevée que les plus riches (Dorange *et al.*, 1989c). Si les hypothèses du recyclage des produits de l'atrésie et du transfert des réserves musculaires vers le compartiment génital sont vérifiées, les ovocytes composant la ponte de juillet proviennent pour l'essentiel de la dernière cohorte. Elle a donc dû bénéficier de l'accumulation progressive des réserves en provenance de tous ces apports : peut-être peut-on chercher là l'explication de la meilleure qualité des émissions principales.

Pour la première fois, des gamètes obtenus en éclosérie ont fait l'objet d'un examen détaillé tant cytochimique que cytologique. Les résultats obtenus confirment la variabilité de la compétence des gamètes à donner des larves viables et donc son impact sur le recrutement. Ils soulèvent le problème du conditionnement des géniteurs en éclosérie car, jusqu'à ce jour, cette méthode est appliquée sans contrôle sur la qualité finale des gamètes matures. Il est donc indispensable, pour éviter les échecs dans les élevages contrôlés, de définir les conditions permettant l'obtention de gamètes compétents.

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

- ALBERTINI L., 1985. Recherches cytologiques et expérimentales sur l'ovogenèse chez la moule (*Mytilus edulis* L., Mollusque bivalve). Thèse Doct. Spéc. (3ème cycle), Université de Caen : 147 p.
- ALDANA ARANDA D., 1984. Croissance et composition chimique élémentaire de larves de *Mytilus edulis*, en relation avec la nourriture fournie : algues monocellulaires et bactéries. Thèse 3ème cycle, Université de Brest : 118 p.
- ALLARAKH C., 1979. Recherches histologiques et expérimentales de la différenciation sexuelle et du cycle de reproduction de *Chlamys opercularis*. Thèse 3ème cycle, Université de Caen : 148 p.
- ALLEN S.K.Jr., HIDU H. & STANLEY J.G., 1986. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole, 170 : 198-210.
- ANDERSON W.A. & PERSONNE P., 1970a. The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. J. Cell Biol., 44 : 29-51.
- ANDERSON W.A. & PERSONNE P., 1970b. Recent cytochemical studies on spermatozoa of some invertebrate and vertebrate species. In : Comparative Spermatology. Bacetti B. (Ed.), Academic Press, New York : 431-457.
- ANDERSON W.A. & PERSONNE P., 1976. The molluscan spermatozoon : Dynamic aspects of its structure and function. Am. Zool., 16 : 293-313.
- ANSELL A.D., 1972. Distribution, growth and seasonal changes in biochemical composition of the bivalve *Donax vittatus* (da Costa) from Kames Bay, Millport. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 10 : 137-150.
- ANSELL A.D., DAO J.C., LUCAS A., MACKIE L.A & MORVAN C., 1988. Reproductive and genetic adaptation in natural and transplant population of the scallop *P. maximus* in European waters. Final report on Research carried out under I.I.C. scientific cooperation. Contrat n° ST2J-0058-1-VK-CT : 50 p.
- ANTOINE L., 1979. La croissance de la coquille St-Jacques *Pecten maximus* (L.) et ses variations en mer celtique et en Manche. Thèse 3ème cycle, Université de Brest : 148 p.
- ARNI P., 1974. Licht und elektronen mikroskopische untersucchungen an Embryonen von *Lymnaea stagnalis* L. (Gastropoda, Pulmonata) mit besonderer Berücksichtigung der frühembryonelen Ernährung. Z. Morph. ökol. Tiere, 78 : 299-323.
- AUFFRET M., 1985. Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse Doct. Spéc., Université de Brest : 153 p.

- BAIRD R.H. & GIBSON F.A., 1956. Underwater investigations on an scallop (*Pecten maximus*) L. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 35 : 555-562.
- BAMFORD D., 1982. Epithelial absorption. In : Echinoderm nutrition. Jangoux M. & Lawrence J.M. Publ.. Rotterdam Netherlands : 317-330.
- BARBER B.J., GETCHELL R., SHUMWAY S. & SCHICK D., 1988. Reduced fecundity in a deep-water population of the giant scallop *Placopecten magellanicus* in the Gulf of Maine, U.S.A. Mar. Ecol. (Prog. Ser.), 42 : 207-212.
- BAYNE B.L., GABBOTT P.A. & WIDDOWS J., 1975. Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis*. L. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 55 : 675-689.
- BAYNE B.L., HOLLAND D.L., MOORE M.N., LOWE D.M. & WIDDOWS J., 1978. Further studies on the effects of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 58 : 825-841.
- BESNARD J.Y., 1987. Biochemical investigations on the lipid content of the female gonad of the scallop *Pecten maximus* L. 5th International Pectinid Workshop, Menai Bridge, Wales, U.K. : 15 p.
- BESNARD J.Y., 1988. Etude des constituants lipidiques dans la gonade femelle et les larves de *Pecten maximus* L. (Mollusque Lamellibranche). Thèse Doct. Univ.. Université de Caen : 154 p.
- BLADES-ECKELBARGER P.I. & YOUNGBLUTH M.J., 1984. The ultrastructure of oogenesis and yolk formation in *Labidocera aestiva* (Copepoda : Calanoida). J. Morphol., 179 : 33-46.
- BOUCAUD-CAMOU E., 1973. Etude de l'appareil digestif de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Essai d'analyse expérimentale des phénomènes digestifs. Thèse Doct. Etat, Université de Caen : 208 p.
- BOUCAUD-CAMOU E., 1980. Junctional structures in digestive epithelia of a cephalopod. Tissue and Cell, 12 (2) : 395-404.
- BOUCHER J., 1987. Déterminisme du recrutement de la coquille St-Jacques. Programme et résultats actuels. P.N.D.R., n° 5 : 14 p.
- BOURCART C., LAVALLARD R. & LUBET P., 1965. Ultrastructure du spermatozoïde de la moule (*Mytilus perna* von Ihering). C.R. Acad. Sci. Paris, 260 : 5096-5099.
- BRETSCHNEIDER L.H. & RAVEN CHR.P., 1951. Structural and topochemical changes in the egg cells of *Limnaea stagnalis* L. during oogenesis. Archs. Neerl. Zool., 10 : 1-31.

- BUCKLAND-NICKS J.A. & CHIA F.S., 1977. On the nurse cell and the spermatozeugma in *Littorina sitkana*. *Cell Tissue Res.*, 179 : 347-356.
- BUCKLAND-NICKS J.A. & CHIA F.S., 1986. Fine structure of Sertoli cells in three marine snails with a discussion on the functional morphology of Sertoli cells in general. *Cell Tissue Res.*, 245 : 305-313.
- BURSTONE M.S. & FOLK J.E., 1955. Histochemical demonstration of aminopeptidase. *J. Histochem. Cytochem.*, 4 : 217-226.
- CAMPBELL S.A., MALLAMS A.K., WAIGHT E.S. & WEEDON B.C.L., 1967. Pectenoxanthin, Cynthiixanthin and a new acetylenic carotenoid Pectenolone. *Chem. Comm.*, 755 : 941-942.
- CARR R.S. & NEFF J.M., 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B (3) : 447-449.
- CECCALDI H.J. & TRELLU J., 1975. Apparition des activités enzymatiques digestives dans les oeufs de *Palaemon serratus* Pennant (Crustacé Décapode) au cours de l'embryogenèse. *C.R. Séances Soc. Biol. (Paris)*, 169 (5) : 1249-1255.
- CHAYEN J., BITENSKY L., BUTCHER R.G. & POULTER L.W., 1969. A guide to practical histochemistry. Oliver & Boyd (Ed.), Edinburgh : 261 p.
- CHENG T.C., 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 266 : 343-379.
- CHENG T.C. & FOLEY D.A., 1975. Hemolymph cells of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria* : an electron microscopical study. *J. Invertebr. Pathol.*, 26 : 341-351.
- CHENG T.C. & RODRICK G.E., 1975. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52B : 443-447.
- COCHARD J.C., 1983. Etude de la reproduction de la coquille saint-jacques en milieu artificiel. Rapport du contrat E.P.R. Bretagne-CNEXO, n° 80/6203/F : 61 p.
- COCHARD J.C., 1985. Observations sur la viabilité des oeufs de la coquille saint-jacques en rade de Brest. 5th International Pectinid Workshop, La Coruna, Espagne.
- COCHARD J.C. & GERARD A., 1987. Production artificielle de naissain de coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.) en rade de Brest. Analyse des facteurs affectant la croissance larvaire. 6th International Pectinid Workshop, Menai Bridge, Wales, U.K. : 24 p.

- COE W.R., 1943. Development of the primary gonad and differentiation of sexuality in *Teredo navalis* and other pelecypod molluscs. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, Woods Hole, 84 : 178-186.
- COE W.R. & TURNER M.J., 1938. Development of the gonads and gametes in the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *J. Morphol.*, 62 (1) : 91-111.
- CORI G.T., COLOWICK S.P. & CORI C.F., 1938. The action of nucleotides in the disruptive phosphorylation of glycogen. *J. Biol. Chem.*, 123 : 381-389.
- CYANCARA V.A. & HUANG W., 1978. Tissue alkaline phosphatase activity in selected freshwater teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 60B : 221-224.
- DAKIN W.J., 1909. Memoir on Pecten. *Mem. Lpool Mar. Biol. Commun.* Herdman, Williams & Norgate (Ed.), London, 17 : 230-366.
- DAN J.C. & WADA S.K., 1955. Studies on the acrosome. IV - The acrosome reaction in some bivalve spermatozoa. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, Woods Hole, 109 : 40-55.
- DANIELS E.W., LONGWELL A.C., McNIFF J.M. & WOLFGANG R.W., 1971. Ultrastructure of spermatozoa from american oyster *Crassostrea virginica*. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 90 (3) : 275-282.
- DANIELS E.W., LONGWELL A.C., McNIFF J.M. & WOLFGANG R.W., 1973. Ultrastructure of oocytes from the american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 92 (3) : 337-349.
- DANILOVA L.V., 1976. Mécanismes ultrastructuraux du transport nucléoplasmique des substances au cours de la spermatogenèse. *Nelles Acad. Sci., U.R.S.S., Ser. Biol.*, 2 : 281-291.
- DE DUVE C., 1969. The lysosome in retrospect. In : *Lysosomes in Biology and Pathology*. Dingle J.T. and Fell H.B. (Ed.), Amsterdam and London : North-Holland Publ., Vol. 1 : 3-40.
- DE DUVE C., 1987. Une visite guidée de la cellule vivante. *Pour la Science*. Belin (Ed.), Paris : 437 p.
- DE JONG-BRINK M., BOER H.H., HOMMES T.G. & KODDE A., 1977. Spermatogenesis and role of Sertoli cells in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Cell Tissue Res.*, 181 : 37-58.
- DE JONG-BRINK M., BOER H.H. & JOOSSE J., 1983. Oogenesis oviposition and oosorption. In : *The Mollusca. Reproductive Biology of Invertebrate*. Adiyodi K.G. & Adiyodi R.G. (Ed.), John Wiley, Chichester, New York, Vol. 1. : 297-355.
- DECROLY M., GOLDFINGER M. & SIX-TONDEUR N., 1979. Biochemical characterization of lysosomes in unfertilized eggs of *Xenopus laevis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 587 : 567-578.

- DHAINAUT A. & PORCHET M., 1977a. Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. II - Etude autoradiographique des ovocytes jeunes. *Biol. Cell.*, 28 : 233-240.
- DHAINAUT A. & PORCHET M., 1977b. Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. III - Etude autoradiographique des ovocytes submatures. *Biol. Cell.*, 28 : 241-250.
- DINGLE J.T., 1977. *Lysosomes. A laboratory handbook*. 2nd ed. Dingle J.T. (Ed.). Elsevier North-Holland, Biomedical Press : 323 p.
- DOHMEN M.R., 1983. Gametogenesis. In : *The Mollusca. Development*. Verdonk N.H., Van den Biggelaar J.A.H. & Tompa A.S. (Ed.). Academic Press, London, Vol. 3 : 1-48.
- DONVAL-HILY A., 1984. Etude ultrastructurale et histoenzymologique de l'appareil digestif chez le juvénile de *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). Thèse Doct. Spéc., Université de Brest : 115 p.
- DORANGE G. & LE PENNEC M., 1989a. Ultrastructure of spermatogenesis in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.*, 15 (2) : 109-117.
- DORANGE G. & LE PENNEC M., 1989b. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the bay of St-Brieuc. *Mar. Biol.*, 103 : 339-348.
- DORANGE G., PAULET Y.M. & LE PENNEC M., 1989a. Etude cytologique de la partie femelle de la gonade de *Pecten maximus* récolté en baie de Saint-Brieuc. 1. Caractéristiques ultrastructurales des tissus somatiques. *Haliotis*, 19 : 287-297.
- DORANGE G., PAULET Y.M. & LE PENNEC M., 1989b. Etude cytologique de la partie femelle de la gonade de *Pecten maximus* récolté en baie de Saint-Brieuc. 2. Etude ultrastructurale de l'ovogenèse et de la lyse ovocytaire. *Haliotis*, 19 : 299-314.
- DORANGE G., PAULET Y.M., LE PENNEC M. & COCHARD J.C., 1989c. Critères d'évaluation de la qualité des ovocytes émis par *Pecten maximus* (Mollusque Bivalve). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 309 (III) : 113-120.
- ECKELBARGER K.J., 1980. An ultrastructural study of oogenesis in *Streblospio benedicti* (Spionidae) with remarks on diversity of vitellogenic mechanisms in Polychaeta. *Zoomorphology*, 94 : 241-263.
- ECKELBARGER K.J. & GRASSLE J.P., 1982. Ultrastructure of the ovary and oogenesis in the polychaete *Capitella jonesi* (Hartman, 1959). *J. Morphol.*, 171 : 305-320.

- ECKELBARGER K.J. & GRASSLE J.P., 1983. Ultrastructural differences in the eggs and ovarian follicles cells of *Capitella* (Polychaeta) sibling species. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, Woods Hole, 165 : 379-393.
- ECKELBARGER K.J. & RICE S.A., 1988. Ultrastructure of oogenesis in the holopelagic polychaetes *Rhynchonerella angelini* and *Alciopa reynaudii* (Polychaeta : Alciopidae). *Mar. Biol.*, 98 : 427-439.
- EPP J., BRICELJ V.M. & MALOUF R.E., 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 121 : 113-136.
- FAIN-MAUREL M.A. & CASSIER P., 1969. Différenciations cytoplasmiques en relation avec la fonction excrétrice dans les reins céphaliques de *Petrobius maritimus* Leach (Insecte, Aptérygote). *J. Microscopie*, 10 : 163-178.
- FENG S.Y., FENG J.S., BURKE C.N. & KHAIRALLAH L.H., 1971. Light and electron microscopy of the leucocytes of *Crassostrea virginica* (Mollusca : Pelecypoda). *Z. Zellforsch.*, 120 : 222-245.
- FERRAND J.G. & DELAVault R., 1973. Histochimie des polysaccharides et des lipides dans les ovocytes fonctionnels mûrs d'*Asterina gibbosa* (Echinoderme, Astéride). *C.R. Acad. Sci., Paris*, 276 (D) : 1573-1575.
- FRANZEN A., 1955. Comparative morphological investigations into the spermiogenesis among mollusca. *Zool. Bidr. Upps.*, 30 : 399-456.
- FRANZEN A., 1956. On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. *Zool. Bidr. Upps.*, 31 : 355-482.
- FRANZEN A., 1970. Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. In : *Comparative spermatology*. Baccetti B. (Ed.). Academic Press, New York : 29-46.
- FRANZEN A., 1983. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. *Gamete Res.*, 7 : 199-214.
- GABBOTT P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs : a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In : *Biochemistry, Physiology and Behaviour of Marine Organisms in relation to their Ecology*. Proc. 9th Eur. Mar. Biol. Symp. Barnes H. (Ed.), Aberdeen Univ. Press, Aberdeen : 191-211.
- GABBOTT P.A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In : *The Mollusca. Environmental biochemistry and physiology*. Hochachka P.W. (Ed.), Academic press, London, Vol. 2 : 165-217.

- GABE M., 1968. Techniques histologiques. Masson & Cie (Ed.), Paris : 1133 p.
- GALANGAU M.V., 1969. Etude en microscopie électronique de la gamétogenèse de *Milax gagates* (Draparnaud, 1801) (Gastéropodes. Pulmonés. Limacidae). Evolution des ultrastructures au cours de la spermatogenèse chez différents types de mollusques. Thèse Doct. Etat, Université de Montpellier : 151 p.
- GALLAGER S.M. & MANN R., 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, 56 : 105-121.
- GALTSOFF P.S. & PHILPOTT D.E., 1960. Ultrastructure of the spermatozoon of the oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Ultrastruct. Res.*, 3 : 241-253.
- GANTER P. & JOLLES G., 1969. Histochimie normale et pathologique. Gauthier-Villars (Ed.), Paris, Vol. 1 : 1-923.
- GANTER P. & JOLLES G., 1970. Histochimie normale et pathologique. Gauthier-Villars (Ed.), Paris, Vol. 2 : 924-1904.
- GHARAGOZLOU-VAN GINNEKEN I.D. & POCHON-MASSON J., 1971. Etude comparative infrastructurale du spermatozoïde chez les palourdes de France. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 112 : 805-817.
- GIESE A.C., 1966. Lipids in the economy of marine invertebrates. *Physiol. Rev.*, 46 : 244-298.
- GIESE A.C., 1969. A new approach to the biochemical compositions of the mollusc body. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 7 : 175-229.
- GIESE A.C. & PEARSE J.S., 1979. Reproduction of marine Invertebrates. Molluscs : Pelecypods and lesser classes. Giese A.C. & Pearse J.S. (Ed.), Academic Press, New York, Vol. 5 : 112-292.
- GORI P., 1977. Ponceau 2R staining on semi-thin sections of tissues fixed in glutaraldehyde-osmium tetroxide and embedded in epoxy resins. *J. Microscopy*, 110 (2) : 163-165.
- GRANT W.S., CHERRY M.I. & LOMBARD A.T., 1984. A cryptic species of *Mytilus* (Mollusca : Bivalvia) on the west coast of South Africa. *S. Afr. J. Mar. Sci.*, 2 : 149-162.
- GRUFFYDD L.L.D. & BEAUMONT A.R., 1970. Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* L. (Mollusca, Lamellibranchia). *Helgol. Meeresunters.*, 20 : 486-497.

- GUTIERREZ M., PEREZ CRESPO J. & PASCUAL E., 1978. Ultraestructura de ovocitos y espermatozoides del ostion, *Crassostrea argulata* Lmk. de la costa sudatlantica de Espana. *Inv. Pesq.* 42(1) : 167-178.
- HAIGLER S.A., 1964. A histochemical and cytological study of the "brown cells" found in "auricular pericardial gland" and other tissues of the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Master's thesis, University of Delaware.
- HELM M.M., HOLLAND D.L. & STEPHENSON R.R., 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 53 : 673-684.
- HERLIN-HOUTTEVILLE P. & LUBET P.E., 1975. The sexuality of pelecypod molluscs. In : *Intersexuality in animal kingdom*. Reinboth R. (Ed.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New-York, : 179-187.
- HERRY A. & LE PENNEC M., 1987. Ultrastructure de la gonade d'un Mytilidae hydrothermal profond de la ride du Pacifique Oriental. *Haliotis*, 16 : 295-307.
- HODGSON A.N. & BERNARD R.T.F., 1986. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of mytilidae (Mollusca, Bivalvia). *Gamete Res.*, 15 : 123-135.
- HODGSON C.A. & BURKE R.D., 1988. Development and larval morphology of the spiny scallop, *Chlamys hastata*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, Woods Hole, 174 : 303-318.
- HOLLAND D.L., 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. In : *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Malins D.C. & Sargent J.R. (Ed.), Academic Press, London, Vol. 4 : 85-123.
- HOLLAND D.L. & SPENCER B.E., 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 53 : 287-298.
- HOLLANDE E., 1972. Recherches cytologiques et expérimentales sur les glandes multifides de l'Escargot *Helix pomatia* (L.) : le cycle de l'appareil de Golgi pendant l'élaboration des mucoprotéines. *Thèse Doct. Etat*, Université de Paris VI : 217 p.
- HOUDRY J., 1974. Mise en évidence d'une activité phosphatasique acide. *J. Microscopie*, 21 : 245-252.
- ISHIKAWA M., 1975. Fertilization. In : *The Sea Urchin Embryo*. Czihak G. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg : 99-149.

- KANE R.E., 1970. Direct isolation of the hyaline layer protein released from the cortical granules of the sea urchin egg at fertilization. *J. Cell Biol.*, 45 : 615-622.
- KESSEL R.G., 1982. Differentiation of *Acmaea digitalis* oocytes with special reference to lipid-endoplasmic reticulum -annulate lamellae- polyribosome relationships. *J. Morphol.*, 171 : 225-243.
- KREBS E.G. & FISHER E.H., 1962. Molecular properties and transformations of glycogen phosphorylase in animal tissues. *Adv. Enzymol.*, 24 : 263-290.
- KUBO M., ISHIKAWA M. & NUMAKUNAI T., 1979. Ultrastructural studies on early events in fertilization of the bivalve *Laternula limicola*. *Protoplasma*, 100 : 73-83.
- LANE N.J., 1978. Intercellular junctions and cell contacts in Invertebrates. Electron microscopy. *State of the Art Symposia, Proc. 9th Int. Cong. Electron Microscopy*. Sturges J.M. (Ed.), Imperial Press, Canada, Vol. 3 : 673-691.
- LAWRENCE J.M., 1982. Digestion. In : *Echinoderm nutrition*. Jangoux M. & Lawrence J.M., Publ., Rotterdam, Netherlands : 283-316.
- LE PENNEC M., 1974. Une nouvelle forme d'élevage marin : la pectiniculture. *Penn ar Bed : "L'aquaculture marine"*, 9 : 31-45.
- LELOIR L.F., 1967. Regulation of glycogen metabolism. In : *Inter. Symp. Enzym. Asp. Met. Regul.* National Cancer Inst. Monograph 27 U.S. Dept of Health, Education and Welfare. Washington, D.C. : 3-18.
- LISON L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. Gauthier-Villard (Ed.), Paris, Vol. 2 : 398-842.
- LOEWENSTEIN W.R. & KANNO Y., 1964. Studies on an epithelial (gland) cell functions. I - Modifications of surface membrane permeability. *J. Cell Biol.*, 22 : 565-586.
- LONGO F.J., 1976. Cortical changes in *Spisula* eggs upon insemination. *J. Ultrastruct. Res.*, 56 : 226-232.
- LONGO F.J., 1983. Meiotic maturation and fertilization. In : *The Mollusca. Vol. 3 : Development*. Tompa A.S., Verdonk N.H. & Van Den Biggelaar J.A.M. (Ed.), Academic Press : 49-89.
- LONGO F.J. & DORNFELD E.J., 1967. The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*. *J. Ultrastruct. Res.*, 20 : 462-480.
- LOOSANOFF V.L., 1937. Development on the primary gonad and sexual phases in *Verus mercenaria* L. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*, 72 : 389-405.

- LOOSANOFF V.L. & DAVIS H.C., 1963. Rearing of bivalve molluscs. In : *Advances in Marine Biology*. Russel F.S. (Ed.), Academic Press, London, Vol. 1 : 1-136.
- LOWE D.M., MOORE M.N. & BAYNE B.L., 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 62 : 133-145.
- LUBET P., 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinidés. *Rev. Trav. Inst. (Scient. tech.) Pêch. Marit.*, 23 : 387-548.
- LUBET P., BRICHON G., BESNARD J.Y. & ZWINGELSTEIN G., 1986. Sexual differences in the composition and metabolism of lipids in the mantle of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk (Mollusca, Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol.*, 84B, 3 : 279-285.
- LUBET P., DORANGE G. & ROBBINS I., 1987a. Cytological investigations on the annual reproductive cycle of the scallop (*Pecten maximus* L.) from the channel. Vith International Pectinid Workshop, Menai Bridge, Wales, U.K.
- LUBET P., BESNARD J.Y., FAVERIS R. & ROBBINS I., 1987b. Physiologie de la reproduction de la coquille St-Jacques (*Pecten maximus* L.). *Oceanis*, 13 (3) : 265-290.
- LUBET P., BESNARD J.Y. & FAVERIS R., 1987c. Compétition énergétique entre tissus musculaire et gonadique chez la coquille St Jacques (*Pecten maximus* L.) (mollusque bivalve). *Haliotis*, 16 : 173-180.
- LUCAS A., 1965. Recherche sur la sexualité des Mollusques Bivalves. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 99 : 115-247.
- LUCAS A., 1971. Les gamètes des mollusques. *Haliotis*, 1 : 185-214.
- LUCAS A., 1980. Problèmes de génétique, d'écophysiologie et de pathologie dans les écloséries de bivalves. *Oceanis*, 6(5) : 511-533.
- LUCAS A., 1984. Développement contrôlé des bivalves marins. *Haliotis*, 14 : 143-158.
- LUCAS A., CHEBAB-CHALABI L. & ALDANA ARANDA D., 1986. Passage de l'endotrophie à l'exotrophie chez les larves de *Mytilus edulis*. *Oceanol. Acta*, 9 : 97-103.
- MACKIE G.L., 1984. Bivalves. In : *The Mollusca*. Tompa A.S., Verdonk N.H. & Van Den Biggelaar J.A.M. (Ed.), Academic Press, London, Vol. 7 : 351-415.
- MASON J., 1958. The breeding of the scallop *Pecten maximus* (L.) in Manx waters. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 37 : 653-671.

- MASON J., 1983. Scallop and Queen fisheries in the British Isles. Fishing News Book Ltd, Farnham Surrey, England : 144 p.
- MASUDA R. & DAN J.C., 1977. Studies on the annual reproductive cycle of the sea urchin and the acid phosphatase activity of relict ova. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole, 153 : 577-590.
- MAZLIAK P., 1975. Lysosomes, glyoxysomes, peroxysomes. Doin (Ed.), Paris : 124 p.
- MEDHIOUB N.M. & LUBET P., 1988. Recherches cytologiques sur l'environnement cellulaire ("tissus de réserve") des gonades de la palourde (*Ruditapes philippinarum* Adams et Reeve), Mollusque Bivalve, Ann. Sci. Nat. (B Zool.), 9 : 81-86.
- MICHEL C., 1969. Ultrastructure et histochimie de la cuticule pharyngienne chez *Eulalia viridis* Müller (Annélide Polychète Errante, Phyllodocidae). Etude de ses rapports entre l'épithélium sous-jacent dans le cycle digestif. Z. Zellforsch., 98 : 54-73.
- MIKI W., YAMAGUSHI K. & KOWOSU S., 1982. Comparison of carotenoid in the ovary of marine fish and shellfish. Comp. Biochem. Physiol. (B Comp. Biochem.), 71, 1 : 7-11.
- MONNAT J.Y., 1970. Mise en évidence de l'hermaphrodisme simultané de *Lucinoma borealis* (L.) var. minor. (Dautzenberg) (Pélécy-pode, Lucinacea). C.R. Acad. Sci. Paris, 270 : 2302-2304.
- MONNERON A. & BERNHARD W., 1966. Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en epon. J. Microscopie, 5 : 697-714.
- MOORE M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. Cell Tissue Res., 175 : 279-287.
- MOORE C.A. & EBLE D.F., 1977. Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* hemocytes. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole, 152 : 105-119.
- MOORE M.N. & LOWE D.M., 1977. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. J. Invertebr. Pathol., 29 : 18-30.
- MORVAN C., 1987. Cycle de reproduction et fécondité de deux espèces de bivalves dans le Golfe normano-breton. Thèse Doct. Univ., Université de Brest : 172 p.
- MOTAVKINE P.A. & VARAKSINE A.A., 1983. Histophysiologie du système nerveux et régulation de la reproduction chez les mollusques bivalves. Sciences (Ed.), Moscou : 208 p. (Traduit du Russe par Bellon-Humbert C., sous presse aux eds IFREMER).

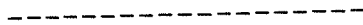
- NAIDU K.S., 1970. Reproduction and breeding cycle of the giant scallop *Plactopecten magellanicus* (Gmelin) in Port au Port Bay, Newfoundland. *Can. J. Zool.*, 48 : 1003-1012.
- NIIJIMA L. & DAN J., 1965. The acrosome reaction in *Mytilus edulis*. I - Fine structure of the intact acrosome. *J. Cell Biol.*, 25 : 243-248.
- OCKELMANN K., 1965. Developmental types in marine bivalves and their distribution along the Atlantic coast of Europe. *Proc. 1st Eur. Malacol. Congr.* : 25-35.
- OLIVE P.J.W. & PILLAI G., 1983. Reproductive biology of the polychaete *Kefersteinia cirrata* Keferstein (Hesionidae). I - Ovary structure and oogenesis. *Int. J. Invertebr. Reprod.*, 6 : 295-306.
- PARIVAR K., 1980. Differentiation of Sertoli cells and post-reproductive epithelial cells in the hermaphrodite gonad of *Arion ater* (L.) (Mollusca, Pulmonata). *J. Molluscan Stud.*, 46 : 139-147.
- PASTEELS J.J., 1973. Yolk and lysosomes. In : *Lysosomes in Biology and Pathology*. Dingle J.T. (Ed.), Elsevier, North-Holland Biomedical, Amsterdam, Vol. 3 : 216-234.
- PATTERSON E.K., HSIAO S.H. & KEPPEL A., 1963. Studies on dipeptidases and aminopeptidases. I. Distinction between leucine aminopeptidase and enzymes that hydrolyse L-Leucyl- β -naphthylamide. *J. Biol. Chem.*, 238 : 3611-3620.
- PAULET Y.M., GERARD A. & LUCAS A., 1986. Reproduction strategy of two populations of *Pecten maximus*. In : *Advances in invertebrate reproduction*. Porchet M., Andries J.C., Dhainaut A. (Ed.), Elsevier Sc. publ. : 535.
- PAULET Y.M., LUCAS A. & GERARD A., 1988. Reproduction and larval development in two *Pecten maximus* (L.) populations from Brittany. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 119 : 145-156.
- PAULET Y.M., DORANGE G., COCHARD J.C. & LE PENNEC M., 1989. Quality assessment of spawned oocytes of *Pecten maximus*. 7th International Pectinid Workshop, Portland, Maine, U.S.A.
- PEARSE A.G.E., 1968. *Histochemistry theoretical and applied*. Churchill Livingstone (Ed.), Edinburgh & London, Vol. I : 1-760.
- PEARSE A.G.E., 1972. *Histochemistry theoretical and applied*. Churchill Livingstone (Ed.), Edinburgh & London, II : 761-1518.
- PEREDO S. & PARADA E., 1984. Gonadal organization and gametogenesis in the fresh-water mussel *Diplodon chilensis chilensis* (Mollusca : Bivalvia). *Veliger*, 27 (2) : 126-133.

- PERES S., 1981. Estudio do ciclo reprodutivo de *Pecten ziczac*. Thesis Dep. Fisiologia, Inst. biosciencias, Université de Sao Paulo. 124 p.
- PIPE R.K., 1985. Seasonal cycles in and effects of starvation on egg development in *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. (Prog. Ser.), 24 : 121-128.
- PIPE R.K., 1987a. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* : an ultrastructural study. Mar. Biol., 95 : 405-414.
- PIPE R.K., 1987b. Ultrastructure and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol., 96 : 519-528.
- PIPE R.K. & MOORE M.N., 1985. The ultrastructural localization of lysosomal acid hydrolases in developing oocytes of the common marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem. J., 17 : 939-949.
- POCHON-MASSON J. & GHARAGOZLOU I.D., 1970. Particularité morphologique de l'acrosome dans le spermatozoïde de *Tapes decussatus* L. (Mollusque Lamellibranche). Ann. Sci. Nat. (B Zool), 12 : 171-180.
- POPHAM J.D., 1979. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. Malacol. Rev., 12 : 1-20.
- POPHAM J.D., DICKSON M.R. & GODDARD C.K., 1974. Ultrastructural study of the mature gametes of two species of *Bankia* (Teredinidae : Mollusca). Aust. J. Zool., 22 : 1-12.
- PORTER R.G., 1974. Reproductive cycle of the soft-shell clam *Mya arenaria*, at Skagit Bay, Washington. Fish. Bull., 72 : 648-656.
- POSEN S., 1967. Alkaline phosphatase. Ann. Intern. Med., 67 : 183-203.
- PRIEUR D., 1981. Les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Etude analytique et expérimentale. Thèse Doct. Etat, Université de Brest : 266 p.
- RASMUSSEN L.P.D., HAGE E. & KARLOG O., 1985. An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis*. J. Invertebr. Pathol., 45 : 158-167.
- RAVEN G.P., 1966. Morphogenesis : the analysis of molluscan development. 2nd ed., Pergamon Press, New York : 337 p.
- REDDIAH K., 1962. The sexuality and spawning of Manx Pectinids. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 42 : 683-703.
- REYNOLDS E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17 : 208-212.

- RICE M.A. & STEPHENS G.C., 1987. Uptake and internal distribution of exogenously supplied amino acids in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 66 : 19-31.
- RIGBY J.E., 1982. The fine structure of differentiating spermatozoa and Sertoli cells in the gonad of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Molluscan Stud.*, 48 : 111-123.
- ROOSEN-RUNGE E.C., 1977. The process of spermatogenesis in animals. Cambridge Univ. Press., London and New York : 214 p.
- RUDDELL C.L., 1971. Elucidation of the nature and function of the granular oyster amoebocytes through histochemical studies of normal and traumatized oyster tissues. *Histochem.*, 26 : 98-112.
- RUDDELL C.L. & WILLINGS S.R., 1971. The ultrastructure of the Oyster Brown Cell, a cell with a fenestrated plasma membrane. *Z. Zellforsch.*, 120 : 17-28.
- RUSSEL L.D., 1980. Sertoli-germ cell interrelations : A review. *Gamete Res.*, 3 : 179-202.
- SASTRY A.N., 1962. Some morphological and ecological differences in two closely related species of scallops, *Aequipecten irradians* Lamarck and *Aequipecten gibbus* Dall, from the Gulf of Mexico. *Q. J. Fla. Acad. Sci.*, 25 : 89-95.
- SASTRY A.N., 1970. Environmental regulation of oocytes growth in the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. *Experientia*, 26 : 1361-1372.
- SASTRY A.N., 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). In : *Reproduction of Marine Invertebrates*. Giese A.C. & Pearse J.S. (Ed.), Academic Press, New York, Vol. 5 : 113-292.
- SHEAR M. & PEARSE A.G.E., 1963. A starch substrate film method for the histochemical localization of amylase. *Exptl. Cell. Res.*, 32 : 174-177.
- SILBERZAHN N., 1979. Les cellules de la lignée femelle chez un hermaphrodite protandre *Crepidula fornicata*, mollusque prosobranche. *Ann. Soc. Fr. Biol. Dev.*, Paris : 17-18.
- SPURR A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26 : 31-43.
- SYLVEN B. & BOIS L., 1962. Studies on the histochemical "Leucine Aminopeptidase" reaction. I - Identity of the enzymes possibly involved. *Histochem.*, 3 : 65-78.
- SYLVEN B. & BOIS I., 1963. Studies on the histochemical "Leucine Aminopeptidase" reaction. II - Chemical and histochemical comparison of the enzymatic and environment factors involved. *Histochem.*, 3 : 341-353.

- TANG S.F., 1941. The breeding of the scallop, *Pecten maximus* L., with a note on the growth rate. Proc. Lpool Biol. Soc., 54 : 9-28.
- TEBBLE N., 1966. British Bivalve Seashells. Trustees of The British Museum (Natural History). The Alden Press Ltd, Oxford : 212 p.
- THIERY J.P. & RAMBOURG A., 1974. Cytochimie des polysaccharides. J. Microscopie, 21 : 225-232.
- UBBELS G.A., 1968. A cytochemical study of oogenesis in the pond snail *Limnaea stagnalis*. Ph. D. Thesis, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands.
- VARADARAJAN S. & SUBRAMONIAM T., 1980. Histochemical investigations on vitellogenesis of an anomuran crab, *Clibanarius clibanarius*. Int. J. Invertebr. Reprod., 2 : 47-58.
- ZABA B.N., 1981. Glycogenolytic pathways in the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. Mar. Biol. Lett., 2 : 67-74.
- ZERBIB C., 1976. Nature chimique des enclaves vitellines de l'ovocyte du Crustacé Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). Ann. Histochem., 21 : 279-295.

- ANNEXES -



CALENDRIER DES PRÉLÈVEMENTS

	1986		1987	
	20 janvier			
	20 février			
	20 mars			
	23 avril			
	13 mai		20 mai	
	2 juin			
	9 juin			
	16 juin			
	23 juin		22 juin	
Première ponte partielle dans le milieu naturel	} 30 juin 5 juillet 8 juillet		27 juin	} Première ponte partielle dans le milieu naturel
			1 juillet	
			5 juillet	
			7 juillet	
	12 juillet			
	16 juillet		15 juillet	
	21 juillet			
Deuxième ponte générale et mas- sive dans le milieu naturel	} 25 juillet 5 août 19 août		23 juillet	} Deuxième ponte générale et massive dans le milieu naturel
			29 juillet	
			5 août	
			13 août	
	14 octobre		20 août	
	19 novembre			
	9 décembre			

TECHNIQUES HISTOENZYMOLOGIQUES

Lipase (GOMORI, 1952, d'après GABE, 1968)

- Incuber 24 h à 37°C dans :
 - 1 ml de Tween à 5 %
 - 45 ml de tampon Tris 0.1 M à pH 7.4
 - 3 ml de CaCl₂ à 2 % dans l'eau distillée.
- Laver 10 mn à l'eau.
- Traiter 10 mn au nitrate de plomb à 2 % dans l'eau distillée.
- Rincer 10 mn à l'eau.
- Traiter 2 mn par du sulfure d'ammonium à 10 % dans l'eau distillée.
- Laver 3 mn à l'eau.
- Monter à la gélatine glycérimée.

Estérase (BURSTONE, 1956, d'après GABE, 1968)

- Incuber 10 mn au froid dans :
 - 1 ml d'acétate d'a naphthyl AS-10 à 1 % dans le méthanol
 - 5 ml d'eau distillée
 - 5 ml de tampon Sørensen 0.2 M à pH 8
 - 25 mg de Fast Blue B salt.
- Laver à l'eau distillée.
- Monter à la gélatine glycérimée.

Leucine Amino-Peptidase (BURSTONE et FOLK, 1955)

- Incuber 30 mn à 25°C dans :
 - 40 ml d'eau distillée
 - 10 ml de tampon Tris 0.2 M à pH 7.1
 - 10 mg de L leucine β naphtylamide HCl
 - 30 mg de Fast Garnet.
- Laver à l'eau distillée.
- Monter à la gélatine glycérimée.

Phosphatase Alcaline (GOMORI, 1952, d'après GABE, 1968)

- Incuber 10 mn à la température ambiante dans :
 - 10 mg d'a naphthyl phosphate sodique
 - 45 ml d'eau distillée
 - 5 ml de borax à 4 %
 - 3 gouttes de MgSO₄ à 10 %
 - 20 mg de Fast Garnet GBC.
- Monter à la gélatine glycérimée.

Phosphatase Acide

(GROGG et PEARSE, 1952, d'après GABE, 1968)

- Incuber à 37°C pendant 1 h dans :
 - 20 mg d'a naphtyl phosphate sodique
 - 20 ml de tampon Walpole 0,1 M à pH 5
 - 25 mg de Fast Garnet GBC.
- Rincer à l'eau courante 1 à 2 mn.
- Monter à la gélatine glycérimée.

β -Glucuronidase (MOORE, 1976)

- Incuber à 37°C pendant 40 mn dans :
 - 14 mg naphthol AS BI glucuronide dissous dans 0,6 ml NaHCO₃ 0,05 M
 - 50 ml de tampon acétate 0,2 M à pH 4,5 contenant 2,5 % de CaCl₂
 - 5 g de polypeptide.
- Rincer au NaCl à 2,5 %.
- Postcoupler par 20 mg de Fast Red violet ou de Fast Blue B dans 20 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4.
- Monter à la gélatine glycérimée.

N-Acetyl Glucosaminidase (MOORE, 1976)

- Incuber à 37°C pendant 40 mn dans :
 - 15 ml de mélange de naphthol AS BI glucosaminide dissous dans 2,5 ml de méthoxyéthanol
 - 50 ml de tampon citrate 0,1 M à pH 4,5 contenant 2,5 % de NaCl et 5 g de polypeptide.
- Rincer au NaCl à 2,5 %.
- Postcoupler par 20 mg de Fast Red Violet dans 20 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4.
- Monter à la gélatine glycérimée.

Arylsulfatase (LOWE, MOORE et BAYNE, 1982)

- Incuber pendant 20 mn à 40°C dans :
 - 47,5 ml de tampon acétate 0,1 M pH 5,5 contenant 2,5 % de NaCl
 - 30 mg de naphthol AS BI sulfate dans 2,5 ml de méthoxyéthanol.
- Rincer avec NaCl à 2,5 %.
- Postcoupler 10 mn à température ambiante par 1 mg/ml de Fast Violet B dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4.
- Laver à l'eau distillée.
- Monter à la gélatine glycérimée.

Amylase (SHEAR et PEARSE, 1963)

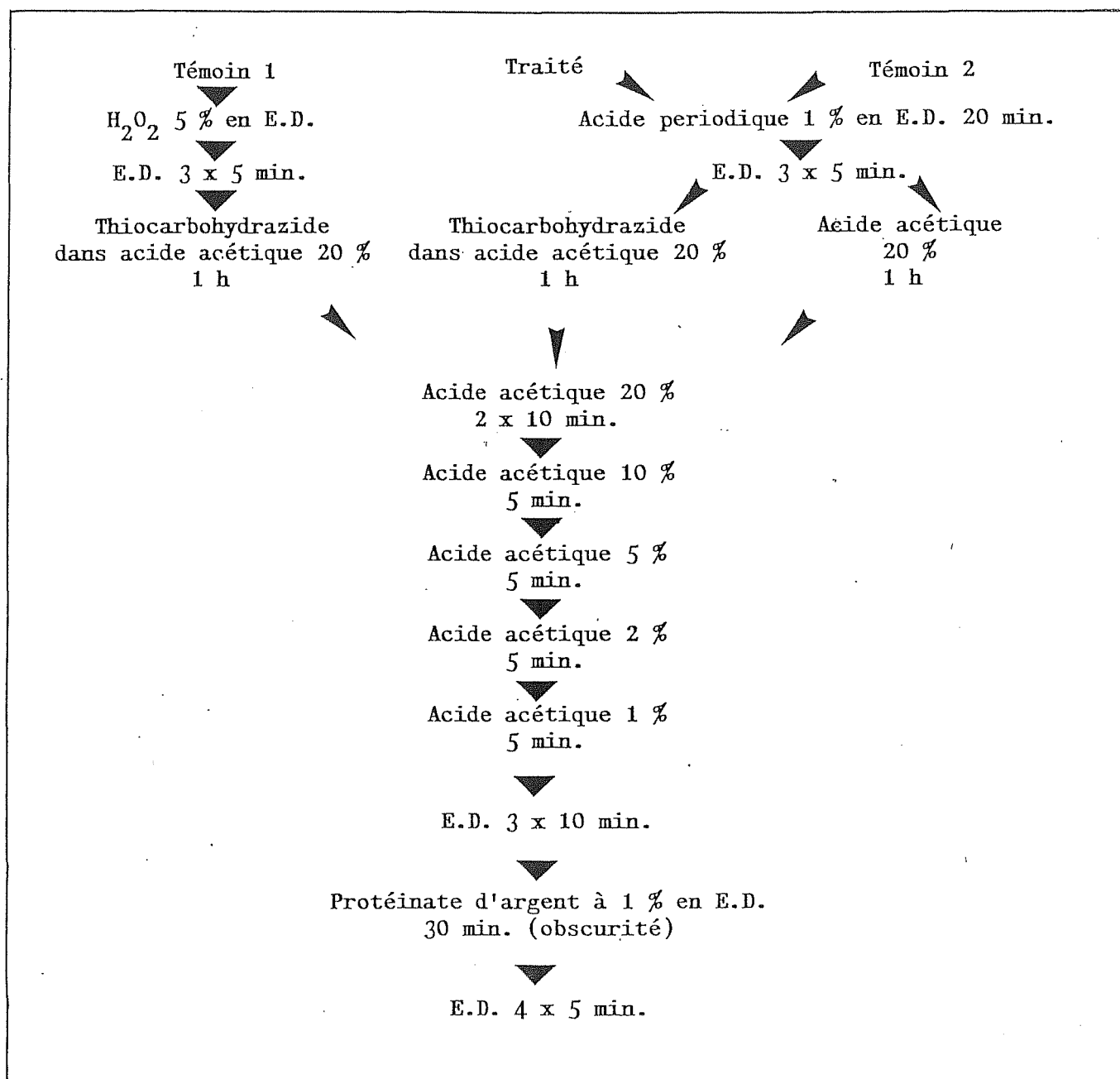
- Préparation du film d'amidon :
 - 2,5 g d'amidon soluble
 - 50 ml de tampon à 0,02 M d'acide borique et 0,01 M de NaOH
 - chauffer en agitant doucement jusqu'à clarification de la solution
 - dégazer sous vide
 - étendre sur lame dégraissée : sécher en position verticale
 - fixer 18 h par le mélange méthanol/ eau distillée / acide acétique (50/50/10)
- Laver 2 mn à l'eau distillée, sécher.
- Appliquer les coupes à congélation sur le film.
- Incuber 10-20 mn à 37°C en atmosphère humide.
- Fixer pendant 1 h dans le mélange méthanol/eau/acide acétique.
- Laver à l'eau distillée.
- Colorer 1 mn au lugol.
- Laver jusqu'à ce que le film d'amidon se colore en bleu.
- Monter en gélatine glycinée lugolée.

Phosphorylase b

(TAKEUCHI et KURIAKI, 1953 ; GODLEWSKI (1960-1964)
d'après CHAYEN, BITENSKI, BUTCHER et POULTER (1969)

- Maintenir les coupes 10 mn à température ambiante.
- Incuber 20 mn à 37°C dans :
 - 50 mg glucose-1-phosphate
 - 15 mg fluorure de sodium
 - 10 mg A.M.P.
 - 5 mg glycogène
 - 10 UI insuline
 - 10 mg A.T.P.
 - 10 mg sulfate de magnésium
 - 15 ml eau distillée
 - 10 ml tampon acétate 0,1 M pH 5,8
- Laver rapidement à l'eau distillée.
- Immerger les coupes 30 sec dans du lugol dilué au demi dans de l'eau distillée.
- Laver à l'eau.
- Monter à la gélatine glycinée lugolée (gélatine glycinée + lugol V/V).

➤ DÉTECTION DU GLYCOGÈNE SUR COUPES ULTRAFINES
TECHNIQUE DE THIERY ET RAMBOURG (1974)

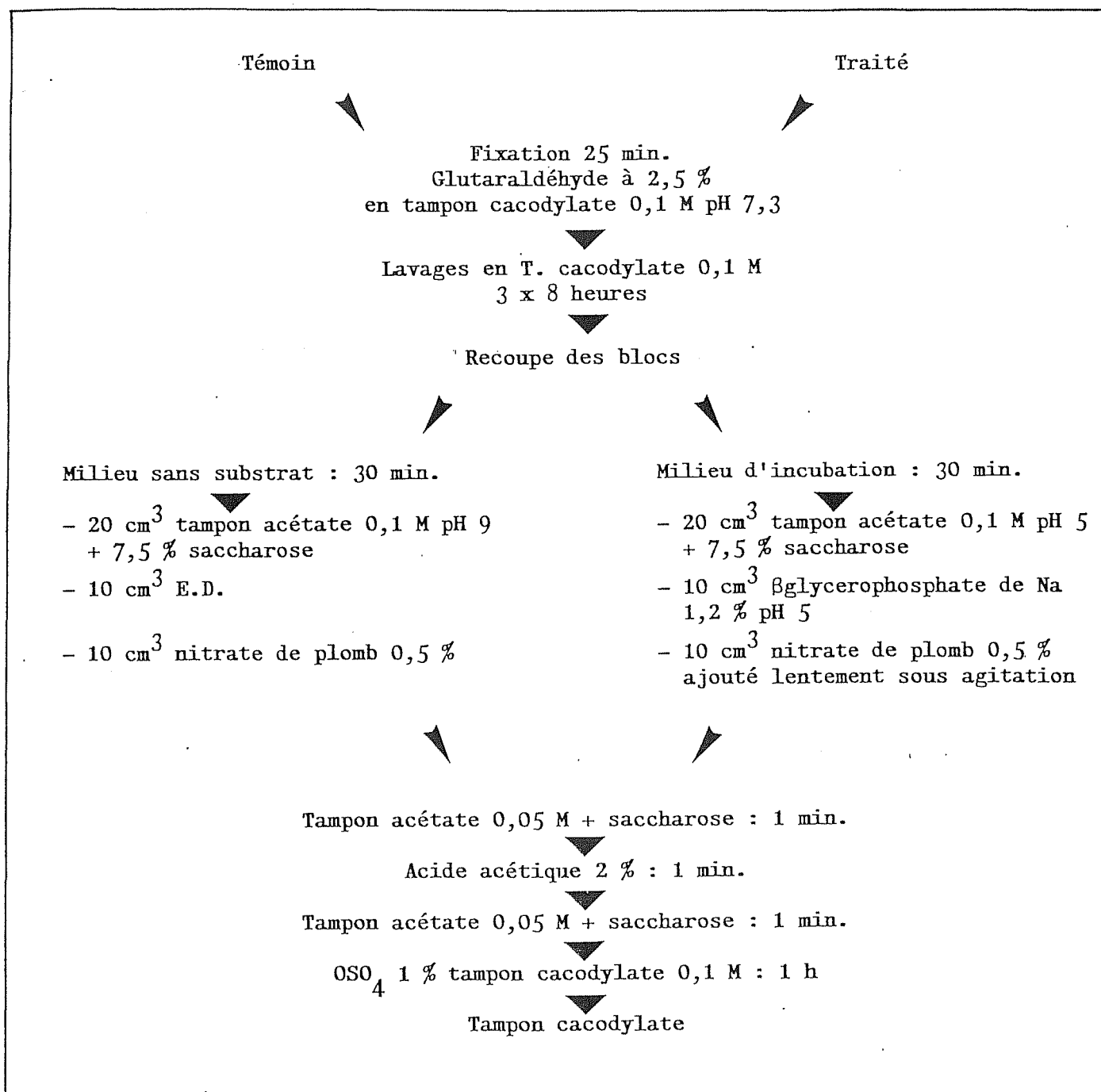


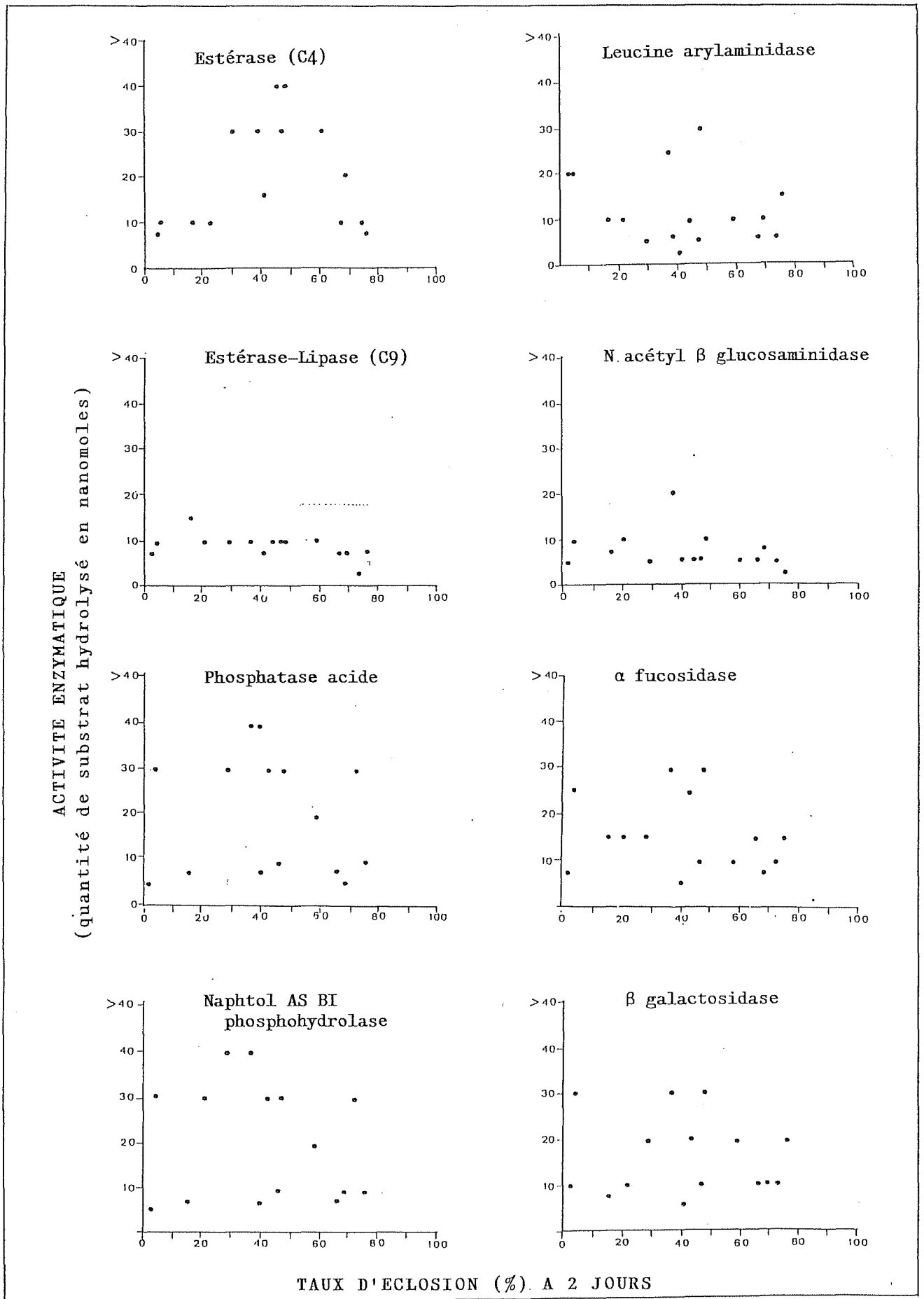
➤ DÉTECTION DES GLYCOPROTÉINES

Le temps d'incubation dans le thiocarbohydrazide est prolongé à 72 heures. Le protocole est similaire à celui schématisé ci-dessus pour le glycogène.

- ANNEXE IV -

DÉTECTION DE LA PHOSPHATASE ACIDE
SUR COUPES ULTRAFINES - TECHNIQUE DE HOURDRY (1974)





ESSAI DE CORRÉLATION ENTRE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE
(TEST API ZYM) ET LE TAUX D'ÉCLOSION ($r < 0,15$)

RESUME

L'environnement gonadique des cellules sexuelles, le déroulement de la gamétogenèse, le devenir des gamètes formés et leur qualité au moment de l'émission ont été étudiés chez *Pecten maximus* sur le plan ultrastructural et histochimique.

Les résultats obtenus sur la gamétogenèse se sont révélés, dans l'ensemble, conformes à ceux de travaux antérieurs sur les bivalves et en outre ils ont permis :

- de mettre en évidence des cellules somatiques auxiliaires et leur rôle actif dans les processus de maturation des lignées germinales mâle et femelle ;
- de noter l'apparition précoce, au cours de la vitellogenèse, d'inclusions de type lysosomal ;
- d'identifier les granules corticaux et de mettre en évidence leur rôle dans la constitution d'une membrane de fécondation ;
- de préciser les caractéristiques structurales et histochimiques des gamètes ;
- de déceler l'existence d'une spermatogenèse anormale.

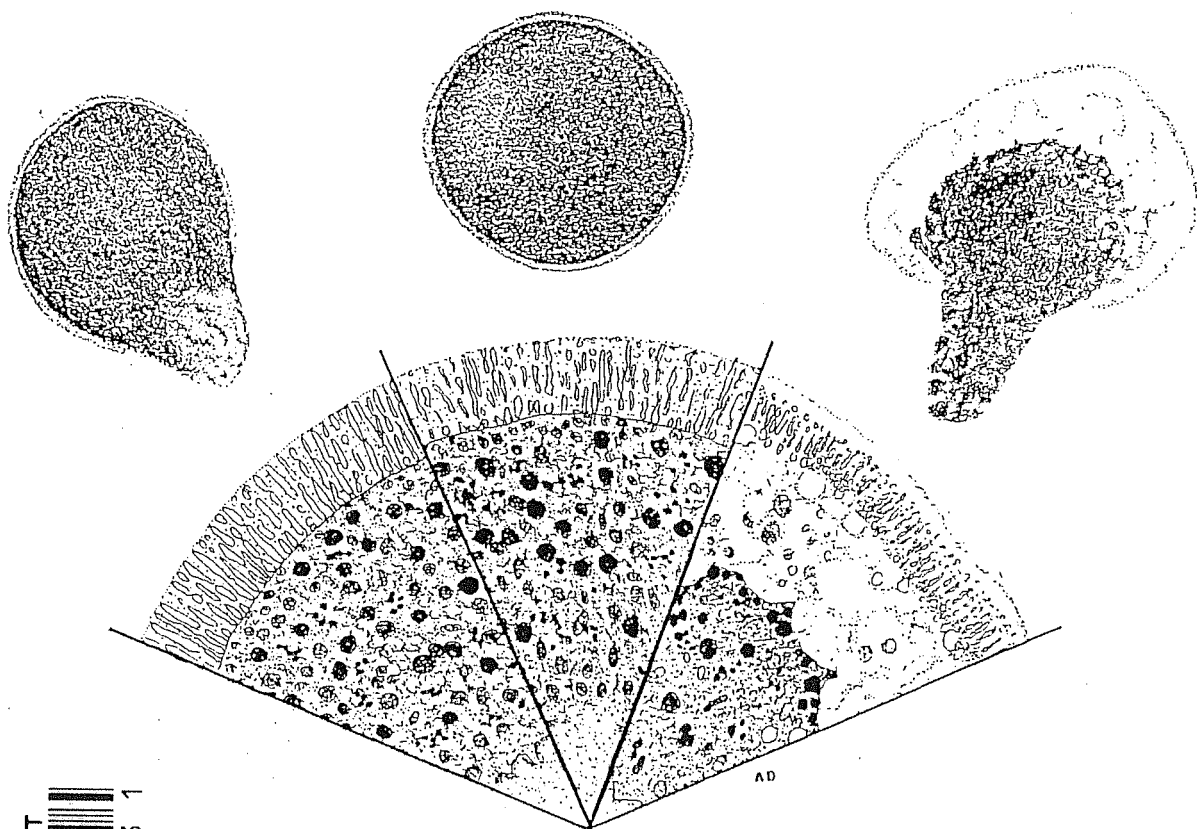
Une description des phénomènes de dégénérescence des gamètes, notamment de la lyse ovocytaire particulièrement importante chez cette espèce en baie de St-Brieuc, a été réalisée. Diverses catégories cellulaires susceptibles d'être impliquées dans la résorption des reliquats de la lyse gamétique, ont été mises en évidence. Le rôle des hémocytes à fonction macrophagique est en particulier démontré. La question du transfert des produits de lyse a été discutée.

L'examen en microscopie électronique des ovocytes émis par induction artificielle a permis de préciser les caractéristiques structurales des trois catégories d'ovocytes aisément identifiables en microscopie photonique sur des critères morphologiques simples et de déceler l'existence d'anomalies structurales dans des ovocytes d'apparence normale. En couplant l'analyse d'images aux techniques histologiques, une variabilité quantitative de leur contenu lipidique a également été détectée, permettant d'apporter quelques éléments de réponse à certains échecs de la reproduction de *P. maximus* en éclosion comme dans le milieu naturel.

MOTS-CLES :

Mollusque bivalve - *Pecten maximus* - Tissus somatiques - Gonade - Gamétogenèse - Gamètes - Dégénérescence gamétique - Ovocytes émis - Histochimie - Ultrastructure.

LES GAMETES DE *PECTEN MAXIMUS* L. (MOLLUSCA , BIVALVIA)



B. U. DE BREST
D 109 227983 1

II - ICONOGRAPHIE

Germaine DORANGE

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Laboratoire de Biologie Marine

1989

N° d'ordre : 75

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

(Mention Océanologie Biologique)

par

Germaine DORANGE

LES GAMETES DE *PECTEN MAXIMUS* L.

(MOLLUSCA, BIVALVIA)

II - ICONOGRAPHIE

Soutenue le 10 février 1989 devant la Commission d'Examen :

- Président* : LEROY J.P., Professeur, U.F.R. Médecine
Université de Bretagne Occidentale
- Rapporteurs* : DAGUZAN J., Professeur, Faculté des Sciences
Université de Rennes I
- LUCAS A., Professeur émérite,
U.F.R. Sciences et Techniques
Université de Bretagne Occidentale
- Examineurs* : BOUCHER J., Chercheur, IFREMER
Centre de Nantes
- LE PENNEC M., Professeur, *Directeur de Thèse*,
U.F.R. Sciences et Techniques
Université de Bretagne Occidentale
- LUBET P., Professeur, Faculté des Sciences
Université de Caen



- LISTE DES PLANCHES -

- PLANCHE 1 - Evolution macroscopique de la gonade au cours du cycle annuel de *P. maximus* en baie de St-Brieuc (1986).
- PLANCHE 2 - Aspect de la gonade sur coupes en paraffine à divers stades du cycle sexuel.
- PLANCHE 3 - Gonade observée en M.E.B.
- PLANCHE 4 - Structure du tégument.
- PLANCHE 5 - Epithélium externe tégumentaire en microscopie électronique.
- PLANCHE 6 - Caractéristiques histoenzymologiques de l'épithélium externe tégumentaire.
- PLANCHE 7 - Caractéristiques ultrastructurales du tissu sous-épithélial périgonadique.
- PLANCHE 8 - Caractéristiques structurales du tissu conjonctif interstitiel.
- PLANCHE 9 - Vue générale, sur coupes semi-fines, d'un acinus femelle s'ouvrant sur un conduit évacuateur.
- PLANCHE 10 - Caractéristiques structurales des gonoductes.
- PLANCHE 11 - Caractéristiques ultrastructurales des gonoductes.
- PLANCHE 12 - Caractéristiques histochimiques et enzymologiques des gonoductes sur coupes a congélation.
- PLANCHE 13 - Caractéristiques ultrastructurales des cellules durant l'ovogenèse.
- PLANCHE 14 - Caractéristiques ultrastructurales des cellules durant l'ovogenèse.
- PLANCHE 15 - Cellule auxiliaire et ovocyte en microscopie électronique.
- PLANCHE 16 - Caractéristiques structurales de la cellule auxiliaire, séparée de l'ovocyte, et de l'ovocyte en fin de vitellogenèse.
- PLANCHE 17 - Inclusions cytoplasmiques ovocytaires.

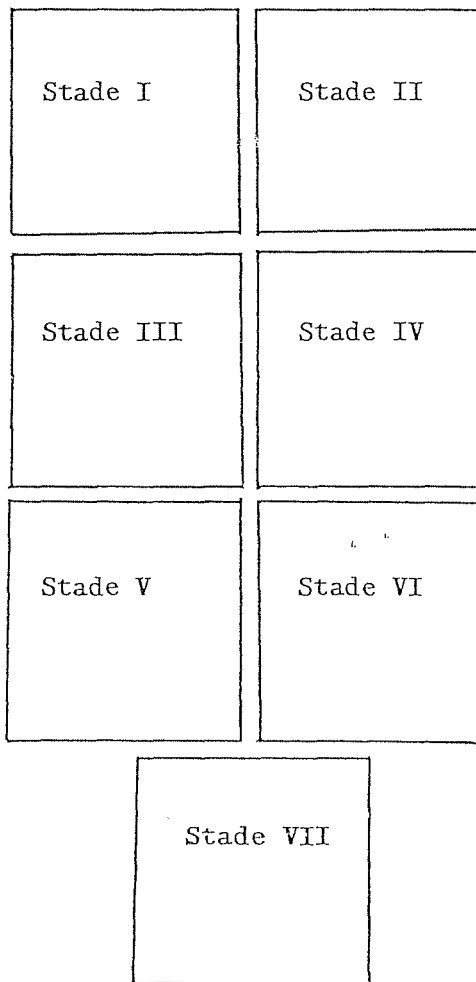
- PLANCHE 18 - Caractéristiques histochimiques et histoenzymologiques des ovocytes sur coupes à congélation et en paraffine.
- PLANCHE 19 - Acini mâles sur coupes semi-fines, à divers stades du cycle sexuel.
- PLANCHE 20 - Début de spermatogenèse.
- PLANCHE 21 - Spermatogenèse au M.E.T.
- PLANCHE 22 - Spermatogenèse au M.E.T.
- PLANCHE 23 - Spermatozoïde.
- PLANCHE 24 - Spermatogenèse anormale.
- PLANCHE 25 - Dégénérescence et lyse ovocytaires sur coupes en paraffine.
- PLANCHE 26 - Dégénérescence ovocytaire sur coupes semi-fines et ultra-fines.
- PLANCHE 27 - Dégénérescence et lyse ovocytaires en microscopie électronique.
- PLANCHE 28 - Dégénérescence des cellules germinales mâles en M.E.T.
- PLANCHE 29 - Résorption.
- PLANCHE 30 - Ovocytes émis après stimulations thermiques des géniteurs en écloserie.
- PLANCHE 31 - Ovocytes émis après stimulations thermiques des géniteurs en écloserie.
- PLANCHE 32 - Aspect des ovocytes émis sur coupes semi-fines.
- PLANCHE 33 - Aspect de certains ovocytes émis en M.E.T.

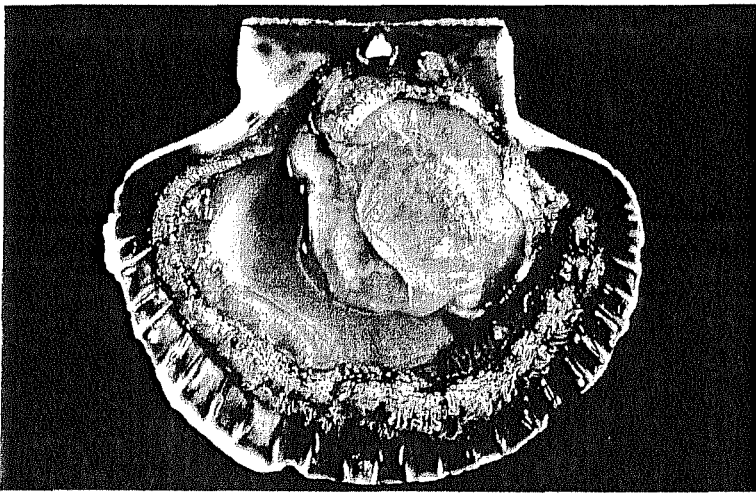
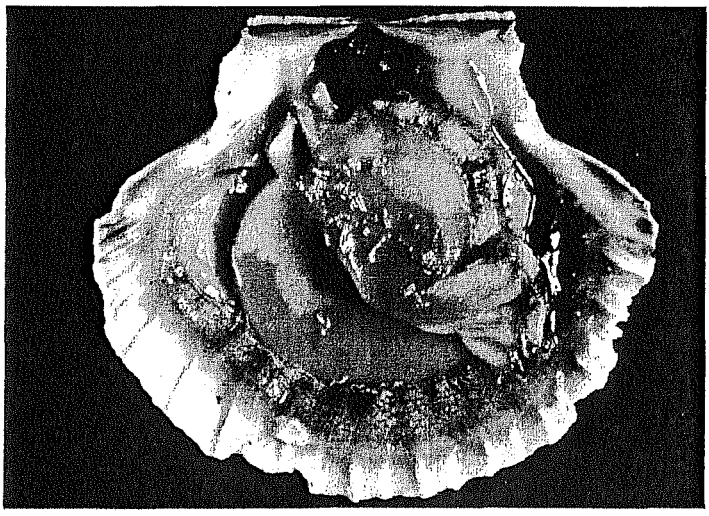
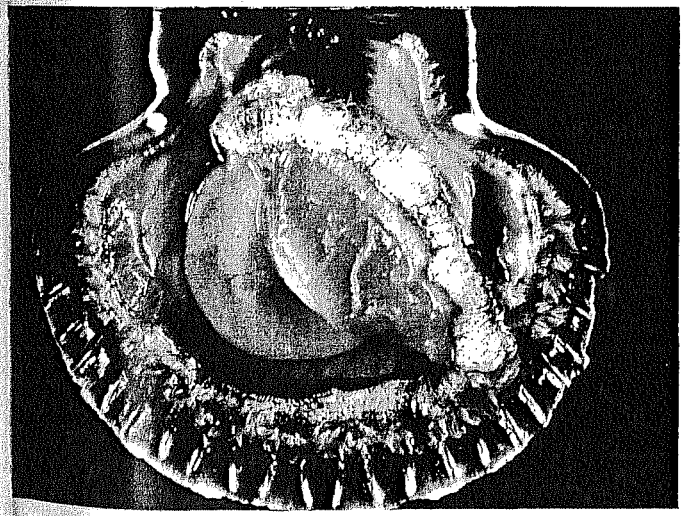
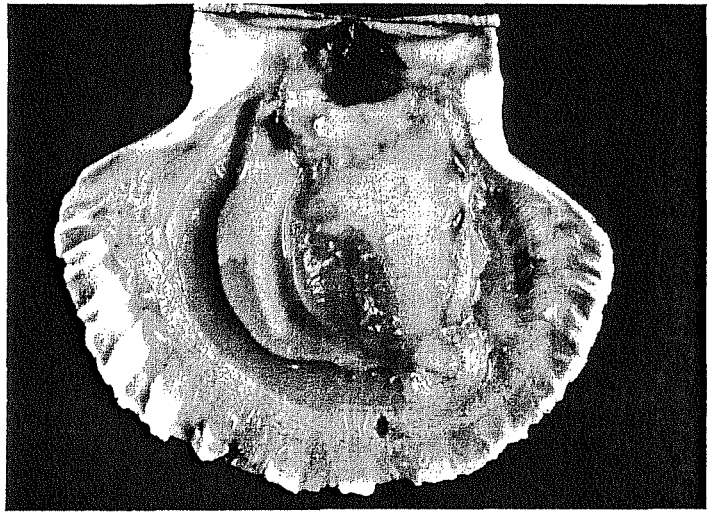
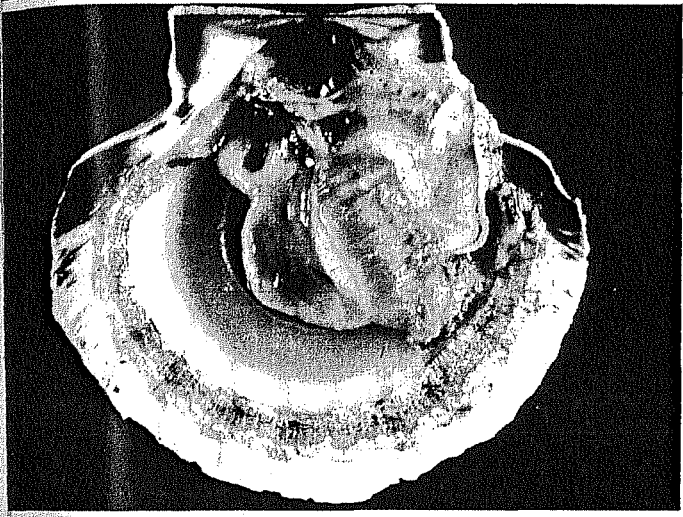
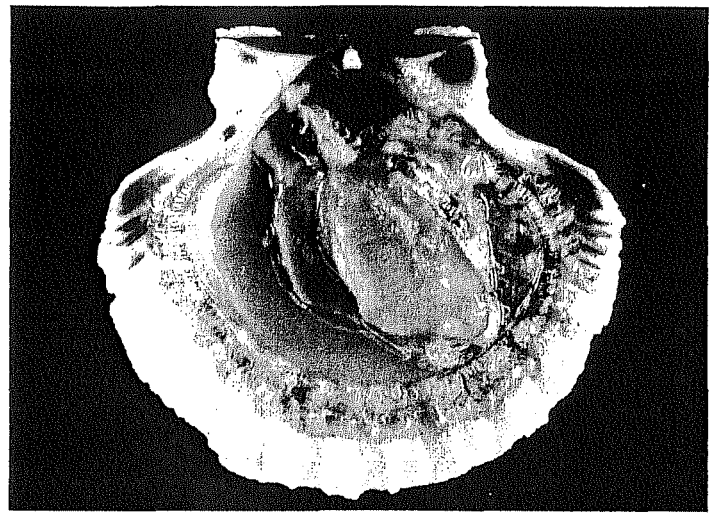
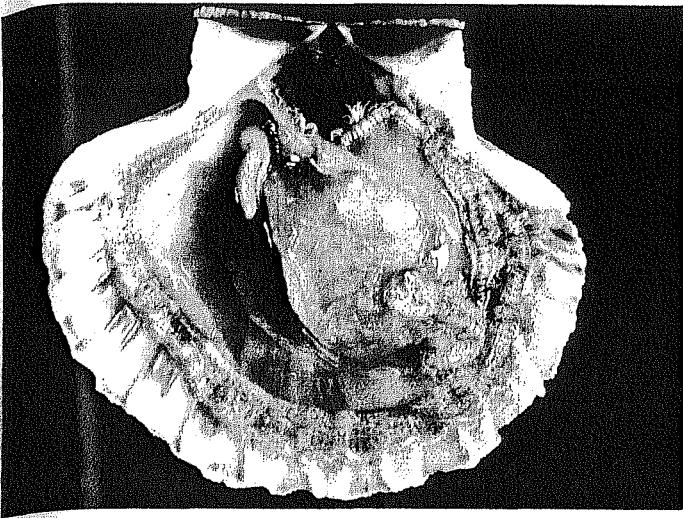
- PLANCHE 1 -

EVOLUTION MACROSCOPIQUE DE LA GONADIE
AU COURS DU CYCLE ANNUEL DE *P. MAXIMA*
EN BAIE DE St-BRIEUC

Les stades sont établis selon l'échelle de Mason (1958).

Echelle : 5 cm





- PLANCHE 2 -

Photo 1 - Coupe transversale de gonade au stade I. Acini presque vides ; quelques ovocytes résiduels dans les acini femelles. Travées conjonctives musculaires transversales apparentes ; tégument épais. Echelle : 250 μ m.

Photo 2 - Stade II : gamétogenèse mâle active en avance sur la gamétogenèse femelle. Les acini (\downarrow) débouchent dans de courts conduits qui fusionnent en gonoductes. Tissu interstitiel épais. Echelle : 250 μ m.

Photo 3 - Stade III : présence de cellules sexuelles mâles matures et d'ovocytes en vitellogenèse. Echelle : 250 μ m.

Photo 4 - Stade IV-V : acini mâles et femelles à cellules matures. Echelle : 250 μ m.

Photo 5 - Stade VI : maturité sexuelle. Quelques îlots d'ovocytes atrétiques. Echelle : 250 μ m.

A : acinus.

A $\circ \Rightarrow$: acini mâles et femelles.

A ♀

E : épithélium externe tégumentaire.

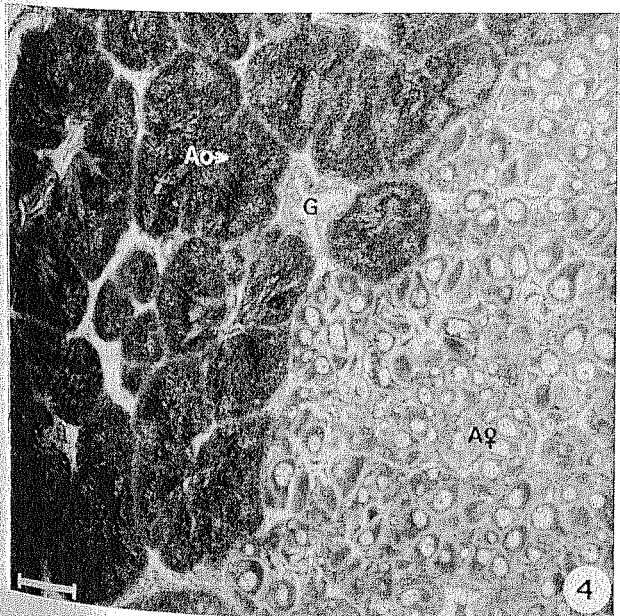
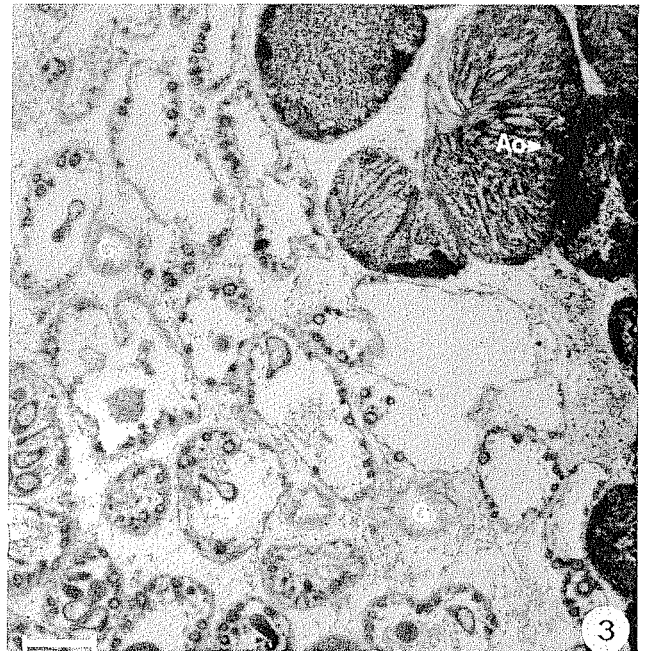
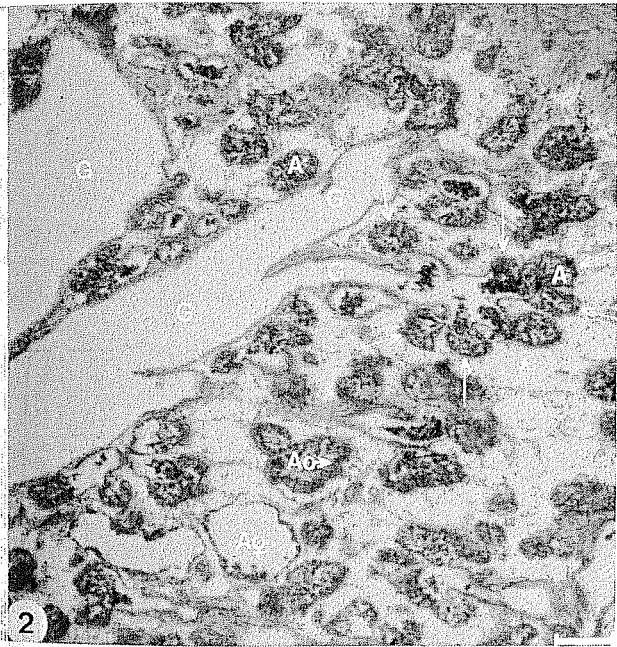
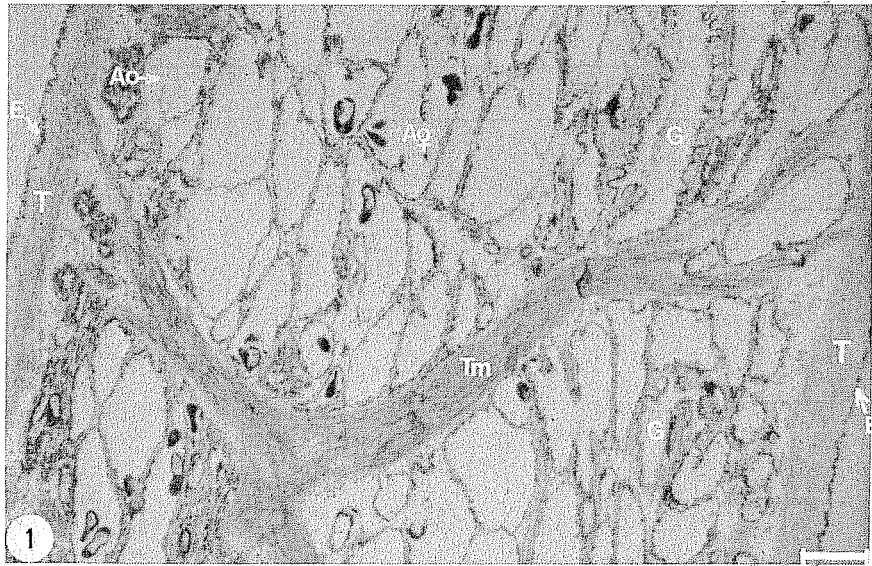
G : gonoducte.

Ly : plage de lyse ovocytaire.

T : tissu sous-épithélial tégumentaire.

Tm : travée musculaire transversale.





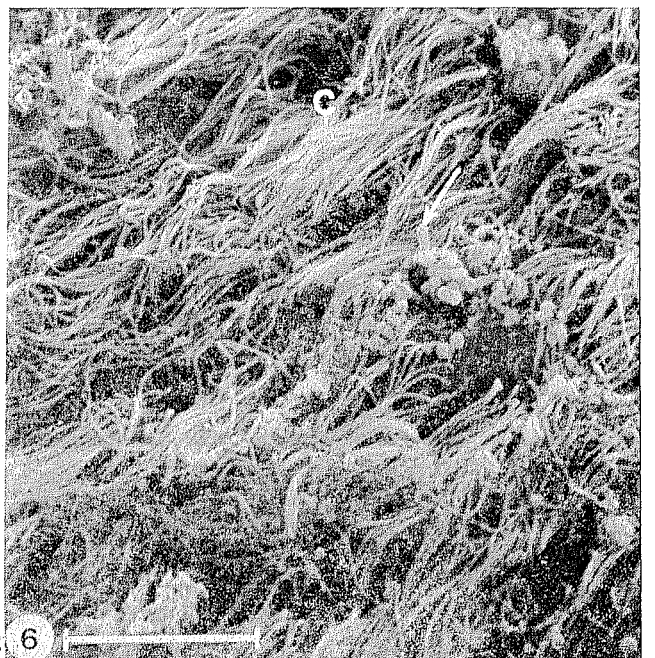
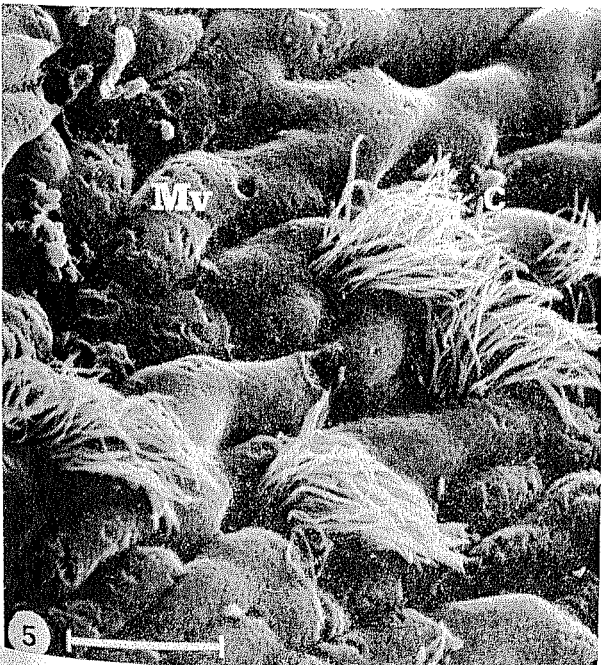
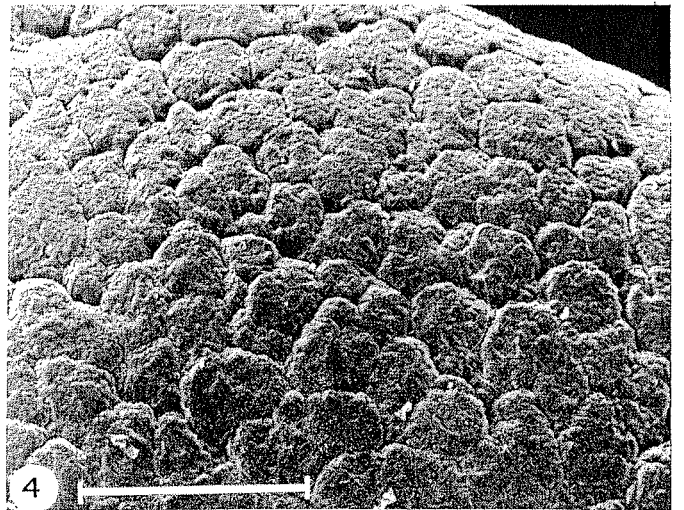
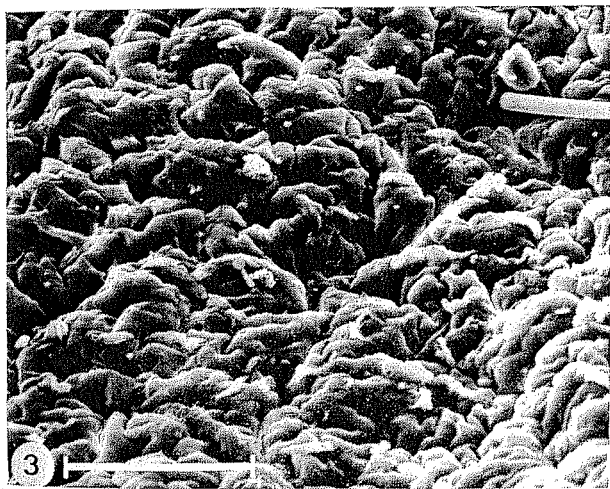
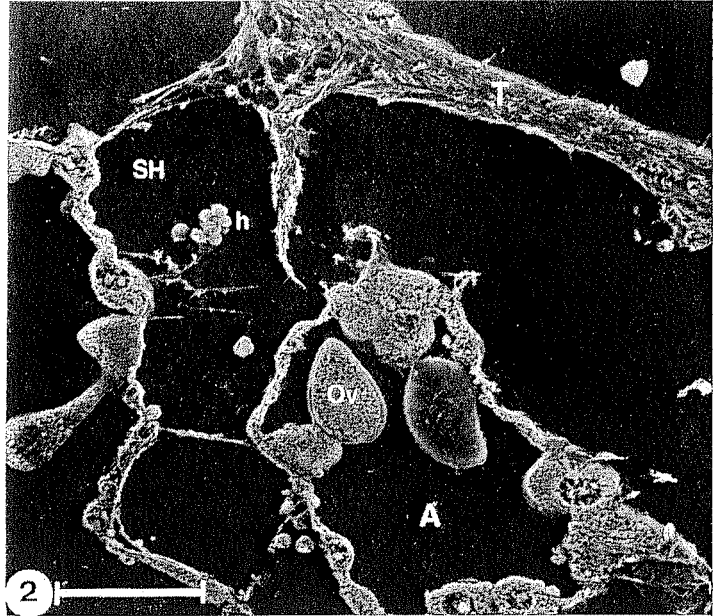
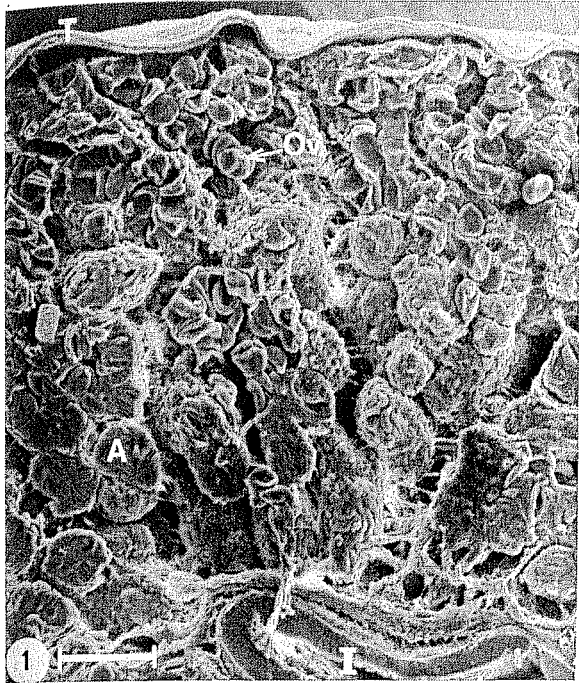
ies

- PLANCHE 3 -

- Photo 1 - Coupe transversale. Acini, remplis d'ovocytes, entre le tégument et la paroi intestinale. Echelle : 250 μ m.
- Photo 2 - Coupe transversale. Les sinus hémolymphatiques sont présents sous le tégument et entre les acini. Echelle : 50 μ m.
- Photo 3 - Vue externe du tégument, en hiver, montrant les nombreux plis. Echelle : 50 μ m.
- Photo 4 - Vue externe du tégument en période de maturité sexuelle. Le contour des acini est discernable. Echelle : 500 μ m.
- Photo 5 - Vue externe du tégument montrant des touffes ciliaires éparses entre les macrovillosités. Echelle : 10 μ m.
- Photo 6 - Vue externe du tégument à proximité du pied, entièrement recouvert de cils. Noter la présence de bactéries (↓). Echelle : 10 μ m.

- A : acini.
 C : cils.
 h : hémocyte.
 I : intestin.
 Mv : macrovillosités.
 Ov : ovocyte.
 SH : sinus hémolymphatique.
 T : tégument.





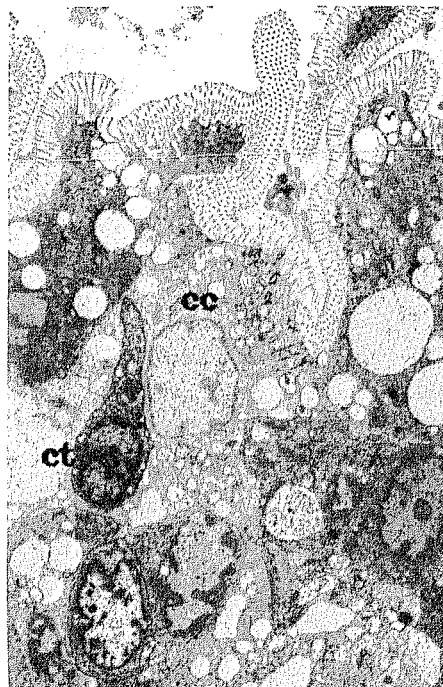
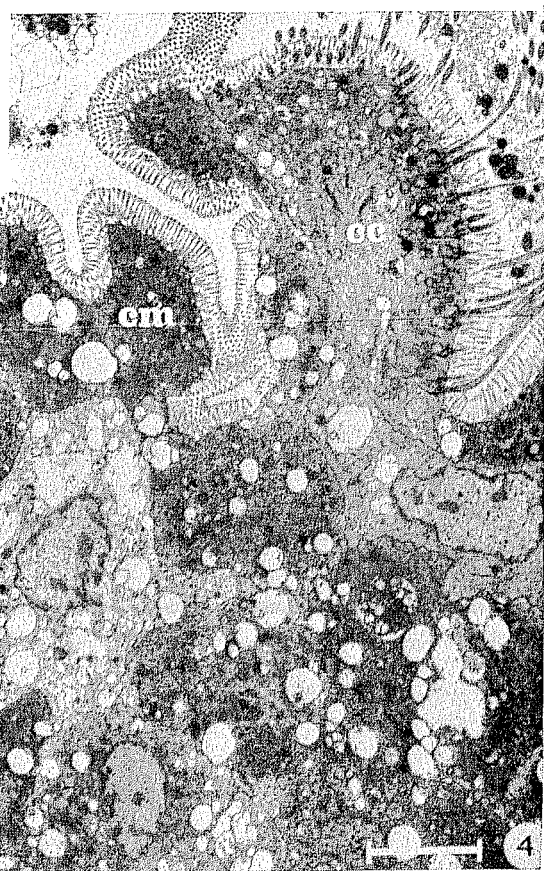
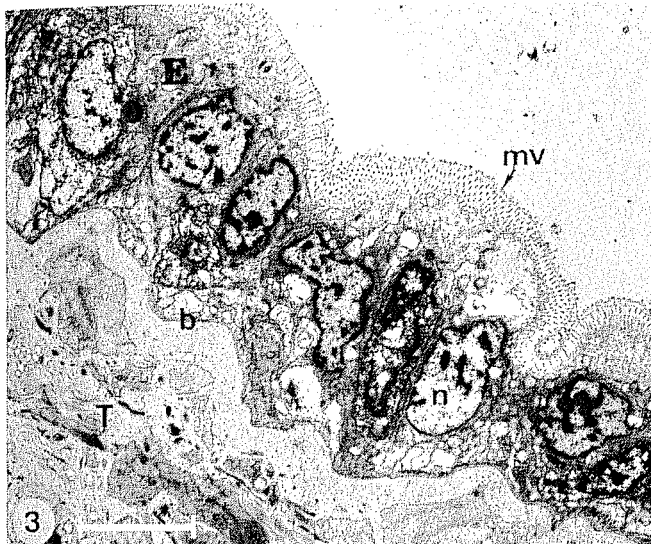
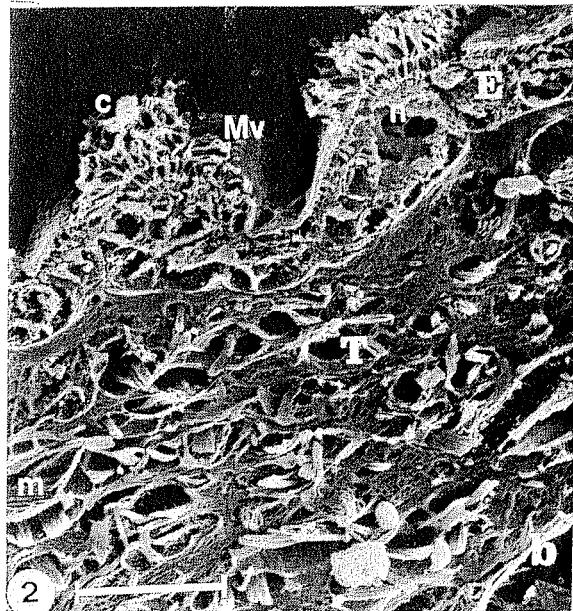
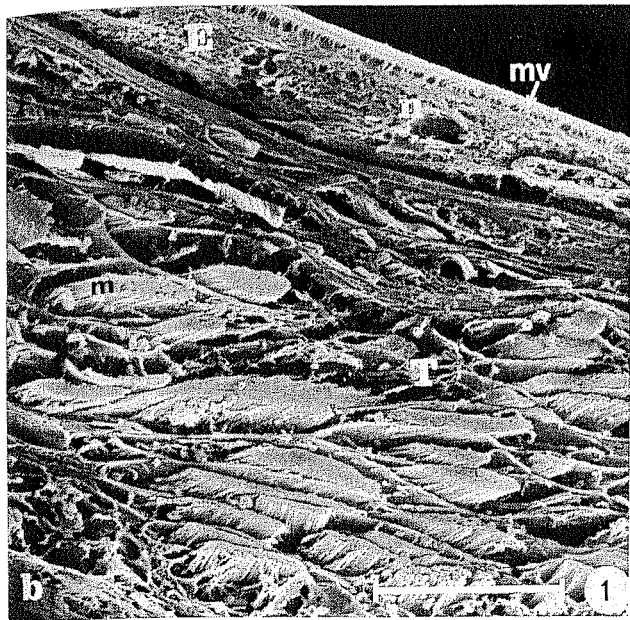
- PLANCHE 4 -

- Photo 1 - Coupe transversale de la paroi gonadique. M.E.B. Epithélium externe cubique et plat recouvrant un épais tissu conjonctivo-musculaire dans lequel des faisceaux de fibres musculaires sont visibles. Echelle : 10 μ m.
- Photo 2 - Coupe transversale de la paroi gonadique plissée. M.E.B. Les cellules ciliées sont visibles. Echelle : 10 μ m.
- Photo 3 - Coupe transversale de la paroi gonadique. M.E.T. Les cellules à microvillosités constituent l'essentiel de l'épithélium. La lame basale est plissée. Echelle : 5 μ m.
- Photo 4 - Coupe transversale de la paroi gonadique. M.E.T. Zone plissée plus complexe constituée de cellules ciliées et de cellules à microvillosités sous lesquelles s'observent des cellules de transit et des cellules indifférenciées. Les vacuoles sont nombreuses. Echelle : 5 μ m.
- Photo 5 - Systèmes jonctionnels entre les cellules épithéliales. Belt-desmosome (∇) auquel fait suite une jonction septée (\downarrow). Echelle : 0,5 μ m.

- b : lame basale du tégument.
 c : cils.
 cc : cellule ciliée.
 cm : cellule à microvilli.
 ci : cellule indifférenciée.
 ct : cellule de transit.
 E : épithélium externe.
 m : fibres musculaires.
 mv : microvillosités.
 Mv : macrovillosités.
 n : noyau.
 T : tissu sous-épithélial tégumentaire.

3

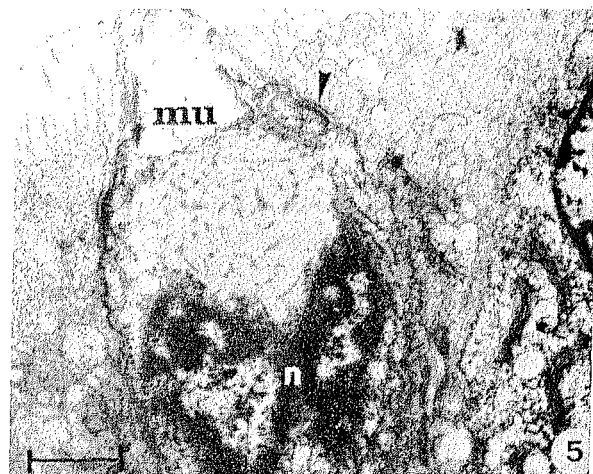
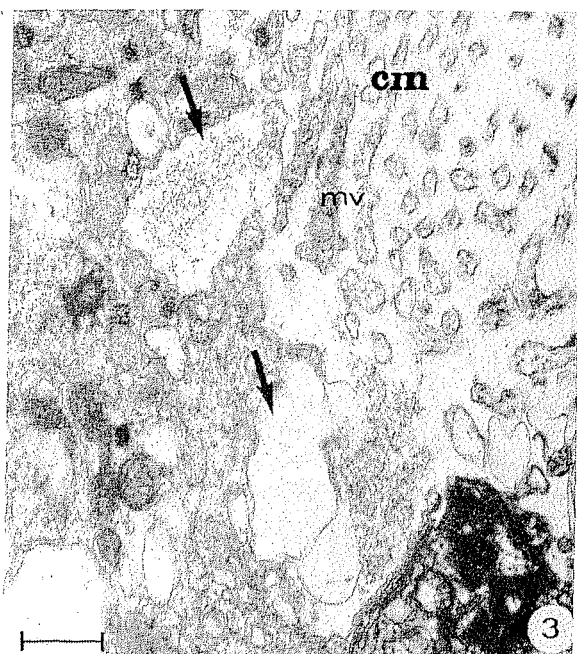
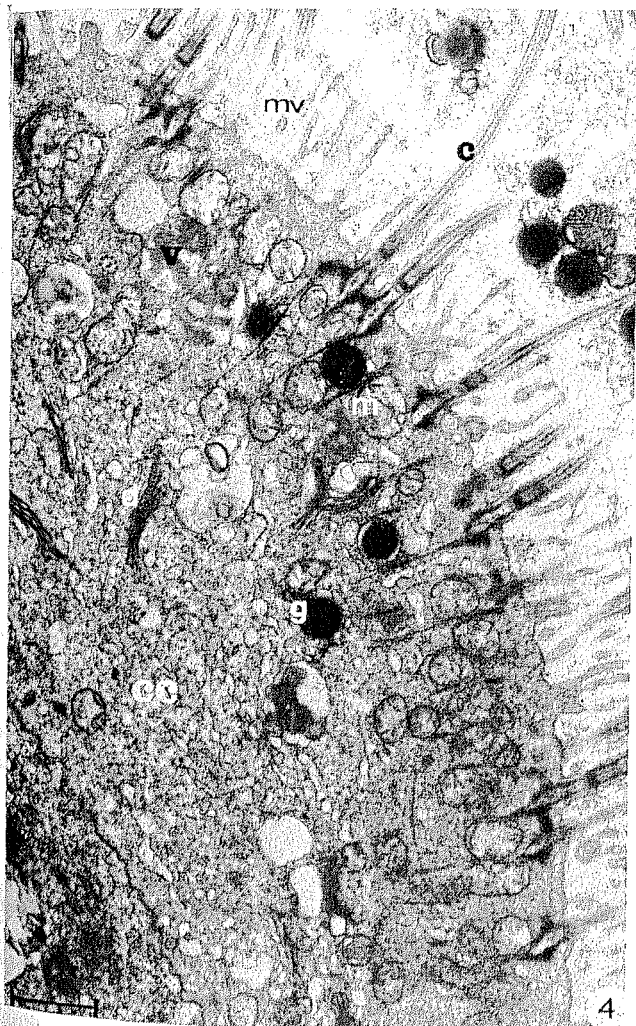
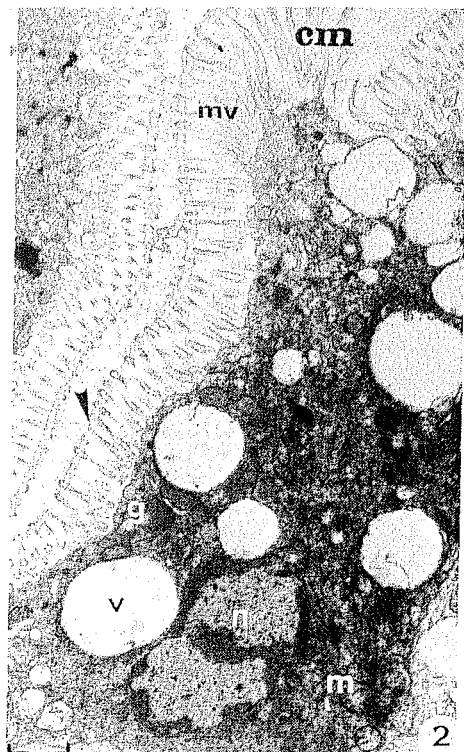
5



- PLANCHE 5 -

- Photo 1 - Détail de l'épithélium montrant les microvillosités et quelques cils. M.E.B. Echelle : 1 μ m.
- Photo 2 - Cellule à microvillosités. Trame fibrillaire à l'apex des microvilli (∇). M.E.T. Echelle : 1 μ m.
- Photo 3 - Figures d'endocytose à l'apex des cellules à microvillosités (\downarrow). M.E.T. Echelle : 0,5 μ m.
- Photo 4 - Cellule ciliée. M.E.T. Echelle : 1 μ m.
- Photo 5 - Mucocyte. Système jonctionnel (∇). M.E.T. Echelle : 1 μ m.

c : cils.
cc : cellule ciliée.
cm : cellule à microvillosités.
d : dictyosome.
g : globule dense.
m : mitochondrie.
mu : mucocyte.
mv : microvillosités.
n : noyau.
v : vacuole.



- PLANCHE 6 -

- Photo 1 - Coupe à paraffine montrant l'aspect de l'épithélium et du tissu sous-jacent (Trichrome de Gomori). Echelle : 100 μ m.
- Photo 2 - Activité estérasique positive se traduisant par une coloration noirâtre de l'épithélium. Echelle : 100 μ m.
- Photo 3 - Activité phosphatasique alcaline positive (coloration pourpre). Echelle : 100 μ m.
- Photo 4 - Activité amylasique positive : le film d'amidon est dégradé à proximité de l'épithélium. Echelle : 100 μ m.
- Photo 5 - Activité phosphatasique acide positive dans les cellules de l'épithélium (coloration brunâtre). Echelle : 100 μ m.
- Photo 6 - Activité aminopeptidasique positive dans la bordure épithéliale (coloration rougeâtre). Echelle : 100 μ m.

A : acini.

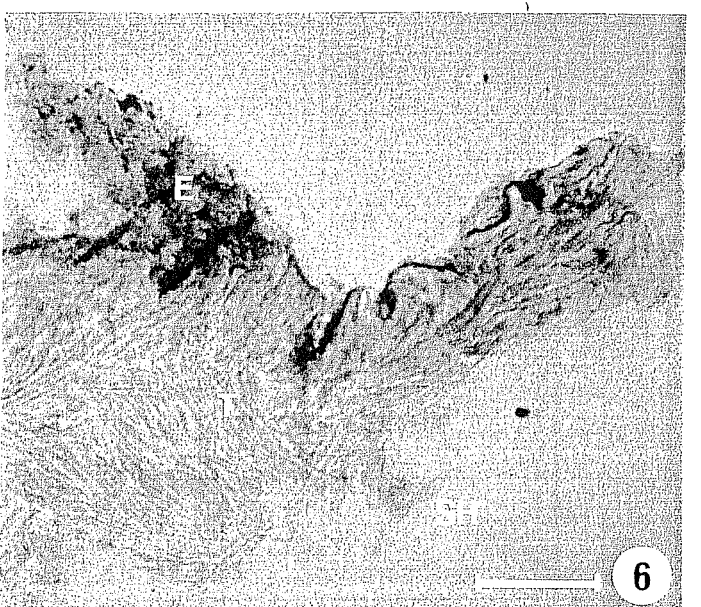
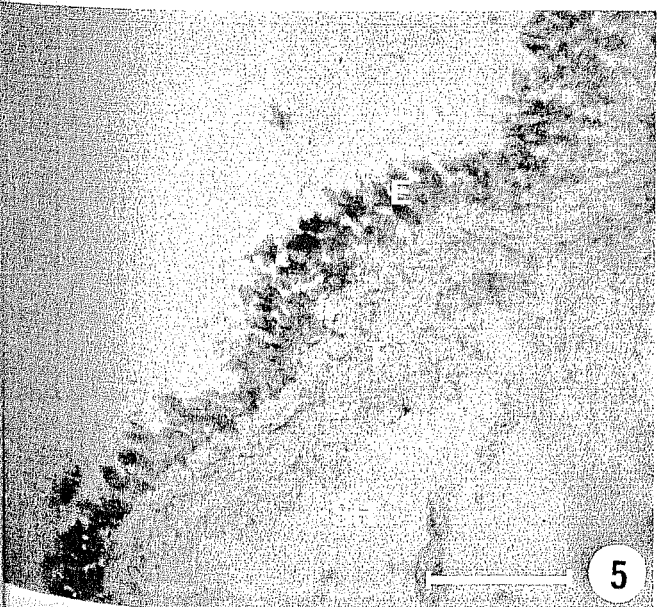
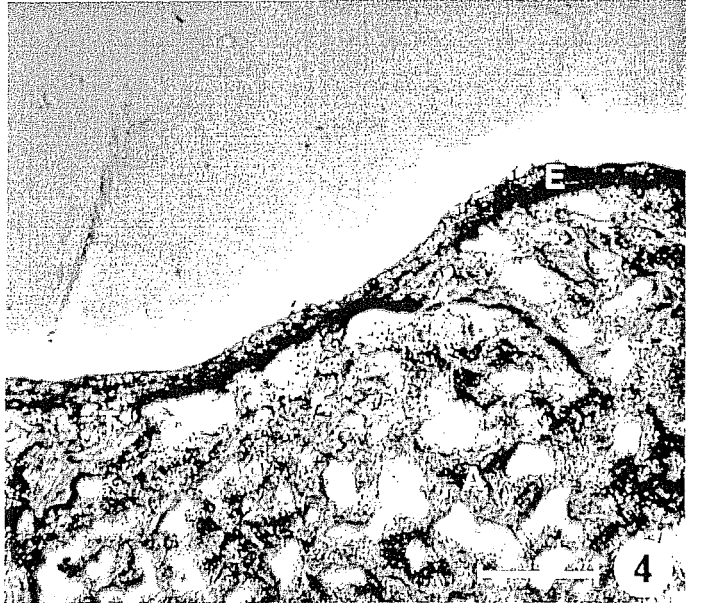
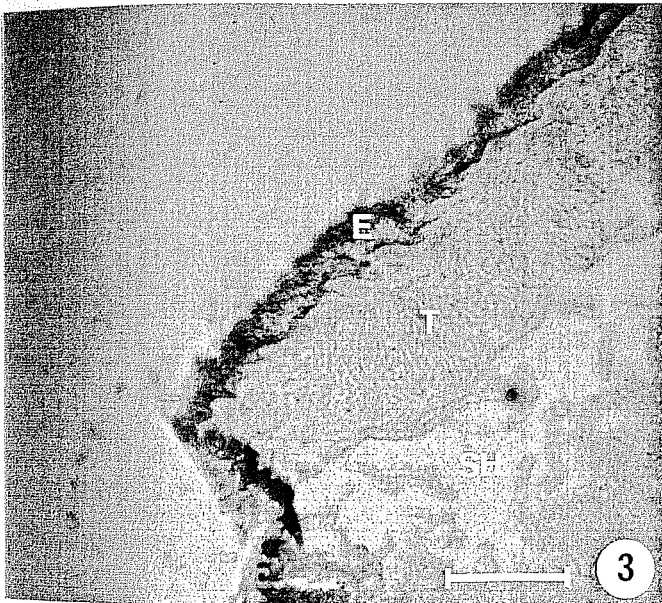
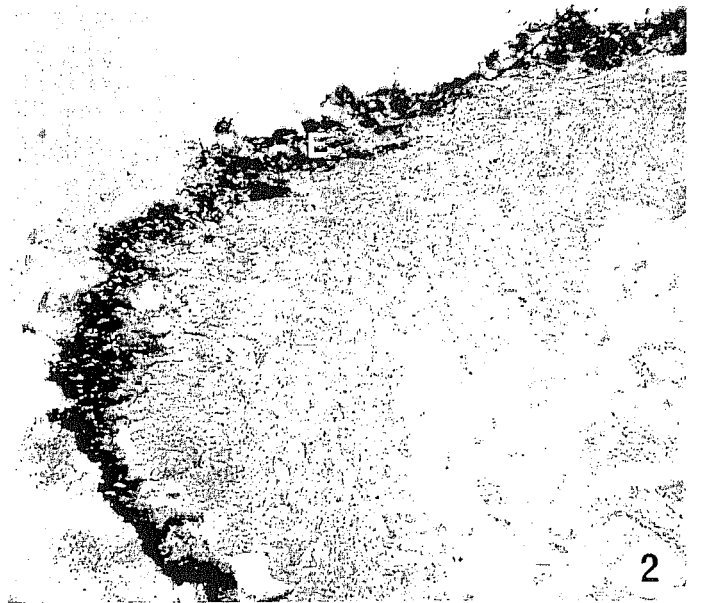
E : épithélium externe tégumentaire.

h : hémocytes.

SH : sinus hémolympatique.

T : tissu sous-épithélial.





- PLANCHE 7 -

CARACTERISTIQUES ULTRASTRUCTURALES
DU TISSU SOUS-EPITHELIAL PERIGONADIQUE

Photo 1 - Sous la lame basale indentée de l'épithélium externe, l'épais tissu conjonctivo-musculaire présente des fibres de collagène, parfois en faisceaux, des enclaves de grains denses, des myofibrilles, des expansions cytoplasmiques hémocytaires et des fibroblastes. Echelle : 5 μ m.

Photo 2 - Fibroblaste. Echelle : 1 μ m.

Photo 3 - Hémocyte de type II, dissymétrique, avec une expansion cytoplasmique envahie de vésicules de reticulum endoplasmique lisse ($\nabla\nabla$). L'autre expansion possède un cytoplasme dense (∇). Echelle : 1 μ m.

Photo 4 - Cellule musculaire dont les myofibrilles (∇) occupent la majeure partie du cytoplasme. A proximité (\downarrow), extrémité axonale chargée de vésicules de sécrétion. Echelle : 1 μ m.

Photo 5 - Zone de contact entre la cellule musculaire (∇) et une extrémité axonale (\downarrow). Echelle : 0,5 μ m.

b : lame basale de l'épithélium externe tégumentaire.

c : fibres de collagène.

E : épithélium externe.

f : fibroblaste.

gr : grains denses.

h : hémocyte.

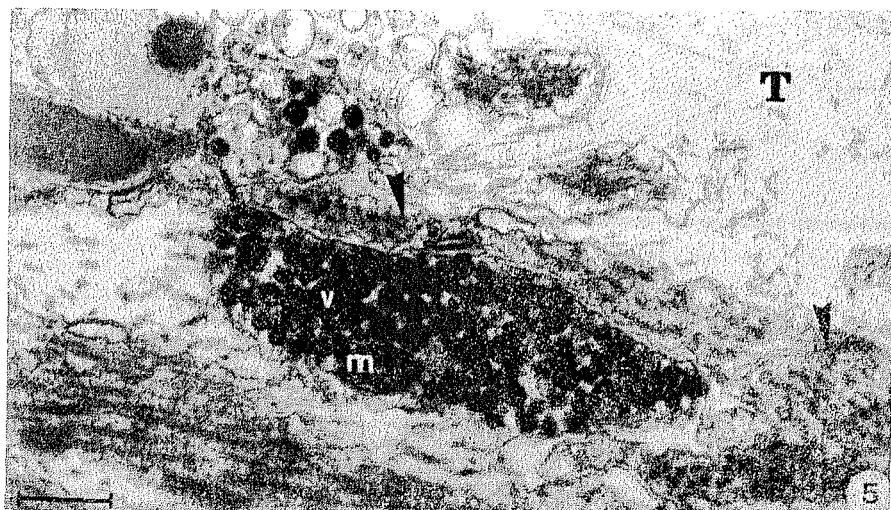
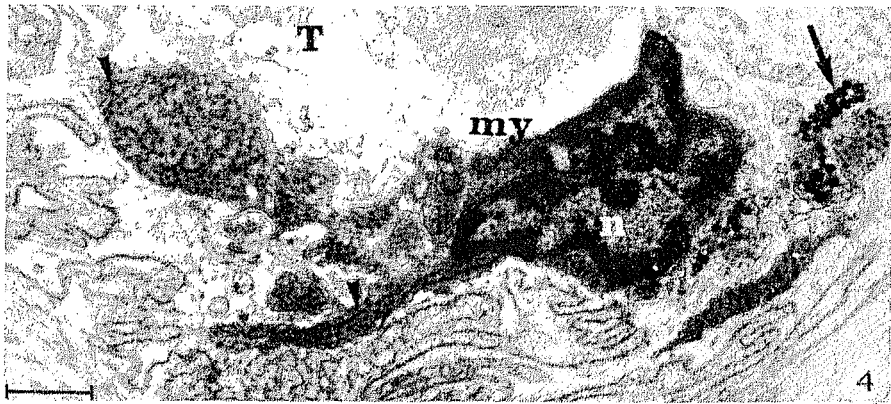
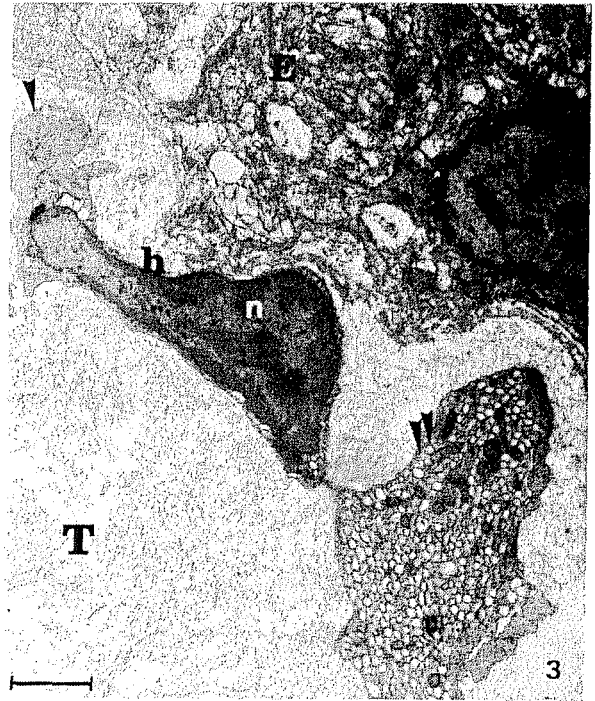
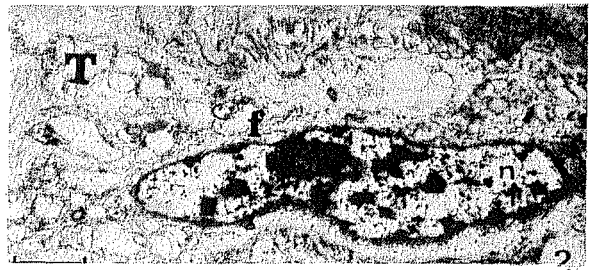
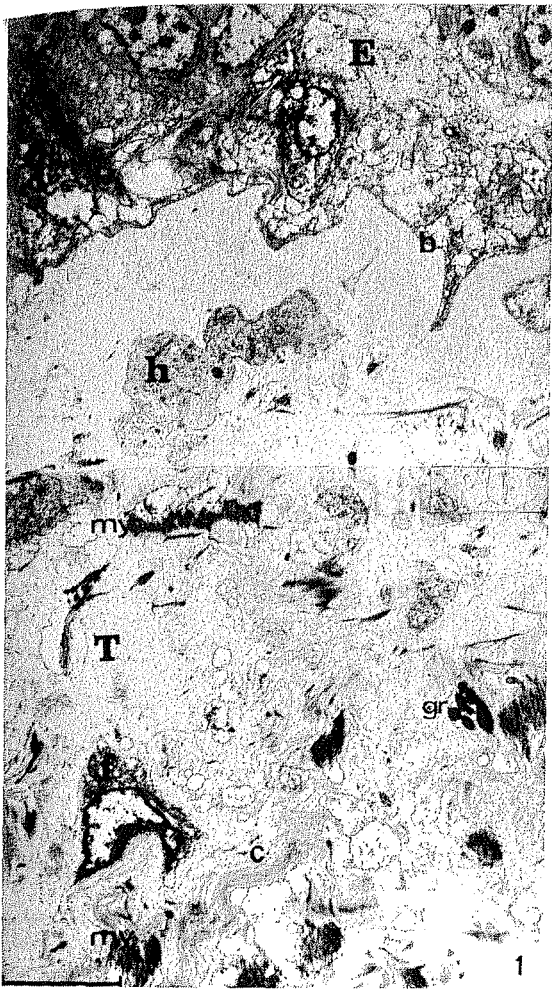
m : mitochondrie.

my : myocyte. **my** : myofibrilles.

n : noyau.

T : tissu conjonctivo-musculaire.

v : vésicule de sécrétion.



- PLANCHE 8 -

- Photo 1 - Abondantes cellules vacuolaires (▼), en période hivernale, entre les acini mâles. Coupe semi-fine. Echelle : 200 µm.
- Photo 2 - Cellules vacuolaires (▼) au M.E.T. Echelle : 3 µm.
- Photo 3 - Membrane plasmique invaginée d'une cellule vacuolaire. Noter la densification au point de départ des invaginations (▼▼). Aspect renflé et échinulé de certaines invaginations (↓). Echelle : 0,5 µm.
- Photo 4 - Vacuoles intracytoplasmiques échinulées à proximité des invaginations (↓) de la membrane plasmique d'une cellule vacuolaire. Echelle : 0,5 µm.
- Photo 5 - Contours très plissés (↓↓) du tissu interstitiel en période hivernale. Echelle : 5 µm.
- Photo 6 - Tissu interstitiel réduit en période de maturité sexuelle (↓↓). Echelle : 1 µm.

A : acinus.

cv : cellule vacuolaire.

g : gonoducte.

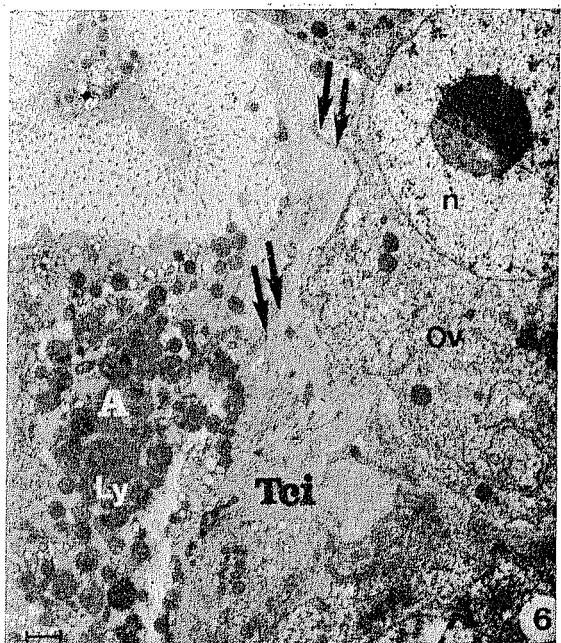
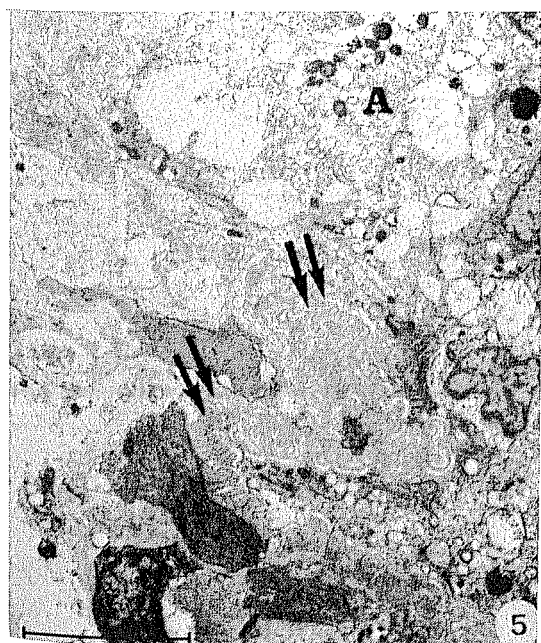
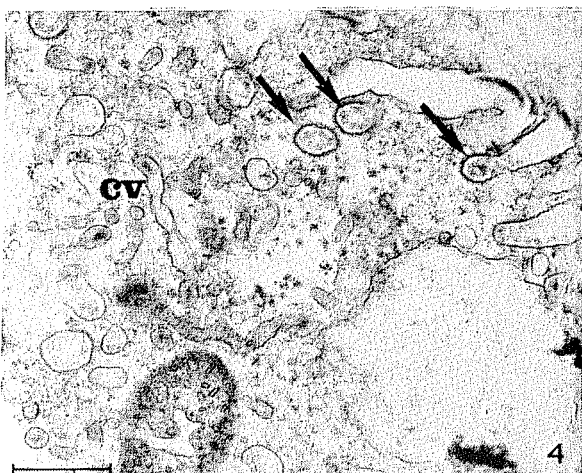
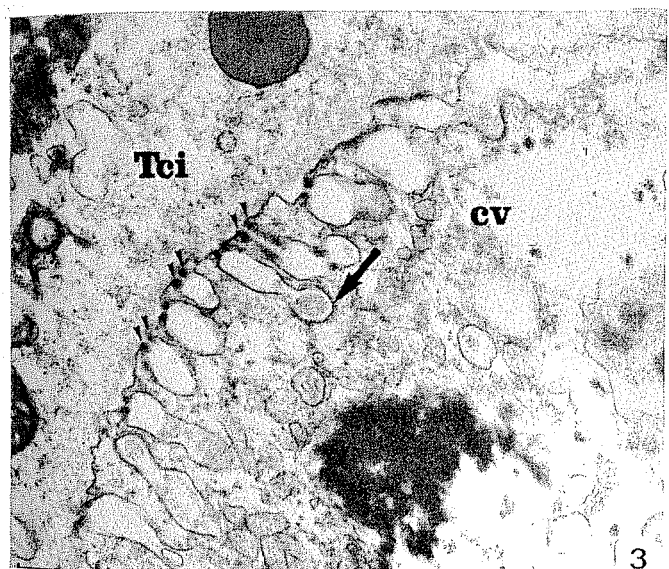
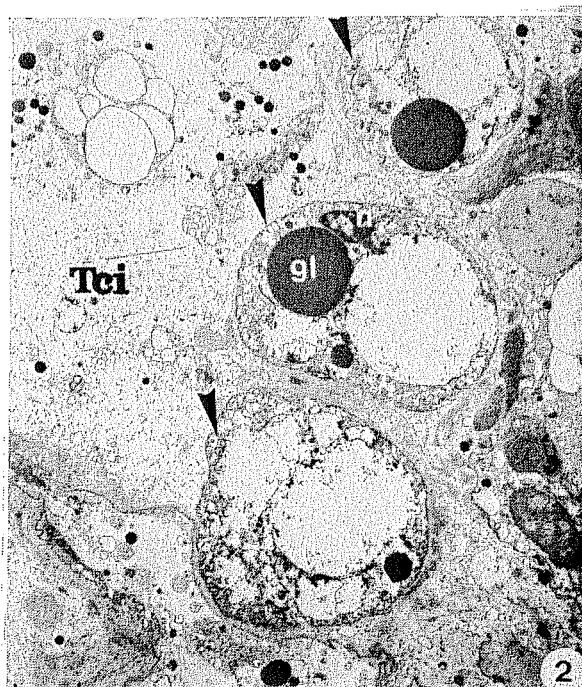
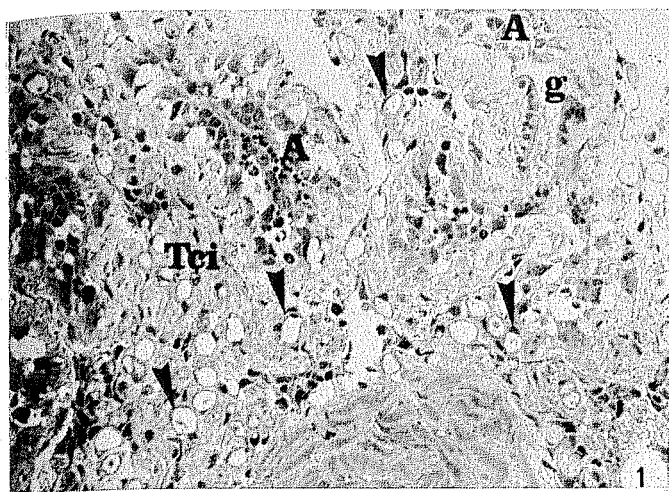
gl : globule dense.

Ly : plage de lyse.

n : noyau.

Ov : ovocyte.

Tci : tissu interstitiel.



a
ct
,5

- PLANCHE 9 -

PLANCHE 9

Vue générale, sur coupe semi-fine, d'un acinus femelle s'ouvrant sur un conduit évacuateur limité par un épithélium simple prismatique cilié. On y reconnaît les ovocytes à différents stades de maturité, ainsi que les cellules auxiliaires (↓). Un ovocyte en voie de lyse est situé à proximité du canal évacuateur. Echelle : 4 µm.

- E : épithélium simple prismatique.
- G : conduit évacuateur ou gonoducte.
- jo : jeune ovocyte prévitellogénique.
- Ov : ovocyte vitellogénique
- Tci : tissu conjonctif interstitiel.
- Ovly : ovocyte en voie de lyse.



- PLANCHE 10 -

Photo 1 - Aspect plissé de l'épithélium cilié d'un conduit évacuateur en M.E.B. Echelle : 25 μ m.

Photo 2 - Cellules épithéliales ciliées moins hautes qu'en 1 pour ce gonoducte d'un diamètre plus réduit. Les hémocytes sont visibles dans les sinus hémolympatiques sous-jacents au gonoducte. M.E.B. Echelle : 25 μ m.

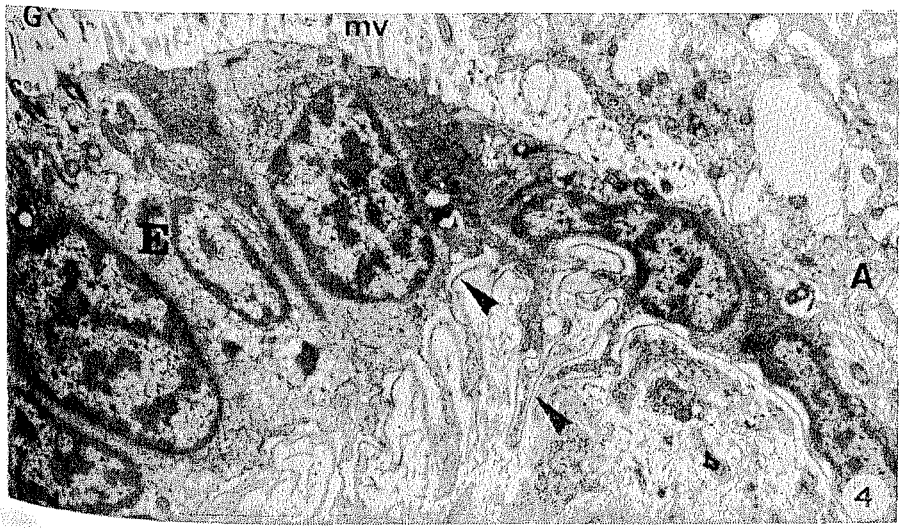
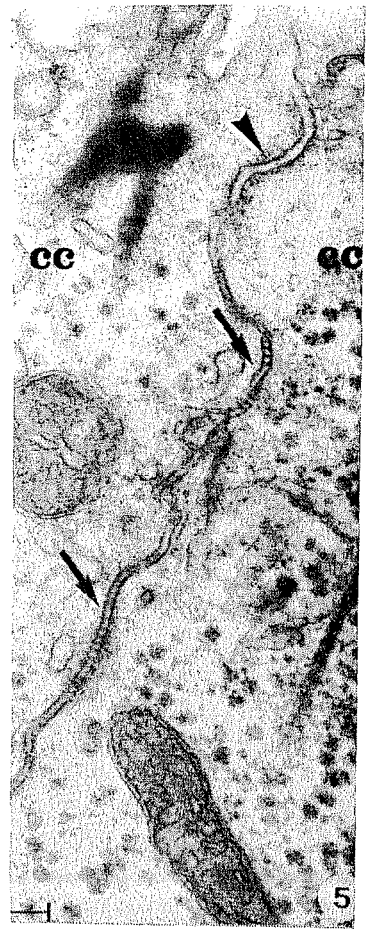
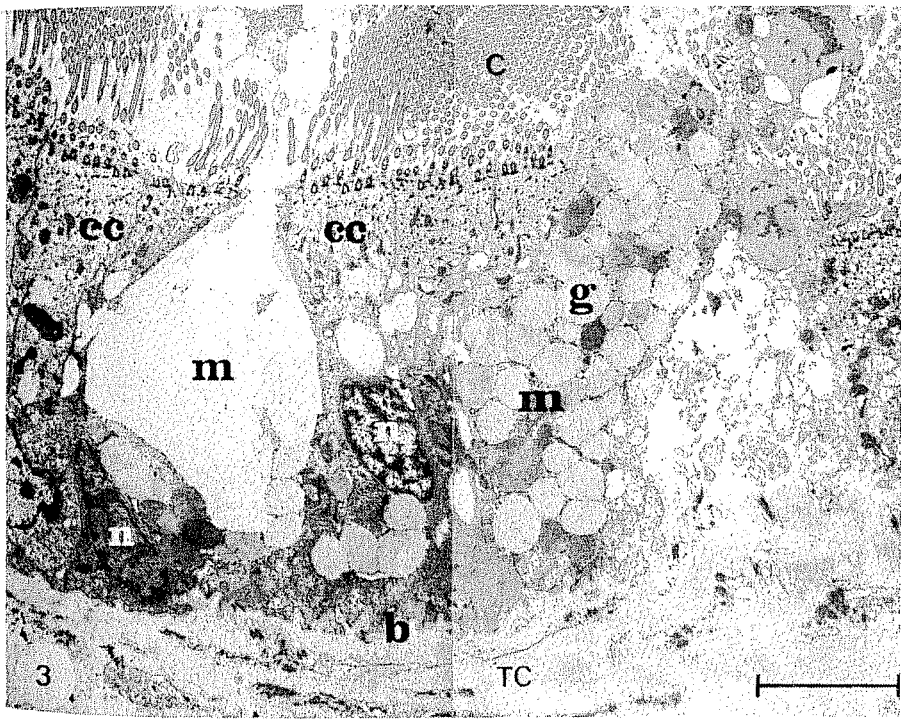
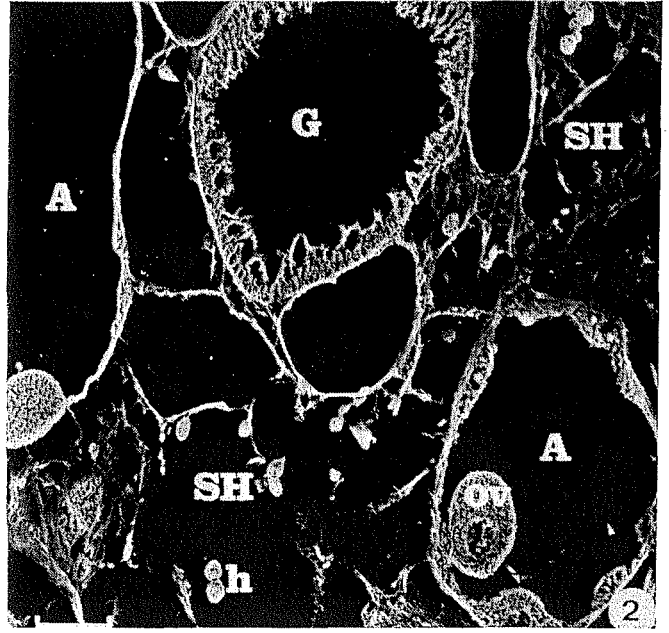
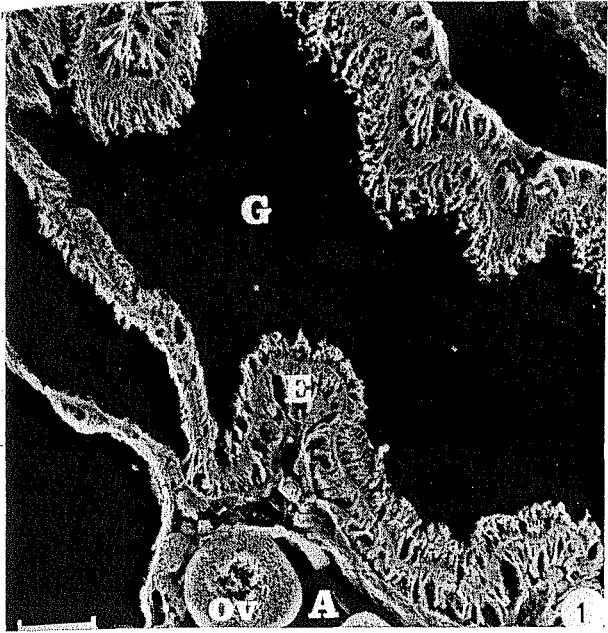
Photo 3 - Présence de deux mucocytes, l'un vide, l'autre plein de grains de sécrétion, entre les cellules ciliées d'un gonoducte. Prélèvement effectué en période de maturation sexuelle. M.E.T. Echelle : 5 μ m.

Photo 4 - Lamelle basale plissée (∇) sous l'épithélium des gonoductes, à la jonction acinus-gonoducte. M.E.T. Echelle : 1 μ m.

Photo 5 - Système jonctionnel entre les cellules épithéliales du gonoducte. A un belt-desmosome (∇) font suite des jonctions septées (∇). M.E.T. Echelle : 0,1 μ m.

- A : acinus.
- b : lame basale.
- c : cils.
- cc : cellule ciliée .
- E : épithélium du gonoducte.
- g : grain de mucus.
- G : conduit évacuateur ou gonoducte.
- h : hémocyte.
- m : mucocyte.
- mv : microvillosité.
- n : noyau.
- Ov : ovocyte.
- SH : sinus hémolympatique.
- TC : tissu conjonctif.

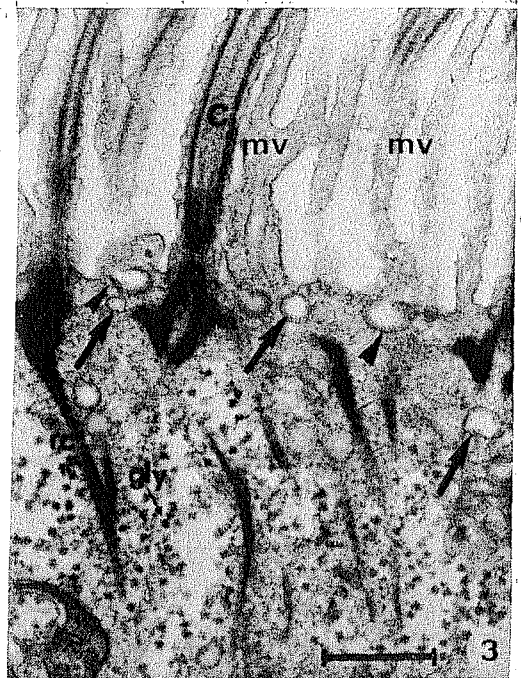
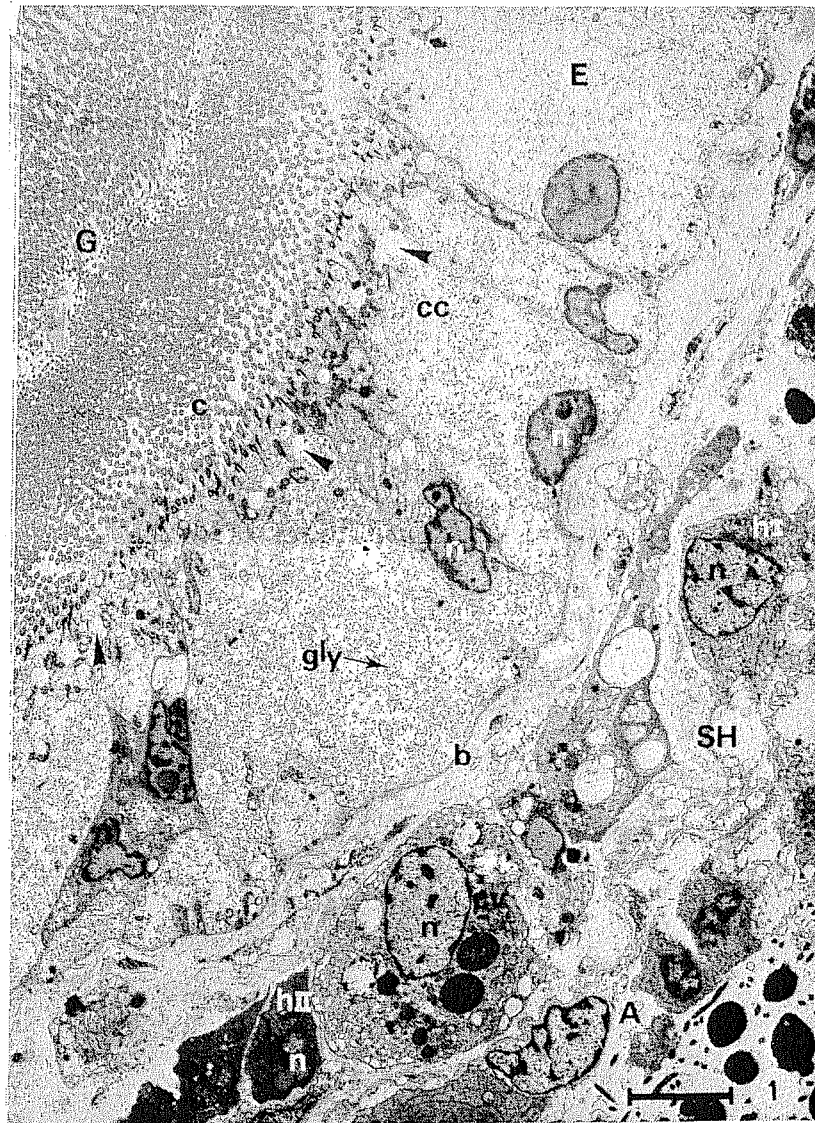




- PLANCHE 11 -

- Photo 1** - Cellules épithéliales chargées de glycogène présentant, à l'apex, de nombreuses vacuoles (▼). Le noyau est le plus souvent en position basale. Un sinus hémolympatique est visible sous le gonoducte. On y observe des hémocytes de type I et II ainsi qu'une volumineuse "cellule vacuolaire", adhérent largement au tissu conjonctif sous-jacent à l'épithélium. Son cytoplasme est ici chargé d'inclusions denses. Echelle : 5 µm.
- Photo 2** - Aspect festonné des microvilli (▼) intercalées entre les cils des cellules épithéliales du gonoducte. Echelle : 1 µm.
- Photo 3** - Invaginations de la membrane plasmique à la partie apicale des cellules (▼). Des vacuoles sont proches de la surface (▼). Les microvilli sont plus rectilignes qu'en 2. Echelle : 0,5 µm.

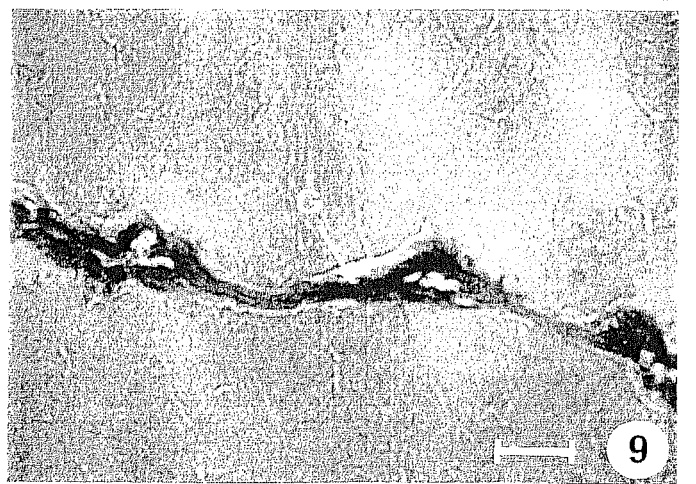
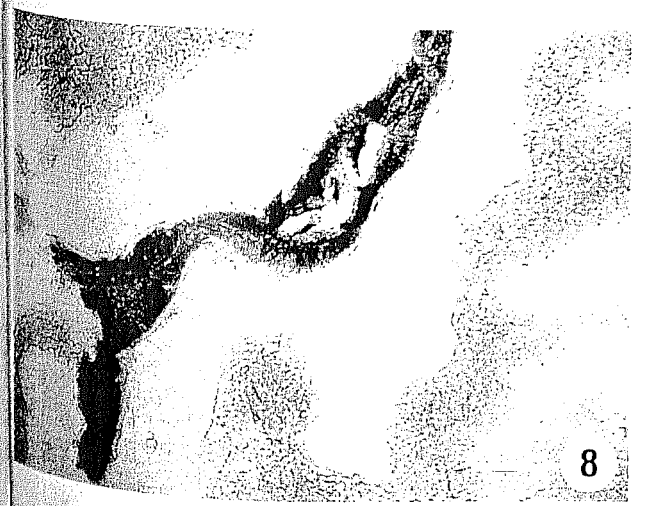
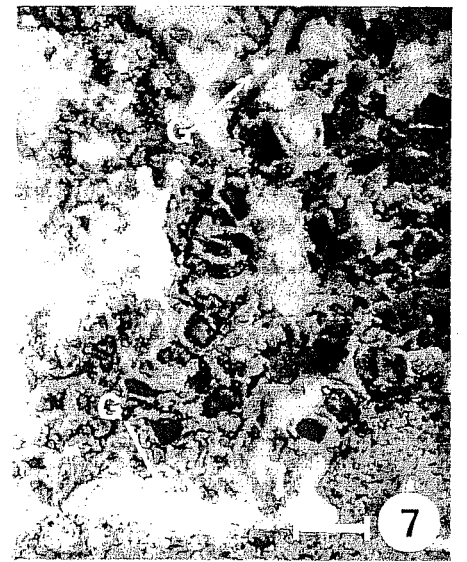
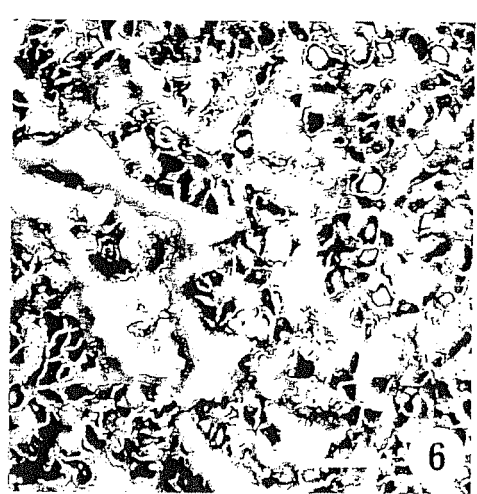
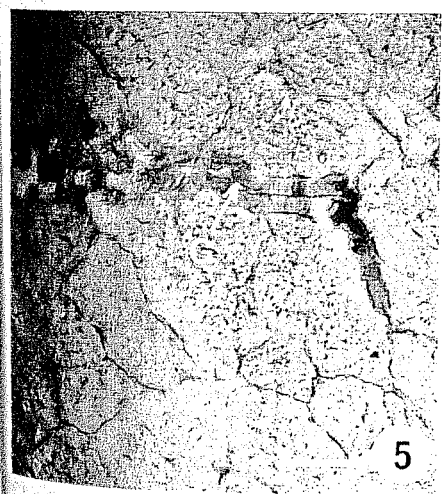
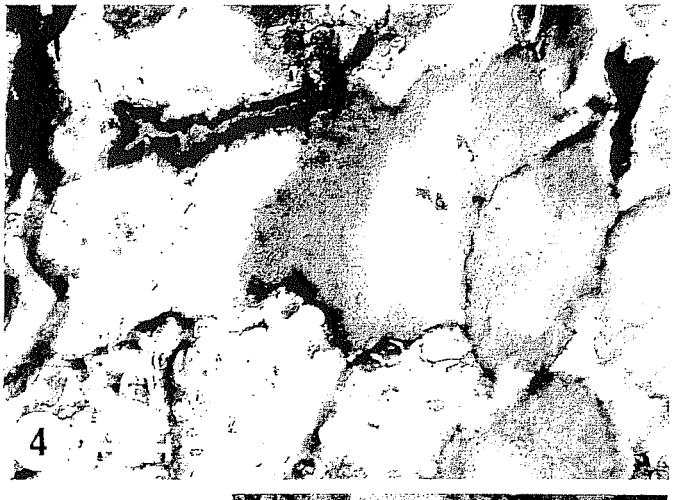
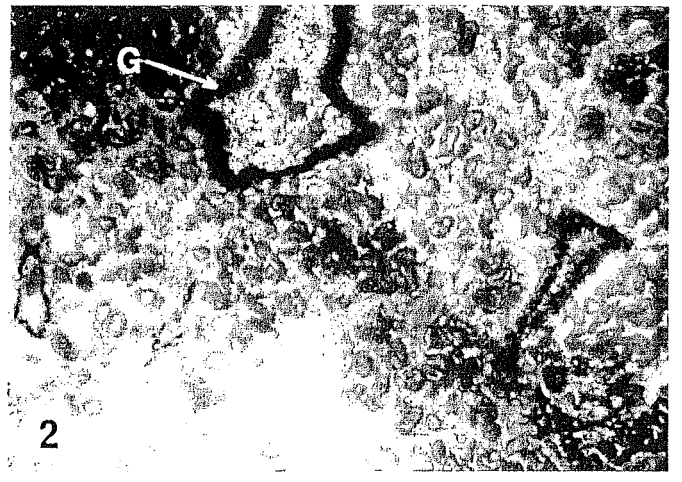
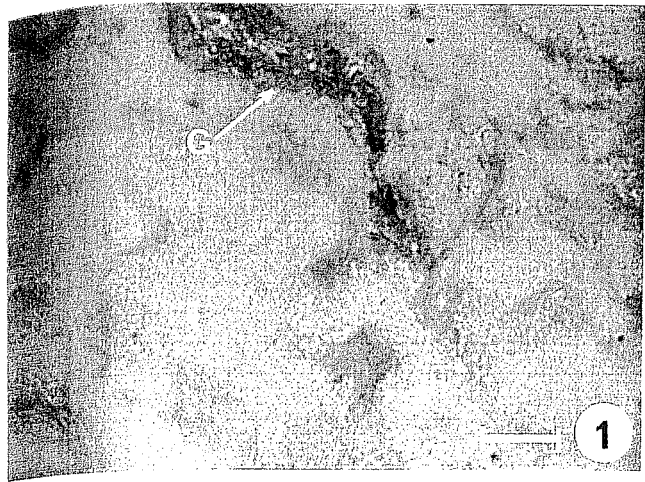
- A : acinus.
 b : lame basale.
 c : cils.
 cc : cellule ciliée.
 cv : cellule vacuolaire.
 E : épithélium.
 G : gonoducte.
 gly : glycogène.
 hI : hémocyte de type I.
 hII : hémocyte de type II.
 mv : microvilli.
 n : noyau.
 rc : racine ciliaire.
 SH : sinus hémolympatique.



- PLANCHE 12 -

- Photo 1** - Réaction faiblement positive à l'A.P.S. en hiver (coloration rouge).
Echelle : 100 μ m.
- Photo 2** - Réaction fortement positive à l'A.P.S. en période d'atrésie des gamètes. Echelle : 25 μ m.
- Photo 3** - Activité lipasique dans certaines cellules épithéliales (coloration brune). Echelle : 25 μ m.
- Photo 4** - Activité estérasique forte (coloration noirâtre).
Echelle : 100 μ m.
- Photo 5** - Activité phosphatasique alcaline (coloration rougeâtre).
Echelle : 100 μ m.
- Photo 6** - Activité phosphatasique acide (coloration rouge-brun).
Echelle : 100 μ m.
- Photo 7** - Activité amylasique. Le film d'amidon est digéré.
Echelle : 100 μ m.
- Photo 8** - Activité phosphorylasique (coloration rouge-brun).
Echelle : 25 μ m.
- Photo 9** - Activité aminopeptidasique (coloration rouge-brun).
Echelle : 25 μ m.

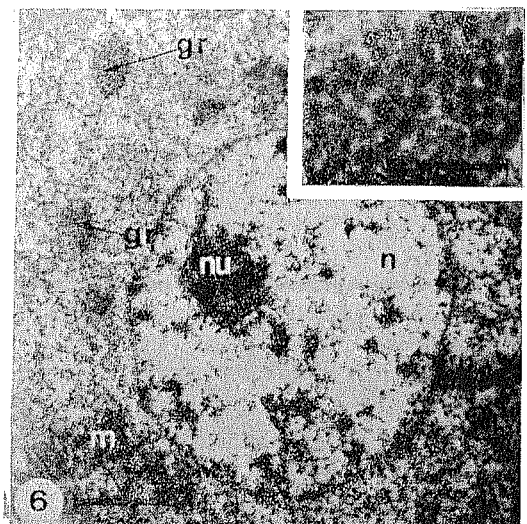
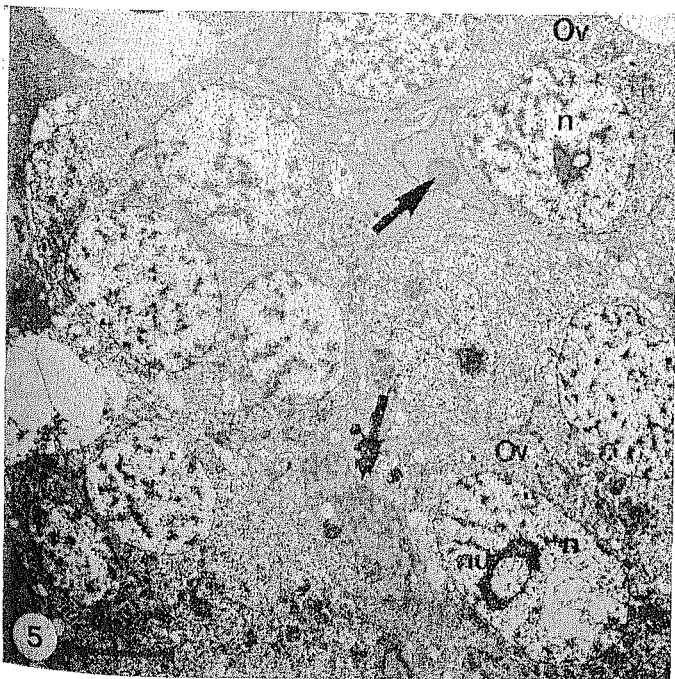
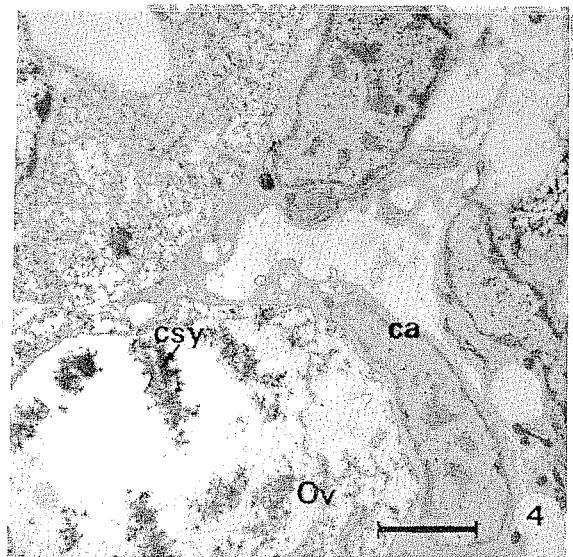
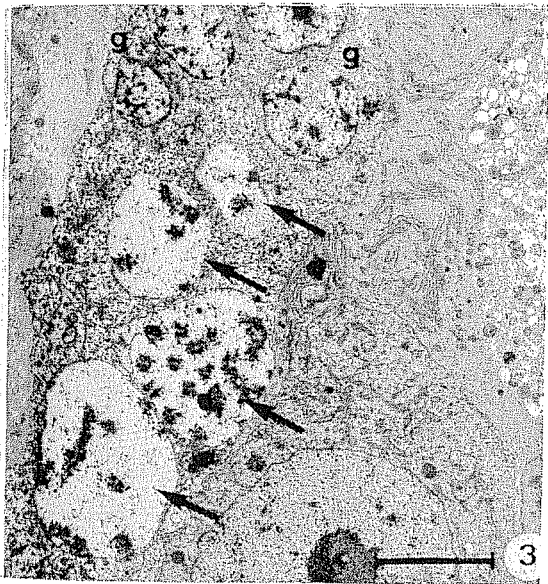
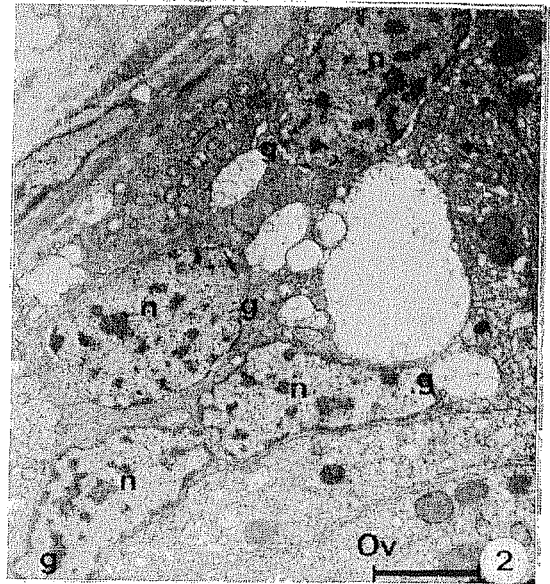
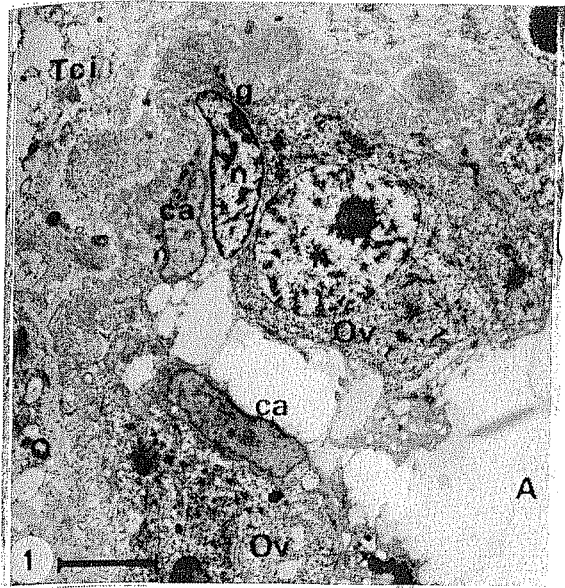
G : gonoducte.



- PLANCHE 13 -

- Photo 1 - Ovogonie primaire allongée au cytoplasme réduit. Présence de cellules auxiliaires et de jeunes ovocytes. Echelle : 5 μ m.
- Photo 2 - Présence de quatre ovogonies secondaires et vue partielle d'un ovocyte vitellogénique. Echelle : 2 μ m.
- Photo 3 - Ovocytes prévitellogéniques au stade zygotène-pachytène (\downarrow), identifiables aux complexes synaptonémaux. Echelle : 5 μ m.
- Photo 4 - Cellule auxiliaire accolée à un ovocyte au stade zygotène-pachytène. Echelle : 2 μ m.
- Photo 5 - Ovocytes au stade zygotène-pachytène et début diplotène. Réapparition du nucléole en anneau. Une cellule auxiliaire (∇) est accolée à chaque ovocyte. Echelle : 5 μ m.
- Photo 6 - Ovocyte au début du stade diplotène. Echelle : 2 μ m. Présence d'agrégats denses (grossis dans l'encart). Echelle : 0,5 μ m.

A : acinus.
 ca : cellule auxiliaire.
 csy : complexe synaptonémal.
 g : ovogonie.
 gr : granules denses.
 m : mitochondrie.
 n : noyau.
 nu : nucléole.
 Ov : ovocyte.
 Tci : tissu conjonctif interstitiel.



st

- PLANCHE 14 -

- Photo 1 - Ovocyte en début de vitellogénèse. Apparition des granules corticaux (▼). Echelle : 5 µm.
- Photo 2 - Formation des granules corticaux à proximité de dictyosomes et du R.E.G. Noter les diverses formes de transition (▼). Echelle : 1 µm.
- Photo 3 - Formes oblongues (▼) ou rondes des granules corticaux. Echelle : 1 µm.
- Photo 4 - Marquage positif des granules corticaux (I) à la réaction de Thiery. Présence de glycogène (▼) dans le cytoplasme de l'ovocyte. Echelle : 0,5 µm.
- Photo 5 - Ovocytes vitellogéniques. Les inclusions vitellines (▼) s'accumulent dans le cytoplasme où les granules corticaux sont déjà abondants. Les cellules auxiliaires ont acquis un abondant R.E.G. (▼). Echelle : 5 µm.

Ca : cellule auxiliaire.

d : dictyosome.

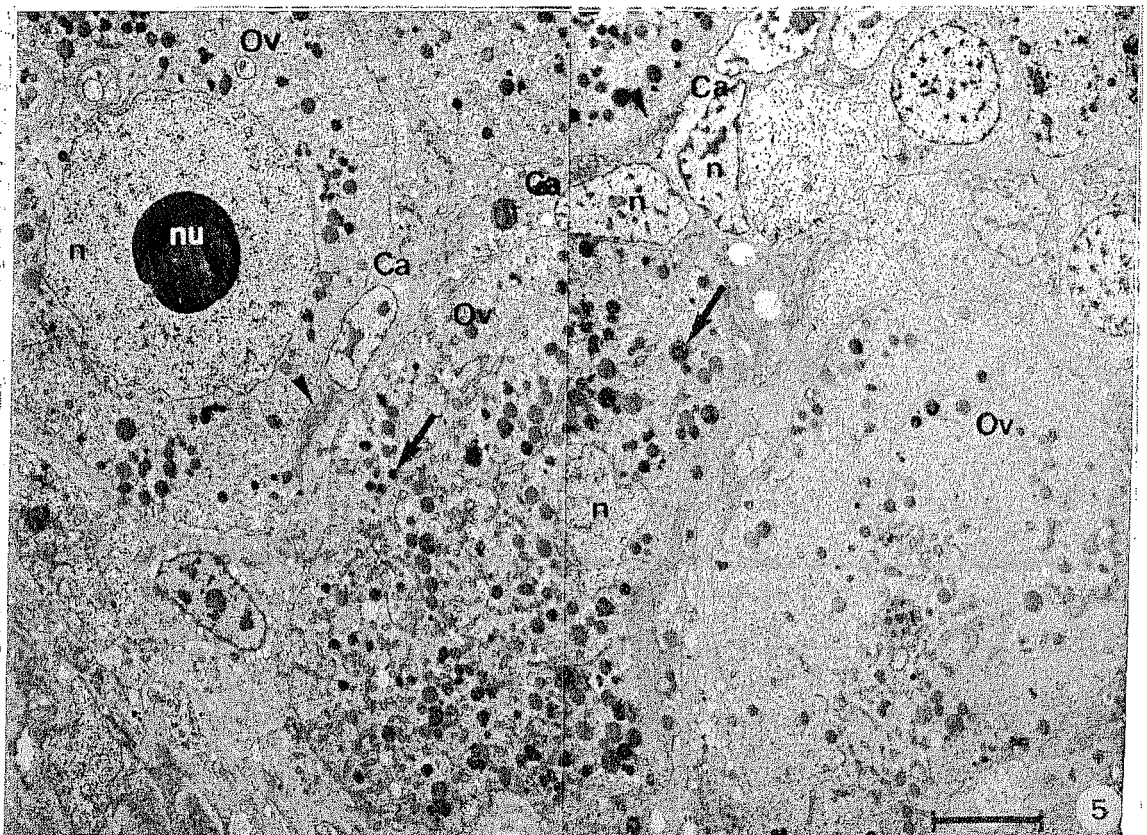
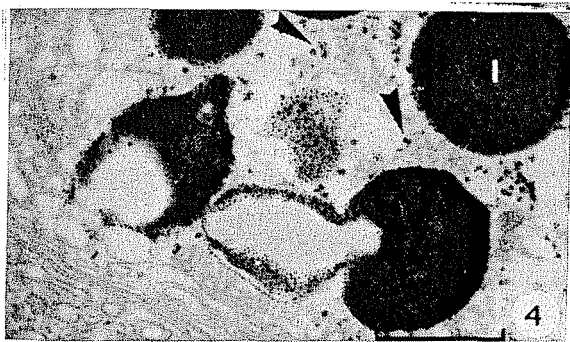
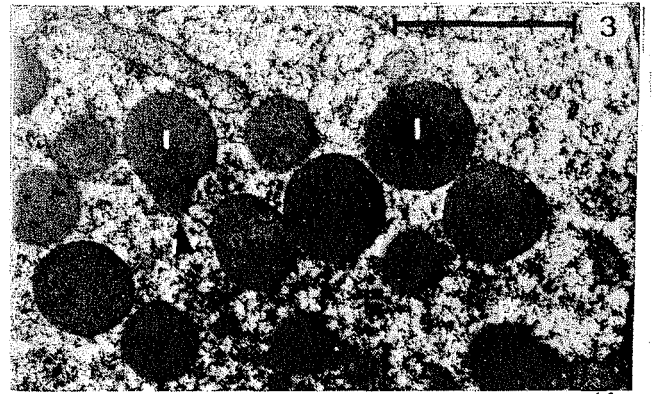
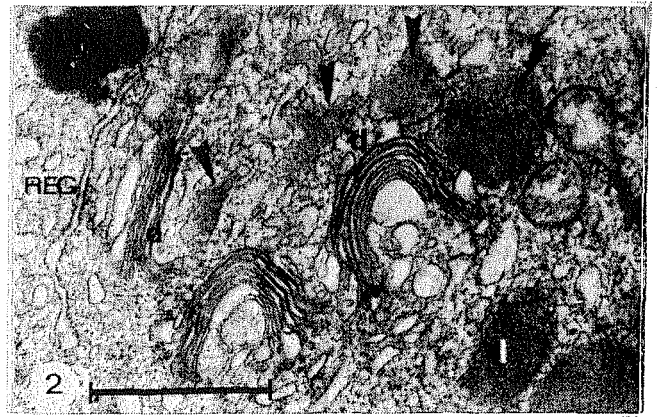
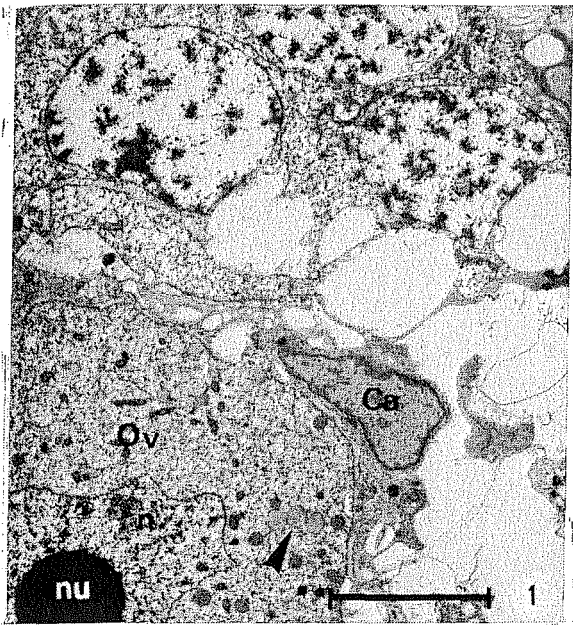
I : granules corticaux.

n : noyau

nu : nucléole.

Ov : ovocyte.

REG : reticulum endoplasmique granuleux.



ery.

lent
i.

- PLANCHE 15 -

- Photo 1 - Cellules auxiliaires (↓) accolées aux jeunes ovocytes adhérant largement au tissu conjonctif interstitiel. M.E.B. Echelle : 10 μm.
- Photos 2 et 3 - Endocytose (▽) dans l'ovocyte au niveau de la zone de contact ovocyte - cellule auxiliaire. M.E.T. Echelle : 2 : 1 μm ; 3 : 0,2 μm.
- Photos 4 et 5 - Détails d'une cellule auxiliaire. Noter l'abondant R.E.G., les volumineuses mitochondries, un dictyosome. M.E.T. Echelle : 4 : 1 μm ; 5 : 1 μm.
- Photo 6 - Elaboration de l'enveloppe vitelline (↓) dans un ovocyte vitellogénique. Un système jonctionnel (▽) est visible entre l'ovocyte et la cellule auxiliaire. M.E.T. Echelle : 5 μm.
- Photo 7 - Zone de contact cellule auxiliaire - ovocyte renforcée par un système de jonction (▽) lors de l'élaboration de l'enveloppe vitelline. Celle-ci se forme à partir de la périphérie de la cellule auxiliaire. Une volumineuse vacuole au contenu fibrillaire est visible dans la cellule auxiliaire. M.E.T. Echelle : 2 μm.
- Photo 8 - Système jonctionnel de type "zonula adherens" (▽) entre la cellule auxiliaire et l'ovocyte. M.E.T. Echelle : 0,2 μm.

Ca : cellule auxiliaire.

d : dictyosome.

Ev : enveloppe vitelline.

m : mitochondrie.

n : noyau.

nu : nucléole.

Ov : ovocyte.

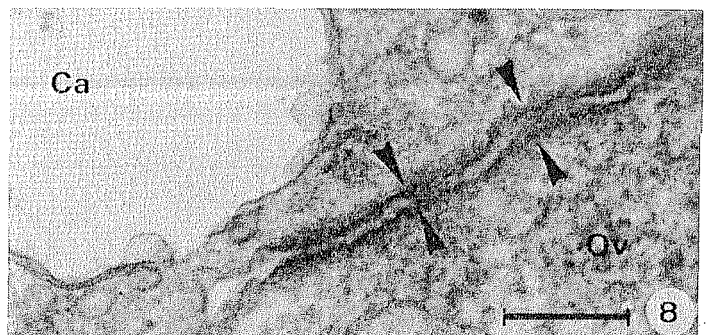
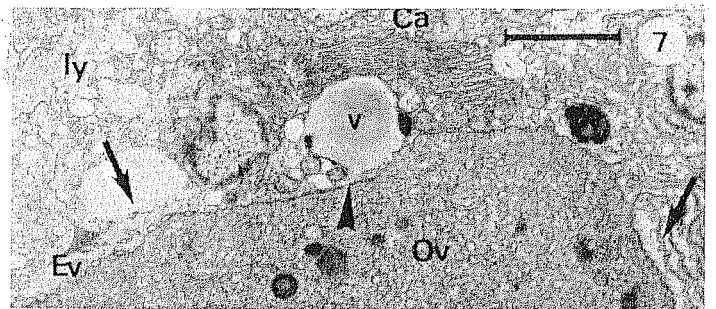
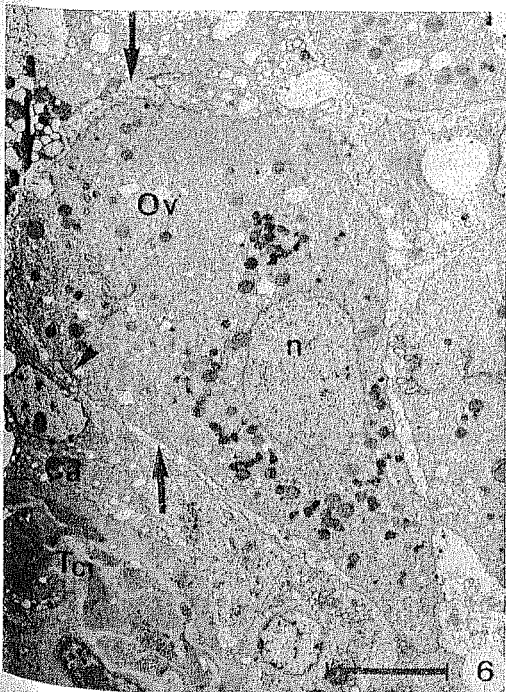
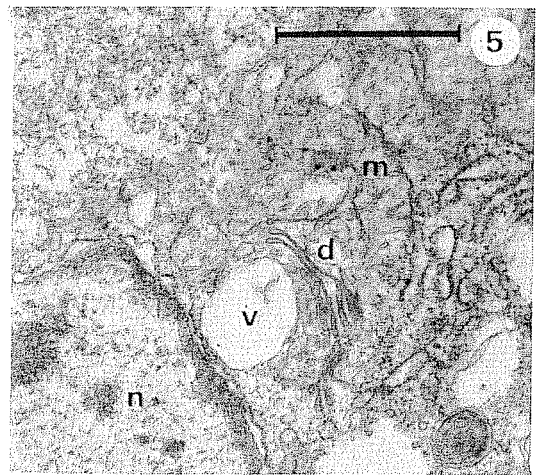
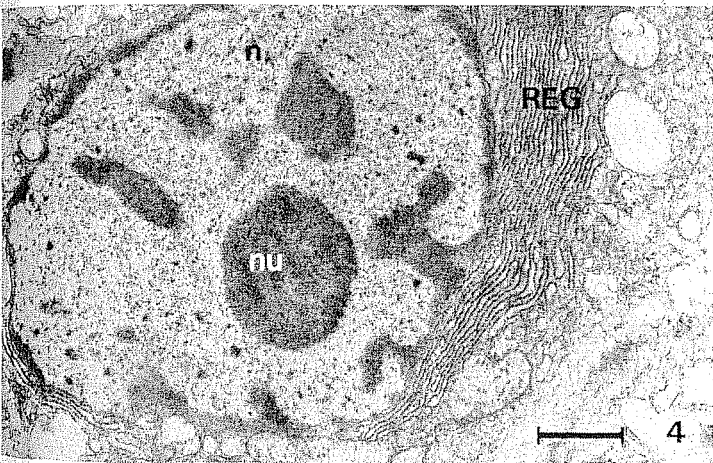
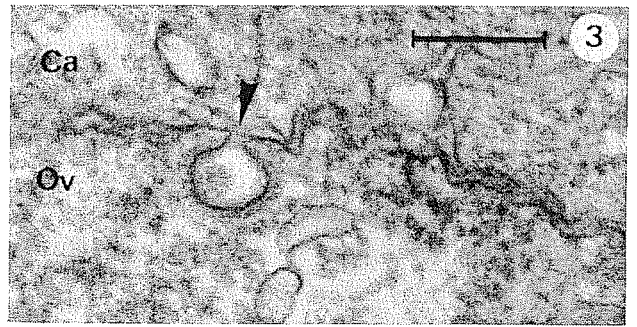
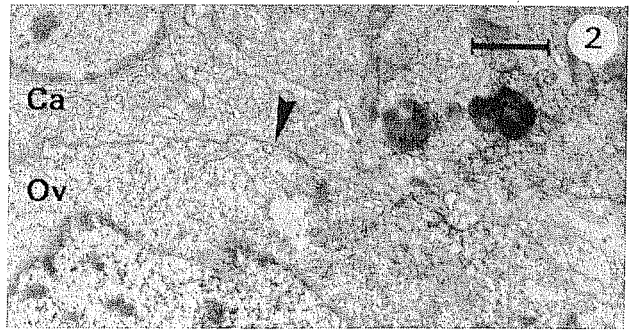
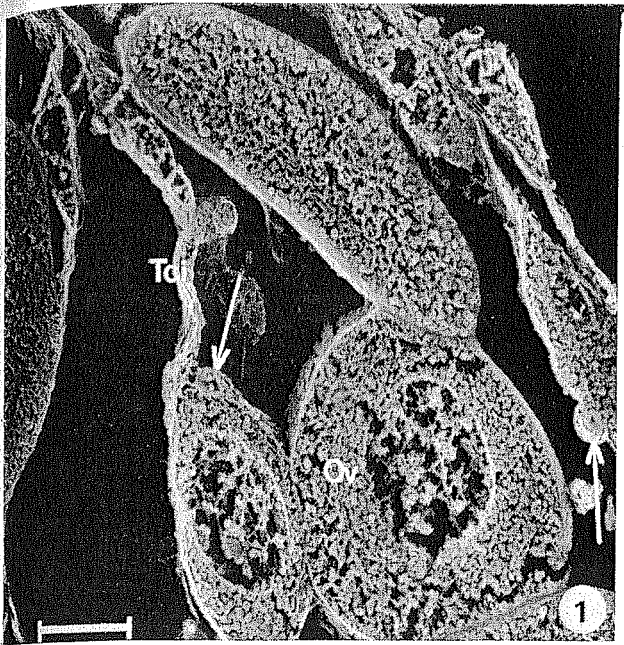
ly : débris de lyse.

REG : reticulum endoplasmique granuleux.

Tci : tissu conjonctif interstitiel.

v : vacuole.

it
μm.
le
1 ;
:
:
L-
o-

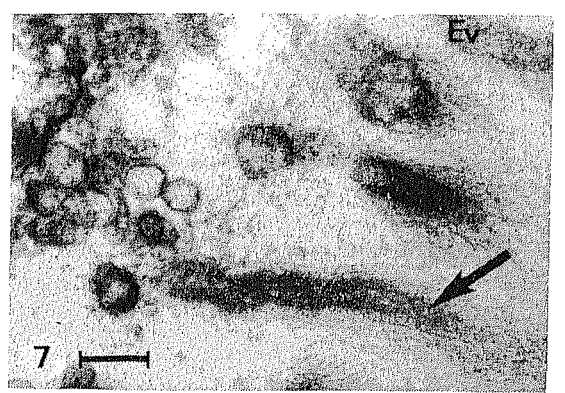
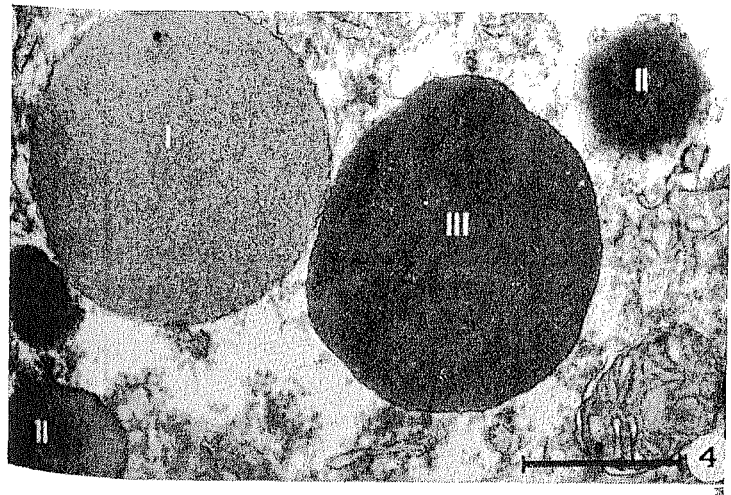
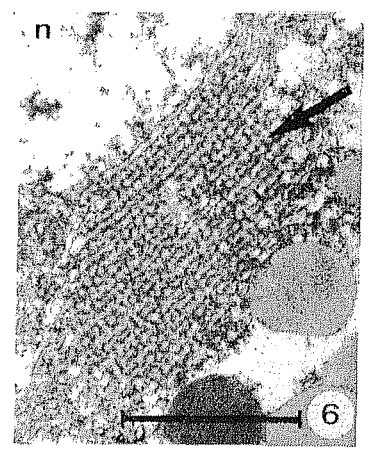
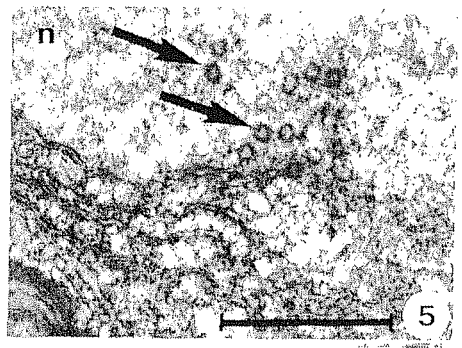
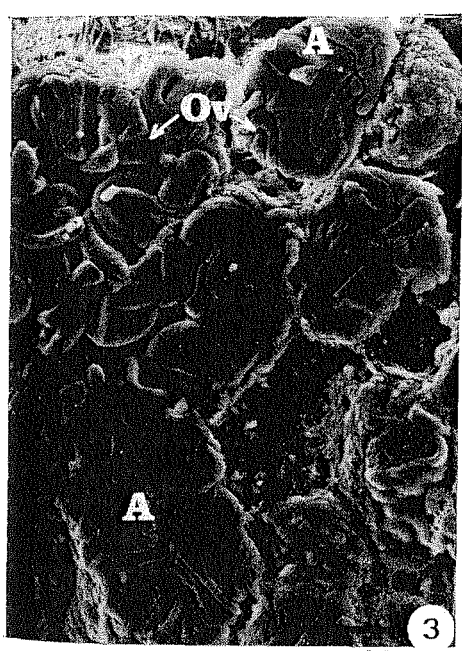
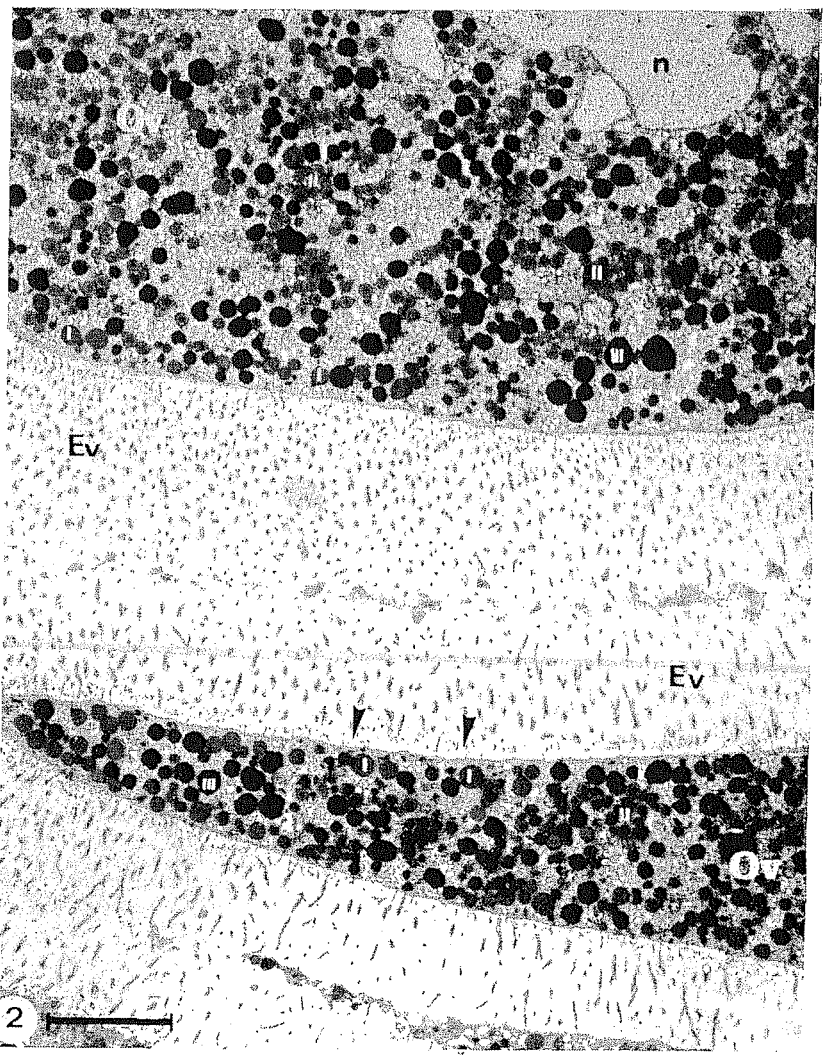
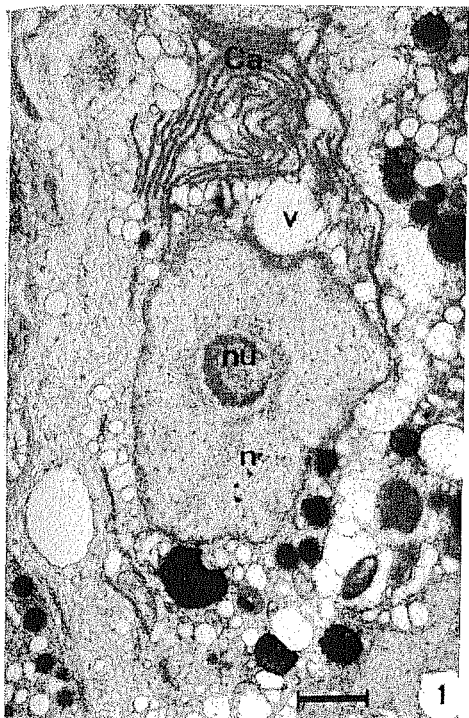


- PLANCHE 16 -

CARACTERISTIQUES STRUCTURALES
DE LA CELLULE AUXILIAIRE, SEPARÉE DE L'OVOCYTE,
ET DE L'OVOCYTE EN FIN DE VITELLOGENÈSE

- Photo 1 - Vacuolisation de la cellule auxiliaire. M.E.T. Echelle : 1 μ m.
- Photo 2 - Portions d'ovocytes en fin de vitellogenèse. Noter l'épaisse enveloppe vitelline, le mince espace périvitellin (∇), les abondantes inclusions denses I, II et III. Les inclusions I ou granules corticaux sont nombreuses en périphérie. Le noyau présente un contour irrégulier. M.E.T. Echelle : 1 μ m.
- Photo 3 - Ovocytes tassés dans les acini en période de maturité sexuelle. M.E.B. Echelle : 100 μ m.
- Photo 4 - A fort grossissement, inclusions I (granules corticaux), II (lipides), III (glycoprotéines). M.E.T. Echelle : 0,5 μ m.
- Photo 5 - Nombreux pores nucléaires (∇). M.E.T. Echelle : 1 μ m.
- Photo 6 - Lamelles annelées (∇). M.E.T. Echelle : 1 μ m.
- Photo 7 - Microfilaments (∇) sur les pourtours des microvilli de l'enveloppe vitelline. M.E.T. Echelle : 1 μ m.

A : acinus.
Ca : cellule auxiliaire.
Ev : enveloppe vitelline.
n : noyau.
nu : nucléole.
Ov : ovocyte.
v : vacuole.

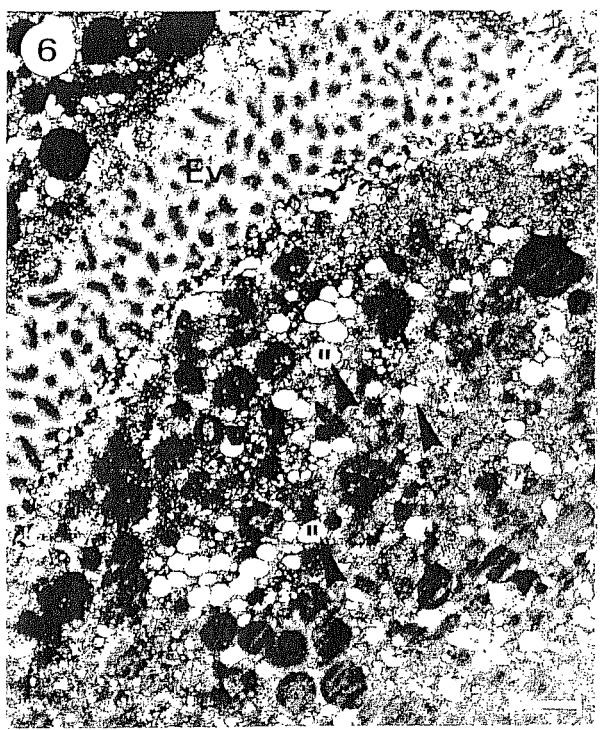
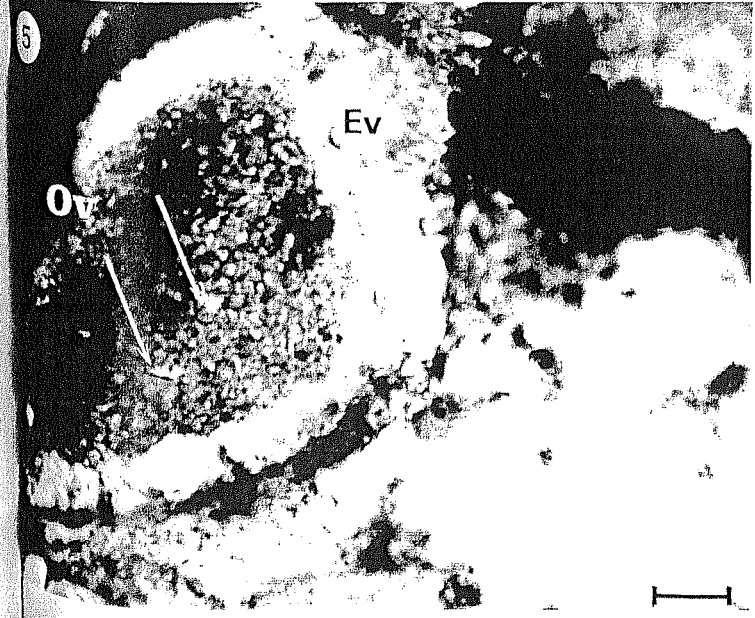
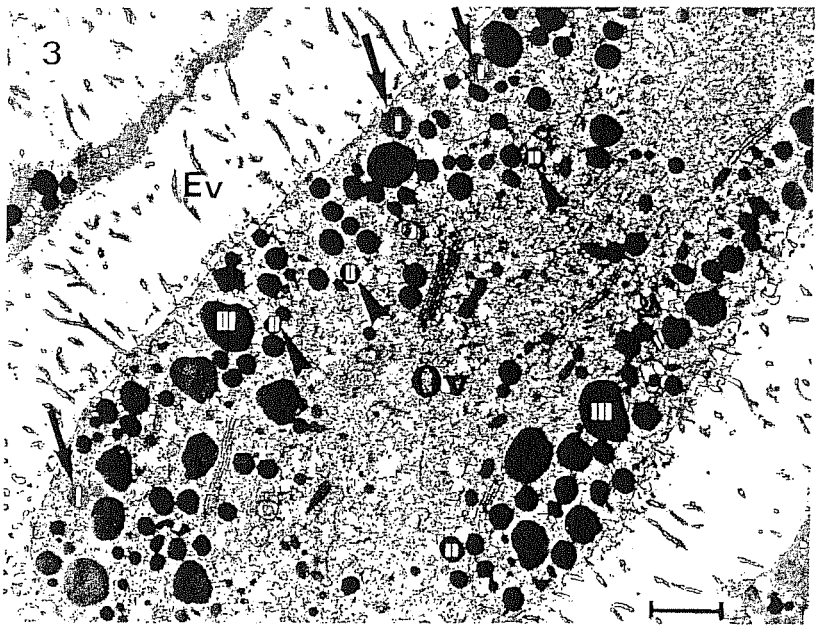
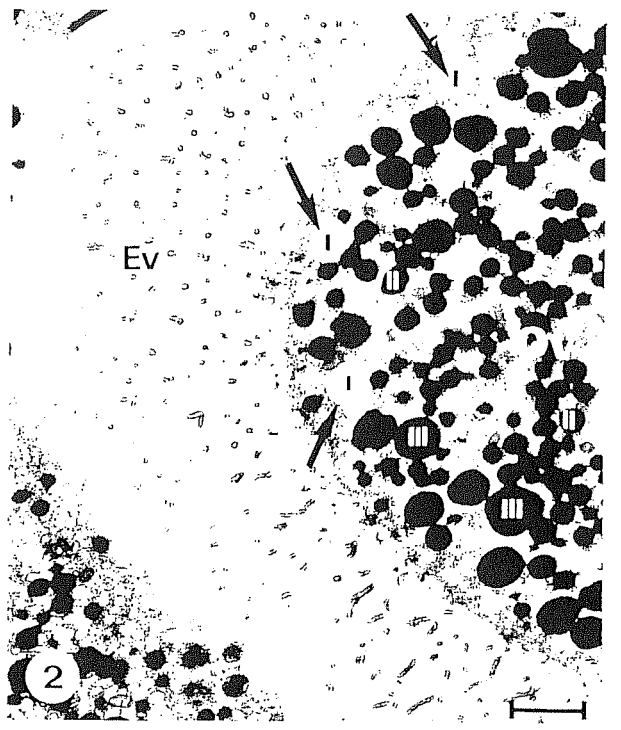
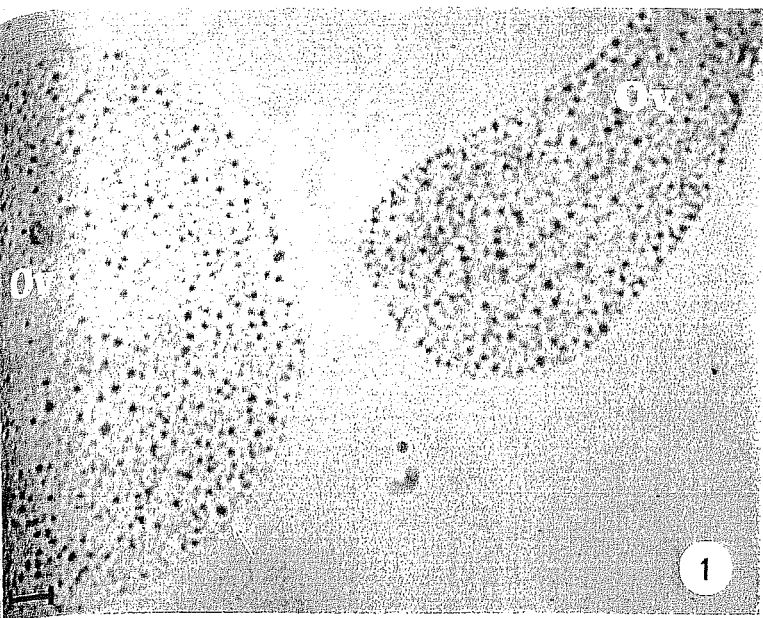


- PLANCHE 17 -

- Photo 1** - Coloration des protéines basiques au ponceau de xylydine sur coupe semi-fine. Mise en évidence d'inclusions de nature protéique, abondantes en périphérie de l'ovocyte (↓) et disséminées dans le cytoplasme. Echelle : 1 μm.
- Photo 2** - Digestion par la protéinase des inclusions I (granules corticaux, ↓) sur coupe ultra-fine. Echelle : 1 μm.
- Photo 3** - Coupe ultra-fine témoin montrant les trois types d'inclusions denses I, II, III (↓ ▽). Echelle : 1 μm.
- Photo 4** - Coloration des lipides totaux au Noir Soudan sur coupe à congélation. Nombreux globules lipidiques colorés en noir (↓). Echelle : 15 μm.
- Photo 5** - Coloration des lipides neutres au sulfate de bleu de Nil (↓), sur coupe à congélation. Echelle : 10 μm.
- Photo 6** - Localisation des lipides sur une coupe ultra-fine d'échantillon de gonade préfixé pour la M.E.T. Après extraction au méthanol-chloroforme, les lipides apparaissent, par comparaison au témoin (photo 3), localisés au niveau des inclusions II (▽). Echelle : 1 μm.

Ev : enveloppe vitelline.

Ov : ovocyte.



- PLANCHE 18 -

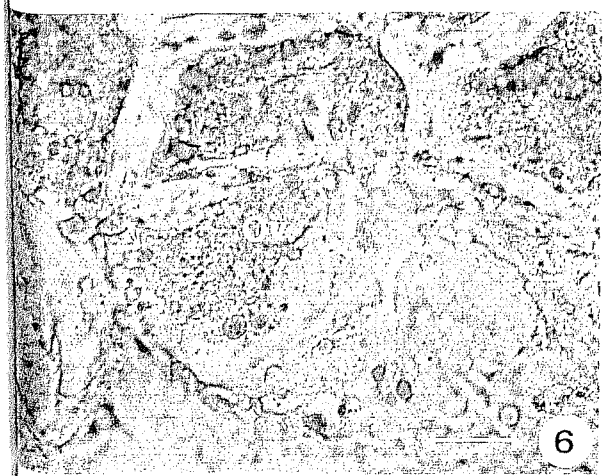
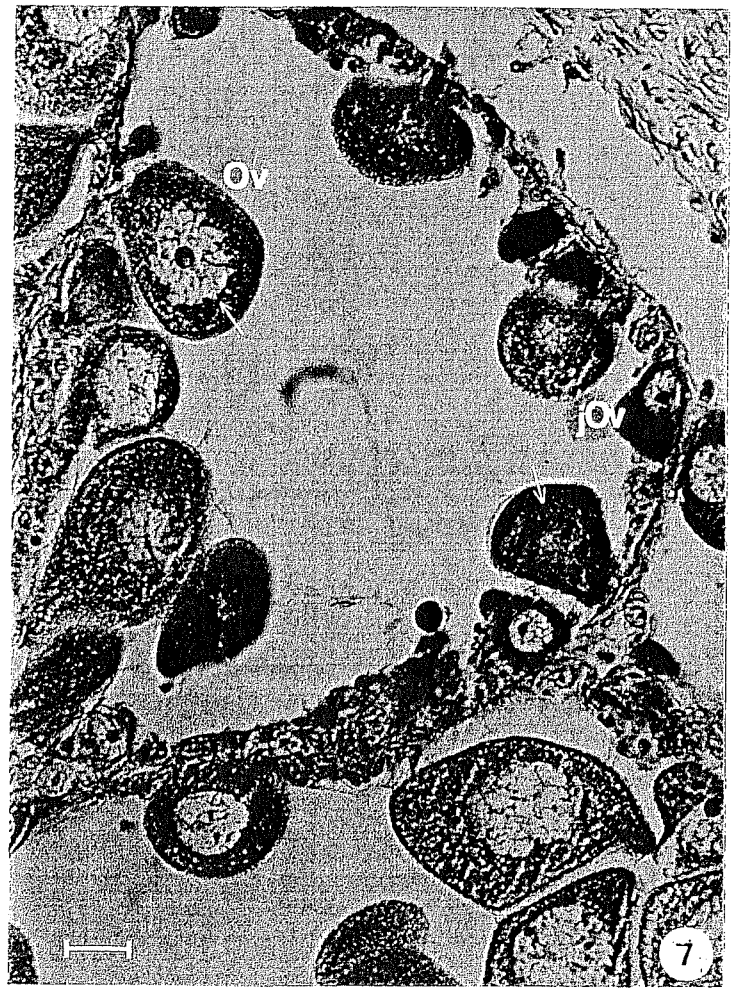
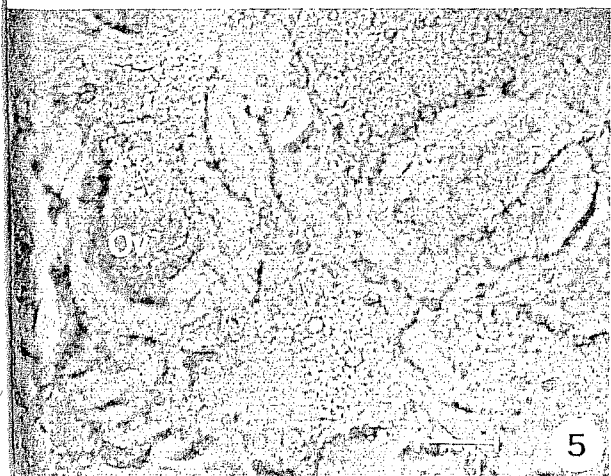
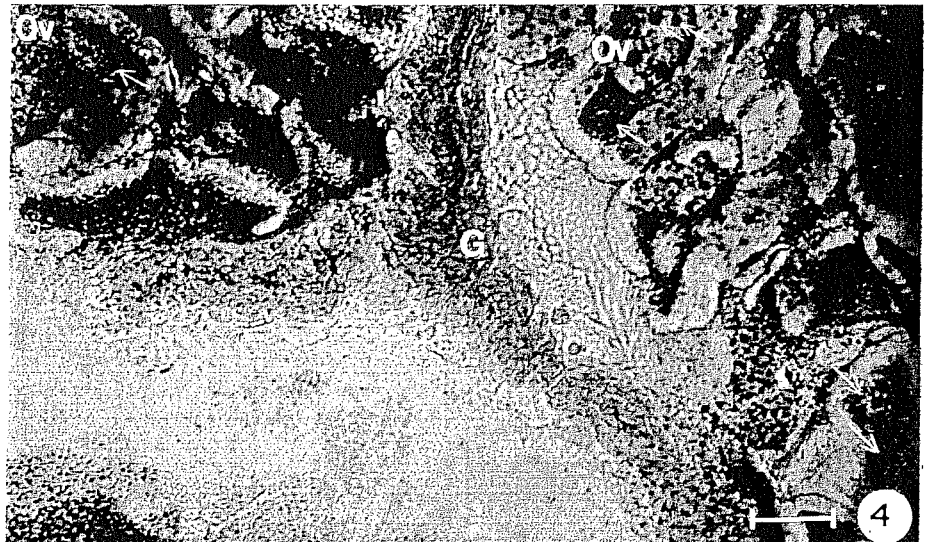
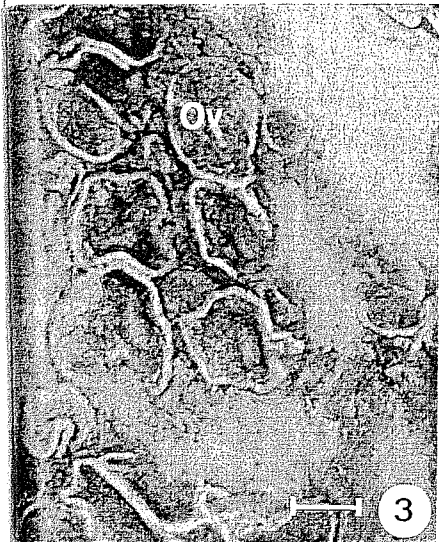
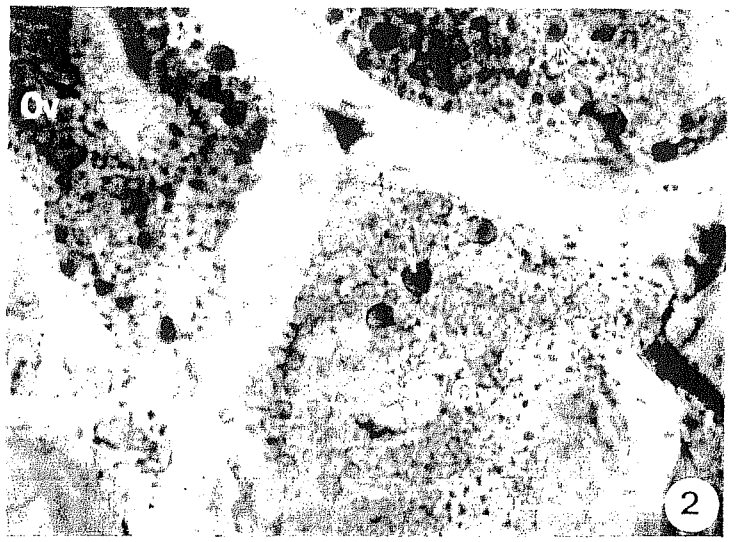
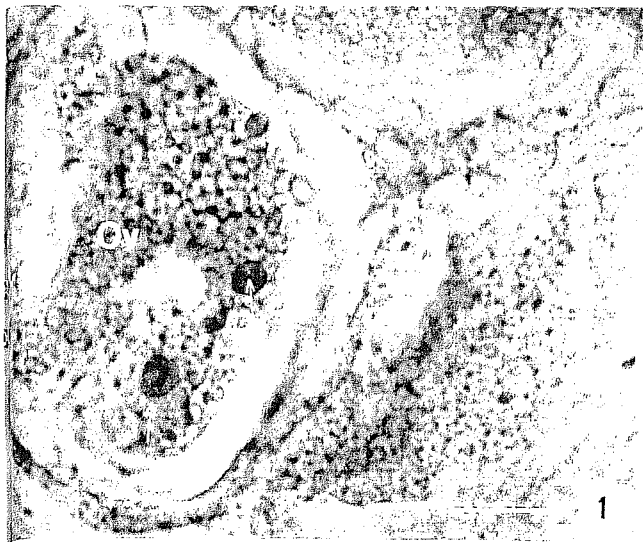
- Photo 1 - Estérase témoin. Globules non marqués (↓). Echelle : 15 μm.
- Photo 2 - Activité estérasique dans des globules cytoplasmiques dont le centre est coloré en noir (↓). Echelle : 15 μm.
- Photo 3 - Phosphatase acide témoin. Echelle : 50 μm.
- Photo 4 - Activité phosphatasique acide forte. Coloration rouge-brun de globules cytoplasmiques (↓). Echelle : 25 μm.
- Photo 5 - Aminopeptidase témoin (globules cytoplasmiques colorés en jaune). Echelle : 25 μm.
- Photo 6 - Légère coloration positive (rose) de globules cytoplasmiques lors de la mise en évidence de l'aminopeptidase (↓). Echelle : 25 μm.
- Photo 7 - Réaction au vert de méthyle-pyronine sur coupe en paraffine. Noter la pyroninophilie (↓) croissante des ovocytes en vitellogénèse. Echelle : 15 μm.

Ev : enveloppe vitelline.

G : gonoducte.

jOv : jeune ovocyte.

Ov : ovocyte vitellogénique.



- PLANCHE 19 -

- Photo 1 - Période hivernale. Nombreuses gonies primaires (↓), quelques gonies secondaires (↓) et quelques spermatozoïdes. Echelle : 10 µm.
- Photo 2 - Début de maturation. Assises de gonies primaires en périphérie (↓); gonies secondaires (↓), spermatocytes et spermatozoïdes. Echelle : 10 µm.
- Photo 3 - Maturation active. Nombreuses assises de gonies secondaires ; quelques gonies primaires. Abondance de spermatocytes et spermatides. Nombreux spermatozoïdes. Echelle : 10 µm.
- Photo 4 - Fin de maturation. Quelques gonies secondaires et spermatocytes nombreux (↓), dont certains, aisément repérables, sont en anaphase (↓), spermatides et spermatozoïdes. Echelle : 10 µm.

Cv : cellule vacuolaire.

gp : gonie primaire.

gs : gonie secondaire.

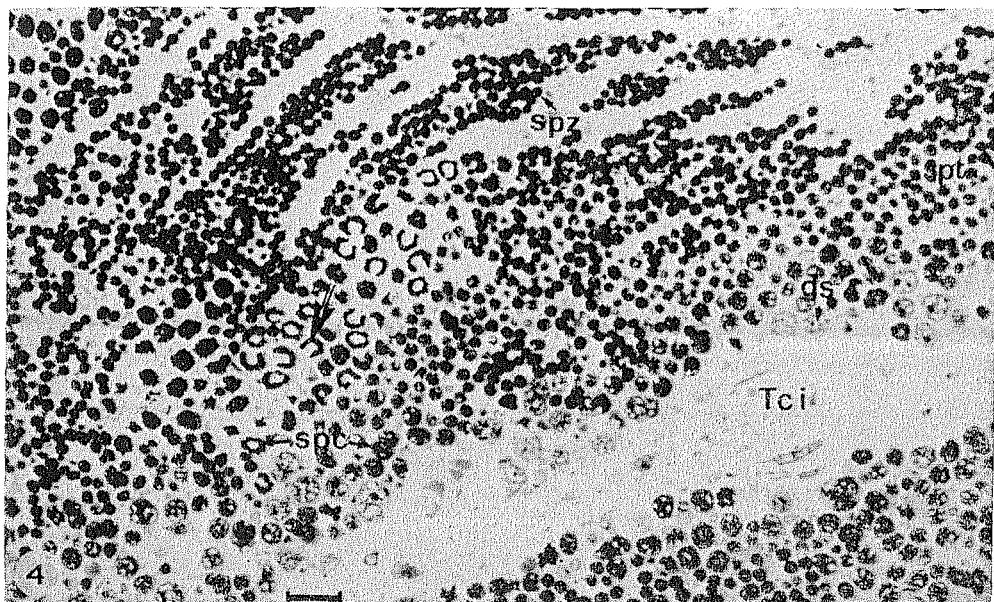
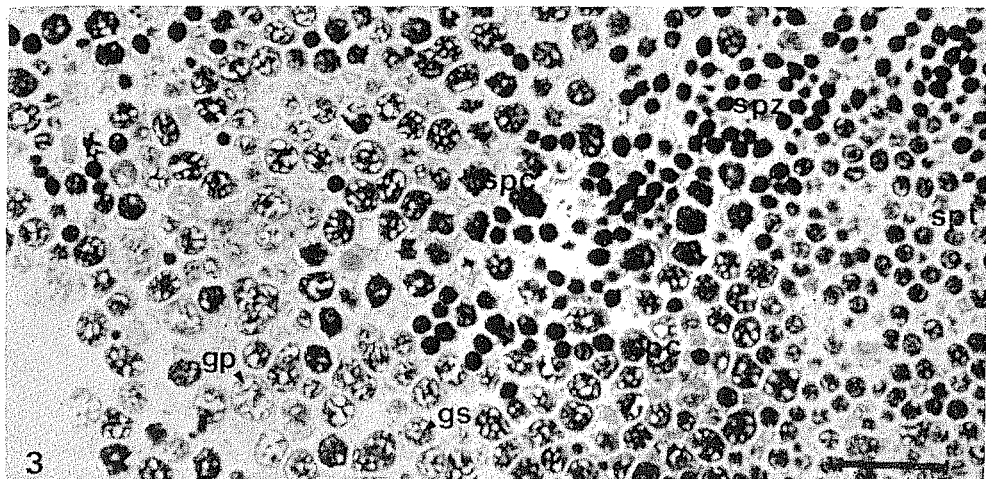
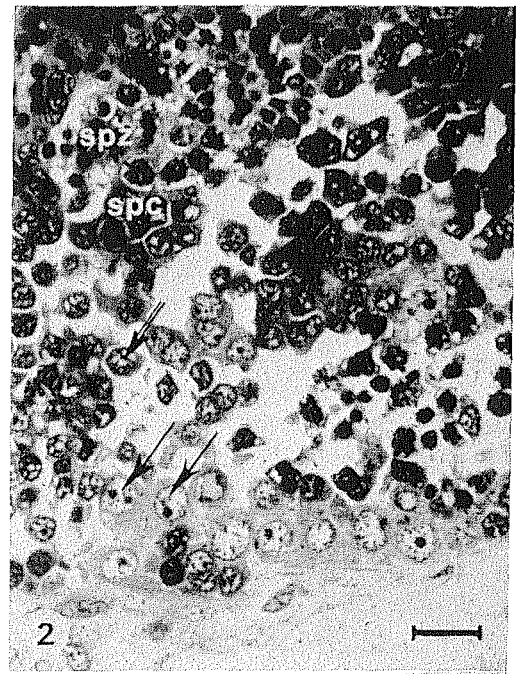
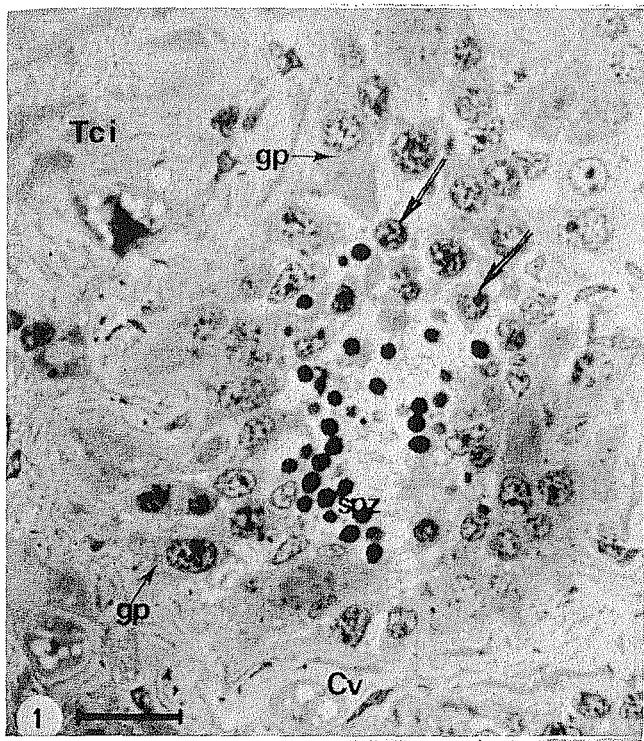
spc : spermatocyte.

spt : spermatide.

spz : spermatozoïde.

Tci : tissu conjonctif interstitiel.

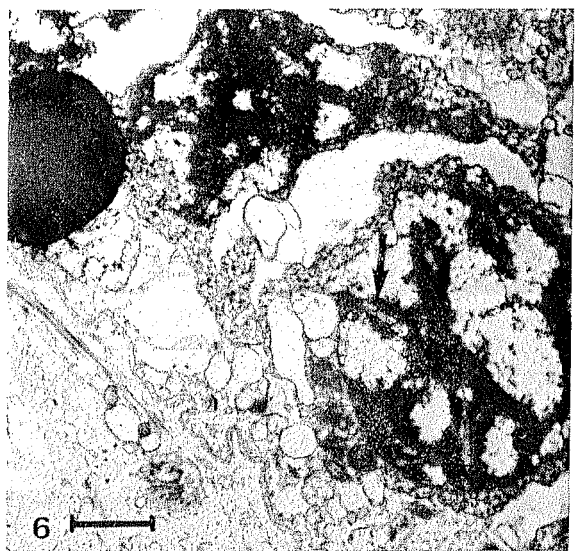
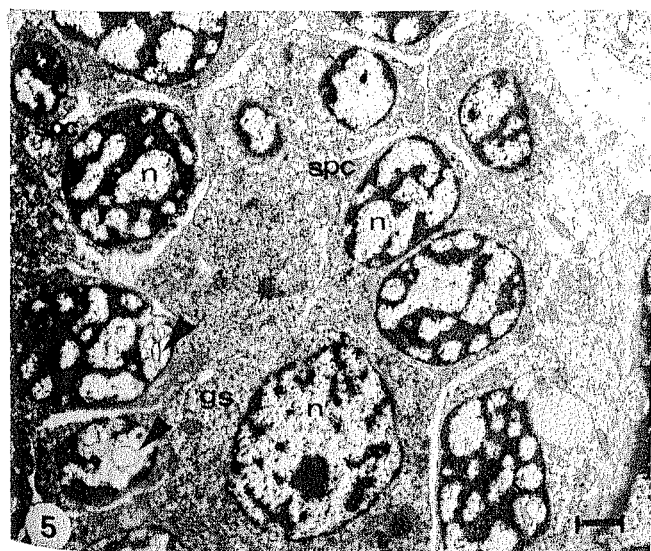
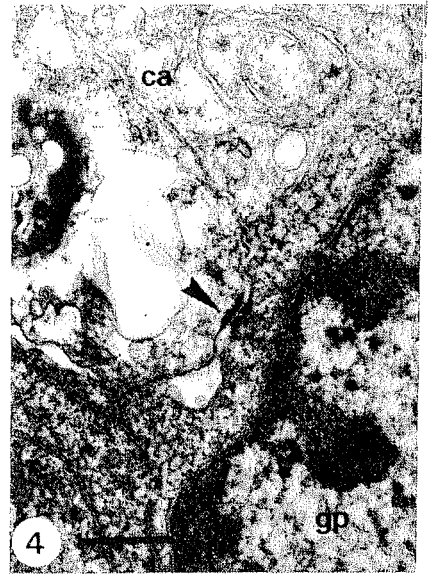
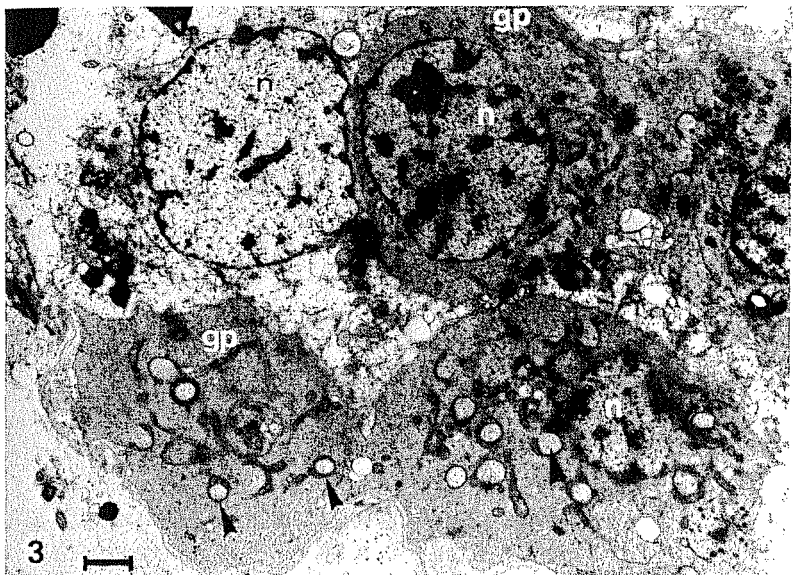
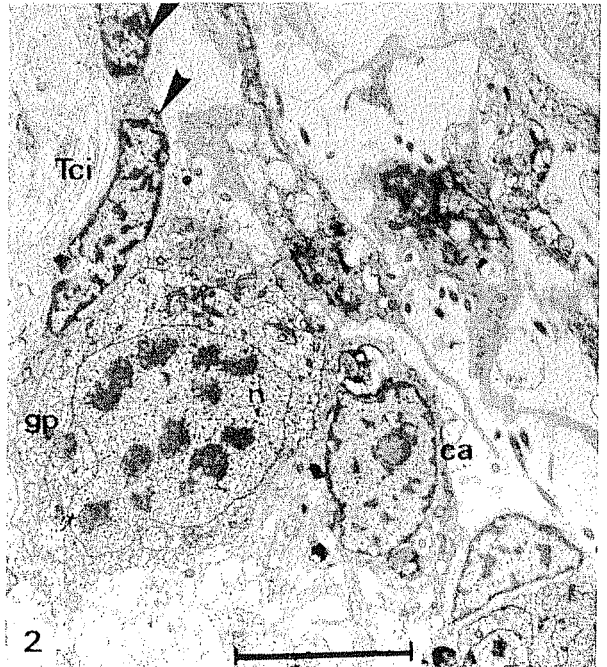
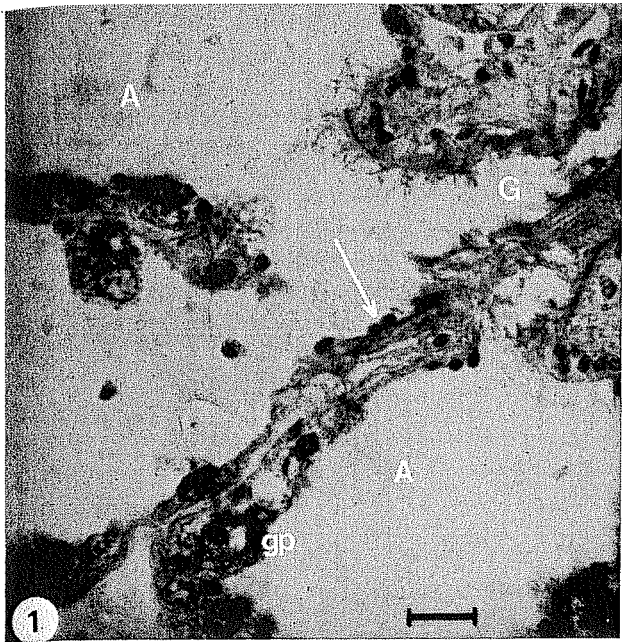
nies
e
.
;
-
:s
hase



- PLANCHE 20 -

- Photo 1 - Acini vides en hiver. Présence de cellules somatiques étroites (↓) et de gonies primaires. Coupe en paraffine. Echelle : 15 µm.
- Photo 2 - Gonie primaire en mitose. Cellule auxiliaire avec inclusions denses et cellules somatiques étroites (▼) contre le tissu conjonctif interstitiel. M.E.T. Echelle : 5 µm.
- Photo 3 - Mitochondries en altère ou circulaires (▼) avec matériel granulaire, dans des gonies primaires. Cellule auxiliaire accolée aux gonies primaires. M.E.T. Echelle : 1 µm.
- Photo 4 - Desmosome (▼) entre une cellule auxiliaire et une gonie. M.E.T. Echelle : 0,5 µm.
- Photo 5 - Gonie secondaire et spermatocytes de 1er ordre en début de première prophase méiotique. Présence de vacuoles intranucléaires (▼) dans les spermatocytes. M.E.T. Echelle : 1 µm.
- Photo 6 - Spermatocyte I au stade pachytène identifiable par ses complexes synaptonémaux (↓). M.E.T. Echelle : 1 µm.

A : acinus.
 ca : cellule auxiliaire.
 G : gonoducte.
 gp : gonie primaire.
 gs : gonie secondaire.
 spc : spermatocyte.
 n : noyau.
 Tci : tissu conjonctif interstitiel.



- PLANCHE 21 -

- Photo 1 - Spermatocytes au stade diplotène-diacinèse avec réseau chromatinien moins condensé. Echelle : 5 μ m.
- Photo 2 - Spermatocyte I en anaphase. Echelle : 1 μ m.
- Photo 3 - Spermatocytes I, en fin de prophase ; spermatocytes II (\downarrow) ; spermatides et spermatozoïdes. Echelle : 5 μ m.
- Photo 4 - Spermatides en formation (\downarrow). Echelle : 1 μ m.
- Photo 5 - Séparation des deux spermatides (\downarrow). Echelle : 1 μ m.
- Photo 6 - Spermatides individualisées. Regroupement des mitochondries en collerette à la base du noyau. Echelle : 1 μ m.

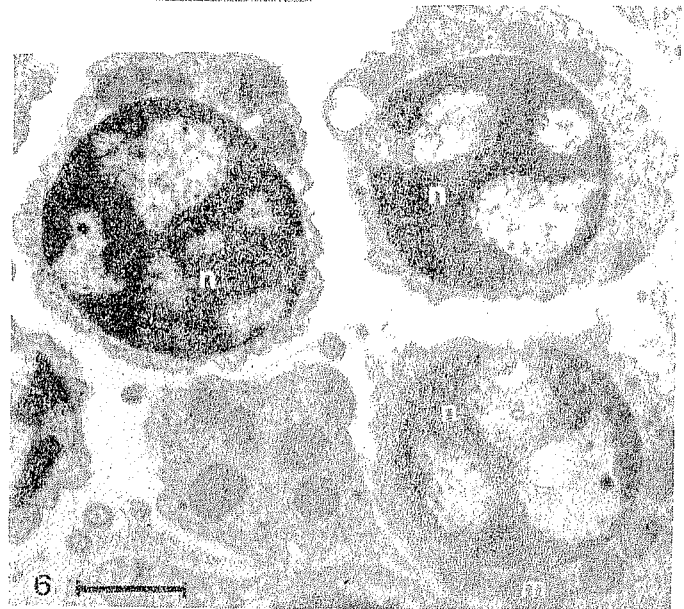
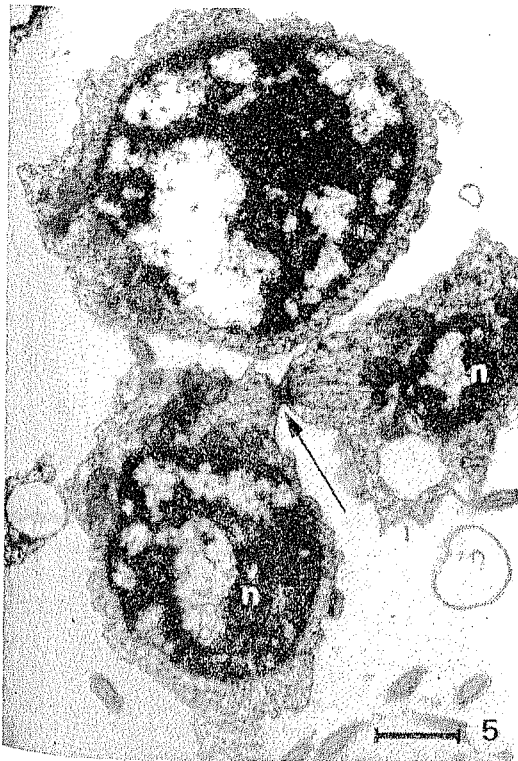
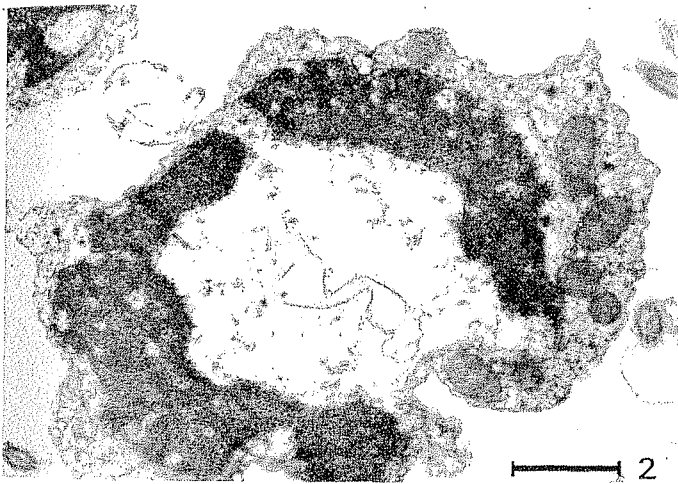
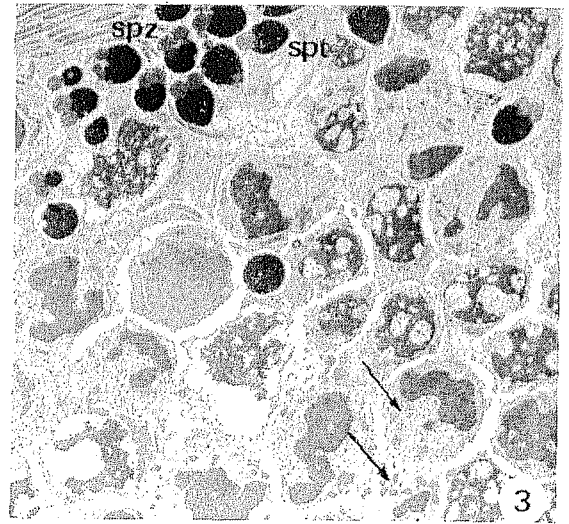
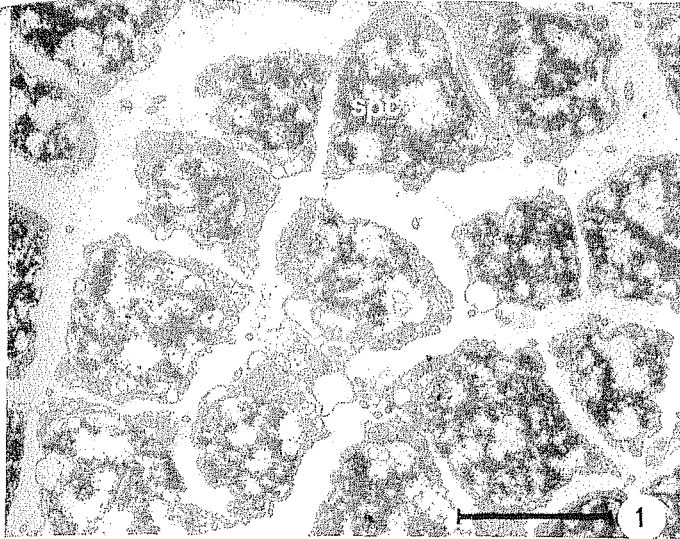
m : mitochondrie.

n : noyau.

spc : spermatocyte.

spt : spermatide.

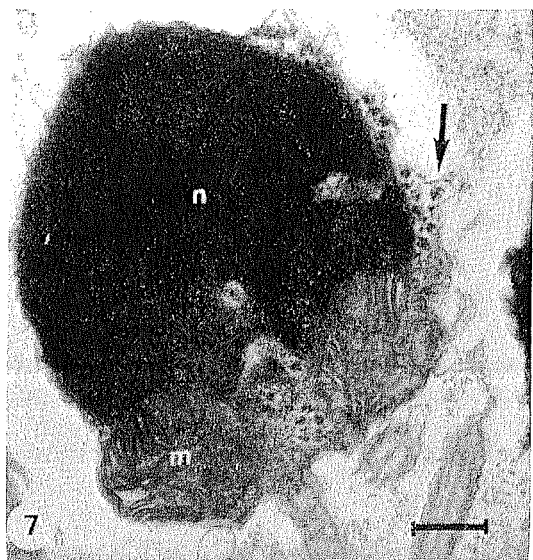
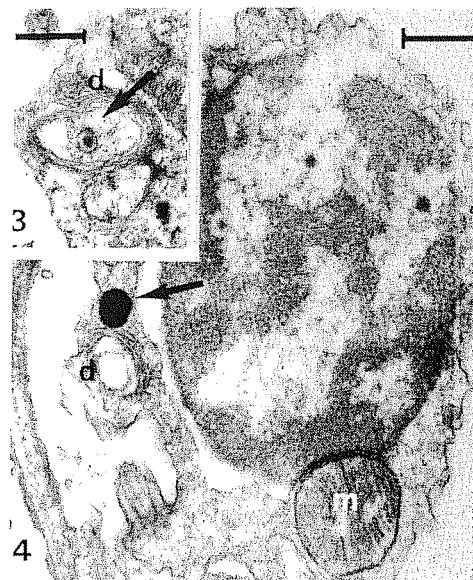
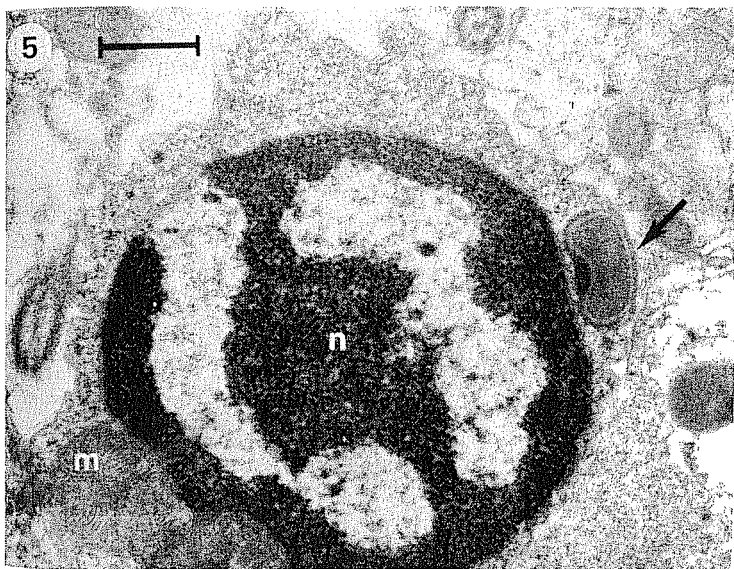
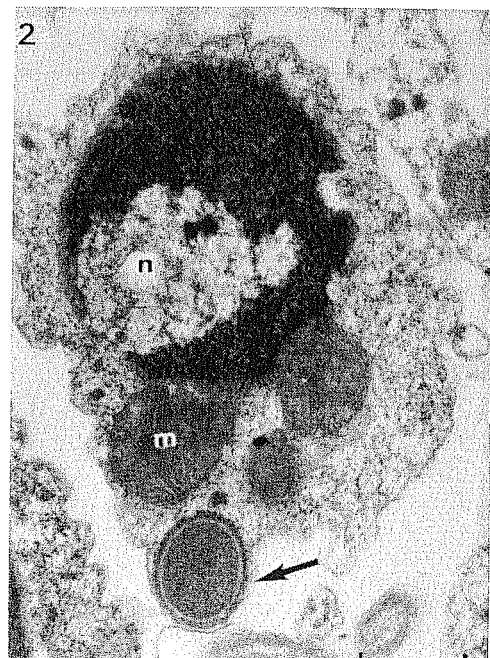
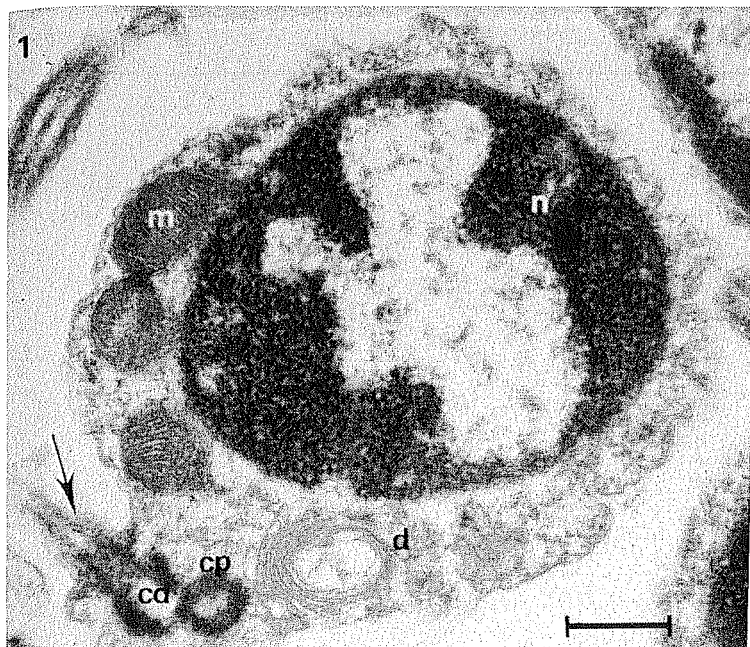
spz : spermatozoïde.



- PLANCHE 22 -

- Photo 1 - Spermatide avec ébauche de flagelle (↓). Echelle : 0,5 μm.
- Photo 2 - Vésicule acrosomiale (↓) près des mitochondries, dans une spermatide jeune. Echelle : 0,5 μm.
- Photo 3 - Vésicule osmiophile (↓) au centre de l'espace délimité par les citernes golgiennes. Echelle : 0,5 μm.
- Photo 4 - Inclusion positive à la réaction de Thiery (↓) près du dictyosome d'une spermatide. Echelle : 0,5 μm.
- Photo 5 - Vésicule acrosomiale légèrement déprimée (↓) au pôle apical d'une spermatide. Echelle : 0,5 μm.
- Photo 6 - Fin de spermiogenèse (↓). Echelle : 5 μm.
- Photo 7 - Perte de cytoplasme (↓) dans la spermatide en fin de maturation. Echelle : 0,5 μm.

d : dictyosome.
 m : mitochondrie.
 n : noyau.
 cd : centriole distal.
 cp : centriole proximal.

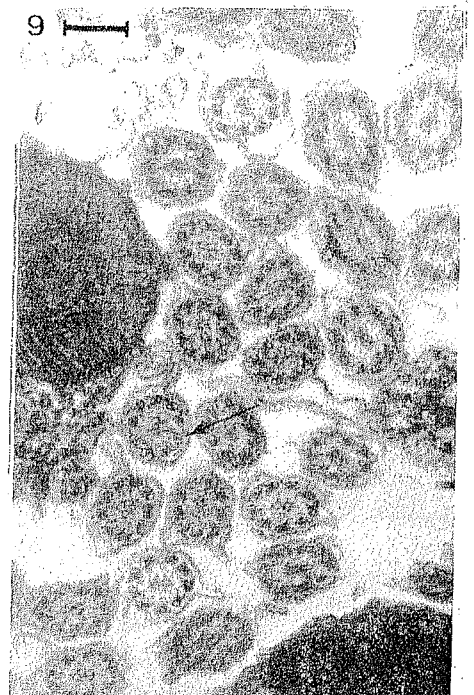
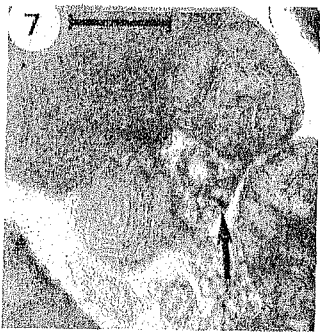
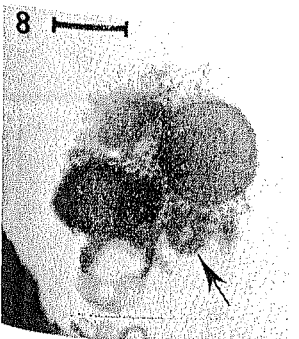
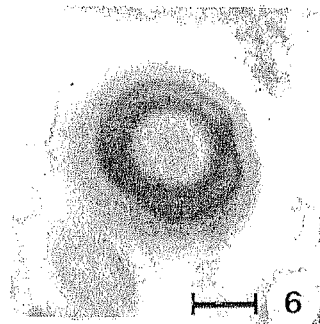
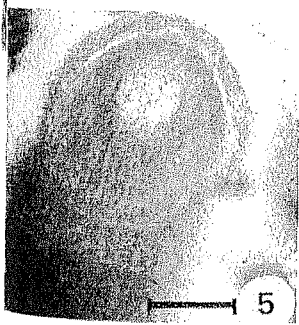
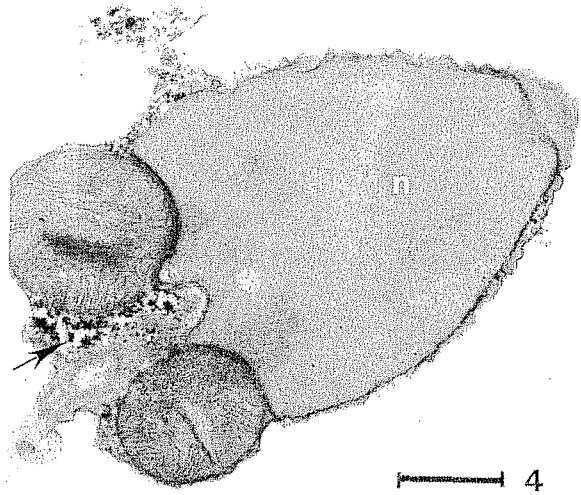
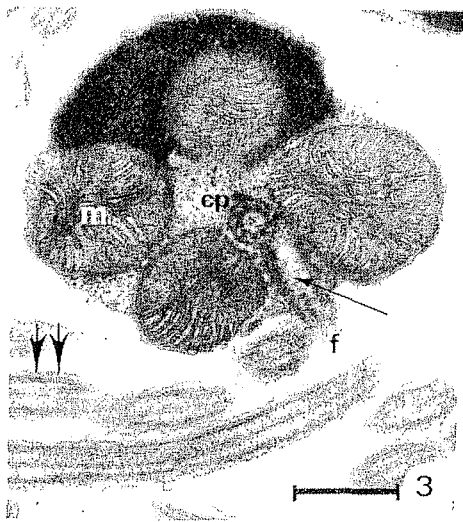
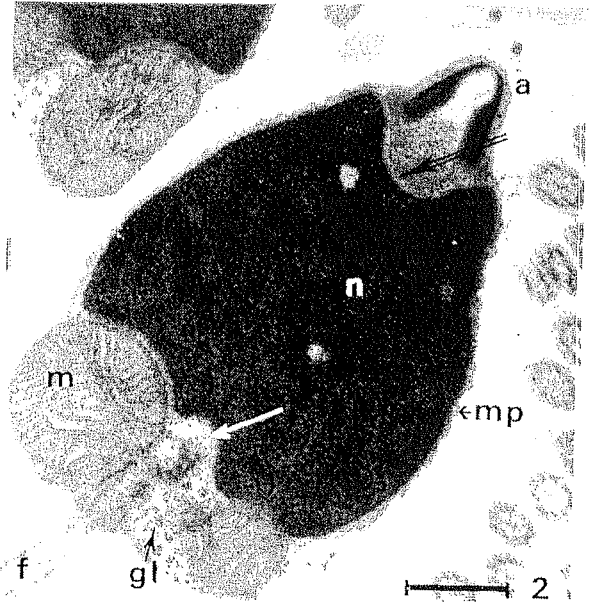
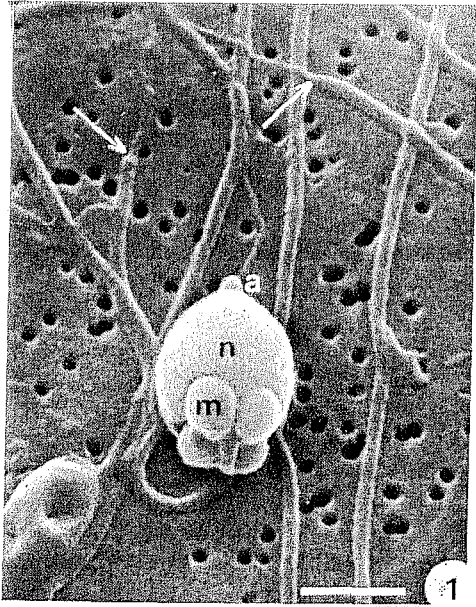


н.

- PLANCHE 23 -

- Photo 1 - Vue générale au M.E.B. Echelle : 1 μ m. Rétrécissement du flagelle (↓)
- Photo 2 - Coupe longitudinale en M.E.T. Invaginations nucléaires antérieure (↓) et postérieure (↓). Echelle : 0,5 μ m.
- Photo 3 - Les quatre sphères mitochondriales de la pièce intermédiaire sont disposées autour du centriole proximal et distal (↓). Flagelle coupe longitudinale (↓). M.E.T. Echelle : 0,5 μ m.
- Photo 4 - Glycogène de la pièce intermédiaire (↓). Réaction de Thiery. M.E.T. Echelle : 0,5 μ m.
- Photo 5 - Coupe tangentielle de l'acrosome montrant une structure lamellaire. M.E.T. Echelle : 0,2 μ m.
- Photo 6 - Coupe transversale de l'acrosome montrant la structure lamellaire entre les deux anneaux denses. M.E.T. Echelle : 0,2 μ m.
- Photo 7 - Structures denses (↓) rayonnantes rattachant le centriole distal à la membrane plasmique. M.E.T. Echelle : 1 μ m.
- Photo 8 - Coupe transversale du centriole distal au départ du flagelle (↓). M.E.T. Echelle : 0,5 μ m.
- Photo 9 - Coupes transversales de flagelles montrant les 9 doublets périphériques et un doublet central de microtubules (↓). M.E.T. Echelle : 0,2 μ m.

- a : acrosome.
 cp : centriole proximal.
 f : flagelle.
 gl : glycogène.
 m : sphère mitochondriale.
 mp : membrane plasmique.
 n : noyau.

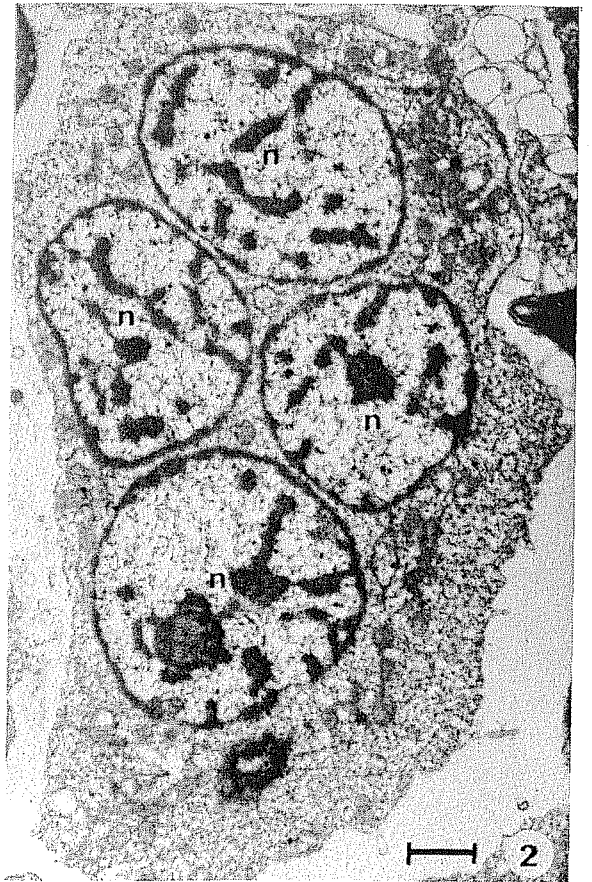
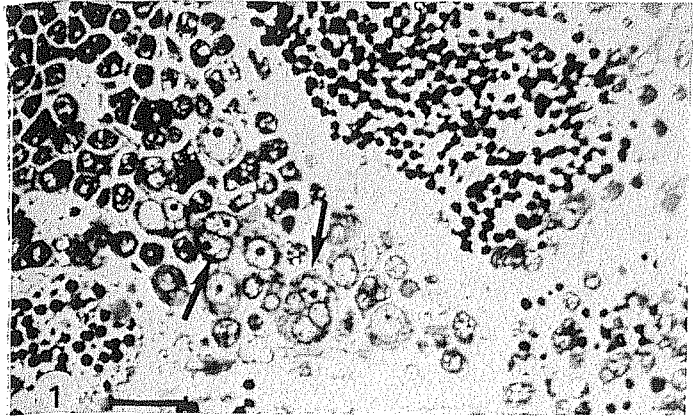


- PLANCHE 24 -

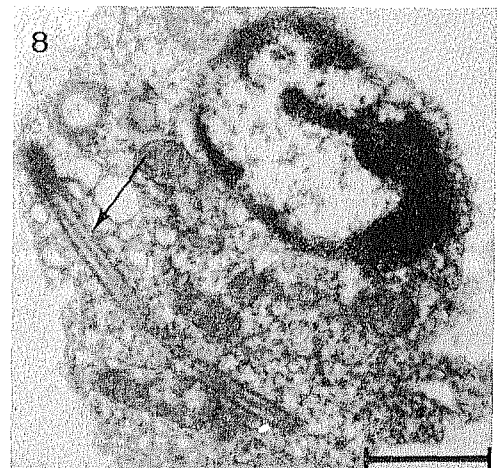
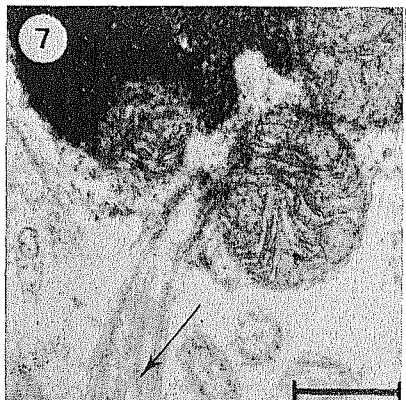
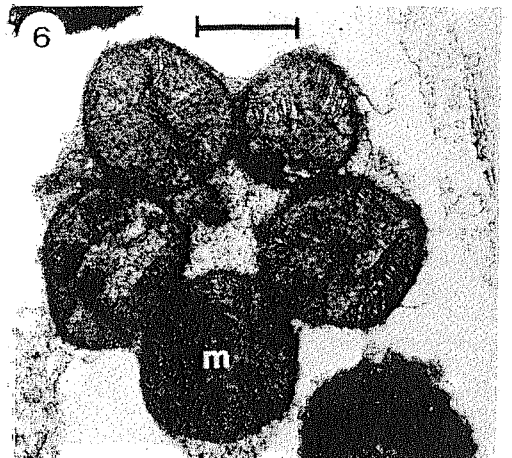
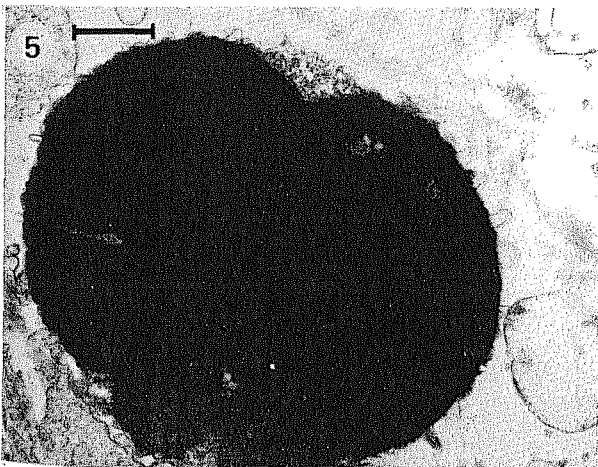
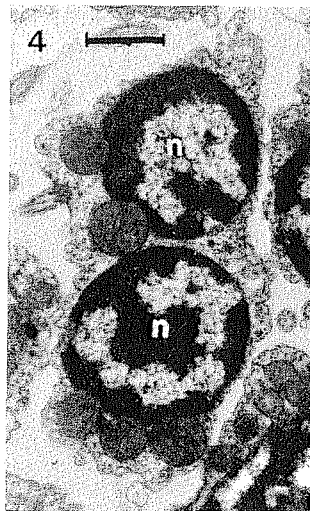
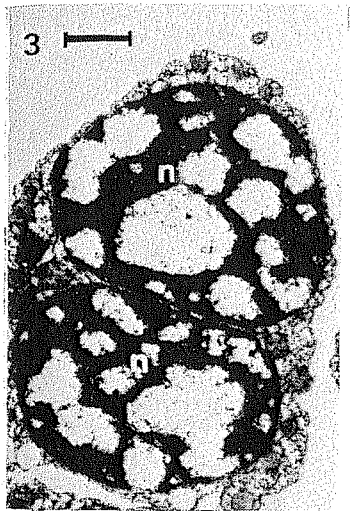
- Photo 1 - Formations goniales plurinucléées (↓) observables sur coupe semi-fine, en périphérie d'un acinus en période de gamétogenèse active. Echelle : 15 µm.
- Photo 2 - Gonie géante à quatre noyaux . M.E.T. Echelle : 1 µm.
- Photo 3 - Spermatocyte I binucléé au stade leptotène. M.E.T. Echelle : 1 µm.
- Photo 4 - Spermatide binucléée. M.E.T. Echelle : 1 µm.
- Photo 5 - Spermatozoïde bicéphale. M.E.T. Echelle : 0,5 µm.
- Photo 6 - Spermatozoïde à cinq sphères mitochondriales. M.E.T. Echelle : 0,5 µm.
- Photo 7 - Spermatozoïde à flagelle dédoublé (↓). M.E.T. Echelle : 0,5 µm.
- Photo 8 - Flagelle intracytoplasmique (↓) dans une spermatide. M.E.T. Echelle : 1 µm.

m : sphère mitochondriale.

n : noyau.



n.



- PLANCHE 25 -

Photo 1 - Acini remplis d'ovocytes matures d'apparence normale.
Echelle : 20 μ m.

Photo 2 - Image de dégénérescence ovocytaire au centre d'un acinus. Modification des affinités tinctoriales des ovocytes en voie de lyse, au centre de l'acinus. Echelle : 20 μ m.

Photo 3 - Figure caractéristique d'ovocytes lysés imbriqués comme les pièces d'un puzzle. Des ovocytes lysés remplissent la lumière d'un gonoducte. Echelle : 20 μ m.

Photo 4 - Présence d'ovocytes lysés dans la lumière intestinale. Ovocytes lysés visibles au centre des acini. Echelle : 20 μ m.

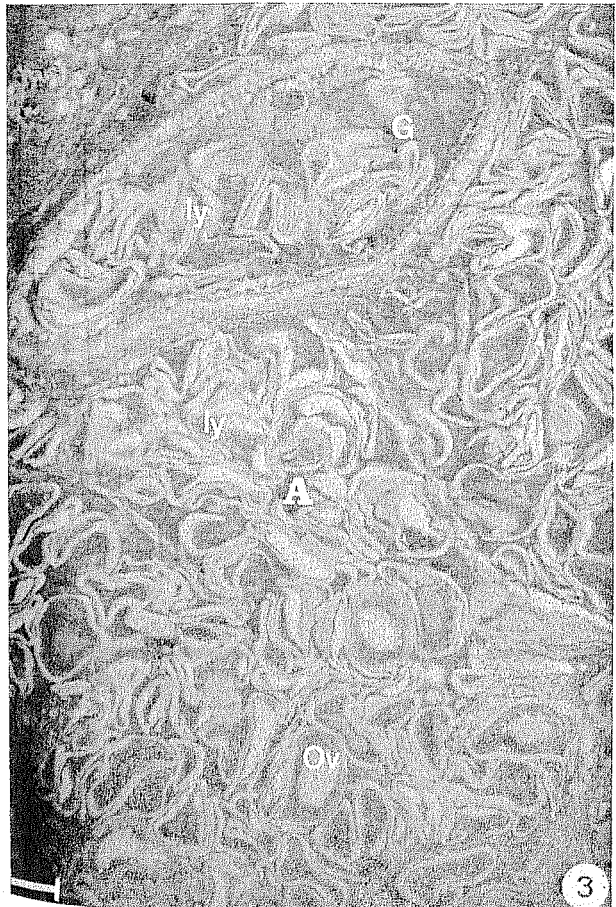
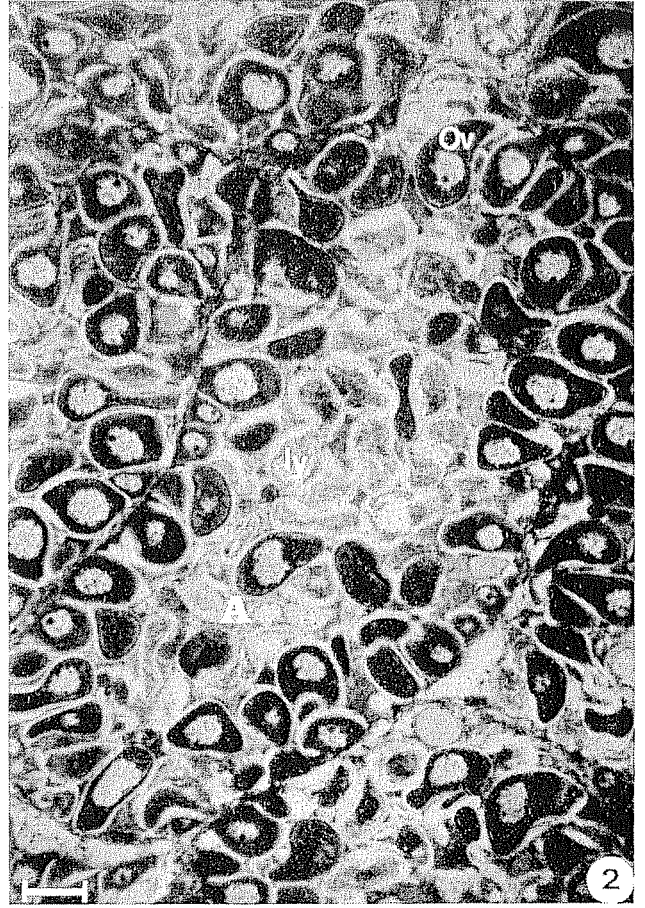
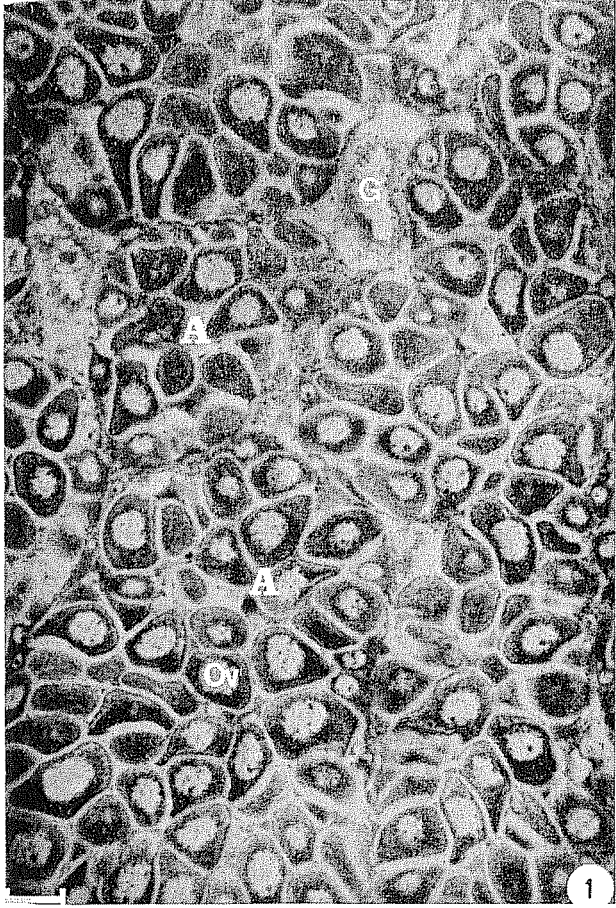
A : acinus.

G : gonoducte.

ly : ovocytes lysés.

Ov : ovocyte.

I : épithélium de recouvrement de l'intestin.



- PLANCHE 26 -

- Photo 1 - Vacuolisation cytoplasmique visible sur coupe semi-fine, au sein d'ovocytes vitellogéniques jeunes, encore largement adhérent au tissu conjonctif périphérique de l'acinus ou libres dans la lumière (↓). Echelle : 25 μm.
- Photo 2 - Nodule de R.E.G. (↓) emprisonnant des inclusions II et des mitochondries. M.E.T.
Echelle : 1 μm.
- Photo 3 - Portion d'ovocyte vacuolisé (↓) par dilatation du R.E. et altération des mitochondries. M.E.T. Echelle : 5 μm.
- Photo 4 - Mitochondries tuméfiées aux crêtes raréfiées. M.E.T.
Echelle : 5 μm.
- Photo 5 - Portion d'ovocyte nécrosé en périphérie. Le noyau présente des zones normalement denses (↓) et une enveloppe dilatée (↓).
Echelle : 5 μm.
- Photo 6 - Nécrose périphérique de l'ovocyte. Des inclusions cytoplasmiques dissociées sont visibles au niveau des zones de lyse (↓).
Echelle : 2 μm.

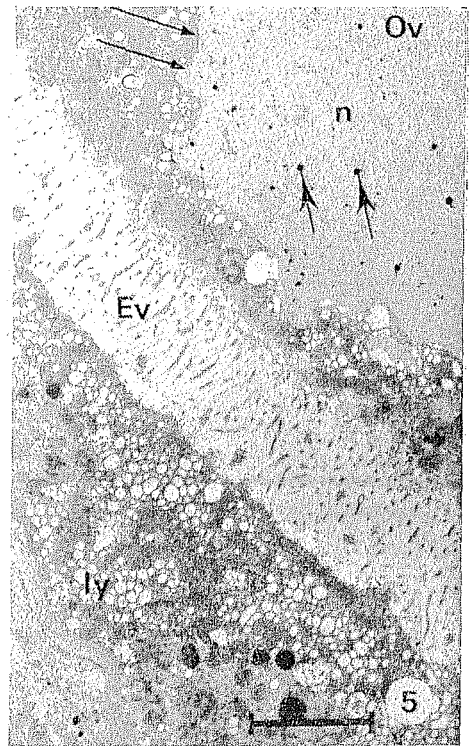
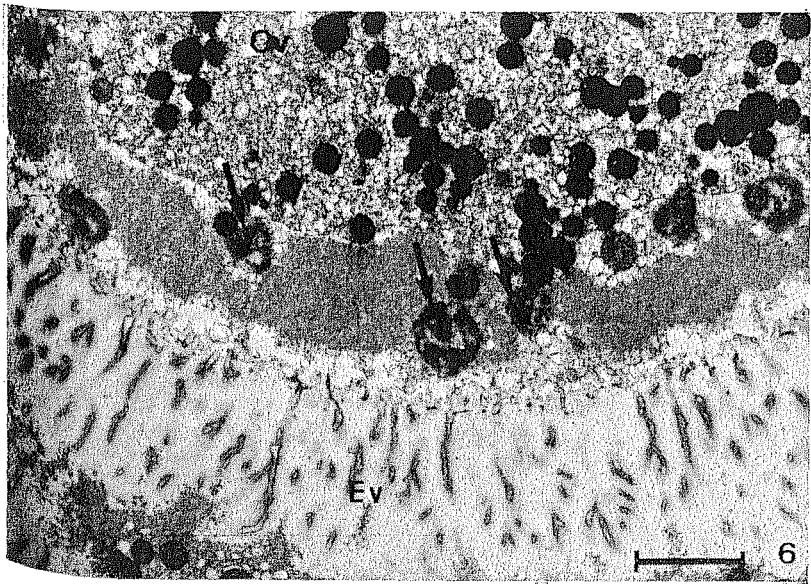
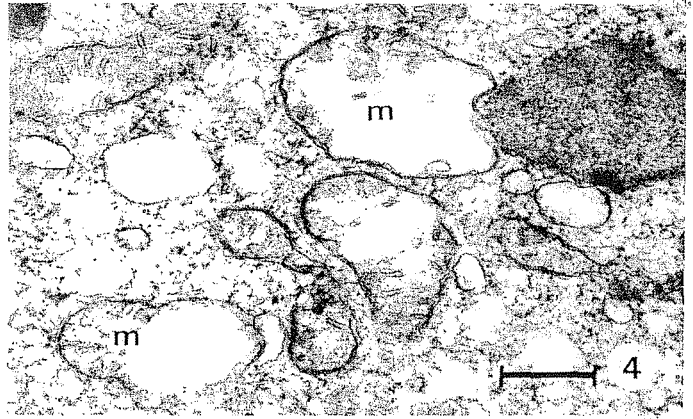
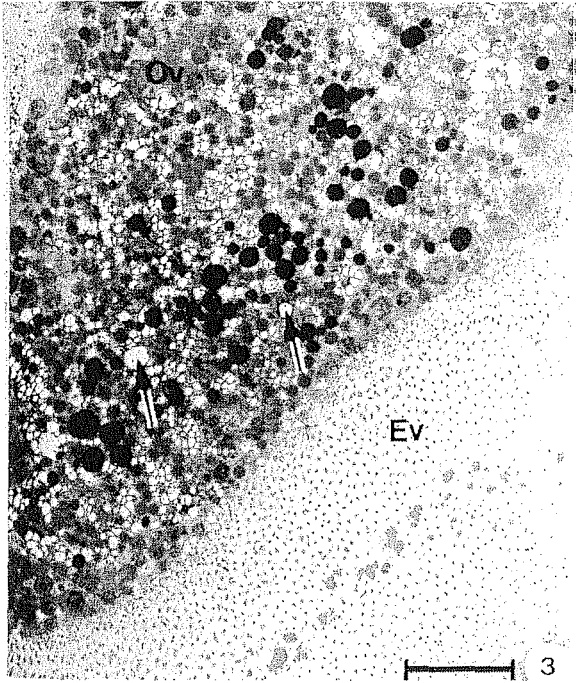
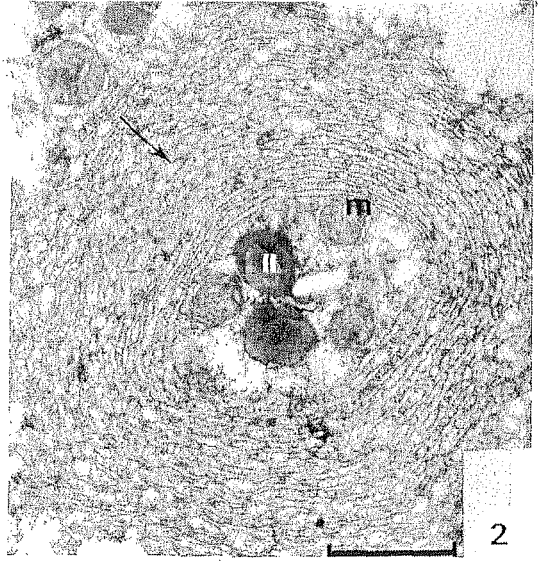
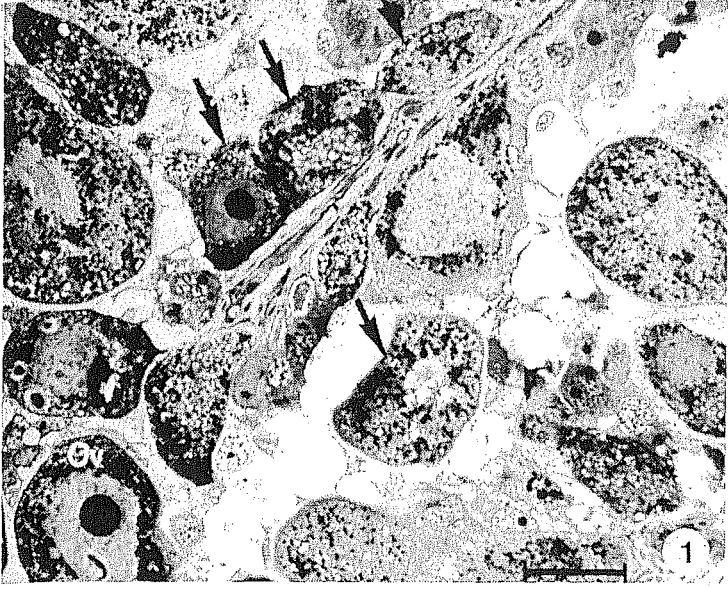
Ev : enveloppe vitelline.

ly : débris de la lyse.

m : mitochondrie.

n : noyau.

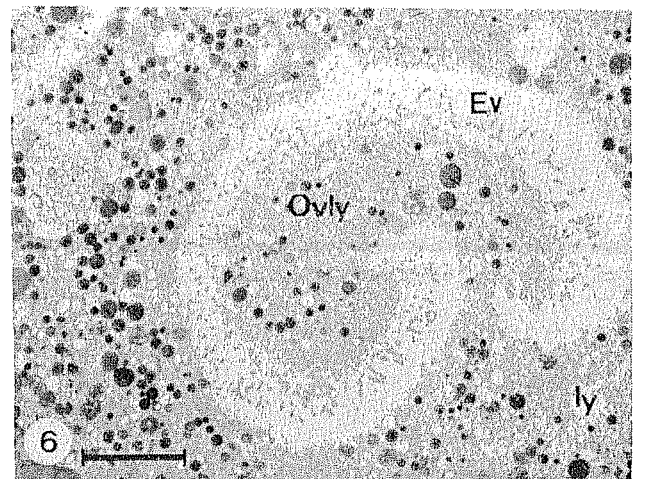
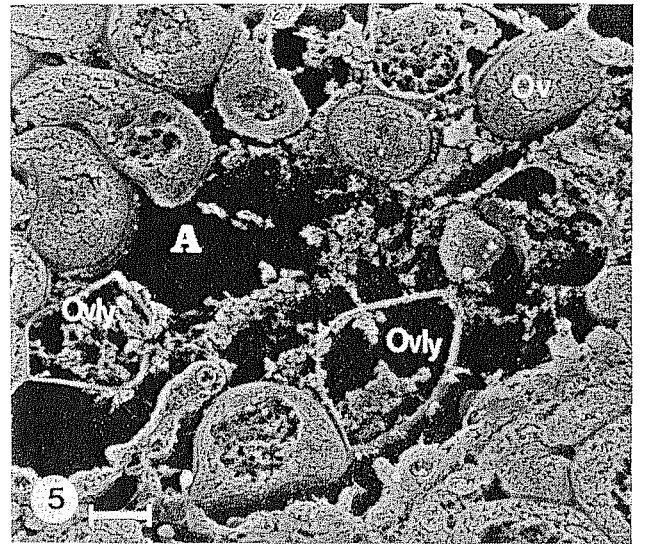
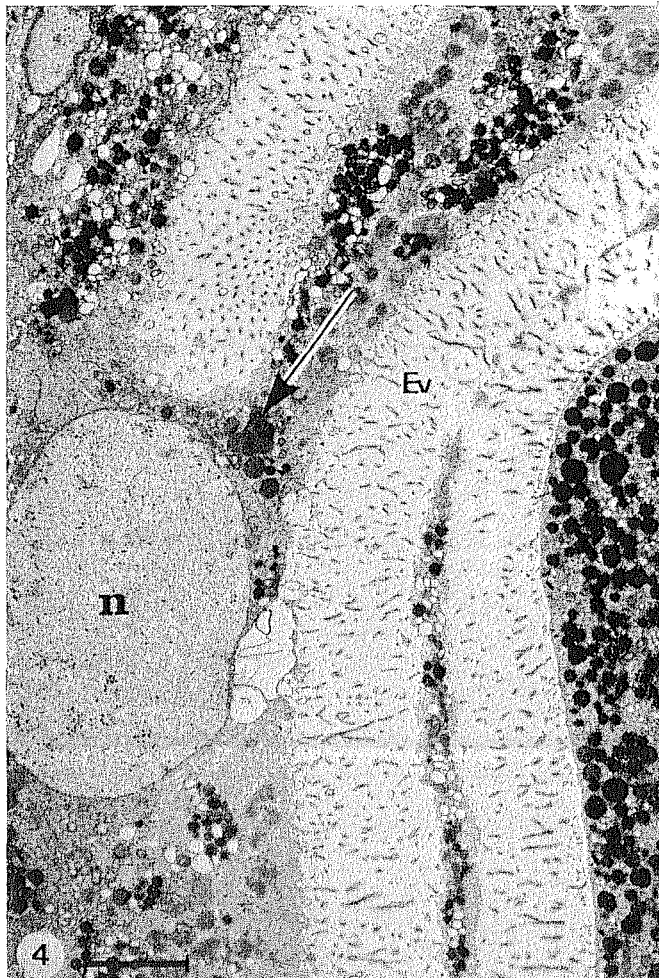
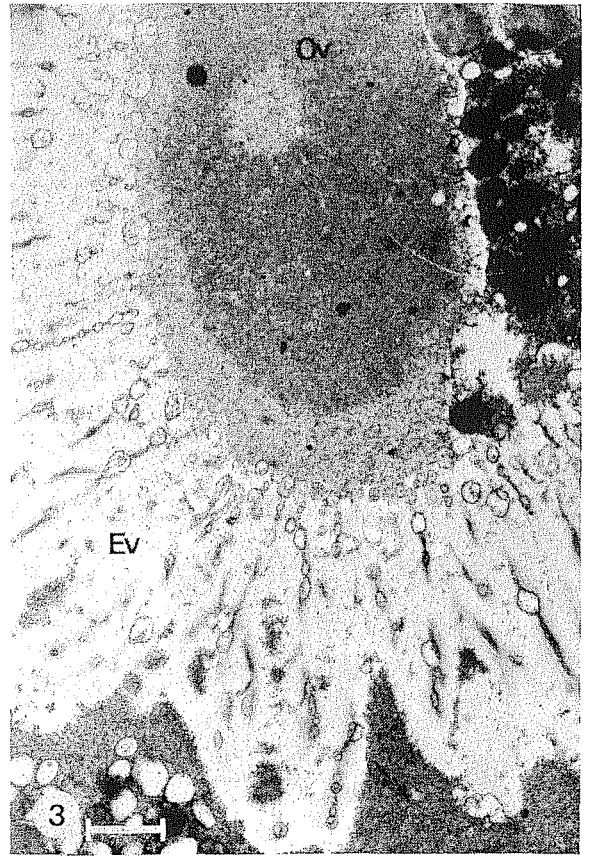
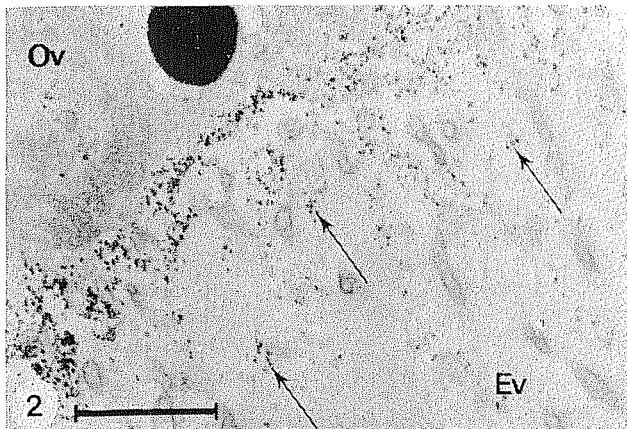
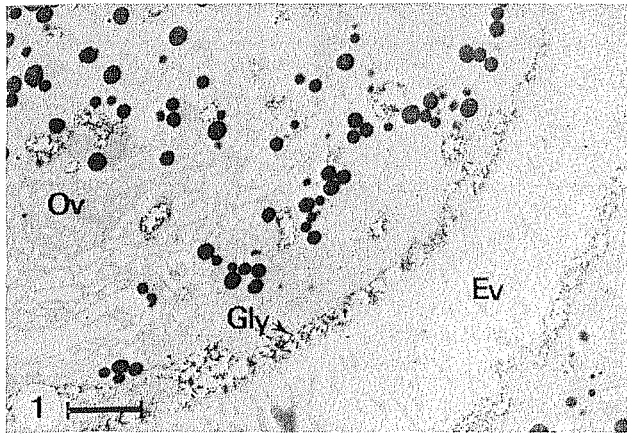
Ov : ovocyte.



- PLANCHE 27 -

- Photo 1 - Accumulation anormale de glycogène au niveau de la zone de né-
crose périphérique de l'ovocyte. Réaction de Thiery. M.E.T.
Echelle : 2 μ m.
- Photo 2 - Transit de glycogène (\downarrow) dans l'enveloppe vitelline. M.E.T.
Echelle : 1 μ m.
- Photo 3 - Altération de l'enveloppe vitelline. M.E.T. Echelle : 1 μ m.
- Photo 4 - Rupture de l'enveloppe vitelline (∇) et vidange du contenu de
l'ovocyte dans la lumière de l'acinus. Le noyau rejeté est
visible sur la coupe. M.E.T. Echelle : 5 μ m.
- Photo 5 - Aspect des ovocytes lysés au M.E.B. Echelle : 20 μ m.
- Photo 6 - Reliquats de la lyse ovocytaire dans l'acinus. M.E.T.
Echelle : 5 μ m.

- A : acinus.
Ev : enveloppe vitelline.
Gly : glycogène.
ly : reliquats de la lyse ovocytaire.
n : noyau.
Ov : ovocyte.
Ovly : ovocyte lysé.



- PLANCHE 28 -

Photo 1 - Nombreuses cellules altérées en période de maturation sexuelle (↓) : phénomènes de caryolyse importants sur cet échantillon observé sur coupe semi-fine. Echelle : 10 µm.

Photos 2 et 3 - Perte de contraste progressif du noyau. Les mitochondries peuvent être tuméfiées (↓). Le cytoplasme dense se vacuolise (↓).
Echelle : 2 : 1 µm ; 3 : 1 µm.

Photo 4 - Lyse de cellules germinales mâles (↓). Début de caryolyse (↓).
Echelle : 2 µm.

Photo 5 - Hypercondensation de la chromatine dans une spermatide. L'enveloppe nucléaire est anormalement dilatée (↓). Echelle : 2 µm.

Photo 6 - Spermatozoïdes normaux et altérés (↓). Noter les nombreuses plages claires dans le noyau de spermatozoïdes dégénérés, aux contours irréguliers et dont les mitochondries sont parfois altérées (↓). Echelle : 2 µm.

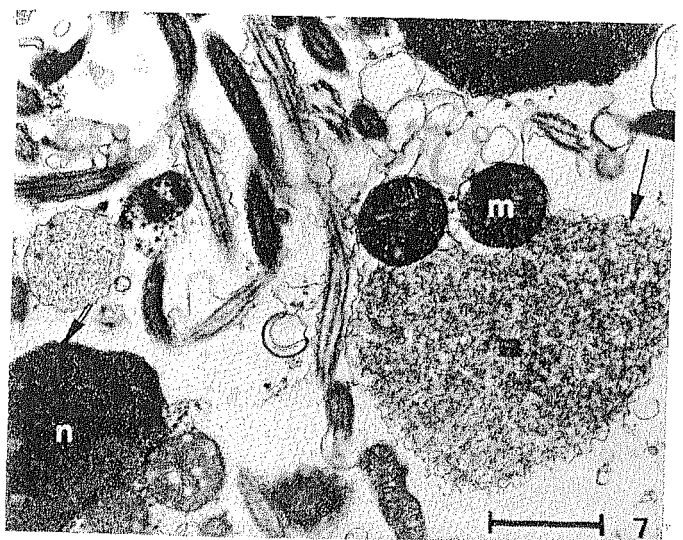
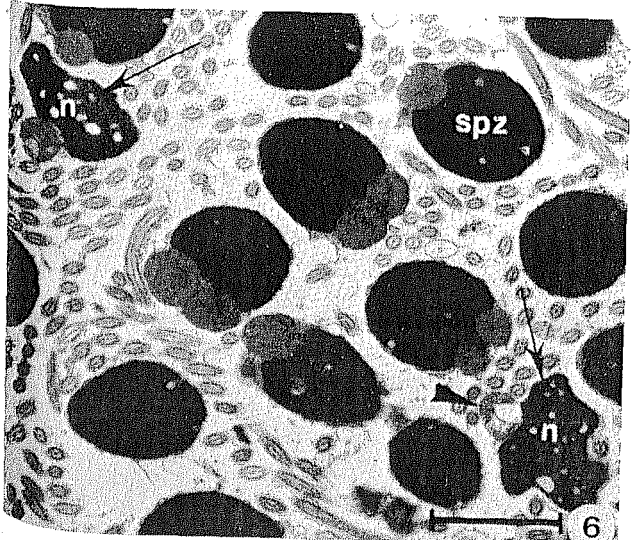
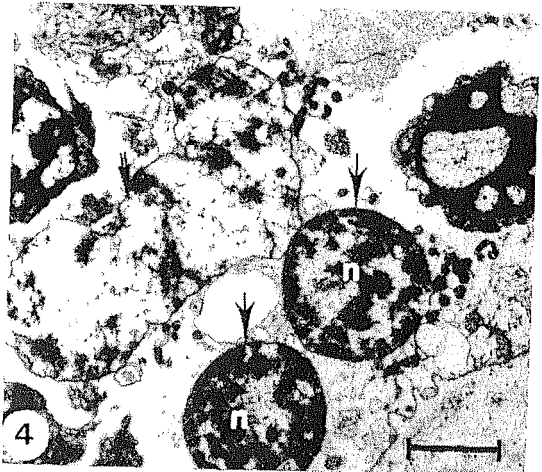
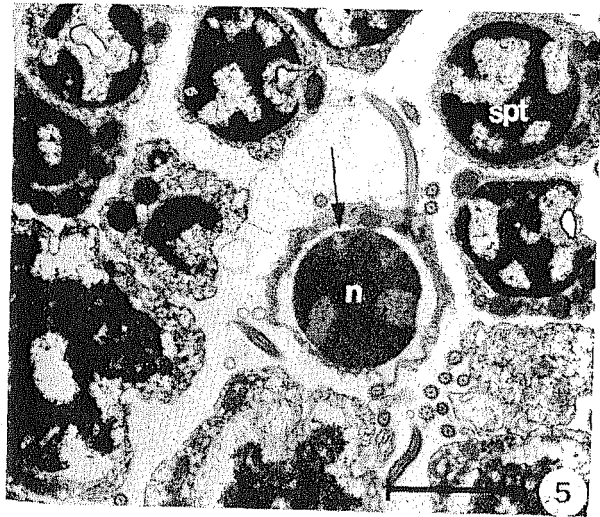
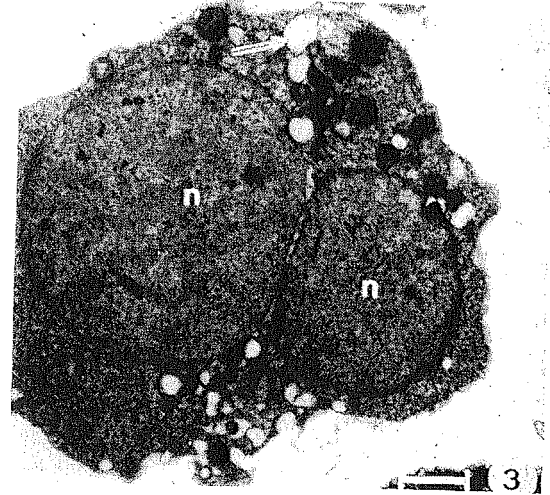
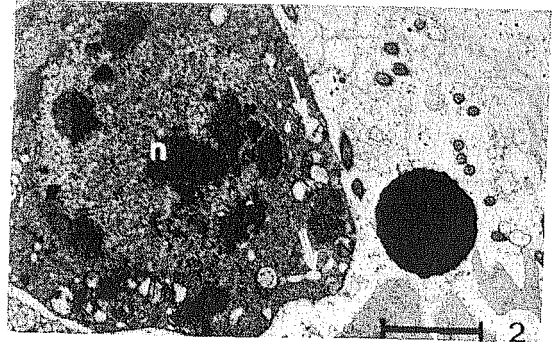
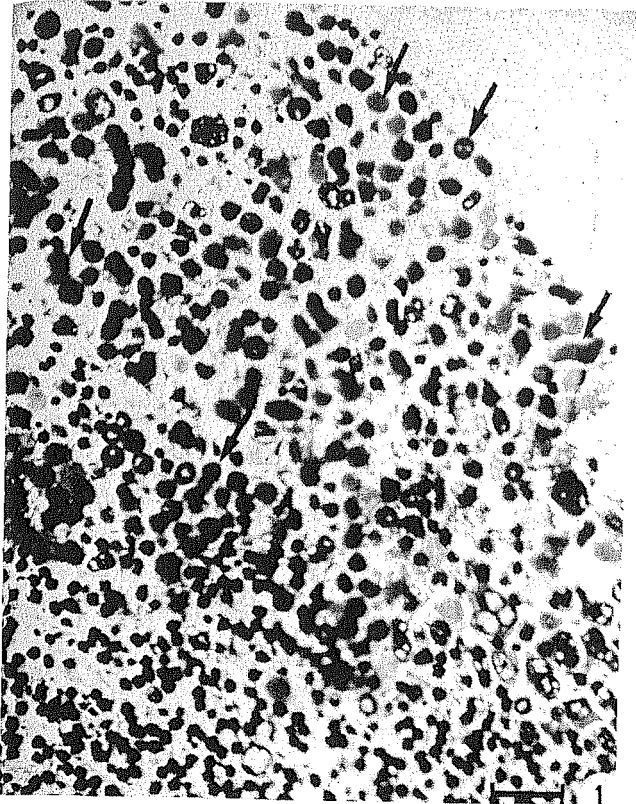
Photo 7 - Spermatozoïdes en voie de lyse au noyau plus ou moins altéré (↓, ↓). Echelle : 1 µm.

m : mitochondrie.

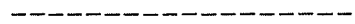
n : noyau.

spz : spermatozoïde.

spt : spermatide.

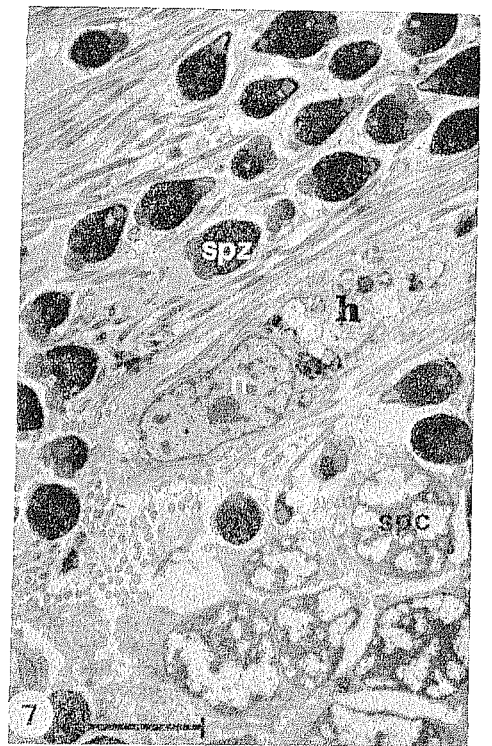
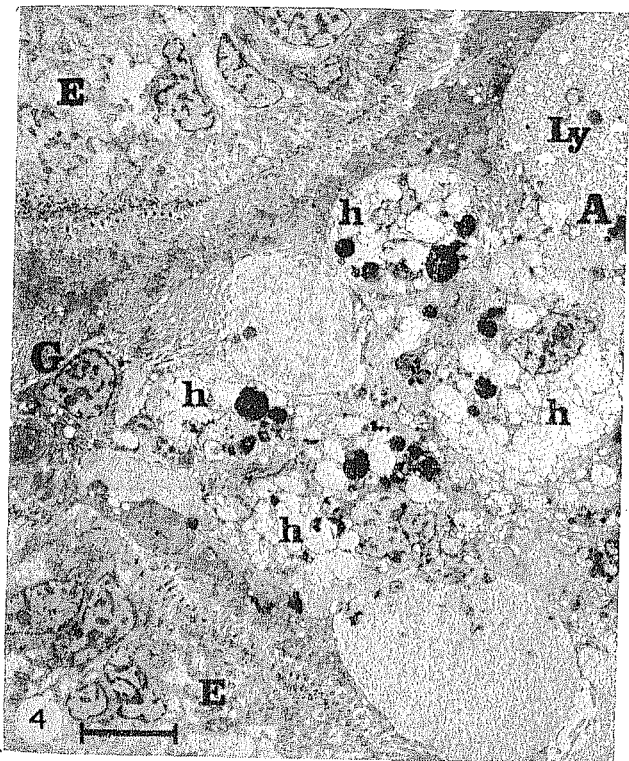
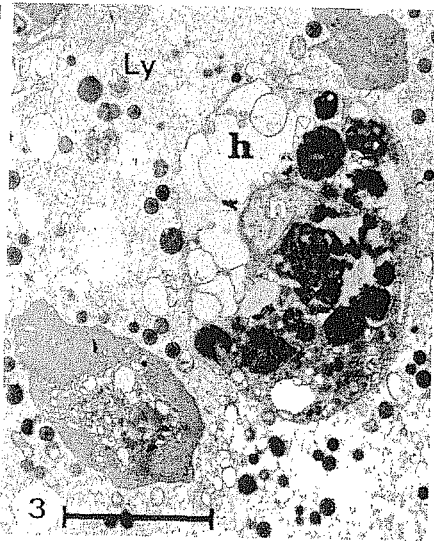
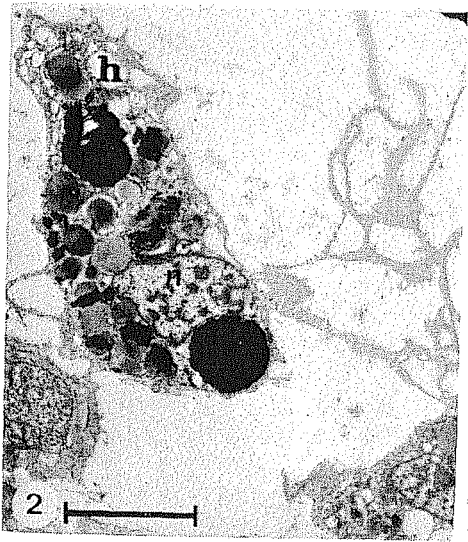
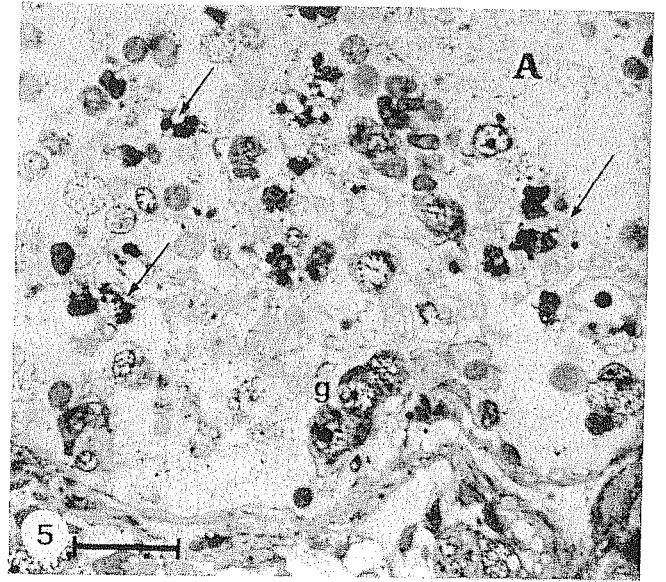
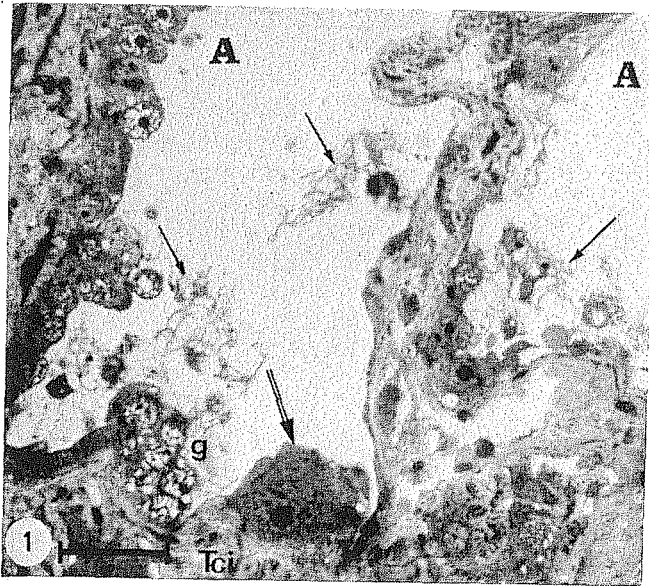


- PLANCHE 29 -



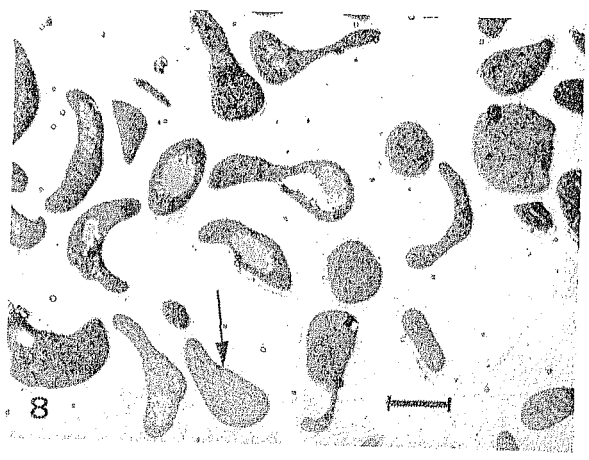
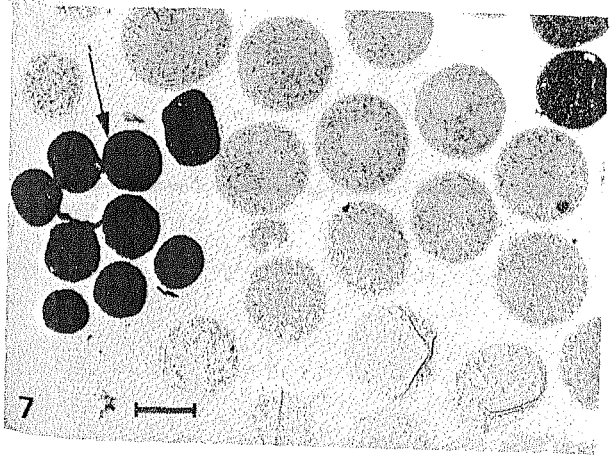
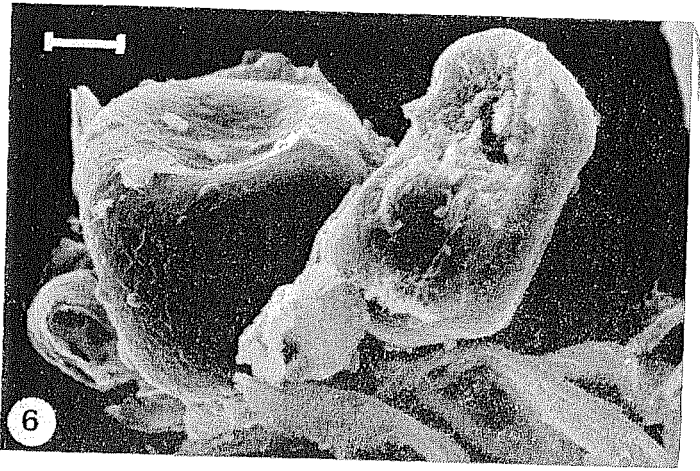
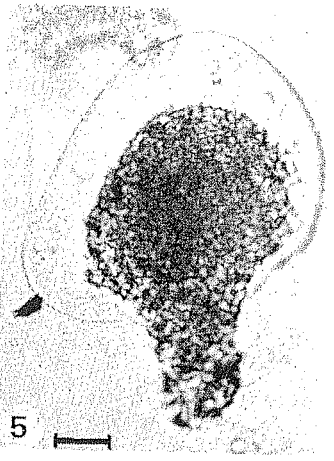
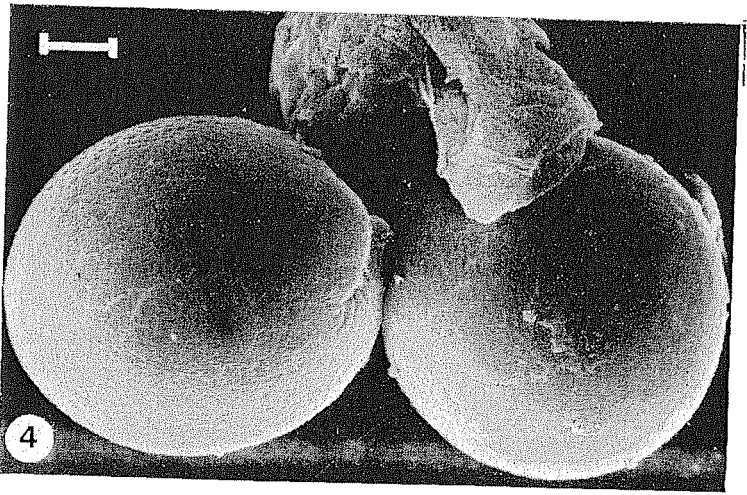
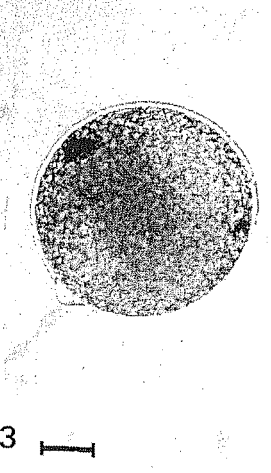
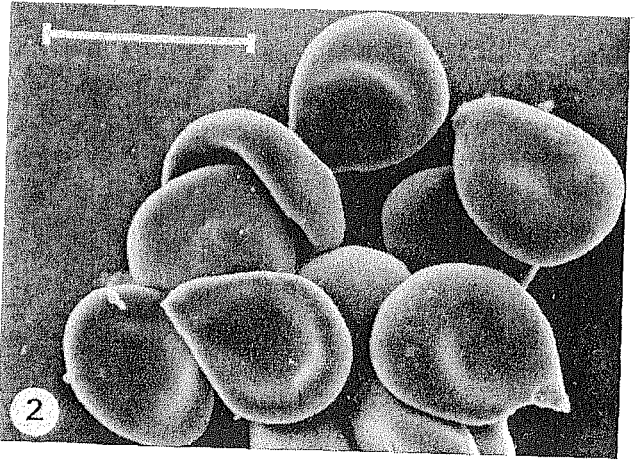
- Photo 1 - Dans un acinus femelle presque vide d'hiver, présence de macrophages (↓) dont les prolongements cytoplasmiques sont visibles sur coupe semi-fine. Des gonies et un ovocyte en début de vitellogenèse (↓) sont discernables contre le tissu conjonctif interstitiel. Echelle : 10 μm.
- Photo 2 - Hémocyte à fonction macrophagique, en M.E.T., dans un acinus femelle d'hiver. Le cytoplasme est chargé d'inclusions denses et de corps résiduels. Echelle : 5 μm.
- Photo 3 - Hémocyte à fonction macrophagique parmi les reliquats de la lyse ovocytaire. M.E.T. Echelle : 5 μm.
- Photo 4 - Afflux d'hémocytes macrophagiques à la jonction acinus-gonoducte, en période d'atrésie ovocytaire intense. M.E.T. Echelle : 5 μm.
- Photo 5 - Sur coupe semi-fine d'un échantillon prélevé en hiver, des macrophages (↓) sont visibles dans cet acinus mâle, où des gonies sont aussi discernables. Echelle : 10 μm.
- Photo 6 - Spermatozoïde résiduel phagocyté par un hémocyte macrophagique. M.E.T. Echelle : 1 μm.
- Photo 7 - Présence entre les spermatozoïdes d'une cellule à fonction macrophagique résorbant les résidus cytoplasmiques de la spermiogenèse. M.E.T. Echelle : 5 μm.

A : acinus.
 E : cellules épithéliales du gonoducte.
 g : gonie.
 G : gonoducte.
 h : hémocyte.
 Ly : reliquats de la lyse ovocytaire.
 n : noyau.
 spc : spermatocyte.
 spz : spermatozoïde.
 Tci : tissu conjonctif interstitiel.



- PLANCHE 30 -

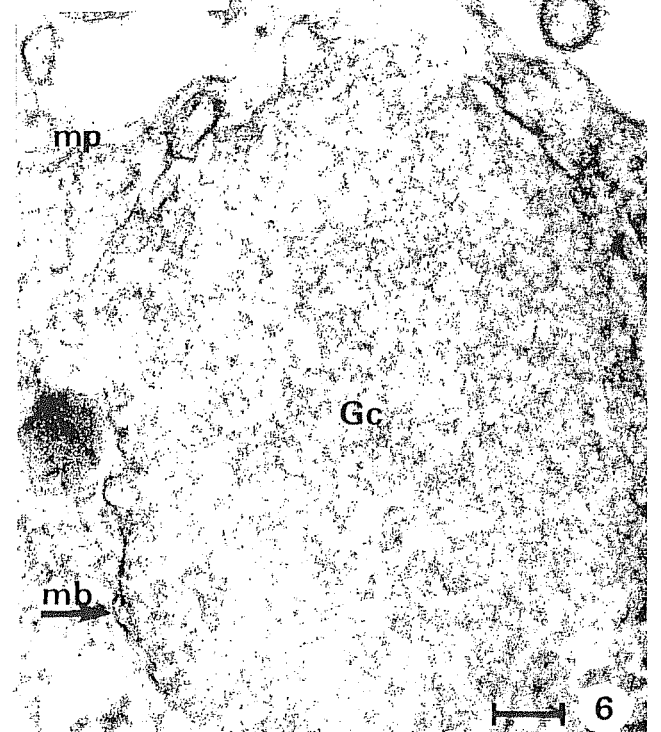
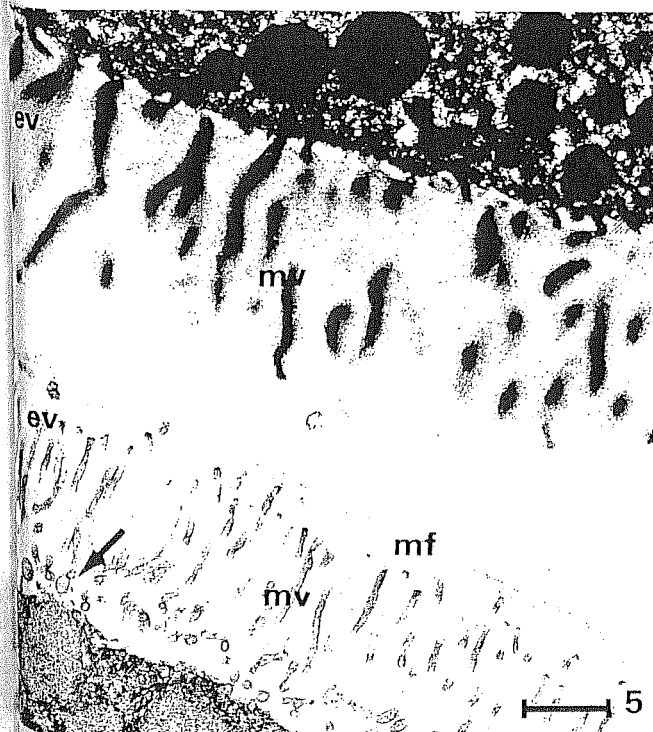
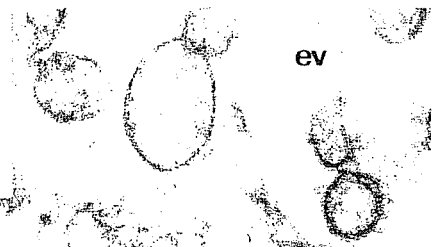
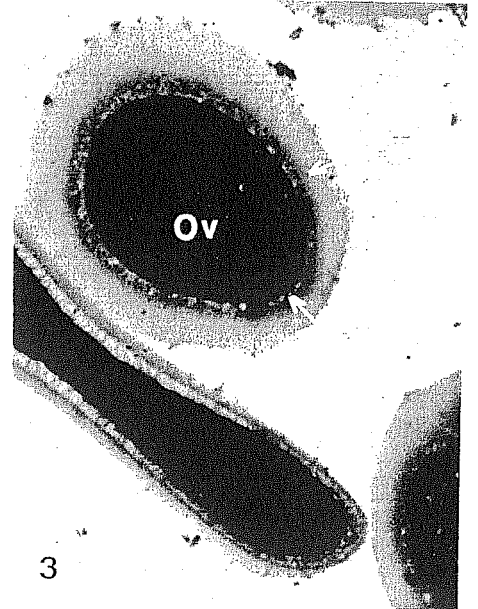
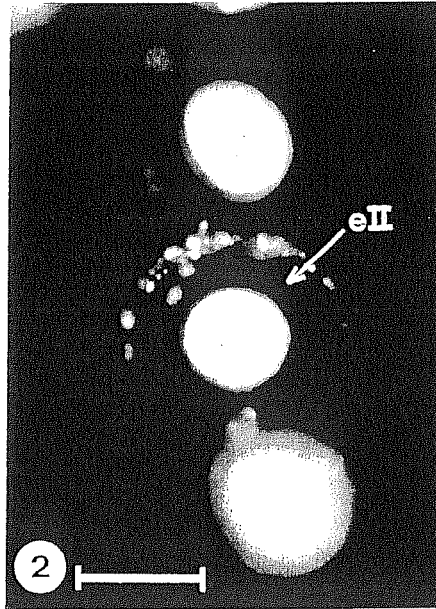
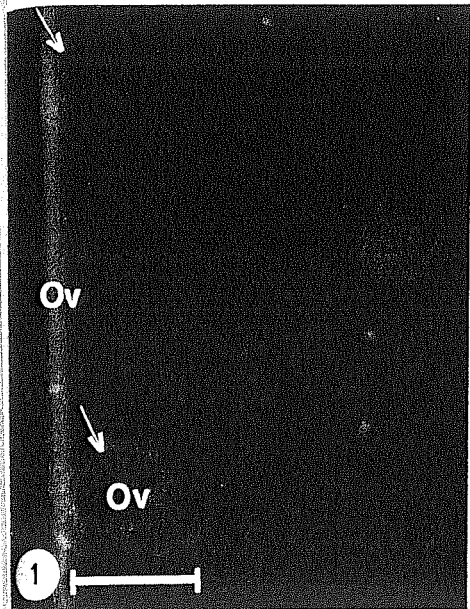
- Photo 1** - Ovocyte immature pédonculé à l'examen direct en microscopie photonique. Echelle : 20 μ m.
- Photo 2** - Ovocytes immatures en M.E.B. Echelle : 100 μ m.
- Photo 3** - Ovocyte mature arrondi, en microscopie photonique. Echelle : 20 μ m.
- Photo 4** - Ovocytes matures en M.E.B. Echelle : 10 μ m.
- Photo 5** - Ovocyte surmature lysé, en microscopie photonique. Echelle : 20 μ m.
- Photo 6** - Ovocyte surmature lysé en M.E.B. Echelle : 10 μ m.
- Photo 7** - Sur coupe semi-fine, ponte constituée essentiellement d'ovocytes d'apparence normale. Noter l'hypercolorabilité de certains ovocytes (\downarrow). Echelle : 50 μ m.
- Photo 8** - Sur coupe semi-fine, ponte constituée d'ovocytes immatures (\downarrow). Echelle : 50 μ m.



- PLANCHE 31 -

- Photo 1 - Fluorescence naturelle (↓) d'intensité variable des ovocytes émis. Echelle : 100 µm.
- Photo 2 - Enveloppe secondaire épaisse autour de l'ovocyte, en microscopie à contraste de phase. Echelle : 100 µm.
- Photo 3 - Enveloppe secondaire autour de l'ovocyte, sur coupe semi-fine. Echelle : 50 µm.
- Photo 4 - Spermatozoïdes normal et lysé piégés entre l'enveloppe secondaire et la membrane de fécondation de l'ovocyte, sur coupe ultra-fine. Echelle : 1 µm.
- Photo 5 - Portion d'ovocytes au M.E.T., montrant l'aspect différent de l'enveloppe vitelline avant fécondation (ovocyte du haut du cliché) et après fécondation (ovocyte du bas du cliché). La vidange par exocytose des granules corticaux (↓) provoque la formation, dans l'ovocyte fécondé, d'une membrane de fécondation. Echelle : 1 µm.
- Photo 6 - Détail d'un granule cortical se vidant par exocytose. Echelle : 0,1 µm.

- e II : enveloppe secondaire.
 ev : enveloppe vitelline.
 f : flagelle.
 Gc : granule cortical.
 m : mitochondrie.
 mb : membrane limitante du granule cortical.
 mf : membrane de fécondation.
 mp : membrane plasmique.
 mv : microvillosités.
 Ov : ovocyte.
 spz : spermatozoïde.
 spz ly : spermatozoïde lysé.



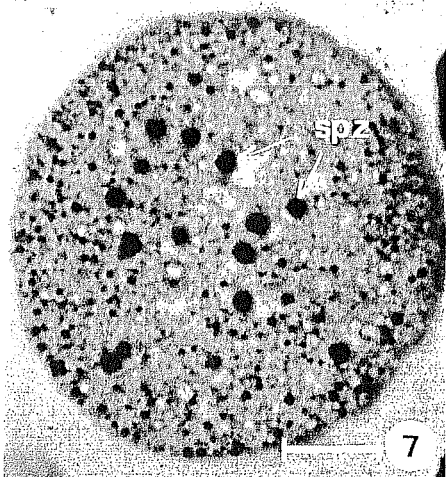
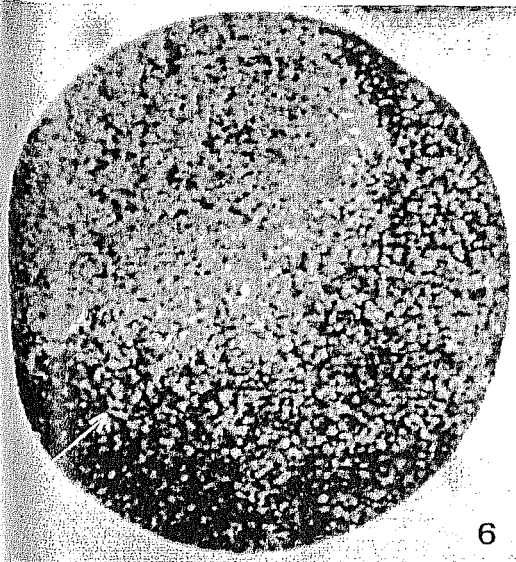
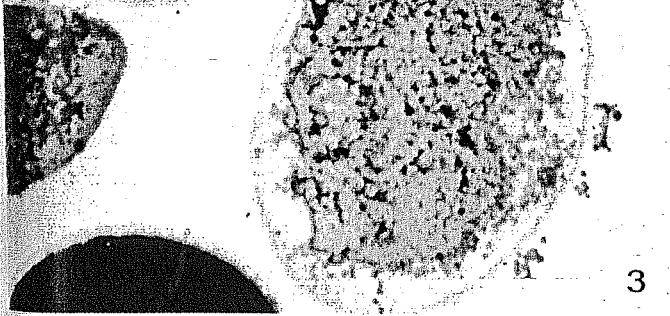
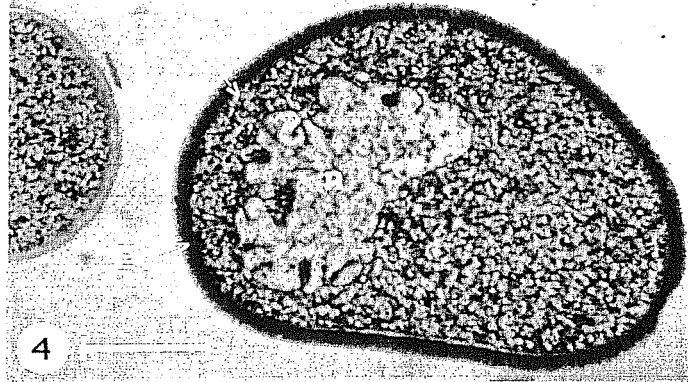
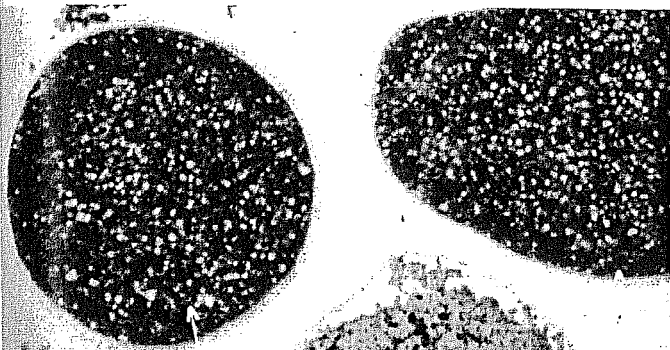
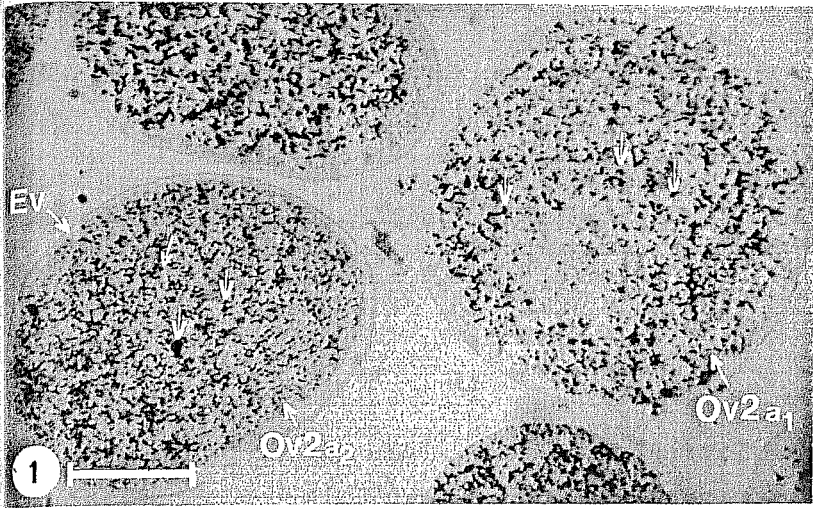
- PLANCHE 32 -

- Photo 1 - Ovocytes d'apparence normale colorés au rouge à l'huile pour la mise en évidence des lipides. Les inclusions lipidiques (↓) sont en quantité variable selon les ovocytes. Echelle : 20 µm.
- Photo 2 - Ovocyte présentant des signes d'altération en périphérie du noyau (↓). Noter le nodule basophile de R.E.G. (↓). Echelle : 20 µm
- Photo 3 - Vacuolisation cytoplasmique discrète des ovocytes Ov 2b2. Nécrose périphérique dans un ovocyte surmature Ov 3b. Echelle : 20 µm.
- Photo 4 - Altération de l'enveloppe vitelline ovocytaire. Echelle : 20 µm.
- Photo 5 - Nécrose généralisée d'un ovocyte surmature Ov 3c. Hypercolorabilité de l'ovocyte Ov 2b4. Echelle : 20 µm.
- Photo 6 - Ovocyte, dépourvu d'enveloppe vitelline, au contenu polarisé (↓), Ov 2b5. Echelle : 10 µm.
- Photo 7 - Polyspermie dans un ovocyte Ov 2b6 dépourvu d'enveloppe vitelline. Echelle : 10 µm.

Ev : enveloppe vitelline

n : noyau

spz : spermatozoïde



la
nt
rau
ose
m.
bi-
(↓),
line.

- PLANCHE 33 -



PLANCHE 33 ASPECT DE CERTAINS OVOCYTES EMIS en M.E.T.

- Photo 1 - Portion d'ovocyte immature. Le noyau présente des contours assez irréguliers. Les inclusions I, II, III sont abondantes. La seule différence observable par rapport à l'ovocyte mature du cliché 2 concerne les inclusions lipidiques dont l'osmiophilie diffère. Elles sont ici plus denses au centre qu'en périphérie. Echelle : 5 μ m.
- Photo 2 - Portion d'ovocyte mature. Echelle : 5 μ m.
- Photo 3 - Portion d'ovocyte anormal hyperosmiophile. Echelle : 1 μ m.
- Photo 4 - Portion d'ovocyte dépourvu d'enveloppe vitelline au contenu polarisé. Les inclusions les plus grosses I et III sont regroupées à un pôle de l'ovocyte. Echelle : 5 μ m.
- Photo 5 - Polyspermie : le cytoplasme ovocytaire est envahi de spermatozoïdes (Υ). L'enveloppe vitelline est altérée. Echelle : 5 μ m.

Ev : enveloppe vitelline.

mp : membrane plasmique.

n : noyau.

nu : nucléole.

spz : spermatozoïde.

I : granules corticaux.

II : inclusions lipidiques.

III : inclusions glycoprotéiques.

