

**MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE
DE LA RECHERCHE ET DE LA TECHNOLOGIE**

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté

par

GILLES SALAUN

pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

TITRE :

**LA GONADE DE L'HUITRE CREUSE,
CRASSOSTREA GIGAS (THUNBERG, 1793)
EN FIN DE GAMETOGENESE**

soutenu le

devant le jury suivant :

Mr. Alain VAN WORHMOUDT, Directeur de Recherche, CNRS, Concarneau

Président

Mr. Yves BENYAMIN, Professeur, Université de Montpellier

Rapporteur

Mme. Nicole DEVAUCHELLE, Cadre de Recherche, HDR, IFREMER / Brest

Rapporteur

Mme. Germaine DORANGE, Maître de Conférence, HDR, I3S / UBO, Brest

Examineur

Laboratoire de Motilité Cellulaire - Montpellier
E.P.H.E. (Sciences de la Vie et de la Terre)

Directeur d'Etudes : Yves BENYAMIN

Laboratoire de Physiologie des Invertébrés
IFREMER - Brest

Directeur d'Etudes : Nicole DEVAUCHELLE



à

Annick,

Louis-Clément,

Jean-Baptiste-Dieuseul,

Lyndcia-Anna-Maria.



REMERCIEMENTS

Il m'est agréable de pouvoir remercier ici toutes celles et tous ceux qui ont à titres divers participé à la réalisation de ce travail, en particulier :

Monsieur **Alain VAN WORHMOUDT**, Directeur de Recherche / CNRS au Muséum d'Histoires Naturelles de Concarneau qui a bien voulu présider ce jury.

Monsieur Le Professeur **Yves BENYAMIN**, Directeur du Laboratoire de Motilité Cellulaire à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes qui a accepté mon inscription dans son Laboratoire.

Madame **Nicole DEVAUCHELLE** -Habilitée à Diriger des Recherches - du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés à l'IFREMER de Brest qui a encadré ce travail.

Madame **Annick SALAUN** - documentaliste à IFREMER - pour ses recherches bibliographiques.

Madame **Germaine DORANGE** -Habilitée à Diriger des Recherches - Responsable du Laboratoire de Culture Cellulaire - et Monsieur Le Professeur **Jean-Paul LEROY** - Responsable du Laboratoire d'Anatomo-Pathologie - tous deux au Centre Hospitalier Universitaire de Brest, pour leurs conseils.

Messieurs **Pierre de THE** et **Patrick CAMUS** de la société UNILOG-ALCATEL, pour leur collaboration scientifique en analyse d'images.

Madame **Sylvie GROS** – dessinatrice à IFREMER – pour son aide iconographique.

Monsieur **Loïc QUEMENEUR** pour son assistance en traitement de données sous Statistica.

Toutes les Personnes ayant travaillé ces dernières années auprès de Madame DEVAUCHELLE : étudiants, contractuels, professeurs et notamment : Madame **Hélène CARIO**, Messieurs **Mikaël PLET** et **Loïc PHILIP de LABORIE**.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	5
1. DESCRIPTION ANATOMIQUE ET MORPHOLOGIQUE	7
1.1. INTRODUCTION	7
1.2. MATERIEL ET METHODES	7
1.3. RESULTATS	10
1.3.1. Caractéristiques des régions	10
1.3.2. Caractéristiques globales de la gonade	11
1.3.3. Caractéristiques globales des organes digestifs et de l'appareil circulatoire	16
1.4. DISCUSSION	16
2. CARACTERISTIQUES DES OVOCYTES DANS LA GONADE	18
2.1. INTRODUCTION	18
2.2. MATERIEL ET METHODES	18
2.2.1. Matériel biologique	18
2.2.2. Traitements des échantillons	18
2.2.3. Références d'analyse	20
2.2.4. Analyse quantitative	20
2.3. RESULTATS	21
2.3.1. Stades	21
2.3.2. Variations individuelles (Tableau 1, Figure 3)	21
2.3.3. Variations intra-gonadiques (Tableau 1, Figure 4)	21
2.3.4. Variations antéro-postérieures (Tableau 1, Figure 5)	25
2.3.5. Variations latérales (Tableau 1, Figure 6)	27
2.4. DISCUSSION	29
3. COMPARAISON DE METHODES D'APPRECIATION DES SURFACES DES OVOCYTES EN VUE D'ESTIMER L'ETAT DE GAMETOGENESE	32
3.1. INTRODUCTION	32
3.2. MATERIEL ET METHODES	33
3.2.1. Les animaux	33
3.2.2. Les techniques de prélèvement et d'observation	33
3.2.3. Les techniques de coloration	33
3.2.4. Les techniques d'analyse	34
3.2.5. Analyse des données	34
3.3. RESULTATS (TABLEAUX 7 ET 8)	34
3.3.1. Qualité comparée des colorants	35
3.3.2. Comparaison des surfaces des ovocytes sur coupes colorées au MGG et au trichrome de Masson	35
3.3.3. Comparaison des surfaces des ovocytes analysés sur coupes semi-fines et à partir de ponctions montées en frottis colorés au MGG	35
3.4. DISCUSSION	37
4. DYNAMIQUE DE L'EMISSION DES GAMETES	38
4.1. INTRODUCTION	38
4.2. MATERIEL ET METHODES	39
4.2.1. Matériel biologique	39
4.2.2. Traitement des échantillons	39
4.2.3. Analyse des paramètres	41
4.3. RESULTATS	41
4.3.1. Les observations photographiques	41
4.3.2. Les variations inter-individuelles	45
4.3.3. Les variations intra-individuelles	48
4.3.4. Etude des critères d'évaluation	48

4.3.5. <i>Etude des indices de condition</i>	49
4.3.6. <i>Variations des délais de réponse aux stimuli thermique et gamétique</i>	50
4.3.7. <i>Etude des indices et des temps de réponse ou des durées d'émission</i>	51
4.3.8. <i>Relations entre indices de condition et critères d'évaluation de l'intensité de la reproduction</i>	53
4.3.9. <i>Relations entre la durée d'émission des gamètes et les critères d'évaluation de l'intensité de la gamétogenèse</i>	55
4.3.10. <i>Relations entre les durées d'émission des gamètes et les critères mesurés après l'arrêt des émissions</i>	57
4.4. DISCUSSION	59
PERSPECTIVES	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	64

INTRODUCTION

Le secteur conchylicole place la France au **premier rang européen** de la production d'huîtres et emploie plus de **35 000 personnes** directement ou indirectement.

Selon les statistiques du Comité Central des Pêches Maritimes (FAO, 1999) la production conchylicole représente près du **tiers de l'ensemble de la production française des pêches maritimes et cultures marines**. En valeur marchande, l'ostréiculture arrive en première place. La production ostréicole est évaluée à 150 000 tonnes d'huîtres creuses et environ 2000 tonnes d'huîtres plates par an qui représente une **valeur marchande de 1.3 milliard de francs**.

Cette économie est relativement exposée de part sa dépendance au milieu naturel : pollutions urbaines ou littorales, occasionnant maladies, mortalité, défaut de recrutement par captage naturel. **La conchyliculture nécessite de ce fait, une activité de recherche soutenue** afin d'assurer des productions tant quantitatives que qualitatives.

Dans les années 1970 et 1980 de nombreux travaux en reproduction des mollusques menés sur la palourde puis sur la coquille Saint-Jacques comme modèles ont montré la complexité des mécanismes de contrôle de la reproduction artificielle en laboratoire ou en écloserie.

A la fin des années 1980, le développement des écloséries et les premiers travaux de génétique sur *Crassostrea gigas* ont pointé les limites dans les connaissances en matière de contrôle de la reproduction des huîtres. Ces connaissances en matière de reproduction des huîtres recouvraient à la fois des acquis zootechniques et des acquis scientifiques ayant trait à la biologie et à la physiologie de l'espèce.

Aujourd'hui **la génétique impose un travail sur des individus** préalablement identifiés d'où un développement des recherches à l'échelle de l'individu.

Les objectifs de notre travail sont triples :

- En premier lieu il doit contribuer à la **validation d'outils spécifiques** permettant une investigation de la gonade mâle et femelle chez l'huître - outils applicables à l'ensemble des mollusques bivalves - :

. outils informatiques à travers le développement de logiciels d'application en analyse d'image,

. outils " biologiques " à travers :

- la proposition de critères de quantification d'un état de développement des gamètes et de la gonade.

- des méthodes d'estimation du développement des gamètes à la suite de ponctions non destructrices de la gonade ou de coupes de tissus frais obligeant au sacrifice de l'animal.

- En second lieu il doit contribuer au développement des **connaissances en biologie et physiologie** et aider à comprendre la stratégie de reproduction.

Les processus visés sont :

- le processus de fin de maturation chez la femelle *C. gigas*,
- le processus d'émission chez les deux sexes.

Cet apport de connaissances s'insère dans un ensemble de recherches finalisées.

- Enfin, en troisième lieu il se propose de fournir à une **communauté de personnes** des "aides" :

* à une communauté scientifique des connaissances et des moyens servant à repérer, évaluer, statuer sur des états physiologiques, donc une aide à l'acquisition des données et à la décision.

* à une communauté de professionnels - ostréiculteurs, politiques et administratifs- une aide à la préservation, à la gestion et au développement de stocks de mollusques.

Pour ce faire, notre étude s'articule autour de quatre axes de recherche :

- Une **description anatomique et morphologique de la gonade,**
- Une **caractérisation des ovocytes dans la gonade,**
- Une comparaison des **méthodes d'appréciation** des surfaces des ovocytes en vue d'estimer **l'état de gamétogénèse,**
- Une étude sur la **dynamique de l'émission** des gamètes mâles et femelles.

1. DESCRIPTION ANATOMIQUE ET MORPHOLOGIQUE

1.1. INTRODUCTION

De nombreux auteurs se sont attachés à décrire les caractéristiques anatomiques et morphologiques des mollusques à fin de taxonomie (Lamarck, 1819; Adams et Adams, 1858; Cuvier, 1882; Kellog, 1892 ; Orton, 1937; Nelson, 1938).

Leenhardt (1926) a plus particulièrement travaillé sur *C. angulata*, Awati et Rai (1931) sur *O. cucullata*, Orton (1937), Ranson (1943) sur *O. edulis* et Galstoff (1951) sur *C. virginica*.

Les travaux plus récents de Torigoe (1981), Harry (1985), Rodriguez et Garcia-Cubas (1986), Li (1989), Li et Qi (1994), Kennedy *et al.* (1996) concernent :

* Des études spécifiques portant essentiellement sur le système digestif des huîtres avec les compartiments stomacaux et leurs conduits, la topographie des intestins et des diverticules digestifs (Awati et Rai, 1931; Show et Battle, 1957; Galstoff, 1964; Dinamani, 1967; Rodriguez et Garcia-Cubas, 1986; Li et Qi, 1994; Evseev *et al.*, 1996).

* Des descriptions de l'état de la gonade à différents moments du processus de gamétogénèse (maturation et émission) chez des espèces commerciales d'huîtres (Loosanoff et Engle 1940, 1942, Galstoff 1964 et Loosanoff 1962, 1965, Millar, 1962; Mann, 1979, Morales et Mann 1989, Wilson et Simons, 1985)

Le but de cette étude anatomique menée sur l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) est d'acquérir un ensemble de critères anatomo-morphologiques afin de faciliter la réalisation d'expériences contrôlées en laboratoire à des fins d'aquaculture ou de génétique, le suivi du processus de maturation et d'autre part l'interprétation des résultats acquis sur un état de gamétogénèse.

Les éléments anatomo-morphologiques décrits sur la base de l'analyse de coupes sériées réalisées dans des régions bien ciblées de la masse viscérale sont mis en relation, avec la configuration et l'épaisseur de la gonade. Ces éléments viennent compléter des connaissances en anatomie générale et en ultrastructure partiellement acquises pour l'espèce.

1.2. MATERIEL ET METHODES

L'étude est réalisée avec des huîtres femelles matures de 2 ans d'âge, élevées sur table, dans l'Aber-Benoît, sur la côte nord du Finistère (France) et collectées au mois de juin et juillet 1996.

Au laboratoire, les animaux sont préalablement lavés afin d'ôter l'épifaune et le sédiment adhérent puis ouverts afin de déterminer pour chaque animal, son stade macroscopique (Echelle de Le Dantec, 1968). Une observation microscopique (Echelle de His, 1976) est aussi réalisée à partir d'un prélèvement d'ovocytes. Neuf animaux au stade 3P-3H qui correspondent à des ovocytes matures et qui présentent une masse viscérale importante, sont retenus.

Les animaux sont disséqués. Leur masse viscérale, composée des organes circulatoires, digestifs et reproductifs, est fixée individuellement dans une solution de Bouin pendant 24 heures puis lavée et conservée dans une solution d'éthanol à 70° jusqu'à la réalisation de coupes transversales. Des sections transversales (Figure 1) sont faites au scalpel perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur du corps de l'huître dans trois régions de la

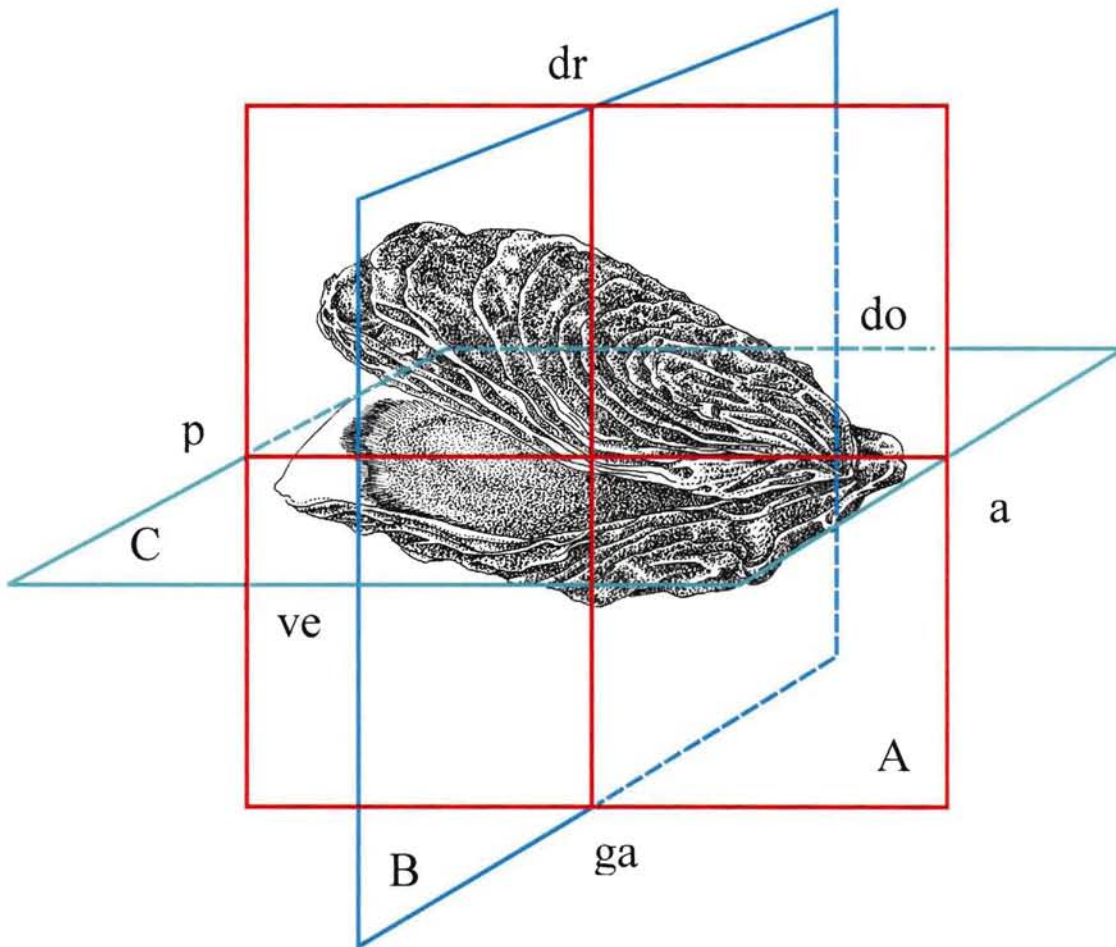


Figure 1 : Orientations et plans de coupes chez *Crassostrea gigas*. A: coupe sagittale ; B: coupe transversale ; C: coupe longitudinale ; a: bord antérieur ; do: bord dorsal ; dr: bord droit ; ga: bord gauche ; p: bord postérieur ; ve: bord ventral.

gonade : en région « Antérieure » au niveau des palpes labiaux, en région « Médiane » en avant de la jonction des palpes labiaux et des branchies, en région « Postérieure » au niveau de la cavité péricardique. Nos références topographiques sont, à ce stade de l'étude, celles de l'axe antéro-postérieur défini par Jackson (1890), cité par Yonge (1953), repris par Stasek (1963) et Morales-Alamo et Mann (1989) : cet axe passe par la bouche et le muscle adducteur ou l'anus. L'axe dorso-ventral lui est approximativement perpendiculaire. La figure 2 rappelle l'organisation des viscères selon des termes empruntés à Morales-Alamo et Mann (1989) qui ont décrit l'huître creuse américaine, *Crassostrea virginica*, et à Evseev *et al.* (1996) qui ont travaillé sur *Crassostrea gigas*.

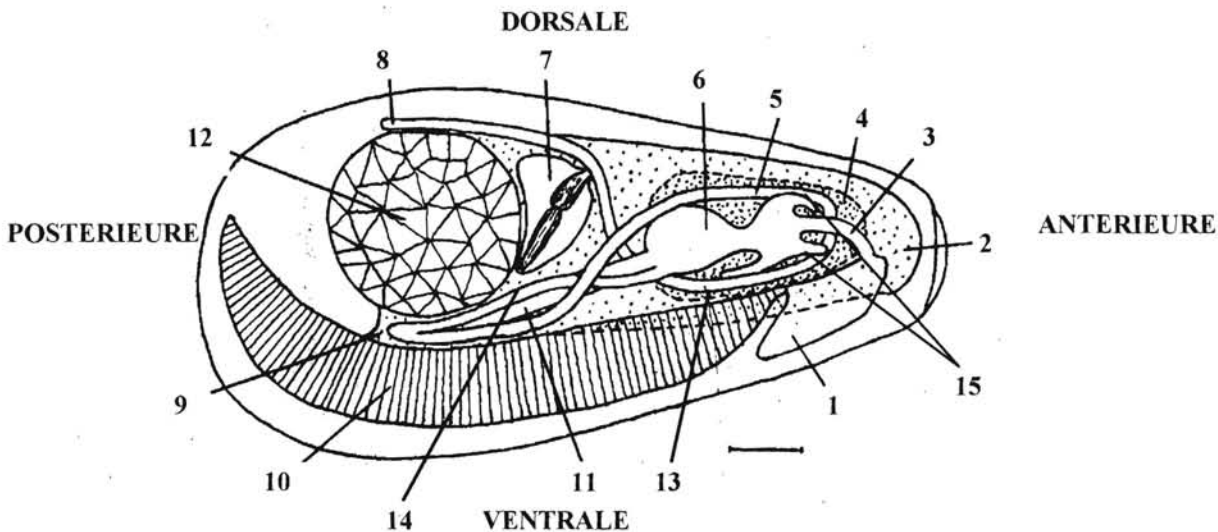


Figure 2 : Topographie des organes de la masse viscérale chez *Crassostrea gigas* (d'après Evseev *et al.*, 1996) vue du côté droit après enlèvement du manteau et de tissus conjonctifs. 1, palpes labiaux; 2, masse viscérale; 3, oesophage; 4, diverticule digestif; 5, intestin ascendant; 6, estomac; 7, cavité péricardique avec ventricule et auricules; 8, anus; 9, processus pylorique; 10, branchies; 11, sac cristallin; 12, muscle adducteur; 13, intestin descendant; 14, intestin intermédiaire; 15, appendice de l'estomac. Echelle: 1 cm.

Chaque section fait 4-5 mm d'épaisseur. Les sections sont prélevées dans les trois régions prédéfinies, elles-mêmes distantes de 4-5mm.

Les tissus ainsi prélevés sont déshydratés en automate et imprégnés de paraffine selon les méthodes classiques décrites par Gabe (1968). Des coupes semi-fines de 5 µm sont préparées au microtome, placées sur lames de verre avec une solution albumineuse, face antérieure visible, colorées au trichrome de Masson et montées entre lame et lamelle avec une solution de résine (Entellan). La coloration au trichrome de Masson (variante de Goldner) est une coloration topographique où les noyaux apparaissent en noir et les cytoplasmes acidophiles en rose.

Après examen binoculaire, trois lames illustrant chacune les plans de coupe transversaux réalisés dans chacune des régions sont sélectionnées. Les images en résultant sont étudiées selon des critères anatomo-morphologiques précis.

1.3. RESULTATS

1.3.1. Caractéristiques des régions

1.3.1.1. Région antérieure

La coupe (Planche 1) est réalisée dans la masse viscérale, en arrière de la jonction des palpes labiaux et des branchies. Les palpes labiaux couvrent toute la zone ventrale.

* La gonade s'étend sous le manteau et occupe les zones dorsale, droite et gauche. Elle est absente en zone ventrale. Sa superficie équivaut sensiblement à la moitié de la surface totale de la coupe. Son épaisseur est plus importante en zone gauche et ventrale qu'en zone droite et ventrale. En zone dorsale, elle se réduit considérablement en un point.

* La zone digestive occupe l'autre moitié. Elle s'étend entre les zones dorsale et ventrale. Elle est limitée en zone dorsale par la gonade, en zone ventrale par les palpes labiaux.

- L'oesophage apparaît en section transversale très allongé et très étroit.

- Les deux appendices de l'estomac qui constituent pour partie le compartiment antérieur, ont une forme caractéristique et entourent l'oesophage. L'un se situe en zone dorsale, l'autre en zone ventrale.

- Les deux conduits intestinaux, l'ascendant ou compartiment intermédiaire et le descendant ou compartiment rectal ont une forme caractéristique en croissant plus ou moins allongé.

- L'intestin ascendant est situé en zone dorsale du côté droit, il s'insère entre la gonade et un des deux appendices de l'estomac. L'intestin descendant apparaît très allongé et s'étend de la zone gauche vers la zone dorsale qu'il borde.

- Les diverticules digestifs occupent la moitié de la surface de la zone digestive.

Ils couvrent principalement la zone ventrale, au dessus des palpes labiaux et s'étendent de la zone droite à la zone gauche. Ils se développent aussi en zone dorsale où ils dessinent un fin cordon entre la gonade et les deux conduits intestinaux. Au milieu des diverticules digestifs, en zone ventrale, plusieurs conduits stomacaux sont visibles, de même en zone droite où ils sont plus petits.

* Le tissu conjonctif entoure toutes les viscères. Il est bien visible en zone dorsale autour de l'oesophage, des deux conduits intestinaux et des deux appendices de l'estomac.

1.3.1.2. Région médiane

La coupe (Planche 2) se situe en avant de la jonction des palpes labiaux et des branchies. Celles-ci occupent la zone ventrale.

* La gonade encercle la masse digestive. Elle s'interrompt légèrement en région ventrale. Sa superficie équivaut au deux tiers de la surface de la section. Son épaisseur est variable, elle est plus importante en zone gauche et en zone dorsale du côté droit tandis qu'elle est moindre en zone ventrale et droite.

* La zone digestive occupe le tiers restant de la surface et est relativement centrée.

- L'estomac est très large et centré dans la cavité digestive. Cette partie de l'estomac correspond au compartiment postérieur.

- Les deux conduits intestinaux, l'ascendant et le descendant conservent leur forme caractéristique en croissant. Cependant leurs tailles respectives sont plus réduites qu'en région antérieure, surtout pour le conduit descendant. Ils se situent de part et d'autre de

l'estomac en opposition : le conduit descendant se trouve en zone gauche et ventrale, le conduit ascendant en zone droite et dorsale.

- Les diverticules digestifs occupent la majeure partie de la cavité digestive au détriment du tissu conjonctif. Ils entourent l'estomac. Ils sont particulièrement développés en zone ventrale droite et gauche et en zone dorsale gauche. Une interruption de leur extension a lieu en zone droite et dorsale autour de l'intestin ascendant et en zone gauche et ventrale autour de l'intestin descendant.

- Les conduits stomacaux sont très nombreux. La majorité d'entre eux se situent en région ventrale. Les plus gros en zone ventrale droite et en zone ventrale gauche. Cependant de plus petits sont aussi visibles en zone dorsale.

* Le tissu conjonctif est peu visible, seules quelques petites zones apparaissent autour de l'estomac et des deux intestins.

1.3.1.3. Région postérieure

La coupe (Planche 3) est représentative de la région postérieure. Elle se situe en arrière du muscle adducteur et traverse la cavité péricardique.

* La gonade occupe la quasi totalité de la surface. Elle se caractérise par la présence de deux masses gonadiques bien distinctes séparées par un sillon. Une petite couvre le quart de la surface et se situe dans la zone dorsale gauche. Une grande occupe les trois quarts restants de cette même surface gonadique et s'étend en zone ventrale droite et gauche. Ces deux masses gonadiques délimitent sur trois côtés la cavité péricardique.

* Le coeur est composé d'un seul ventricule de forme triangulaire et de deux oreillettes parallèles entre elles dont l'une est visible pour partie sur la coupe. Cette cavité péricardique est située en zone gauche, sous la masse gonadique droite.

* Les organes digestifs : l'intestin descendant se situe maintenant en zone dorsale gauche. Il est entouré par une petite zone de tissu conjonctif. Celle-ci est elle-même bordée sur trois côtés par la petite masse gonadique. L'intestin ascendant, se retrouve en zone ventrale droite. Il est de grande taille par rapport à l'intestin descendant. Il surplombe le compartiment initial de l'intestin qui jouxte le sac cristallin. Le compartiment initial de l'intestin est la zone la plus étroite, le sac cristallin est la zone la plus large. Le compartiment initial de l'intestin et le sac cristallin se situent en zone ventrale gauche. Les intestins et le sac cristallin sont entourés par une faible épaisseur de tissu conjonctif qui les isole de la grande masse gonadique.

*A ce stade de développement de la gonade, on n'observe pas de diverticules digestifs visibles dans le tissu conjonctif qui entoure les intestins.

1.3.2. Caractéristiques globales de la gonade

La surface de la gonade s'accroît progressivement de la région antérieure vers la région postérieure.

* En région antérieure elle a une forme de « croissant » (Planche 1). Ce croissant occupe les parties droite, dorsale et gauche et fait face à la partie ventrale. La gonade occupe à ce niveau près de la moitié de la surface de la coupe.

PLANCHE 1

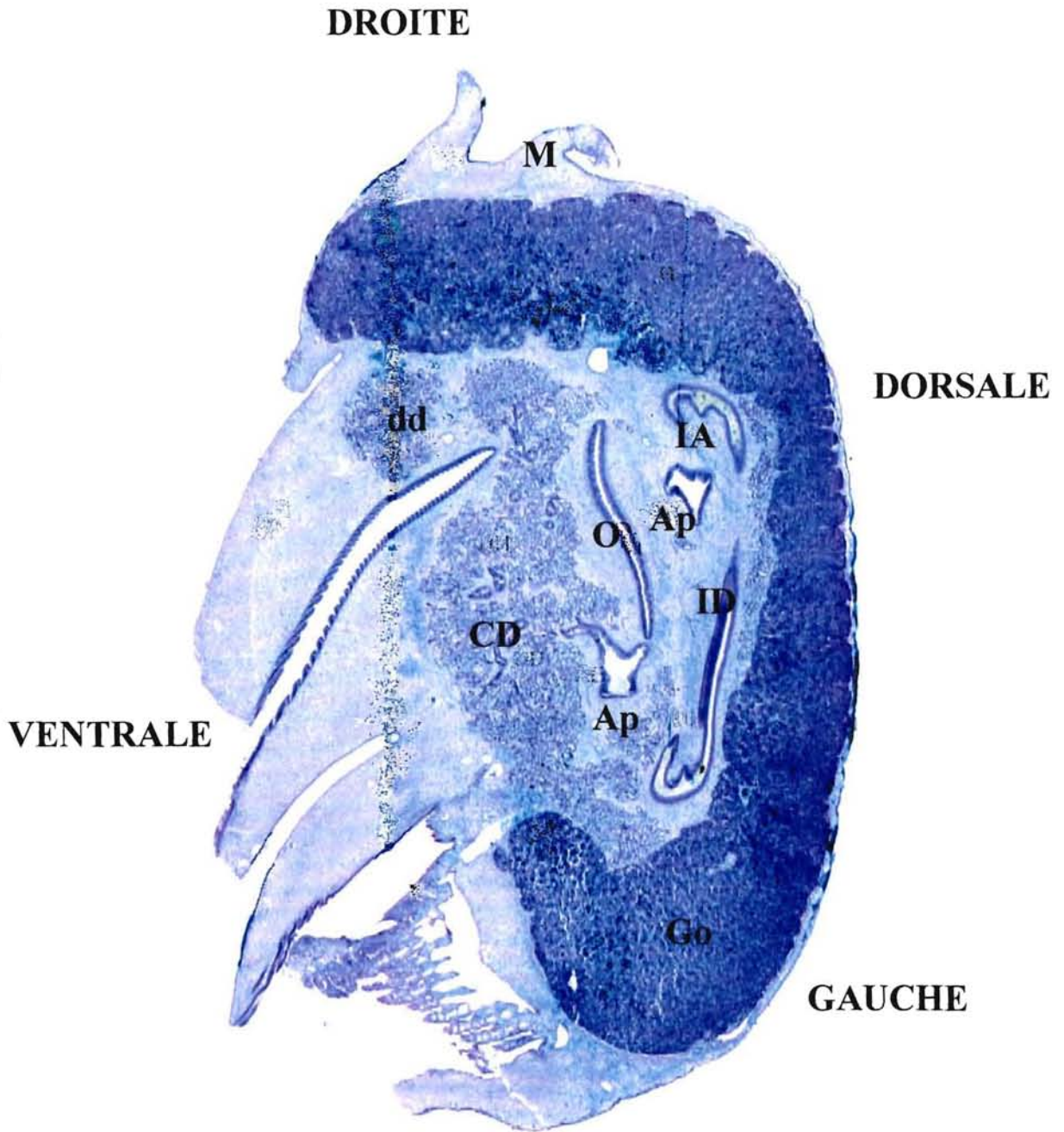


PLANCHE 2

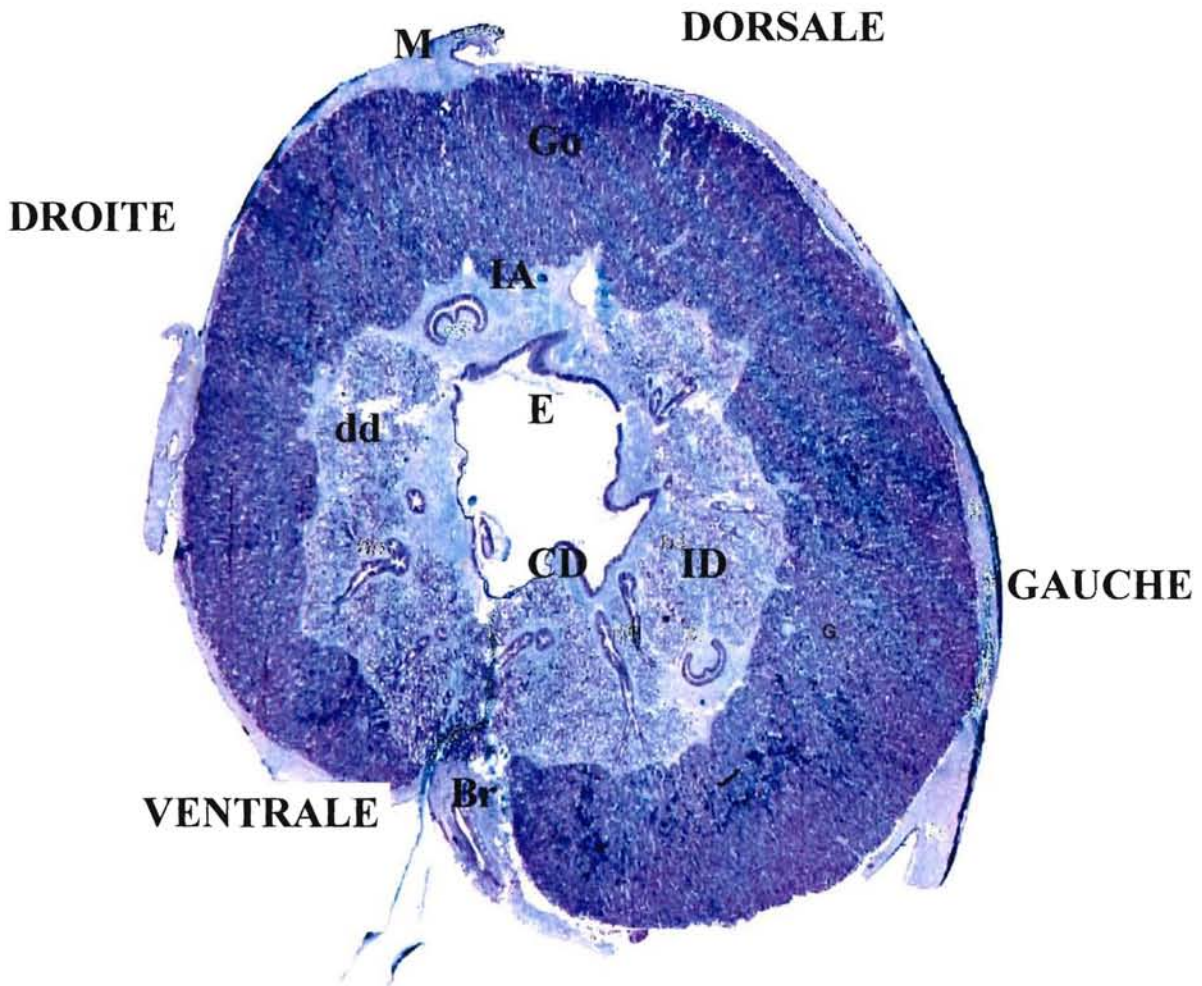
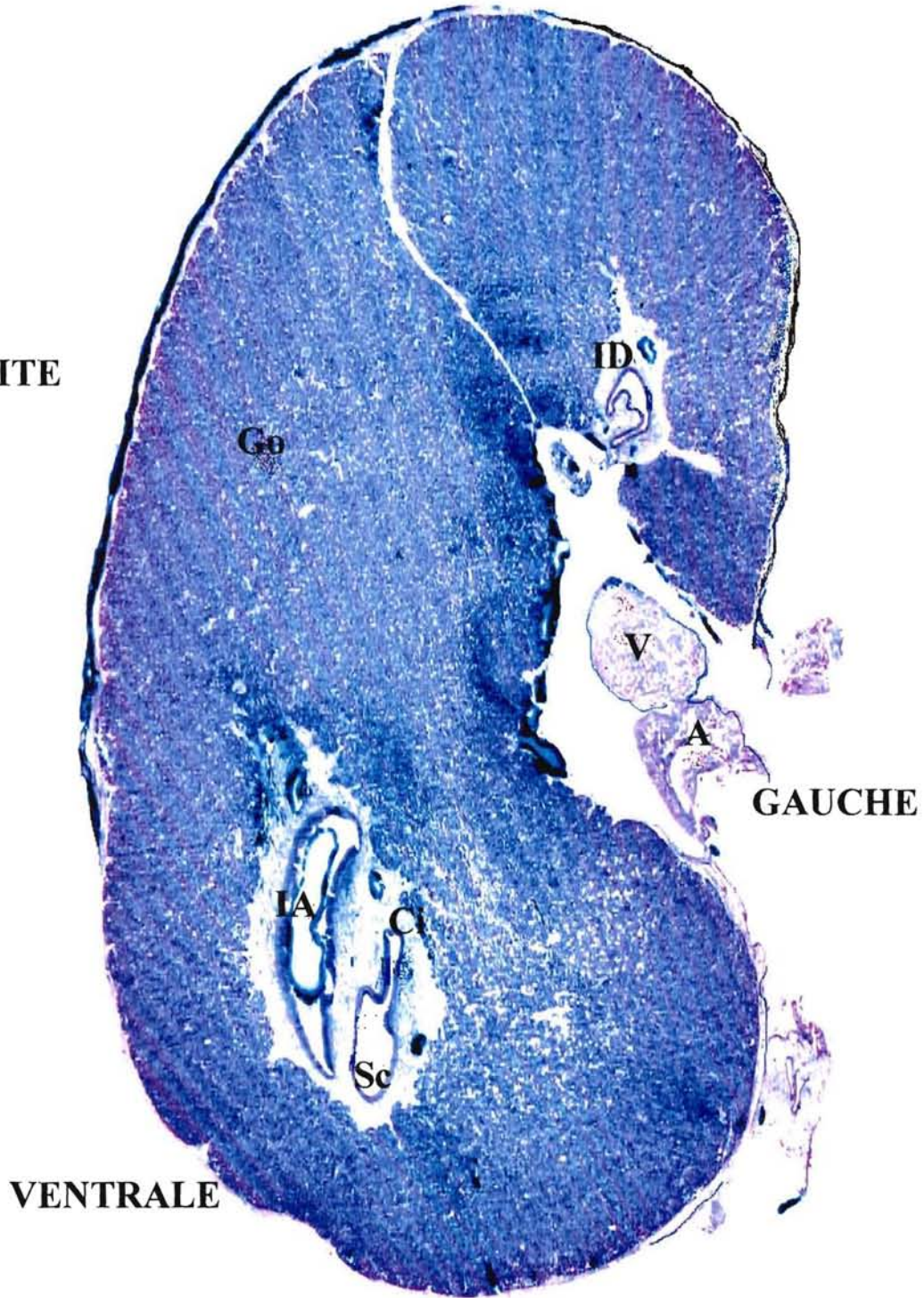


PLANCHE 3

DORSALE

DROITE



GAUCHE

VENTRALE

* En région médiane, ce croissant prolonge ses cornes vers la partie ventrale et dessine un anneau périphérique, interrompu sur une très faible portion au niveau ventral (Planche 2). La gonade occupe ici les deux tiers de la surface de la section.

* En région postérieure, la gonade occupe la quasi totalité de la surface de la coupe et se scinde en deux masses d'inégales surfaces (Planche 3).

1.3.3. Caractéristiques globales des organes digestifs et de l'appareil circulatoire

- Les diverticules digestifs ont une surface qui va croissante de la région antérieure vers la région médiane. Ils sont absents en région postérieure.

- L'estomac évolue suivant l'axe antéro-postérieur et se divise en deux compartiments:

* en région antérieure (Planche 1), le compartiment antérieur de l'estomac fait suite à l'oesophage. Il est visible à travers deux appendices - de forme caractéristique en H - qui encadrent l'oesophage,

* en région médiane (Planche 2), le compartiment postérieur de l'estomac, occupe le centre de la coupe et est relativement large,

* en région postérieure (Planche 3) l'intestin fait suite à l'estomac. A son départ il passe au dessus du sac cristallin puis le longe jusqu'au processus pylorique.

- L'intestin, en fonction de son trajet dans la cavité viscérale, est découpé en trois compartiments: le compartiment initial, le compartiment intermédiaire ou branche ascendante, le compartiment rectal ou branche descendante. Ces deux branches sont en perpétuelle migration selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral et constituent un excellent repère pour évaluer la position d'un plan de coupe.

1.4. DISCUSSION

Notre étude sur *Crassostrea gigas* est originale car elle réalise simultanément l'observation des organes digestifs, reproductifs et, pour partie, circulatoires. Cette démarche est aussi celle que Morales-Alamo et Mann ont développée en 1989 sur *C. virginica*. Elle diffère des approches que d'autres auteurs, Loosanoff et Engle (1940), Galstoff (1964), Loosanoff (1965), ont développées sur plusieurs espèces d'huîtres. Ces approches dissocient l'étude des gonades et des organes digestifs et comparent des individus ou des populations différentes.

Sur le plan anatomo-morphologique, nous montrons que dans la région postérieure de l'huître *Crassostrea gigas*, la gonade est constituée de deux masses séparées par un sillon. Cette particularité n'a pas été relevée chez *Crassostrea virginica*, par contre Nascimento et Lunetta (1978) décrivent deux lobes distincts chez *Crassostrea rhizophorae*. Chez ces deux espèces, les éléments digestifs connaissent à peu près les mêmes évolutions et présentent un haut degré de similitude. Concernant le coeur, outre une différence de morphologie connue sur les oreillettes (Evseev *et al.*, 1996), il apparaît que la cavité péricardique se situe en zone gauche et centrale chez *C. gigas* et non en zone dorsale et droite comme c'est le cas chez *C. virginica*.

Les différences relevées entre ces deux espèces sont soit des différences spécifiques soit des différences attribuables aux caractéristiques intrinsèques des tissus observés (niveaux de coupe, états de maturité).

Ce travail permet d'avoir une connaissance précise de l'anatomo-morphologie de la masse viscérale de *C. gigas* en fin de gamétogénèse. Il fait suite et complète des études macroscopiques et histologiques sur l'organisation des conduits génitaux de cette espèce (Devauchelle *et al.*, 1999 ; Boussaïd, 2000).

Cette investigation qui lie étroitement, pour des régions bien déterminées de la masse viscérale, un état de développement gamétogénétique et un positionnement d'organes de référence permet, outre un savoir sur des processus internes à un moment donné, une aide à la manipulation en expérimentation, une aide à la compréhension et à l'interprétation des données dans le cadre d'études cytologiques particulières ou d'un état de maturité.

Pour comparer des variations individuelles et populationnelles d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, il est recommandé, sur la base de nos résultats, d'effectuer un prélèvement dans la même région et en région postérieure et droite, où l'épaisseur de la gonade est plus importante.

Ces recommandations seront utilement prises en compte lors d'études spécifiques en anatomo-pathologie ou en génétique des populations où un suivi individuel est prescrit.

Le Titre 2 de ce mémoire complète ces données anatomo-morphologiques en renseignant le lecteur sur la distribution des tailles et la répartition spatiale des ovocytes dans la gonade de *Crassostrea gigas*, en fin de gamétogenèse.

2. CARACTERISTIQUES DES OVOCYTES DANS LA GONADE

2.1. INTRODUCTION

L'étude du déroulement de la gamétogenèse chez les Mollusques Bivalves revêt deux aspects : un aspect descriptif et un aspect constitutif.

La description et la caractérisation du déroulement de la gamétogenèse s'est d'abord faite en termes de stades, lesquels sont regroupés à l'intérieur d'Echelles. Ces Echelles établies macroscopiquement, ainsi pour exemple, celle de Le Dantec (1968) ou microscopiquement, comme celles de Kennedy et Battle (1964), de His (1976) , de Mann (1979), apportent des informations quantitatives et/ou qualitatives. Elles sont généralement réalisées à partir de frottis ou de coupes histologiques. Des indices gonadiques ou de condition les complètent.

La constitution de la gonade s'étudie par le biais de différentes techniques : analyse d'image (Heffernan et Walker, 1989), stéréologie (Chalkey, 1943), planimétrie (Lowe et al, 1982). Ce qui est mesuré est de la gonade au travers de son épaisseur, de sa largeur, de sa surface, peu souvent de l'ovocyte. Quand celui-ci est analysé, c'est au travers de son diamètre (Lango-Reynoso, 1999).

L'objectif de cette étude est :

- * de valider des critères de mesure comme éléments d'appréciation de l'état d'avancement de la gamétogenèse.

- * d'établir une « cartographie » de la gonade en fin de maturité pour chaque animal : voir la distribution de la taille des plans de coupe dans les ovocytes, étudier la correspondance entre la taille des ovocytes mesurés par ces nouveaux critères et leur localisation spatiale.

L'établissement de cette « cartographie » est nécessaire pour savoir où, quand et comment prélever les tissus ou les cellules sexuelles, afin de rendre homogène les prélèvements lors de suivis individuels ou d'échantillonnages et ainsi de permettre les comparaisons entre résultats, l'interprétation des données et la diffusion de connaissances valablement établies.

2.2. MATERIEL et METHODES

2.2.1. Matériel biologique

L'étude est réalisée avec des huîtres femelles matures de 2-3 ans d'âge, élevées sur table, dans l'Aber-Benoît, sur la côte nord du Finistère (France) et collectées au mois de juin et juillet 1996.

2.2.2. Traitements des échantillons

Au laboratoire, les animaux sont préalablement lavés afin d'ôter l'épifaune et le sédiment adhérent puis ouverts afin de déterminer pour chaque animal, son stade macroscopique. Une observation microscopique est aussi réalisée à partir d'un prélèvement d'ovocytes. 9 animaux

au stade 3P-3H qui correspondent à des ovocytes matures et qui présentent une masse viscérale importante, sont retenus.

2.2.2.1. Préparation des coupes histologiques

Ces animaux sont alors disséqués. Leur masse viscérale, composée des organes circulatoires, digestifs et reproductifs, est fixée individuellement dans une solution de Bouin pendant 24 heures puis lavée et conservée dans une solution d'éthanol à 70° jusqu'à la réalisation de coupes transversales. Ces coupes transversales faites au scalpel sont définies comme étant le plan perpendiculaire à l'axe antéro-postérieur du corps de l'huître. Elles aboutissent à isoler pour chaque « gonade », 3 segments de 4-5 mm d'épaisseur, séparés eux-mêmes par 4-5 mm.

3 régions sont ainsi déterminées: une région « Antérieure » au niveau des palpes labiaux, une région « Médiane » en avant de la jonction des palpes labiaux et des branchies; une région « Postérieure » au niveau de la cavité péricardique.

Pour chaque animal, ces 3 régions placées individuellement dans des histocettes, la face postérieure visible, subissent un phase d'imprégnation par la paraffine après une série de bains d'éthanol et de toluène. Chaque échantillon ainsi traité est alors orienté dans des moules à paraffine, la face postérieure visible. L'inclusion réalisée, chaque région est découpée en sections de 5µm d'épaisseur réalisées au microtome pour coupes semi-fines puis montées et colorées au trichrome de Masson, la face antérieure visible.

Après examen binoculaire, 5 lames consécutives sont alors sélectionnées sur une trentaine de réalisées pour chaque région. Chaque animal est donc représenté par 15 lames.

2.2.2.2. Mode opératoire de l'analyse quantitative

L'analyse d'image se réalise sur 3 animaux retenus pour la qualité et la taille de leurs coupes semi-fines. Les préparations histologiques sont analysées sur un système UNILOG™. Chaque lame est observée au grossissement 200. Chaque femelle est analysée à travers des points de mesure réalisés dans ses 3 régions: Antérieure, Médiane, Postérieure. Chaque région est étudiée à travers 4 zones: Droite, correspondant à la valve droite, Gauche, correspondant à la valve creuse, Ventrale, correspondant à la zone des palpes labiaux et des branchies, Dorsale, correspondant à la zone opposée. Chaque zone est elle-même divisée en 2 sous-zones: un point Extérieur, situé sous le manteau et un point Intérieur, situé du côté de la masse digestive, à 3-4 mm. du premier point. Cette distance correspond à l'épaisseur maximale de gonade dans la région Antérieure. Nous définissons ainsi 8 points de mesure par lame pour les régions Postérieure et Médiane et 6 points pour la région Antérieure car les ovocytes sont ici absents en zone Ventrale. En chaque point de mesure, nous acquérons au minimum les paramètres sur 30 ovocytes. Au total près de quinze mille ovocytes sont ainsi paramétrisés.

L'étude de l'homogénéité et/ou de l'hétérogénéité de la gonade est réalisée par le biais des paramètres suivants: surfaces du noyau, du cytoplasme, puis, après acquisition de ces deux paramètres, par calcul, la surface totale « noyau + cytoplasme » et le rapport nucléocytoplasmique. Dans un second temps, afin d'affiner l'analyse, les rapports cytoplasmocytaire et nucléocytaire sont aussi évalués.

2.2.3. Références d'analyse

2.2.3.1. Stade macroscopique

Il est établi selon l'échelle de Le Dantec (1968). Cette échelle d'évaluation est utilisée pour les huîtres du genre *Crassostrea*. Cette évaluation nécessite le sacrifice de l'animal.

2.2.3.2. Observation microscopique

Elle est réalisée à partir d'un prélèvement d'ovocytes. Une évaluation d'état de maturité est faite selon les critères morphologiques établis par His (1976) selon la classification de Le Dantec (1968) pour *Crassostrea gigas*.

2.2.3.3. Critères anatomo-morphologiques

- l'axe antéro-postérieur est celui défini par Jackson (1890) cité par Yonge (1953) ou Stasek (1963), pour *C. virginica*. L'axe dorso-ventral lui est approximativement perpendiculaire (Figure 1).

- les références topographiques des viscères sont données par la description de Evseev *et al.* (1996), pour *C. gigas* (Figure 2).

2.2.3.4. Techniques histologiques

- La préparation des échantillons et la confection des lames se font par les techniques décrites par Gabe (1968).

- La coloration au trichrome de Masson (variante de Goldner) est une coloration topographique où les noyaux apparaissent en noir et les cytoplasmes acidophiles en rose.

2.2.4. Analyse quantitative

Cette analyse permet d'étudier quantitativement la reproduction des bivalves (Heffernan et Walker, 1989). Les préparations histologiques des femelles de *Crassostrea gigas* sont analysées sur un système d'analyse d'images, comprenant un microscope muni d'une caméra vidéo couleur. Celle-ci est connectée à un ordinateur équipé d'une carte d'acquisition d'image: le système convertit les images optiques en signaux vidéo puis en images binaires en utilisant des niveaux de gris grâce à un menu binaire. Un menu paramétrisation calcule, à partir de là, les mesures morphométriques de surfaces.

Chaque lame est observée au grossissement 200. Les contours des cytoplasmes et des noyaux apparaissent automatiquement à l'écran. Un écran de contrôle permet de corriger ces contours. L'application A1 du logiciel UNILOG évalue les aires des différents paramètres en pixels. Une calibration permet de les traduire en μm^2 (1 px. = $0,6829 \mu\text{m}^2$).

2.2.4.1. Analyse statistique

Les surfaces moyennes et les écarts-types sont calculés pour chaque paramètre de mesure de surface en chaque point de mesure. Les surfaces moyennes sont ensuite comparées entre elles à l'aide de l'analyse des variances ANOVA et du Test Newman-Keuls ($\alpha = 0,05$) - ou du test t ($\alpha = 0,05$) pour les rapports cytoplasmo-ovocytaires et nucléo-ovocytaires - selon le plan d'analyse défini comme suit:

- comparaison des 3 animaux entre eux,
- comparaison des effets pour chaque animal:
 - * effet région par animal, pour les 3 animaux,

- * effet zone par animal, pour les 3 animaux,
- * effet sous-zone par animal, pour les 3 animaux

Toutes ces comparaisons se font au travers des 6 paramètres de mesure de surfaces.

2.3. RESULTATS

2.3.1. Stades

Les trois animaux de notre étude, évalués par les Echelles de Le Dantec (1968) et de His (1976), sont au même stade (3H): le tissu interstitiel est très réduit, les follicules sont très volumineux et les ovocytes matures.

15000 ovocytes ont fait l'objet de mesures en vue de rendre compte des variations inter et intra-individuelles des paramètres mesurés.

La dispersion des valeurs mesurées figure dans les graphes qui suivent par les écarts types.

2.3.2. Variations individuelles (Tableau 1, Figure 3)

La question est de savoir si des animaux repérés à un même stade de fin de maturité ont des ovocytes avec des caractéristiques équivalentes.

Il existe des variations individuelles qui s'expriment au travers de la taille des ovocytes (N+C), de leurs composants respectifs (N et C) ou de la relation que ces composants entretiennent entre eux (N/C), (ANOVA ; $p < 0.001$).

Les variations de surface sont parfois faibles mais néanmoins significativement différentes (test Newman-Keuls; $\alpha = 0.05$).

Les ovocytes des animaux 2 et 3 ont une surface plus importante que ceux de l'animal 1. L'animal 2 a les plus gros ovocytes, l'animal 1, les plus petits.

En fin de maturité le cytoplasme occupe environ 80% de la surface totale et le noyau environ les 20% restants. Cependant des différences significatives existent autour de ces taux pour les trois animaux (test t ; $\alpha = 0.05$).

Les animaux ne sont donc pas tous au même degré de maturité bien que repérés comme tels par les échelles classiquement utilisées. Nos critères permettent donc d'appréhender plus précisément le degré de maturité.

2.3.3. Variations intra-gonadiques (Tableau 1, Figure 4)

La question est de savoir s'il vaut mieux ponctionner les ovocytes en surface ou davantage en profondeur dans la gonade pour apprécier un état de maturité.

Au sein d'un même animal il existe des différences dans les caractéristiques des ovocytes dues au positionnement de ceux-ci dans l'épaisseur de la gonade. Ces différences sont systématiques concernant les surfaces du cytoplasme et la surface totale des ovocytes (ANOVA; $p < 0.001$).

Les ovocytes ectogonadiques situés sous le manteau sont plus gros que les ovocytes endogonadiques situés du côté de la partie digestive (test Newman-Keuls ; $\alpha = 0.05$).

Tableau 1 : Valeurs moyennes des différents paramètres mesurés par analyse d'image.

Cibles	Nb. ovo.	moyenne en μm^2 (coef = 0,6829)			rapport			écart-type					
		C	N	N+C	N/C	C/N+C	N/N+C	C	N	N+C	N/C	C/N+C	N/N+C
1	4562	1388	387	1775	29	78	22	358	144	426	12	7	7
2	4715	1768	412	2180	24	81	19	367	170	454	10	6	6
3	4669	1696	365	2061	22	83	17	343	145	426	8	5	5
1E	2078	1450	392	1842	28	79	21	367	152	439	11	7	7
1I	2484	1315	377	1692	30	78	22	330	131	389	12	7	7
2E	2165	1827	439	2266	24	81	19	375	188	468	10	6	6
2I	2550	1718	389	2107	23	82	18	352	150	428	9	6	6
3E	2192	1752	366	2118	21	83	17	356	152	441	8	5	5
3I	2477	1647	364	2011	22	82	18	323	138	405	7	5	5
1A	1262	1198	357	1555	31	77	23	302	130	359	13	7	7
1M	1653	1466	398	1864	28	79	21	354	143	415	11	6	6
1P	1841	1448	398	1846	28	78	22	351	151	424	11	7	7
2A	1226	1789	413	2202	23	81	19	339	168	419	10	6	6
2M	1745	1713	399	2112	24	81	19	358	165	443	9	6	6
2P	1744	1809	423	2232	24	81	19	387	176	478	10	6	6
3A	1182	1619	342	1961	21	83	17	339	133	416	7	5	5
3M	1842	1665	358	2023	22	83	17	313	141	390	8	5	5
3P	1645	1786	389	2175	22	82	18	358	153	444	8	5	5
1DO	1287	1389	386	1775	29	78	22	357	141	423	11	7	7
1DR	1294	1363	372	1735	29	78	22	364	134	426	11	7	7
1GA	1324	1345	395	1740	30	77	23	343	151	417	12	7	7
1VE	851	1488	400	1888	28	79	21	356	149	422	11	7	7
2DO	1319	1760	402	2162	23	82	18	351	159	423	9	6	6
2DR	1229	1751	397	2148	23	82	18	374	164	463	9	6	6
2GA	1234	1763	433	2196	25	81	19	371	191	472	11	7	7
2VE	933	1810	417	2227	23	81	19	369	162	453	9	6	6
3DO	1297	1688	358	2046	21	83	17	351	142	436	7	5	5
3DR	1256	1694	359	2053	21	83	17	336	142	415	8	5	5
3GA	1227	1714	373	2087	22	82	18	338	144	422	8	5	5
3VE	889	1686	371	2057	22	82	18	347	153	430	8	6	6

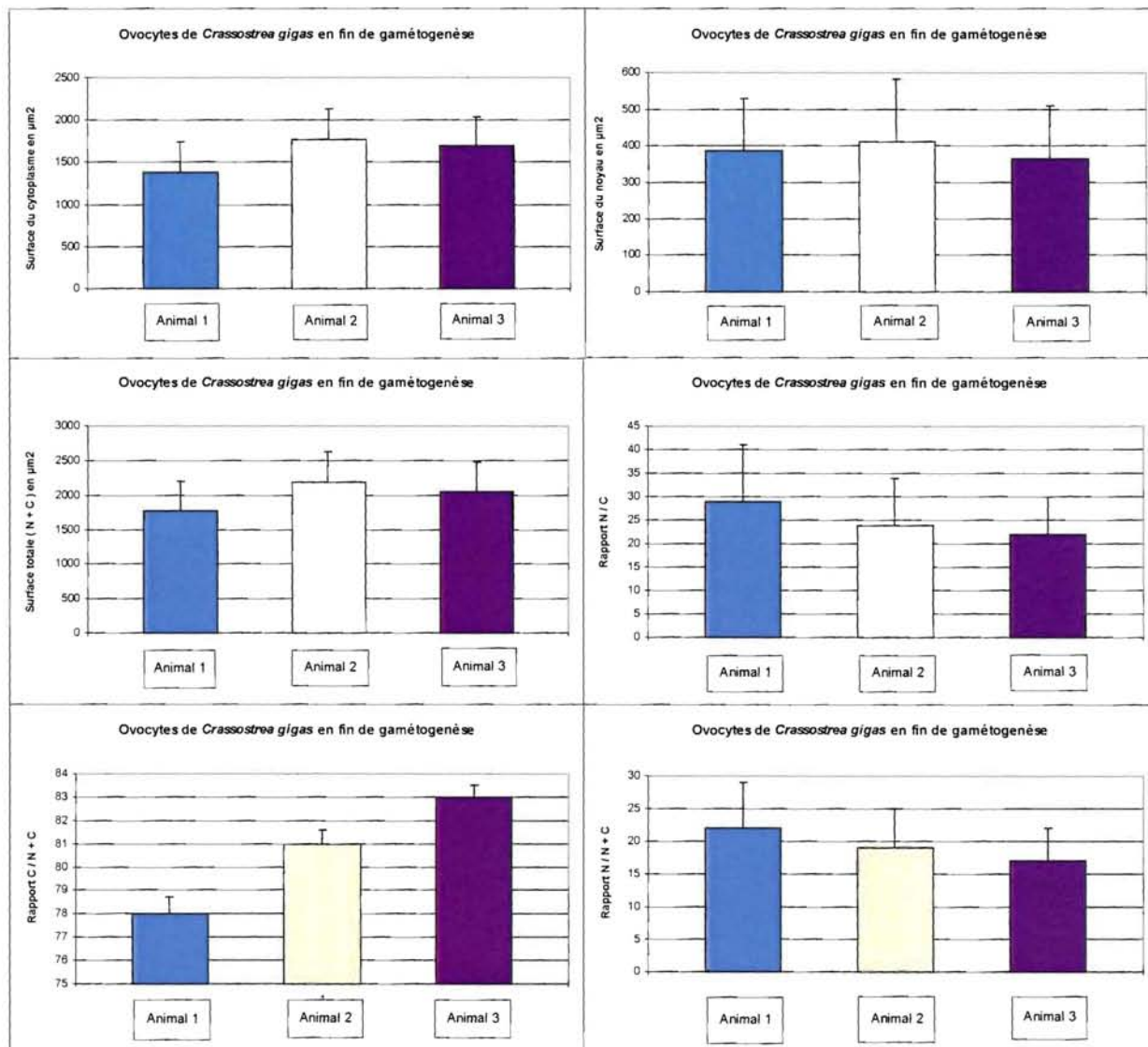


Figure 3 : Représentation graphique des valeurs moyennes obtenues pour chaque animal et chaque critère estimé par analyse d'images. Les écarts-types sont représentés sur les figures.

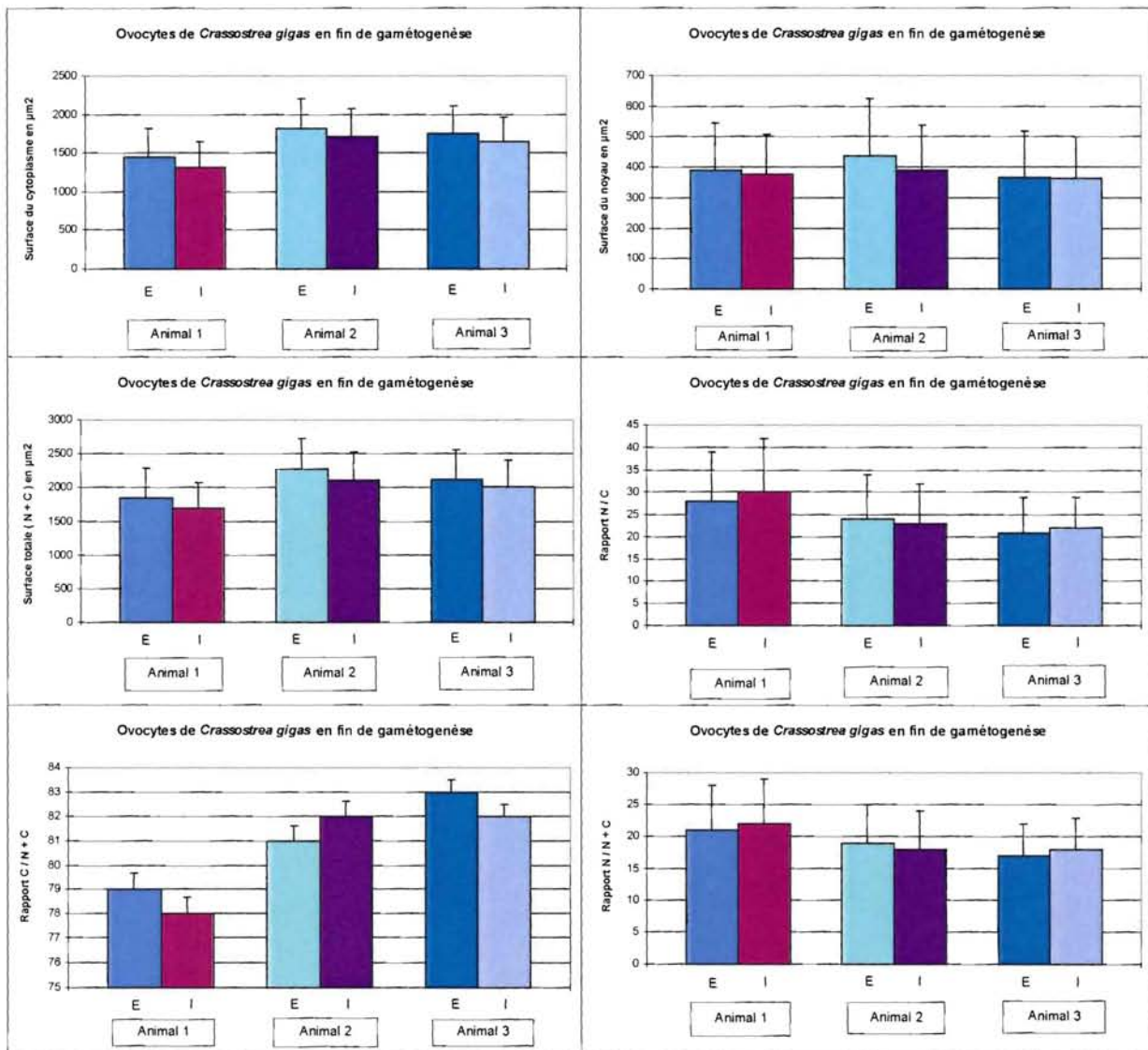


Figure 4 : Représentation graphique des valeurs moyennes obtenues pour chaque sous-zone endogonadique (I) et ectogonadique (E), chaque animal et chaque critère estimé par analyse d'images. Les écarts-types sont représentés sur les figures.

Les rapports des surfaces des ovocytes endogonadiques (I) aux ovocytes ectogonadiques (E) sont respectivement de 0,92 ; 0,93 et 0,95 pour les animaux 1, 2 et 3.

Pour les trois animaux, toute zone confondue, le cytoplasme occupe entre 78 et 83% de la surface totale de l'ovocyte et le noyau entre 17 et 22%.

Les noyaux des ovocytes ectogonadiques et endogonadiques de l'animal 3 sont de même taille (test Newman-Keuls ; $\alpha = 0.05$). Ce même animal a des ovocytes plus petits que ceux de l'animal 2 mais ces ovocytes ont un rapport cytoplasmo-ovocyttaire plus important.

Les cellules étant plus grosses en périphérie et les différences de surface entre ovocytes ectogonadiques et endogonadiques étant plus importantes pour l'animal qui a les plus petits ovocytes, nous pensons que la gamétogenèse de *Crassostrea gigas* est caractérisée par un gradient centrifuge.

Il est donc préférable, lors de prélèvements à fin de mesures, de ponctionner sous le manteau et pour comparer l'état de maturité de plusieurs individus, de ponctionner toujours à la même profondeur.

2.3.4. Variations antéro-postérieures (Tableau 1, Figure 5)

La question ici est de savoir s'il existe une région où ponctionner préférentiellement, sachant que la région Postérieure de l'animal est la plus accessible lorsque l'huître est entrouverte.

Au sein d'un même animal il existe des différences dans les caractéristiques des ovocytes dues à leur positionnement dans les différentes régions de la gonade. Ces différences sont visibles au travers des critères morphométriques : C, N et N+C (ANOVA; $p < 0.001$), (Tableau 3, graphe 3).

Ces variations ne sont pas constantes d'un animal à l'autre (test Newman-Keuls ; $\alpha = 0.05$) même lorsque nous analysons indépendamment les régions Médiane et Postérieure (test Newman-Keuls ; $\alpha = 0.05$).

Une différenciation plus précise des trois régions n'est pas non plus obtenue en prenant en compte un gradient de développement dans la gonade, c'est à dire en analysant séparément les valeurs des ovocytes ectogonadiques et endogonadiques (test Newman-Keuls ; $\alpha = 0.05$). Dans ce dernier cas de figure une analyse des seules régions Médiane et Postérieure conduit aux mêmes conclusions (test Newman-Keuls; $\alpha = 0.05$).

Cependant les ovocytes ont tendance à être plus gros en région postérieure et plus petits en région antérieure chez les animaux qui ont les ovocytes les plus petits.

Chez nos trois animaux, toutes régions confondues, la surface du cytoplasme varie de 77 à 83% de la surface totale et le noyau de 17 à 23%.

Les ovocytes de l'animal 2 qui ont la taille la plus importante ont des rapports cytoplasmo-ovocytaires et nucléo-ovocytaires identiques dans les trois régions (test t ; $\alpha = 0.05$).

L'animal 3 dont les ovocytes sont plus petits que ceux de l'animal 2 a ces rapports identiques en régions antérieure et médiane d'une part, médiane et postérieure d'autre part (test t ; $\alpha = 0.05$).

Pour les animaux 2 et 3 il n'y a pas de gradient antéro-postérieur.

L'animal 1 qui a les plus petits ovocytes a ces mêmes rapports identiques seulement pour les régions médiane et postérieure (test t ; $\alpha = 0.05$). De manière générale cet animal 1 enregistre les plus faibles ou les plus fortes valeurs en région antérieure preuve que les ovocytes y sont moins développés que dans les autres régions. Pour l'animal 1 il y a un gradient antéro-postérieur.

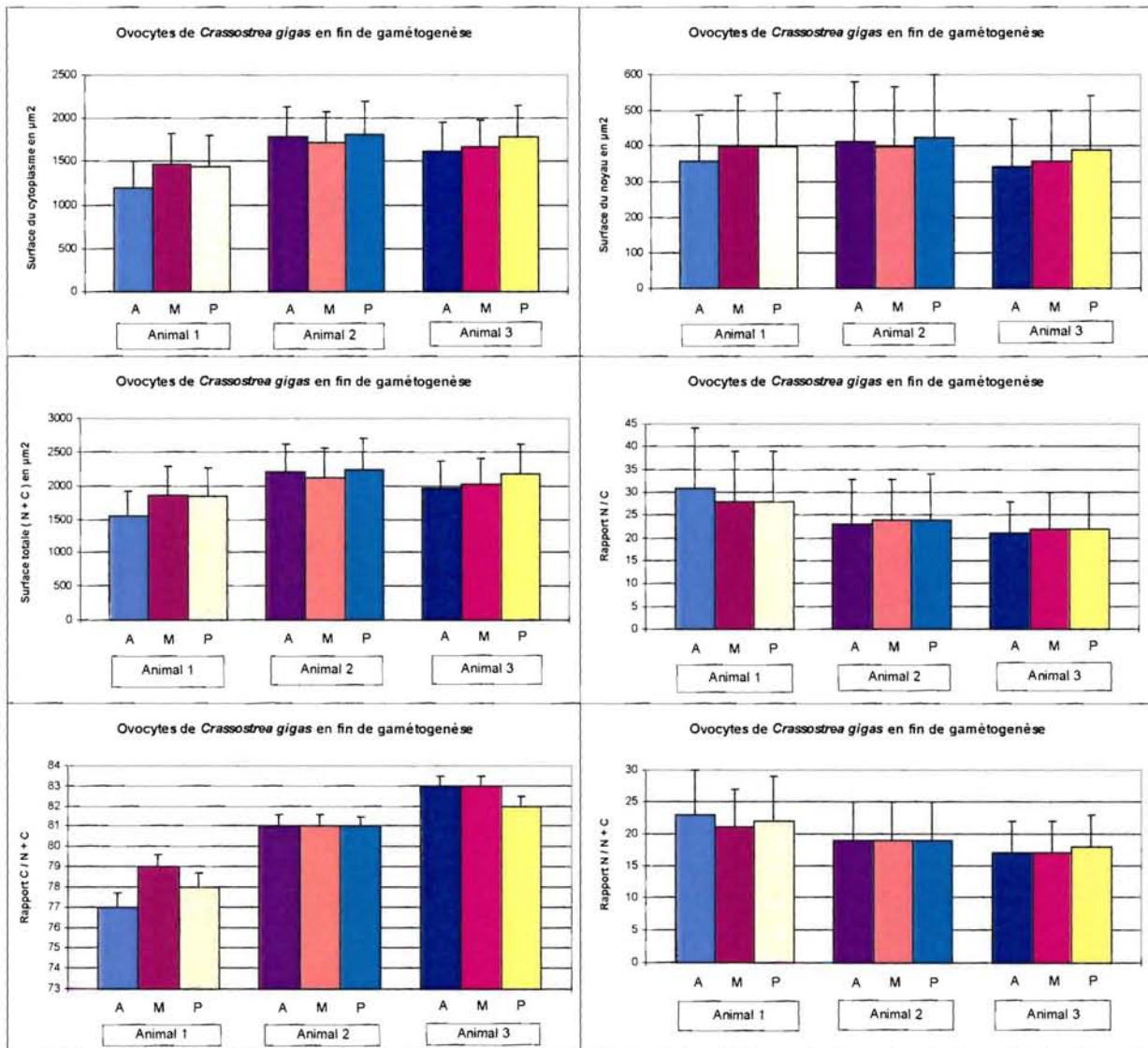


Figure 5 : Représentation graphique des valeurs moyennes obtenues pour chaque région antérieure (A), médiane (M) et postérieure (P), chaque animal et chaque critère estimé par analyse d'images. Les écarts-types sont représentés sur les figures.

D'après nos mesures, les ovocytes de la partie postérieure peuvent être légèrement plus grands que ceux de la partie antérieure chez les animaux dont les ovocytes sont en moyenne plus gros. Nous conseillons donc de prélever les ovocytes toujours dans la même région et préférentiellement en région postérieure, les valeurs y étant plus grandes.

2.3.5. Variations latérales (Tableau 1, Figure 6)

Les ovocytes de chaque zone ont parfois des tailles égales au travers des différents paramètres de mesure, mais ces égalités ne sont pas constantes d'un animal à l'autre (test Newman-Keuls; $\alpha = 0.05$). Une différenciation plus précise n'est pas d'avantage obtenue en se limitant aux seules régions Médiane et Postérieure (test Newman-Keuls; $\alpha = 0.05$).

Une différenciation plus précise des quatre zones n'est pas non plus obtenue en différenciant les ovocytes ectogonadiques et endogonadiques ou en se limitant aux seules régions Médiane et Postérieure (test Newmann-Keuls; $\alpha = 0.05$).

Le cytoplasme dans toutes les zones et pour les trois animaux couvre toujours près de 80% de la surface totale de l'ovocyte et le noyau 20%.

L'animal 3 a le plus fort pourcentage de cytoplasme . Il est supérieur à celui de l'animal 2 qui est lui même supérieur à celui de l'animal 1.

Les 3 animaux ont des taux cytoplasmo-ovocytaire et nucléo-ovocytaire égaux en zone droite et dorsale (test t ; $\alpha = 0,05$).

Globalement, les tailles des ovocytes ne sont pas statistiquement différentes dans les différents côtés de l'animal, quelque soit l'animal et son degré propre de maturité (test Newman-Keuls; $\alpha = 0,05$). Nous concluons donc que les zones Droite, Gauche, Ventrale ou Dorsale sont comparables du point de vue des caractéristiques de surface des ovocytes.

Nous pouvons donc piquer et prélever du tissu et des cellules sexuelles sans prendre en compte la latéralité, mais en sachant néanmoins que les zones droite et dorsale sont les plus accessibles.

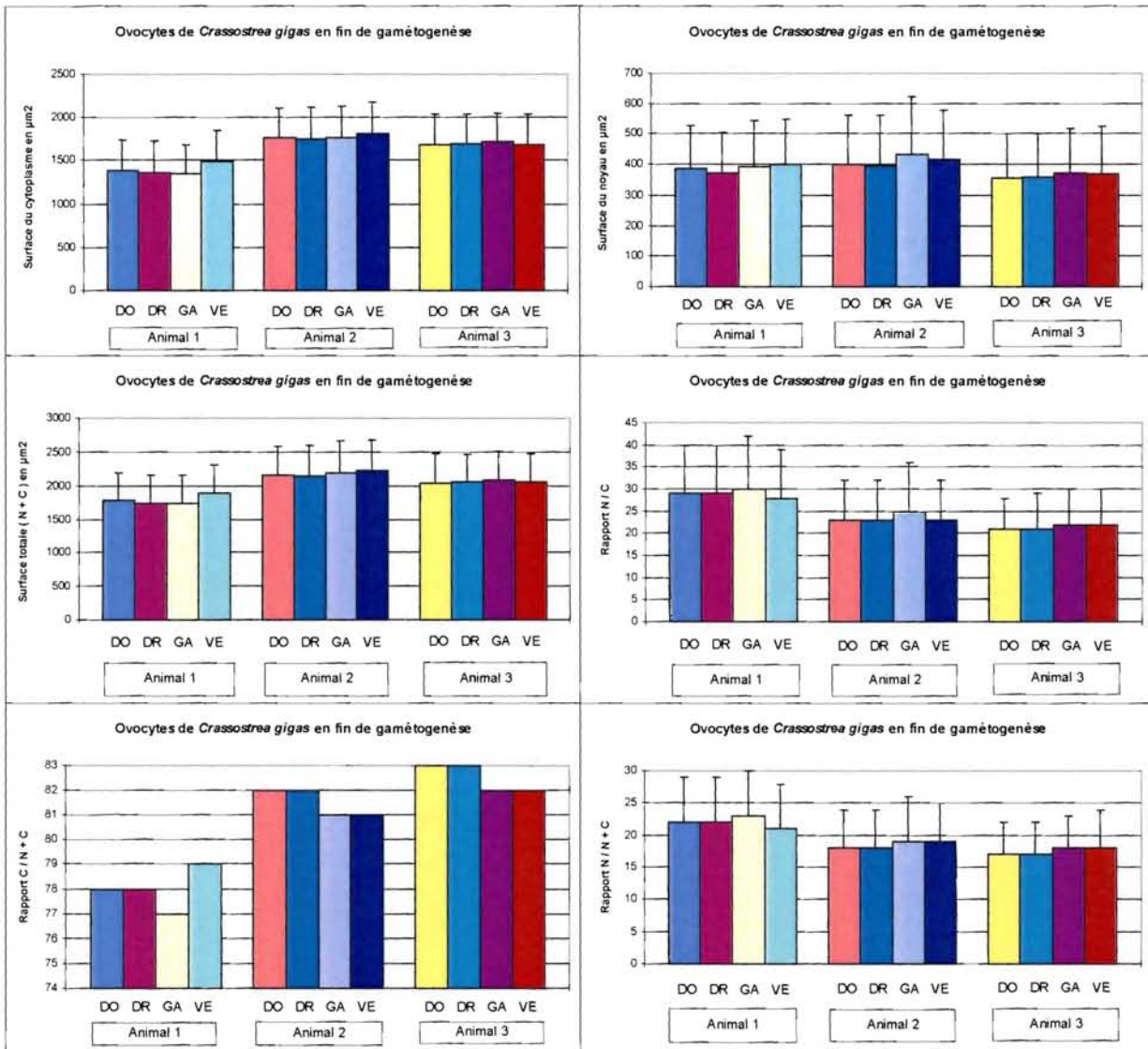


Figure 6 : Représentation graphique des valeurs moyennes obtenues pour chaque zone droite (DR), gauche (GA), Ventrale (VE), et dorsale (DO), chaque animal et chaque critère estimé par analyse d'images. Les écarts-types sont représentés sur les figures.

2.4. DISCUSSION

L'étude du développement de la gamétogénèse chez les Mollusques Bivalves a conduit à l'établissement d'Échelles. Elles permettent une caractérisation descriptive de la gonade en termes de stades. Établies à partir d'observations macroscopiques ou microscopiques, elles fournissent des informations qualitatives ou quantitatives.

L'échelle de Le Dantec (1968) créée pour *Crassostrea gigas* est une échelle macroscopique qui nous apporte une information quantitative. Elle situe nos animaux au stade 3H.

L'échelle de His (1976) établie selon la classification de Le Dantec (1968) pour *Crassostrea gigas*, a été retenue pour notre étude au lieu de celle de Kennedy et Battle (1964) ou de Mann (1979). C'est une échelle microscopique qui apporte des informations qualitatives à partir de nos coupes histologiques. Elle situe nos animaux au stade 3H.

Il est à noter que certaines échelles microscopiques sont réalisées à partir de frottis, ainsi l'échelle de Braley (1984) pour *Tridacna gigas*, tandis que d'autres résultent de couplages d'observations macroscopiques et microscopiques. C'est le cas par exemple des échelles de Chipperfield (1953) de Lubet (1959), de His (1976) et de Cochard et Devauchelle (1993) établies à partir de coupes ou de l'échelle de Lucas (1965) établie à partir de frottis.

Généralement les auteurs utilisent des échelles microscopiques d'évaluation couplées avec un indice gonadique (IG) ou un indice de condition (IC) tels Hayes et Menzel (1981), Peterson et Fegley (1986), Wilson (1987), Guillou et Tartu (1992), voire avec d'autres méthodes (Besnard, 1988 ; Heffernan et al, 1988 ; Paulet et al, 1992 ; Cochard et Devauchelle, 1993 ; Coatanéa et al, 1994 ; Laruelle et al, 1994).

Mais les descriptions de la gonade ou des gamètes en terme de stades apportent des informations entachées de subjectivité. S'y ajoutent des problèmes de sémantique (Brousseau, 1978 ; Barber et Blake, 1991). Aussi les approches couplant informations quantitative et qualitative sont-elles préférables. Ces approches basées sur des méthodes microscopiques sont très variées et traitent de la constitution de la gonade.

Les gamètes peuvent être réparties en classes de taille (Lannan et al, 1980 ; Jones et al, 1986 ; Besnard, 1988).

La gonade peut aussi faire l'objet d'analyses de surfaces, d'épaisseur, de largeur, du diamètre moyen des ovocytes par différentes méthodes telles l'analyse d'image (Heffernan et Walker, 1989), ou la planimétrie (Wilson et Simons, 1985). Lowe et al, (1982), Borrero (1987), Morvan et Ansell (1988), Morales-Alamo et Man (1989), Paulet et al (1992) étudient la constitution de la gonade à partir d'analyses de volumes par la technique de stéréologie (Chalkey, 1943 ; Weibel et al, 1966 ; Bayne et al, 1978).

De nombreux auteurs (Le Dantec, 1968 ; Barber et Blake, 1983 ; Wilson et Simons, 1985 ; Jones et al, 1986 ; Morvan et Ansell, 1988 ; Paulet, 1992 ; Laruelle, 1994) estiment que l'analyse du diamètre moyen des ovocytes ne peut apporter des informations suffisamment précises sur le stade de gamétogénèse et qu'il faut le coupler avec d'autres techniques de quantification : la mesure de surfaces ou d'épaisseur.

Loosanoff et Engle (1940), Galstoff (1964) et Loosanoff (1965) étudient l'épaisseur de la gonade pour évaluer la quantité de ponte. Cette méthode nécessite d'une part que les animaux aient la même taille, le même âge, d'autre part que la section transversale pour l'étude histologique soit réalisée toujours au même niveau du corps (Loosanoff, 1965). Les animaux doivent aussi être originaires du même site, la qualité de l'environnement intervenant directement sur le processus de maturation donc sur l'épaisseur (Loosanoff et Engle, 1942).

Loosanoff (1965) montre sur des coupes transversales effectuées à différents niveaux du corps que l'épaisseur de la gonade chez *Crassostrea gigas* varie d'une région à l'autre, ce que rapportent les travaux de Morales-Alamo et Mann (1989) sur *Crassostrea virginica*.

Sur une coupe longitudinale à travers le corps, le même auteur signale que la gonade de *Crassostrea virginica* est « virtuellement homogène », une masse continue entourant la partie digestive.

Cependant, il n'est pas évident que des régions voisines dans la gonade soient à des stades de développement significativement différents (Millar, 1962 ; Mann, 1979 ; Wilson et Simons,

1985) bien que chez *Ostrea edulis*, les follicules des mêmes individus, avant l'entrée en gamétogenèse de printemps, soient souvent à des stades de développement largement différents (Loosanoff, 1962).

Dans la même étude, celui-ci établit des comparaisons entre les deux espèces: le tissu conjonctif dans lequel croît la gonade est plus épais chez *Crassostrea virginica* où il atteint 3-4 mm que chez *Ostrea edulis* où il ne dépasse pas 1,25mm, pour des huîtres de même taille.

Il est à noter que l'épaisseur, en tant que référence de maturité est aléatoire car elle ne tient pas compte de la densité du tissu gonadique (Galstoff, 1964), aussi faut-il la coupler avec d'autres paramètres de mesures pour apprécier cette maturité.

La mesure d'épaisseur peut se faire sur coupes transversales de la gonade non montées (Loosanoff et Engel, 1940 ; Loosanoff et Nomejko, 1951 ; Hopkins et al 1953 ; Loosanoff, 1965) ou montées (Kennedy et Battle, 1964). Dans ce cas la largeur de la gonade est mise en relation avec celle de la masse viscérale.

La mesure de surfaces de la gonade est utilisée par de nombreux auteurs sur *Crassostrea gigas* (Mori, 1979 ; Lannan, 1980 ; Perdue et al, 1981 ; Perdue, 1983 ; Perdue et Erikson, 1984 ; Allen et Downing, 1986 ; Dinamani, 1987).

Notre approche s'est révélée être un **bon outil d'évaluation de la gamétogenèse de *Crassostrea gigas***. Il offre de réelles perspectives d'étude et de suivi de la maturation ovocytaire des huîtres voire des mollusques bivalves.

Les critères morphométriques retenus pour l'étude sont aptes à quantifier et à rendre compte de l'état d'avancement de la gamétogenèse, en particulier les critères de surface du cytoplasme et de surface totale ainsi que les rapports nucléo-ovocytaires et cytoplasmoovocytaires, en fonction de **repères topographiques nombreux et constants**.

Notre étude tend à montrer l'existence :

1- de variations fortes inter-individuelles de la taille des ovocytes pour des animaux estimés être en fin de gamétogenèse.

2- d'une hétérogénéité intra-gonadique. Le développement gamétogénétique serait plus avancé à l'Extérieur qu'à l'Intérieur de la gonade et de même en région Postérieure qu'en région Antérieure.

3- d'une homogénéité des surfaces des ovocytes dans les zones Droite, Gauche, Ventrale et Dorsale.

L'hypothèse d'un développement gamétogénétique qui se produirait de l'Extérieur vers l'Intérieur et du Postérieur vers l'Antérieur est accréditée par les observations de nombreux auteurs (Lubet, 1959 ; Devauchelle 1999). De même, l'étude de l'organisation des conduits génitaux (Devauchelle, 1999) montre une double arborescence : l'une sur le côté gauche, l'autre côté droit, qui s'origine dans la partie Antérieure de l'animal. Progressivement ces conduits se rassemblent en des conduits de plus en plus gros, les gonoductes débouchent dans le gonopore près de la cavité péricardique.

Des études complémentaires permettront de préciser des **indicateurs de fin de maturité** que notre travail a abordé :

- * les différences de taille entre les ovocytes ectogonadiques et endogonadiques
- * les différences de taille entre les ovocytes situés en région Postérieure et ceux situés en région Antérieure.

* les rapports nucléo ou cytoplasmo - ovocytaires.

Les objectifs de notre étude nous ont contraint à utiliser des animaux en fin de gamétogenèse, celle-ci ayant été appréciée par des échelles d'évaluation citées dans la littérature et des critères morphométriques nouveaux. Nos résultats confortent l'idée d'utiliser cette nouvelle approche pour une étude de toutes les phases de la gamétogenèse.

3. COMPARAISON DE METHODES D'APPRECIATION DES SURFACES DES OVOCYTES EN VUE D'ESTIMER L'ETAT DE GAMETOGENESE

3.1. INTRODUCTION

De nombreux travaux en reproduction des mollusques menés sur la palourde puis la coquille Saint-Jacques et, à moindre degré, sur l'huître comme modèles ont montré la complexité des mécanismes impliqués dans ce phénomène biologique.

Le contrôle artificiel de la reproduction en écloserie, en l'absence de synchronisation des gamétogénèses chez les animaux et donc de l'impossibilité de prévoir les émissions de produits sexuels, rend nécessaire leur suivi individuel et la possibilité de statuer rapidement sur le degré de maturité de leurs gamètes, ceci afin d'intervenir et de récolter.

Aujourd'hui encore, l'imprécision des méthodes d'estimation de l'état de maturité est un obstacle à cette évaluation (Thielley, 1995). Aujourd'hui encore, la méthode de référence pour quantifier et qualifier un stade de maturité est l'analyse sur coupes histologiques de l'ensemble « gonade-glande digestive ». Ces coupes sont généralement colorées soit au trichrome de Masson soit à l'hématoxyline-éosine.

Ce contrôle nécessite aussi le recours à un type de prélèvement non destructif, conservant l'intégrité des fonctions et des processus, lequel prélèvement doit être associé à une coloration simple, rapide et facilement « lisible », car l'appréciation d'un état de maturité si elle exige une bonne connaissance de l'anatomie du développement des gamètes tant dans leur chronologie que dans leur quantification nécessite aussi la mise au point d'un outil prospectif simple de mise en oeuvre et fiable quant à une indication de cet état. Cet outil concerne à la fois une méthode de prélèvement et un type d'observation associé à un mode de coloration.

Pour ce faire, nous avons choisi de comparer trois méthodes de traitement d'échantillons : deux préparations histologiques réalisées à partir de coupes transversales dans la masse « gonade - glande digestive », et une préparation de frottis de cellules prélevées dans la gonade par ponction.

* La confection des préparations histologiques est fortement technicisée et leur délai d'observation avoisine les 48 heures, de plus elle oblige au sacrifice de l'animal. Ces deux préparations sont traitées soit classiquement par la coloration au trichrome de Masson, soit expérimentalement par la coloration au May-Grunwald-Giemsa.

* Une étude expérimentale menée par Thielley (1995) nous a fait retenir la ponction effectuée à l'aide d'une seringue et d'une aiguille hypodermique comme mode d'échantillonnage. Le prélèvement ainsi réalisé sert à la préparation des frottis qui sont, après séchage, colorés au May-Grunwald-Giemsa puis montés classiquement. Ce type de prélèvement non destructif et cette coloration peuvent être réalisés en un temps très court, entre 45 et 60 minutes. Ce gain de temps dans l'appréciation d'un état de maturité permet de suivre « en temps réel » le développement et d'intervenir si nécessaire sur l'animal.

Les comparaisons des modes de prélèvement, des méthodes d'observation et des modes de coloration se fait par analyse d'image au travers de la quantification des surfaces des ovocytes dans la gonade ou sur frottis. Les différentes moyennes sont comparées sur la base des mesures de taille des ovocytes.

La mise en relation de la taille des ovocytes libres et colorés au May-Grunwald-Giemsa sur frottis avec ceux retenus dans les *acini* et colorés soit par le May-Grunwald-Giemsa soit par le trichrome, permet :

* d'une part d'évaluer la possibilité intrinsèque du MGG à remplacer et à apprécier un état de maturité aussi pertinemment que le trichrome.

* d'autre part de s'assurer que cet état de maturité peut être analysé rapidement à partir d'un frottis sec coloré au MGG.

3.2. MATERIEL ET METHODES

3.2.1. Les animaux

L'étude est réalisée sur des femelles matures de 2-3 ans élevées dans des zones de production contrôlées - ferme ostréicole sur l'Aber Wrach - et achetées à l'étal de ce même établissement courant juillet 1998.

Au laboratoire les huîtres sont ouvertes. Une première quantification de maturité est effectuée macroscopiquement par l'échelle de le Dantec (1968) puis microscopiquement par l'échelle de His (1976).

Trente deux femelles au stade 3P-3H sont retenues.

3.2.2. Les techniques de prélèvement et d'observation

Deux techniques de prélèvements sont utilisées dans notre étude pour apprécier un état de maturité.

La ponction est réalisée à l'aide d'une seringue (TERUMO ; 2ml) et d'une aiguille hypodermique (TERUMO ; 0.45*12mm). Elle est effectuée dans la partie postérieure (P) de l'animal, en arrière du muscle adducteur, du côté droit (DR). L'échantillon ainsi prélevé sert à la confection de 4 ou 5 frottis. Le séchage de ceux-ci se fait à température ambiante pendant 15 à 20 mn. Leur coloration est assurée par le May-Grunwald-Giemsa.

La dissection de l'ensemble « gonade-glande digestive » se fait pendant le séchage des frottis et avant leur coloration. Ces ensembles sont fixés dans une solution de Bouin pendant 24 heures puis conservés dans de l'alcool à 60° avant leur traitement. Un échantillon de 5 mm d'épaisseur issu de la partie postérieure est isolé de chaque ensemble. C'est une coupe transversale, perpendiculaire à l'axe antéro-postérieur. Chaque échantillon est inclus dans de la paraffine et débité en coupes de 5µm d'épaisseur par un microtome pour coupes semi-fines.

3.2.3. Les techniques de coloration

Les deux types de préparations sont colorés par deux colorations topographiques :

* Le May-Grunwald-Giemsa, noté « MGG », est une coloration dérivée de la méthode panoptique de Pappenheim . Il met en évidence les affinités tinctoriales des cytoplasmes et des produits de sécrétion. Il est utilisé en Hématologie et en Anatomo-Pathologie pour des frottis. Le May-Grunwald-Giemsa colore le noyau en rose , le cytoplasme en bleu et le nucléole en rouge vif.

* La coloration au trichrome de Masson utilisée est la variante de Goldner (1938), elle est une coloration élective des fibres conjonctives. Elle est utilisée sur des coupes déparaffinées. Le trichrome de Masson colore le noyau en brun noir, le cytoplasme en rose, les sécrétions en rouge ou vert, les muscles en rouge, les hématies en jaune, le collagène en vert franc.

3.2.3.1. Mode opératoire pour les frottis colorés au MGG

Les frottis secs sont recouverts par quelques gouttes d'une solution d'éosinate de bleu de méthylène, colorant neutre, dans de l'alcool méthylique. Au bout d'une minute nous ajoutons

quelques goutte d'eau d'Evian (pH 7.2), agitons pour homogénéiser, laissons reposer une minute puis rinçons abondamment avec une pissette de la même eau. Nous recouvrons alors la lame d'une solution diluée de colorant de Giemsa (5 ml dans 55ml d'eau d'Evian) préparée juste avant son utilisation et laissons agir 20 minutes avant de laver énergiquement toujours avec la même eau.

La coloration des frottis se fait manuellement et individuellement. Les mêmes temps d'exposition, fixés expérimentalement, sont scrupuleusement respectés.

3.2.3.2. Mode opératoire pour les coupes semi-fines

Les coupes semi-fines de chaque animal sont traitées alternativement : sur deux lames qui se suivent, l'une est colorée par le MGG, l'autre par le trichrome de Masson, de manière à restreindre un possible effet « lame ».

La coloration des coupes au May-Grunwald-Giemsa se fait manuellement en regroupant certains animaux, celle au trichrome de Masson, par un automate.

3.2.4. Les techniques d'analyse

Les surfaces des ovocytes sur frottis sont acquises par une application d'un logiciel en analyse d'images « A3 » développée par UNILOG (Grenoble, France) en relation avec Ifremer.

De même une seconde application de ce même logiciel « A1 » nous permet de calculer les surfaces totales des ovocytes à partir de l'acquisition des surfaces des noyaux et des cytoplasmes, à l'intérieur de la gonade.

Un minimum de 30 ovocytes par lame est étudié.

Chaque animal est étudié selon les 3 cas de figure correspondant aux 3 types de lames :

- +1 lame « coupe » colorée au trichrome, analysée par « A1 »
- +1 lame « coupe » colorée au May-Grunwald-Giemsa, analysée par « A1 »,
- +1 lame « frottis » colorée au May-Grunwald-Giemsa, analysée par « A3 »

Ces 3 types de lames servent à comparer :

* d'une part, les techniques de prélèvement et d'observation : ponction / dissection de l'ensemble « gonade-glande digestive », frottis sec / coupe histologique.

* d'autre part les méthodes de coloration : May-Grunwald-Giemsa / trichrome de Masson.

3.2.5. Analyse des données

Les valeurs de surfaces totales des ovocytes dans les acini, colorés soit par le MGG soit par le trichrome, sont comparées individuellement et globalement au travers des ajustements à la loi normale (Test de Kolmogorov-Smirnov ; $\alpha = 0,05$), de leurs moyennes (test de Student ; $\alpha = 0,05$), de leurs distributions (test de Smirnov ; $\alpha = 0,05$).

De même les valeurs de surfaces des ovocytes sur frottis et des ovocytes sur coupes, exprimées en pixel (px.), sont comparées individuellement et globalement après leur transformation respective en μm^2 , par 2 coefficients :

- * cas du logiciel « A3 » : $1\text{px.} = 0,5976\mu\text{m}^2$,
- * cas du logiciel « A1 » : $1\text{px.} = 0,6829\mu\text{m}^2$.

3.3. RESULTATS (Tableaux 7 et 8)

La Planche 4 renseigne sur l'aspect des ovocytes dans les coupes semi-fines (a) ou dans les frottis (b).

3.3.1. Qualité comparée des colorants

Le May-Grunwald-Giemsa met en évidence de façon différentielle les structures tissulaires chez les ovocytes.

Le May-Grunwald-Giemsa peut être utilisé indifféremment sur des coupes déparaffinées ou sur des frottis.

3.3.2. Comparaison des surfaces des ovocytes sur coupes colorées au MGG et au trichrome de Masson

Les valeurs moyennes des surfaces pour les coupes colorées au trichrome et au MGG sont respectivement de 1792,51 et 1848,58 μm^2 , celles des diamètres de 47,8 et 48,5 μm (Tableau 7).

L'analyse des résultats bruts enregistrés pour les 32 animaux montre que les moyennes des surfaces ne sont pas égales (Test de Smirnov ; $\alpha = 0,05$).

L'analyse des données brutes animal par animal, montre que les surfaces des ovocytes colorés au trichrome et au MGG sont comparables pour seulement 17 animaux sur les 32 traités (Test t ; $\alpha = 0,05$) (Tableau 8).

L'analyse portant sur la comparaison des 32 surfaces moyennes des ovocytes examinés à partir des deux types de colorations montre cependant que les moyennes sont égales. Ce n'est pas le cas des variances.

3.3.3. Comparaison des surfaces des ovocytes analysés sur coupes semi-fines et à partir de ponctions montées en frottis colorés au MGG

Les valeurs moyennes des surfaces des ovocytes colorés au MGG sur frottis et des ovocytes colorés au MGG sur coupes histologiques sont respectivement de 1814,84 et 1848,58 μm^2 . Leur diamètre moyen respectif est de 48,0 et 48,5 μm (Tableau 7).

L'analyse des données brutes enregistrés pour les 32 animaux montre que les moyennes de surfaces ne sont pas égales. (Test de Smirnov, $\alpha = 0.05$).

L'analyse des données brutes animal par animal montre que les surfaces des ovocytes analysées sur coupes semi-fines et sur frottis sont comparables pour seulement 12 animaux sur les 32 traités (test t, $\alpha = 0.05$) (Tableau 8).

L'analyse portant sur la comparaison des 32 surfaces moyennes des ovocytes examinés sur coupes et sur frottis montre cependant que les moyennes sont égales. Ce n'est pas le cas des variances.

Tableau 7 : Caractéristiques des surfaces des ovocytes (en px.) acquises au travers des deux techniques d'observation couplées aux deux techniques de coloration.

Techniques	frottis / May-Grunwald-Giemsa	coupe / May-Grunwald-Giemsa	coupe / trichrome de Masson
n =	1121	1180	1218
mini	1317.35	1218	829
maxi	6718.13	6772	5298
étendue	5400.78	5504	4469
médiane	2865.64	2656	2555.5
moyenne	3036.88	2706.95	2624.85
variance	706807.91	319279.57	356025.34
écart-type	840.72	565.05	596.68
variation	0.27683	0.20874	0.22731
asymétrie	1.02114	0.71354	0.67714
aplatis.	4.19991	5.25673	3.87136
moyenne (µm ²)	1814.84	1848.58	1792.51
diam. moy. (µm)	48.0	48.5	47.8

Tableau 8 : valeurs moyennes des surfaces des ovocytes enregistrées pour chaque animal aux travers des différentes techniques d'échantillonnage, d'observation et de coloration.

Type coloration	Type support	May-Grunwald-Giemsa				Trichrome de Masson	
		frottis		coupe		coupe	
		Surface ovo.	px.	µm ² .	px.	µm ² .	px.
ANIMAL n = / traitement							
1	30 / 36 / 42	2563,81 ± 277,63	1532.13	2949,06 ± 542,95	2013.91	2993,07 ± 589,95	2043.97
2	31 / 44 / 32	2975,87 ± 531,45	1778.38	2719,61 ± 510,91	1857.22	3224,84 ± 530,51	2202.24
3	39 / 36 / 35	2758,32 ± 431,26	1648.37	3115,47 ± 590,97	2127.55	2983,94 ± 505,90	2037.73
4	32 / 35 / 35	3019,69 ± 588,93	1804.56	2712,57 ± 433,29	1852.41	2498,49 ± 549,67	1706.22
5	35 / 43 / 40	3233,71 ± 455,73	1932.47	2792,51 ± 458,33	1907.01	2851,15 ± 709,83	1947.05
6	34 / 37 / 38	4866,05 ± 768,80	2907.95	3020,51 ± 452,99	2062.71	2599,53 ± 621,10	1775.22
7	33 / 34 / 36	3400,14 ± 415,55	2031.92	3044,35 ± 506,83	2078.99	3132,94 ± 782,88	2139.48
8	33 / 38 / 34	3418,51 ± 559,12	2042.90	2748,58 ± 512,37	1877.01	2771,91 ± 551,60	1892.94
9	35 / 33 / 40	3686,46 ± 749,16	2203.03	2750,70 ± 529,08	1878.45	2986,35 ± 618,58	2039.38
10	34 / 37 / 39	3031,01 ± 289,61	1811.33	2991,54 ± 734,53	2042.92	2713,56 ± 629,91	1853.09
11	34 / 43 / 38	3631,06 ± 705,98	2169.92	2966,16 ± 498,72	2025.59	3076,74 ± 594,48	2101.11
12	33 / 35 / 39	2666,06 ± 343,46	1593.24	2909,46 ± 571,15	1986.87	2358,00 ± 441,78	1610.28
13	38 / 36 / 34	2012,96 ± 180,94	1202.94	2745,17 ± 543,77	1874.68	2601,44 ± 398,86	1776.52
14	32 / 35 / 38	2802,55 ± 562,27	1674.80	2512,14 ± 417,28	1715.54	2510,76 ± 385,12	1714.60
15	34 / 34 / 42	3418,75 ± 554,37	2043.05	2871,21 ± 515,79	1960.75	2660,14 ± 430,89	1816.61
16	33 / 34 / 49	2616,34 ± 244,08	1563.52	2544,88 ± 440,80	1737.90	2614,65 ± 578,61	1785.54
17	32 / 40 / 38	2614,44 ± 252,10	1562.39	2474,23 ± 552,40	1689.65	2758,21 ± 432,67	1883.58
18	36 / 37 / 34	2993,28 ± 425,71	1788.78	3089,08 ± 583,07	2109.53	3096,71 ± 509,48	2114.74
19	33 / 38 / 38	3218,58 ± 479,30	1923.42	2774,55 ± 656,46	1894.74	2452,29 ± 413,91	1674.67
20	37 / 36 / 32	2594,11 ± 364,05	1550.24	2659,69 ± 502,48	1816.30	2458,44 ± 485,41	1678.87
21	33 / 36 / 48	1735,90 ± 231,61	1037.37	2511,17 ± 527,82	1714.88	2328,50 ± 598,40	1590.13
22	33 / 33 / 33	2641,02 ± 274,19	1578.27	2513,85 ± 504,79	1716.71	2228,15 ± 370,3	1521.60
23	35 / 39 / 37	2644,47 ± 392,83	1580.34	2517,15 ± 487,76	1718.96	2597,95 ± 563,89	1761.85
24	34 / 36 / 35	4799,50 ± 627,76	2868.18	2678,78 ± 432,86	1829.34	3029,91 ± 557,50	2069.13
25	35 / 43 / 36	3855,53 ± 492,81	2304.06	2208,37 ± 513,31	1508.1	2462,86 ± 454,09	1681.89
26	43 / 39 / 41	2516,10 ± 318,33	1503.62	2713,18 ± 502,73	1852.83	2255,68 ± 470,04	1540.40
27	34 / 34 / 36	3682,15 ± 692,55	2200.45	2441,85 ± 448,10	1667.54	2133,69 ± 387,58	1457.10
28	33 / 34 / 43	2981,36 ± 386,46	1781.66	2469,68 ± 445,49	1686.54	2356,77 ± 293,24	1609.44
29	39 / 36 / 37	4014,50 ± 723,00	2399.07	2538,58 ± 313,58	1610.67	2779,89 ± 565,72	1898.39
30	35 / 37 / 39	2566,22 ± 578,72	1533.57	2424,68 ± 526,23	1655.81	2232,36 ± 366,47	1524.48
31	36 / 35 / 36	2351,31 ± 297,41	1405.14	2437,03 ± 417,74	1664.25	2417,89 ± 399,95	1651.18
32	39 / 37 / 44	3461,69 ± 440,30	2068.71	2627,24 ± 547,68	1794.14	2110,70 ± 392,38	1441.40
moyenne		3036,88 ± 502,41	1814.84	2706,95 ± 565,05	1848.58	2624,85 ± 596,68	1792.51

PLANCHE 4

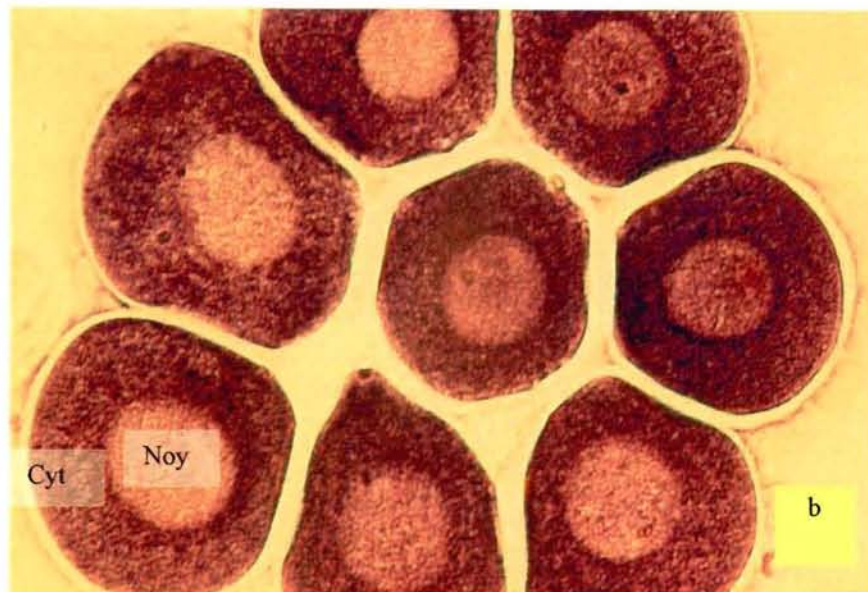
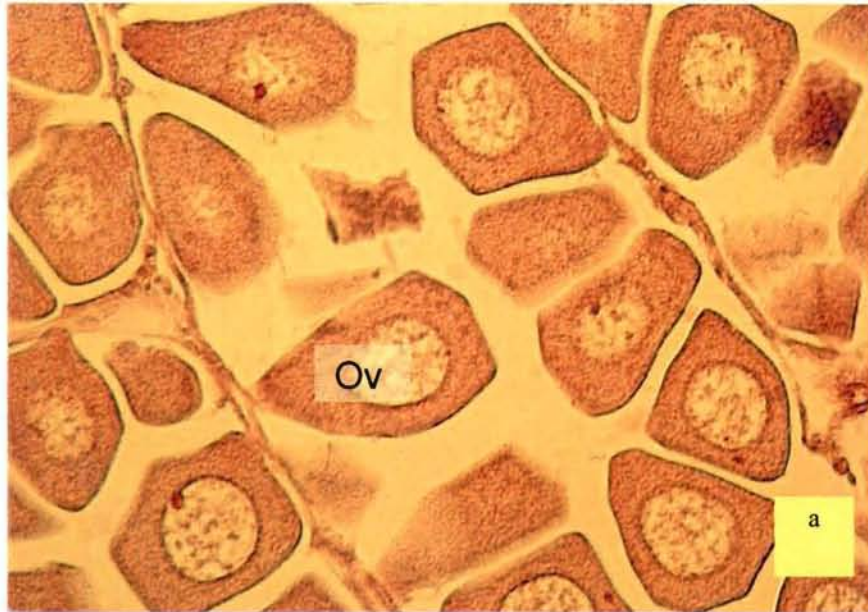


Planche 4 a : ovocytes dans coupes semi-fines

Planche 4 b : ovocytes dans frottis (Cyt : cytoplasme ; Noy : noyau)

3.4. DISCUSSION

La littérature ne fait pas état de résultats équivalents. Les deux types de coloration permettent une lecture aisée des structures qui nous intéressent et une acquisition facile des paramètres de mesure par le logiciel d'analyse d'images.

Nos résultats montrent qu' à l'échelle d'une population les ponctions suivies de frottis colorés au MGG permettent d'obtenir une appréciation comparable des critères de surface des ovocytes que les prélèvements de tissus frais fixés, coupés, colorés au MGG ou au Trichrome et montés sur lames. L'état de la gamétogenèse d'une population peut donc être appréciée très rapidement, entre 45 et 60 minutes après la ponction.

Mais à l'échelle de l'individu, il convient de noter qu' il n'y a pas de correspondance entre les résultats issus des trois méthodes testées.

Les valeurs trouvées, au delà des comparaisons des méthodes, signifient deux choses :

- * que la ponction, technique de prélèvement non destructive pour l'animal des ovocytes dans la gonade, permet d'accéder directement aux cellules sexuelles en conservant leur intégrité membranaire et structurelle
- * que le frottis sec réalisé à partir de cette ponction et coloré au May-Grunwald-Giemsa permet d'évaluer sûrement le développement des ovocytes dans la gonade et donc de suivre si besoin est la maturation dans ses derniers stades - l'étude ayant été réalisée sur des animaux en fin de maturité.

Il serait intéressant de prolonger cette étude en réalisant une comparaison entre la taille des ovocytes prélevés par ponction et la taille des ovocytes conservés à l'intérieur de la gonade, ceci à différents stades de maturité, afin de suivre le cycle de reproduction de populations d'huîtres.

4. DYNAMIQUE DE L'EMISSION DES GAMETES

4.1. INTRODUCTION

Les processus d'ovogenèse et de spermiogenèse chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* sont très mal connus, de même ceux concernant l'émission des gamètes.

Dans la littérature classique, l'étude de l'émission est abordée sous différents registres :

* Un registre « physiologique » où l'émission est reliée à la coordination complexe des différents organes : branchies, système nerveux, manteau, muscle adducteur (Galtsoff, 1964), où la quantité de produits est corrélée à des indices gonadiques (I.G.) ou des indices de condition (I. C.), dont les modes de calcul sont très variés.

* Un registre « écologique » où la reproduction en général est étudiée sous l'angle de l'adaptation incluant la disponibilité en nutriments, la fréquence des pontes, la fécondité (Thompson et al, 1999, Devauchelle, 2000), le calendrier de pontes (Ingle, 1951 ; Kennedy et Battle, 1964 ; Butler, 1965 ; Loosanoff, 1965 ; Sakuda, 1966 ; Andrews, 1979 ; Hayes et Menzel, 1981 ; Kennedy et Krantz, 1982).

Ces recherches sont généralement menées sous l'angle de l'étude des populations. Or les travaux en génétique (Devauchelle *et al.*, 1997 ; Gérard *et al.*, 1997) nécessitent aujourd'hui une approche « individuelle » afin de mieux comprendre et maîtriser le processus de reproduction qui inclue l'émission.

Un premier travail (cf.§ 2 de ce papier) sur la gonade femelle de *C. gigas* en fin de maturation nous a permis de dresser une « cartographie » de son développement : développement spatial de la zone gonadique par rapport à des références anatomiques, développement spatial des ovocytes par l'intermédiaire de critères morphométriques.

Ce travail sur le processus d'émission des gamètes mâles et femelles revêt deux aspects : un aspect dynamique, un aspect prédictif.

* L'aspect dynamique est étudié par l'observation des variations individuelles des émissions, dans une population « mise à pondre » par lots, au mois de juillet, mois où les indices de condition connaissent un maxima pour l'espèce (Ruiz et al., 1991, Lango-Reynoso, 1999). Ces variations sont étudiées en fonction de régions et de zones préalablement définies, afin de statuer sur l'homogénéité ou l'hétérogénéité de la gonade en cours ou en fin d'émission.

* L'aspect prédictif est traité :

- d'une part, par la quantification de l'intensité et de la variabilité de ces émissions et ce par deux méthodes :

. le calcul d'un indice de condition (I.C.) effectué sur les animaux en fin d'expérimentation,

. l'acquisition par analyse d'image de rapports de surfaces obtenus après définition préalable de critères de quantification.

- d'autre part, par l'étude de la pertinence des critères à évaluer une émission. Celle-ci est appréciée en les comparant entre eux et en les reliant aux caractéristiques de temps des émissions.

Cette étude aboutit à l'établissement d'une « cartographie » des gonades pendant et/ou juste après le relargage des produits sexuels. Des mesures de surface réalisées sur des coupes histologiques à des niveaux morphologiques bien identifiés permettent de répondre à différentes questions :

* Dans les conditions de « ponte » artificielle, une huître « relargue »-t-elle la totalité ou seulement une partie de ses produits ? En effet, une huître peut pondre à plusieurs reprises dans une saison, de plus la présence sur une coupe histologique de différentes lignées germinales dans le tissu gonadique au cours de la maturation laisse à penser que les émissions ne peuvent être que partielles et non totales.

* Comment le tissu gonadique est-il mobilisé pendant l'émission ? La mobilisation concerne-t-elle toutes les régions et/ou toutes les zones de la même manière à la fois et ce, chez les animaux des deux sexes ?

* Un Indice de condition peut-il permettre de prédire certaines caractéristiques des émissions de gamètes.

* Existe-t-il une spécificité des fonctionnements et des comportements reproductifs liée au sexe chez l'huître *C. gigas*?

4.2. MATERIEL ET METHODES

4.2.1. Matériel biologique

L'étude est réalisée avec des huîtres mâles et femelles de 2-3 ans d'âge élevées dans un établissement ostréicole, sur l'Aber Benoît (Nord-Finistère, Bretagne, France), et achetées à l'étal de l'ostréiculteur durant le mois de juillet 1997.

4.2.2. Traitement des échantillons

A l'arrivée au laboratoire, les huîtres sont préalablement lavées puis stockées à sec le temps de la préparation du bac d'émission. Le bac de ponte est un bac plat rectangulaire (210 * 60 cm.), de faible hauteur d'eau (10 cm.) et de couleur blanche.

4.2.2.1. Etude des conditions et des caractéristiques des émissions

Les émissions sont provoquées par l'intermédiaire de chocs thermiques : les huîtres sont plongées dans une eau de mer à 27-28° C, maintenue à ce niveau de température par une résistance électrique durant le temps accordé à l'expérimentation.

Les chocs thermiques se doublent parfois de chocs gamétiques : des gamètes de l'un ou l'autre sexe, obtenus par scarification après sacrifice d'un animal, sont répandus dans la masse d'eau. Les deux types de chocs sont délivrés soit simultanément soit séparément selon le degré de réponse des animaux (temps de conditionnement).

Les animaux sont stimulés une première fois soit thermiquement soit thermiquement et gamétiquement.

Ceux qui répondent aux stimuli sont isolés dans des béciers afin de surveiller les émissions et d'empêcher une diffusion de produits sexuels à l'intérieur de la masse d'eau où sont placés les autres animaux.

Ceux qui ne répondent pas ou répondent mal sont stimulés une deuxième ou une troisième fois. En fin de journée les animaux sont écartés pour toute manipulation. Les animaux sont renouvelés tous les jours afin de contrôler les effets des stimuli et les réponses individuelles des animaux. L'expérimentation ne se fait que sur un faible nombre d'animaux à la fois (6-8) afin d'assurer une surveillance efficace des flux d'émission et de pouvoir intervenir rapidement sur les animaux en cours d'expulsion de gamètes.

Les temps de réponses aux différents stimuli, les temps octroyés aux animaux en cours d'émission et les temps de sacrifice des animaux, ces deux derniers temps pouvant coïncider, sont notés. En effet, les émissions de gamètes sont variables d'un animal à l'autre et de ce fait la durée d'émission.

4.2.2.2. Caractéristiques des animaux

Au sacrifice une description visuelle de la gonade est effectuée. Les caractéristiques morphométriques relatives à la hauteur de la coquille, au poids frais de chair, au poids frais de la gonade additionnée de la glande digestive et à celui de la coquille, sont également enregistrés. A partir de ces caractéristiques, un « indice de condition » (I.C.) de la gonade en cours ou en fin d'émission est calculé pour chaque animal :

$$\text{I.C.} = \text{poids frais « gonade + glande digestive »} / \text{poids frais chair} * 100.$$

Cet indice est calqué sur le modèle des indices de condition utilisés pour évaluer l'état de maturité de la gonade. Ce nouvel indice va nous permettre de nous situer par rapport à des animaux repérés en fin de maturité et étudiés précédemment.

Sept femelles et neuf mâles ayant émis leurs gamètes font l'objet de prélèvements de tissus en vue d'analyses.

4.2.2.3. Préparation des coupes histologiques

En fin d'expérimentation, les ensembles « gonade + glande digestive » sont fixés individuellement dans une solution de Bouin pendant 24 heures puis lavés et conservés dans une solution d'éthanol à 60° jusqu'à la réalisation des coupes transversales. Ces coupes transversales faites au scalpel sont définies comme étant le plan perpendiculaire à l'axe antéro-postérieur du corps de l'huître. Elles aboutissent à isoler, pour chaque « gonade », 3 segments de 4-5 mm d'épaisseur, séparés eux-mêmes par 4 -5 mm.

Trois régions sont ainsi déterminées : une région « Antérieure » au niveau des palpes labiaux, une région « Médiane » en avant de la jonction des palpes labiaux et des branchies et une région « Postérieure » en arrière de la cavité péricardique.

Pour chaque animal, ces trois régions sont placées individuellement dans des histocettes, la face postérieure visible. Ils subissent alors une phase d'imprégnation par la paraffine après une série de bains d'éthanol et de toluène. Chaque échantillon ainsi traité est alors orienté dans un moule à paraffine, toujours la face postérieure visible. L'inclusion réalisée, chaque région ainsi isolée est découpée en sections de 5 µm d'épaisseur réalisées au microtome pour coupes semi-fines. Celles-ci sont colorées au trichrome de Masson selon la technique décrite par Gabe (1968), la face antérieure visible, puis montées dans une résine synthétique (Entellan).

Après un examen à la loupe binoculaire une lame illustrant chaque région est sélectionnée, chaque animal est représenté par trois lames.

4.2.2.4. Déroulement de l'analyse quantitative

Les préparations histologiques font l'objet de mesures automatiques par une application (A2) du logiciel UNILOG (Grenoble, France). Chaque lame est observée au grossissement 16. Chaque animal est analysé au travers de ses trois régions -Antérieure, Médiane, Postérieure - et de trois de ses quatre zones. En effet, chaque région est « découpée » à travers quatre zones : Droite, correspondant à la valve droite, Gauche, correspondant à la valve creuse, Ventrale, correspondant à la zone des palpes labiaux et des branchies, Dorsale, correspondant à la zone opposée. La zone Ventrale non occupée en région Antérieure est écartée de l'analyse statistique.

L'étude de l'homogénéité et/ou de l'hétérogénéité de la gonade en cours ou en fin d'émission est réalisée pour chaque animal, par le biais de rapports de surfaces des plans de coupe aux différents lieux indiqués.

Trois rapports de surface sont étudiés qui représentent nos critères de quantification de l'intensité et de la variabilité des émissions :

- le rapport de surfaces des gamètes à la zone analysée dans le plan de coupe,
- le rapport de surfaces des gamètes à la gonade,
- le rapport de surfaces de la gonade à la zone analysée dans le plan de coupe.

Le terme « zone analysée dans le plan de coupe » recouvre ici le tissu germinale soit les gamètes et la paroi des acini, le tissu interstitiel lorsqu'il existe, le « vide » laissé par l'expulsion des gamètes ainsi que les canaux évacuateurs, généralement dilatés et partiellement ou totalement remplis de gamètes. La zone s'étend entre le bord interne du manteau et la limite externe du tissu digestif.

Le terme « gonade » recouvre lui, le tissu germinale c'est à dire les gamètes et la paroi des acini et les canaux évacuateurs diversement remplis de gamètes. Lorsque l'animal est en fin de maturation la « gonade » se superpose pratiquement à la « zone » car le tissu interstitiel est très réduit, voire inexistant. En cours d'émission, le « vide » créé par l'émission des gamètes constitue la différence majeure entre les deux entités.

Le terme « gamètes » désigne les gamètes dans les acini, la paroi des acini, les gamètes présents dans les canaux évacuateurs.

4.2.3. Analyse des paramètres

Nous pouvons définir à partir des trois rapports, gamète/zone, gamète/gonade et gonade/zone, trois taux de remplissage ou de vidange de la gonade relatifs à un moment donné de l'émission par région et par zone pour chaque animal.

L'effet « animal » ainsi que les effets « région » et « zone » et les inter-effets « région-zone », sont étudiés à l'aide de l'analyse de variance ANOVA. Dans le cas de l'effet animal, le test de Newman-Keuls ($\alpha=0.05$) nous permet de comparer les animaux entre eux par le biais de leurs moyennes obtenues pour chaque critère de quantification (rapport de surface) et donc leur degré respectif de remplissage ou leur corollaire, leur taux d'émission.

Les trois critères d'évaluation sont discutés en fonction de leur pertinence à indiquer un état d'émission chez un animal (tests de corrélation).

Parallèlement ces taux de remplissage sont mis en relation avec les I.C. calculés en fin d'expérimentation (tests de corrélation).

Ces I.C. sont aussi mis en relation avec les temps de réponse aux stimuli et les durées d'émission octroyées à chaque animal (tests de corrélation).

4.3. RESULTATS

4.3.1. Les observations photographiques

La planche 5 montre des gonades de *C. gigas* femelles. La photo 5a, se réfère à une gonade pleine d'ovocytes en fin de gamétogenèse. La photo 5b illustre l'évacuation des ovocytes qui sont libres dans les acini ou poussés vers le canal évacuateur. La photo 5c montre des gamètes résiduels libres dans les acini et la présence de cellules sexuelles en cours de croissance positionnées en périphérie des acini.

PLANCHE 5

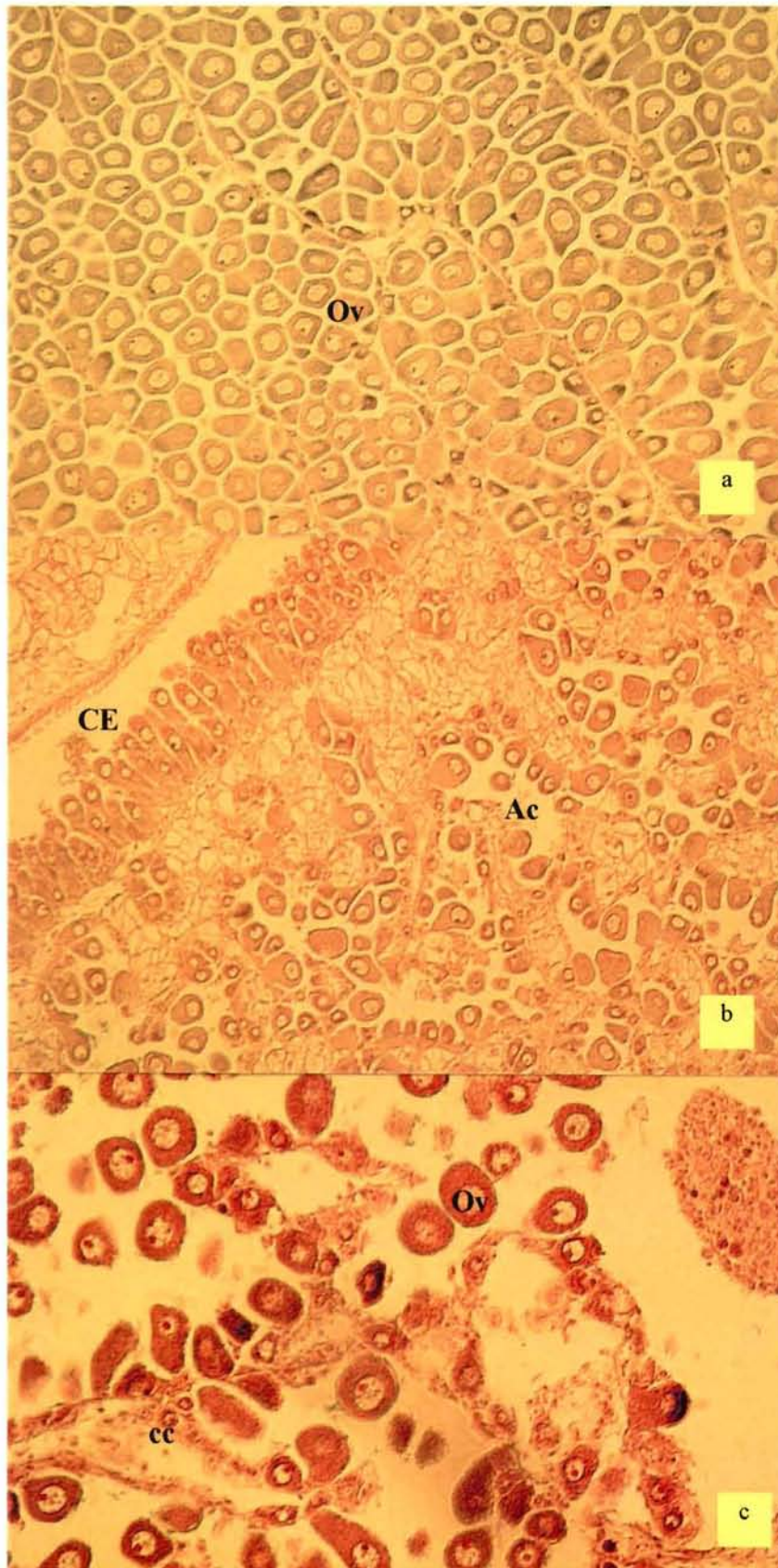


Planche 5 a : ovocytes (Ov) dans gonade en fin de maturité

Planche 5 b : ovocytes dans acini (Ac) et canal évacuateur (CE)

Planche 5 c : ovocytes libres (Ov) dans gonade en cours d'émission et présence de cellules sexuelles (cc).

PLANCHE 6

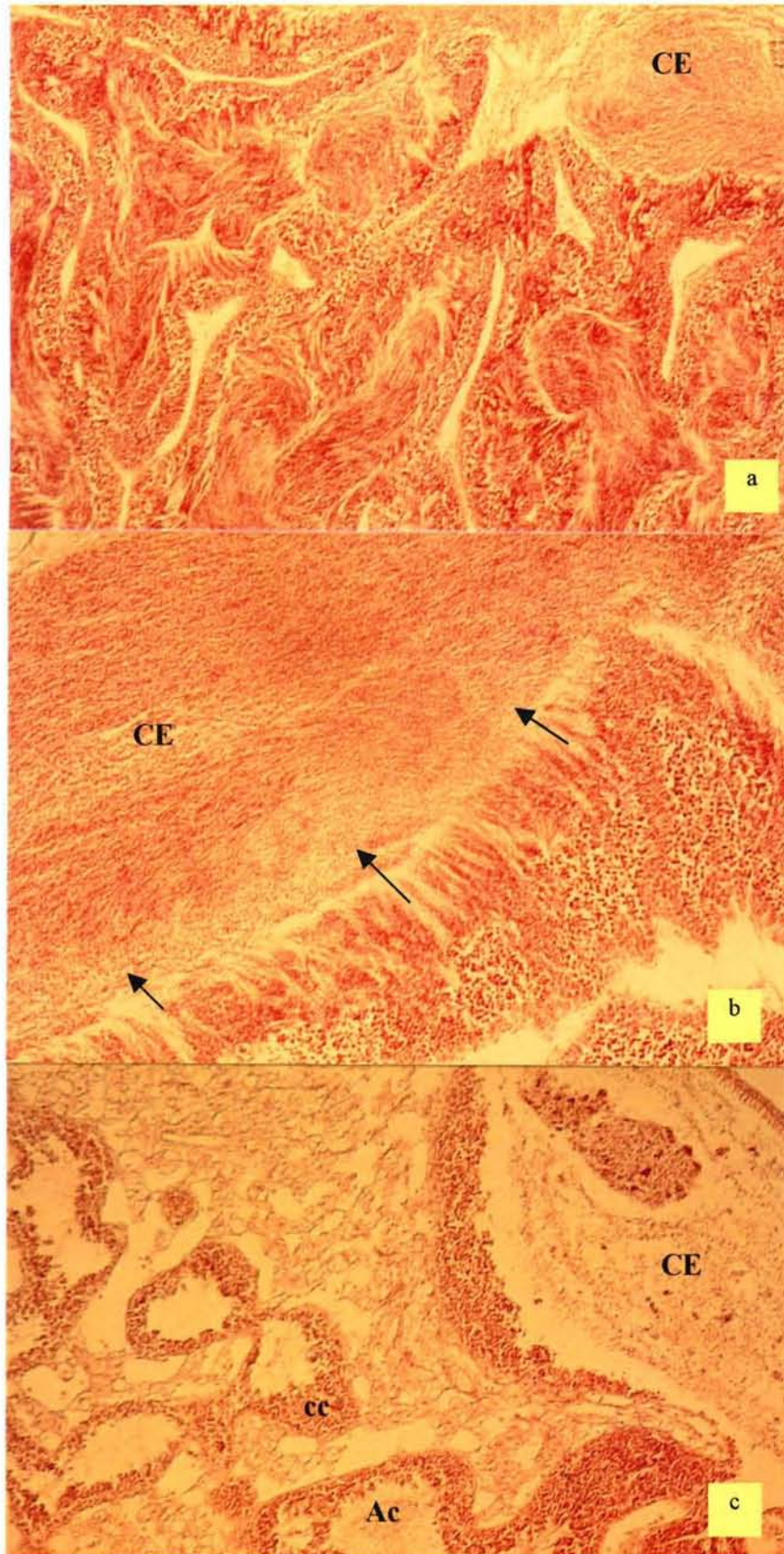


Planche 6 a : gonade mâle en fin de gamétogenèse et en début d'émission (CE : canal évacuateur)

Planche 6 b : gonade mâle en cours d'émission avec les flux gamétiques (flèches)

Planche 6 c : gonade mâle en fin d'émission, présence de cellules sexuelles (cc) dans les acini(Ac).

PLANCHE 7

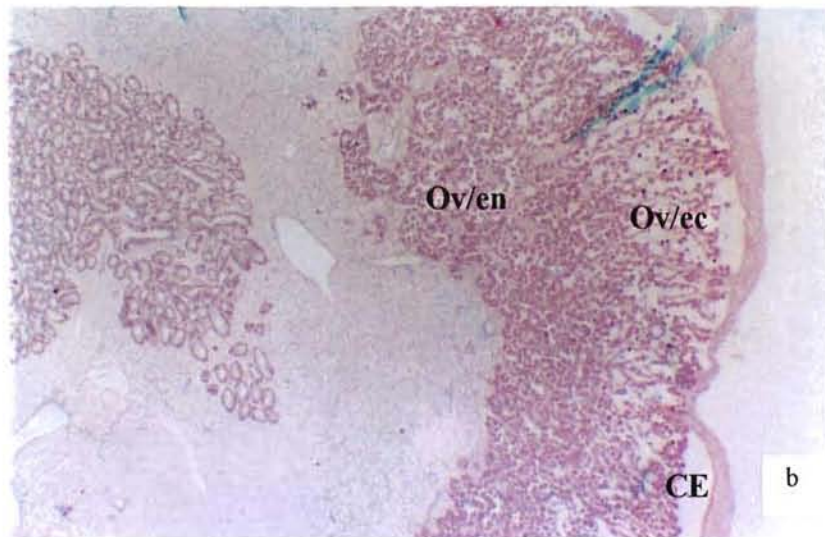
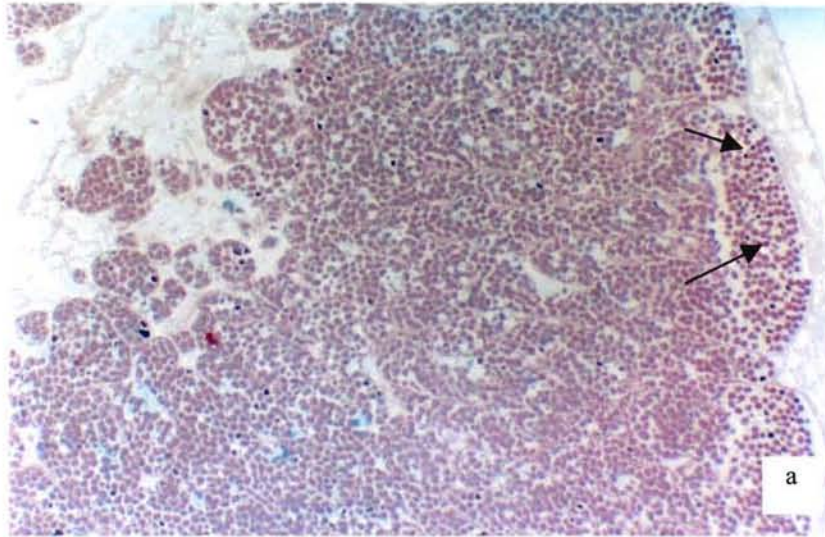


Planche 7 a : flux d'ovocytes (flèches) dans gonade en début d'émission

Planche 7 b : ovocytes ectogonadiques (Ov/ec) et endogonadiques (Ov/en) ; canal évacuateur (CE).

La photo 5c montre en outre qu'après l'émission des gamètes les acini contiennent quelques cellules sexuelles en cours de développement.

La Planche 6 nous montre des gonades d'huîtres mâles en fin de gamétogenèse après que les animaux aient subi un choc thermique et/ou gamétique. La photo 6a correspond à un animal au début de l'émission des gamètes, la photo 6b montre le milieu d'émission, la photo 6c montre la fin de l'émission.

Ces clichés font apparaître des flux gamétiques dans les canaux évacuateurs et la présence de cellules sexuelles mâles à différents stades, la désorganisation du tissu interstitiel connu pour être un tissu de réserve au dépend duquel se développent les cellules sexuelles. La photo 6c montre en outre qu'après l'émission des gamètes les acini contiennent de nombreuses cellules sexuelles mâles en cours de développement.

La Planche 7 montre l'évolution de l'état de la gonade femelle en cours d'émission des gamètes. Les flux d'ovocytes arrondis sont nettement visibles dans les canaux évacuateurs sur la photo 7a. La photo 7b illustre bien que les ovocytes endogonadiques sont expulsés en dernier lieu.

4.3.2. Les variations inter-individuelles

4.3.2.1. Chez les femelles

Il existe des différences hautement significatives entre les animaux. Ces différences s'expriment au travers des trois critères d'évaluation du taux de remplissage (Tableau 9) (ANOVA ; $p < 0.01$).

Tableau 9 : Synthèse de tous les effets en fonction des critères d'évaluation du taux de remplissage (femelle *C. gigas*).

Synthèse de tous les effets ; plan : (fem.stat)			
1-ANIMAL, 2-REGION, 3-ZONE			
CRITERES	gamète / zone	gamète / gonade	gonade / zone
	niveau p	niveau p	niveau p
Animal	2,5743 E - 05	6,116 E - 09	0.00896007
Région	0.21732883	0,04654764 *	0.72670728
Zone	0.25846934	0.21557254	0.3660228
Région*Zone	0.74216855	0.90637696	0.76357269

Ces différences sont parfois faibles : les animaux 2, 3, 4, 5 et 6 sont à des niveaux d'émission équivalents, l'animal 1 est le plus vide, l'animal 7, le plus plein (test de Newman-Keuls; $\alpha = 0.05$).

L'animal 2 est celui qui a la plus grande surface occupée par la gonade malgré un niveau de vidange des gamètes comparable aux autres individus (Tableau 10), (Figure 6).

Tableau 10 : Taux de remplissage moyen (*100) obtenu par chaque critère d'évaluation pour chaque animal (femelle *C. gigas*).

FEMELLES	Critères d'évaluation (Moyennes * 100)			
	Animal	gamète / zone	gamète / gonade	gonade / zone
1		30,79	41,24	73,45
2		47,45	51,52	93,11
3		41,9	52,33	78,91
4		45,62	56,69	79,01
5		46,64	55,84	82,69
6		47,47	55,24	84,92
7		64,38	74,44	86,14

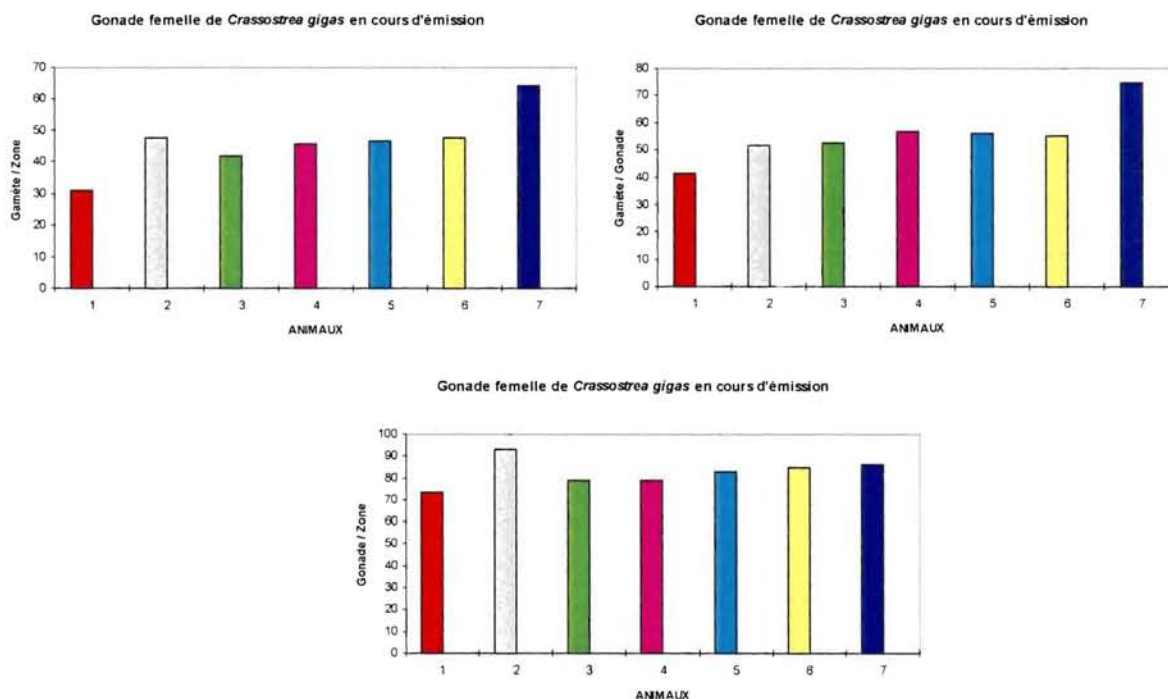


Figure 6 : Représentations des taux de remplissage moyen (*100) obtenus par chaque critère d'évaluation pour chaque animal (femelles *C. gigas*), après l'arrêt de l'émission des gamètes.

4.3.2.2. Chez les mâles

Il existe des différences très hautement significatives dans les niveaux d'émission entre les animaux. Ces différences s'expriment au travers des trois critères d'évaluation du taux de remplissage (Tableau 11), (ANOVA ; $p < 0.001$).

Tableau 11 : Synthèse de tous les effets en fonction des critères d'évaluation du taux de remplissage (mâles *C. gigas*), calculé après l'arrêt de l'émission des gamètes.

Synthèse de tous les effets ; plan : (mâl.stat)			
1-ANIMAL, 2-REGION, 3-ZONE			
CRITERES	gamète / zone	gamète / gonade	gonade / zone
	niveau p	niveau p	niveau p
Animal	7,439 E - 28	3,5714 E - 26	5,2944 E - 21
Région	0.27870885	0.10151578	0.46844289
Zone	0.61912894	0.60969388	0.95623523
Région*Zone	0.06509881	0.40513188	0.04748229 *

L'amplitude des variations du taux de remplissage entre les animaux, exprimée au travers des trois critères, est parfois très importante : les six premiers animaux ont le moins émis, les deux derniers sont les plus vides (test de Newman-Keuls ; $\alpha = 0.05$), (Tableau 12), (Figure 7).

Tableau 12 : Taux de remplissage moyen (*100) obtenu par chaque critère d'évaluation pour chaque animal (mâles *C. gigas*), calculé après l'arrêt de l'émission des gamètes.

MALES Animal	Critères d'évaluation (Moyennes * 100)		
	gamète / zone	gamète / gonade	gonade / zone
1	81,46	86,41	94,23
2	84,98	87,48	97,13
3	92,91	95,38	97,39
4	79,85	86,12	92,66
5	92,12	95,04	96,89
6	78,02	82,84	94,04
7	60,44	70,28	85,33
8	40,63	58,18	68,74
9	38,77	61,56	62,48

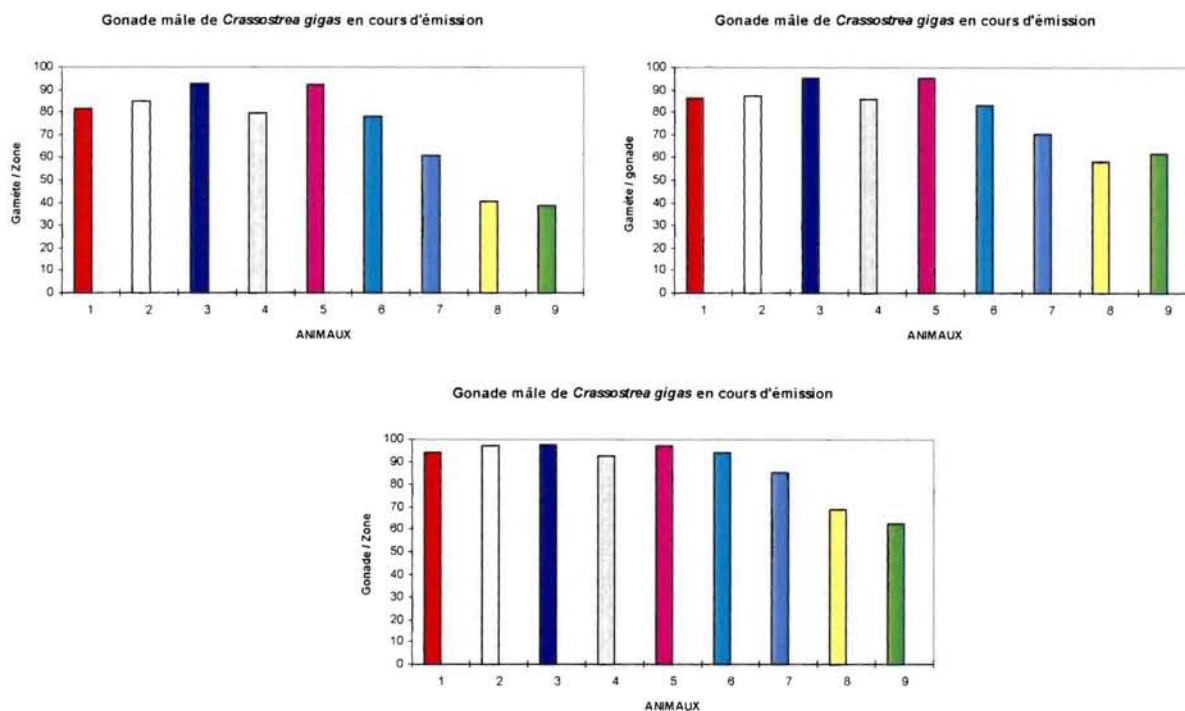


Figure 7 : Représentations des taux de remplissage moyen (*100) obtenus par chaque critère d'évaluation pour chaque animal (mâles *C. gigas*), calculé après l'arrêt de l'émission des gamètes.

Les animaux des deux sexes, supposés en fin de maturation et répondant à des stimuli sont dans des états très variables du point de vue de la vidange des gonades lorsque s'arrête l'émission des gamètes.

4.3.3. Les variations intra-individuelles

4.3.3.1. Chez les femelles

Toutes les zones étudiées sont pareillement concernées par l'émission : elles se vidangent identiquement dans un laps de temps donné (ANOVA ; $p < 0.05$), (Tableau 9).

Il existe un effet « région » au travers du critère « gamète / gonade » ($p = 0.046$). Il tendrait à montrer une vidange légèrement plus importante en région Médiane.

4.3.3.2. Chez les mâles

Toutes les régions et toutes les zones sont identiquement mobilisées par l'émission des gamètes : elles se vidangent de la même manière dans un laps de temps donné (ANOVA ; $p < 0.05$), (Tableau 11).

Il existe un inter-effet liant région et zone au travers du critère « gonade / zone » ($p = 0.047$).

Concernant l'émission des gamètes nous notons un fonctionnement spécifique à chaque sexe.

4.3.4. Etude des critères d'évaluation

4.3.4.1. Chez les femelles

Les critères « gamète / gonade » et « gamète / zone » donnent la même appréciation du niveau de vidange dans l'animal ($r = 0,97$). Si nous avons beaucoup de gamètes dans la gonade, nous avons beaucoup de gamètes dans la zone.

Pour les femelles, le taux de remplissage des animaux est moins bien évalué par le critère « gonade / zone ». Les différences entre animaux sont moins marquées à travers ce critère (Figure 6).

4.3.4.2. Chez les mâles

Les critères « gamète / gonade » et « gamète / zone » donnent la même appréciation du niveau de vidange dans l'animal ($r = 0,996$). Si nous avons beaucoup de gamètes dans la gonade, nous avons beaucoup de gamètes dans la zone.

De même les critères « gonade / zone » et « gamète / zone » ($r = 0,972$) : plus nous avons de surface occupée par la gonade dans la zone, plus nous avons de gamètes dans cette zone (Figure 7).

Les critères « gamète / gonade » et « gonade / zone » évoluent aussi en parallèle : plus nous avons de gonade dans la zone, plus nous avons tendance à avoir des gamètes dans la gonade ($r = 0.935$).

Il est à noter que le critère « gamète / zone » enregistre les plus grandes variations du taux de remplissage. De ce fait la lisibilité de l'émission est meilleure.

Les critères « gamète / zone » et « gamète / gonade » sont les plus représentatifs de la présence de gamètes chez un animal quelque soit son sexe : ils donnent une bonne appréciation du niveau de remplissage.

4.3.5. Etude des indices de condition

4.3.5.1. Chez les femelles

Nous observons une diminution de l'indice de condition après l'arrêt de l'émission des gamètes. Si l'on compare l'Indice de Condition d'huîtres femelles non stimulées, mesuré après l'arrêt de l'émission des gamètes, on constate que l'IC a diminué de 10% : En effet, dans le premier cas, l'IC est de 52.07 (Tableau 13), et dans le second cas de 42.63 (Tableau 14). Cette diminution est la conséquence de la vidange partielle observée chez les animaux.

Tableau 13 : Caractéristiques des femelles *C. gigas* en fin de maturation non stimulées.

Femelles de <i>Crassostrea gigas</i> en fin de maturation						
Animal	stade	Caractéristiques morphométriques				I.C.
		h. coquille	pds fr.chair	pds.fr.go+gld	pds.fr. coquille	
1	3H	54,70	24,45	13,78	123,96	56,36
2	3H	39,40	18,02	10,20	88,02	56,60
3	3H	44,20	22,70	12,57	71,14	55,37
4	3H	40,40	12,94	5,20	65,88	40,19 *
5	3H	43,70	18,89	9,79	79,63	51,83 *
6	3H	44,50	17,66	9,41	94,65	53,28 *
7	3H	38,00	17,43	10,51	103,34	60,30
8	3H	40,80	15,92	7,25	99,17	45,54 *
9	3H	44,30	9,92	4,88	72,54	49,19 *

Tableau 14 : Caractéristiques des femelles *C. gigas* après l'arrêt de l'émission des gamètes.

Animal	h.coquille	pds. fr.chair	pds.fr.go+gld.	pds.fr.coquille	I.C.
1 (1)	47,1	32,39	15,17	200,45	46,84
2 (2)	51	16,18	7,35	106,53	45,43
3 (3)	40,9	11,55	5,4	85,68	46,75
4 (0)*	32	10,76	4,61	58,43	42,84
5 (4)	37,1	9,46	3,79	76,74	40,06 *
6 (5)	38,5	11,88	5,41	81,01	45,53 *
7 (6)	31,7	9,47	3,64	52,54	38,44 *
8 (7)	38,1	7,11	2,5	82,93	35,16 *

L'animal 4 a été retiré de l'analyse statistique.

4.3.5.2. Chez les mâles

La vidange partielle des gamètes mâles s'accompagne d'une baisse conséquente de l'indice de condition, plus de 10% en moyenne Si l'on compare l'Indice de Condition d'huîtres femelles non stimulées, mesuré après l'arrêt de l'émission des gamètes , dans le premier cas, l'indice gonadique est de 53.49 (Tableau 15), dans le second cas, il est de 42.46 (Tableau 16).

Tableau 15 : Caractéristiques des mâles *C. gigas* non stimulés en fin de maturation.

Mâles de <i>Crassostrea gigas</i> en cours de maturation						
Animal	stade	Carastéristiques morphométriques				I.C.
		h. coquille	pds. fr. chair	pds. fr. go+gld	pds. fr. coquille	
1	3H	41,90	15,41	8,40	71,71	54,51
2	3H	34,40	11,99	6,72	58,2	56,04
3	3P-3H	44,40	10,42	5,36	74,48	51,43
4	3H (en ponte?)	31,50	8,41	3,63	97,50	43,16
5	3H	52,70	22,62	14,16	92,30	62,59
6	3H	40,00	13,53	7,20	75,15	53,21

Tableau 16 : Caractéristiques des mâles *C. gigas* après l'arrêt de l'émission des gamètes.

Animal	h.coquille	pds.fr.ch.	pds.fr.g.+gl.	pds.fr.coq.	I.C.
1	38,20	11,11	4,37	64,26	39,33
2	34,60	10,09	4,63	63,85	45,88
3	37,30	13,80	7,12	52,48	51,59
4	37,30	12,48	5,60	69,50	44,87
5	43,20	15,88	7,69	79,08	48,42
6	37,80	9,74	3,72	78,69	38,19
7	32,10	9,47	2,85	52,78	30,09
8	30,80	6,35	2,63	49,70	41,41
9	39,60	11,97	5,08	80,70	42,43

L'émission des gamètes se traduit chez les femelles comme chez les mâles par une baisse conséquente de l'I.C.

4.3.6. Variations des délais de réponse aux stimuli thermique et gamétique

Remarque : dans les tableaux récapitulatifs, le temps le plus élevé englobe le temps de réaction au stimulus gamétique quand celui-ci est délivré.

4.3.6.1. Chez les femelles

Il est très variable et oscille entre quatorze et quarante minutes (Tableau 17).

Tableau 17 : Données de temps relatives aux émissions chez les femelles *C. gigas*.

Femelles de <i>Crassostrea gigas</i> en cours d'émission							
Animal	Types de stimuli		Caractéristiques des émissions			état gonade	I. C.
	thermique	gamétique	t. rép. (mn)	d. émi. (mn.)	t. sacr. (mn.)		
1 (1)	*		25 (st.)	10	12	gonflée	46,84
2 (2)	*	*	40 ; 5	13	15	translucide	45,43
3 (3)	*	*	29 ; 10 (st.)	120	120	gonflée	46,75
4 (0)*	*	*	14 ; 14	10	12		42,84
5 (4)	*	*	16 ; 13 (st.)	10	12		40,06
6 (5)	*	*	16 ; 16 (st.)	10	12	can. visibles	45,53
7 (6)	*	*	30 ; 11 (st.)	120	120	gl. dig. visible	38,44
8 (7)	*		36 (st.)	10	12	gonflée	35,16

4.3.6.2. Chez les mâles

Il est très variable : un mâle répond au bout de deux minutes, un autre au bout de soixante minutes.

Tableau 18 : Données de temps relatives aux émissions chez les mâles *C. gigas*.

Mâles de <i>Crassostrea gigas</i> en cours d'émission								
Animal	Types de stimuli		Caractéristiques des émissions				état gonade	I.C.
	thermique	gamétique	t. rép. (mn.)	d. émi. (mn.)	t. sacr. (mn.)	type de pte.		
1	*	*	38 ; 6	29	44			39,33
2	*	*	62 ; 28	15	92		gonflée	45,88
3	*		8 (st.)	10	52		gonflée	51,59
4	*	*	19 ; 16 (st.)	163	163	ptes. seq.		44,87
5	*	*	45 ; 10	60	60	faible émis.	gonflée	48,42
6	*	*	4 ; 2 (st.)	52	52	faible émis.		38,19
7	*	*	44 ; 1	61	61		translucide	30,09
8	*		2	43	43		translucide	41,41
9	*	*	24 ; 9 (st.)	139	139	ptes. seq.		42,43

4.3.7. Etude des indices et des temps de réponse ou des durées d'émission

4.3.7.1. Chez les femelles

Après l'arrêt des émissions des gamètes, les valeurs des indices de condition sont relativement constantes et indépendantes du temps de réponse et de la durée des émissions de gamètes. Cette durée observée est soit de l'ordre de 10 mn quand les émissions sont massives, soit de l'ordre de 120 mn quand elles sont faibles et continues (Tableau 19), (Figure 8).

Tableau 19 : Valeurs des Indices de Condition et des données de temps relatives aux émissions chez les femelles *C. gigas* : temps de réponse aux stimuli (t. rép.) et durée des émissions (d. émis.) en minutes (mn).

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
I. C.	46,84	45,43	46,75	42,84	40,06	45,53	38,44	35,16
t. rép. (mn.)	25	40	29	14	16	16	30	36
d. émis. (mn.)	10	13	120	10	10	10	120	10

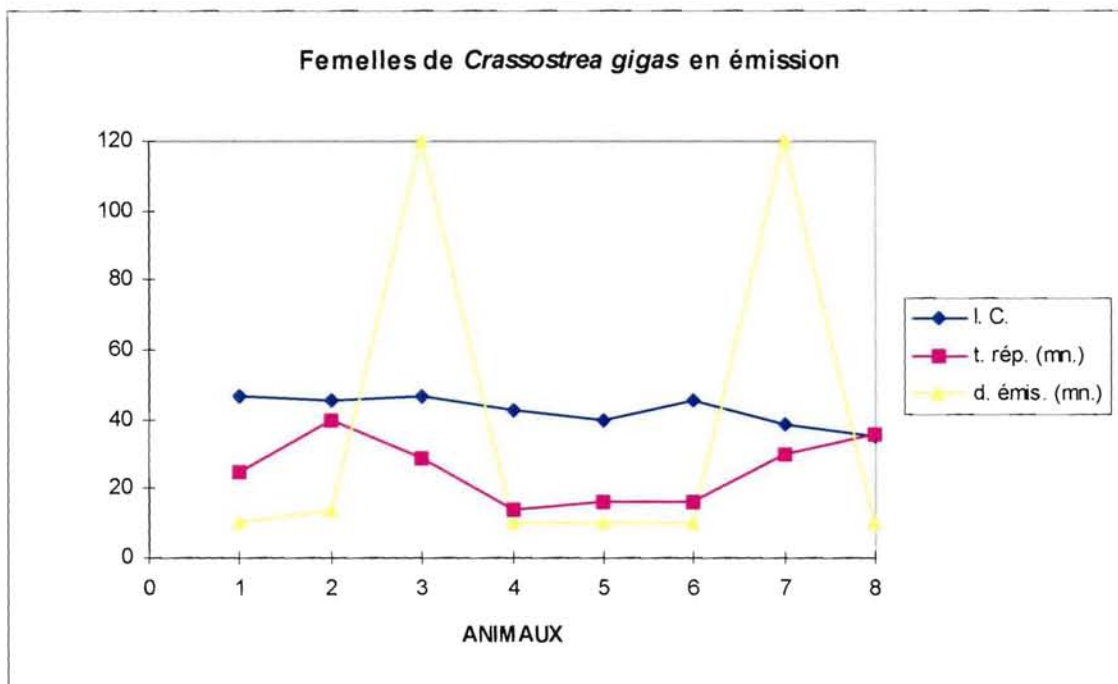


Figure 8 : Courbes illustrant les valeurs des Indices de Condition et des données de temps relatives aux émissions chez les femelles *C. gigas*.

4.3.7.2. Chez les mâles :

Après l'arrêt des émissions de gamètes, les valeurs des indices de condition sont relativement constantes et indépendantes du temps de réponse et de la durée des émissions de gamètes. La durée accordée à l'émission varie entre 10 mn et 163 mn (Tableau 20), (Figure 9).

Tableau 20 : Valeurs des Indices de Condition et des données de temps relatives aux émissions chez les mâles *C. gigas* : temps de réponse aux stimuli (t. rép.) et durée des émissions (d. émis.) en minutes (mn).

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I.C.	39,33	45,88	51,59	44,87	48,42	38,19	30,09	41,41	42,43
t.rép.(mn.)	38	62	8	19	45	4	44	2	24
t.émis.(mn.)	29	15	10	163	60	52	61	43	139

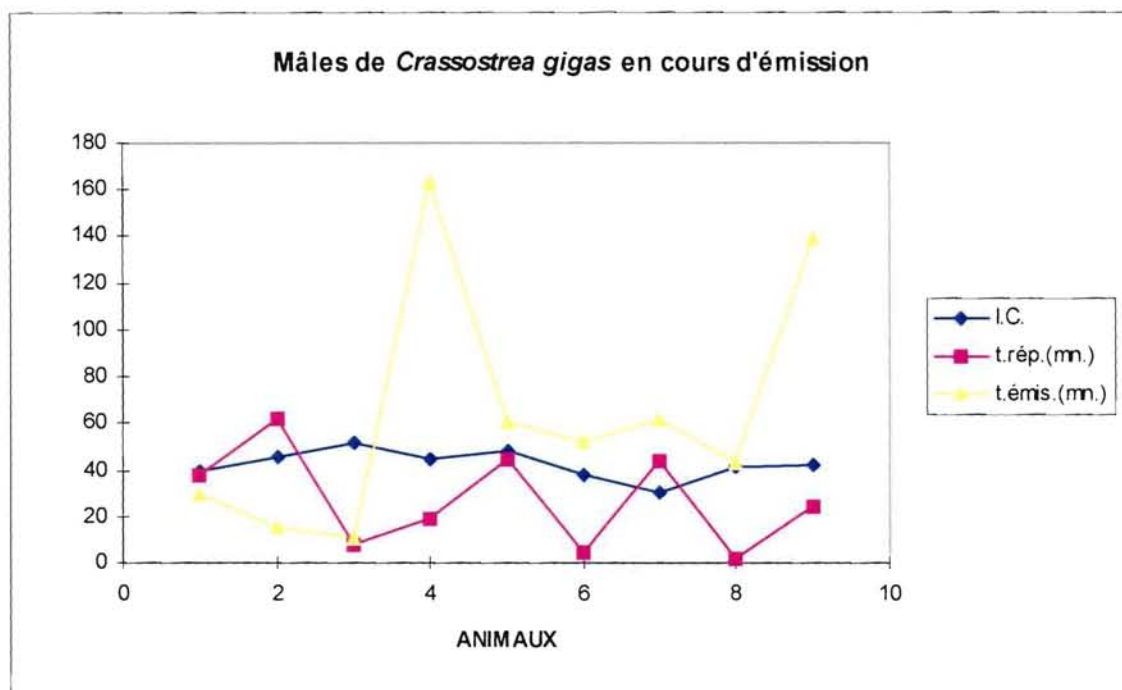


Figure 9 : Courbes illustrant les valeurs des Indices de Condition et des données de temps relatives aux émissions chez les mâles *C. gigas*.

4.3.8. Relations entre indices de condition et critères d'évaluation de l'intensité de la reproduction

4.3.8.1. Chez les femelles

Il y a une correspondance entre les indices de condition calculés en cours d'émission pour chaque animal et les taux de remplissage individuels enregistrés au travers du critère « gamète / gonade » ($r = -0,81$). (Tableau 21), (Figure 10).

Tableau 21 : Valeurs des Indices de Condition et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les femelles *C. gigas*.

Critères	ANIMAUX						
	1	2	3	4	5	6	7
Gam. / Zone	30,79	47,45	41,9	45,62	46,64	47,47	64,38
Gam. / Gon.	41,24	51,52	52,33	56,69	55,84	55,24	74,44
Gon. / Zone	73,45	93,11	78,91	79,01	82,69	84,92	86,14
I.C.	46,84	45,43	46,75	40,06	45,53	38,44	35,16

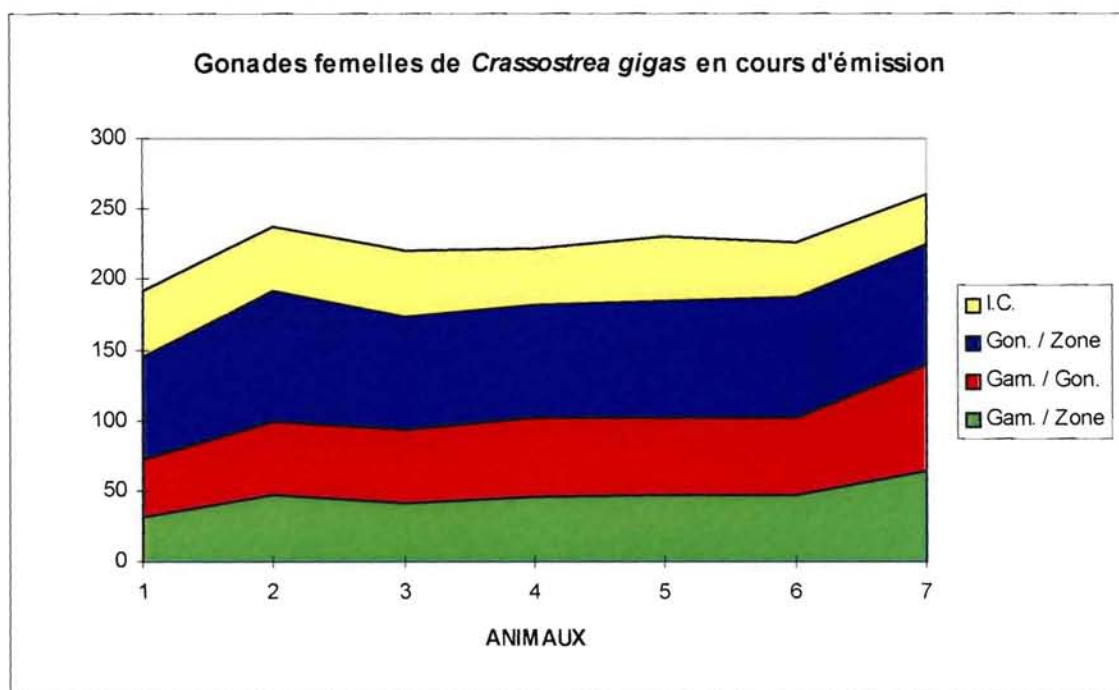


Figure 10 : Histogramme en aires illustrant les valeurs des Indices de Condition et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les femelles *C. gigas*.

4.3.8.2. Chez les mâles

Il n'existe pas de correspondance intéressante entre les indices de condition calculés en cours d'émission pour chaque animal et les taux de remplissage individuel donnés par le critère « gamète / gonade » ($r = 0,55$); (Tableau 22), (Figure 11).

Tableau 22 : Valeurs des Indices de Condition et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les mâles *C. gigas*.

Critères	ANIMAUX								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gam. / Zone	81,46	84,98	92,91	79,85	92,12	78,02	60,44	40,63	38,77
Gam. / Gon.	86,41	87,48	95,38	86,12	95,04	82,84	70,28	58,18	61,56
Gon. / Zone	94,23	97,13	97,39	92,66	96,89	94,04	85,33	68,74	62,48
I.C.	39,33	45,88	51,59	44,87	48,42	38,19	30,09	41,41	42,43

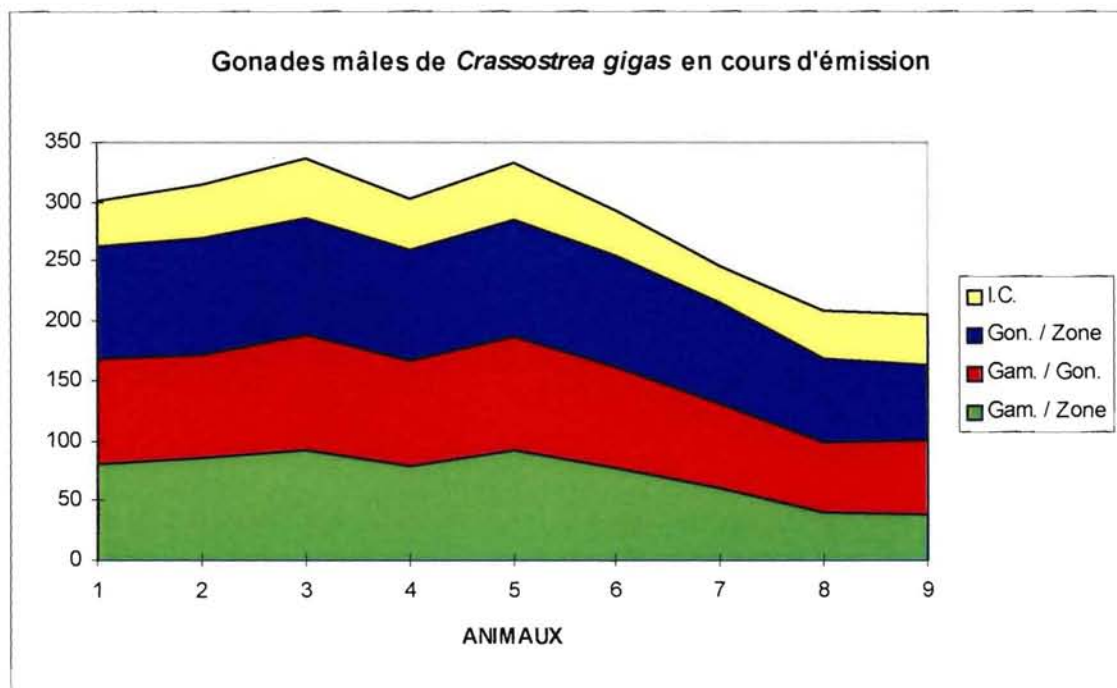


Figure 11 : Histogrammes en aires illustrant les valeurs des Indices de Condition et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les mâles *C. gigas*.

L'I.C. calculé après l'arrêt des émissions de gamètes ne donne pas une bonne appréciation du taux de remplissage d'une gonade mâle ou femelle à un moment donné de l'émission.

Nos résultats ne permettent pas de conclure que l'I.C. est un indicateur prédictif du niveau de remplissage ou de vidange de la gonade après l'arrêt de l'émission des gamètes. Des expériences complémentaires, menées à plus grande échelle, s'avèrent nécessaires pour estimer sa validité.

4.3.9. Relations entre les temps de réponse à l'émission des gamètes et les critères d'évaluation de l'intensité de la gamétogenèse

4.3.9.1. Chez les femelles

L'analyse groupée de toutes les données indique qu'il n'y a pas de correspondance entre les temps de réponse aux stimuli pour chaque animal et le taux de remplissage individuel enregistré au travers du critère « gamète / gonade » ($r = 0,23$). (Tableau 23), (Figure 12). Lorsque les animaux 1 et 7 non stimulés gamétiquement sont retirés de l'analyse, la relation est meilleure ($r = 0,86$).

Tableau 23 : Valeurs des temps de réponse aux stimuli et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les femelles *C. gigas*.

Critères	ANIMAUX						
	1	2	3	4	5	6	7
Gam. / Zone	30.79	47.45	41.9	45.62	46.64	47.47	64.38
Gam. / Gon.	41.24	51.52	52.33	56.69	55.84	55.24	74.44
Gon. / Zone	73.45	93.11	78.91	79.01	82.69	84.92	86.14
T. rép. (mn.)	25	40	29	16	16	30	36

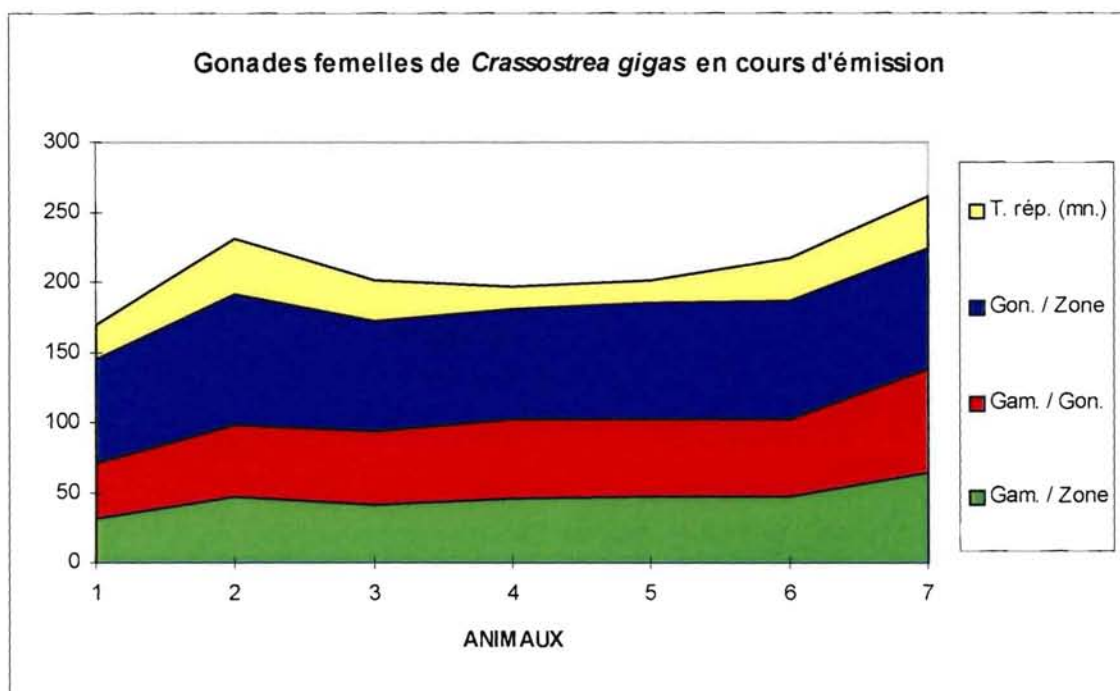


Figure 12 : Histogramme en aires illustrant les valeurs des temps de réponse aux stimuli et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les femelles *C. gigas*.

4.3.9.2. Chez les mâles

Il n'y a pas de correspondance entre les temps de réponse aux stimuli pour chaque animal et le taux de remplissage individuel enregistré au travers du critère « gamète / gonade » ($r = 0,27$), (Tableau 24), (Figure 13). Le coefficient est de 0,24 lorsque les animaux 3 et 8 non stimulés gamétiquement sont retirés de l'analyse.

Tableau 24 : Valeurs des temps de réponse aux stimuli et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les mâles *C. gigas*.

Critères	ANIMAUX								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gam. / Zone	81.46	84.98	92.91	79.85	92.12	78.02	60.44	40.63	38.77
Gam. / Gon.	86.41	87.48	95.38	86.12	95.04	82.84	70.28	58.18	61.56
Gon. / Zone	94.23	97.13	97.39	92.66	96.89	94.04	85.33	68.74	62.48
T. rép. (mn.)	38	62	8	19	45	4	44	2	24

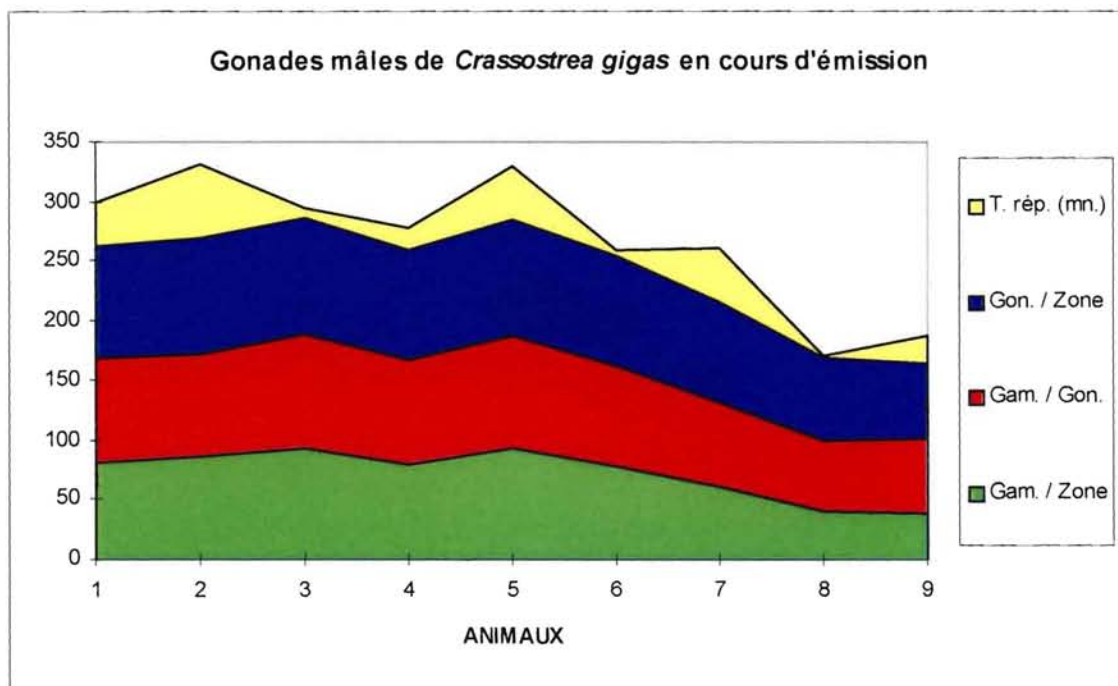


Figure 13 : Histogramme en aires illustrant les valeurs des temps de réponse aux stimuli et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les mâles *C. gigas*.

Chez les femelles comme chez les mâles d'huîtres en fin de gamétogenèse, le délai de réponse au stimuli d'émission de gamètes n'est pas dans nos conditions expérimentales un critère prédictif du niveau de remplissage ou de vidange qui sera atteint par la gonade après l'arrêt de l'émission des gamètes.

4.3.10. Relations entre les durées d'émission des gamètes mâles et les critères mesurés après l'arrêt des émissions

4.3.10.1. Chez les femelles

Il n'y a pas de correspondance entre les durées d'émission pour chaque animal et le taux de remplissage individuel enregistré au travers du critère « gamète / gonade » ($r = -0,11$). (Tableau 25), (Figure 14). Le coefficient est $r = -0,86$ lorsque les animaux 1 et 7 non stimulés gamétiquement sont retirés de l'analyse.

Tableau 25 : Valeurs des temps d'émission et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les femelles *C. gigas*.

Critères	ANIMAUX						
	1	2	3	4	5	6	7
Gam. / Zone	30.79	47.45	41.9	45.62	46.64	47.47	64.38
Gam. / Gon.	41.24	51.52	52.33	56.69	55.84	55.24	74.44
Gon. / Zone	73.45	93.11	78.91	79.01	82.69	84.92	86.14
T. émis. (mn.)	10	13	120	10	10	120	10

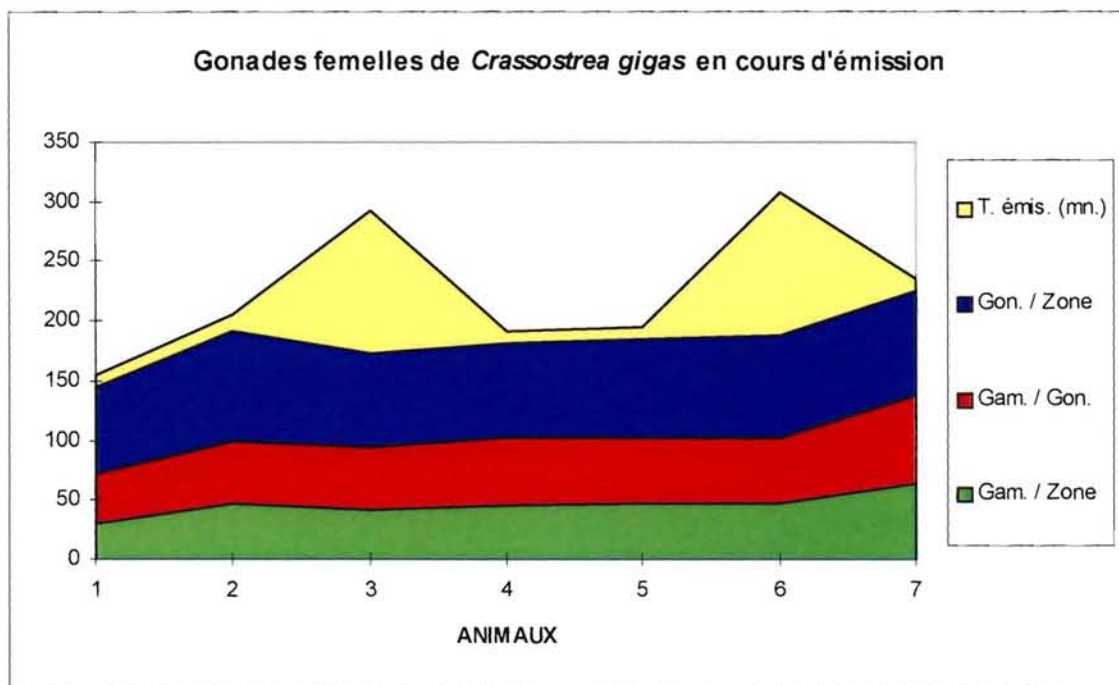


Figure 14 : Histogramme en aires illustrant les valeurs des temps d'émission et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les femelles *C. gigas*.

4.3.10.2. Chez les mâles

Il n'y a pas de correspondance entre les durées d'émission pour chaque animal et le taux de remplissage individuel enregistré au travers du critère « gamète / gonade » ($r = -0,31$). (Tableau 26), (Graphe 15). Le coefficient est $r = -0,40$ lorsque les animaux 3 et 8 non stimulés gamétiquement sont retirés de l'analyse.

Tableau 26 : Valeurs des temps d'émission et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les mâles *C. gigas*.

Critères	ANIMAUX								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gam. / Zone	81.46	84.98	92.91	79.85	92.12	78.02	60.44	40.63	38.77
Gam. / Gon.	86.41	87.48	95.38	86.12	95.04	82.84	70.28	58.18	61.56
Gon. / Zone	94.23	97.13	97.39	92.66	96.89	94.04	85.33	68.74	62.48
T. émis. (mn.)	29	15	10	163	60	52	61	43	139

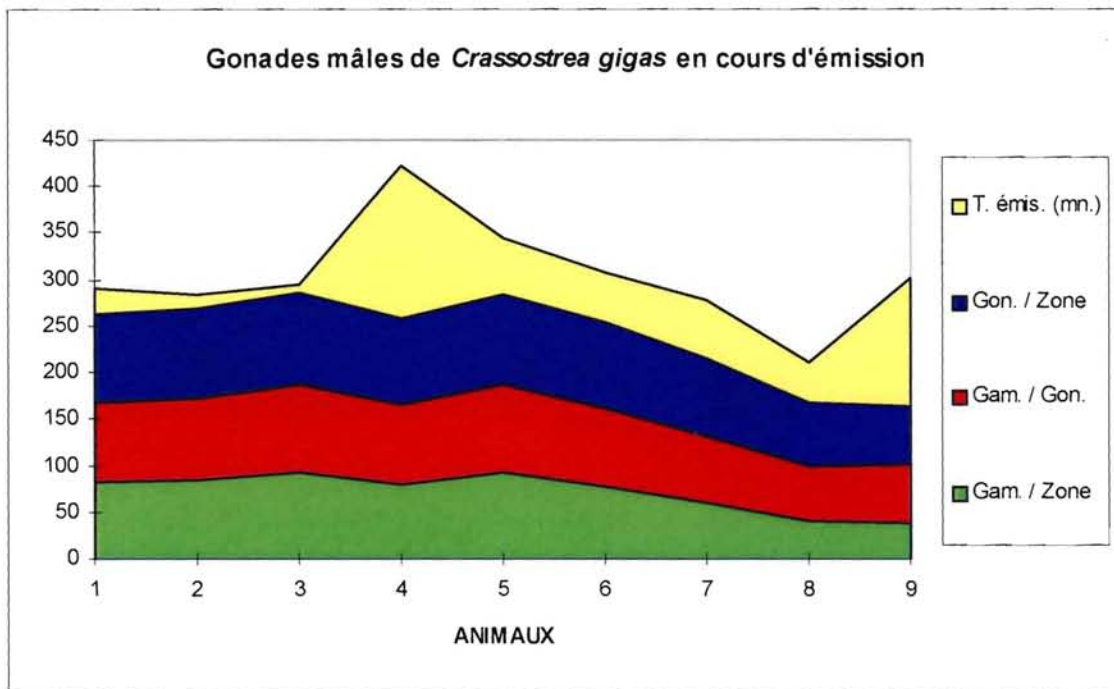


Figure 15 : Histogramme en aires illustrant les valeurs des temps d'émission et des critères d'évaluation du taux de remplissage chez les mâles *C. gigas*.

Chez les mâles comme chez les femelles, il n'y a pas de relation entre les durées d'émission des gamètes et le niveau de remplissage ou de vidange atteint par les gonades après l'arrêt de l'émission des gamètes. Dans nos conditions expérimentales, l'émission des gamètes mâles est réduite comparée à l'émission des gamètes femelles.

4.4. DISCUSSION

Les critères d'évaluation peuvent-ils anticiper fidèlement l'intensité de la gamétogenèse ?

Jusqu'à présent, l'intensité de la gamétogenèse a été mesurée de différentes façons par bon nombre d'auteurs.

Elle peut être rendue au travers des données de reproduction. Ainsi Lucas (1982) estime la production de gamète *in situ* sur *P. margaritifera* par une méthode indirecte et au laboratoire par une méthode directe basée sur la récolte des gamètes émis. Pouvreau (1999) évalue cette production toujours chez *P. margaritifera* par un ensemble de données reliant le poids des gonades au poids total de chair sur lequel il ajuste un modèle linéaire. La différence entre modèle en fin de maturité et modèle au stade de régression totale donne le modèle *in situ* de la production de gamètes en fonction du poids de chair. Au laboratoire le même auteur calcule cette même production à partir de la quantité de produits sexuels récoltés sur des filtres en milieux contrôlés.

Devauchelle et Philip de Laborie (1999) basent cette production sur des rapports de surface du tissu germinal, du tissu de réserve et des autres tissus chez l'huître *Crassostrea gigas*.

La fécondité des bivalves est calculée plus simplement par Fox et Coe (1973) par le poids de la gonade avant et après l'émission, par Griffiths (1977), Bayne et Worrall (1980) par le poids de tissus toujours avant et après émission.

La technique de planimétrie (Chalkey, 1943), est souvent utilisée : ainsi sur *Crassostrea virginica* par Kennedy et Battle (1964) et par Morales-Alamo et Mann (1989), sur *Ostrea edulis* par Wilson et Simons (1985).

La technique de sérologie est aussi largement utilisée, en particulier dans les études sur la moule: Lowe et al (1982), Borrero (1987). Bayne et al (1978) mesurent aussi l'évolution de la gamétogenèse par cette technique et le calcul du GVF.

Il résulte de ces techniques différentes quantifications, évaluations. Ainsi le GVF (Gamete Volume Fraction) (Chalkey, 1943 ; Weibel et al., 1966 ; Bayne et al., 1978) s'exprime au travers de la proportion de tissu gonadique dévolue à la production de gamètes. Il prend en compte les différents stades de développement (Newell et al., 1982) mais ne quantifie pas les produits (Hilbish et Zimmerman, 1988). Le GVF peut atteindre 80 à 90% du tissu conjonctif en fin de maturité et descendre à 5-10% après l'émission (Bayne et al., 1978).

La progression de la gamétogenèse est aussi déterminée par l'estimation du PFA (Percent Follicule Area) et du PGA (Percent Gamet Area). Ils sont respectivement pour Wilson et Simons (1985) travaillant sur *Ostrea edulis*, le pourcentage de gonade occupé par les follicules et le pourcentage de follicule occupé par les gamètes. Tandis que chez Morales-Alamo et Mann, le PGA (Percent Gonad Area) désigne la proportion de corps occupé par la gonade.

Pour Morales-Alamo et Mann (1989) il existe aussi une bonne corrélation entre le GVF et le PGA en juillet et août pour *Crassostrea virginica*.

Le GVF est généralement associé à d'autres mesures : au volume du manteau chez *Mytilus edulis* (Bayne et al., 1982 ; Lowe et Pipe, 1987) ou au poids du corps et du manteau (Hilbish et Zimmerman, 1988), alors que le PGA peut, lui, selon Morales-Alamo et Mann (1989), estimer la quantité de produits élaborés par les mollusques bivalves car le poids ou le volume de la gonade ne peut être mesuré directement.

Tinsman et al (1976) décrivent une autre technique pour mesurer le développement gonadique : un indice folliculaire, le GFI (Gonad Follicule Index) combinant le pourcentage de tissu gonadique par rapport au tissu non gonadique et la densité gonadique.

Plus anciennement Loosanoff et Engle (1942) calculait une quantité relative de gamètes en mesurant l'épaisseur du tissu gonadique.

Mais la taille ou le pourcentage de gonade ne suffit pas à quantifier sûrement la maturation pour Tinsman et al. (1976) car la densité des follicules croît parallèlement. Cette densité est le rapport de surface des follicules à la gonade. Elle varie entre 0.0 - état vide - et 1.0 - état mature - chez *C. virginica*. Généralement des huîtres en période de repos ont des densités de 0.01 à 0.15 et en cours de maturation de 0.15 à 0.80. Les auteurs avancent qu'entre 0.60 et 0.80 des gamètes mûres existent.

Nous le voyons, chaque auteur définit ses propres critères et les mêmes appellations recouvrent parfois des entités différentes. Ainsi, chez Morales-Alamo et Mann (1989) le PGA est la proportion de corps occupée par la gonade qui inclut le tissu interstitiel entre les follicules tandis que chez Wilson et Simons (1985) il désigne, en pourcentage, l'aire occupée par les gamètes dans les follicules. Il est donc très difficile de comparer des résultats.

Nos méthodes et nos résultats permettent d'aborder et de comprendre la gamétogenèse et l'émission de *Crassostrea gigas* de manière plus précise.

Au vu de la difficulté d'interprétation et de comparaison des résultats, nous avons cherché à standardiser les échantillons mesurés et les mesures elles-mêmes. A cet effet, nous avons effectué les prélèvements des échantillons de manière très ciblée dans les tissus et enregistré les mesures par le biais de l'association de différents référents anatomiques.

Cette démarche conduit à une amélioration notable de l'étude de l'intensité de la gamétogenèse et de l'émission des gamètes. Elle peut être envisagée aussi dans l'estimation de la fécondité et l'appréciation de la densité des tissus gonadiques.

De ce point de vue, les méthodes de mesure de surface mises en place se sont révélées pertinentes.

Chaque **critère morphométrique défini** est apte à rendre compte du taux de remplissage d'un animal en cours de maturation ou en cours d'émission.

Les critères « gamète / zone » et « gamète / gonade » sont les plus lisibles. Chez les mâles, l'intensité de la gamétogenèse est toutefois bien représentée par le critère gonade/zone. Ce n'est pas le cas pour les femelles.

Nos trois critères morphométriques peuvent être rapprochés de quantifications existantes étudiées par d'autres auteurs. Ainsi, le critère « gamète / gonade » se rapproche du GVF. Il n'existe pas de référence du même type que les nôtres dans la littérature. Les seules références qui existent sur la quantification de l'intensité des émissions de gamètes se rapportent à des animaux qui ont pondu dans le milieu naturel. Bayne *et al* (1978) montrent que les gonades d'huîtres de *Crassostrea gigas* se vident quasi totalement (entre 90 et 95% de leur contenu). Il est hautement probable que la vidange que nous observons et qui est beaucoup plus faible soit due au fait que la stimulation de ponte soit intervenue sur des animaux dont l'état de maturité ne se prêtait pas à l'émission des gamètes.

Notre critère gamète/gonade s'assimilerait aussi au critère « densité » proposé par Tinsman *et al.* (1976). Les chiffres proposés par cet auteur pour *Crassostrea virginica* pourraient s'appliquer à *Crassostrea gigas*.

Sur la stratégie d'émission des gamètes :

Nous savons que les mâles ont des saisons de reproduction très étendues et que leur gonade produit de nombreuses cohortes de spermatozoïdes qui se succèdent. Les femelles ont généralement une saison de reproduction plus restreinte que celle des mâles et leur gonade contient un nombre de cohortes moins important (Devauchelle, 2000).

Kennedy et Krantz (1982) travaillant sur *Crassostrea virginica*, observent après l'émission une désorganisation de l'arrangement ovocytaire dans la gonade et la présence de jeunes ovocytes confinés à la paroi folliculaire. Chez les mâles, les follicules ne rétrécissent pas autant que chez les femelles : en périphérie beaucoup de spermatocytes et des spermatides sont encore présents et probablement devraient continuer à mûrir, de même les jeunes ovocytes chez les femelles. Cette désorganisation et cette présence d'ovocytes sont confirmées par nos clichés.

Nos observations sont faites à l'issue de travaux expérimentaux. Dans le milieu naturel, il est fréquent d'observer des gonades totalement vides après les émissions de gamètes chez les femelles. Ce n'est pas le cas dans nos conditions.

Les gonades mâles sont généralement beaucoup plus remplies que les gonades femelles après avoir émis leurs gamètes.

Cette stratégie de reproduction de *C. gigas* diffère aussi de celle d'autres huîtres. Ainsi chez *Crassostrea virginica*, Loosanoff (1965) constate que la ponte peut s'étaler, pour un même individu, sur quelques jours voire quelques semaines, ce qui implique entre autre, un relargage partiel des ovocytes et donc une maturation continue.

Chez les femelles, nous constatons de grosses variations des taux de remplissage - ils vont du simple au double - et donc du volume de l'émission.

Chez les mâles, les variations enregistrées sont encore plus importantes.

Sont-elles liées à des différences de métabolisme chez les animaux, au degré de maturité propre de l'animal ? Sont-elles en liaison ou avec des émissions partielles déroulées en milieu naturel avant leur récolte ou encore avec un début de régression lié à un stress (conditions de récolte, de stockage, de vente..)?

Enfin, nous notons aussi des variations à l'intérieur d'un même individu quelque soit son sexe.

Le mâle fonctionne en production continue de cellules sexuelles. Stimulé, il émet partiellement ses gamètes.

La femelle fonctionne en production discontinue. Les gonades contiennent quelques cohortes d'ovocytes. Stimulée, elle émet ses gamètes plus massivement. Les différences entre les mâles et les femelles concordent avec les observations de Loosanoff (1965) et celles de Lango-Reynoso (1999).

La gonade se vide par l'évacuation des gamètes dans des canaux périphériques externes. Nous avons vu que la gamétogenèse est caractérisée par un gradient. Il en est de même de l'évacuation des gamètes. Cette constatation est à rapprocher de la description de l'état de la gonade femelle en fin de maturité où les ovocytes ectogonadiques sont légèrement plus gros que les ovocytes endogonadiques (cf §2 de ce mémoire) et aux observations de Devauchelle et Coll. (1999) sur l'organisation tubulo-acineuse de la gonade de *Crassostrea gigas*.

L'étude de notre **indice de condition** nous montre qu'il ne peut mesurer ici une production gamétique bien que la diminution de sa valeur enregistre les vidanges observées. Il n'est en effet corrélé à aucun critère. Il est à noter que dans notre étude les différents coefficients de corrélation sont établis à partir du critère « gamète / gonade ». Pour pallier à ce manque, il serait intéressant de mener une expérimentation mettant en relation la quantité de gamètes mesurée directement après récolte et l'I.C. tel que nous l'avons formulé afin de tester sa fiabilité. Cet indice s'avère en effet intéressant dans le cadre d'une sélection génétique basée sur une productivité de gamètes, aussi une étude complémentaire à plus grande échelle serait à initier afin d'apprécier sa validité. L'analyse globale montre aussi que les délais de réponse aux stimuli de ponte et les durées d'émission chez les mâles et chez les femelles ne sont pas reliés à l'intensité de l'émission des gamètes.

PERSPECTIVES

Ces différentes études apportent un ensemble d'éléments originaux et intéressants sur la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* au niveau individuel.

L'observation simultanée des organes digestifs, reproductifs et, pour partie, circulatoires, en des régions bien ciblées, permet d'avoir une connaissance précise de l'anatomo-morphologie de la masse viscérale en fin de gamétogenèse. Ces nouveaux éléments de connaissance offrent une **aide à la manipulation en expérimentation**, une **aide à la compréhension et à l'interprétation** des données ainsi qu'une aide à la comparaison en définissant des standards, des **référents anatomiques** tangibles.

L'étude spatiale des ovocytes dans la gonade en fin de gamétogenèse nous offre aussi un ensemble de " **critères** " qui permettent **l'évaluation de la gamétogenèse** chez *Crassostrea gigas* à ce stade. Cette étude serait à compléter afin de tester ces **indicateurs de maturité** à d'autres stades de développement de la gonade. L'**outil d'évaluation informatique** s'est révélé **performant**. Aussi toute étude de ce type s'en trouve facilitée.

Face à l'outil informatique, le nouvel **outil prospectif d'évaluation** couplant méthode de prélèvement par ponction dans la gonade d'un animal restant vivant, mode de coloration au May-Grunwald-Giemsa et technique du frottis permet d'envisager un **suivi dynamique** de la gamétogenèse tout au moins dans ses derniers stades avant l'émission.

L'étude individuelle de l'émission des gamètes par nos méthodes de quantification de l'état d'émission, outre qu'elle valide des critères morphométriques d'évaluation, renseigne utilement sur la **stratégie d'émission des gamètes**. Dans le cas d'émissions provoquées artificiellement, nous observons des différences de comportement des mâles et des femelles par rapport à l'émission des gamètes.

Les variations de **comportement** ne sont pas ici expliquées, davantage les différences de **fonctionnement**. Cependant elles ont le mérite d'être pour la première fois quantifiées et cette quantification offre de nouvelles perspectives de recherche dans la compréhension des mécanismes, des processus inhérents à l'huître *Crassostrea gigas*, voire à d'autres espèces.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, H. & Adams, A. 1858. The genera of recent Mollusca. Vol. 2 and Vol. 3. Van Voorst, London. 661 pp., 138 pp.
- Ahmed, M. 1975. Specialization in living oysters. *Adv. Mar. Biol.*, 13: 357-397.
- Arakawa, K.Y. 1990. Commercially important species of oysters in the world. *Mar. Behav. Physiol.*, 17 : 1-13.
- Awati, P.R. & Rai, H.S. 1931. *Ostrea cucullata* (the Bombay oyster). Indian Zool. Mem. Ind. Animal Type, III, Lucknow, Methodist Publ. House, India. 107 pp.
- Barber, B.J. & Blake N.J. 1983. Growth and reproduction of the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck) at its southern distributional limit. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 66 : 247-256.
- Barber, B.J., Ford S.E. & Wargo, R.N. 1991. Genetic variation in the timing of gonadal maturation and spawning of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol. Bull.* 181 : 216-221.
- 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. Ass. U.K.* 58 : 825-841.
- Bayne, B.L. & Worrall, C.M. 1980. Growth and production of mussels *Mytilus edulis* from two populations. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 3 : 317-328.
- Bayne, B.L., Bubel, A., Gabbot, P.A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M. & Morre, M.N. 1982. Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* L.. *Mar. Biol. Lett.* 3 : 89-105.
- Beninger, P.G. 1987. A qualitative and quantitative study of the reproductive cycle of the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, in the Bay of Fundy (New Brunswick, Canada). *Can. J. Zool.* 65: 495-498.
- Besnard, J.Y. 1988. Etude des constituants lipidiques dans la gonade femelle et les larves de *Pecten maximus* L. (Mollusque Lamellibranche). Thèse Université de Caen, 154pp.
- Borrero, F.J. 1987. Tidal height and gametogenesis : reproductive variation among populations of *Geukensia demissa*. *Biol. Bull.* 173 : 160 -168.
- Boussaid, B. 2000. Etudes écotoxicologiques in vivo - in vitro : l'huître japonaise *Crassostrea gigas* comme modèle expérimental. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, 89pp.
- Braley, R.D. 1984. Reproduction in the giant clams *Tridacna gigas* and *T. derasa* in situ on the north-central great barrier reef, Australia and Papua New Guinea. *Coral Reefs*, 3 : 221-227.
- Brousseau, D.J. 1978. Spawning cycle, fecundity and recruitment in a population of soft-shell clam, *Mya arenaria*, from Cape Ann, Massachusetts. *Fish. Bull.* 76 : 155 -166.

- Buroker, N.E., Hershberger, W.K. & Chew, K.K. 1979a. Population genetics of the family Ostreidae. 1. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. Mar. Biol. 54 : 157-169.
- Buroker, N.E., Hershberger, W.K. & Chew, K.K. 1979b. Population genetics of the family Ostreidae. 2. Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. Mar. Biol. 54 : 171 -184.
- Chalkey, H.W. 1943. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. J. Natl. Cancer Inst. 4 : 47-53.
- Coatanea, D., Vercelli, C., Chabiran J.M. & Oheix, J. 1994. Contrôle de la maturation et du calendrier d'émissions larvaires d'un stock de géniteurs d'huîtres plates *Ostrea edulis* méditerranéennes. Rapp. intermédiaire de convention IFREMER/Région Languedoc-Roussillon, Palavas, (FRANCE), 57pp.
- Chipperfield, P.N.J. 1953. Observations on the breeding and settlement of *Mytilus edulis* (L.) in british waters. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 32 : 449-476.
- Cochard, J.C. & Devauchelle, N. 1993. Spawning, fecundity and larval survival and growth in relation to controlled conditioning in native and transplanted populations of *Pecten maximus* (L.) : evidence for the existence of separate stocks. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 0 : 1 -16.
- Cuvier, G. 1882. Le règne animal. Mollusques. Fortin, Masson et Comp., Paris. Pp. 181-236.
- Devauchelle, N., Grizel, H., Bodoy, A., Nouhant, S., Salaün, G. & Barret, J. 1997. Rapport « Groupe de Travail : La reproduction des mollusques bivalves d'aquaculture marine ». Rapport Interne IFREMER Nantes, 14 -15 novembre 1995.
- Devauchelle, N., Boussaïd, B., Le Pennec, G., Philip de Laborie, L., Salaun, G. & Dorange, G. 1999. Organization of the genital tract of the japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Poster presented at the 8th International Congress on Invertebrate Reproduction and Development.
- Dinamani, P. 1967. Variations in the stomach of the Bivalvia. Malacology., 5(2): 225 -268.
- Dinamani, P. 1987. Gametogenic patterns in populations of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Northland, New Zealand. Aquaculture. 64 : 65 -76.
- Dinamani, P. 1991b. The Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), in New Zealand. Pages 343 - 352 in W. Menzel (ed). Seto Mar. Biol. Lab., 37(3/6) : 239 -255, 1996.
- Eble, A.F. & Scro, R. General Anatomy. In The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Chapter 2. Edited by V.S. Kennedy, R.I.E. Newell & A.F. Eble. 1996.
- Eversole, A.G., Michener, W.K. & Eldridge, P.J. 1980. Reproductive cycle of *Mercenaria mercenaria* in a South Carolina estuary. Proc. Natl. Shellfish Assoc. 70 : 22 - 30.
- Evseev, G.A., Yakolev, Yu.M. & Li, X.X. 1996. The Anatomy of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) (Bivalvia : Ostreidae). Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 37(3/6) : 239 -255.
- Fox, D.L., Coe, W.R. 1943. Biology of the California sea mussel (*Mytilus californianus*). Nutrition metabolism, growth and calcium deposition. J. Exp. Zool. 93 : 205 -243.
- Gabe, M. 1968. Techniques histologiques. Masson et cie. Paris, 113 pp.

- Galstoff, P.S. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Fish. Bull., 64, Govern. Print. Office, Washington. 480 pp.
- Gérard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launay, S., Heurtebise, S., Ledu, C. & Philipot, P. 1997. Contrôle de la gamétogénèse des huîtres creuses et plates. Relations reproduction et génétique. Rapport Interne « Groupe de travail : La reproduction des mollusques bivalves d'aquaculture marine. IFREMER Nantes, 14 -15 novembre 1995, p 99 -111.
- Graham, A. 1949. The molluscan stomach. Trans. Roy. Soc. Edinburgh, 61(3) : 737-778.
- Griffiths, R.J. 1977. Reproduction cycles in littoral populations of *Choromytilus meridionalis* (Kr.) and *C. dulacomya ater* (Molina) with a quantitative assesment of gamete production in the former. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 30 : 53 -71.
- Guillou, J. & Tartu, C. 1989. Reproduction et recrutement de la coque *Cerastoderma edule* (L.) à Saint-Pol-de-Léon (Bretagne - Nord)). IFREMER Actes de Colloques. 13 : 29 - 38.
- Harry, H.W. 1985. Synopsis of the superspecific classification of living oysters (Bivalvia : *Gryphaeidae* and *Ostreidae*). Veliger, 28(2) : 121 -158.
- Hayes, P.F. & Menzel, R.W. 1981. The reproductive cycle of early setting *Crassostrea virginica* (Gmelin) in the northern gulf of Mexico, and its implications for population recruitment. Biol. Bull. 160 : 80 - 88.
- Heffernan, P.B., Walker, R.L. & Carr, J.L. 1988. The reproductive cycle of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in Wassaw Sound, Georgia. Nat. Shellfisheries Ass., Abstracts Annual Meeting, June 25 - 30, New Orleans, Louisiana, 208 - 209.
- Heffernan, P.B. & Walker, R.L. 1989. Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. J. Moll. Stud. 55 : 135 -137.
- Hilbish, T.J., Zimmerman, K.M. 1988. Genetic and nutritional control of the gametogenic cycle in *Mytilus edulis*. Mar. biol. 1998 : 223 - 228.
- His E., Cantin, C. Biologie et physiologie des coquillages. Rapport interne IFREMER-DEL/95.06/Arcachon.
- His, E. 1976. Contribution à l'étude biologique de l'huître dans le bassin d'Arcachon. Activité valvaire de *Crassostrea angulata* et de *Crassostrea gigas*, application à l'étude de la reproduction de l'huître japonaise. Thèse Université de Bordeaux I, (FRANCE), 63 pp.
- Ingle, R.M. 1951. Spawning and setting of oyster in relation to seasonal environmental changes. Bull. Mar. Sci. Gulf Carib. 1 : 111 - 135.
- Jones, H.A., Simpson, R.D. & Humphrey, C.L. 1986. The reproductive cycles and glochidia of fresh-water mussels (bivalvia : hydriidae) of the Macleay river, northern New South Wales, Australia. Malacologia. 27 (1) : 185 -202.
- Kanti, A., Heffernan, P.B. & Walker, R.L. 1993. Gametogenic cycle of the southern surfclam *Spisula solidissima similis* (Say, 1822) from St Catherines sound, Georgia. J. Shellfish Res., vol 12, n° 2 : 255 -261.
- Kellogg, J. L. 1892. A contribution to our knowledge of the morphology of lamellibranchiate mollusks. Bull. U.S. Fish. Commiss., 10 : 389 - 436.

- Kennedy, A.V. & Battle, H.I. 1964. Cyclic changes in the gonad of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Can. J. Zool. 42 : 305 - 321.
- Kennedy, V.S. & Krantz, L.B. 1982 . Comparative gametogenic and spawning patterns of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) in Central Chesapeake Bay. J. Shellfish Res. 2 : 133 - 140.
- Lamarck, J. 1819. Histoire Naturelle des Animaux Sans Vertèbres. Tome 6(1). Verdiere, Paris. 343 pp.
- Lannan, J.E., Robinson, A. & Breese, W.P. 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstock conditioning to maximise larval survival. Aquaculture. 21 : 337 - 345.
- Laruelle, F., Guillou, J. & Paulet, Y.M. 1994. Reproductive pattern of clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 74 : 351 - 366.
- Le Dantec, J. 1968. Ecologie et reproduction de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lamarck) dans le bassin d'Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 32 (3) : 237 - 362.
- Leenhardt, H. 1926. Quelques études sur « *Gryphea angulata* » (Huître du Portugal). Ann. de l'Inst. Oceanogr., n.s., 3 : 1 - 89.
- Li, X.X. 1989. A comparative morphology of mantle cavity in some Chinese oysters. Oceanol. Limnol. Sinica, 20(6) : 502 - 507.
- Li, X.X. & Qi, Z.Y. 1994. Studies on the comparative anatomy, systematic classification and evolution of chinese oysters. Studia Marina Sinica, 35 : 143 -179.
- Loosanoff, V.L., & Engle, J.B. 1940. Spawning and setting of oysters in Long Island Sound in 1937, and discussion of the method for predicting the intensity and time of oyster setting. Bull. U. S. Bur. Fish., 49 : 403 - 422.
- Loosanoff, V.L., & Engle, J.B. 1942. Accumulation and discharge of spawn by oysters living at different depths. Biol. Bull., 82 : 403 - 422.
- Loosanoff, V.L. & Nomejko, A. 1951. Spawning and setting of the American oyster, *C. virginica*, in relation to lunar phases. Ecology. 32 : 113 -134.
- Loosanoff, V.L. 1962. Gametogenesis and spawning of the European oyster, *O. Edulis*, in waters of Maine. Biol. Bull., 122 : 86 - 94.
- Loosanoff, V.L. 1965. Gonad development and discharge of spawn in oysters of Long Island Sound. Biol. Bull. 129 : 546 – 561.
- Lowe, D.M. & Pipe, R.K. 1942. Mortality and quantitative aspects of storage cell utilization in mussels, *Mytilus edulis*, following exposure to diesel oil carbohydrates. Mar. Environm. Res. 22 : 243 - 251
- Lowe, D.M., Moore, M.N. & Bayne, B.L. 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 62 : 133 -145.

- Lubet, P., 1959. Recherches sur le cycle et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (Mollusques bivalves). Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 23 (4) : 548 pp.
- Lucas, A., 1965. Recherche sur la sexualité des mollusques bivalves. Thèse Université de Rennes, (FRANCE), 135 pp.
- Lucas, A. 1982. Evaluation of reproductive effort in bivalve molluscs. Malacologia, 22 (1-2) : 183 -187.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 59 : 95 -110.
- Millar, R.H., 1962. Breeding and gonadial cycle of oysters in Loch Ryan, Scotland. J. Cons. Int. Explor. Mer., 28 : 432 - 439.
- Moralos-Alamo, M. & Mann, R. 1989. Anatomical features in histological sections of *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) as an aid in measurements of gonad area for reproductive assessment. J. Shellfish Res. 8(1) : 71 - 82.
- Mori, K. 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 53 : 361 - 369.
- Morvan, C. & Ansell, A.D. 1988. Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. Mar. Biol. 97 : 355 - 364.
- Nascimento, I.A. & Lunetta, J.E. 1978. Ciclo sexual da ostra de mangue e sua importância para o cultivo. Bol. Fisiol. Animal, Univ. S. Paulo. 2 : 63 - 98.
- Nelson, T.C. 1938. The feeding mechanism of the oyster. I. On the pallium and branchial chambers of *Ostrea virginica*, *O. edulis* and *O. angulata* with comparisons with other species of the genus. J. Morphol., 63(1) : 1 - 61.
- Nelson, T.C. 1960. The feeding mechanism of the oyster. II. On the gills and palps of *Ostrea edulis*, *Crassostrea virginica* and *C. angulata*. J. Morphol., 107 : 163 -191.
- Newell, R.I.E., Hilbish, T.J., Koehn, R.K. & Newell, C.J. 1982. Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. (*Bivalvia* : *Mytilidae*) from localities on the east coast of the United States. Biol. Bull. 162 : 299 - 310.
- Orton, J.H. 1937. Oyster biology and oyster culture, being the Buckland lectures to 1935. Edward Arnold Co., London. 211 pp.
- Paulet, Y.M., Dorange, G., Cochard, J.C. & Le Pennec, M. 1992. Reproduction et recrutement chez *Pecten maximus* L. Ann. Inst. Océanogr., Paris, 68 (1-2) : 45 - 64.
- Perdue, J.A., Beattle, J.H. & Chew, K.K. 1981. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. J. Shellfish Res. 1 : 9 -16.
- Perdue, J.A. 1983. The relationship between the gametogenic cycle of the Pacific oyster, *C. gigas*, and the summer mortality phenomenon in strains of selectively-bred oysters. Seattle WA : University of Washington, 205 pp. Dissertation.

- Perdue, J.A. & Erickson, G. 1984. A comparison of the gametogenic cycle between the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Suminoe oyster *Crassostrea rivularis* in Washington State. *Aquaculture*. 37 : 231 - 237.
- Peterson, C.H. & Fegley, S.R. 1986. Seasonal allocation of resources to growth of shell, soma, and gonads in *Mercenaria mercenaria*. *Biol. Bull.* 171 : 597 - 610.
- Pouvreau, S. 1999. Etude et modélisation des mécanismes impliqués dans la croissance de l'huître perlière, *Pinctada margaritifera*, au sein de l'écosystème conchylicole du lagon de l'atoll de Takapoto (Polynésie française). Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes, 267 pp.
- Ranson, G. 1943. La vie des huîtres . Histoires Naturelles -1, Collection dirigée par Jean Rostand. Gallimard, Paris, 261 pp.
- Rodriguez, Z.G.C. & Garcia-Cubas, A. 1986. Taxonomia y anatomia comparada de las ostras an las costas de Mexico. *Ann. Inst. Ciencias Mar. Limnol. Univ. Nac. Autonomia Mexico*, 13(2) : 249 - 314.
- Rodriguez, Z.G.C. & Linares, F.A. 1992. Contribution on the taxonomy of the Ostreidae (Mollusca : Bivalvia) in Mexico. *Unitas Malacologica*, 11th Int. Malacol. Congr., Siena, Italy, 1992, Abstr. Publ. Univ. Siena, Italy : 400 - 401.
- Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., Garcia-Martin, L.O. & Sanchez-Lopez, J.L. 1992. Influence of seasonal environmental changes of the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain.
- Sakuda, H.M. 1966. Reproductive cycle of American oyster, *Crassostrea virginica* in West Lock, Pearl harbor, Hawaiï. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 95 : 216 -218.
- Show, B.L. & Battle, H.I. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35 : 325 - 347.
- Stasek, C. R. 1963. Orientation and form in the bivalved Mollusca. *J. MORPH.* 112 : 195 -214.
- Suzuki, T. 1984. Comparative anatomy of the excretory organs and heart of Bivalves-Subclasses Pterimorphia, Paleoheterodonta and Heterodonta. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture No.7*, 59 - 82(1985).
- Thompson, R.J., Newell, R.I.E., Kennedy, V.S. & Mann, R. 1996. Reproductive processes and early development in « The Eastern oyster *Crassostrea virginica* ». edited by V.S. Kennedy, R.I.E. Newell and A.F. Eble. A Maryland sea Grant Book College Park, Maryland.
- Torigoe, K. 1981. Oysters in Japan. *J. Sci. Hiroshima Univ.*, B1, 29(2) : 291 - 419.
- Weibel, E.R., Kistler, G.S. & Scherle, F. 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell. Biol.* 30 : 23 - 38.
- Wilson, J.H. & Simons, J. 1985. Gametogenesis and breeding of *Ostrea edulis* on the west coast of Ireland. *Aquaculture*, 46 : 307 - 321.
- Wilson, J.H. 1987. Spawning of *Pecten maximus* (Pectinidae) and the artificial collection of juveniles in two bays in the west of Ireland. *Aquaculture*. 61 : 99 -111.

Yonge, C.M. 1953. The monomyarian condition in the Lamellibranchia. *Trans. Roy. Soc. Edinb.* 62 : 443 - 478.

Yonge, C.M. 1960. *Oysters*. Collins Clear-Type Press, London, 209 pp.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES **Sciences de la Vie et de la Terre**
 Sorbonne - Esc. A - 4ème étage - gauche - 46 rue St Jacques 75005 PARIS (Metro : Cluny-la-Sorbonne)

**MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE
 DE LA RECHERCHE ET DE LA TECHNOLOGIE**

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté

par

GILLES SALAUN

**LA GONADE DE L'HUITRE CREUSE,
 CRASSOSTREA GIGAS (THUNBERG, 1793)
 EN FIN DE GAMETOGENESE**

RESUME

Ces différentes études apportent un ensemble d'éléments originaux et intéressants sur la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* au niveau individuel.

L'observation simultanée des organes digestifs, reproductifs et, pour partie, circulatoires, en des régions bien ciblées, permet d'avoir une connaissance précise de l'anatomo-morphologie de la masse viscérale en fin de gamétogenèse. Ces nouveaux éléments de connaissance offrent une **aide à la manipulation en expérimentation**, une **aide à la compréhension et à l'interprétation** des données ainsi qu'une aide à la comparaison en définissant des standards, des **référents anatomiques tangibles**.

L'étude spatiale des ovocytes dans la gonade en fin de gamétogenèse nous offre aussi un ensemble de " **critères** " qui permettent **l'évaluation de la gamétogenèse** chez *Crassostrea gigas* à ce stade. Cette étude serait à compléter afin de tester ces **indicateurs de maturité** à d'autres stades de développement de la gonade. L'**outil d'évaluation informatique** s'est révélé **performant**. Aussi toute étude de ce type s'en trouve facilitée.

Face à l'outil informatique, le nouvel **outil prospectif d'évaluation** couplant méthode de prélèvement par ponction dans la gonade d'un animal restant vivant, mode de coloration au May-Grunwald-Giemsma et technique du frottis permet d'envisager un **suivi dynamique** de la gamétogenèse tout au moins dans ses derniers stades avant l'émission.

L'étude individuelle de l'émission des gamètes par nos méthodes de quantification de l'état d'émission, outre qu'elle valide des critères morphométriques d'évaluation, renseigne utilement sur la **stratégie d'émission des gamètes**. Dans le cas d'émissions provoquées artificiellement, nous observons des différences de comportement des mâles et des femelles par rapport à l'émission des gamètes.

Les variations de **comportement** ne sont pas ici expliquées, davantage les différences de **fonctionnement**. Cependant elles ont le mérite d'être pour la première fois quantifiées et cette quantification offre de nouvelles perspectives de recherche dans la compréhension des mécanismes, des processus inhérents à l'huître *Crassostrea gigas*, voire à d'autres espèces

Mots-clés : Mollusque, Huître, *Crassostrea gigas*, Reproduction, Gamétogenèse, Emission, Histologie