



**Ifremer**

---

## **La Reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France**

IFREMER/Nantes/France, 14 et 15 novembre 1995

Coordinateurs :  
Nicole Devauchelle  
Jean Barret  
Gilles Salaun

FICHE DOCUMENTAIRE

<b>Numéro d'identification du rapport :</b> DRV/RA/RST/97-11		<b>date de publication :</b> octobre 1997
<b>Diffusion :</b> libre X restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/>		<b>nombre de pages</b> 217
<b>Validé par :</b> DRV/RA		<b>bibliographie</b> Oui
<b>Version du document :</b> définitive		<b>illustration(s)</b> Oui
<b>langue du rapport :</b> français		
<b>Titre et sous-titre du rapport :</b> La Reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France. -Rapport de Groupe de Travail- IFREMER/Nantes/France, 14 et 15 novembre 1995		
<b>Titre traduit :</b> The natural and controlled Reproduction of cultivated bivalves in France. -Symposium Report- IFREMER-Nantes/France, November 14-15, 1995		
<b>Coordonnateurs :</b> DEVAUCHELLE Nicole, Jean BARRET, Gilles SALAUN	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> IFREMER/DRV/RA Laboratoire physiologie des Invertébrés/Brest	
<b>Collaborateur(s) :</b> nom, prénom IFREMER : DRV/RA/Brest, La Tremblade, La Trinité sur Mer, L'Houmeau, Nantes, Palavas les Flots, Ecloserie du Tinduff ; ENS, Lyon ; IPIMAR, OLHAO, Portugal ; Université de Sophia Antipolis, Laboratoire de Physiologie cellulaire et comparée URA CNRS 1513, URA CNRS 322, Brest URA CNRS 561, Besançon URA 671 CNRS, Villefranche/mer,	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b>	
<b>Travaux universitaires :</b> diplôme : établissement de soutenance :	<b>discipline :</b> <b>année de soutenance :</b>	
<b>Titre du contrat de recherche :</b>		<b>n° de contrat IFREMER</b>
<b>Organisme commanditaire :</b> nom développé, sigle, adresse		
<b>Organisme(s) réalisateur(s) :</b> nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)		
<b>Responsable scientifique :</b>		
<b>Cadre de la recherche :</b> Programmes : Biologie des espèces d'élevage (E1) et Optimisation et innovations techniques (E2) Projets : E11002 E21002		<b>Convention :</b>  <b>Autres (préciser) :</b> Synthèse de travaux réalisés ou commandés par IFREMER Outil d'aide à la décision

**Résumé :**

Le rapport IFREMER regroupe 17 synthèses courtes et illustrées qui se rapportent au thème de la reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France. Les espèces ciblées sont *Ostrea edulis*, l'huître plate, *Crassostrea gigas*, l'huître creuse, *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*, les moules, ainsi que *Pecten maximus*, la coquille St Jacques.

Une synthèse supplémentaire présente, à titre de comparaison, les principaux axes de recherche étudiés à l'IFREMER en matière de reproduction contrôlée, pour les poissons marins.

Les synthèses documentent sur trois sujets :

1. l'écophysiologie des cycles de reproduction dans le milieu naturel,
2. les possibilités de contrôler artificiellement les saisons de reproduction, en écloséries et de procéder à des collectes de gamètes puis à leur fécondation,
3. la description des gonades sur les plans anatomiques et d'organisation cellulaire et celle des gamètes du point de vue de la biologie, de la physiologie et de la biochimie.

Tous les sujets sont abordés sur la coquille St Jacques qui fut, pendant 20 ans, un modèle d'étude pour le développement de l'aquaculture semi extensive et la mise en place d'écloséries.

Concernant les moules, les résultats se rapportent exclusivement à l'écophysiologie dans le milieu naturel.

Les résultats présentés sur les huîtres se rapportent à tous les sujets. Ils traduisent l'évolution récente des recherches sur cette espèce : le sujet 1 a fait l'objet de nombreuses observations, les sujets 2 et 3 commencent à être documentés.

Les 18 synthèses ont été présentées oralement à IFREMER/NANTES les 14 et 15 novembre 1995.

**Abstract :**

This report compiles 17 short and illustrated syntheses concerning the natural strategies of reproduction and the artificial control of the reproductive process for the flat oyster, *Ostrea edulis*, the japanese oyster, *Crassostrea gigas*, the mussels, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*, the scallop, *Pecten maximus*.

An additional syntheses is presented, as a comparison within molluscs, which are the main research topics at IFREMER concerning the artificial control of the reproductive processes in Marine Fish.

Three main subjects are documented :

1. the ecophysiology of the natural period of reproduction in the wild,
2. the methods developed in the hatcheries for the artificial control of the reproductive periods, the gametes collection and the fertilization,
3. the descriptive knowledge of the gonads (anatomy, cellular organisation) and of the gametes (physiology, biochemistry, cellular biology).

For the scallop, *Pecten maximus*, more is known on all the subjects since this species has been studied for 20 years as a model for hatchery improvements and reseeded experiments.

The results concerning the mussels are exclusively confined to the natural description of the reproductive spawning periods and consequences.

The results affecting oysters are well documented on the strategies observed in the wild. Less, but increasing information is available on the artificial control of the spawning season, on the gonads and on the gametes.

The 18 syntheses have been orally presented at IFREMER/NANTES (FRANCE). 14-15th of november.

**Mots-clés :**

bivalves, stratégie de reproduction, contrôle artificiel, gonades, gamètes, coquille St Jacques, moules, huîtres, nourriture, photopériode, température, biologie, physiologie, biochimie.

**Keywords :**

bivalves, reproductive strategy, artificial induction of reproduction, gonads, gametes, scallop, mussels, oysters, food, light, temperature, biology, physiology, biochemistry.

Commentaire : Rapport interne DRV / RA / RST / 97-11

Citations :

## Ouvrage

**Devauchelle N., Barret J. et Salaun G., coord., 1997.** Groupe de travail sur la reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France, Nantes (France), IFREMER, Rapport interne DRV 97-11 RA/RST/BREST : 217 pages.

## Contribution

**Martin A.G., Littaye-Mariette A, Langlade A. et Allenou J.P., 1997.** Cycle de reproduction naturelle de l'huître plate *Ostrea edulis*. In : La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France, Nantes (France), 14-15 novembre 1995, Groupe de travail, Devauchelle N., Barret J., Salaun G., coord, IFREMER, rapport interne, DRV 97-11 RA/RST/BREST : 21 - 34

Les coordonnateurs remercient :

- René Robert pour la correction des contributions,
- Séverine Tourbot pour la participation au travail de frappe et pour l'illustration de la couverture du document,
- Nelly Conche et Sylvie Nouhant pour le travail d'organisation réalisé à Nantes.

# INTRODUCTION

Nicole DEVAUCHELLE

Le groupe de travail organisé à Nantes a été conçu pour être un **outil d'aide à la décision**. A l'issue du groupe de travail, la Direction des Ressources Vivantes d'IFREMER prévoyait de déterminer pour la période 1996-2000, les orientations du sous-projet « Physiologie de la Reproduction des mollusques », les plus adaptées aux opérations de soutien et de développement de la conchyliculture en France. Les espèces principalement concernées par cet exercice sont l'huître plate, *Ostrea edulis*, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, les moules, *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* et la coquille saint-Jacques, *Pecten maximus*.

En France, la mytiliculture est née « accidentellement » en 1235 sur les pièges à oiseaux de Walton et l'ostréculture, au 19<sup>ème</sup> siècle, en Baie d'Arcachon. C'est au cours de ce siècle que la conchyliculture s'est beaucoup développée grâce aux actions conjuguées de scientifiques et d'administrateurs maritimes : Coste, de Bon, de Jouette notamment. Entre les années 1850 et 1970, la conchyliculture consistait principalement à repeupler et parfois surpeupler les bancs naturels de bivalves ou à créer de nouvelles zones d'élevage en y ensemençant les naissains collectés sur les zones de production naturelle. Dans la seconde moitié du 19<sup>ème</sup> siècle, est apparu un nouveau type d'aquaculture basé sur la production contrôlée de naissains en écloseries. Cette nouvelle tactique de production n'a été réellement soutenue en France qu'à partir des années 1970, dans les buts précis de diversifier les espèces cultivées dans notre pays par importation et reproduction contrôlée d'espèces non indigènes (exemple de la palourde japonaise) et de relancer des activités de pêche traditionnelle en décroissance (exemple de la coquille saint-Jacques). Plus récemment, la production de bivalves dans des écloseries s'est imposée pour concrétiser la production d'animaux ayant un profil génétique sélectionné.

IFREMER, précédemment l'ISTPM et le CNEXO, ont pu réaliser pendant 20 à 30 années consécutives des opérations de surveillance de la reproduction en mer sur tout le littoral français et effectuer des travaux de recherche expérimentale dans le but de contrôler artificiellement la production des larves. Plusieurs unités de recherche ont contribué à ces actions, à des fins diverses, telles que prévoir les périodes favorables au captage en mer, sélectionner des lignées d'animaux résistants aux maladies, déssaisonnaliser les périodes de reproduction, mettre au point les procédures de collecte, de traitement et de fécondation des gamètes. Les données recueillies apportent des informations nouvelles sur la biologie et la physiologie des bivalves, une somme de connaissances originales concernant les procédures que l'homme peut suivre pour réussir à contrôler les dates de reproduction, réaliser des fécondations et assurer le développement des embryons. A ces données, s'ajoutent celles qui commencent à apparaître sur des paramètres « indicateurs de la vitalité » des reproducteurs, des gamètes et des embryons de bivalves.

Le colloque organisé à Nantes, les 14 et 15 novembre 1995, a permis de réunir les différentes groupes d'IFREMER étant partie prenante dans les études sur la reproduction des bivalves. Chacun, dans son domaine de compétence, a présenté oralement des synthèses de résultats et pointé les informations qui manquent le plus.

Le colloque organisé à Nantes, les 14 et 15 novembre 1995, a permis de réunir les différents groupes d'IFREMER étant partie prenante dans les études sur la reproduction des bivalves. Chacun, dans son domaine de compétence, a présenté oralement des synthèses de résultats et pointé les informations qui manquent le plus.

Les pages qui suivent regroupent les documents écrits qui ont été produits à l'issue de présentations orales. Ils sont répartis en trois parties :

- I- Connaissance des cycles naturels, des gamètes et des embryons
- II- Contrôle artificiel de la reproduction
- III- Les indicateurs de qualité

La comparaison des travaux réalisés sur d'autres espèces animales marines était susceptible d'enrichir l'exercice. Une synthèse de la situation des programmes de recherche concernant les poissons marins à l'IFREMER a donc été présentée. Elle est insérée dans ce rapport. Le cas des crustacés a été évoqué, succinctement et oralement. En outre, les relevés de discussions sont annexés aux documents de synthèses.

Le groupe de travail a réuni 57 participants (voir liste jointe) dont l'origine est illustrée par les figures 1, 2 et 3. La participation aux exposés est résumée dans les figures 4 et 5 et les espèces cibles dans la figure 6. Parmi les participants figuraient plusieurs groupes de recherche extérieurs à IFREMER ayant participé aux travaux expérimentaux. Outre les représentants IFREMER et les Extérieurs directement impliqués dans la réalisation et l'encadrement des travaux, quatre chercheurs indépendants des travaux exposés et experts dans l'étude de la reproduction ont été conviés au groupe de travail.

L'ensemble des recherches a bénéficié de plusieurs contrats de recettes gérés par l'IFREMER : Grand Programme Qualité des Eaux d'Épuration 1992-1996, Contrat de Baie 1992-1996 ; Contrat de Plan Etat région Bretagne et Poitou Charentes, Subvention du Ministère des Affaires Etrangères 1992-1996. Le Ministère de l'Éducation Nationale a participé au financement d'une partie des travaux, en 1992, par le biais d'un contrat géré par l'INSERM. Les travaux des collaborateurs de l'IFREMER ont été soutenus par un fond de contrats d'incitation et de sous-traitance IFREMER.

A l'issue de ce groupe de travail, conçu comme un outil d'aide à la décision, des conclusions et des propositions d'orientation des programmes ont été rédigées sous forme de note (DRV/RA/Moll/N.Devauchelle, 96003 du 23 janvier 1996).

## LISTE DES PARTICIPANTS

<b>ARBAULT</b> Suzanne	IFREMER	Nantes	
<b>BARILLE</b> Laurent	Université	Nantes	
<b>BARRET</b> Jean	IFREMER	Brest	
<b>BAUD</b> Jean-Pierre	IFREMER	Bouin	
<b>BEKHADRA</b> Farida	UBO	Brest	
<b>BODOY</b> Alain	IFREMER	Nantes	
<b>BOEUF</b> Gilles	IFREMER	Brest	
<b>BOUDRY</b> Pierre	IFREMER	La Tremblade	
<b>CASSE</b> Nathalie	UBO	Brest	
<b>CLAUDE</b> Serge	IFREMER	La Trinité/Mer	(14 novembre)
<b>COCHARD</b> Jean-Claude	IFREMER	Tahiti	
<b>COLLET</b> Bertrand	IFREMER	La Tremblade	
<b>DAO</b> Jean-Claude	IFREMER	Brest	
<b>DARDIGNAC</b> Marie-José	IFREMER	L'Houmeau	
<b>DEVAUCHELLE</b> Nicole	IFREMER	Brest	
<b>DONVAL</b> Anne	UBO	Brest	
<b>FAURE</b> Catherine		Brest	ex thèse IFREMER/Brest
<b>FAUVEL</b> Christian	IFREMER	Palavas	
<b>GAIGNON</b> Jean-Louis	IFREMER	Brest	
<b>GERARD</b> André	IFREMER	La Tremblade	
<b>GIRARD</b> Jean-Pierre	Université	Nice-Sofia	
<b>GOULLETQUER</b> Philippe	IFREMER	La Tremblade	
<b>GOYARD</b> Emmanuel	IFREMER	La Trinité/Mer	
<b>GRIFFOND</b> Bernadette	URA-CNRS	Besançon (faculté de médecine)	
<b>GRIZEL</b> Henri	IFREMER	Sète	
<b>HARACHE</b> Yves	IFREMER	Brest	
<b>HEURTEBISE</b> Serge	IFREMER	La Tremblade	
<b>JOLY</b> Jean-Pierre	IFREMER	Port en Bessin	



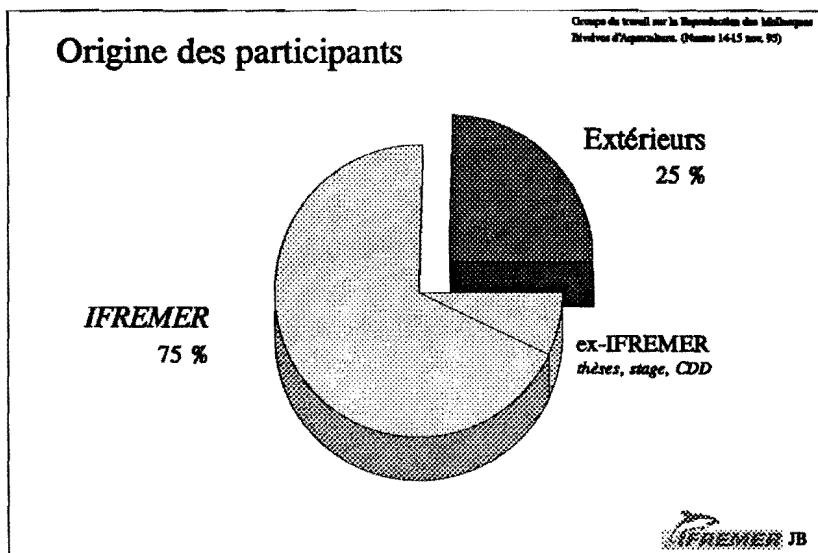


Figure 1

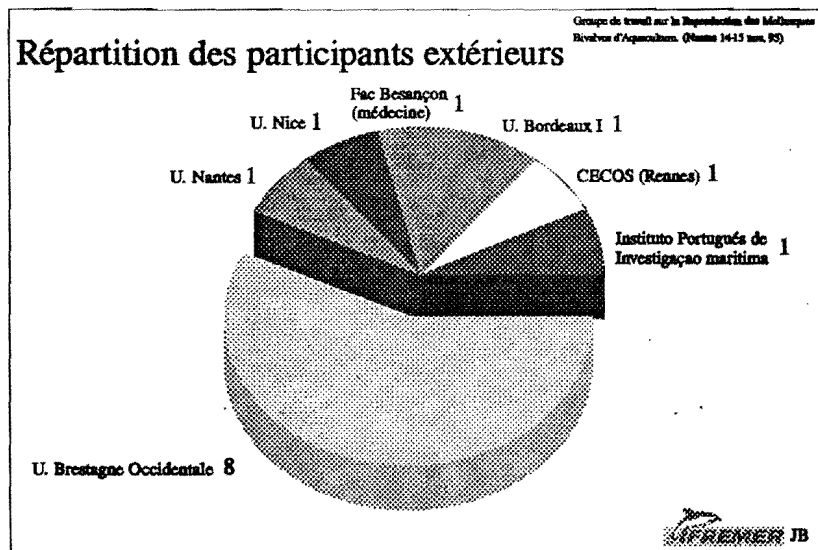


Figure 2

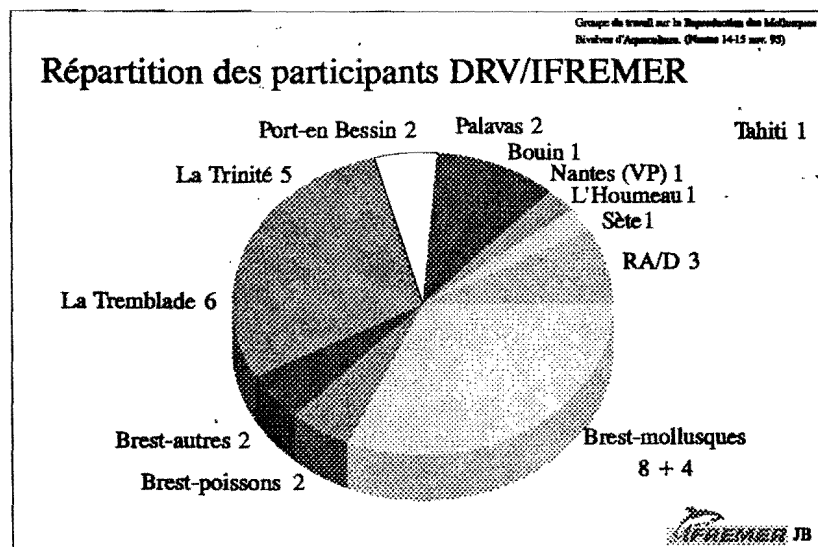


Figure 3

<b>LAMBERT</b> Christophe	IFREMER	Brest	
<b>LANGLADE</b> Aimé	IFREMER	La Trinité/Mer	
<b>LARVOR</b> Hélène		Lorient	ex thèse IFREMER/Brest
<b>LE MENN</b> Françoise	Université	Bordeaux 1	
<b>LE PENNEC</b> Marcel	UBO	Brest	
<b>MARTIN</b> Anne-Geneviève	IFREMER	La Trinité/Mer	
<b>MASSAPINA</b> Clara	Inst. Portugues de Investigacao Maritima Olhao		Portugal
<b>MAZURIE</b> Joseph	IFREMER	La Trinité/Mer	
<b>MICARELLI</b> Primo	IFREMER	Brest	CDD
<b>MILCENDEAU</b> Brigitte	IFREMER	Nantes	
<b>MOAL</b> Jeanne	IFREMER	Brest	
<b>NACIRI-GRAVEN</b> Yamama	IFREMER	La Tremblade	
<b>NICOLAS</b> Laurence	IFREMER	Brest	
<b>NONNOTTE</b> Liliane	UBO	Brest	
<b>NOUHANT</b> Sylvie	IFREMER	Nantes	
<b>PAULET</b> Yves-Marie	UBO	Brest	
<b>QUERE</b> Claudie	IFREMER	Brest	
<b>RENARD</b> Philippe	CECOS	Rennes	
<b>ROBERT</b> René	IFREMER	Brest	
<b>ROBILLARD-DOBOVICK</b> Nadia		Nantes	stage ingénieur IFREMER/Brest
<b>RUELLE</b> François	IFREMER	Port en Bessin	(14 novembre)
<b>SALAUN</b> Gilles	IFREMER	Brest	
<b>SAOUT</b> Christelle	UBO	Brest	
<b>SEGUINEAU</b> Catherine	IFREMER	Brest	
<b>SAMAIN</b> Jean-François	IFREMER	Brest	
<b>SOUDANT</b> Philippe	IFREMER	Brest	
<b>THOUARD</b> Emmanuel	IFREMER	Nantes	
<b>VERCELLI</b> Catherine	IFREMER	Palavas	
<b>VALDEZ</b> Maria-Eugenia	UBO	Brest	

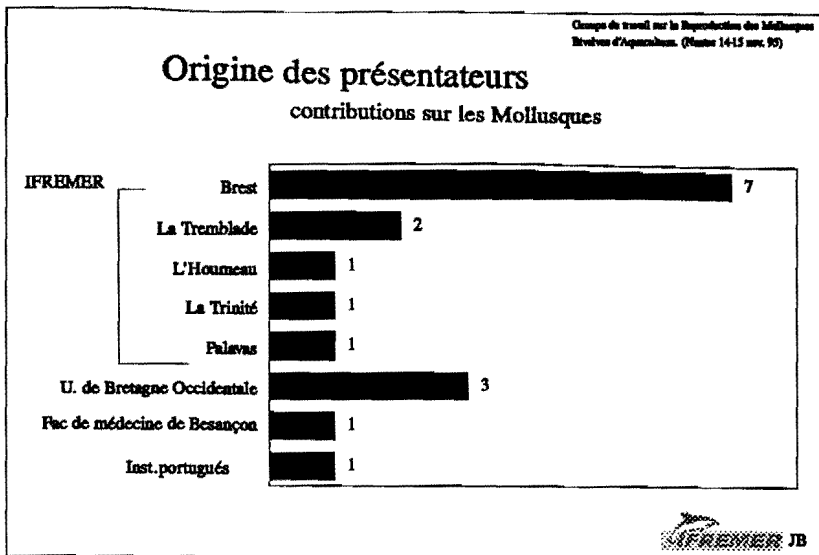


Figure 4

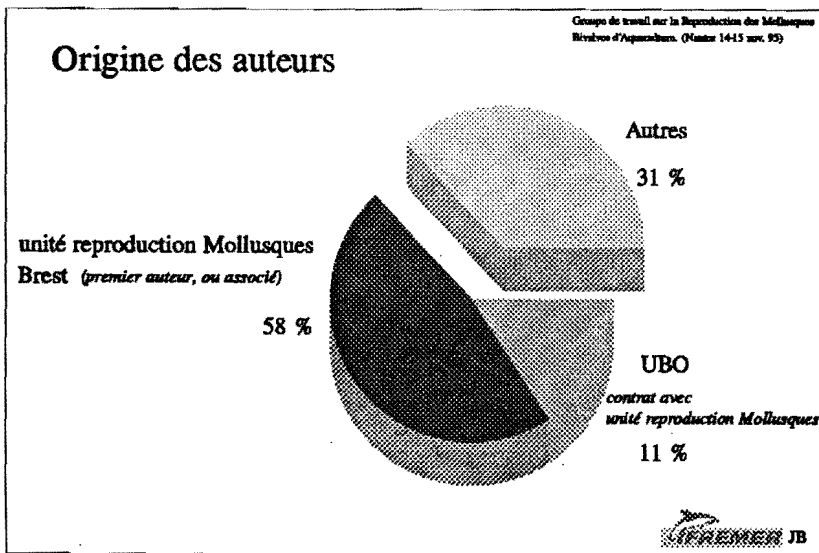


Figure 5

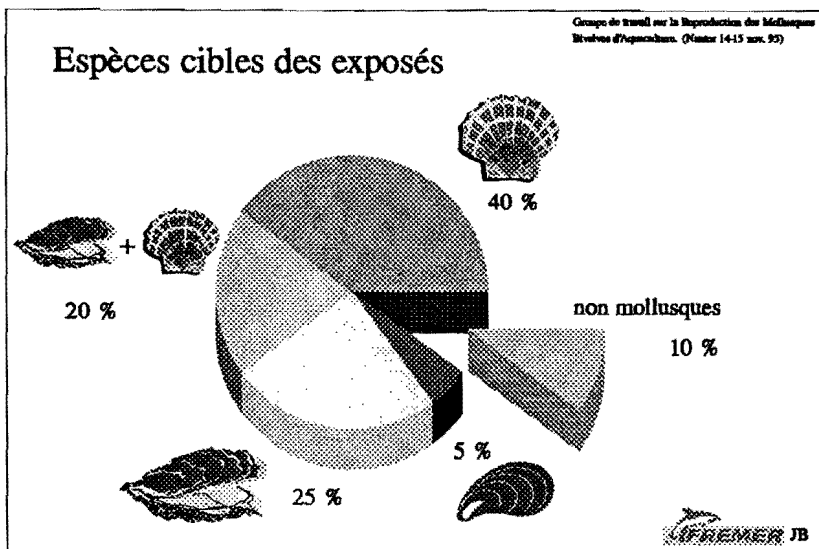


Figure 6

## CONNAISSANCE DES CYCLES NATURELS, DES GAMÈTES ET DES EMBRYONS

	page
Cycle de reproduction naturelle de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> <b>P. Gouletquer</b>	7
Cycle de reproduction naturelle de l'huître plate <i>Ostrea edulis</i> <b>A.G. Martin, A. Littaye-Mariette, A. Langlade et J.-P. Allenou</b>	21
Cycles de reproduction naturelle des moules <b>M-J. Dardignac</b>	35
Cycle de reproduction naturelle des coquilles Saint-Jacques <b>Y.M. Paulet, F. Bekhadra, A. Donval et C. Saout</b>	43
Recherche de facteurs neuropeptidiques impliqués dans le contrôle de la reproduction chez <i>Pecten maximus</i> <b>B. Griffond, F. Jégou et N. Devauchelle</b>	49
Monoamines et reproduction chez la coquille Saint Jacques <i>Pecten maximus</i> <b>F. Bekhadra, Y.M. Paulet, A. Donval et C. Saout</b>	51
Références physiologiques des gamètes : paramètres de l'activation des spermatozoïdes chez la coquille St-Jacques <i>Pecten maximus</i> (Linné) et chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg) <b>C. Faure, N. Devauchelle, JP. Girard et J. Cosson</b>	61
Etude du développement embryonnaire de <i>Pecten maximus</i> (L.) <b>N. Casse et N. Devauchelle</b>	69
Discussion Rapporteur : <b>J. Mazurié</b>	77

## CONTRÔLE ARTIFICIEL DE LA REPRODUCTION

Estimation des stades de maturite de bivalves <b>N. Devauchelle, M. Thielley et G. Salaün</b>	<b>81</b>
Contrôle de la gamétogenèse d'un stock d'huîtres plates méditerranéennes <i>Ostrea edulis</i> <b>C. Vercelli, D. Coatanéa, J.M. Chabirand et J. Oheix</b>	<b>91</b>
Contrôle de la gamétogenèse des huîtres creuses et plates. Relations "reproduction" et "génétique". <b>A. Gérard, Y. Naciri-Graven, P. Boudry, S. Launay, S. Heurtebise, C. Ledu et P. Phelipot</b>	<b>99</b>
Etat actuel des connaissances sur la reproduction artificielle de l'huître <i>Crassostrea angulata</i> au Portugal <b>C. Massapina, E. Dores, D. Matias, S. Joaquim et N. Devauchelle</b>	<b>113</b>
Contrôle de la gamétogenèse chez la coquille saint-Jacques : Température et photopériode <b>J. Barret et N. Devauchelle</b>	<b>127</b>
Nutrition et reproduction des bivalves <b>J.F. Samain, C. Saout, P. Soudant, J.R. Le Coz, C. Segueineau, C. Queré, J.P. Connan, M. Mazuret, P. Miner, M.L. Muzellec, Y. Marty, J. Moal, Y.M. Paulet et R. Robert</b>	<b>137</b>
Induction de la ponte chez la coquille Saint-Jacques : Utilisation des neurotransmetteurs <b>N. Devauchelle, N. Robillard, , P. Micarelli et P. Guerrier</b>	<b>149</b>
Discussion Rapporteur : <b>Y. Naciri-Graven</b>	<b>157</b>

## INDICATEURS DE QUALITÉ

- Caractérisation des parties dures du reproducteur de  
coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus*  
**H. Larvor, N. Devauchelle, J-P. Cuif et G. Salaün** 161
- Variations de la qualité des embryons de *Crassostrea gigas* et de *Pecten maximus*  
dues à la qualité des gamètes  
**N. Devauchelle, J. Cosson, G. Dorange, N. Doubovick, C. Faure, J.P. Girard,  
P. Micarelli, L. Orsini et M.E. Valdez** 173

## REGARD SUR LA REPRODUCTION DES POISSONS

- Le programme Reproduction et stades précoces des poissons à l'*IFREMER*  
**J.-L. Gaignon** 201

## Synthèse et discussion

- Rapporteurs  
**E. Thouard et H. Grizel** 211



**CONNAISSANCE DES CYCLES NATURELS,  
DES GAMETES ET DES EMBRYONS**





## CYCLE DE REPRODUCTION NATURELLE DE L'HUITRE CREUSE *Crassostrea gigas*

**P. GOULLETQUER**

IFREMER/GAP/URAPC B.P. 133 La Tremblade. (F)

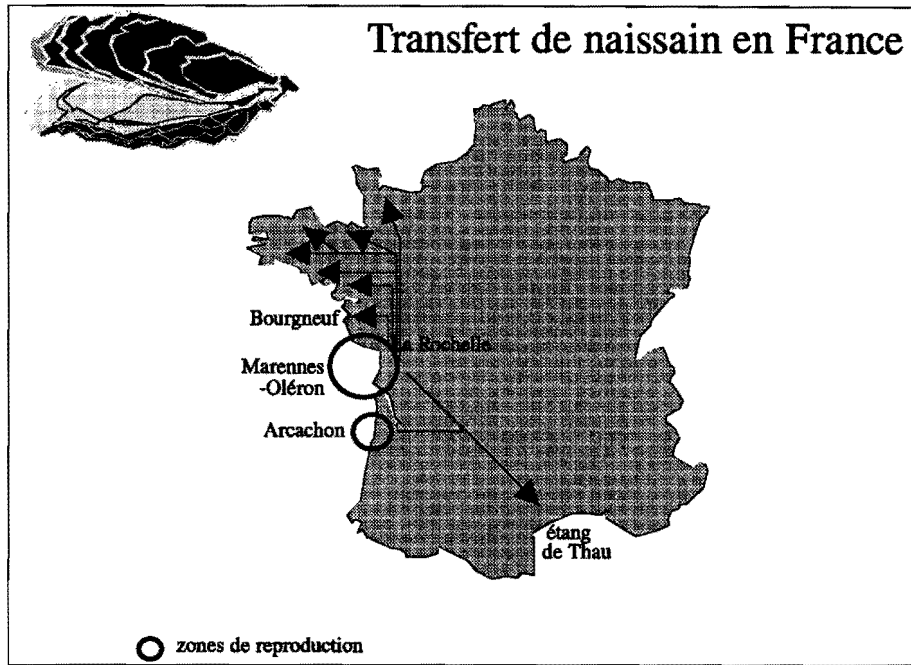
**Résumé :** Depuis l'introduction dans les années 1970 de *Crassostrea gigas* sur le littoral français, seuls deux secteurs (i.e., littoral charentais, Bassin d'Arcachon) ont permis un cycle de reproduction complet aboutissant à un recrutement annuel régulier, et l'établissement de populations naturelles. Dans les autres bassins de production (Normandie, Bretagne, Vendée, Méditerranée), une gamétogénèse complète peut s'effectuer aboutissant à une ponte, et parfois un recrutement lorsque les conditions thermiques sont favorables. Le facteur « température » apparaît comme le principal facteur limitant la reproduction dans le milieu naturel. Les phases de croissance et de reproduction sont simultanées. Le cycle de reproduction des huîtres de 1 an montre une évolution asynchrone de la gamétogénèse avec une forte variabilité interannuelle alors que la phase de croissance apparaît prioritaire pour ces animaux. A l'inverse, les individus plus âgés montrent une maturation synchrone aboutissant à 1 ou 2 pontes massives, avec un métabolisme orienté de façon prioritaire vers la reproduction. L'effort de reproduction croît avec l'âge pour atteindre un poids de gamètes représentant 60% et 80% du poids sec de chair à l'âge de 2 et 3 ans respectivement. L'huître *C. gigas* est généralement considérée comme une espèce à hermaphrodisme successif protandrique. Des inversions de sexe sont toutefois observées chez les animaux adultes.

### SITUATION SUR LE LITTORAL FRANÇAIS

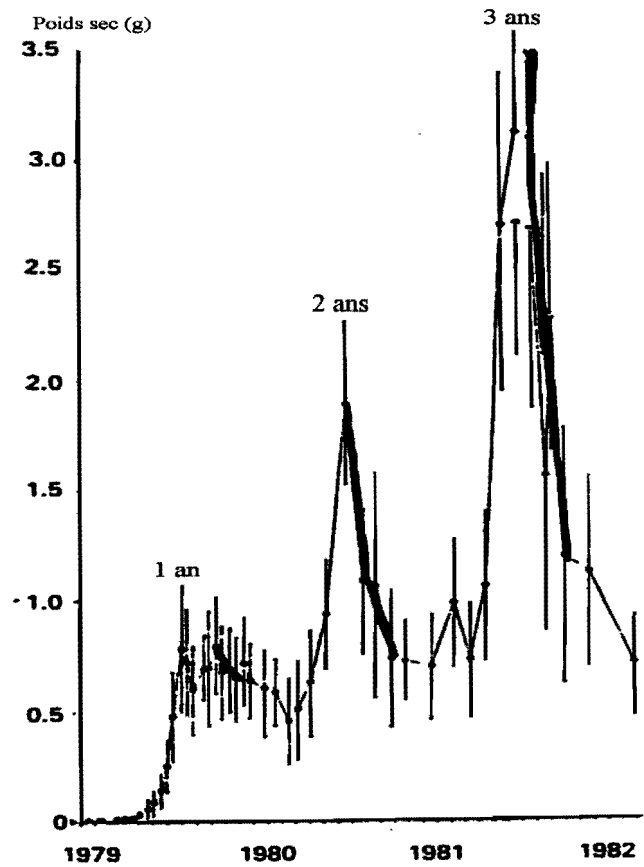
Depuis l'introduction dans les années 1970 de *C. gigas* sur le littoral français, seuls deux secteurs (i.e., littoral charentais, Bassin d'Arcachon) permettent un cycle de reproduction complet aboutissant à un recrutement annuel régulier sur lequel est basée 90% de la production française d'huîtres creuses (Gouletquer et Héral, 1991 ; Fig.1). Des populations naturelles ont pu s'établir en Charente-Maritime, de la Baie de l'Aiguillon à l'estuaire de la Gironde ainsi qu'à Arcachon (Héral, 1990). Les huîtres élevées dans les autres bassins de production montrent des gamétogénèses complètes suivies de pontes dès que les températures sont favorables (Normandie : Joly *et al.*, 1995 ; Bretagne : Auger, 1976 ; Vendée : Haure, 1994). Dans la Baie de Bourgneuf, une perte de poids de chair de 35 à 48% est observée sur des animaux de 2 ans lors de la ponte. Par contre, le recrutement dans ces secteurs est quasiment inexistant, du fait de la fragilité de la phase larvaire initiale plus sensible aux facteurs environnementaux que les adultes (Mann *et al.*, 1991 ; Tab.1). Un faible recrutement de juvéniles est observé irrégulièrement en Normandie, Vendée et Méditerranée (Thau).

### EVOLUTION DU CYCLE DE REPRODUCTION

En fin d'automne, l'huître présente une activité réduite de la gonade jusqu'au printemps suivant (octobre à mars). La gamétogénèse se déroule selon un rythme très lent pendant cette période (e.g.: mitoses goniales) qui ne correspond pas à un véritable repos sexuel (Lubet, 1991). Les lignées germinales se développent, de façon active, à la fin de l'hiver (7-8°C), pour s'accélérer au printemps et arriver à la maturité sexuelle en juillet.



**Figure 1.** Zones de reproduction, et transferts de naissain d'huître creuse.



**Figure 2.** Evolution du poids sec de *Crassostrea gigas* (nées en 1978), en fonction de l'âge. Les barres verticales représentent la variance femelles, males (d'après Deslous-Paoli et Heral, 1988)

D'un point de vue biochimique, ce cycle se caractérise par une phase de stockage en glycogène dès le réchauffement printanier de la température, qui sera rapidement métabolisé en lipides (vitellogénèse) dans le mois qui précède la ponte (Gabbott, 1975 ; Maurel et Borel, 1986 ; Deslous-Paoli, 1980). Une température minimale de 17-18°C semble nécessaire pour le déclenchement de la ponte (Gras *et al.*, 1971). Par ailleurs, l'huître *C. gigas* est considérée comme une espèce à hermaphrodisme successif protandrique (Buroker, 1983). La fécondité peut atteindre 7 à 10 millions d'oeufs de 45-60µm de diamètre (Amemiya, 1928), et plus généralement 50 à 100 millions d'oeufs pour les adultes (Quayle, 1969 ; Walne, 1974). Elle croît avec l'âge en représentant 7% du poids sec de chair, 60% et 80% à 2 ans et 3 ans respectivement sur Marennes-Oléron (Deslous-Paoli et Héral, 1988 ; Fig.2). Cette fécondité est, par ailleurs, fonction des paramètres environnementaux trophiques et thermiques et peut donc varier largement (Berthomé *et al.*, 1982 ; Deslous-Paoli *et al.*, 1982 ; Héral *et al.*, 1986ab ; Maurel et Borel, 1986 ; Haure, 1994 ; Joly *et al.*, 1995 ; Fig.3). La phase pélagique (oviparité) dure de 15 à 28 jours en fonction de la température ambiante. La survie larvaire semble également dépendre plus directement de la température que de la salinité (Fig.4). Une température inférieure à 17°C a induit un défaut de recrutement en 1981 et 1986. La fixation s'effectue au stade pédiveligère (300 µm) au moment de la métamorphose.

## CONDITIONS D'ELEVAGE AFFECTANT LA REPRODUCTION

Robert *et al.* (1993) montre que les conditions zootechniques peuvent influencer l'état de maturation du cheptel (i.e., cylindre Stainway vs poche). A une plus large échelle, la dimension de la population ne semble pas influencer à court terme sur le niveau de recrutement (relation stock-recrutement).

## FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX CONTROLANT LE CYCLE DE REPRODUCTION

### Température

A Marennes-Oléron, la date de ponte et l'étude du cumul des températures, de 1972 à 1985, montrent des corrélations négatives entre l'automne précédant la ponte et la date de celle-ci, mais également entre le printemps précédant la ponte et celle-ci (Héral *et al.*, 1986a). Ceci confirme les travaux de Lubet (1980) montrant l'importance des températures automnales dans le déclenchement de la gamétogénèse et la relative indépendance vis-à-vis des conditions hivernales. En fait, la reprise de l'activité génitale est indépendante de la température du milieu au moment de la réactivation de la gonade : celle-ci se produit grâce à la mise en place d'un programme complexe neuroendocrinien établi à la fin du cycle sexuel précédent, mettant en jeu l'action combinée de la température, de la nutrition et des réserves énergétiques. La température a, par contre, un impact direct sur la vitesse de la gamétogénèse au printemps. La notion de Degré Jour a été développée sur *C. gigas* par Mann (1979) et Héral (1990). Ce dernier obtient la relation  $y=282^{-2,87} \times \text{Temp (septembre à juin)}^{+1,078} \times \text{Temp (mars à juin)}$  avec  $R=0,92$ , pour le bassin de Marennes-Oléron. Par ailleurs, si la température décroît en dessous de 15°C la gamétogénèse ralentit, mais elle peut se réactiver dès le réchauffement au delà de 15°C (Mann, 1979 ; Tab.1). Selon Lubet (1991), environ 1900 DD sont requis pour atteindre la maturité sexuelle. Toutefois Muranaka et Lannan (1984) précisent que l'effet de l'intensité de la température et de sa durée est prépondérant sur celui de l'accumulation à une exposition

**Tableau 1.** Tolérance des espèces *Crassostrea* à la température et à la salinité. Les optimum sont donnés entre parenthèses; (modifié d'après Mann *et al.*, 1991)

**Adultes croissance et ponte**

Species	Temperature (°C)		Salinity (ppt)		Reference
	Growth	Spawning	Growth	Spawning	
virginica	5-34 (28-32)	18-25 (23)	>5 (12-27)	>8	7,8,20,21,22,31,
angulata	20-30	20	21-43	<33	3,4,16
araikensis		7-40 (30-40)			5,11,16
gasar	25-30	5-34	14-20		1,28,29
gigas	3-35 (11-34)	16-30 (20-25)	10-42 (35)	10-30 (20-30)	2,4,15,18,19,24,25
gryphoïdes	19-33	27-31	4-40 (30-40)	13-29	11,13,23
iredali	30-33	<45	>15		4
madrasensis	26(30)	1-41 (8-25)	17-35 (20-35)		16,17,26,27,30
nippona	no data				
rhizophorae			22-40 (26-37)		4,5,12
taurica	3-28	17-18			32

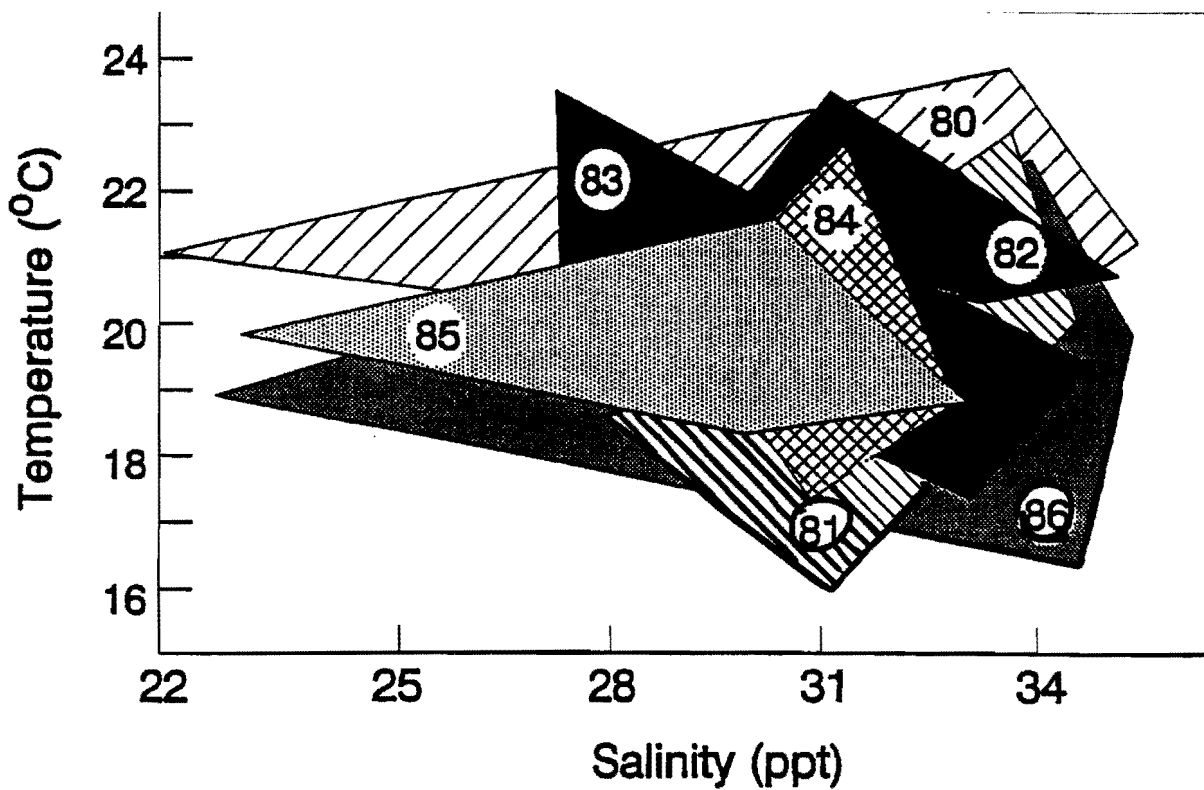
**Larves**

Species	Temperature (°C)	Salinity (ppt)	Reference
virginica	20-33	8-39 (10-29)	3,9,10
angulata		21-43 (28-35)	3,4,16
araikensis	20-28 (26-28)	10-30 (20)	5
gigas	18-35 (30)	19-35	2,14,15
rhizophorae	<30 (25)	20-40 (28)	12

no data available for gasar, gryphoïdes, iredali, madrasensis, nippona and taurica

Reference :

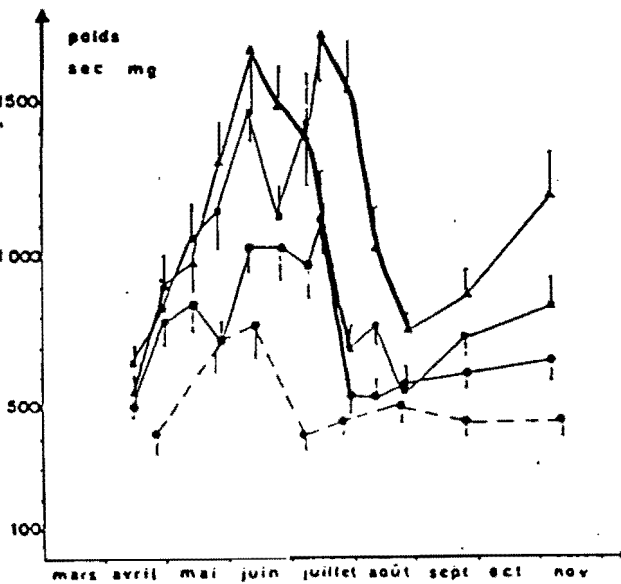
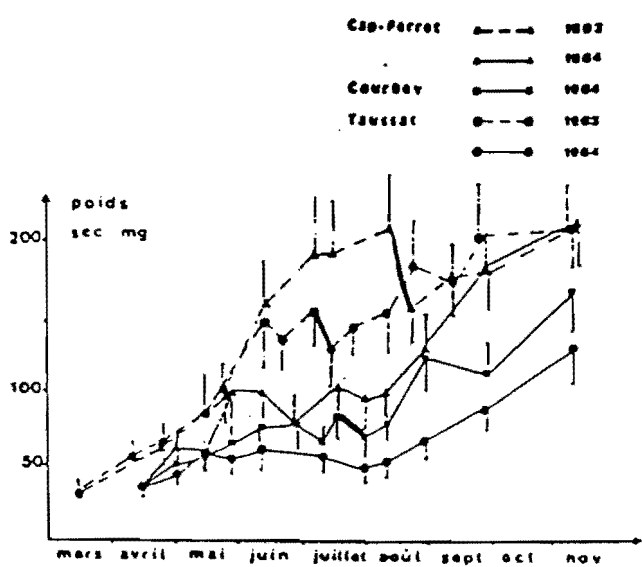
1. Ajana, 1980; 2. Allen *et al.*, 1988; 3. Amemiya, 1926; 4. Bardach *et al.*, 1972; 5. Boveda and Rodriguez, 1967; 6. Breese and Malouf, 1977; 7. Butler, 1949; 8. Chanley, 1958;
10. Davis, 1958; 9. Davis and Calabrese, 1964; 11. Desai *et al.*, 1982; 12. Dos Santos and Nascimento, 1985; 13. Durve, 1965; 14. His *et al.*, 1989; 15. Hugues-Games, 1977;
16. Jhingran and Gopalakrishnan, 1974; 17. Joseph and Madhyastha, 1984; 18. King, 1977;
19. Le Gall and Raillard, 1988; 20. Loosanoff, 1958; 21. Loosanoff, 1969; 22. Loosanoff and Davis, 1952; 23. Mane, 1978; 24. Muranaka and Lannan, 1984; 25. Nell and Holliday, 1988;
26. Rao, 1951; 27. Rao and Naylor, 1956; 28. Sandison, 1966; 29. Sandison and Hill, 1966;
30. Stephen, 1980; 31. Wells, 1961; 32. Zenkevitch, 1963.



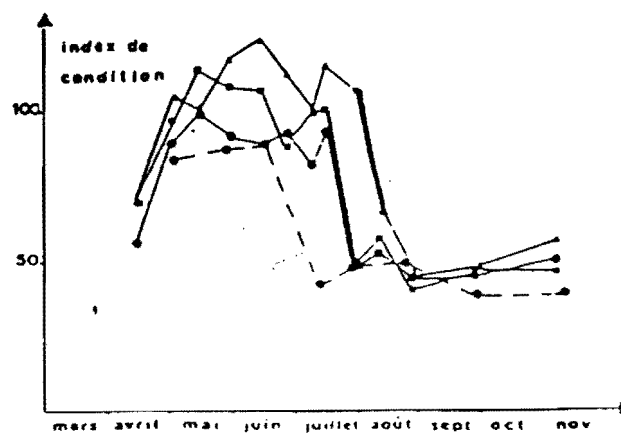
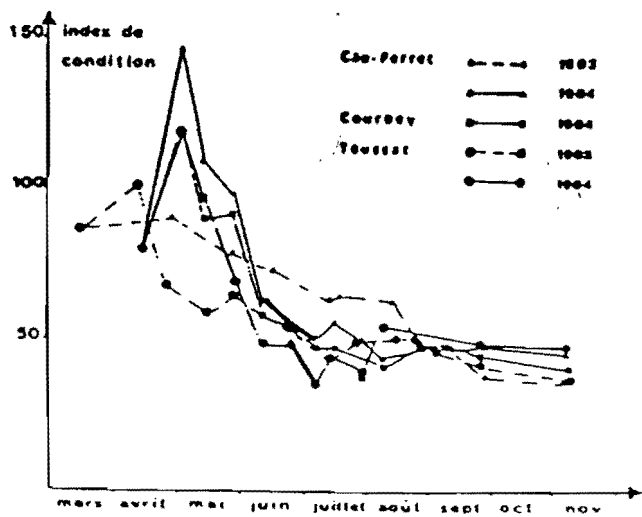
**Figure 3.** Effet combiné de la température et de la salinité sur le recrutement interannuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron. Recrutement faible en 1981 et 1986 (d'après Heral, 1990).

1 an

2 ans



Evolution des poids secs



Evolution de l'indice de condition

Figure 4. Comparaison des évolutions des poids secs et des indices de condition d'huîtres d'un an et de deux ans, dans le bassin d'Arcachon (Maurer et Borel, 1986)

thermale en ce qui concerne la maturation. La durée de maturation est donc d'autant plus courte que la température est élevée sans dépasser les 25°C (Loosanoff et Davis, 1950). Les durées de vie larvaire sont thermodépendantes, atteignant 15 jours à 24-25°C et 28 jours à 20-22°C. Dans les conditions les plus favorables, les taux de survie dans le milieu naturel seraient de 10%.

### **Salinité**

L'huître japonaise se reproduit dans une gamme très large de salinité (10-30 ppt) (Mann *et al.*, 1991 ; Tab.1). Ce facteur est donc moins limitant sur nos côtes que le précédent. L'optimum serait de 25 ppt selon Helm et Millican (1977) et de 20 à 30 ppt selon Mann *et al.* (1991). Par contre, Muranaka et Lannan (1984) obtiennent expérimentalement des taux de survie, larvaire et postlarvaire, supérieurs avec des expositions à des salinités de 30 ppt. L'impact des conditions initiales du conditionnement des géniteurs sur les taux de survie et de croissance des larves est, par ailleurs, souligné.

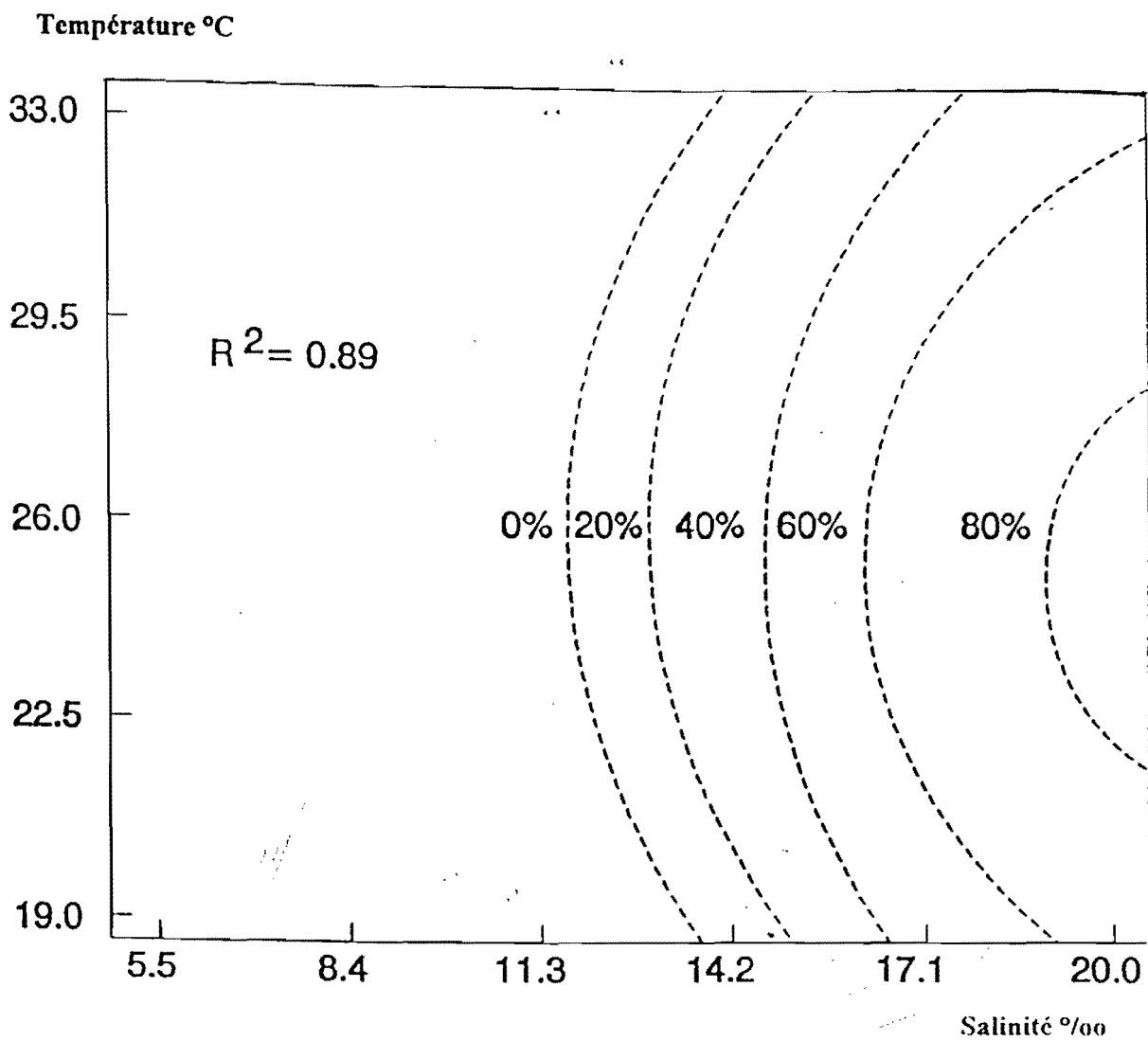
### **Synergie Température - Salinité**

Selon Marteil (1976), plus les salinités sont élevées en cours de maturation, plus les températures requises pour la ponte sont fortes. L'auteur précise que l'évolution des larves est favorisée à des températures supérieures à 22°C même pour des salinités de l'ordre de 34 ppt. A des températures inférieures à 20-21°C, cette évolution reste possible d'autant plus que la salinité est plus basse que 34 ppt. Par exemple, les salinités élevées de 34 ppt en 1976 n'ont pas altéré l'évolution des larves car les températures étaient restées supérieures à 21°C. L'optimum pour la survie larvaire dans le bassin de Marennes-Oléron est estimé à 25 ppt pour une température de 20-21°C (Héral, 1990 ; Fig.4). A la différence du modèle développé sur *C. virginica* par Davis et Calabrese (1964) qui permet une analyse prédictive des survies larvaires (Gouilletquer *et al.*, 1994), seuls les travaux de His *et al.* (1989) permettent d'aborder l'effet combiné de la température et salinité sur les taux de survie et de croissance des larves de *C. gigas* (Fig.5).

### **Nutrition**

Dans les conditions environnementales naturelles, le facteur nutrition en terme de disponibilité alimentaire, est particulièrement important afin d'obtenir un déroulement normal de la gamétogénèse. Ce facteur agit sur la fécondité ainsi que sur le recrutement. Toutefois, ce paramètre est principalement dépendant des conditions thermiques enregistrées dans le milieu naturel (Berthomé *et al.*, 1982). L'analyse du défaut de recrutement en 1981 par Deslous-Paoli *et al.* (1982) est remarquable à ce titre : l'année 1979 a montré un captage pléthorique de naissains de *C. gigas* à la différence de 1981. La composition biochimique des mâles, en août 1981, a montré un déficit en protéines de 6,3%, 34,2% en lipides et 61,2% en glucides. Les déficits pour les femelles sont de 12,3 , 21,3 et 69,8% bien que la teneur énergétique relative de la chair des femelles est identique, à la différence des mâles, entre les 2 années (Fig.6). En 1981, un retard important de la gamétogénèse a été observé par rapport à 1979 du fait d'un bloom phytoplanctonique printanier déficitaire. Une absence d'accumulation de glycogène par les huîtres fut notée au printemps 1981 ainsi qu'une action déficitaire de la température en fin de gamétogénèse. La ponte principale fut retardée jusqu'à l'automne où les conditions environnementales, défavorables à la survie larvaire, limita fortement le recrutement. Ceci démontre à nouveau l'importance de la synergie des facteurs et de la nécessaire approche multifactorielle dans l'étude des processus de reproduction de *C. gigas*.





**Figure 5.** Survie estimée (%) des larves de *C. virginica* après 2 jours de développement en fonction de la température et de la salinité (R.G. Lough, 1975 ; Davis and Calabrese, 1964)

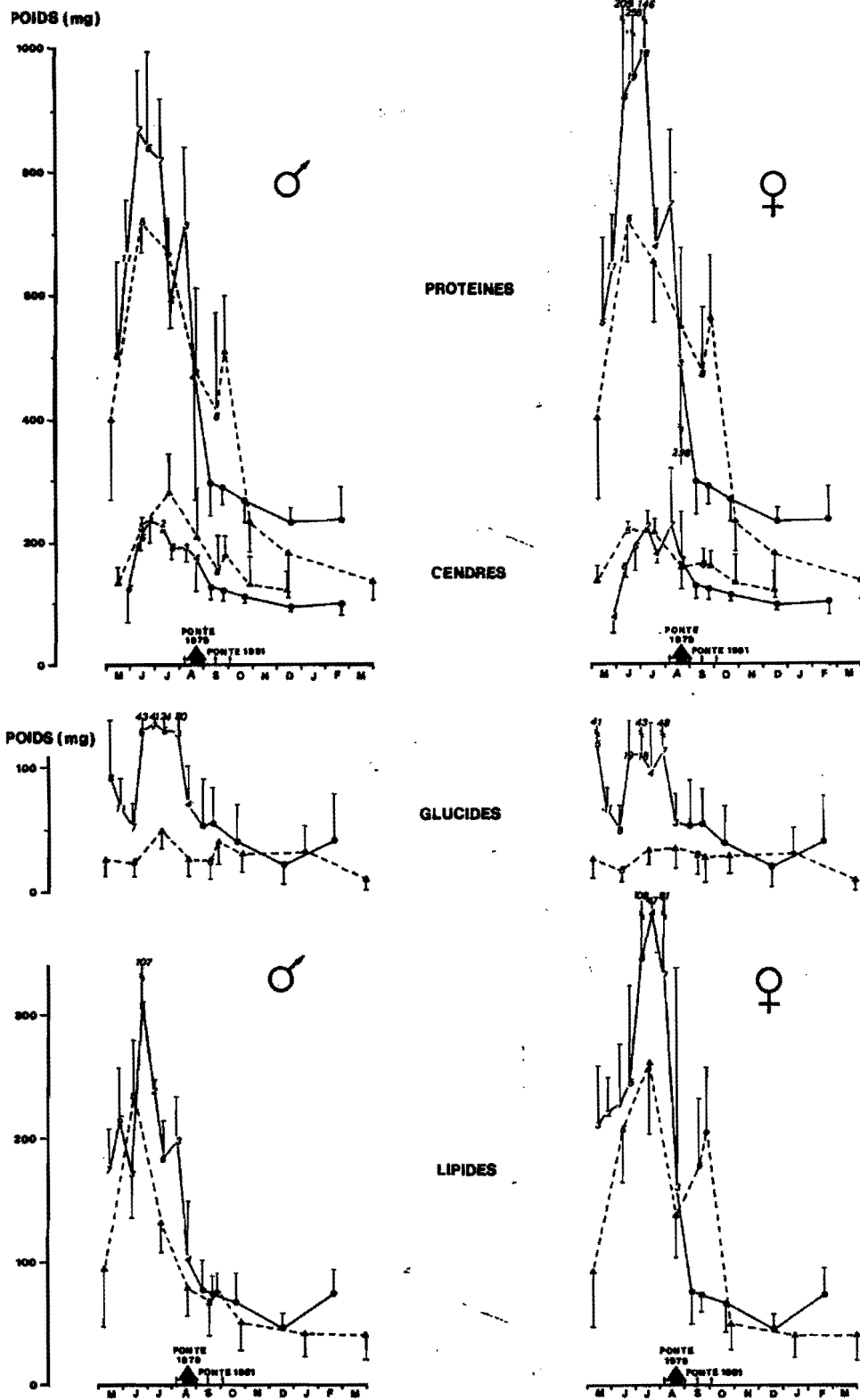


Figure 6. Evolution comparée des paramètres biochimiques de l'huître en 1979 et 1981. (Deslous-Paoli *et al.*, 1982)

## Références

- Ajana A.M., 1980.** Fishery of the mangrove oyster *Crassostrea gasar* Adanson (1757) in the Lagos area, Nigeria. *Aquaculture*, **21(2)** : 129-137
- Allen M.J., R.J. Wolotira, T.M. Sample, S.F. Noel & C.R. Iten, 1988.** Life history and harvest information for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). NWAFC Tech. Mem. Ser.
- Amemiya I., 1926.** Notes on experiments on the early developmental stages of the Portuguese, American, and English native oysters, with special reference to the effect of the varying salinity. *J. mar. Biol. Assoc. U.K.*, **31(1)** : 161-175.
- Amemiya I., 1928.** Ecological studies of Japanese oysters, with special reference to the salinity of their habitat. *J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, **9(5)** : 333-375.
- Arakawa K.Y., 1990.** Natural spat collecting in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Mar. Behav. Physiol.*, **17** : 95-128.
- Auger C., 1976.** Etude de deux variétés de *C. gigas*, leur acclimatation en rivière d'Etel. Thèse 3ème cycle, Paris VI, 80p.
- Bardach J.E., J.H. Ryther & W.O. McLarney, 1972.** Aquaculture: the farming and husbandry of freshwater and Marine Organisms. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY : 868p.
- Berthomé J.P., J.M. Deslous-Paoli, M. Héral, D. Razet & J.Garnier, 1982.** Absence de captage de *C. gigas* dans le Bassin de Marennes-Oléron en 1981 : causes et conséquences. CIEM F. 26, 14 p.
- Boveda J.V.P. & R.J. Rodriguez, 1987.** Supervivencia de la ostra de mangle *Crassostrea rhizophorae* (Gilding, 1828) a las variaciones de temperatura, salinidad y pH. *Sociedad de Ciencias Naturales la Salle Memoria*, **47(127-128)** : 217-231.
- Breese W.P. & R.E. Malouf, 1977.** Hatchery rearing techniques for the oyster *Crassostrea rivularis* Gould. *Aquaculture*, **12** : 123-126.
- Buroker N.E., 1983.** Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *C. gigas*. *Malacologia*, **23(2)** : 271-279.
- Butler P.A., 1949.** Gametogenesis of the oyster under conditions of depressed salinity. *Biol. Bull.*, **96(3)** : 263-269
- Chanley P.E., 1958.** Survival of some juveniles bivalves in water of low salinity. *Proc. Nat. Shellfish Assoc.*, **48** : 52-65.
- Davis H.C., 1958.** Survival and growth of clam and oyster larvae at different salinities. *Biol. Bull.*, **114(1)** : 57-70.
- Davis H.C. and A. Calabrese, 1964.** Combined effects of temperature and salinity on development of eggs and growth of larve of *M. mercenaria* and *C. virginica*. US Fish Wildlife Services. *Fishery Bulletin*, **63** : 643-655.
- Desai K.M., B. Patel & H. Dave, 1982.** Laboratory rearing of eggs and larvae of edible oysters of the Gulf of Kutch. proceedings of the Symposium on Coastal Aquaculture, Cochin, India, 1980,6 : 704.
- Deslous-Paoli, 1980.** Contribution à l'étude de la biologie de l'huître *C. gigas* Thunberg dans le Bassin et les claires de Marennes-Oléron. Thèse 3ème cycle, Université d'Aix Marseille II. 121 p.
- Deslous-Paoli J.M. and M. Héral, 1988.** Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* cultured in the Bay of Marennes-Oléron. *Aquat. Liv. resources*, **1**, 239-249.

- Deslous-Paoli J.M., M. Héral, Berthomé J.P., D. Razet et J. Garnier, 1982.** Reproduction naturelle de *C. gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981: aspects biochimiques et énergétiques. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* **45(4)** : 319-327.
- Dos Santos A.E. & I.A. Nascimento, 1985.** Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal development of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828. *Aquaculture*, **47(4)** : 335-352.
- Durve V. S., 1965.** On the seasonal gonadal change and spawning in the adult oyster *Crassostreagryphoides* (Schlotheim). *J. Mar. Biol. Assoc. India*, **7(2)** : 328-344.
- Gabbott P.A., 1975.** Storage cycle in marine molluscs: an hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. Proc. 9<sup>th</sup> Europ. Mar. Biol. Symp. : 191-211.
- Gouletquer P. and M. Héral, 1991.** Aquaculture of *Crassostrea gigas* in France. The ecology of *C. gigas* in Australia, New Zealand, France and Washington State. Oyster Ecology Workshop, Annapolis, USA : 12-19.
- Gouletquer P., M. Héral and J. Prou, 1994.** Combined effects of temperature-salinity on larval survival of the Eastern oyster *C. virginica* in the Maryland portion of the Chesapeake Bay (USA). *Haliotis*, **23** : 71-86.
- Gras P., M. Comps, A. David et G. Baron, 1971.** Observations préliminaires sur la reproduction des huîtres dans le bassin de Marennes-Oléron en 1971. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches Maritimes*, **207**, 16 p.
- Haure J., 1994.** Approche de la capacité trophique dans un bassin ostréicole (Baie de Bourgneuf). Diplôme EPHE, 110 p.
- Héral M., 1990.** Traditional oyster culture in France. In Barnabé Edit., Bases biologiques & écologiques de l'aquaculture. Lavoisier, Tec & Doc, V1 : 347-397.
- Héral M., J.M. Deslous-Paoli et J. Prou, 1986a.** Influence du climat sur le recrutement et sur la production d'huîtres cultivées (*C. angulata* et *C. gigas*) dans le Bassin de Marennes-Oléron. *Haliotis*, **15** : 193-207.
- Héral M., J.M. Deslous-Paoli et J. Prou, 1986b.** Dynamique des productions et des biomasses des huîtres creuses cultivées *C. angulata* et *C. gigas* dans le Bassin de Marennes-Oléron depuis un siècle. Cons. Inter. Explor. Mer, CM 1986/F 41 : 23 p.
- Helm M.N. and P.F. Millican, 1977.** Experiments in the hatchery of Pacific oyster larvae *C. gigas*. *Aquaculture*, **11** : 1-12.
- His E., R. Robert and A. Dinet, 1989.** Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol* **100** : 455-463.
- Hughes Games W.L., 1977.** Growing the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in subtropical seawater fishponds: 1. growth rate, survival and quality index. *Aquaculture*, **11(3)** : 217-230.
- Jhingran V.G. and V. Gopalakrishnan, 1974.** Catalogue of cultivated aquatic organisms. *FAO Fisheries Technical Paper*, **130** : 83 p.
- Joly J.P., F. Ruelle et E. Legagneur, 1995.** Contrôle des performances biologiques de populations diploïdes et triploïdes d'huîtres creuses *C. gigas* en Baie des Veys. Rapport IFREMER 17 p.
- Joseph M.M. and M.N. Madhyastha, 1984.** Annual reproductive cycle and sexuality of the oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston). *Aquaculture*, **40(3)** : 223-231.
- King M.G., 1977.** Cultivation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a non-tidal hypersaline pond. *Aquaculture*, **11(2)** : 123-136.

- Le Gall J.L. and O. Raillard, 1988.** Influence de la température sur la physiologie de l'huître *Crassostrea gigas*. *Oceanis*, **14(5)** : 603 -608
- Loosanoff V.L., 1958.** Some aspects of behavior of oysters at different temperatures. *Biol. Bull.*, **114(1)** : 57-70.
- Loosanoff V.L., 1969.** Maturation of gonads of oysters *Crassostrea virginica* of different geographical areas subjected to relatively low temperatures. *Veliger*, **11(3)** : 153-163.
- Loosanoff V.L. and H.C. Davis, 1950.** Spawning of oysters at low temperature. *Science*, **3(2889)** : 521.
- Lough R. G., 1975 .** A reevaluation of the combined effects of temperature and salinity on survival and growth of bivalve larvae using response surface techniques. *Fishery Bulletin*, **73(1)** : 86-94.
- Lubet P., 1980.** Influence des facteurs externes sur la reproduction des lamellibranches. *Oceanis* **6(5)** : 469-489.
- Lubet P., 1991.** Bases biologiques de la culture des mollusques. In Barnabé Edit., Bases biologiques & écologiques de l'aquaculture. Lavoisier, Tec & Doc, 166-189.
- Mane U.H., 1978.** Survival and behavior of oysters in water of low salinities at Ratnagiri on the West coast of India. *J. Molluscan Studies*, **44(2)** : 243-249.
- Mann R., 1979.** Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *C. gigas* and *O. edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **59** : 95-110.
- Mann R., E. Burreson and P.K. Baker, 1991.** The decline of the Virginia oyster fishery in Chesapeake bay: considerations for introduction of a non-endemic species, *C. gigas*. *Jour. Shell. Res.* **10(2)** : 379-388.
- Marteil L., 1976.** La conchyliculture française, 2ème partie. Biologie de l'huître et de la moule. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **40(2)** : 149-346.
- Maurer D. et M. Borel, 1986.** Croissance, engraissement et cycle sexuel de *C. gigas* dans le Bassin d'Arcachon: comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis*, **15** : 125-134.
- Muranaka M.S. and J.E. Lannan, 1984.** Broodstock management of *C. gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* **39** : 217-228.
- Nell J.A. & J.E. Holliday, 1988.** Effects of salinity on the growth and survival of Sydney Rock oyster *Saccostrea commercialis* and Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae and spat. *Aquaculture*, **68(1)** : 39-44.
- Quayle D.B., 1969.** Pacific oyster culture in British Columbia. *Fisheries Research Board of Canada*, **169** : 193 p.
- Rao K.V., 1951.** Observations on the probable effects of salinity on the spawning, development, and setting of the Indian backwater oyster, *Ostrea madrasensis* Preston. *Proc. Indian Acad. Sci.*, **33** : 231-256.
- Rao K.V. & K.N. Naylor, 1956.** Rate of growth in spat and yearlings of the Indian backwater oyster *Ostrea madrasensis* Preston. *Indian J. Fisheries*, **3(2)** : 231-260.
- Robert R., G. Trut, M. Borel and D. Maurer, 1993.** Growth, fatness and gross biochemical composition of the Japanese oyster *C. gigas* in Stainway cylinders in the Bay of Arcachon, *Aquaculture*, **110** : 249-261.
- Sandison E.E., 1966.** The effect of salinity fluctuations on the life cycle of *Gryphea gasar* ((Adanson) Dautzenberg) in Lagoos Harbor, Nigeria. *J. Animal Ecol.*, **35(2)** : 379-389.
- Sandison E.E. & M.B. Hill, 1966.** The distribution of *Balanus pallidus stutsburi* Darwin, *Gryphea gasar* ((Adanson) Dautzenberg), *Mercierella enigmatica* Fauvel and *Hydroides uncinata* (Philippi) in relation to salinity in lagoon Harbor and adjacent creeks. *J. Animal Ecol.*, **35(1)** : 235-250.

- Stephen D., 1980.** The reproductive biology of the Indian oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston): 1 Gametogenic patterns and salinity. *Aquaculture*, **21(2)** : 139-146.
- Walne P.R., 1974.** Culture of Bivalve molluscs: 50 years experience at Conway Fishing New Books, 191 p.
- Wells H.W., 1961.** The fauna of oyster beds with special reference to the salinity factor. *Ecological Monographs*, **31(3)** : 239-266.
- Zenkevitch L., 1963.** Biology of the seas of the U S S.R. John Wiley & Sons, New-York, NY : 955 p.



## CYCLE DE REPRODUCTION NATURELLE DE L'HUITRE PLATE *OSTREA EDULIS*

A.G. MARTIN, A. LITTAYE-MARIETTE, A. LANGLADE ET J.-P. ALLENOU

Station IFREMER La Trinité sur Mer - Laboratoire Ressources Aquacoles

B.P. 86 - 12 rue des Résistants - 56 470 La Trinité sur Mer

**Résumé :** Cette contribution présente une synthèse non exhaustive des observations de différents auteurs, sur la reproduction de l'huître plate *Ostrea edulis*, de Gerbe (1876) à Cuña et Perez (1990) citées en partie notamment par Marteil, (1976), Andrews (1979) et Lubet (1991), et y intègre les éléments d'observations apportés par le suivi de la reproduction de cette huître dans le Morbihan. Ce suivi est réalisé chaque année par différentes équipes du laboratoire de La Trinité sur Mer dans le but d'informer les professionnels du captage. Les données recueillies sur 17 ans (de 1972 à 1988) ont été analysées.

Les différents auteurs s'accordent pour dire l'importance de la température sur chaque étape de la reproduction de cette espèce incubatrice à hermaphrodisme asynchrone "rythmique consécutif". Certains soulignent la nécessité d'une période de repos sexuel hivernal et d'une température seuil permettant la reprise de la gamétogénèse. La notion d'un nombre de degrés-jour nécessaire à l'accomplissement de la gamétogénèse est reprise par plusieurs auteurs. L'émission des gamètes serait de plus liée à une température minimale critique. La durée de la vie larvaire est également thermodépendante. Enfin, l'autre facteur important cité est la nutrition qui conditionne la fécondité et le recrutement.

### INTRODUCTION

L'aire de répartition de l'huître plate *Ostrea edulis* s'étend, en Atlantique, du Cap Ghir, au Maroc, jusqu'au 65<sup>ème</sup> degré de latitude Nord, en Norvège, ainsi qu'en Mer Méditerranée, en Mer Noire et en Mer Adriatique. Les huîtres appartenant à ce genre aiment les eaux marines à salinité assez élevée, limpides ou peu turbides. Elles vivent en zone subtidale ou en zone infra littorale et supportent mal de longues périodes d'émersion.

Les huîtres du genre *Ostrea* sont des espèces incubatrices, larvipares. De nombreuses études ont été réalisées sur les différentes étapes de la reproduction de cette espèce dont la culture s'est développée en France dans la seconde moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle, sous l'influence de Victor Costes (Marteil, 1979). L'ostréiculture étant alors, et encore en majeure partie maintenant, tributaire du captage de naissain sur les collecteurs immergés dans le milieu naturel, il était important de déterminer la période la plus favorable aux fixations des larves.

Plusieurs synthèses concernant ces études ont été effectuées dont celles de Marteil (1976), d'Andrews (1979) ou de Lubet (1991). Par ailleurs, l'étude du cycle sexuel de l'huître plate réalisée au laboratoire de La Trinité sur Mer a permis d'accumuler depuis sa création une somme importante de données dont 17 années ont été analysées.

Cette contribution reprend les résultats d'une partie des auteurs concernant chaque étape de la reproduction d'*Ostrea edulis* en y intégrant les observations réalisées dans le Morbihan, sur le site de captage de la Baie de Quiberon (figure 1).



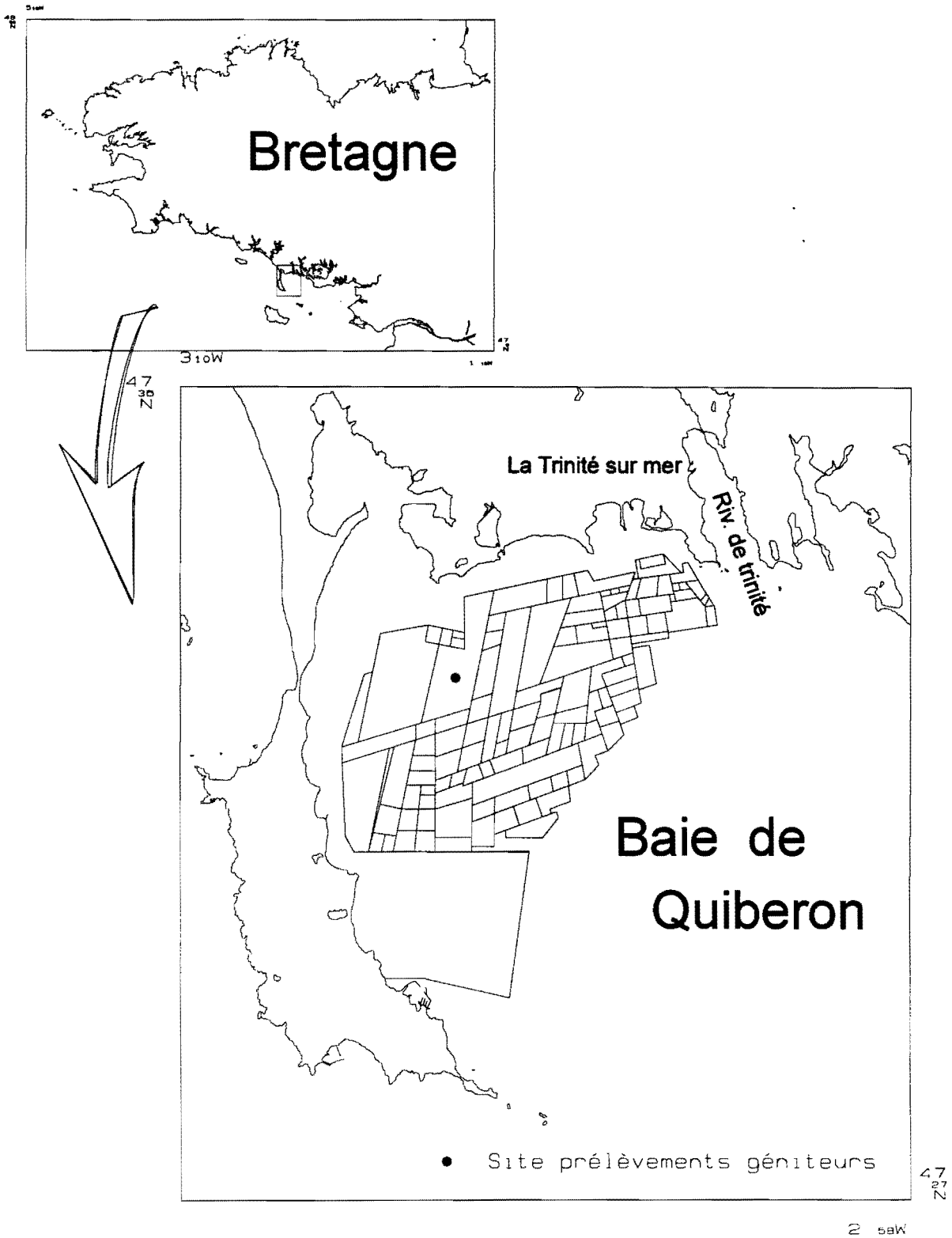



Figure 1. Localisation des secteurs conchyliques en zone subtidale de la Baie de Quiberon

 Concessions ostréicoles (huîtres plates ou huîtres creuses)

Source: Affaires maritimes d'Auray

Digitalisation: IFREMER/SISMER

## **RAPPEL DE L'ANATOMIE DES ORGANES DE REPRODUCTION**

Comme pour l'ensemble des ostréidés, la gonade d'*Ostrea edulis* est impaire et forme, à maturité, une masse aux contours imprécis entourant les diverticules digestifs. Elle est constituée d'acini, ou tubules, où se différencient les gamètes et qui confluent en deux canaux d'évacuation aboutissant dans le cloaque génito-urinaire (Lucas, 1971). L'orifice de ce cloaque débouche dans la chambre exhalante de l'huître (chambre épibranchiale).

## **SEXUALITE**

### **Stratégie de reproduction**

Lubet (1986) décrit les différentes stratégies de reproduction des bivalves que Mac Arthur et Wilson (1967) classent très schématiquement en deux types selon que le milieu est relativement stable ou instable :

- le type K caractérisant les espèces de milieu stable, à populations présentant de faibles fluctuations de densité, à long développement, à vie adulte longue, maturité sexuelle tardive, période de reproduction potentiellement longue et basse fécondité ;

- le type r caractérisant les espèces de milieu instable, à populations présentant de larges fluctuations de densité, à vie adulte courte, maturité sexuelle précoce, période de reproduction courte et haute fécondité.

Selon Lubet, les ostréidés se rapprocheraient du type r tout en présentant une flexibilité en fonction de la latitude.

### **Déterminisme des changements de sexe**

Les huîtres du genre *Ostrea* sont des espèces à hermaphrodisme asynchrone, c'est-à-dire à maturations déphasées des lignées mâles et femelles (Lubet, 1991). L'inversion sexuelle pouvant intervenir plusieurs fois au cours du même cycle annuel, cette espèce est dite à "sexualité rythmique consécutive" (Coe, 1943 in Marteil, 1976). La protandrie est de règle et la formation des gamètes mâles intervient dès l'automne suivant le captage (Davaine, 1853 ; Orton, 1921 in Cole, 1942). Cette phase n'est généralement pas fonctionnelle et les spermatozoïdes sont le plus souvent lysés. L'huître entre alors en phase femelle et fonctionnera comme telle en début de saison suivante. Des embryons ont ainsi été observés chez des huîtres d'un an par Gerbe (1876), Dantan, (1913), Orton, (1921), (cités par Cole 1942). Ensuite, le rythme de l'inversion dépend de plusieurs facteurs comme la latitude en liaison avec la température, et la nutrition (Marteil, 1976).

En Scandinavie où la période de reproduction est courte avec une seule ponte, les huîtres plates ne changent généralement de sexe qu'une fois par an (Yonge, 1960), deux à trois fois en Grande-Bretagne (Walne, 1974), parfois plus sur les côtes françaises. Loosanoff (1962) n'a observé qu'une phase de maturation sexuelle sur des huîtres importées de Hollande dans l'état du Maine (U.S.A.) en raison de la courte durée de l'été.

L'analyse des observations de l'état sexuel des gonades réalisées au cours des campagnes de suivi de la reproduction de l'huître plate dans le Morbihan montre, certaines années, la succession de 3 pontes (caractérisées par un pic du nombre de laiteuses) séparées d'environ 18 jours. Pour d'autres années, il semble que plusieurs cycles se chevauchent et qu'il y ait un asynchronisme de la maturation entre les huîtres de même classe d'âge. Dans un même site, il peut aussi y avoir asynchronisme de la maturation et de la ponte chez des huîtres de classe d'âge différente (Cochennec *et al.*, 1992).

La rapidité du changement de sexe, surtout dans le sens femelle - mâle (quelques jours en conditions optimales, selon Yonge, 1960), et le fait que les gonades puissent ne pas se vider complètement lors de l'émission des gamètes peut entraîner la présence simultanée des deux types de produits sexuels et présenter ainsi l'opportunité d'auto-fertilisation (Andrews, 1979). Cette présence simultanée a été vérifiée dans notre laboratoire par Cochennec (commun. pers.) lors d'une étude sur la relation reproduction - parasitisme. Elle a été aussi mentionnée par Cole en Grande Bretagne (1942) et Ruiz *et al.* (1992) sur les côtes de Galice.

L'alimentation, conditionnant le métabolisme, jouerait un rôle dans le changement de sexe. Ainsi Orton (1927) suggère qu'une bonne nutrition favorise l'accroissement du nombre de géniteurs femelles, remarque qui semble accréditée par le constat que des géniteurs conservés trop longtemps en écloserie présentent une chute de fertilité et se masculinisent (Lubet, 1980). Le rôle de l'alimentation (qualité et quantité) est difficile à mettre en évidence dans le milieu naturel, étant donné la diversité des espèces présentes dans le phytoplancton, et le rôle important des matières organiques dissoutes, des débris organiques et des bactéries (Héral *et al.*, 1986). Si l'effort de reproduction demande un moindre apport énergétique chez les espèces à cycle court et larvipares que chez les espèces à cycle long, il semble cependant que les femelles requièrent un apport plus important que les mâles du fait de la valeur calorique plus élevée de leurs oeufs (Lucas *et al.* (1975), *in* Lubet, 1980).

Enfin, le déterminisme des changements de sexe pourrait être régi également par des facteurs internes (action des ganglions nerveux...) notamment dans le sens femelle vers mâle comme cela a été suggéré par Allarakh et Lubet (1980) dans le cadre d'études sur les pectinidés (*in* Lubet, 1991).

D'une façon générale, les études sur le contrôle neuro-endocrinien de la reproduction des bivalves sont assez récentes. On pourra se reporter à l'article de Lubet (1994) reprenant l'ensemble des études réalisées sur les mollusques et notamment sur les régulations de la synthèse ou de la dégradation des réserves ainsi que des mécanismes physiologiques de la reproduction. Aucune étude relative à l'espèce *Ostrea edulis* n'est cependant citée.

## **GAMETOGENESE**

### **Evaluation de la maturité de la glande sexuelle**

Les stades de maturité de la glande génitale sont évalués de façon courante selon des critères macroscopiques. L'échelle pratique d'évaluation des stades du cycle sexuel d'*Ostrea edulis* établie par Marteil (1960) est donnée dans le tableau 1.

**Tableau 1.** L'échelle pratique d'évaluation des stades du cycle sexuel d'*Ostrea edulis* (Marteil 1960, 1976)

Stade	Description	Appellation
0-5	Gonade vide - Correspond au repos sexuel ou à la fin de l'expulsion des gamètes ou des larves	Très maigres ou maigres
1	Début de la gamétogénèse: multiplication des gonies	peu grasses
2	Gonades bien développées mais la dissociation des gamètes reste difficile	grasses
3	Réplétion maximale: gonade hypertrophiée, une épaisse couche blanc-crème enveloppe la masse viscérale, les gamètes abondants sont obtenus par pression très légère	très grasses
4	Emission des gamètes - incubations chez la femelle	
4a	Les oeufs viennent d'être émis et forment dans la cavité palléale une masse blanche laiteuse	laiteuses
4b	Fin de l'incubation: les coquilles larvaires donnent à la masse des embryons une coloration gris-ardoise	ardoisées
5	Gonade entièrement vide: masse digestive bien visible, coloration grisâtre de la chair	confondu avec stade 0

Cette échelle est utilisée lors du suivi de la reproduction effectué par le laboratoire et les observations sont réalisées sur des échantillons allant de 50 à 100 huîtres prélevés 2 à 3 fois par semaine de mai à août, selon les années.

Les autres données acquises par le laboratoire et traitées dans le présent travail sont :

- le nombre de larves par m<sup>3</sup> (pêche au filet à plancton de maille 130 µm avec flot-mètre),
- la température

*Pour cette dernière donnée, les valeurs prises en baie de Quiberon étant ponctuelles (2 à 3 fois par semaine de mai à août), celles qui ont été utilisées pour les traitements sont des données journalières recueillies en rivière de Trinité qui peuvent différer de ± 1° C en fonction de la saison par rapport à celles de la baie.*

### **Facteurs de contrôle de la gamétogénèse**

#### Reprise de la gamétogénèse

La plupart des auteurs sont d'accord pour considérer que l'espèce *Ostrea edulis* présente une période de repos sexuel hivernal. Existe-t-il une température minimale de reprise de la gamétogénèse ? Cole (1942) et Marteil (1976) fixent le début de la gamétogénèse aux environs de 10°C. Lubet (1980) a constaté toutefois, sur les côtes de la Manche, une reprise de l'activité génitale coïncidant avec les plus basses températures hivernales (8-9°C°). Il estime cependant que, "le départ de la gamétogénèse, s'il ne dépend pas de l'état thermique au moment de la reprise du cycle sexuel, semblerait lié à des états thermiques antérieurs". Il serait plus précoce chez *Ostrea edulis* lorsque les températures des mois de novembre et décembre précédents ont été plus élevées.

En Galice, Cuña et Pérez (1990) considèrent qu'il y a une phase de repos sexuel en automne (Ria de Arosa) tandis que Ruiz *et al.* (1992), n'ont pas observé de vrai repos sexuel (anse de San Cibran), mais leurs observations ont été faites entre septembre 1988 et décembre 1989,

période où la température n'est pas descendue au-dessous de 11°8. Ces derniers auteurs mettent en avant l'importance de la nourriture disponible.

Sur la côte Ouest d'Irlande, Wilson et Simons (1985) ont constaté une période de repos sexuel d'octobre à février.

En baie de Quiberon, une corrélation plus forte a été observée entre les températures du mois de février et la date de ponte ( $R = -0.420$ ) qu'entre les autres mois d'automne-hiver et celle-ci (tableau 2). Cette observation a également été faite sur *Crassostrea gigas* par Héral *et al.* (1986). L'hypothèse de ces auteurs est que les températures de février jouent un rôle dans le déclenchement de la gamétogénèse. Notons que, dans le secteur de notre étude, le minimum thermique se situe, en moyenne, entre 4° et 5° C, et intervient en janvier ou en février.

**Tableau 2.** Coefficient de corrélation entre la date de première ponte en Baie de Quiberon et les températures moyennes mensuelles - seuil de signification 5 % avec 11 d.d.l. : 0.553

Mois	Oct.	(Nov.)	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai
R	- 0.107	(- 0.348)	- 0.377	- 0.420	- 0.186	- 0.466	- 0.781

\* années 1972 à 1988 - 4 années exceptées en raison de lacunes dans les données - la valeur de novembre est calculée sur un nombre trop limité de données pour être prise en compte -

Des expériences de conditionnement d'*Ostrea edulis* ont montré que ce conditionnement durait d'autant moins longtemps qu'il se rapprochait de la période du début du cycle sexuel en milieu naturel (Pouvreau, 1977; Desvergee, (*in* Lubet, 1980); Cuña et Pérez, 1990). De plus, les huîtres plates semblent, selon ces auteurs, réfractaires à tout conditionnement à la fin de l'automne et celles conditionnées de fin décembre à fin janvier n'émettent pas leurs larves avant mars, soit presque en même temps que celles conditionnées en février. L'hypothèse d'une "horloge interne" neuro-endocrinienne déclenchant la reprise du cycle sexuel a été faite par Gimazane et Lubet 1972 (*in* Lubet, 1980) à propos de la coque.

Le rôle de la température minimale sera discuté dans le paragraphe suivant avec la notion de degrés-jour.

#### Maturation des gamètes

Si l'on reprend les valeurs du tableau 2, on voit que la température du mois de mars n'est pas corrélée avec la date de ponte. Plusieurs auteurs ayant travaillé sur le conditionnement thermique ont noté un allongement du conditionnement en mars par rapport à fin janvier-février et avril (Walne, 1964 et Desvergee *in* Pouvreau 1977; Cuña et Pérez, 1990). Là encore, l'hypothèse d'un contrôle interne de la gamétogénèse peut être envisagée.

**Tableau 3.** Exemples de l'influence prédominante du mois de mai sur la date de première ponte en Baie de Quiberon

Année	T° moy. janv.fév.	T° moy. mai	Date de 1 <sup>ère</sup> ponte
1972	6.37	12.1	15 juin
1979	5.9	14.33	2 juin

Dès avril, par contre, le rôle de la température s'accroît et, en mai, ce facteur devient prépondérant dans l'accélération de la gamétogénèse ( $R= 0.781$ ). L'importance de la température du mois de mai par rapport à celles de janvier-février sur la date de première ponte est montrée dans le tableau 3.

La date de première ponte est donc dépendante à la fois de la température absolue et du temps, ce que Mann (1979) a traduit par la notion de degrés-jour dans l'équation  $D= d ( t-t_0 )$

D : quantité de degrés-jour

d: : nombre de jours nécessaires pour atteindre la maturité correspondant au stade 4a pour notre étude

t : température quotidienne de l'eau

$t_0$  : seuil de température au-dessous duquel aucun développement n'est observé

Les différentes valeurs de résolution de cette équation sont données dans le tableau 4.

**Tableau 4.-** Températures seuils et nombre de degrés-jours liés à la gamétogénèse

Espèce	$t_0$ en °C	D	Auteurs	Site d'observation
<i>C. virginica</i>	12.0	450	Price et Maurer (1971)	Delaware Bay
<i>C. gigas</i>	10.55	592	Mann (1979)	écloserie U.S.A.
<i>O. edulis</i>	6.76	404	" "	"
<i>O. edulis</i>	7	$554 \pm 45$	Wilson et Simons (1985)	Côte irlandaise
<i>O. edulis</i>	10.75	$122 \pm 3$	Présente étude	Baie de Quiberon

Mann a donné avec beaucoup de réserves des valeurs calculées pour *Ostrea edulis* ( $D = 404$  et  $t^0 = 6.76^\circ\text{C}$ ) en précisant que la fréquence d'échantillonnage était trop faible et que les températures expérimentales étaient au-dessus de la température initiale calculée. Wilson et Simons (1985) ont utilisé le seuil donné par Mann pour calculer le nombre de degrés-jours, avec un pas d'échantillonnage encore plus large (un mois) et sur deux cycles d'étude de 19 mois. Ils ont observé un début de redéveloppement des gamètes à la fin de l'hiver à une température moyenne située au-dessus de  $7^\circ\text{C}$ .

La température-seuil beaucoup plus élevée que nous rapportons abaisse considérablement le nombre de degrés-jours. Peut-être pouvons-nous parler dans le cas de la Baie de Quiberon de seuil d'accélération de la gamétogénèse plutôt que de seuil d'initiation ? Ce seuil, atteint le plus souvent fin mars-début avril, est cependant proche de celui donné par Cole (1942) qui le fixe à  $10^\circ\text{C}$  à partir de ses observations sur les jeunes huîtres de Conway.

Ruiz *et al.* (1992) ont utilisé les chiffres de Mann pour calculer la date de ponte dans l'anse de San Cibran en Galice et ont trouvé un décalage de deux mois avec la date réelle de ponte en 1988 et 1989. Ils n'ont pas retenu la notion de race physiologique pour expliquer les différences observées d'une région à l'autre mais insistent sur l'importance de la disponibilité en nourriture.

Le rôle de la salinité a été évoqué par quelques auteurs comme pratiquement inexistant dans les conditions habituelles de vie de l'espèce *Ostrea edulis*. Selon Marteil (1976), dans le Morbihan, l'action de la salinité sur le développement sexuel ne serait évidente qu'en rivière lors de fortes dessalures (< 29 ‰) associées à une turbidité élevée et se traduirait par un ralentissement de ce développement. Au delà et jusqu'à 36 ‰, aucune influence n'est mise en cause.

Au travers de toutes ces observations, il apparaît que le rôle de la température est prédominant dans l'initiation et le déroulement de la gamétogénèse mais que les seuils observés sont différents selon les régions considérées et que d'autres facteurs entrent en jeu comme la quantité de nourriture disponible.

## LA PONTE

L'expulsion des gamètes a lieu normalement en une seule fois mais, comme déjà mentionné plus haut, peut être occasionnellement incomplète. L'émission des gamètes mâles a lieu dans la chambre exhalante puis ceux-ci sont aussitôt rejetés hors de l'huître par le courant cloacal sans intervention de contractions du muscle adducteur. Les ovules sont aussi rejetés dans la chambre exhalante dont la fermeture est assurée par l'extension des feuillets internes du bord du manteau. Les oeufs passent alors à travers les ostias des filaments branchiaux dans la chambre inhalante où ils seront incubés après fécondation.

Plusieurs auteurs situent la température minimale d'émission des gamètes autour de 15° C, comme Leenhardt (1924 *in* Marteil 1976), Korringa (1947, *in* Wilson et Simons 1985) et Yonge (1960). Walne la situe autour de 16° C dans la région de Conway (1974). Wilson et Simons (1985), sur la côte Ouest irlandaise ont observé les premières pontes entre 12.4° et 13.9° C selon le site et l'année. Marteil (1976) parle de température minimale critique qu'il situe entre 14 et 16° C selon la latitude. Il mentionne l'action de différentes stimulations provoquant la ponte chez les huîtres matures (variations brusques de température et de salinité). Ces phénomènes ont été étudiés par Lubet (1980 ; 1991) qui cite également l'action des courants et des vagues et surtout la stimulation thermique, largement utilisée depuis en éclosion. L'action de la lune (émissions de gamètes correspondant aux pleines et aux nouvelles lunes) citée par certains auteurs (Orton, 1927; Korringa, 1941, Walne 1974, *in* Andrews, 1979) est controversée. Lubet pense que cette coïncidence est imputable à l'augmentation des stimuli naturels en période de vives eaux (1991).

On admet que les mâles émettent leurs gamètes le plus souvent les premiers et que la présence de ceux-ci induit, par le biais d'hormones, la ponte des femelles. Nelson et Allison (1940, *in* Marteil, 1976) ont baptisé "diantline" une substance extraite des spermatozoïdes qui, entre autres, permettrait la décontraction des muscles lisses favorisant l'évacuation des oeufs.

La fécondité des huîtres en nombre d'oeufs est très différente selon qu'il s'agit d'huîtres ovipares ou larvipares. Selon les espèces d'*Ostrea*, toutes larvipares, le nombre des oeufs varie de quelques dizaines de mille (*Ostrea chilensis*) à plus d'1 million (*Ostrea edulis*) contre 20 à 100 millions pour les *Crassostrea*. Le chiffre moyen pour *Ostrea edulis* est situé entre 500 000 à 1 500 000. Les variations observées d'un individu à l'autre dépendent plus de la taille que de l'âge (Cole, 1942 et Marteil, 1976). La taille des oeufs est plus importante que

chez les ovipares et est en relation inverse avec le nombre d'oeufs. Généralement inférieure à 100  $\mu\text{m}$  chez *Crassostrea*, elle est de 150  $\mu\text{m}$  chez *Ostrea edulis* et jusqu'à 700  $\mu\text{m}$  chez *Ostrea chilensis* (Marteil, 1976).

La durée de l'incubation dure de 8 à 10 jours selon Korringa (1947, *in* Marteil, 1976), 8 à 9 jours selon Marteil (1960). La coquille apparaît au bout de 3-4 jours (Andrews 1979).

## VIE LARVAIRE ET METAMORPHOSE

### Durée de la vie larvaire

Après l'émission dans le milieu au stade véligère et à une taille de 160 à 200  $\mu\text{m}$ , les larves mènent une vie pélagique planctotrophe dont la durée varie en fonction de la température : selon Korringa elle passe de 6-7 jours à 22° C à 12 jours à 18° C (1941, *in* Marteil, 1976). Pour Marteil, elle dure de 8 à 14 jours pour des températures variant de 18-20° C à 15-16° C (1976).

En reportant toutes les durées observées en milieu naturel entre 1972 et 1988, en fonction de la température moyenne de surface (-1 m), nous avons mis en évidence un optimum de 10 jours à 18-19° C pour une croissance de larves de 180  $\mu\text{m}$  à 240  $\mu\text{m}$ , cette durée passant à 15 jours à 16° C. Walne indique une durée de 10 jours pour passer de 180 à 300  $\mu\text{m}$  sans précision sur la température (1964, *in* Andrews, 1979)

La fixation se fait au stade pédivéligère, à une taille de 260 à 290  $\mu\text{m}$ , par un "ciment" sécrété par la glande byssogène (fixation par le bord de la valve gauche). La métamorphose s'achève alors : le pied, le vélum et les yeux disparaissent, les branchies se développent, le "naissain" s'étale sur le support par sécrétion de coquille (Marteil, 1976). Nous n'aborderons pas ici le problème de la qualité du support permettant une bonne fixation. Ce sujet a été largement développé et plusieurs références sont disponibles dans Andrews (1979).

### Abondance larvaire

L'abondance larvaire au moment de l'émission a été utilisée pour refléter la qualité des gamètes. La figure 2 montre ainsi l'abondance larvaire en fonction de la température moyenne de maturation. Cette abondance correspond au nombre de larves dans l'eau 8 jours après la date de ponte et la température moyenne est calculée à partir des valeurs observées au cours des 20 derniers jours de maturation. On voit alors que pour des températures moyennes inférieures à 16° le nombre de larves est pratiquement nul. Ce seuil peut être alors considéré comme un seuil de qualité que nous appelons Tqual. Rappelons qu'il est calculé sur une série de données prise en rivière de Trinité et qu'il peut être estimé à 15° C sur le site de reproduction de la Baie de Quiberon.

L'absence de larves pour une température moyenne de maturation inférieure à Tqual peut être expliquée de deux façons différentes : elle peut être liée à un asynchronisme des maturations mâles et femelles ou à une réelle mauvaise qualité des gamètes. Dans le premier cas, la sex-ratio que l'on peut exprimer par le rapport du nombre de stades 4a sur le nombre de stades 3 doit être très différente de 0.5. Dans le second cas, le taux de fécondation ou de survie pendant l'incubation que l'on peut exprimer par le rapport du nombre de stades 4b sur le nombre de stades 4a doit être quasiment nul.



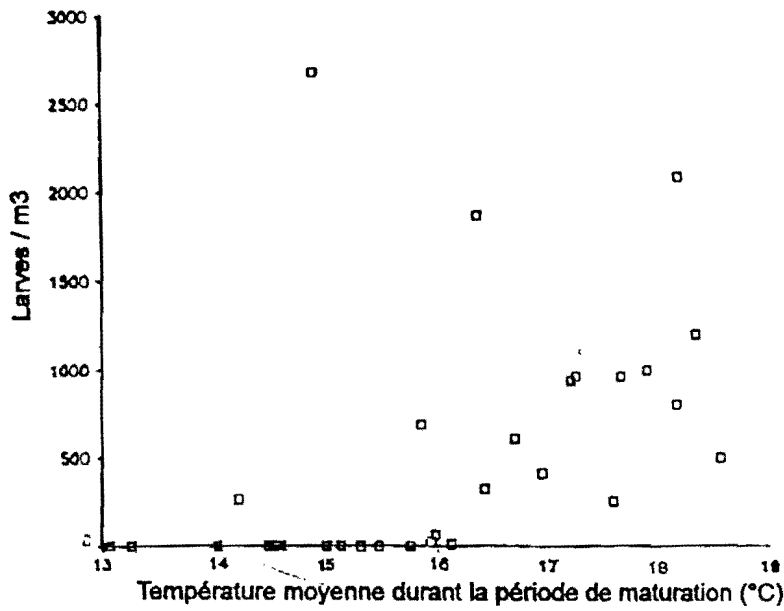


Figure 2. Quantité de larves émises en fonction de la température moyenne de maturation

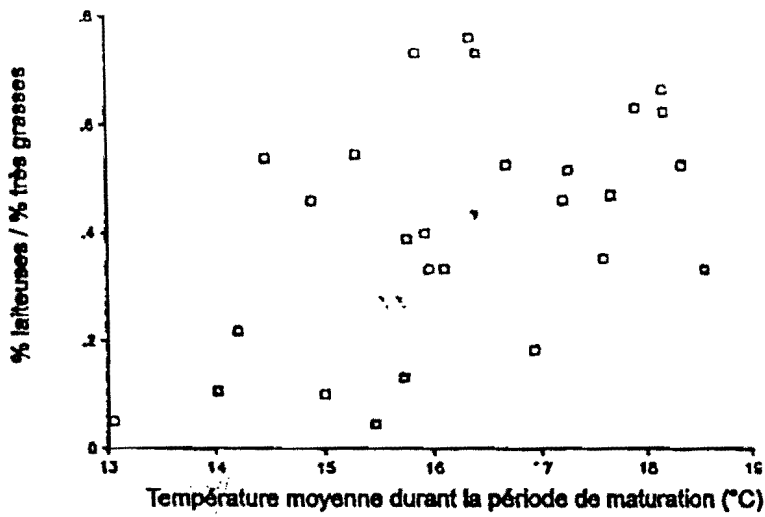


Figure 3. Sex-ratio en fonction de la température moyenne de maturation

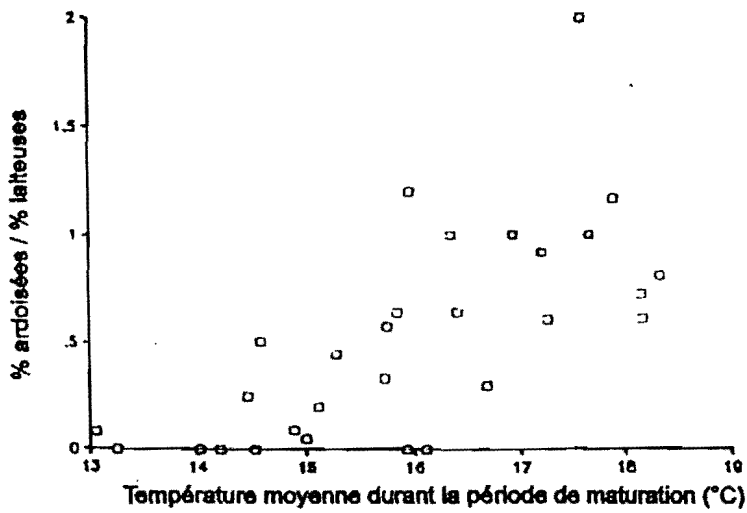


Figure 4. Taux de fécondation ou de survie des larves pendant l'incubation en fonction de la température moyenne de maturation

Ces deux valeurs sont rapportées en fonction de la température de maturation (figures 3 et 4). La figure 3 montre une assez grande dispersion des valeurs pour T maturation < 16° C avec toutefois 50 % des valeurs assimilables à la sex-ratio situées en-dessous de 0.2 ou au-dessus de 0.7 et 100 % des valeurs situées entre 0.3 et 0.7 pour T maturation > 17° C. La figure 4 montre un rapport assimilable au taux de fécondation ou de survie pendant l'incubation situé entre 0 et 0.5 pour T < T<sub>qual</sub>. Au-dessus de T<sub>qual</sub>, il se situe entre 0.5 et 1.2. Les deux phénomènes, asynchronisme et mauvaise survie des ovules ou des oeufs juste fécondés peuvent donc entrer en jeu en cas de température insuffisante de maturation.

On pourrait également mettre en cause la température à l'expulsion pour la survie des larves. Marteil (1976) observe qu'une température de 13° C n'entraîne pas la disparition des larves dans l'eau et nous n'avons pas de relation entre abondance larvaire et température à l'expulsion. Certains auteurs considèrent cependant qu'il existe un seuil de température pour l'expulsion des larves. Situé entre 15° C et 20° C selon les auteurs et les régions, il pourrait être lié à la race géographique (Lubet, 1991).

#### **Autres facteurs influençant la survie des larves.**

De nombreux auteurs ont étudié les conditions de vie larvaire. On pourra se reporter à Andrews (1979) qui a synthétisé les différentes observations et assertions. Les principaux facteurs retenus comme influençant la survie des larves sont :

- la prédation dont le taux est lié à la durée de vie larvaire et donc à la température;
- les courants qui peuvent entraîner une dispersion des larves et aussi des variations de température (ainsi, en Baie de Quiberon, les courants venus de l'extérieur peuvent jouer un rôle sur la température surtout en début de saison);
- les algues toxiques.

Récemment, le recrutement de naissain d'huîtres plates a été perturbé par la présence du dinoflagellé *Gymnodinium cf. nagasakiense* (G. de Kergariou, commun.pers.). Ainsi, en 1992, des concentrations élevées de cet organisme phytoplanctonique ont été associées à la disparition des larves dans l'eau fin juillet, au moment où les conditions et notamment la température étaient favorables à leur développement. L'été 1995, ce *Gymnodinium* s'est développé en début de saison (maximum 400 000 cellules/litre mi-juin en Baie de Quiberon) ce qui a compromis le devenir des premières pontes.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La stratégie de reproduction de l'huître plate *Ostrea edulis* est caractérisée par une maturité sexuelle précoce, une période de reproduction relativement courte et un rythme d'inversion sexuelle rapide. Les observations des différents auteurs montrent que cette stratégie est flexible selon la latitude considérée et selon les fluctuations climatiques à cette même latitude. Température et nourriture disponible semblent être les facteurs externes prédominants dans le déroulement de chaque étape de la reproduction. La notion de race géographique, soulevée par certains auteurs et contestée par d'autres, mériterait d'être développée en s'appuyant sur différentes études de comparaison génétique. Le rôle des facteurs internes, déjà abordé pour d'autres espèces de lamellibranches, constitue un axe de recherche à suivre.

Dans la pratique, en ce qui concerne le suivi de la reproduction en milieu naturel dans le but de prédire la meilleure date de pose des collecteurs, un premier pas a été fait par la détermination de la relation "date de première ponte - nombre de degrés-jour".

Toutefois, l'information "date de la première ponte" n'est pas suffisante pour les professionnels dans la mesure où ce n'est pas souvent celle qui donne une bonne fixation :

- soit, généralement, par déficit de température éventuellement lié à des courants défavorables introduisant des eaux froides;
- soit pour une autre raison telle que *Gymnodinium cf. § ci-dessus*.

Une meilleure connaissance des courants liés au vent et une prévision météorologique à longue échéance permettrait de mieux prévoir le devenir des pontes observées.

Il serait intéressant, également, de préciser le rôle de *Gymnodinium* non seulement sur la survie des larves, mais éventuellement sur la gamétogénèse, puisque l'alimentation joue un rôle sur le déroulement de celle-ci.

## Références

- Allarakh C. et P. Lubet, 1980. Analyse expérimentale de la différenciation du sexe chez quelques pectinidés. *Arch. Anat. Microscop. et Morph. Exp.*, **70** -1 : 47-58
- Andrews J.D., 1979. Pelecypoda: ostreidae. *Reproduction of Marine Invertebrates*, A.C. Giese et J.S. Pearse, eds., Academic Press. Vol V : 293-341
- Cochennec N., J. Mazurie, A.G. Martin et Y. Le Coguc, 1992. Effets du parasite *Bonamia ostreae* sur la reproduction des huîtres plates (*Ostrea edulis*). Poster présenté au colloque PAMAQ, Montpellier.
- Coe W.E., 1943. Sexual differentiation in Mollusks I. - Pelecypods. *Quart. Rev. Biol.*, **18**-2 : 154-164.
- Cole H.A., 1942. Primary sex-phases in *Ostrea edulis*. *Quart. J. Micros. Sci.*, **83** : 317-356.
- Cuña M.A. y A. Pérez , 1990. Contribución al estudio de la reproducción de la ostra (*Ostrea edulis*) y su acondicionamiento a escala industrial. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, **6**-1 : 107-116.
- Dantan J.L., 1913. Fécondité de l'*Ostrea edulis*, *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, **157**.
- Davaine C., 1853. Recherches sur la génération des huîtres. *Journ. Conchyl.*, **4**.
- Gerbe Z., 1876. Aptitude qu'ont les huîtres à se reproduire dans la première année. *Rev. et Mag. Zool.*, **3**.
- Gimazane J.P. et P. E. Lubet, 1972. Etude expérimentale de l'action de la nutrition, de la température et de la lumière sur le cycle sexuel de *Cardium edule* L., (mollusque bivalve). *Bull. Soc. Limn. de Normandie*, **103** : 137-146.
- Héral M., 1989. L'ostréiculture française traditionnelle. *Aquaculture, coord. Banabé, TEC & DOC, Lavoisier*, Vol. 1, 2, (3) : 347-398.
- Héral M., J. Prou et J.M. Deslou-Paoli, 1986. Influence des facteurs climatiques sur la production conchylicole de bassin de Marennes-Oléron. *Haliotis*, **15** : 193-207.
- Korringa P., 1941. Experiments and observations on swarming, pelagic life and setting in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L.. *Arch. Néerl. Zool.*, **5** : 1-249.
- Korringa P., 1947. Périodicité lunaire dans la production des larves d'huîtres plates *Ostrea edulis* L.. *Bull. Un. Synd. Ostreic. Morbihan*; **9** : 9-10.

- Leenhardt H., 1924.** Compte-rendu d'expériences faites en Morbihan sur les huîtres et leur reproduction. *Notes et mém. Off. Pêches marit.*, **40** : 19 p.
- Loosanoff V. L., 1962.** Gametogenesis and spawning of the European oyster, *Ostrea edulis* L. *Biol. Bull. Woods Hole*, **122** : 86-94.
- Lubet P., 1980.** Influence des facteurs externes sur la reproduction des mollusques lamellibranches. *Oceanis*, **6-5** : 469-489.
- Lubet P., 1986.** Strategies of reproduction in Bivalve Molluscs. *Advances in Invertebrate reproduction*, **4**. M. Porchet, J.C. Andries et A. Dhainaut (Eds), Elsevier : 401-408.
- Lubet P., 1991.** Reproduction des mollusques. *Bases biologiques de l'aquaculture, coord. Barnabé, TEC & DOC, Lavoisier*, **(3)** : 168-204.
- Lubet P., 1994.** Données récentes sur la biologie des mollusques. *Haliotis*, **23** : 3-14.
- Lucas A., 1971.** Les gamètes des mollusques. *Haliotis*, **1-2** : 185-214.
- Lucas A., J. Calvo et M. Francart, 1975.** L'effort de reproduction dans la stratégie démographique de six bivalves de l'Atlantique. *Haliotis*, **9.2** : 107-116.
- Mac Arthur R.H. and E.O. Wilson , 1967.** The theory of Island biogeography. *Princeton Univ. Press*.
- 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. Ass. U.K.*, **59** : 95-110.
- Marteil L., 1960.** Ecologie des huîtres du Morbihan *Ostrea edulis* Linné et *Gryphea angulata* Lamarck. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **24-3** : 335-345.
- Marteil L., 1976.** La conchyliculture française. II - Biologie de l'huître et de la moule. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **15-2** : 153-346
- Marteil L., 1979.** La conchyliculture française. III - L'ostréiculture et la mytiliculture. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **18-1** : 7-130
- Nelson T.C. and J.B. Allison, 1940.** On the nature and the action of diantlin, a new hormone like substance carried by the spermatozoa of the oyster. *J. Exp. Zool.*, **85-2** : 299-338
- Orton J.H., 1921.** Oyster spat with mature male sexual products. *Nature*, **108**.
- Orton J.H., 1926.** Observations and experiments on sex-change in the European oyster. Part I -The change from female to male (*Ostrea edulis*). *J.Mar.Biol.Ass.U.K.*, **14** : 967-1045
- Pouvreau B., 1977.** L'huître plate *Ostrea edulis* L. : maturité sexuelle contrôlée, élevage larvaire, croissance et mortalité, variabilité génétique. *Thèse doc., Univ. Caen*, 115 p.
- Price K. and D. Maurer, 1971.** Holding and spawning Delaware Bay oysters (*Crassostrea virginica*) out of season. II- Temperature requirements for maturation of gonads. *Proc. Nat. Shell. Assoc.*, **61** : 29-34.
- Ruiz C., D. Martinez, G. Mosquera, M. Abad and J.L. Sanchez, 1992.** Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Marine Biology*, **112** : 67-74.
- Wilson J.H. and J. Simons, 1985.** Gametogenesis and breeding of *Ostrea edulis* on the west coast of Ireland. *Aquaculture*, **46** : 307-321.
- Yonge C.M., 1960.** Oysters. *Londres, Collins edit.*, 209 p.
- Walne P.R. , 1964.** Observations on the fertility of the oyster (*Ostrea edulis*) *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **44** : 293-310.
- Walne P.R. , 1974.** Culture of Bivalve Molluscs. 50 years experience at Conway. *West Byfleet: Fishing News (Books) LTD*, 173 p.



## CYCLES DE REPRODUCTION NATURELLE DES MOULES

M-J. DARDIGNAC

IFREMER - Place du Séminaire - 17137 L'Houmeau (F).

**Résumé :** Une rapide synthèse est, tout d'abord, faite des études réalisées avant 1991 sur la reproduction des moules. Les travaux effectués, entre 1991 et 1995, dans les différents laboratoires de l'IFREMER, et les résultats obtenus, sont ensuite décrits. Ces travaux n'ont pas été entrepris pour tenter d'expliquer ce qui fait que le cycle sexuel des moules d'une région et le captage qui en est l'aboutissement se déroulent ou non normalement. Prenant en compte les problèmes de captage qui sont apparus ces dernières années en Charente Maritime, une réflexion est amorcée sur l'opportunité d'engager des recherches destinées à expliquer les raisons de ces déficiences pour, éventuellement, essayer d'y remédier.

### Remarque liminaire

Seules les observations faites sur le littoral français sont rapportées ici. En France, deux variétés de moules font l'objet d'une exploitation : *Mytilus edulis*, sur les côtes de la Manche et de l'Atlantique, *Mytilus galloprovincialis*, en Méditerranée et sur les côtes de Bretagne.

## 1. TRAVAUX ANTERIEURS A 1991

Ils sont nombreux et n'ont pas tous été réalisés à l'IFREMER mais il est intéressant d'en faire une rapide synthèse. Ces études ont abordé les cycles de reproduction (différentes séquences, périodes et durées de chacune d'elles), les différences entre les deux variétés de moules, l'influence de certains facteurs, les phénomènes biochimiques accompagnant ces épisodes.

### 1.1. Les cycles de reproduction

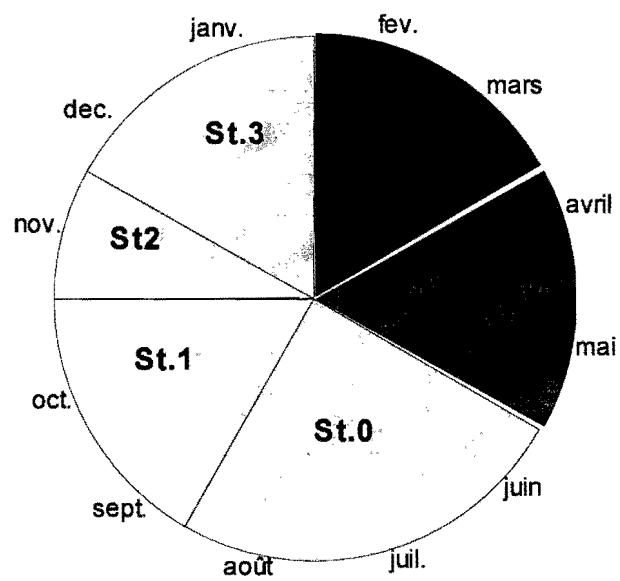
La figure 1 montre le cycle de *M. edulis* tel qu'il a été observé dans le bassin de Marennes-Oléron en 1983 et 1984 (Boromthanarat, 1986). Le stade de repos (stade 0) débute en juin et dure tout l'été. La gamétogenèse commence en septembre (stade 1); les gamètes sont visibles en novembre (stade 2) et mûrs en décembre (stade 3). Les pontes cependant ne débutent qu'en février et la ponte principale a lieu en mars; elle est suivie de pontes secondaires en avril-mai.

Le cycle de *M. edulis* diffère de celui de *M. galloprovincialis*. Dans le bassin d'Arcachon, à une même station, *galloprovincialis* présente un cycle avec un stade de repos nettement plus court, deux mois seulement (juillet et août), alors qu'il dure quatre mois chez *edulis*. Cette dernière ne présente pas de gamètes mûrs avant la fin de décembre à cette station, alors que l'on peut en observer dès le début d'octobre chez *galloprovincialis* (Lubet, 1959).

Pour *edulis* comme pour *galloprovincialis*, le cycle peut varier de manière importante selon les individus, le lieu et l'année (Lubet, 1959; Lubet *et al.*, 1981; Krichene, 1981; Morchid, 1987).

### 1.2. Influence de certains facteurs

La température et la nourriture (quantité et qualité) apparaissent, de plus en plus, comme étant les facteurs qui ont le plus d'importance. En ce qui concerne la température, certains auteurs



**Figure 1.** Cycle de *M.edulis* dans le bassin de Marennes-Oléron.

pensent qu'il existe une plage thermique à l'extérieur de laquelle la gamétogenèse est perturbée avec pour conséquence lyse des gamètes et absence de ponte (Lubet et Aloui, 1987). Ces plages seraient :

pour *edulis* : 4°C - 17°C.

pour *galloprovincialis* : 6 à 7°C - 19°C.

A l'intérieur de ces plages, la température n'agirait ni sur le déclenchement de la gamétogenèse ni sur sa durée. Ces deux phénomènes seraient gérés par un "programme intérieur" ou une "horloge interne" qui, eux-mêmes, dépendraient d'évènements plus anciens (température, nourriture). De même, il n'y aurait pas de température minimale critique de ponte dès l'instant que l'on se trouve à l'intérieur de la plage thermique. Lorsque les animaux sont arrivés au stade "prêts à pondre", le frai serait déclenché par des stimuli externes.

La température et la nourriture ont aussi une influence très grande sur le développement des larves. Une étude, réalisée en laboratoire à Arcachon sur *M. galloprovincialis*, montre une croissance optimale à 20°C et 35 ppt, l'effet néfaste d'une température supérieure à 30°C et la très grande importance du paramètre nourriture (His *et al.*, 1989).

### 1.3. Biochimie

La composition biochimique des mollusques est étroitement liée au cycle de reproduction. D'une manière générale :

- pendant le stade de repos accumulation de réserves, surtout sous forme de glycogène;
- forte utilisation de ce glycogène pendant la gamétogenèse;
- la maturation des gamètes s'accompagne d'une augmentation des protéines et des lipides, particulièrement importante pour les lipides chez les femelles, ce qui semblerait résulter d'une transformation du glycogène en réserve lipidique nécessaire aux ovocytes;
- chaque ponte s'accompagne d'une diminution brutale des protéides et des lipides (expulsion des gamètes), puis est suivie d'une nouvelle augmentation de ces deux constituants qui correspond à une restauration de la gonade entre deux pontes.

De nombreux auteurs ont montré qu'il existe une relation étroite entre le cycle de reproduction et l'évolution d'un caractère macroscopique comme l'indice de condition. Ce dernier est souvent jugé suffisant pour définir certaines étapes (ponte, stade de repos) du cycle : il augmente dès la fin des pontes, présente un maximum alors que les animaux sont en période de repos et atteint ses valeurs minimales au moment de l'expulsion des gamètes. Toutefois, une chute est fréquemment observée avant le début de la gamétogenèse. Les examens biochimiques montrent qu'il ne s'agit pas d'une reprise accidentelle de l'activité sexuelle; elle doit donc vraisemblablement résulter de conditions environnementales défavorables (température élevée, nourriture insuffisante).

## 2. TRAVAUX POSTERIEURS A 1991

### 2.1. Inventaire des travaux effectués

IFREMER - R.A. Port en Bessin

Objectif : étude de la production mytilicole et des possibilités d'optimisation.

Lieu et espèces : côtes du Cotentin. *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

Paramètres suivis : indice de condition, PLG .

Période : février 1993 - mai 1994.



Espèce	Site	Sexe	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Févr.	Mars	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.
<i>M. edulis</i>	Quiberon	M et F				■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■				■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	.....			
	Roscanvel	M		■■■■■					■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■					
	Pen a Lan	F					■■■■■		■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■					
		M et F								■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■				
<i>M. galloprovincialis</i>	Quiberon	M. et F				■■■■■				■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	.....			
	Roscanvel	M							■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	.....				
		F	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■							■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■				
	Pen a Lan	M					■■■■■	.....	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■		■■■■■	.....		
		F					■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	.....	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■					
<i>Hybride</i>	Quiberon	M et F							■■■■■	.....				
	Roscanvel	M							■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■					
		F			■■■■■					■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	■■■■■	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■		
	Pen a Lan	M		■■■■■	■■■■■						■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	■■■■■	.....	
		F		■■■■■	■■■■■	■■■■■	■■■■■	■■■■■	■■■■■	■■■■■	■■■■■	■■■■■	■■■■■	■■■■■

Légende :

■■■■ = Ponte secondaire

■■■■■ = Ponte principale

M = Mâle

F = Femelle

Figure 2 - Représentation simplifiée des périodes de ponte des trois espèces étudiées (Le Chanjour *et al.*, 1994).

### IFREMER - DEL - Saint Malo

Objectif : étude de l'évolution en cours d'année de la qualité marchande des moules.

Lieu et espèces : Bretagne nord. *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

Paramètres suivis : indice de condition, PLG.

Période : depuis décembre 1990.

### IFREMER - R.A. La Trinité

Objectif : étude de la gamétogenèse des moules.

Lieu et espèces : rade de Brest et baie de Quiberon. *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, hybrides.

Paramètre suivi : histologie de la gonade.

Période : octobre 1992 - septembre 1993.

### IFREMER - R.A. L' Houmeau

Objectif : analyse des relations entre le captage de moules et certains facteurs du milieu.

Lieu et espèce : Pertuis Breton. *M. edulis*.

Paramètres suivis : indice de condition, captage, température, salinité, ensoleillement.

Période : 1989 - 1993.

### IFREMER - R.A. La Tremblade

Objectif : Etude de la croissance des moules sur filières. Modélisation de l'écosystème.

Lieu et espèce : Pertuis Breton. *M. edulis*.

Paramètres suivis : indice de condition, PLG.

Période : juin 1991 - août 1992.

### IFREMER - DEL La Tremblade

Objectif : éviter les fixations importantes de moules sur les structures ostréicoles.

Lieu et espèce : Bassin de Marennes-Oléron. *M. edulis*.

Paramètre suivi : populations larvaires.

Période : suivi effectué chaque printemps depuis plusieurs années.

## **2.2. Résultats**

### 2.2.1. Les cycles

Les pontes principales d'*edulis* ont lieu au printemps, entre janvier et avril en Bretagne nord et dans le Pertuis Breton, entre avril et juin en Bretagne sud. On observe généralement, mais pas toujours, des pontes secondaires qui peuvent avoir lieu soit avant la ponte principale (janvier-février, Bretagne sud), soit après (mai-juin, Bretagne nord, Pertuis Breton). Une analyse plus détaillée permet de constater qu'entre ces limites générales les périodes de pontes et les durées du cycle sexuel diffèrent selon les années, les régions et même dans des secteurs voisins d'un bassin. L'accumulation de réserves est aussi très variable : elle est plus ou moins rapide après la ponte et les maxima, toujours observés en été, sont d'une importance diverse.

La *galloprovincialis* se distingue de l'*edulis* par un cycle plus long qui peut comporter une ou deux ponte(s) massive(s) et des pontes secondaires étalées dans le temps. La même remarque peut être faite pour les hybrides. Par ailleurs, qu'il s'agisse des périodes de ponte, de la durée du cycle ou de l'accumulation des réserves, on peut observer, comme chez *edulis*, des différences plus ou moins importantes selon le lieu et l'année.

La figure 2 visualise les périodes de pontes chez *M. edulis*, *M. galloprovincialis* et les hybrides observées en rade de Brest et en baie de Quiberon.

L'étude réalisée à La Trinité montre que les pontes mâles et femelles sont simultanées lors des émissions principales. En revanche, un décalage peut être observé chez *galloprovincialis* et

les hybrides pendant les émissions secondaires (Barillé, commun. pers.; Dardignac-Corbeil et Prou, 1995; Le Chanjour *et al.*, 1994; Le Mao, commun. pers.).

### 2.2.2. Influence de certains facteurs

L'analyse rétrospective des relations entre le captage des moules dans le Pertuis Breton (*M. edulis*) et certains facteurs environnementaux a mis en évidence une corrélation significative négative entre l'abondance du captage et la température qui a régné entre le 13 octobre et le 26 janvier d'une part, le 16 février et le 2 mars d'autre part. La première période correspond à celle de la gamétogenèse et la corrélation montre la nécessité d'une température fraîche pour réduire les besoins somatiques alors que la nourriture est peu abondante à cette époque. La deuxième période est celle qui précède de peu la ponte. Une élévation de la température à cette époque serait défavorable au captage car elle entraînerait une augmentation du métabolisme alors que la nourriture est encore rare d'où la nécessité pour la moule d'utiliser des réserves qui, à ce moment, seraient obtenues par lyse des gamètes (Dardignac-Corbeil et Prou, 1995).

### 2.2.3. Biochimie

Les données recueillies dans le Cotentin n'ont pas encore été exploitées. L'étude des modifications biochimiques effectuées sur des moules de un et deux ans du Pertuis Breton montre que les protéines présentent des valeurs minimales en mai-juin. Les glucides constants pendant la phase d'accumulation des réserves de juillet à novembre, diminuent dès que la moule puise dans ces dépôts, puis ré-augmentent très rapidement en mai-juin. Les lipides sont moins rapidement utilisés et l'accumulation qui est observée en mars est beaucoup plus importante chez les femelles (Barillé, commun. pers.).

## **3. COMMENTAIRES**

Bien que le captage de moules ait été médiocre certaines années, ces accidents n'avaient pas, jusqu'à récemment, perturbé gravement la mytiliculture. Mais pendant trois ans de suite, en 1989, 1990 et 1991, le captage a été très faible en Charente Maritime ce qui a entraîné un grave manque à gagner pour certains professionnels. La mise en place de longues lignes dans le Pertuis Breton en 1991 avait pour objectif premier d'assurer un captage suffisamment abondant et surtout régulier alors que des inquiétudes apparaissent à propos du captage sur bouchots. En 1995, par exemple, le captage a été satisfaisant dans les bouchots où il est le plus souvent médiocre et franchement mauvais dans des zones où d'habitude la production de naissain est bonne, voire la meilleure du Pertuis. On est ainsi conduit à se demander s'il ne serait pas souhaitable d'envisager des recherches qui permettraient, sinon de résoudre ces problèmes, au moins d'expliquer les raisons de ces anomalies.

Un bon captage est le résultat d'un déroulement heureux de la gamétogenèse suivi d'une évolution réussie des populations larvaires et d'un taux de survie satisfaisant du naissain fixé. Que nous apportent sur ces sujets les études menées ces dernières années ?

### *- La gamétogenèse*

La plupart des travaux réalisés ont surtout été destinés à connaître l'évolution de la qualité marchande des mollusques et à étudier les possibilités d'améliorer cette dernière par une gestion meilleure des élevages. L'évolution de l'indice de condition figure bien celle de la "qualité" des animaux mais reste insuffisante pour décrire les différentes séquences du cycle

sexuel lui-même. Les modifications des constituants biochimiques, quant à elles, apportent des précisions intéressantes, mais s'il s'agit d'étudier la reproduction, il semble nécessaire d'y associer une étude histologique qui seule permet de bien délimiter les différentes phases de la gamétogenèse. Par ailleurs, ces recherches n'ont pas pris en compte l'influence de certains facteurs considérés comme ayant une action importante sur la reproduction des mollusques, notamment la température et la nourriture. Il faut d'ailleurs admettre que si la première ne pose guère de problème, il n'en va pas de même de la seconde.

- *La période larvaire*

Le seul suivi de populations larvaires qui est réalisé a pour objectif unique d'avoir des précisions sur les fixations de moules prévisibles : quel moment ? quelle quantité ? Les raisons qui font que les larves évoluent bien ou mal ne sont pas recherchées.

- *Le taux de survie du naissain*

L'analyse rétrospective, réalisée dans le Pertuis Breton, a montré l'influence importante du facteur "dessiccation" sur les chances de survie du naissain lorsque celui-ci se fixe sur des collecteurs soumis à émergence. D'autres paramètres doivent cependant avoir aussi une action mais ils n'ont pas été mis en évidence.

La question est donc posée :

- doit-on considérer que les manques de captage observés ces dernières années ne sont que des "accidents" dont la probabilité de se renouveler est faible ?
- dans la négative, doit-on s'investir dans une recherche appropriée ?
- si oui, il faut définir les actions à entreprendre et estimer les moyens nécessaires.

## Références

- Boromthanasarat S., 1986.** Les bouchots à *Mytilus edulis* Linnaeus dans l'écosystème estuarien du bassin de Marennes-Oléron (France). Aspects biologiques et bioénergétiques. *Thèse Université Aix-Marseille II*. 141 p.
- Dardignac-Corbeil M.J. et J. Prou, 1995.** A propos des problèmes de captage de naissain de moules (*Mytilus edulis* L.) dans le Pertuis Breton de 1989 à 1991 : Observations préliminaires. *Haliotis*, **24** : 13-31.
- His E., R. Robert et A. Dinet, 1989.** Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, **100** : 455-463.
- Krichene Y., 1981.** Contribution à l'étude de la conchyliculture en mer. *Mémoire 3<sup>o</sup> cycle. Institut National d'Agronomie de Tunis*.
- Le Chanjour R., B. Le Gall et J. Mazurié, 1994.** Etude de la gamétogenèse des moules de la baie de Quiberon et de la rade de Brest. *Note du laboratoire R.A. de la Station IFREMER de la Trinité sur Mer*. 4 p.
- Lubet P., 1959.** Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (mollusques bivalves). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, **23(4)** : 389-548.
- Lubet P. et N. Aloui, 1987.** Limites létales thermiques et action de la température sur la gamétogenèse et l'activité neurosécrétoire chez la moule (*M.edulis* et *M.galloprovincialis*), mollusque bivalve. *Haliotis*, **16** : 309-316.

- Lubet P., J.P. Gimazane et G.Prunus, 1981.** Etude du cycle de reproduction de *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) (mollusque lamellibranche) à la limite méridionale de son aire de répartition. Comparaison avec les autres secteurs de cette aire. *Haliotis*,**11** :157-170.
- Morchid A., 1987.** La reproduction des moules *Mytilus galloprovincialis* Lmk en élevage dans le golf de Fos. Aspects biologiques, biochimiques et bioénergétiques. *Thèse Université Aix-Marseille*. 111 p.

## CYCLE DE REPRODUCTION NATURELLE DES COQUILLES SAINT-JACQUES

Y.M. PAULET, F. BEKHADRA, A. DONVAL ET C. SAOUT

URA CNRS 1513, Laboratoire "Flux de matière et réponses du vivant", IUEM, UBO,  
6 avenue Le Gorgeu, BP 809, 29 285 BREST cedex (F)

**Résumé :** Notre équipe s'est fixée comme objectif d'étudier la régulation des cycles annuels de reproduction chez les bivalves. Les interrogations scientifiques soulevées sont de deux ordres : d'une part elles relèvent de la compréhension des fluctuations d'abondance des populations naturelles (participation au PNDR), d'autre part elles contribuent à l'amélioration du contrôle de la production de produits sexuels à des fins aquacoles (collaboration avec IFREMER DRV/RA). L'espèce modèle retenue est la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*.

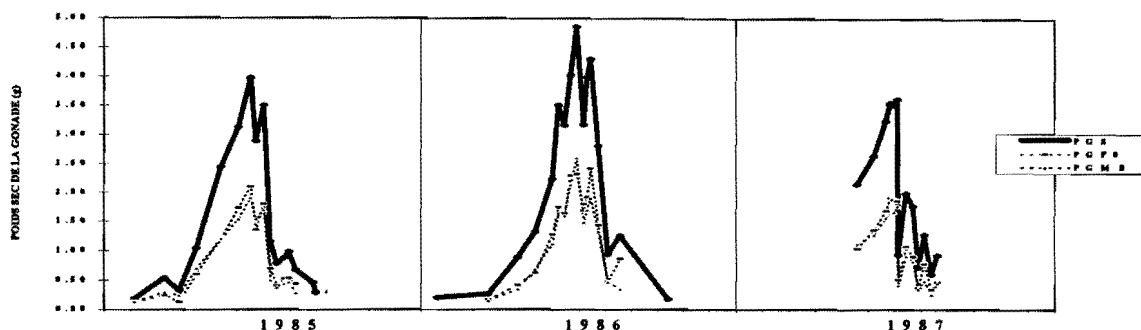
L'étude, menée durant plusieurs années, de la reproduction de la coquille Saint-Jacques des populations de la baie de Saint-Brieuc et de la rade de Brest, a permis de formuler des hypothèses de fonctionnement indispensables au montage de protocoles expérimentaux. Ainsi, les observations, concernant par exemple, la cinétique de la production gamétique et le cycle annuel des tissus de réserve, ont conduit à la mise en oeuvre d'expériences de maturation contrôlée en éclosérie (collaboration avec l'éclosérie du Tinduff, CLPM). La démarche suivie semble prometteuse, elle sera également appliquée à la compréhension des mécanismes du déclenchement de la ponte ainsi qu'à la recherche d'éventuels cycles annuels de nutrition.

## INTRODUCTION

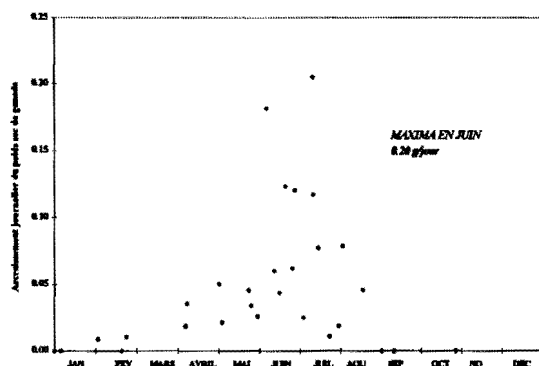
L'étude de la reproduction des populations naturelles de coquilles Saint-Jacques, *Pecten maximus*, relève essentiellement de deux préoccupations :

- i) l'une tient au domaine de la gestion de la ressource, soit comme élément de gestion, soit dans le cadre des études d'écologie populationnelle tel le programme d'étude du déterminisme du recrutement (PNDR)
- ii) l'autre s'insère dans une problématique d'aquaculture notamment à travers la mise au point d'un contrôle de la production gamétique. Dans les deux cas, l'objectif est de disposer de la description la plus précise possible des événements biologiques qui composent un cycle annuel de reproduction, cette description devant être enrichie d'une mesure de la variabilité interannuelle du processus.

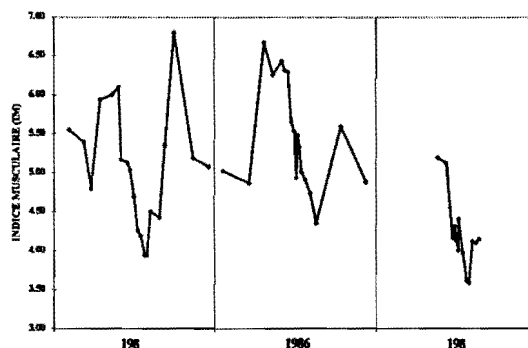
Dans le cadre de ses travaux (contributions au PNDR et aux programmes d'aquaculture), notre laboratoire a été amené à étudier en détail la reproduction de deux populations naturelles de coquilles Saint-Jacques, celle de la baie de Saint-Brieuc de 1985 à 1987 et celle de la rade de Brest de 1989 à 1995. Cette approche en milieu naturel, ne constitue qu'une partie de nos recherches sur cette espèce, espèce que nous avons choisie comme modèle pour des travaux de physiologie de la reproduction et de la nutrition.



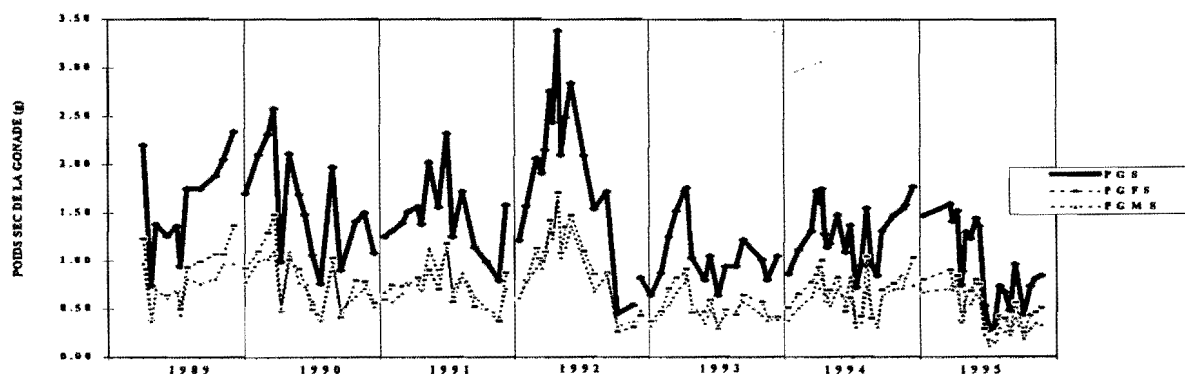
**Figure 1 :** Variations du poids de la gonade séchée de 1985 à 1987 pour des individus de la classe III sur la station Plattières en baie de Saint-Brieuc. (PGS : poids de la gonade séchée ; PGFS : poids de la partie femelle de la gonade séchée ; PGMS : poids de la partie mâle de la gonade séchée)



**Figure 2 :** Baie de Saint-Brieuc, accroissement journalier du poids gonadique (poids sec).



**Figure 3 :** Baie de Saint-Brieuc, variations de l'indice musculaire pour des individus de la classe III



**Figure 4 :** Variations du poids de la gonade séchée pour des individus de la classe III prélevés sur le banc de Roscanvel en rade de Brest. (PGS : poids de la gonade séchée ; PGFS : poids de la partie femelle de la gonade séchée ; PGMS : poids de la partie mâle de la gonade séchée)

## **1. MATERIEL ET METHODES**

Les méthodes de suivi sont les mêmes en baie de Saint-Brieuc et en rade de Brest. Des individus de la classe III ( $n = 20$  à  $30$ ) sont prélevés à la drague au moins chaque mois (chaque quinzaine ou chaque semaine durant les périodes supposées critiques), sur une station de référence. En baie de Saint-Brieuc, il s'agit de la station "Plattières" (profondeur comprise entre 10 et 15 mètres) situées à 4 miles dans l'W-SW du port d'Erquy, tandis qu'en rade de Brest le point de prélèvement est situé sur le banc de Roscanvel (profondeur comprise entre 25 et 30 mètres).

Au laboratoire, les coquilles sont disséquées dans le but d'isoler les différents organes (muscle, gonade, glande digestive et reste des tissus) ; une pesée de ces organes frais ainsi qu'une pesée après dessiccation pendant 48h à l'étuve à 100°C sont réalisées pour chacun des individus. Le poids sec d'un organe peut être utilisé directement comme indicateur de son niveau de développement, ou alors un indice, permettant de se libérer d'une variation sur la taille des individus, peut être calculé pour chacun des organes reconnus (Indice Gonadique, Indice Musculaire, Indice de la Glande Digestive et Indice du Reste). Il est égal au poids de l'organe sec divisé par le poids de la coquille séchée à l'air et multiplié par 100. Ce travail permet également de déterminer la teneur en eau de chacun des tissus.

## **2. RESULTATS**

### **2.1. La reproduction en baie de Saint-Brieuc**

La figure 1 présente les variations du poids sec de la gonade durant les 3 années d'étude. L'activité reproductrice est très fortement saisonnière et synchronisée entre individus. L'hiver apparaît comme une période de repos sexuel, le printemps comme le siège d'une production gamétique très intense et le début de l'été comme une courte période d'émission des produits sexuels.

La réalisation du calcul d'accroissement journalier du poids sec gonadique, entre deux prélèvements successifs, permet de dresser un profil annuel de la cinétique de l'investissement dans la reproduction (Figure 2).

Les maxima de production gonadique sont observés du milieu du mois de juin au milieu du mois de juillet ; leur valeur est voisine de 0.20 gramme par jour. La figure 3, présente les variations de l'indice musculaire ; cet organe reconnu comme principal site d'accumulation des réserves métaboliques exhibe des variations saisonnières reproductibles. Suite à un amaigrissement hivernal, le muscle adducteur voit son poids augmenter rapidement à partir de la fin du mois de mars pour culminer au mois de mai. Ensuite, et corrélativement à l'intense activité gamétogénétique, on observe une décroissance de l'indice musculaire qui atteint son minimum annuel au début du mois d'août ; les réserves musculaires se rétablissent ensuite durant la période automnale.

### **2.2. La reproduction en rade de Brest**

Les données concernant la reproduction de la population brestoïse de coquilles Saint-Jacques sont plus abondantes puisqu'elles recouvrent une période de 7 ans. L'examen des variations du



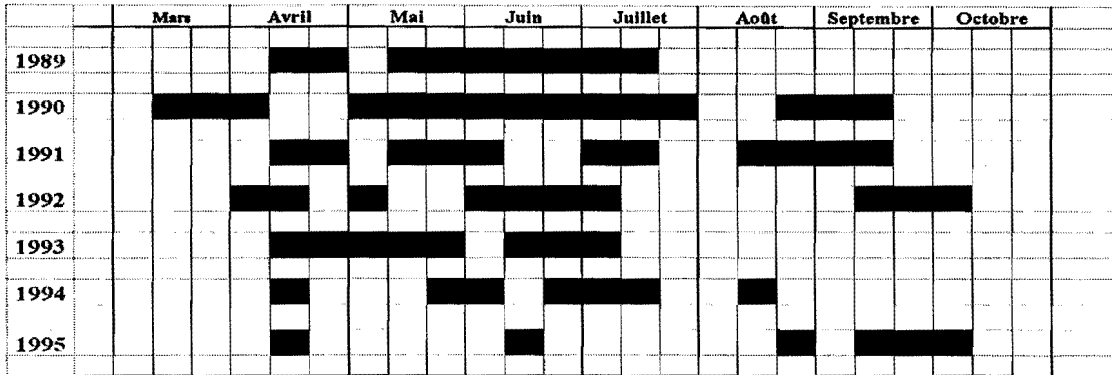


Figure 5 : Calendrier des pontes en rade de Brest (période 1989-1995).

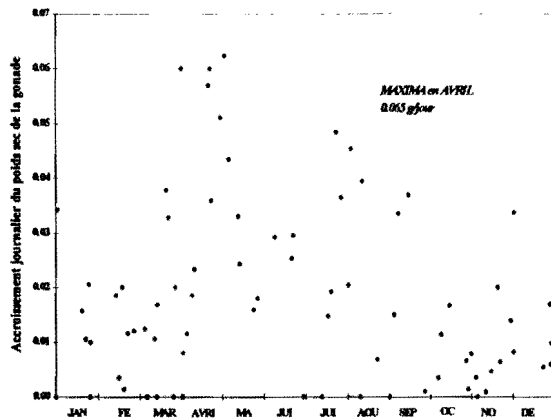


Figure 6 : Rade de Brest, accroissement journalier du poids gonadique (poids sec)

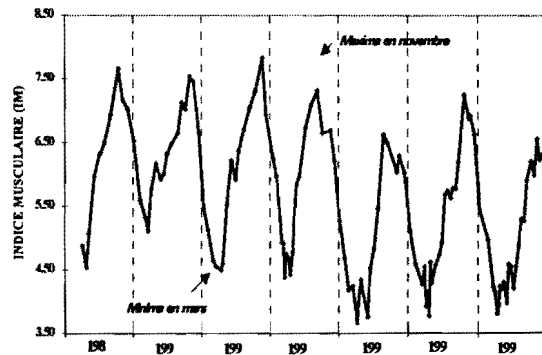


Figure 7 : Rade de Brest, variations de l'indice musculaire pour des individus de la classe III

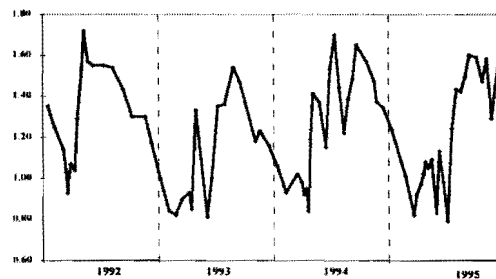


Figure 8 : Rade de Brest, variations de l'indice de la glande digestive (individus de la classe III)

poids de la gonade séchée (Figure 4), laisse apparaître un processus bien différent de celui observé en baie de Saint-Brieuc.

Le cycle saisonnier est bien plus difficile à décrypter, notamment par manque de synchronisme entre les individus qui constituent la population. Cependant, on peut noter un certain nombre d'étapes reconnues chaque année : de décembre à mars une période d'accroissement continu du poids de la gonade, à la fin du mois de mars ou au début du mois d'avril une importante émission de gamètes, d'avril à juillet une phase de rematuration aboutissant à une ou plusieurs pontes, une rematuration estivale conduisant ou non à une ponte de fin d'été. Le calendrier annuel des pontes est donné sur la figure 5. Le calcul d'une cinétique de production gonadique a été réalisé (Figure 6).

L'accroissement journalier du poids de la gonade (Figure 6), montre une forte dispersion due à l'existence d'une variabilité inter-annuelle élevée. Cependant, le nuage de points obtenu permet de dégager une certaine constance du processus de production gamétique : les valeurs maximales sont toujours observées durant le mois d'avril (0.065g/jour), un arrêt de la gamétogenèse au début du mois de novembre. La figure 7 présente les variations de l'indice musculaire durant la période d'étude. A la différence de la gonade, dont les variations pondérales apparaissent chaotiques, le poids du muscle adducteur présente un cycle saisonnier marqué et reproductible. Chaque hiver (de novembre à fin mars) voit l'amaigrissement de cet organe de réserve, tandis que le reste de l'année est caractérisé par une croissance continue de son poids. Les variations inter-annuelles observées, concernent d'une part la vitesse à laquelle se réalise la croissance musculaire printanière et estivale et d'autre part, l'existence ou non d'un plateau durant le printemps.

La figure 8 illustre les variations de l'indice de la glande digestive. Si, en première approche, cet organe semble présenter des fluctuations analogues à celles du muscle adducteur, un examen détaillé permet de relever quelques importantes différences. Les variations pondérales de cet organe sont beaucoup plus rapides que celles du muscle, ce qui donne un aspect moins "lissé" à son profil annuel de variations.

De plus, les variations de l'indice de la glande digestive, qu'elles soient positives ou négatives, précèdent toujours celles de l'indice musculaire.

## DISCUSSION

La coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*, est l'un des bivalves européens dont la reproduction est la plus abondamment étudiée. De la Norvège à l'Espagne, il existe plus de dix populations dont la reproduction a été étudiée de manière approfondie. Une synthèse à l'échelon européen reste à faire, prenant simultanément en compte les caractéristiques des milieux et l'ensemble des caractéristiques biologiques des populations étudiées. Nous avons voulu, à travers cette courte contribution, nous limiter à l'analyse du caractère plus ou moins saisonnier de la reproduction de cette espèce. Pour cela seuls les critères d'évolution pondérale des parties germinale et somatique ont été utilisés, cependant, la matière pour une analyse comparative des aspects biochimique et cytologique de la reproduction est disponible.

Les résultats présentés ouvrent de nombreuses perspectives de recherche concernant la régulation du processus reproducteur. Tout d'abord, ils révèlent l'importance du couplage entre les processus de nutrition/stockage et de gamétogenèse ; ceci est tout à fait clair dans le

cas de la rade de Brest où le bloom phytoplanctonique printanier est immédiatement suivi du déclenchement d'une ponte et de l'accélération de la production gamétique, au même moment les parties somatiques débutent une phase d'accumulation. En baie de Saint-Brieuc, le schéma est différent, puisque la gamétogenèse de fin de printemps se fait au dépend de réserves somatiques accumulées durant les mois de mars et d'avril. En second lieu, il apparaît une action conjointe ou alternée de la température et de la photopériode sur l'intensité de la production gamétique ; en effet la température ne peut permettre d'expliquer, à elle seule, le démarrage de gamétogenèse au mois de décembre en rade de Brest alors qu'elle décroît et qu'elle continuera à le faire jusqu'au mois de mars.

Ainsi, le suivi à long terme de populations naturelles offre les éléments indispensables à la définition de plans d'expériences ayant pour objectifs de maîtriser la reproduction d'une espèce à des fins aquacoles. C'est dans cet esprit que notre laboratoire s'est associé à l'équipe *Mollusques* de l'IFREMER (centre de Brest) et à l'écloserie du Tinduff, dans le but de progresser sur la voie d'un conditionnement contrôlé de la coquille Saint-Jacques. A partir de géniteurs de la rade de Brest, les expériences ont pour objectifs de réaliser une désaisonnalisation de géniteurs afin de différer l'utilisation de réserves musculaires ainsi que d'optimiser les conditions de température et de lumière lors des conditionnements qui précèdent les pontes.

## RECHERCHE DE FACTEURS NEUROPEPTIDIQUES IMPLIQUÉS DANS LE CONTRÔLE DE LA REPRODUCTION CHEZ *Pecten maximus*

GRIFFOND B.\*, F. JÉGOU\*\* ET N. DEVAUCHELLE\*\*

\*CNRS URA 561, Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine, Place Saint-Jacques, 25030 BESANÇON  
Cedex

\*\* IFREMER, Laboratoire Physiologie des Mollusques, BP 70, 29280 Plouzané (F).

**Résumé :** Afin de détecter dans le système nerveux de *Pecten maximus* des facteurs peptidergiques contrôlant la reproduction, nous avons réalisé d'une part des investigations immunocytochimiques, d'autre part des cultures in vitro associant gonades et tissu nerveux.

L'utilisation d'antisera (AS) dirigés contre des peptides ou neuropeptides connus pour leur rôle dans la croissance et la reproduction des différentes espèces de Mollusques et de Vertébrés a permis de mettre en évidence des substances apparentées dans le système nerveux de *Pecten maximus*, aux différents stades de maturation sexuelle. Ainsi, des AS anti-insuline, anti-APGWa et anti- $\alpha$ CDCP révèlent des populations plus discrètes et plus localisées.

In vitro, les résultats préliminaires suggèrent que le ganglion viscéral d'animaux en phase terminale de maturation sexuelle sécrète un facteur stimulateur des mitoses goniales dans la lignée mâle.

La recherche, dans les ganglions nerveux de la coquille Saint-Jacques, de facteurs peptidiques contrôlant la croissance et la reproduction a été entreprise à l'aide de deux techniques complémentaires, la détection immunocytochimique et la méthode des cultures ou associations d'organes in vitro.

### 1. MISE EN ÉVIDENCE IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE NEUROPEPTIDES DANS LE SYSTÈME NERVEUX DE *Pecten maximus*.

Ce travail a fait l'objet d'une publication (Jegou *et al.*, 1993). Des antisera (AS), dirigés contre des (neuro)peptides à rôle connu ou suspecté chez d'autres espèces de Mollusques, ont été testés chez *Pecten maximus*. Les ganglions nerveux (ganglions cérébro-pédieux et ganglion viscéral) d'animaux aux différents stades de maturation sexuelle ont été prélevés, fixés au liquide de Bouin-Hollande-sublimé, inclus à la paraffine, débités en coupes sériées de 6 mm d'épaisseur et traités par la technique à la PAP (Sternberger, 1979).

Un AS anti-FMRFa a permis de détecter de très nombreux périkarya dans tous les ganglions et à tous les stades des fibres immunoréactives très abondantes ont été visualisées dans les neuropiles et les racines nerveuses. Un AS anti-méthionine enképhaline a également révélé des neurones dans tous les ganglions mais leur nombre semblait s'accroître aux étapes finales de la maturation sexuelle. Avec les autres AS utilisés, des marquages plus discrets ont été obtenus. Ainsi, un AS antisomatostatine a mis en évidence des neurones dispersés dans le complexe cérébro-pédieux et la masse viscérale ; avec un AS anti-insuline des groupes de cellules positives ont pu être observés dans le ganglion viscéral ainsi que quelques neurones isolés dans les ganglions cérébro-pédieux ; de petits neurones allongés renfermant une

substance apparentée à l'APGWa ont été identifiés dans les différents ganglions alors qu'avec un AS anti- $\alpha$ CDCP, de rares neurones positifs ont été repérés, en particulier dans les ganglions pédieux.

## **2. ETUDE IN VITRO DE L'EFFET DE BROYATS DE GANGLIONS NERVEUX SUR LE DÉROULEMENT DES GAMÉTOGÉNÈSES MÂLE ET FEMELLE.**

Afin de savoir si les ganglions nerveux de *Pecten maximus* renferment des facteurs susceptibles de stimuler la différenciation ou la maturation des gamètes, un protocole de culture in vitro a été adapté à la coquille Saint-Jacques. Les complexes nerveux (ganglions cérébro-pédieux ou ganglion viscéral) sont prélevés chez des animaux aux différentes phases de maturation sexuelle. Ils sont broyés directement dans le milieu de culture (milieu liquide à base de M199). Le milieu, avec ou sans broyat de ganglions (milieu témoin) reçoit une suspension de cellules gonadiques contenant environ  $10^9$  cellules germinales mâles ou  $10^4$  ovocytes par millilitre. Il est ensuite enrichi soit en thymidine tritiée dont la mesure d'incorporation permet une évaluation des multiplications cellulaires de la lignée mâle, soit en un cocktail d'acides aminés tritiés dont l'incorporation reflète l'accumulation des réserves protéiques dans la lignée femelle.

Les résultats, encore préliminaires, suggèrent que le ganglion viscéral d'animaux en stade final de maturation renferme un facteur stimulateur des multiplications goniales dans la lignée mâle.

En conclusion, nos investigations immunocytochimiques ont démontré l'existence dans le système nerveux de *Pecten maximus* de neuropeptides identiques ou apparentés à des substances impliquées dans la régulation de la croissance ou de la reproduction chez d'autres espèces. Chez *P. maximus*, il serait intéressant à présent de vérifier l'effet de ces peptides, soit par injection, soit in vitro. En ce qui concerne les cultures, après une mise au point méthodologique, nous avons obtenu des résultats encourageants qu'il convient à présent de vérifier et de compléter.

### **Références**

- Jegou F., B. Griffond, N. Devauchelle, A. Donval et C. Colard, 1993.**  
Immunocytochemical detection of different (neuro)peptides in the central nervous system of the scallop *Pecten maximus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106** : 567-572.
- Sternberger L.A., 1979.** Immunocytochemistry. John Wiley and Sons, New York, 2nd Edn.

## MONOAMINES ET REPRODUCTION CHEZ LA COQUILLE SAINT-JACQUES *Pecten maximus*

F. BEKHADRA, Y-M PAULET, A. DONVAL ET C. SAOUT

URA CNRS 1513, Laboratoire "Flux de matière et réponses du vivant", IUEM, UBO,  
6 avenue Le Gorgeu, BP 809, 29 285 BREST cedex. (F).

avec la Collaboration du Laboratoire de Physiologie des Mollusques IFREMER et L'écloserie du Tinduff.

**Résumé :** L'implication des monoamines, dans le processus de reproduction des bivalves marins, a fait l'objet de nombreux travaux. En effet, les expériences d'application *in vitro* et/ou *in-vivo* de la sérotonine et de la dopamine ont mis en évidence leur action sur le contrôle de la gamétogenèse et de la ponte chez de nombreux bivalves. Une dynamique saisonnière de ces amines a été mise en évidence, elle a été corrélée au cycle sexuel. Dans notre étude, nous nous sommes proposés de quantifier (HPLC) la dopamine et la sérotonine dans les ganglions nerveux. Un suivi annuel a été entrepris sur une population naturelle de la Rade de Brest. Les résultats mettent en évidence d'importantes quantités de monoamines et notamment en période de maturation de la gonade. Dans le cadre de notre travail, nous avons entrepris de suivre des animaux conditionnés en écloserie (température et photopériode). Les résultats des dosages suggèrent une influence de la température et de la photopériode sur le contenu en monoamines dans le système nerveux. Il semblerait que les basses températures favorisent l'accumulation de la dopamine.

L'ensemble des résultats devra contribuer à mieux comprendre le contrôle interne de la reproduction. De plus, un aspect appliqué devra en découler dans le domaine du conditionnement des géniteurs en écloserie. Ce dernier, devra être adapté pour une meilleure optimisation des rendements de production.

### INTRODUCTION

L'implication des amines biogènes dans la régulation de la reproduction est actuellement bien établie chez les bivalves. L'impact de ces composés sur le phénomène de reproduction a fait l'objet de plusieurs expériences *in-vitro* et *in-vivo* ; les résultats obtenus ainsi que les hypothèses qui en découlent sont synthétisés ci-après.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude du contrôle de la reproduction des bivalves marins d'intérêt aquacole. La coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*, dont le cycle de reproduction est bien connu, est étudiée afin de préciser l'effet de facteurs environnementaux (température et photopériode) sur l'évolution temporelle des quantités de neurotransmetteurs dans le système nerveux central. Notre démarche s'appuie sur le suivi d'individus d'une population naturelle (banc de Roscanvel, Rade de Brest) pendant deux saisons (hiver et printemps), et sur l'étude d'animaux maintenus en conditions contrôlées de température et de photopériode à l'écloserie du Tinduff (Comité Local des Pêches Maritimes).

## **I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **I.1. Distribution du système monoaminergique**

Depuis les études de Cottrel (1967), sur le système nerveux de plusieurs espèces de bivalves, on sait que la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline sont les monoamines les plus largement représentées dans le système nerveux de ces animaux.

La distribution des neurones sérotonergiques révélée par des techniques immunohistochimiques paraît assez similaire chez deux espèces de pectinidés, (*Patinopecten yessoensis* et *Pecten maximus*) avec une prédominance dans les ganglions cérébroïdes et l'existence d'importants plexus nerveux sérotonergiques dans les neuropiles de tous les ganglions (Matsutani et Nomura, 1984 ; Paulet *et al.*, 1993).

La localisation de catécholamines dans le système nerveux de bivalves se limite à notre connaissance aux résultats apportés par des techniques d'histofluorescence induite chez *Anodonta* (Dahl *et al.*, 1966) et chez *Patinopecten yessoensis* (Matsutani and Nomura, 1984) qui révèlent des neurones dispersés et une abondance de fibres dans les neuropiles des ganglions.

### **I.2. Relation entre système nerveux et gonade**

Les récents travaux de Pani et Croll (1995) ont montré dans la gonade de *Placopecten magellanicus* des concentrations élevées en dopamine, sérotonine et noradrénaline. Ils confirment les données antérieures de Osada *et al.* (1989) sur *Patinopecten yessoensis*. L'innervation de la gonade est réalisée par des nerfs gonadiques venant des ganglions viscéraux ainsi que par des fibres issues des connectifs cérébro-viscéraux (Matsutani et Nomura, 1984 ; Paulet *et al.*, 1993).

### **I.3. Dynamique saisonnière des taux de monoamines**

Les teneurs en monoamines montrent une évolution saisonnière, avec des concentrations de sérotonine élevées en été dans le système nerveux de *Mytilus edulis* (Stéfano et Catapanè, 1977) tandis que chez *Patinopecten yessoensis*, les taux de dopamine montrent des fluctuations importantes pendant la période de ponte (Osada *et al.*, 1989).

### **I.4. Influence des facteurs externes sur les taux de monoamines**

L'hypothèse d'une relation entre la température et les taux de monoamines a été vérifiée en provoquant des chocs thermiques chez *Anodonta* et *Mytilus edulis* (Stephano *et al.*, 1978). Dans le système nerveux de ces deux espèces, un stress froid entraîne une diminution de sérotonine tandis qu'une augmentation de la température entraîne la réaction inverse. Les variations observées pour les catécholamines, noradrénaline et dopamine sont de courte durée, à la suite d'une élévation de température, une chute rapide se produit, suivie par un retour aux valeurs normales semblant indiquer des mécanismes de régulation de ces molécules. Une expérience du même type conduite chez *Crassostrea gigas* montre que dans la gonade les composés aminergiques évoluent à l'inverse du système nerveux (Osada *et al.*, 1989).

## I.5. Dynamique et rôle des monoamines au cours des processus de reproduction

**-Gamétogenèse :** Les différentes monoamines évoluent de façon similaire dans le système nerveux de *Argopecten irradians* au cours de la gamétogenèse avec des taux élevés en fin de gamétogenèse juste avant la ponte (Martinez et Rivera, 1994). Pendant cette phase, dans la gonade, des valeurs maxima étant observées en début de gamétogenèse pour la dopamine, au milieu de la période pour la sérotonine et à la fin pour la noradrénaline dans la gonade mâle (Martinez et Rivera, 1994). L'hypothèse d'un rôle des monoamines dans les processus de mobilisation des réserves via la stimulation de la glycolyse par l'AMP cyclique est proposée par Khotimchenko et Deridovich, (1991) et Campos *et al.*, (1992).

**- Autour de la ponte :** Si les concentrations en monoamines ne semblent pas affectées dans le système nerveux au cours de cette phase, dans la gonade l'émission des gamètes s'accompagne en général de fluctuations. Selon Osada *et al.*, (1987), chez *Patinopecten yessoensis* seuls les niveaux de dopamine diminuent 15 mn après la ponte tandis que Martinez et Rivera (1994) notent une chute de sérotonine, dopamine et noradrénaline pendant les 24 heures suivant l'émission des gamètes chez *Argopecten irradians*. Les résultats montrent que la sérotonine stimule l'émission des gamètes mais que les réponses apparaissent très variables selon l'espèce et le sexe. Chez les espèces testées appartenant aux pectinidés, mytilidés, ostréidés et vénérédés, (Matsutani et Nomura, 1982, 1986 ; Gibbons et Castagna, 1984 ; Tanaka et Murakoshi, 1985 ; Braley, 1985 ; Crawford *et al.*, 1986 ; Alcazar *et al.*, 1987 ; Velez *et al.*, 1990), la plupart répondent par une émission de gamètes mâles mais l'émission d'ovocytes est moins fréquente. La dose nécessaire pour provoquer la ponte ovocytaire est 100 fois supérieure à l'émission de spermatozoïdes chez *Patinopecten yessoensis*. Les mécanismes de stimulation sont encore peu élucidés, certains résultats font état d'une inhibition de la sérotonine par la dopamine (Fong *et al.*, 1993). L'action de la sérotonine semble toutefois liée à la dynamique des prostaglandines PGF<sub>2</sub> $\alpha$  et PGE<sub>2</sub> dans la gonade des mollusques (Osada *et al.*, 1989 ; Matsutani et Nomura, 1986 ; Ono *et al.*, 1982).

**- Maturation ovocytaire:** De nombreux travaux démontrent que face à un même signal hormonal la réponse ovocytaire est très spécifique : chez *Spisula*, les ovocytes achèvent leurs deux divisions de maturation tandis que chez *Ruditapes*, ils restent bloqués en métaphase I, chez *Pecten maximus* la sérotonine est sans effet sur les ovocytes; ces variations entre espèces seraient liées à des différences dans la structure des récepteurs et dans les voies de transduction (Guerrier et Krantic, 1992).

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1 Conditionnement

Pendant la première expérience (22 Novembre 94 au 24 Février 95), les animaux prélevés dans la nature (Roscanvel) sont séparés en deux lots. Le premier lot est conditionné dans un bac chaud (température de 14 °C et photopériode de 16 heures) après une courte période d'augmentation des paramètres. Un second lot est conditionné durant la même période dans un bac froid dans lequel la température et la photopériode sont maintenues constantes (8 °C et 8 h après une diminution de 0.2 °C/ jour et 2 mn/ 24 h) durant les 3 mois d'hiver. Dans la seconde expérience (22 mars au 23 mai), le conditionnement chaud et le conditionnement froid sont reproduits sur deux lots de coquilles du milieu naturel.



**Tableau 1.** Variations des niveaux de monoamines dans le système nerveux durant la première expérience (valeurs moyennes de 4 à 10 individus analysés exprimées en nanogrammes par ganglion, \* évolution significative).

**SEROTONINE**

		Ganglions cérébro-pédieux	Ganglions viscéraux
<b>Début d'expérience</b>	Nature	590.7	597
<b>Fin d'expérience</b>	Nature	1006.8*	912.3*
	8 °C et photopériode hivernale	769.4*	959
	14 °C et photopériode printanière	557	609.6

**DOPAMINE**

		Ganglions cérébro-pédieux	Ganglions viscéraux
<b>Début d'expérience</b>	Nature	389.7	900.6
<b>Fin d'expérience</b>	Nature	369	930.3
	8 °C et photopériode hivernale	277.9	589*
	14 °C et photopériode printanière	201.6*	423.9*

**Tableau 2.** Variations des niveaux de monoamines dans le système nerveux durant la seconde expérience (valeurs moyennes de 4 à 10 individus analysés exprimées en nanogrammes par ganglion, \* évolution significative).

**SEROTONINE**

		Ganglions cérébro-pédieux	Ganglions viscéraux
<b>Début d'expérience</b>	Nature	799.8	811.2
<b>Fin d'expérience</b>	Nature	636.7	908.2
	8 °C et photopériode hivernale	437.6*	759.2
	14 °C et photopériode printanière	826	969.7

**DOPAMINE**

		Ganglions cérébro-pédieux	Ganglions viscéraux
<b>Début d'expérience</b>	Nature	361.6	693.3
<b>Fin d'expérience</b>	Nature	215.5*	580*
	8 °C et photopériode hivernale	258.3*	706.7
	14 °C et photopériode printanière	227.7*	474.6*

## **II.2. Echantillonnage**

Des prélèvements sont faits dans chaque bac de conditionnement à différentes périodes, en début, au cours et en fin de conditionnement. Parallèlement, des lots témoins sont prélevés en milieu naturel. Les coquilles sont disséquées dès leur arrivée au laboratoire. L'ensemble du système nerveux (ganglion cérébro-pédieux et viscéraux) étant prélevé sur chaque individu ainsi qu'un fragment de gonade. Les organes sont aussitôt plongés dans l'azote liquide avant d'être conservés au congélateur (- 80 °C) en attendant leur analyse.

## **II.3. Technique de dosage par HPLC**

Le dosage de la sérotonine et de la dopamine est réalisé par HPLC selon la méthode modifiée de Caroff *et al.* (1986). Chaque ganglion est broyé dans de l'acétonitrile 70 % en présence de deux standards internes, il est ensuite centrifugé pendant 10 mn ( 12 000 T, 10 000 g, 4 °C). Le surnageant est filtré à 0.2 µm puis analysé. Le système d'analyse se compose d'une pompe à gradient Spectre Physiques P 200, colonne Beckman C 18 (5 µm, 4.6 mm x 15 cm), une précolonne Brownlee ( 3 µm), un détecteur électrochimique EG&G Modèle 400 muni d'une électrode de travail opérant à un potentiel de + 850 mv. La phase mobile est préparée dans de l'eau déionisée et contient : 7 % d'acétonitrile, 35 mmol/ l d'acide acétique, 6.1 mmol/ l EDTA, 3.5 mmol/ l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 2.1 mmol/ l d'octyle sulfate, PH 3.35. Les standards utilisés sont préparés dans 70 % d'acétonitrile ce sont: la Sérotonine ( sérotonine créatininsulfat, Merck), la Dopamine ( 3-Hydroxytryptamine, Sigma), la N-acétylsérotonine ( N-acétyl-5-Hydroxytryptamine, Sigma), la Dopac (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, Sigma). La Dopac et la N-acétylsérotonine sont utilisées comme standards internes. Les concentrations en dopamine et en sérotonine sont exprimées en nanogrammes par ganglion.

## **III. RESULTATS**

### **III.1. Première expérience de conditionnement (du 22 novembre 1994 au 24 février 1995)**

#### Au cours de l'expérience (Tab.1).

A la fois dans la nature et à 8 °C avec une photopériode hivernale, la sérotonine augmente dans tous les ganglions. En revanche, la dopamine diminue dans les ganglions viscéraux à 8 °C et dans l'ensemble des ganglions à 14 °C.

#### En fin d'expérience :

A 14 °C, les niveaux de monoamines sont inférieurs à ceux de la nature en fin d'expérience. Le traitement à 8 °C influe sur le niveau de la dopamine dans l'ensemble des ganglions, dans les ganglions viscéraux il est inférieur à celui de la nature. Il est à noter que les quantités de sérotonine dans les ganglions cérébro-pédieux et de dopamine dans les ganglions viscéraux sont significativement plus faibles à 14 °C qu'à 8 °C.

### III.2. Seconde expérience de conditionnement (du 23/03/1995 au 23/05/1995)

#### En cours d'expérience (Tab. 2)

Dans la nature, la dopamine baisse significativement dans l'ensemble des ganglions. Au froid, les monoamines décroissent de manière significative dans les ganglions cérébro-pédieux uniquement, alors qu'à 14 °C seule la dopamine diminue dans les ganglions.

#### En fin d'expérience :

Au froid, la sérotonine des ganglions cérébro-pédieux est au niveau le plus faible comparé à la nature et à 14 °C tandis que la dopamine des ganglions viscéraux est au plus fort.

## IV. DISCUSSION

**Dans la nature**, deux périodes ont été étudiées, l'une, qui s'étend de novembre 1994 à février 1995, s'inscrit au coeur de l'hiver (température en baisse et photophase courte mais en augmentation lente à partir de janvier), l'autre, allant de mars 1995 à mai 1995, s'intègre dans la phase printanière du cycle saisonnier annuel (la température augmente et la photophase s'accroît à un rythme élevé). Durant ces périodes, les monoamines dans le système nerveux central fluctuent :

- i) en hiver, la sérotonine s'accumule dans les ganglions tandis que la dopamine ne montre pas d'évolution détectable,
- ii) au printemps, le contenu en sérotonine reste stable tandis que la dopamine voit sa concentration diminuer.

Les quelques travaux publiés notamment celui de Stefano et Catapane (1977) sur *Mytilus edulis* de la côte Est des Etats-Unis (Long Island Sound), montrent que les variations des concentrations en sérotonine sur une année suivent strictement le cycle thermique annuel de l'environnement avec un minimum en hiver et un maximum en été. Si l'on se réfère uniquement à une base calendaire les résultats de ces auteurs sont en contradiction avec les nôtres ; seule une analyse prenant en compte le "calendrier physiologique" des populations considérées (phases de la reproduction, croissance, etc...) permettrait d'interpréter ces différences. Enfin, les résultats obtenus dans la présente étude menée de novembre 1994 à mai 1995 ne concordent que partiellement avec ceux de Paulet *et al.* (1993) obtenus pour la même espèce et sur le même site en 1991/1992. Il est probable que les différences observées trouvent leur origine dans une différence du régime thermique d'hiver et de printemps entre ces deux périodes, dans un plan d'échantillonnage dont le pas n'est pas le même et dans l'existence d'une ponte hivernale en 1995 non observée en 1992.

**En conditions contrôlées**, A 14°C et en photopériode croissante, et quelle que soit la période de conditionnement, hiver ou printemps, la dopamine diminue dans le système nerveux et la sérotonine reste stable. Ces résultats sont analogues à ceux enregistrés dans la nature durant la période printanière. L'hypothèse d'une implication de la dopamine dans le processus reproducteur durant cette expérience ne peut être écartée : elle se trouve renforcée d'une part par les travaux de Khotimchenko et Deridovich (1991) et de Campos *et al.* (1992) qui démontrent le rôle de la dopamine dans la mobilisation des glucides de réserves, et d'autre part par les résultats de Saout (1995) montrant l'orientation du métabolisme vers la production germinale durant les expériences de conditionnement à 14°C et dans la nature au printemps. Un réexamen des travaux de Paulet *et al.* (1993), permet, de plus, d'identifier des périodes de

baisses rapides de la quantité de dopamine dans les ganglions viscéraux de *Pecten maximus* durant les semaines qui précèdent la ponte en Rade de Brest.

A 8°C et en photopériode hivernale, les résultats diffèrent selon que l'expérience est réalisée en hiver ou au printemps. En hiver, la quantité de sérotonine augmente dans le système nerveux central, comme cela se produit au même moment dans la nature, tandis qu'au printemps elle diminue dans les ganglions cérébro-pédieux. Le même traitement froid ne produit pas les mêmes effets, nous devons faire appel à l'existence de cycles saisonniers, entraînés dans la nature par des facteurs externes, modifiant l'état initial des animaux en début d'expérience.

En se fondant sur nos résultats, on doit admettre qu'il a été possible de produire expérimentalement un printemps en hiver (du point de vue des variations en monoamines dans le système nerveux central), mais non de produire un hiver au printemps.

## CONCLUSION

Ce travail, mené à la fois sur des animaux issus d'un gisement naturel et n'ayant subi aucun conditionnement artificiel, et sur des animaux maintenus en conditions expérimentales, a permis de mettre en évidence d'importantes variations temporelles du contenu du système nerveux central en dopamine et en sérotonine. Certaines expériences apportent des résultats reproductibles et cohérents avec ce qui est observé dans la nature (chute de dopamine lors d'un accroissement de la température), d'autres offrent des résultats divergents selon la saison de leur réalisation (conditions artificielles d'hiver agissant de manières opposées sur le contenu en sérotonine). Ce dernier point accrédite l'hypothèse de l'existence de rythmes physiologiques internes ou de déclencheurs induisant des orientations métaboliques irréversibles.

Les résultats acquis lors de ce "travail exploratoire" sont extrêmement prometteurs, et permettent de poser les bases de travaux à venir. Deux questions seront traitées en priorité par notre équipe dans les mois à venir :

- 1) Les variations des quantités de neurotransmetteurs observées, sont-elles le résultat d'une augmentation des processus de synthèse ou celui d'une diminution de leur libération vers les organes cibles ?
- 2) Quelles sont les variations quantitatives de ces neurotransmetteurs dans l'organe reproducteur ?

Enfin, la conclusion des dosages sur des prélèvements réalisés lors d'un cycle annuel d'individus de la nature (période octobre 1994 - janvier 1996) va permettre de dresser un tableau complet du cycle saisonnier des neurotransmetteurs dans le système nerveux central de *Pecten maximus*.

## Références :

- Alcazar S.N., E.P. Solis and A.C. Alcala, 1987.** Serotonin-induced spawning and larval rearing of China clam, *Hippopus porcellanus* Rosewater (Bivalvia : Tridacnidae). *Aquaculture*, **66** : 359-368.
- Braley R.D., 1985.** Serotonin-induced spawning in giant clams (Bivalvia : Tridacnidae). *Aquaculture*, **47** : 321-325.

- Campos E.O., F. Bronfman and A. Rivera, 1992.** Inestrosa N.C and Martinez G. Proceso reproductivo en invertebrados marinos: neurotransmisores y AMP ciclico. *Rev. Biol. Mar., Valparaiso*, **27** : 225-234.
- Caroff J., L. Barthélémy and P.H. Sebert, 1986.** Brain and plasma biogenic amines analysis by the EC-HPLC technique: application to fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **84c**, **1** : 151-153.
- Cottrel G.A., 1967.** Occurrence of dopamine and noradrenaline in the nervous tissue of some invertebrate species. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, **29** : 63-69.
- Crawford C.M., W.J. Nash and J.S. Lucas, 1986.** Spawning induction, and larval and juvenile rearing of the giant clam, *Tridacna gigas*. *Aquaculture*. **58** : 281-295.
- Dahl E., B. Falck, C. Von Mecklenburg, H. Myhrberg and E. Rosengren, 1966.** Neuronal localization of dopamine and 5-hydroxytryptamine in some mollusca. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **71** : 489-498.
- Fong P.P., R. Noordhuis and J.L. Ram, 1993.** Dopamine reduces intensity of serotonin-induced spawning in the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J. Exp. Zool.*, **266** : 79-83.
- Gibbons M.C. and M. Castagna, 1984.** Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture*. **40** : 189-191.
- Guerrier P. et S. Krantic, 1992.** Reproduction des mollusques bivalves d'aquaculture nouvelle. Rapport IFREMER. 23p.
- Khotimchenko Y.S., and L.L. Deridovich, 1991.** Monoaminergic and cholinergic mechanism of reproduction control in the marine bivalve mollusc and echinoderms: a review. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100C** : 311-317.
- Martinez G. and A. Rivera, 1994.** Role of monoamines in the reproductive process of *Argopecten purpuratus*. *Invert. Repr. Dev.*, **25-2** : 167-174.
- Matsutani T. and T. Nomura, 1982.** Induction of spawning by serotonin in the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Mar. Biol. Lett.*, **3** : 353-358.
- Matsutani, T. and T. Nomura, 1984.** Localization of monoamines in the central nervous system and gonad of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50** : 425-430.
- Matsutani T. and T. Nomura, 1986.** Pharmacological observations on the mechanism of spawning in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52-9** : 1589-1594.
- Ono K., M. Osada, T. Matsutani, K. Mori and T. Nomura, 1982.** Gonadal prostaglandin in F2a profile during sexual maturation in the oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Mar. Biol. Lett.*, **3** : 223-230.
- Osada M., T. Matsutani and T. Nomura, 1987.** Implication of catecholamines during spawning in the marine bivalve mollusc. *Inter. J. Invert. Rep. Dev.*, **12** : 241-252.
- Osada M. and T. Nomura, 1989.** Estrogen effect on the seasonal levels of catecholamines in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. **93C-2** : 349-353.
- Osada M., M. Nishikawa and T. Nomura, 1989.** Involvement of prostaglandins in the spawning of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. **94C-2** : 595-601.
- Pani A.K. and R.P. Croll, 1995.** Distribution of catecholamines, indolamines, and their precursors and metabolites in scallop, *Placopecten magellanicus* (Bivalvia, Pectinidae). *Cell. Mol. Neurobiol.*, Vol. **15**, N°**3** : 371-386.

- Paulet Y.M., F. Bekhadra et A. Donval, 1993.** Monoamines and reproduction in the *Pecten maximus*, a preliminary approach. *Invert. Repr. Dev.* 23 : 2-3 : 89-94.
- Saout C., 1995.** Manipulation des cycles naturels de reproduction chez la coquille Saint-Jacques. Rapport de D.E.A. Univ. Bretagne occidentale. 30p.
- Stefano G.B. and E.J. Catapane, 1977.** Seasonal monoamines changes in the central nervous system of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Experientia*, 33-10 : 1341-1342.
- Stefano G.B., L. Hiripi and E.J. Catapane, 1978.** The effects of short and long term temperature stress on serotonin, dopamine and norepinephrine concentrations in the molluscan ganglia. *J. Therm. Biol.*, 3 : 79-83.
- Tanaka Y. and M. Murakoshi, 1985.** Spawning induction of the hermaphroditic scallop, *Pecten albicans*, by injection with serotonin. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.*, 7 : 9-12.
- Velez A., E. Alifa and O. Azuaje, 1990.** Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermaphroditic tropical scallop, *Pecten ziczac*. *Aquaculture*, 84 : 307-313.



## REFERENCES PHYSIOLOGIQUES DES GAMETES : PARAMETRES DE L'ACTIVATION DES SPERMATOZOÏDES CHEZ LA COQUILLE SAINT-JACQUES *PECTEN MAXIMUS* (LINNE) ET CHEZ L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS* (THUNBERG)

FAURE C.\*, N. DEVAUCHELLE\*, JP. GIRARD\*\* ET J. COSSON\*\*\*

\*IFREMER DRV/RA, Laboratoire Physiologie des Mollusques. BP 70- 29280 Plouzané (F)

\*\* Université de Nice, Sophia Antipolis, faculté des Sciences, Laboratoire de Physiologie cellulaire et comparée, Parc Valrose, 06034 Nice Cedex (F)

\*\*\* URA, 671 du CNRS, Université de Paris 6- 06230 Villefranche sur Mer (F)

*Résumé* : Une série de techniques, qui permet la mesure des paramètres les plus représentatifs de l'activation des spermatozoïdes au cours de leur émission dans l'eau de mer, est décrite. Dans le cas de *Pecten maximus*, le sperme concentré est prélevé au gonopore d'animaux stimulés par une injection de sérotonine. Pour *Crassostrea gigas*, le sperme concentré est obtenu par scarification de la gonade d'animaux non stimulés. Les mesures sont effectuées après la dilution du sperme concentré dans l'eau de mer, reproduisant ainsi les conditions naturelles d'émission au moment de la fécondation. La consommation en oxygène est mesurée dans la chambre d'une électrode de Clark. La mobilité est évaluée soit en microscopie optique en fond noir en lumière transmise, soit sous éclairage stroboscopique. Les caractéristiques physiques du battement flagellaire (fréquence) et du déplacement des spermatozoïdes (vitesse, forme de trajectoire) sont également estimées.

L'influence sur ces paramètres des principaux facteurs ioniques du milieu, dans lequel les spermatozoïdes sont émis, est étudiée. La diminution du pH de l'eau de mer entraîne une diminution des capacités des spermatozoïdes à respirer et à se déplacer pour les deux espèces. L'absence de Na<sup>+</sup> dans l'eau de mer entraîne des conséquences identiques pour *Pecten maximus* seulement. L'augmentation de la concentration en K<sup>+</sup> (200mM) présente un effet activateur chez *Crassostrea gigas* seulement. Ces résultats permettent de suggérer la nature des mécanismes qui accompagnent l'activation des spermatozoïdes (respiration, nage, fécondation) au cours de leur dilution dans l'eau de mer. Dans le cas de *Pecten maximus*, une alcalinisation cellulaire semble nécessaire à l'activation des spermatozoïdes. Chez *Crassostrea gigas*, il est difficile de conclure hormis sur le rôle joué par le K<sup>+</sup> qui se rapproche des observations faites chez certains mammifères.

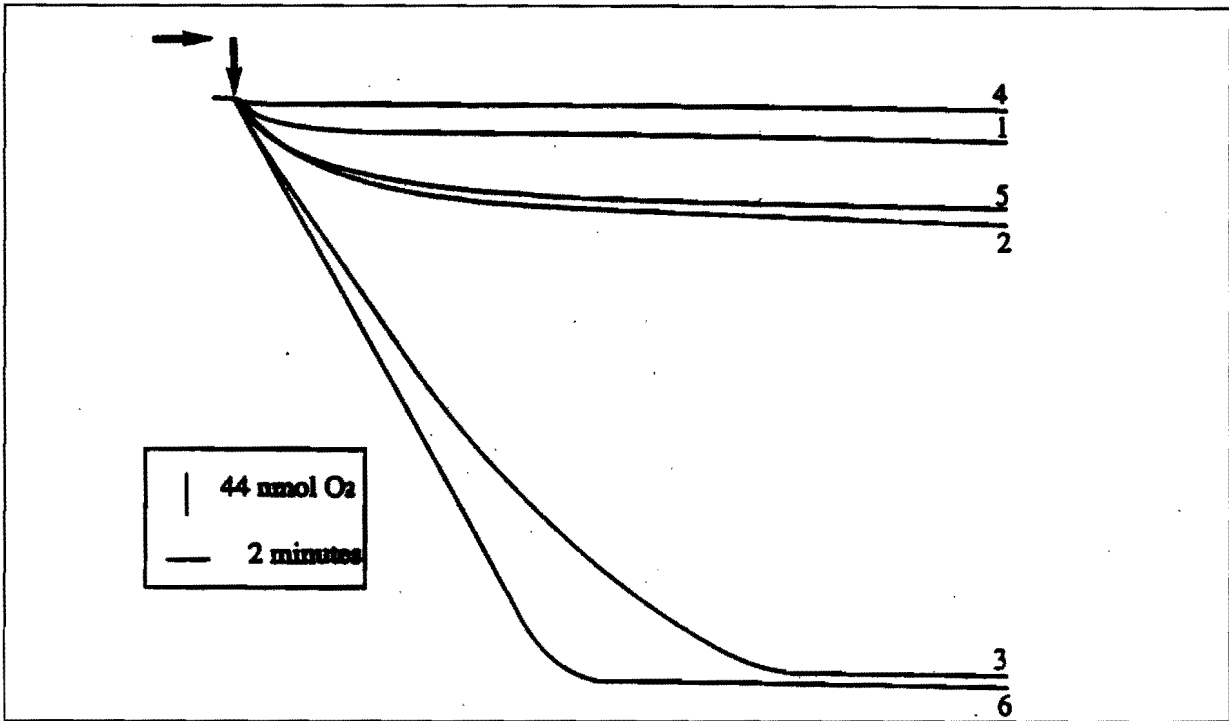
## TECHNIQUES UTILISEES

La mesure de la consommation d'oxygène est effectuée dans une électrode de Clark, reliée à un enregistreur potentiométrique. La consommation, mesurée d'après la courbe (figure 1), est exprimée en nanomoles d'oxygène par minute et par mg de protéines. Un échantillon de sperme dilué dans la chambre de l'électrode est prélevé à chaque mesure et sa concentration en protéine mesurée (Lowry).

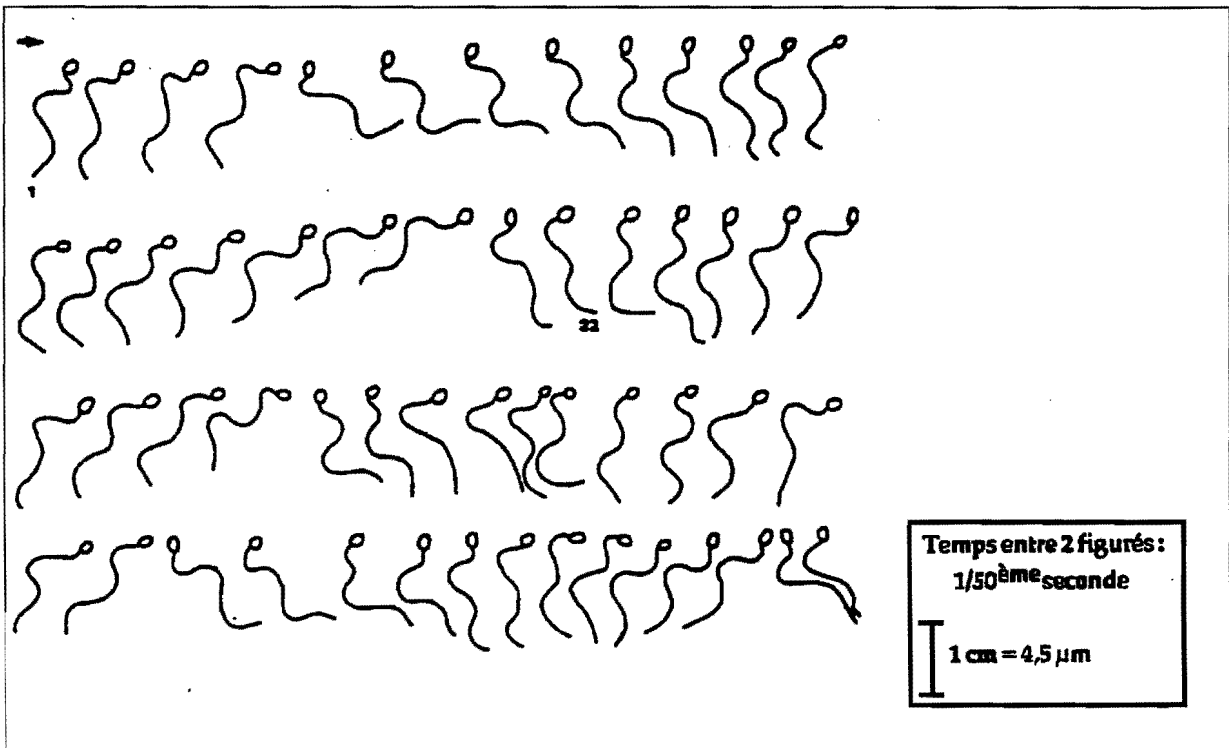
La mobilité des spermatozoïdes est évaluée en microscopie fond noir ou en lumière stroboscopique (Figure 2).

Pouvoir fécondant : des préparations d'ovocytes et d'oeufs sont fixées au formol 4 heures après la fécondation, puis sont colorés au Hoechst 33258. L'observation s'effectue en microscopie à épifluorescence pour estimer la proportion d'ovocytes et d'oeufs.





**Figure 1.** Consommation en oxygène des spermatozoïdes de *Pecten maximus* prélevés dans différentes conditions puis dilués en eau de mer.



**Figure 2.** Positions successives d'un spermatozoïde de *Pecten maximus* lorsque sa trajectoire décrit des cercles en eau de mer.

## RESULTATS

### Influence des paramètres physico-chimiques du milieu de dilution sur l'activation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes ont été prélevés à la sortie du gonopore chez *Pecten maximus*, stimulé par une injection de sérotonine ou bien obtenus par scarification chez *Crassostrea gigas* non stimulée. Au cours de leur dilution dans l'eau de mer, les différents paramètres de l'activité des spermatozoïdes montrent que l'activation des spermatozoïdes de *Pecten maximus*, aboutit à une nage propulsive consistant en un déplacement circulaire alors que chez *Crassostrea gigas* l'ensemble des éléments mesurés est de valeur moindre révélant un faible degré d'activation des spermatozoïdes (Tableau 1). Les spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* présentent un mouvement qui ne varie pas de façon significative lors de la dilution dans l'eau de mer, consistant en un battement flagellaire hétérogène sans mouvement propulsif (Tab. 1).

**Tableau 1.** Caractéristiques de la mobilité des spermatozoïdes dilués en eau de mer naturelle

	<i>Pecten maximus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
<b>Respiration</b> (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	59,7 ± 5,3 (14)	5,1 ± 1,2 (12)
<b>Indice de mobilité</b> (IM) (échelle de 1 à 5)	5 ± 0 (6)	2,7 ± 0,2 (6)
<b>Forme de trajectoire</b>	homogène, circulaire	hétérogène
<b>Aspect des mouvements</b>	propulsifs	peu propulsifs
<b>Vitesse moyenne (VAP)</b> (µm/sec)	225 ± 8 (3) [19] [21] [23]	73 ± 7 (2) [3] [3]

Des travaux antérieurs ont montré que l'émission et l'activation dans l'eau de mer de spermatozoïdes d'invertébrés marins s'accompagnent d'une alcalinisation cellulaire qui rend ces phénomènes sensibles au pH du milieu externe ainsi qu'à la présence de sodium dans celui-ci. Les spermatozoïdes des deux espèces étudiées sont sensibles à une diminution du pH de l'eau de mer dans laquelle ils sont dilués. La mobilité globale des spermatozoïdes de *Pecten maximus* est inhibée tandis que chez *Crassostrea gigas* les mouvements restent de faible amplitude (Tableau 2 et 3).

La baisse du pH de l'eau de mer de 8,2 à 6,5 diminue de 50% la respiration et la mobilité des spermatozoïdes de *Pecten maximus*. Des conséquences identiques sont observées lorsque les spermatozoïdes sont dilués dans une eau de mer artificielle dépourvue de sodium. Nous avons également observé que, dans ces conditions, l'addition ultérieure de sodium restaurait l'activité des spermatozoïdes (respiration, nage et fécondabilité). L'absence de calcium dans l'eau de mer ne modifie aucun des paramètres d'activation mesurés (Tableau 4). Les ions calcium, qui sont indispensables à l'activation des spermatozoïdes chez certaines espèces aquatiques d'eau douce, ne présentent donc pas un caractère indispensable pour l'activation des spermatozoïdes de *Pecten maximus* et *Crassostrea gigas* au cours de leur dilution dans l'eau de mer. La relation entre une élévation du potassium dans l'eau de mer (dépolariation cellulaire) et une inhibition de l'activation des spermatozoïdes a montré, chez certains invertébrés marins (oursin), que l'activation était dépendante du maintien d'un potentiel bioélectrique chez le

**Tableau 2.** Effet du pH acide du milieu de dilution sur les paramètres d'activation des spermatozoïdes de Coquille St-Jacques et d'huître creuse.

	<i>Pecten maximus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
<b>Respiration</b> (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	↘	↘
<b>Indice général de mobilité</b>	↘	↘
<b>Forme de trajectoire</b>	hétérogène, ondulations si mobiles	hétérogène, mouvements très peu propulsifs
<b>Indice de linéarité</b> (IL)	↘	/
<b>Fréquence des battements</b> <b>flagellaires (Hz)</b>	↘	/
<b>Vitesse relative (VRL)</b> (μm/sec)	/	↘
<b>Vitesse progressive (VSL)</b> (μm/sec)	↘	/
<b>Vitesse curvilinéaire (VCL)</b> (μm/sec)	↘	/

**Tableau 3.** Effet de la diminution de la concentration en sodium du milieu de dilution.

	<i>Pecten maximus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
<b>Respiration</b> (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	↘	→
<b>Indice général de mobilité</b>	↘	→
<b>Forme de trajectoire</b>	hétérogène, ondulations si mobiles	hétérogène, mouvements assez propulsifs
<b>Indice de linéarité</b> (IL)	↘	/
<b>Fréquence des battements</b> <b>flagellaires (Hz)</b>	↘	/
<b>Vitesse relative (VRL)</b> (μm/sec)	/	→
<b>Vitesse progressive (VSL)</b> (μm/sec)	↘	/
<b>Vitesse curvilinéaire (VCL)</b> (μm/sec)	↘	/

spermatozoïde. Chez certains mammifères et certains poissons, des conditions identiques, élévation du potassium dans le milieu de dilution des spermatozoïdes, aboutissent à une hyper-activation de ceux-ci. Nous observons que les spermatozoïdes de *Crassostrea gigas*, dilués dans une eau de mer où 200 mM de sodium, ont été remplacés par du potassium, présentent une augmentation de leur consommation d'oxygène ainsi que de leur vitesse relative (Tableau 5).

### **Conditions de prélèvement des spermatozoïdes**

Chez la coquille Saint-Jacques, les conditions d'obtention du sperme jouent un rôle déterminant sur les paramètres physiologiques de l'activation. La respiration, la mobilité, le pouvoir fécondant plus élevés apparaissent pour des géniteurs stimulés thermiquement ou chimiquement (sérotonine). De plus, le passage du sperme dans le rein constitue une étape nécessaire à l'activation des gamètes mâles. La stimulation des géniteurs par une injection de sérotonine est la technique la plus rapide pour obtenir l'émission des gamètes. Le prélèvement du sperme de coquille Saint-Jacques au niveau du gonopore sous forme concentrée puis son stockage à 4°C constitue la méthode de conservation des gamètes mâles la plus performante. En effet, cette méthode permet de maintenir les paramètres physiologiques des spermatozoïdes à un niveau maximal pendant une durée plus longue que dans le cas d'un stockage sous forme diluée à 19°C.

Chez *Pecten maximus*, l'indice de mobilité, le pouvoir fécondant et la respiration des spermatozoïdes sont liés. Par contre, la vitesse de déplacement des spermatozoïdes n'est pas corrélée à ces trois paramètres.

### **Mise en évidence de conditions réprimantes pour les spermatozoïdes dans le milieu gonadique**

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, les conditions d'obtention des spermatozoïdes n'influent pas significativement sur leurs paramètres physiologiques et le passage des gamètes mâles dans le gonoducte ne représente pas une étape nécessaire à l'obtention de conditions d'activation optimales. La technique de conservation la plus efficace consiste à prélever les spermatozoïdes par ponction dans les gonades des géniteurs non stimulés. Le stockage s'effectue ensuite sous forme concentrée à 4°C, permettant le maintien des paramètres physiologiques à un niveau élevé pendant plusieurs heures. Chez ce mollusque, aucune relation stricte n'a été mise en évidence entre les différents paramètres étudiés au cours de la dilution des spermatozoïdes dans l'eau de mer.

Chez la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*, le pH acide du liquide séminal gonadique (6,5) pourrait représenter un des facteurs maintenant les spermatozoïdes dans un état quiescent. Dans ce cas, l'activation par l'eau de mer serait liée à une élévation du pH et/ou à la différence de pression osmotique entre les milieux interne et externe. Or l'hémolymphe présente une osmolarité et une concentration en sodium comparables à celle de l'eau de mer. Seule la concentration en potassium diffère légèrement entre ces deux milieux. L'hémolymphe de *Pecten maximus* a par ailleurs un pH de valeur intermédiaire (7,2) entre celui du liquide séminal (6,5) et celui de l'eau de mer (8,2). Ce dernier point nous amène à privilégier l'hypothèse d'une action du pH dans le blocage et l'initiation du mouvement des spermatozoïdes de coquille Saint-Jacques.

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, le pH dans la gonade est également inférieur à celui de l'eau de mer (6,8), le pH de l'hémolymphe étant intermédiaire entre celui-ci et celui de l'eau de mer. De la même manière que chez *Pecten maximus*, le pH intragonadique pourrait jouer

**Tableau 4.** Effet de la diminution de la concentration en calcium du milieu de dilution.

	<i>Pecten maximus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
<b>Respiration</b> (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	→	→
<b>Indice général de mobilité</b>	→	→
<b>Forme de trajectoire</b>	Homogène, circulaire avec décrochements	Homogène, mouvements propulsifs
<b>Indice de linéarité</b> (IL)	→	/
<b>Fréquence des battements</b> <b>flagellaires (Hz)</b>	→	/
<b>Vitesse relative (VRL)</b> (μm/sec)	/	→
<b>Vitesse progressive (VSL)</b> (μm/sec)	→	/
<b>Vitesse curvilinéaire (VCL)</b> (μm/sec)	→	/

**Tableau 5.** Effet de l'augmentation de la concentration en potassium du milieu de dilution.

	<i>Pecten maximus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
<b>Respiration</b> (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	→	↗
<b>Indice général de mobilité</b>	→	→
<b>Forme de trajectoire</b>	Homogène, circulaire avec décrochements	Homogène, mouvements propulsifs
<b>Indice de linéarité</b> (IL)	→	/
<b>Fréquence des battements</b> <b>flagellaires (Hz)</b>	→	/
<b>Vitesse relative (VRL)</b> (μm/sec)	/	↗
<b>Vitesse progressive (VSL)</b> (μm/sec)	→	/
<b>Vitesse curvilinéaire (VCL)</b> (μm/sec)	→	/

un rôle dans la répression et l'initiation du mouvement des spermatozoïdes. Cependant, pour certains lots de sperme, il semble que les spermatozoïdes soient déjà mobiles dans le liquide séminal. Ceci pourrait indiquer que le pH n'est pas le seul facteur de répression de l'activité des spermatozoïdes avant leur émission. La concentration en potassium dans l'hémolymphe des animaux stimulés, plus élevée que celle de l'eau de mer, pourrait constituer un des facteurs augmentant la mobilité des spermatozoïdes comme cela a été montré au cours de leur dilution dans une eau de mer artificielle riche en potassium. Ceci reste une hypothèse.



## ETUDE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE *Pecten maximus* (L.)

N. CASSE \* ET N. DEVAUCHELLE \*\*

\* URA CNRS D 1513, Laboratoire de Biologie Marine, Institut d'Etudes Marines, 6 avenue Le Gorgeu, B.P. 809, 29285 Brest Cedex (F).

\*\* IFREMER, Laboratoire Physiologie des Mollusques, BP 70, 29280 Plouzané (F).

**Résumé :** La chronologie du développement de la coquille Saint-Jacques a été étudiée depuis l'oeuf jusqu'à la larve D, et ceci pour des conditions d'élevage standard. Après la fécondation, l'embryon de coquille Saint-Jacques va subir successivement les processus de méiose, de segmentation, de gastrulation et d'organogenèse. La méiose permet l'expulsion des 2 globules polaires entre 30 et 45 mn. La segmentation s'étale sur les 7 premières heures de développement. La gastrulation s'étend de 8 à 12 h après la fécondation, et conduit à la formation d'une larve ciliée: la gastrula. Durant l'organogenèse, sont observés des stades caractéristiques tels que trochophore, véligère et larve D ; de plus, le vélum, le manteau, la coquille, la musculature et le tractus digestif se développent.

L'étude de l'embryogenèse de *Pecten maximus* a permis l'obtention de données fondamentales sur le développement de cette espèce. Cependant, il est à noter que les performances des élevages embryonnaires sont très variables, c'est pourquoi, l'estimation de la qualité d'un élevage semble indispensable. Bien que les résultats obtenus ici ne permettent pas de prédire la performance d'un élevage, l'obtention d'indications sur le devenir d'un lot d'embryons est néanmoins possible.

### INTRODUCTION

Le développement embryonnaire de *Pecten maximus* se déroule pendant les deux premiers jours de la vie de l'animal. Au cours de la phase d'embryogenèse, l'oeuf se développe progressivement en une larve D grâce aux réserves accumulées dans l'ovocyte lors de l'ovogenèse. La période embryonnaire est caractérisée par d'importantes modifications morphologiques et anatomiques qui affectent les embryons tout au long de leur développement. Le suivi de ces modifications a permis d'établir une chronologie du développement embryonnaire de l'espèce pour des embryons incubés en conditions standards, la température étant de 18-19°. Cependant, les performances des élevages embryonnaires sont très variables en termes de survie et de « normalité » du développement, c'est pourquoi l'utilisation d'indicateurs permettant d'estimer la qualité d'un élevage est proposée ici.

### RESULTATS

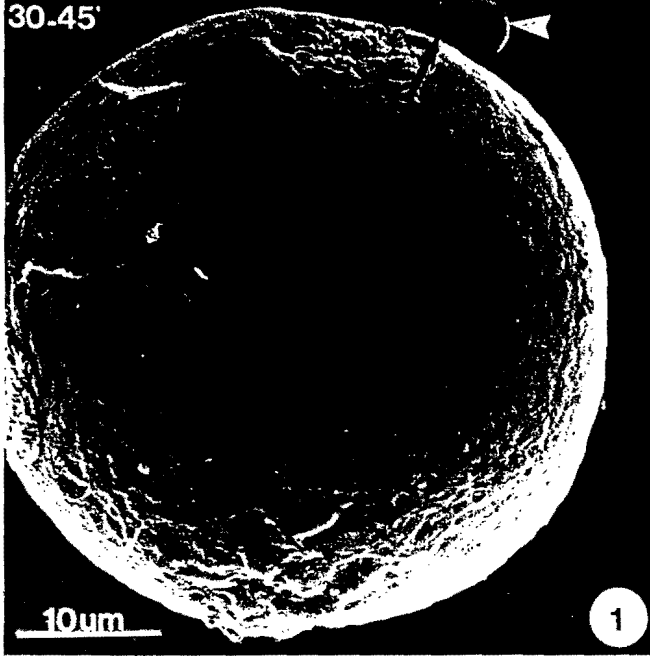
#### La chronologie du développement embryonnaire

Chez les métazoaires, au cours de la période embryonnaire, 4 processus de développement vont se succéder (Houillon, 1957) :

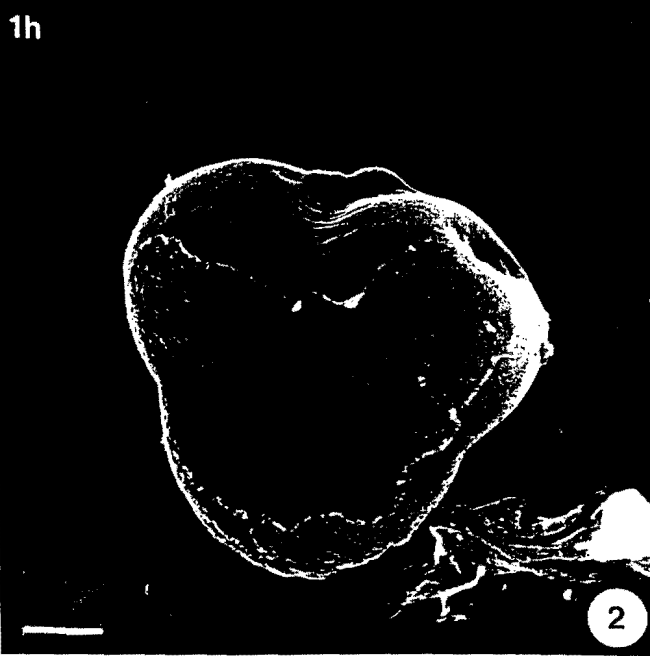
- la méiose, qui permet l'expulsion des globules polaires ;
- la segmentation, période pendant laquelle l'oeuf se divise sans augmenter de volume;
- la gastrulation, qui permet la mise en place des feuilletts embryonnaires



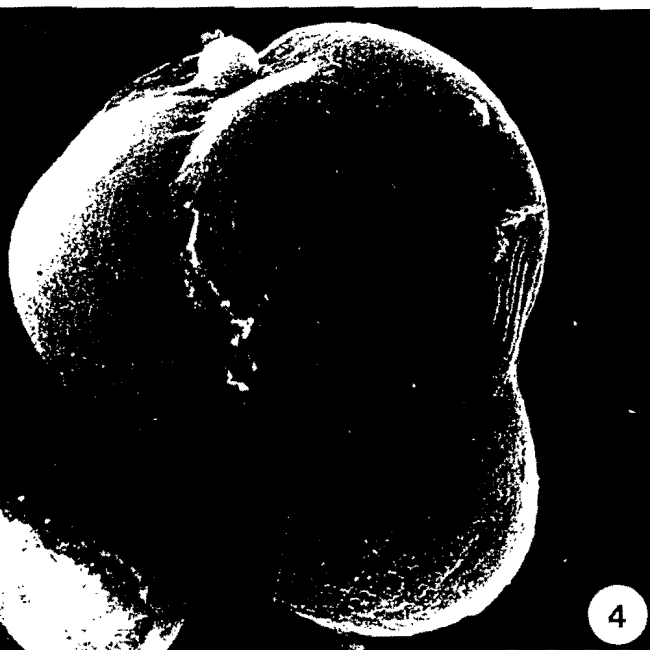
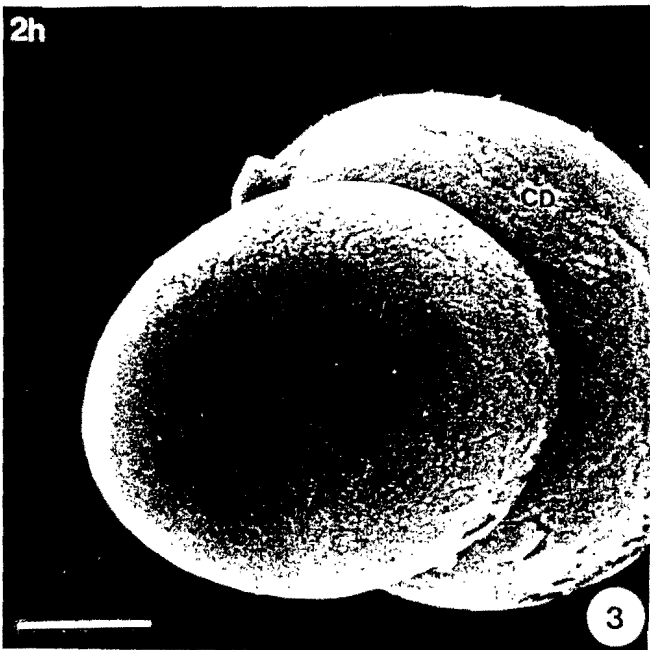
30-45'



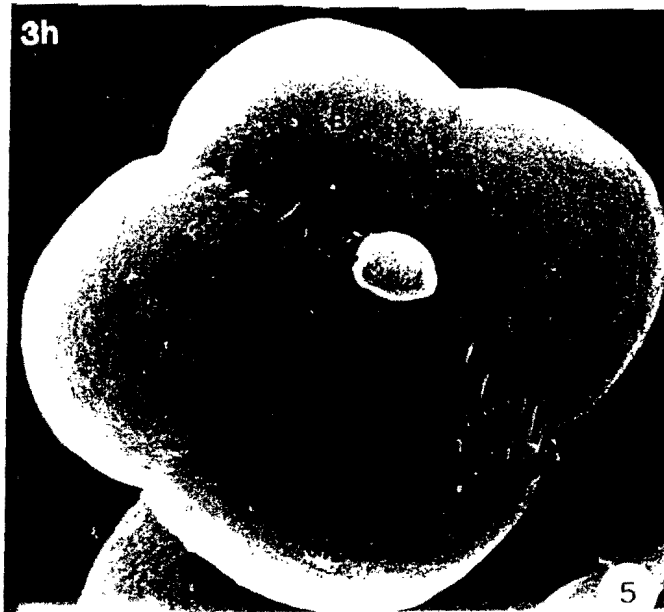
1h



2h



3h



- l'organogenèse, qui conduit à la mise en place des organes.  
(Chez les Mollusques Bivalves pendant l'organogenèse apparaissent : le vélum, le tube digestif, le manteau, la musculature et la coquille).

Les principales étapes de la chronologie sont données ci-après.

#### La méiose :

La méiose conduit à l'expulsion du premier globule polaire 30 mn ( $\Delta$ ) après la fécondation et du second globule polaire entre 45 mn et 1h ( $\rightarrow$ ) (photo 1). Les globules polaires sont situés au pôle animal de l'oeuf, le pôle opposé étant le pôle végétatif.

#### La segmentation :

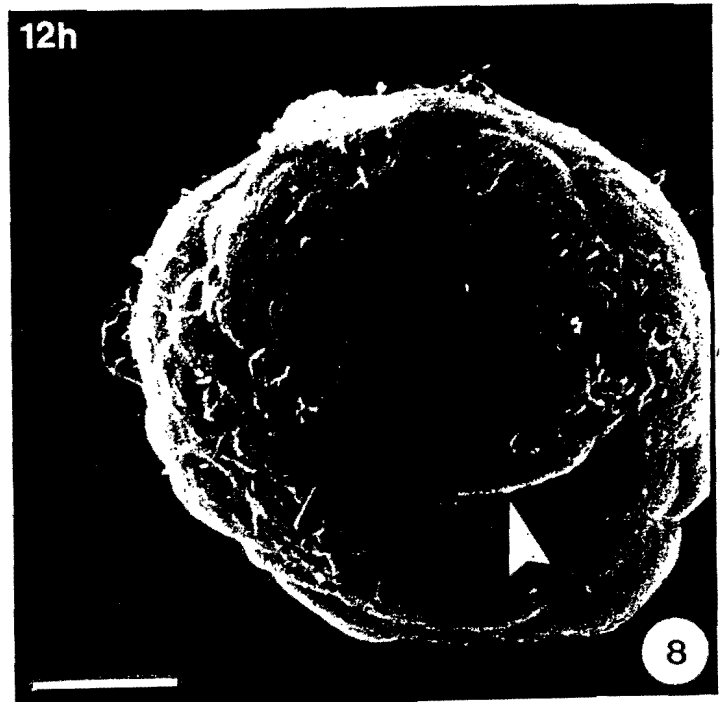
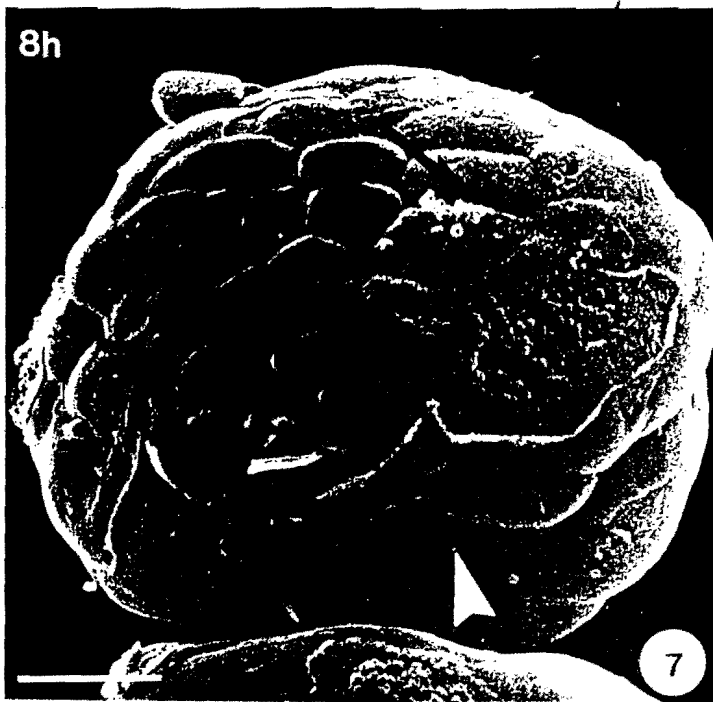
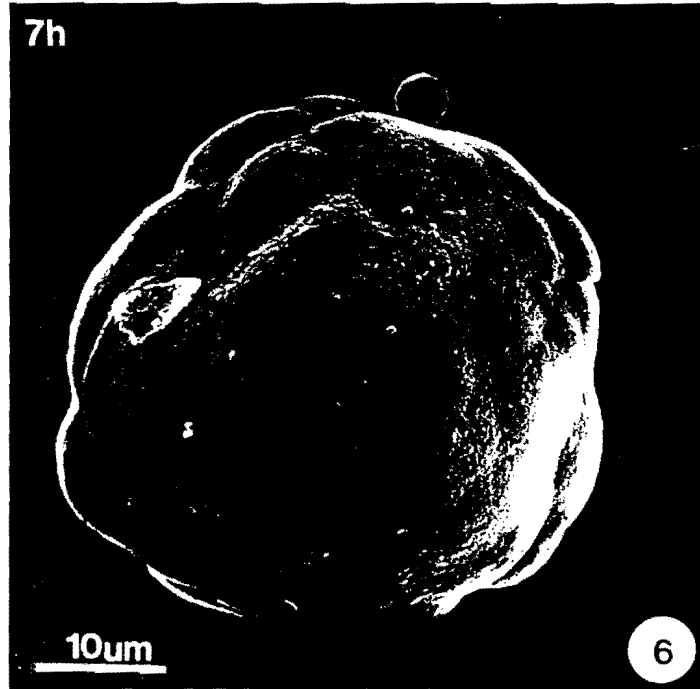
La première division de segmentation prend place rapidement et elle est accompagnée par la formation d'un lobe polaire (Lp 1) au pôle végétatif de l'embryon (photo 2). Ce lobe polaire va se déplacer et se résorber dans l'un des deux blastomères donnant naissance après 2 heures de développement à un embryon à 2 cellules de taille inégale : le petit blastomère est conventionnellement nommé AB et le blastomère volumineux est appelé CD (photo 3). C'est entre 2 et 3h que l'embryon se divise pour la seconde fois (photo 4). Cette seconde division est également accompagnée par la formation d'un lobe polaire (Lp 2) au pôle végétatif de l'embryon, lobe polaire qui va se déplacer et se résorber progressivement dans l'un des blastomères. L'embryon est alors au stade 4 cellules. Il est constitué de blastomères conventionnellement nommés A, B, C et D, ce dernier étant plus volumineux que les trois autres puisqu'il a résorbé le lobe polaire (photo 5). La segmentation se poursuit par l'apparition d'embryons à 8 cellules, à 16 cellules, puis par la formation de la morula qui est observée environ 5h après la fécondation. La segmentation s'achève par la formation de la blastula (photo 6), stade embryonnaire caractérisé par l'apparition d'une cavité interne le blastocoele. La blastula est observée après 7h de développement.

#### La gastrulation :

La blastula entame le processus de gastrulation après 8h de développement (photo 7). Le pôle végétatif de l'embryon s'invagine ( $\Delta$ ) et pénètre progressivement dans le germe : c'est l'embolie ; parallèlement, les micromères du pôle animal vont migrer ( $\rightarrow$ ) à la surface du germe pour le recouvrir : c'est l'épibolie. La gastrulation s'achève vers 12h et donne naissance à une jeune gastrula montrant un blastopore ( $\Delta$ ) réduit sur sa face ventrale (photo 8). Le blastopore deviendra la bouche de l'animal. A ce stade, la gastrula porte des cils épars ( $\rightarrow$ ) localisés dans la région équatoriale. Ces cils permettent alors à la jeune larve de nager en tournant sur elle-même.

#### L'organogenèse :

La gastrula va devenir progressivement une larve trochophore après 20h de développement (photo 9). Cette larve est caractérisée par la prototroque (Pr), qui est une couronne de cils localisée au niveau de la région équatoriale de la larve. Cette structure délimite le corps de la larve en une région pré-trochale, située au-dessus de la prototroque et une région post-trochale, localisée sous la prototroque. La région pré-trochale porte en son centre une touffe de cils longs, le flagelle apical ( $\rightarrow$ ). Grâce à ce dernier, la larve est capable de nager à proximité de la surface et elle progresse selon un mouvement spiral. C'est à ce stade que débute la formation de la coquille dont l'ébauche est visible dans la région dorsale de la larve ( $\Delta$ ). Par la suite, la



trochophore subit des modifications morphologiques et anatomiques qui vont lui permettre de devenir une larve véligère (photo 10). Ainsi, la prototroque se développe considérablement pour se transformer en vélum (Ve), vaste structure qui permet à la larve de se déplacer et de respirer. Chez les jeunes véligères âgées de 30h, la coquille (c) recouvre une grande partie du corps de l'animal, à l'exception du vélum et de la région postérieure de la larve qui porte la bouche ( $\Delta$ ) et l'anus ( $\rightarrow$ ). Après 45h de développement, apparaît la larve D qui est également une véligère (photo 11). A ce stade, la coquille (c) recouvre entièrement le corps de l'animal et elle présente une forme caractéristique en D. La coquille est alors lisse et des observations en microscopie polarisée révèlent qu'elle est calcifiée.

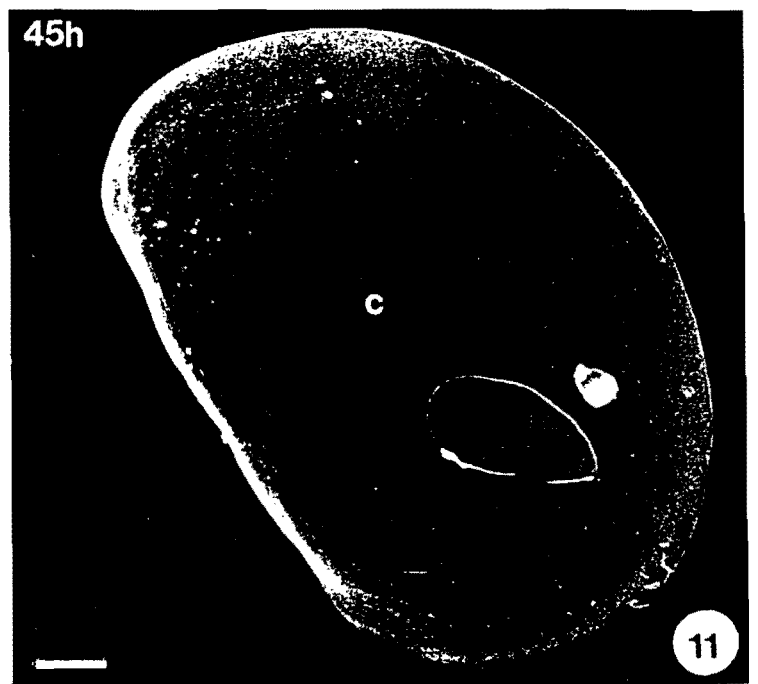
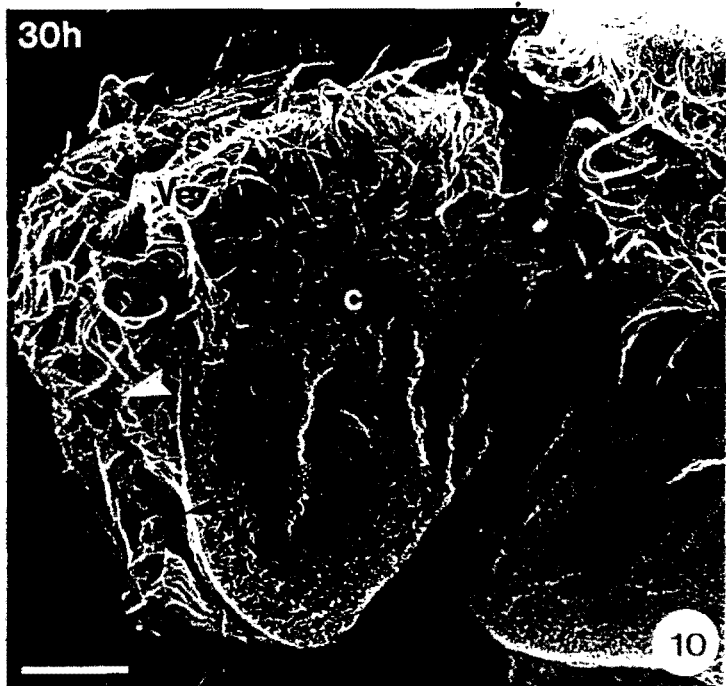
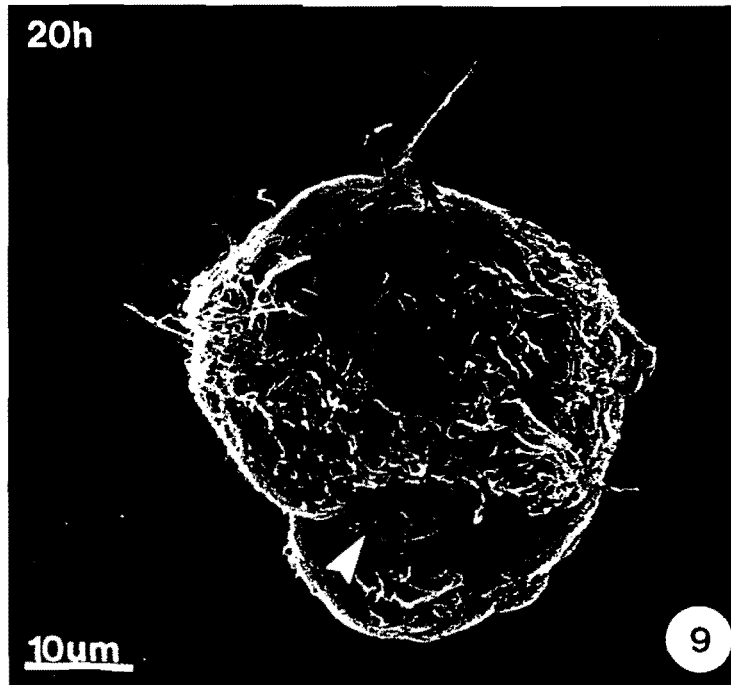
De nombreuses anomalies peuvent apparaître tout au long du développement embryonnaire de *Pecten maximus*, cependant plusieurs étapes semblent particulièrement critiques pour les embryons. Il faut citer :

- les deux premières divisions avec la formation des lobes polaires ;
- la gastrulation qui est un processus morphogénétique complexe ;
- la formation de la coquille qui est un événement long et complexe.

Cette étude nous a conduit à obtenir essentiellement des données fondamentales sur le développement embryonnaire de *Pecten maximus* et, notamment, à établir une chronologie moyenne du développement embryonnaire de l'espèce dans des conditions d'élevage standards. Les données obtenues précédemment sont résumées dans le tableau 1.

**Tableau 1** : chronologie du développement des embryons de *Pecten maximus* (température d'incubation: 18-19°C).

Processus de développement	Nombre d'heures après la fécondation	Stade de développement	Organes en développement	Comportement natatoire (Cragg, 1980)
méiose	30-45 mn	globules polaires		sédimentation
segmentation	1-5	stade 2 à 16 cellules		
	5	morula		
	6-7	blastula		
gastrulation	8-12	jeune gastrula		nage à proximité du fond, rotation.
organogenèse	13-16	gastrula		
	17-25	trochophore	prototroque => vélum	nage en subsurface
	26-45	véligère	coquille, manteau, tube digestif	progression en spirale
	45-48	larve D (véligère)	musculature.	



### **Estimation de la qualité d'un élevage embryonnaire :**

Il faut cependant rappeler que les performances des élevages embryonnaires sont extrêmement variables. C'est pourquoi, il est important de pouvoir estimer la qualité d'un élevage au cours du temps. Bien que les résultats obtenus dans cette étude ne permettent pas de prédire les performances d'un élevage, l'obtention d'indications sur le devenir d'un lot d'embryons est néanmoins possible.

A partir des résultats donnés précédemment, nous suggérons l'utilisation de plusieurs « points de repères » pour l'estimation de la qualité des embryons au cours de leur développement. Il faut mentionner notamment :

- les écarts par rapport à la chronologie moyenne établie ;
- l'estimation du pourcentage d'anomalies ;
- l'évolution du comportement natatoire des larves.

L'obtention des données mentionnées ci-dessus peut se faire par des prélèvements réguliers sur les bacs d'élevage et par l'observation des embryons à l'aide d'un microscope ou d'un projecteur de profil.

### **CONCLUSION**

Les résultats sur la chronologie du développement des embryons, sur leur morphologie et sur leur comportement natatoire obtenus ici devraient permettre l'estimation de la qualité d'un élevage embryonnaire au cours du temps. Il faut cependant remarquer qu'il serait également très intéressant de pouvoir déterminer avec précision la qualité des ovocytes, des spermatozoïdes, ainsi que celle des oeufs avant leur mise en incubation. Ceci devrait permettre d'une part, d'éliminer certaines sources d'anomalies liées aux gamètes et à la fécondation et d'autre part, d'éviter de mettre en élevage des lots d'oeufs de mauvaise qualité.

### **Références**

- Cragg S.M., 1980.** Swimming behavior of the larvae of *Pecten maximus* (L.) (Bivalvia). J. Mar. Biol. Ass. U. K. **60** : 551-564.
- Houillon C., 1957.** Embryologie. Hermann (Ed.) Paris, 184 p.



## DISCUSSIONS

### CONNAISSANCE DES CYCLES NATURELS DES GAMETES ET DES EMBRYONS

rapporteur : **Joseph MAZURIE**

**Nicole DEVAUCHELLE** dresse un tableau de la maîtrise croissante de l'élevage des mollusques, depuis la cueillette sur les gisements naturels jusqu'à la reproduction contrôlée (ou artificielle). 7% des mollusques de l'aquaculture mondiale seraient issus d'écloserie (10% en France ?). Elle introduit les présentations suivantes axées, d'une part, sur les cycles naturels et, d'autre part, sur les gamètes et embryons.

**Philippe GOULETQUER** rappelle les connaissances acquises sur la reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* en France (sites, périodes, effort selon les classes d'âge). Il passe en revue l'incidence des facteurs température, salinité, nutrition, sur la gamétogenèse, la survie larvaire et la réussite du captage.

**Anne-Geneviève MARTIN**, après avoir rappelé les caractéristiques distinctives de l'espèce *Ostrea edulis*, développe les résultats des méthodes d'évaluation du nombre de degrés-jours nécessaire à la maturation.

**Marie-José DARDIGNAC** présente les connaissances et travaux sur la reproduction naturelle de *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*, en soulignant le caractère plus malléable de la reproduction de ce genre, face aux conditions externes.

**Yves-Marie PAULET** illustre les singularités de la reproduction de *Pecten maximus* à partir des données acquises sur les populations de la Baie de St Briec et de la Rade de Brest.

**Bernadette GRIFFOND** démontre l'existence dans les ganglions nerveux de *Pecten maximus* de neuropeptides apparentés à des molécules connues pour leur action de contrôle de la reproduction chez les mammifères ou d'autres mollusques. Des broyats de ganglions viscéraux sont capables de stimuler les mitoses goniales.

**Farida BEKHADRA** expose des résultats acquis sur le cycle des monoamines (sérotonine, dopamine), dans des géniteurs de *Pecten maximus* en voie de maturation naturelle ou conditionnée, en vue d'une meilleure compréhension ou contrôle de la maturation.

**Catherine FAURE** présente les méthodes d'estimation de la qualité du sperme de *Pecten maximus* et *Crassostrea gigas*, les facteurs ioniques d'activation, et conclut à des "performances" inférieures chez l'huître.



**Nathalie CASSE** décrit les différentes phases de l'embryogenèse, et souligne la nécessité de critères qualitatifs (tels que le synchronisme dans le développement).

La discussion sur les exposés de la matinée a porté sur la comparaison des stratégies des différentes espèces ou variétés, selon les principaux critères (saisonnalité, facteurs externes déclenchants ou accélérateurs...). Ces stratégies représentent différents modes de gestion d'une ressource trophique variable. Des tentatives de modélisation cherchent à quantifier les rôles respectifs de la nourriture et de la température dans la reproduction naturelle de certaines espèces. Une question fondamentale est celle de la priorité entre facteurs internes et externes, qui déterminera l'aptitude à la désaisonnalisation. L'étude des neurotransmetteurs pourrait être mieux focalisée sur les périodes critiques (déclenchement des mitoses goniales...) mises en évidence dans les cycles naturels de nombreuses espèces.

## **CONTROLE ARTIFICIEL DE LA REPRODUCTION**



## ESTIMATION DES STADES DE MATURITE DE BIVALVES

N. DEVAUCHELLE, M. THIELLEY ET G. SALAÜN

IFREMER DRV/RA, Laboratoire Physiologie des Mollusques. BP 70. 29280 Plouzané (F)

**Résumé :** L'option fécondation artificielle, choisie en France pour la production d'embryons de bivalves, implique les notions de prévision et de synchronisation des gamétogenèses et des pontes. Les pontes sont le plus souvent imprévisibles à quelques jours près ; en écloséries, les pontes imprévues sont le plus souvent totales et perdues ; les pontes provoquées par l'homme, souvent partielles, immatures, surmatures.

Dans une population donnée, la synchronisation des gamétogenèses est rare dans la nature ou en conditionnement. Dans le cas du conditionnement, l'asynchronisme interindividuel est accentué du fait de l'imprécision des méthodes d'estimation de l'état de maturité des reproducteurs placés en bassins.

Comment estimer cet état précisément en cours de gamétogenèse, sans sacrifier les individus, est la question à laquelle nous apportons, ici, des éléments de réponse.

Pour affiner l'estimation de cet état, il est nécessaire d'accéder à la gonade. Chez les animaux qui "clappent" naturellement des valves, l'accès se fait en maintenant les valves ouvertes. C'est le cas de *Pecten maximus*. Chez les espèces qu'on ne peut maintenir ouvertes, l'accès peut être envisagé soit après perforation de la coquille (lime, mini perceuse...) soit, après induction du bâillement (froid, produits chimiques). Il en est ainsi pour *Ruditapes philippinarum*, *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*. Le chlorure de magnésium à 35‰ donne, pour ces dernières espèces, les meilleurs résultats.

La gonade étant accessible, des biopsies peuvent être pratiquées. Nous avons constaté que l'observation de fragments de tissus, prélevés par biopsie à la pince bronchoscopique, donne à l'issue d'une préparation histologique (48h), une évaluation des stades de gamétogenèse plus fiable que celle donnée à l'issue d'une évaluation macroscopique. Un mois après la biopsie, aucune mortalité, aucun retard de gamétogenèse ne sont enregistrés.

La validation de ces observations à grande échelle est nécessaire avant de généraliser ces pratiques en début et cours de gamétogenèse. Pour des diagnostics urgents, le délai actuel d'observation des fragments (48h) devra être réduit.

## INTRODUCTION

Une alimentation continue en larves et donc un contrôle satisfaisant des stades de la gamétogenèse puis des émissions des produits sexuels est la condition *sine qua none* pour la viabilité économique d'une éclosérie de bivalves. D'où l'option de recherche aquacole concernant la fécondation artificielle.

Différentes méthodes sont aujourd'hui utilisées pour suivre l'état de maturité des gonades et apprécier la qualité des gamètes.

Une estimation précise n'est possible aujourd'hui que par sacrifice de l'animal. Il est donc important de rechercher de nouvelles méthodes d'évaluation qui permettent la conservation de celui-ci et son évolution ultérieure sans altération d'aucune sorte à des fins de synchronisation des gamétogenèses et des pontes.

Une recherche d'indices de qualité liés au développement gonadique est un autre point essentiel.

Une nouvelle approche dans le domaine de l'exploration fonctionnelle, outre qu'elle nous renseigne utilement et sur des mécanismes et sur leurs dysfonctionnements, permet, face à

l'existence d'une grande hétérogénéité interindividuelle, de concevoir, à travers un suivi précis, une première sélection de géniteurs retenus pour leurs qualités intrinsèques à fournir des gamètes, des embryons puis des larves et post-larves.

Ce papier rappelle des méthodes actuellement utilisées dans le contrôle de l'état de maturité des gonades de bivalves et rend compte d'une nouvelle approche expérimentale afin de mieux évaluer les stades dans le cadre d'un suivi individuel pour une prévision optimale du moment, de la quantité et de la qualité de l'émission ainsi que de la fiabilité de l'élevage ultérieur.

## RAPPEL DES METHODES USUELLES

Il existe différents critères pour évaluer l'état de maturité d'une gonade:

- \* des critères macroscopiques (état de maigreur ou de réplétion, épaisseur du tissu gonadique, indice gonadique, coloration de la gonade) observables l'animal "ouvert",

- \* des critères microscopiques "mesurables" après des manipulations précises et l'utilisation de techniques sophistiquées (sur coupes histologiques, description de l'abondance et de la morphologie des gamètes ou mesure de l'épaisseur du tissu gonadique ; sur frottis, description de la morphologie et de l'abondance des gamètes).

Les méthodes d'observation utilisées apportent un certain nombre d'informations tant quantitatives que, et/ou, qualitatives, fonction de ces critères :

- \* des informations quantitatives (état de maigreur ou de réplétion de la gonade, épaisseur du tissu gonadique, abondance et taille des gamètes),

- \* des informations qualitatives (morphologie des gamètes, stade de maturité des gamètes).

1. **Des informations quantitatives** sont principalement apportées par une observation macroscopique de la gonade :

- des échelles d'évaluation sont proposées qui recensent les différents stades d'évolution: Echelle de Le Dantec (1968) pour les huîtres du genre *Crassostrea*; Echelles de Marteil (1976), de Coatanea *et al.* (1994) pour *Ostrea edulis*; Echelle de Cochard et Devauchelle (1993) d'après Mason (1958) pour *Pecten maximus*,

- une mesure d'indice gonadique (IG) est réalisable lorsque la gonade peut être facilement isolée des autres tissus. Dans le cas contraire, on peut avoir recours soit aux indices de condition (IC) soit à une étude microscopique sur coupes histologiques sériées de l'ensemble gonade + glande digestive, la mesure de l'IG peut s'effectuer ici, par analyse d'image,

- des observations au microscope photonique sont aussi réalisées dans le cas du calcul du diamètre moyen des ovocytes à partir de coupes histologiques ou de frottis. La mesure peut aussi être effectuée par analyse d'image. L'échantillon (nombre et choix des ovocytes mesurés) doit se révéler conforme aux méthodes statistiques d'échantillonnage.

2. **Des informations qualitatives** sont assurées par différentes méthodes:

- l'observation microscopique de la gonade sur coupes histologiques, couplée avec des échelles d'évaluation : Echelle de His (1976), selon la classification de Le Dantec (1968), pour *Crassostrea gigas*,

- l'observation, à partir de frottis, d'ovocytes : Echelle de Braley (1984) pour *Tridacna gigas* et *Tridacna derasa*.

3. **Des informations** d'ordre à la fois **quantitatives et qualitatives** sont, elles, apportées par différentes méthodes, ainsi :

- certaines échelles d'évaluation sont réalisées par couplage d'observations macroscopiques et microscopiques: l'Echelle de Lubet (1959) pour la moule et le pétoncle se base, pour partie, sur des coupes histologiques, tandis que l'Echelle de Lucas (1965) pour les bivalves se réalise à partir de frottis,

- la constitution de classes de gamètes selon leur stade de maturité et selon des critères morphologiques, pour une gonade, à partir de coupes histologiques ou de frottis. L'échantillon doit être conforme aux méthodes statistiques d'échantillonnage. Certains critères de classification dont la taille peuvent être calculés par analyse d'image,

- l'analyse de la constitution de la gonade et ce, à partir de coupes histologiques : sur des champs sélectionnés, différents paramètres sont calculés. Cette analyse peut se réaliser par analyse d'image ou par la technique de planimétrie ou/et de stéréologie,

- la mesure d'indices gonadiques est couramment utilisée chez la coquille Saint-Jacques, mais jamais seule (Barber et Blake, 1983 ; Wilson, 1987 ; Besnard, 1988 ; Devauchelle et Mingant, 1991 ; Paulet et Boucher, 1991 ; Cochard et Devauchelle, 1993).

La méthode est difficilement applicable chez l'huître (Galstoff, 1964 ; Hayes et Menzel, 1981) où lui est substitué le calcul d'un indice de condition à partir du poids ou du volume total de chair (Le Dantec, 1968 ; Morvan et Ansell, 1988 ; Laruelle *et al.*, 1994).

Le calcul du diamètre moyen des ovocytes doit être systématiquement couplé avec une autre méthode (Le Dantec, 1968 ; Barber et Blake, 1983 ; Wilson et Simons, 1985 ; Jones *et al.*, 1986 ; Morvan et Ansel, 1988 ; Paulet *et al.*, 1992 ; Laruelle *et al.*, 1994).

De manière générale, l'observation macroscopique de la gonade qui apporte des renseignements d'ordre quantitatif ne suffit pas. Pour évaluer fiablement le stade, il lui faut associer une étude microscopique des gamètes sur frottis (Lucas, 1965) et, dans les cas litigieux, l'observation de coupes histologiques (Chipperfield, 1953 ; His, 1976 ; Cochard et Devauchelle, 1993).

La méthode d'évaluation des stades de maturité par observation des gamètes sur frottis est pratiquée par Braley (1984) sur *Tridacna gigas*, par Devauchelle (non publié) sur *Ruditapes philippinarum*, après perforation de la coquille, et sur *Pecten maximus*. Le prélèvement se fait à l'aide d'une seringue hypodermique.

L'utilisation d'échelles microscopiques d'évaluation des stades de maturité en histologie est considérée comme la méthode la plus fiable pour mesurer l'évolution de la gonade (Loosanoff, 1962 ; Mann, 1979 ; Brousseau, 1982 ; Kennedy et Krantz, 1982 ; Dorange, 1989 ; Thielley, 1993). Elle est souvent couplée avec un indice gonadique ou un indice de condition (Hayes et Menzel, 1981 ; Peterson et Fegley, 1986 ; Wilson, 1987 ; Guillou et Tartu, 1992).

Les mesures réalisées à partir de coupes histologiques apportent des informations très précises sur l'état de maturité des gonades. Ainsi en est-il de la méthode de répartition des gamètes en classes (Lannan *et al.*, 1980 ; Jones *et al.*, 1986 ; Besnard, 1988) et de celle de l'analyse de la constitution de la gonade (Wilson et Simons, 1985 ; Heffernan et Walker, 1989 ; Lowe *et al.*, 1982 ; Borrero, 1987 ; Morvan et Ansell, 1988 ; Paulet *et al.*, 1992).

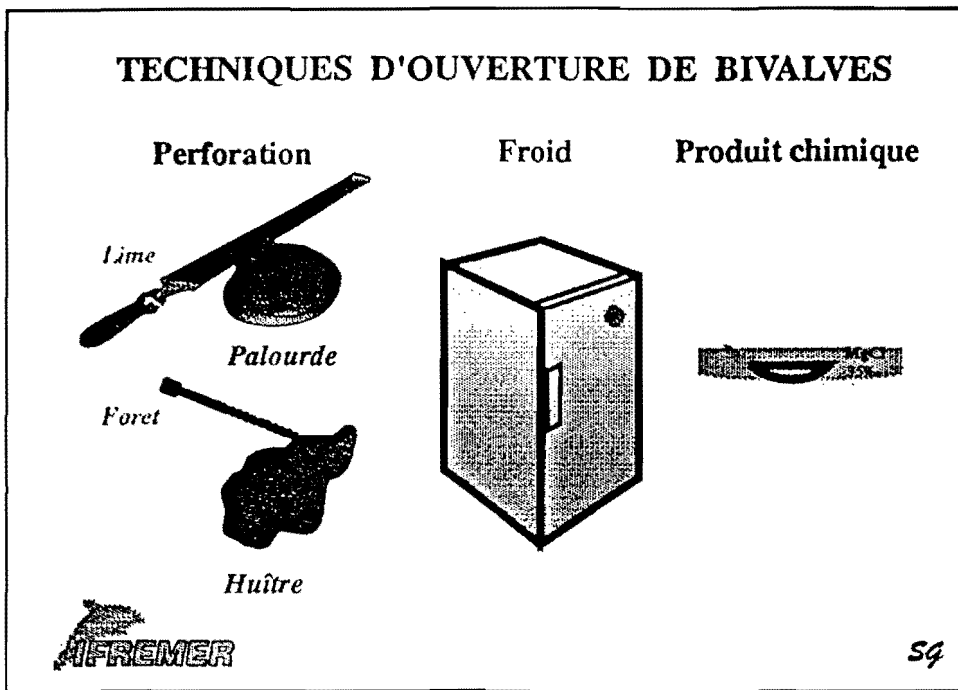


Figure 1. Techniques d'ouverture des bivalves

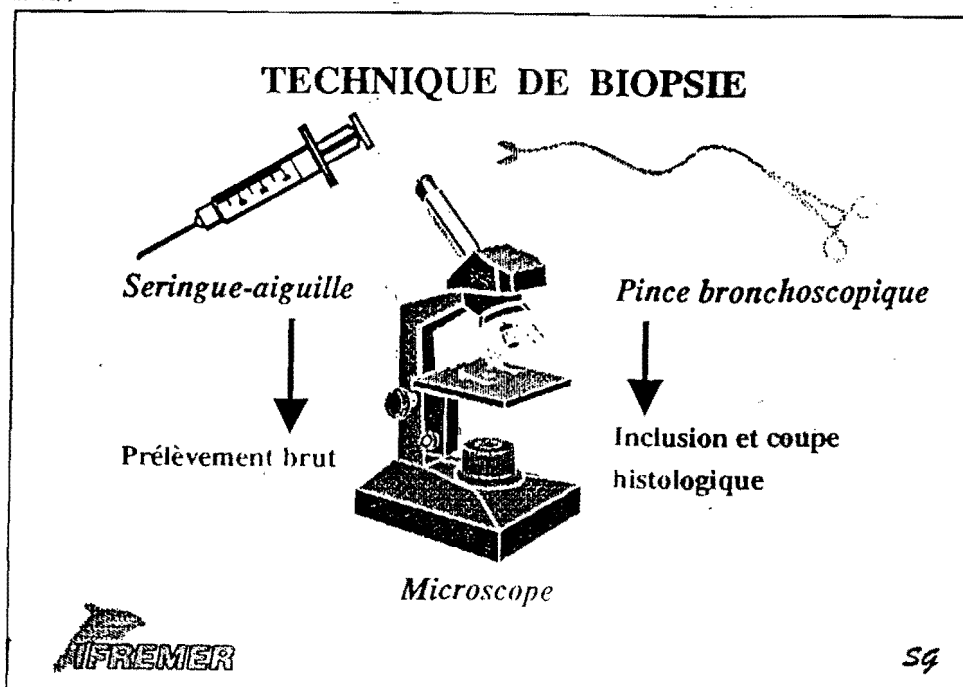


Figure 2. Technique de biopsie

## NOUVELLES APPROCHES EXPERIMENTALES

Actuellement les méthodes de contrôle les plus précises exigent le sacrifice de l'animal. Il est important pour une meilleure connaissance des stades, des cycles et de la qualité des gamètes, de mettre au point une méthode de prélèvement de la gonade qui conserve l'intégrité des fonctions du bivalve dont celle de la reproduction, lequel prélèvement se trouvera traité de manière classique par histologie. En effet, la seule observation de gamètes sur frottis n'apporte que des informations très approximatives sur l'état réel de maturité.

### 1. Méthodes

#### \* Techniques d'ouverture (figure 1)

Une première difficulté chez les bivalves, est l'accessibilité de la gonade. Chez les animaux qui "clappent" naturellement des valves, le prélèvement peut se réaliser les valves ouvertes pendant l'émergence (ex: coquille Saint-Jacques). Chez les autres (ex: huîtres), il est nécessaire d'avoir recours à des artifices.

Outre la perforation de la valve coquillière au-dessus de la gonade par mini-perceuse ou le limage au niveau de la tranche jusqu'à apparition d'une ouverture, différentes techniques, de mise en oeuvre simple, existent.

Ainsi pour l'ouverture des huîtres, deux techniques ont été utilisées :

- une ouverture par le froid : 10 *Crassostrea gigas* et 10 *Ostrea edulis* issues de fermes ostréicoles sont placées à sec, à une température de 0°C, pendant plusieurs heures ou plusieurs jours puis, immergées dans de l'eau de mer à température ambiante (15°C), dès l'ouverture des valves,
- une ouverture par le chlorure de magnésium: 10 *Crassostrea gigas* et 10 *Ostrea edulis*, de même provenance que précédemment, sont immergées dans une solution aqueuse de chlorure de magnésium à 35‰ pendant plusieurs heures puis, plongées dans de l'eau de mer à température ambiante (15°C), dès l'ouverture des valves.

#### \* Techniques de prélèvement (figure 2)

Deux techniques de prélèvement sont alors possibles:

- soit une ponction de gamètes, à l'aide d'une seringue hypodermique et d'une aiguille, à l'intérieur du tissu gonadique ; le prélèvement brut est directement observable sous microscope,
- soit une saisie de fragments de gonade effectuée à l'aide d'une pince bronchoscopique, déjà utilisée par ailleurs chez les poissons (Devauchelle, 1985) ; la paroi de la gonade est préalablement percée à l'aide d'une aiguille de seringue hypodermique afin de faciliter la prise de l'échantillon à l'intérieur du tissu gonadique. Les prélèvements sont traités pour une étude histologique (*in* Gabe, 1968) de même, après sacrifice de l'animal, l'ensemble «gonade + glande digestive ».

#### \* Echelles d'évaluation utilisées (Table 1)

L'échelle d'évaluation histologique de référence utilisée pour la totalité de la gonade et les biopsies résulte d'un compromis entre celles de Le Dantec (1968), His (1976) et Thielley (1993).



Pour l'évaluation macroscopique, l'échelle de Le Dantec (1968) a été retenue pour *Crassostrea gigas*, celle de Coatanéa *et al.* (1994) pour *Ostrea edulis*, celle de Robert *et al.* (1994) pour *Pecten maximus*.

- Le stade macroscopique est le stade de maturité évalué après examen macroscopique de la gonade,
- Le stade biopsie est le stade de maturité évalué après examen de coupes histologiques à travers la biopsie,
- Le stade microscopique, stade de référence, est le stade de maturité évalué après examen de coupes histologiques à travers la totalité de la gonade.

**\* Paramètres suivis**

Les paramètres suivis ont été :

- la survie des animaux après manipulation (technique d'ouverture, biopsie) à 15 jours et 1 mois,
- la qualité des biopsies par observation des coupes et repérage de critères (écrasement, déchirement),
- l'efficacité de la méthode en tant que :
  - \* aptitude à évaluer un stade de maturité,
  - \* aptitude à conserver les fonctions essentielles.

**Table 1.** Echelle d'évaluation des stades de maturité

Stade	Aspect gonade	Contenu femelle	Contenu mâle
0	Repos sexuel		
1	-tubules peu volumineux -tissu conjonctif bien développé	-ovogonies -ovocytes prévitellogéniques -ovocytes en début de vitellogenèse	-spermatogonies -spermatocytes -spermatozoïdes rares
2	-tubules plus développés -réduction du tissu conjonctif intergonadique	-ovocytes prévitellogéniques et en début de vitellogenèse	-spermatogonies, spermatocytes en couronne périphérique dans tubule -spermatozoïdes au centre
3P	-follicules volumineux -tissu interstitiel réduit	-ovocytes en fin de vitellogenèse, très nombreux	-spermatozoïdes très nombreux, au centre
3H	- <i>gonade mature</i> -tubules turgescents -acini avec ovocytes ou spermatozoïdes	- <i>ovocytes matures</i>	- <i>spermatozoïdes dans totalité lumière acini</i> -spermatocytes rares en périphérie
4	-régression partielle -tubules en cours de rétractation	-ovocytes en dégénérescence -départ cycle (stade 1)	-spermatozoïdes résiduels -départ cycle (stade 1)
5	-tubules très rétractés -redéveloppement du tissu conjonctif	-ovocytes résiduels	-spermatozoïdes résiduels

## 2. Résultats expérimentaux

### \* Techniques d'ouverture

\* la technique d'ouverture par le froid se révèle longue quelle que soit l'espèce d'huître considérée (2 à 15 jours). Aucune mortalité n'est constatée, les huîtres se sont refermées après quelques heures dans l'eau de mer,

\* l'ouverture par le chlorure de magnésium se fait en quelques heures. Aucune mortalité n'est observée, la fermeture s'effectue en quelques heures. Cette technique permet, en outre, l'élimination du ver *Polydora* (Catherine *et al.*, 1990).

L'évaluation du stade macroscopique et la biopsie ont donc été réalisées à partir de cette dernière technique.

### \* Biopsies

Les tissus gonadiques prélevés par biopsie à la pince bronchoscopique sont de qualité satisfaisante car ils ne sont pas écrasés. Traités pour l'étude histologique, ils permettent l'observation d'un à trois acini au microscope.

Cette technique permet, en outre, de sexer les animaux de manière très précise et n'entraîne ni mortalité (table 2) ni altération du développement gonadique.

**Table 2.** Survie à la biopsie

durée	15 jours	1 mois
%survie	100 %	100 %
<i>Ostrea edulis</i>	n = 2	n = 2
<i>Crassostrea gigas</i>	n = 11	n = 5
<i>Pecten maximus</i>	n = 3	

Enfin, la méthode se révèle efficace quant à une capacité à évaluer, en cours de gamétogenèse et sans nuire à son développement, un stade de maturité : en effet, nous nous rapprochons, par ce biais, du stade de référence, ce que ne permet pas toujours une observation macroscopique de base (table 3).

**Table 3.** Différences d'appréciation des stades en fonction des méthodes d'évaluation

méthodes	% de différences
Macro / Micro	50
Biopsie / Macro	34
Biopsie / Micro	15

## CONCLUSION

Un faible nombre d'animaux (n=23) a été traité lors de cette approche expérimentale. Pour recommander définitivement cette méthode, il est nécessaire de confirmer les résultats très encourageants sur un nombre plus important d'huîtres. Ce type d'exploration se révèle prometteur dans le cadre d'un suivi individuel de la ponte chez les bivalves.

Il reste aussi à déterminer si les biopsies sont efficaces quels que soient les stades de développement de la gonade et à évaluer les effets de tels prélèvements sur l'évolution de la gamétogenèse et sur le déclenchement de la ponte dans le cas d'une maturité optimale.

Il est enfin souhaitable de faire évoluer la méthode d'estimation de telle sorte qu'un diagnostic puisse se faire très rapidement après le prélèvement.

## Références

- Barber B.J. and N.J. Blake, 1983.** Growth and reproduction of the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck) at its southern distributional limit. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 66 : 247-256.
- 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, 154 p.
- Borrero F.J., 1987.** Tidal height and gametogenesis: reproductive variation among populations of *Geukensia demissa*. *Biol. Bull.*, 173 : 160-168.
- 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., 1982.** Gametogenesis and spawning in population of *Geukensia demissa* (Pelecypoda: Mytilidae) from Westport, Connecticut. *The Veliger*, 24 (3) : 247-251.
- Catherine M., D. Bateau, J. Mazurié & C. Le Bec, 1990.** Anomalies des coquilles d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* observées sur le littoral français en mai-juin 1989 dues au ver *Polydora* et aux peintures antisalissures. *Equinoxe*, 31 : 24-32.
- 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.
- Coatanea D., C. Vercelli, J-M. Chabiran et J. Oheix, 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 Rousillon, Palavas, (FRANCE), 57 p.
- Cochard J-C. and N. Devauchelle, 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.*, 169 : 41-56
- Devauchelle N., 1985.** Identification du sexe et prélèvements d'ovocytes sur turbots (*Scophthalmus maximus*) vivants. *Bull. Fr. Pisc.*, 293/294 : 65-71.
- Devauchelle N. and C. Mingant, 1991.** Review of reproductive physiology of scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.*, 4 : 41-51.

- Dorange G., 1989.** Les gamètes de *Pecten maximus* L. (Mollusca, Bivalvia). Thèse Université de Bretagne Occidentale, (FRANCE), 133 p.
- Gabe M., 1968.** Techniques histologiques. *Masson et cie., Paris*, 113 p.
- Galtsoff P.S., 1964.** The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *U.S. Fish. Wildl. Serv., Fish. Bull.*, **64** : 480 pp.
- Guillou J. et C. Tartu, 1992.** Reproduction et recrutement de la coque *Cerastoderma edule* L. à Saint-Pol-de-Léon (Bretagne-Nord). *IFREMER Actes de Colloques*, **13** : 29-38.
- Hayes P.F. and R.W. Menzel, 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. and R.L. Walker, 1989.** Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. *J. Moll. Stud.*, **55** : 135-137.
- 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 p.
- Jones H.A., R.D. Simpson and C.L. Humphrey, 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.
- Kennedy V.S. and L.B. Krantz,, 1982.** Comparative gametogenic and spawning patterns of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) in central Chesapeake bay. *J. Shellfish Res.*, **2** (2) : 133-140.
- Lannan J.E., A. Robinson and W.P. Breese, 1980.** Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture*, **21**: 337-345.
- Laruelle F., J. Guillou and Y-M. Paulet, 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.
- Loosanoff V.L., 1962.** Gametogenesis and spawning of the European oyster *O. edulis*, in waters of Maine. *Biol. Bull.*, **122** : 86-94.
- Lowe D.M., M.N. Moore and B.L. Bayne, 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) : 5-8.
- Lucas A., 1965.** Recherche sur la sexualité des mollusques bivalves. Thèse Université de Rennes, (FRANCE), 135 p.
- 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. Ass. U.K.*, **59** : 95-110.
- Marteil L., 1976.** La conchyliculture française. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **40** (2) : 149-346.
- Mason J., 1958.** The breeding of the scallop, *Pecten maximus* (L.) in Manx waters. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **67** : 653-671.
- Morvan C. and A.D. Ansell, 1988.** Sereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Mar. Biol.*, **97** : 355-364.

- Paulet Y-M. and J. Boucher, 1991.** Is reproduction mainly regulated by temperature or photoperiod in *Pecten maximus*? *Inv. Reprod. Dev.*, **19** (1) : 61-70.
- Paulet Y-M., A. Donval and F. Bekhadra, 1993.** Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. *Inv. Reprod. Dev.*, **23** (2-3) : 89-94.
- Paulet Y-M., G. Dorange, J-C. Cochard et M. Le Pennec, 1992.** Reproduction et recrutement chez *Pecten maximus* L.. *Ann. Inst. Océanogr., Paris*, **68** (1-2) : 45-64.
- Peterson C.H. and S.R. Fegley, 1986.** Seasonal allocation of resources to growth of shell, soma, and gonads in *Mercenaria mercenaria*. *Biol. Bull.*, **171** : 597-610.
- Robert R., P. Miner, M. Mazuret et J-P. Connan, 1994.** Ecloserie expérimentale de mollusques d'Argenton, bilan et perspective. *Equinoxe*, **49** : 20-33.
- Thielley M., 1993.** Etude cytologique de la gamétogenèse, de la sex-ratio et du cycle de reproduction chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* (L) var. *cumingii* (Jameson), (mollusques, bivalves). Comparaison avec le cycle de *Pinctada maculata* (Gould). Thèse Université Française du Pacifique, (FRANCE), 233 p
- 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.
- Wilson J.H. and J. Simons, 1985.** Gametogenesis and breeding of *Ostrea edulis* on the west coast of Ireland. *Aquaculture*, **46** : 307-321.

## CONTROLE DE LA GAMETOGENESE D'UN STOCK D'HUITRES PLATES MEDITERRANEENNES *OSTREA EDULIS*

C. VERCELLI, D. COATANEA, J.M. CHABIRAND ET J. OHEIX

IFREMER, Station de Palavas, chemin de Maguelone, 34250 Palavas Les Flots (F).

**Résumé :** Un stock de 1100 géniteurs d'huîtres plates méditerranéennes est maintenu au froid ( $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) en circuit fermé, sur filtration biologique (support Biogrog) durant 10 mois. L'alimentation (*Isochrysis aff galbana* et *Chaetoceros calcitrans*) est ajustée empiriquement à la température. La photopériode est fixée à 12 heures durant toute l'expérimentation et la salinité fixée à 36 ‰.

Des prélèvements bimestriels ont permis de suivre l'évolution de l'indice de condition, de la maturation sexuelle et des teneurs en lipides, glucides totaux et glycogène. Les observations montrent que le processus de gamétogenèse n'est pas bloqué, mais que le déclenchement des émissions de larves est inhibé. Les lots de géniteurs issus de ce stock et conditionnés à une température de  $19^{\circ}\text{C}$  ont tous produit des émissions larvaires réparties selon un calendrier programmé de mai à novembre sans dégradation des caractéristiques biométriques et biochimiques des larves.

**Mots clés :** *Ostrea edulis*, gamétogenèse, reproduction, conditionnement.

### INTRODUCTION

Il est généralement admis que l'action combinée de la température et de l'alimentation joue un rôle fondamental dans le processus de la gamétogenèse de l'huître plate *Ostrea edulis*. L'expérimentation présentée ici a pour objectif de contrôler la maturation d'un stock de géniteurs en utilisant principalement le facteur **température**. Un stock de 1100 géniteurs d'origine méditerranéenne est maintenu de mars à novembre à  $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Tous les deux mois, un lot d'huîtres est conditionné par une remontée progressive à  $19^{\circ}\text{C}$ , dans le but de provoquer des émissions de larves selon un calendrier étalé de la température sur toute l'année. L'**alimentation** (*Isochrysis aff galbana* et *Chaetoceros calcitrans*) est ajustée empiriquement à la température. La **photopériode** est fixée à 12 heures durant toute l'expérimentation et la salinité à 36 ‰.

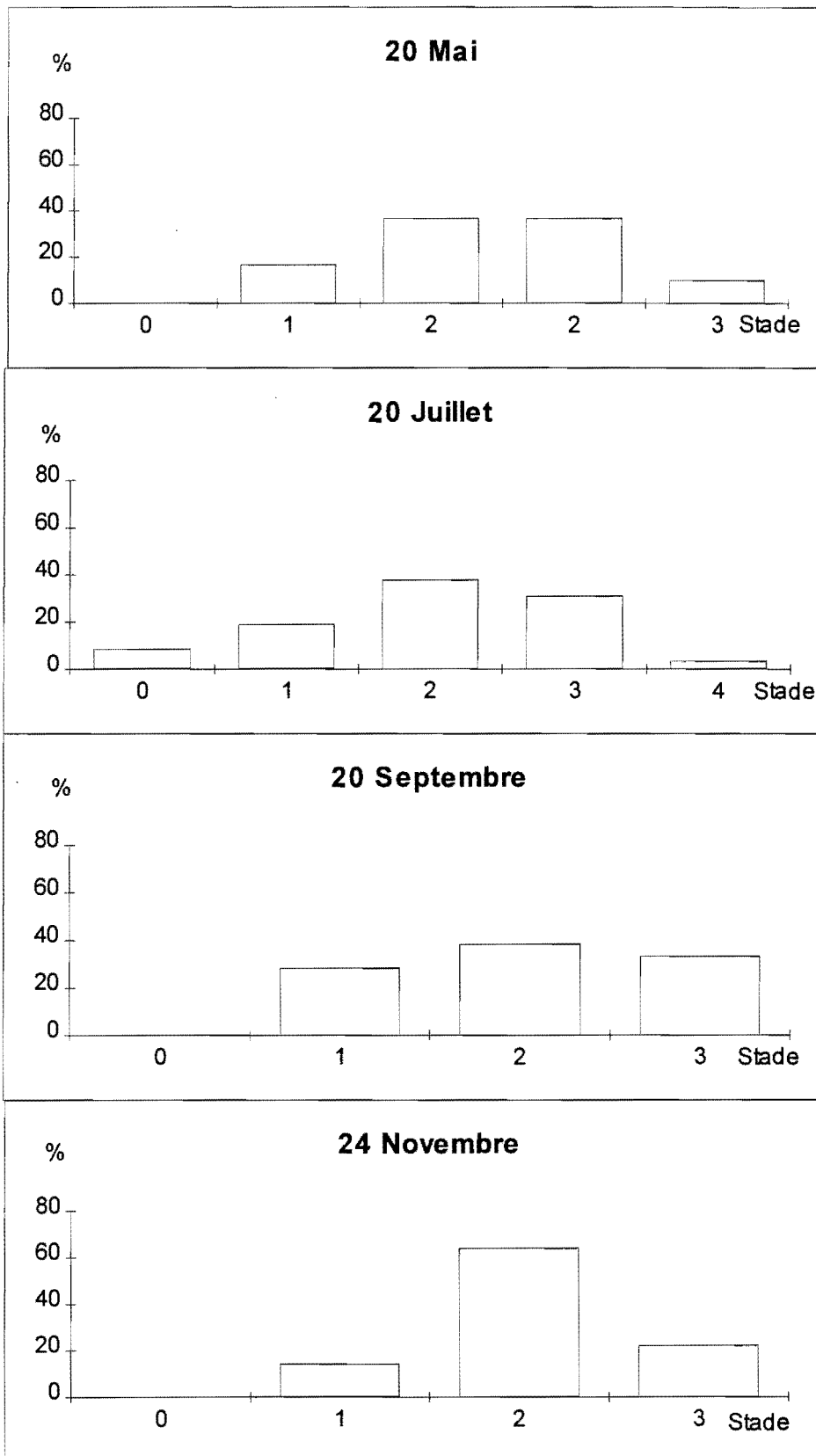
### 1- MATERIEL ET METHODE

#### 1.1. Structures d'expérimentation

La salle des géniteurs, thermorégulée à  $15^{\circ}\text{C}$ , comprend :

- une zone de stockage au froid ( $7^{\circ}\text{C}$ ) constituée de 2 bacs de 1200 litres contenant chacun 550 animaux disposés dans des clayettes, un bac de réserve d'eau froide et un bac de transition destiné aux remontées et descentes progressives en température des animaux,
- une zone de conditionnement à  $19^{\circ}\text{C}$  avec 4 race-ways de 300 litres équipés chacun d'un collecteur de larves et contenant une quarantaine d'animaux.

Tous les bacs fonctionnent en circuit fermé à partir d'eau de mer filtrée à  $1\ \mu\text{m}$  et passée sur U.V. ; ceux contenant des animaux sont équipés de filtres biologiques (Mélard et Blancheton, 1990).



**Figure 1.** Evolution de la gamétogenèse du stock froid (Observations macroscopiques)

## 1.2. Constitution du stock

De violentes tempêtes méditerranéennes ayant remanié les gisements naturels d'huîtres plates en début d'année, nous avons dû mélanger à parts égales des animaux d'origine marine et d'origine étang de Thau. Cependant, l'observation macroscopique des gonades montre que tous les géniteurs sont en début de gamétogenèse, dans des proportions comparables quelle que soit leur origine : 60 % en stade 1 (la gonade commence à recouvrir la glande digestive) pour l'origine "Mer" et 76 % pour l'origine "Etang". Deux lots identifiés respectivement "Mer" et "Etang" sont réservés afin de comparer ultérieurement leur comportement en termes de conditionnement à la ponte.

## 1.3. Calendrier des trois séquences de maturation

Chaque séquence dure une cinquantaine de jours.

- Séquence 1, mai-juillet : 2 bacs
- Séquence 2, juillet-septembre : 2 bacs  
+ comparaison bac "origine Mer" / bac "origine Etang"
- Séquence 3, octobre-novembre : 2 bacs

## 1.4. Paramètres mesurés

Les paramètres suivants, dont seuls les principaux résultats sont présentés, ont été mesurés :

- d'une part, sur le stock des géniteurs maintenu au froid : biométrie, indice de condition Lawrence-Scott (1982), dosage des lipides (Marsh and Weinstein, 1966) et glucides totaux et glycogène (Dubois *et al.*, 1956), observation macroscopique de la gamétogenèse, écochimie sur l'eau d'élevage, recherche du parasite *Bonamia ostrea*,
- d'autre part, sur les géniteurs en maturation : les mêmes paramètres que pour le stock froid ont été suivis et complétés par des mesures de taille et des dosages de lipides sur les larves récoltées.

L'observation macroscopique de la maturation est exprimée à partir de l'échelle suivante :

- stade 0 : la gonade est transparente
- stade 1 : la gonade commence à épaissir
- stade 2 : la gonade recouvre les  $\frac{3}{4}$  de la glande digestive
- stade 3 : la gonade est hypertrophiée
- stade 4 : l'huître est laiteuse (émission de larves trochophores)
- stade 5 : l'huître est ardoisée

## 2- RESULTATS

### 2.1. Le stock de géniteurs maintenu au froid (Tableau 1)

La température moyenne journalière est de 8,3°C pour le bac 1 et de 8,2°C pour le bac 2. La ration alimentaire est comprise entre 0,18 et 0,30.10<sup>9</sup> cellules par individu et par jour. La survie est de l'ordre de 80 % pour les 2 bacs au début du mois de novembre. L'indice de condition décroît régulièrement de 105,2 à 71,6, ce qui représente encore un bon état physiologique en fin de stockage au froid.



**Tableau 1 - Suivi des géniteurs stockés au froid**

Echantillon bimestriel	Poids moyen (g)	Indice condition (L.S.)	Ration algale $10^9$ cel/ind	Survie cumulée (%)	<i>Bonamia</i> cumul (%)
Mars	116	105,2	0,30	↓ 79	↓ 0,4
Mai	89	85,5	0,18		
Juillet	103	85,2	0,20		
Septembre	65	74,4	0,20		
Novembre	100	71,6	0,30		

Résultats hors comparaison Mer/Etang

**Tableau 2 - Suivi des géniteurs en maturation**

Séquence	Origine	Poids moyen (g)	Survie (%)	Température moyenne (°C)	Ration algale $10^9$ cel/ind
1	Stock	101	95	18,6	0,87
	Stock	97	90	18,6	0,88
2	Stock	103	88	18,8	0,56
	Stock	101	85	18,7	0,67
	<i>Mer</i>	<b>115</b>	<b>93</b>	<b>18,7</b>	<b>0,71</b>
	<i>Etang</i>	<b>114</b>	<b>93</b>	<b>18,7</b>	<b>0,64</b>
3	Stock	115	79	18,9	0,81
	Stock	120	85	18,9	0,81

**Tableau 3 - Emissions larvaires**

Séquence	Origine géniteurs	Temps réponse (jours)	Nbre larves p/ind ( $10^6$ )	Taille moyenne ( $\mu$ m)	Lipides (% poids sec larves)
1	Stock	17	0,51	177	} 3,73
	Stock	17	0,76	171	
2	Stock	9	0,32	178	} 3,86
	Stock	8	0,36	180	
	<i>Mer</i>	7	<b>0,25</b>	<b>177</b>	<b>3,85</b>
	<i>Etang</i>	<b>11</b>	<b>0,48</b>	<b>177</b>	<b>4,49</b>
3	Stock	12	0,12	175	} 5,48
	Stock	12	0,27	180	

### 2.1.1. Evolution de la gamétogenèse (Figure 1)

Malgré la température basse et une ration alimentation réduite, la gamétogenèse s'est poursuivie, ce qui se traduit par la disponibilité d'animaux en stade 3 (gonade hypertrophiée) durant tout le stockage au froid. Quelques stades 4 (émission de larves trochophores) sont constatés peu après l'ouverture des animaux de l'échantillonnage de juillet.

### 2.1.2. Evolution des teneurs biochimiques (Figure 2)

Durant l'expérimentation le taux de lipides reste stable, entre 6,3 et 7,4 %, du poids sec de chair. Les teneurs en glycogène, élevées lors de l'échantillonnage initial (11,2 %), ont diminué de moitié en final. Les glucides totaux décroissent régulièrement de 15,1 à 10,7 %. Ces chiffres correspondent à ce que d'autres auteurs ont observé, notamment Walne and Mann (1975). Toutes les valeurs obtenues sur les dosages de septembre accusent une baisse sensible, sans que nous ne puissions l'expliquer autrement que par une éventuelle fragilisation des animaux consécutive à des écarts de température dans les bacs de stockage, qui aurait obligé les animaux à mobiliser leurs réserves énergétiques.

## **2.2. Les séquences de maturation (Tableau 2)**

Chaque séquence dure une cinquantaine de jours. La température moyenne par bac est de 18,5 à 18,9°C. La survie a été de 79 à 95 %, le moins bon résultat correspondant à un des 2 bacs de la séquence 3. La ration algale journalière est comprise entre  $0,60 \cdot 10^9$  et  $0,90 \cdot 10^9$  cellules par géniteur.

### 2.2.1. Les émissions larvaires (Tableau 3)

Des pontes ont été récoltées lors de chaque conditionnement et la taille des larves n'a pas diminué entre mai et novembre.

### 2.2.2. Réserves lipidiques des larves à l'émission

Les teneurs lipidiques se situent autour de 4 % du poids sec de chair pour les 2 premières séquences et dépassent 5 % pour la séquence 3.

### 2.2.3. Pontes cumulées (Figure 3)

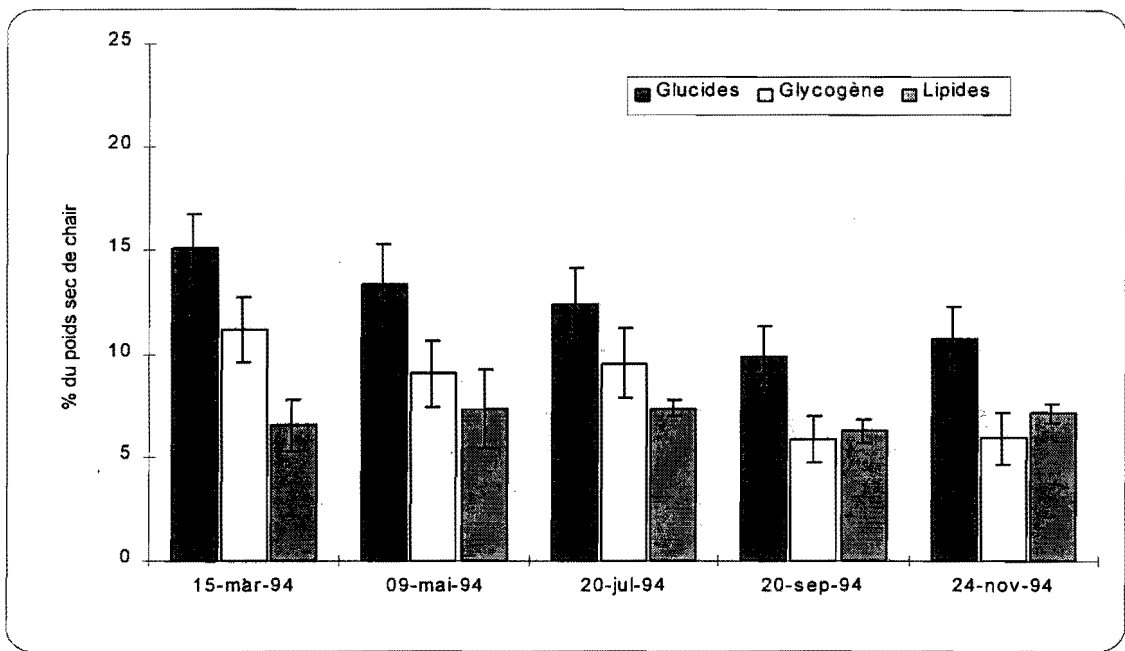
La figure 3 représente le nombre cumulé de larves émises pour chaque séquence de maturation. La courbe de la séquence 1 montre une progression constante et son extrémité ne correspond vraisemblablement pas à la fin des pontes. Seul le respect du calendrier du programme a imposé un arrêt de cette séquence.

La courbe figurant la séquence 2 affiche le temps de réponse le plus court de l'ensemble de l'expérimentation, et on ne peut pas dire si son terme évoque l'arrêt des pontes.

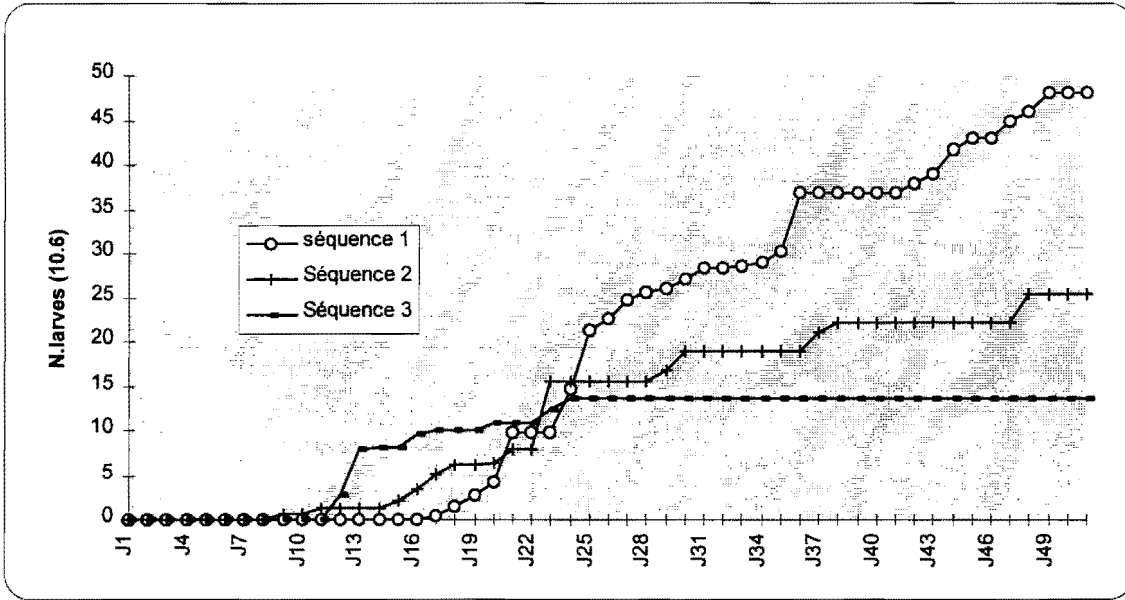
Quant à la 3ème courbe démarrant à J7, elle progresse durant une dizaine de jours, au terme desquels elle plafonne pendant les 25 jours suivants, ce qui suggère que les géniteurs de cette séquence ont bien terminé l'émission de leurs larves.

### 2.2.4. Comparaison des origines Mer et Etang (Tableau 3)

La seule différence apparente est le nombre de larves émises par géniteur, en faveur de l'origine "Etang", ce qui permet de supposer que les conditions de stockage ont lissé les différences ayant pu exister lors de la constitution du stock. Cette disparité à l'origine n'aurait donc pas constitué un biais à l'expérimentation.



**Figure 2.** Teneurs biochimiques des géniteurs stockés au froid.  
(moyennes et intervalles de confiance à 95 %)



**Figure 3.** Cumul des émissions de larves des 3 séquences de maturation.

## CONCLUSION

### 1. Stockage au froid

Les géniteurs ont bien supporté ce régime prolongé au froid et, malgré une diminution de l'indice de condition, n'ont pas épuisé leurs réserves lipidiques et glucidiques. La mortalité chronique est restée faible, de l'ordre de 20 % sur la durée de l'expérimentation. L'ensemble de ces informations indique que le stockage à basse température ne semble pas altérer les qualités de l'huître plate en termes de reproduction.

### 2. Maturation

La température de 19°C a permis de déclencher la fin de la gamétogenèse pour toutes les séquences de maturation et les émissions de larves ont eu lieu avec des temps de réponse compris entre 7 et 17 jours, plus brefs que ceux observés avec des géniteurs conditionnés sans stockage au froid durant les campagnes précédentes (1991 à 1993).

### 3. Emissions larvaires

Les émissions de larves ont été obtenues à chaque séquence de conditionnement, selon le calendrier programmé de mai à novembre, mais avec un rendement global plus faible que les années précédentes : la meilleure performance obtenue n'est que de  $0,76 \cdot 10^6$  larves par géniteur, la norme se situant aux environs de  $1 \cdot 10^6$ . Cette baisse de rendement peut être rapprochée de la baisse de l'indice de condition des géniteurs. Par ailleurs, le niveau de rationnement algal durant la maturation a peut-être été un peu faible. Mais la taille des larves n'a pas diminué avec le temps et s'est toujours située au-dessus des meilleures valeurs obtenues les années précédentes sans stockage au froid (Tableau 4).

**Tableau 4** - Comparaison de la taille des larves émises :

- en 1994 : après stockage des géniteurs au froid
- en 1991, 1992, 1993 : sans stockage au froid

Taille (µm)	1991	1992	1993	1994
Moyenne	157	154	171	177
Minimum	148	147	171	165
Maximum	167	165	173	191

Le niveau de réserves lipidiques est resté stable au cours des 3 séquences (5,5 % en fin d'expérimentation). Plusieurs auteurs ayant démontré que la variabilité des élevages larvaires peut être corrélée à la concentration lipidique au moment de l'émission (Millar and Scott, 1967 ; Holland and Spencer, 1973 ; Holland, 1978), il apparaît que ce dernier critère peut permettre de qualifier les larves obtenues dans les conditions de nos expérimentations comme étant aptes à subir un élevage larvaire.

Il est à noter qu'une production de naissain par télécaptage, réalisée à partir d'une ponte obtenue en novembre dans le cadre de notre expérimentation, a été menée à bien.

## Références

- Dubois M., K.H. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebecs and F. Smith, 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**(3) : 350-356.
- Holland D.L. and B.E. Spencer, 1973.** Biochemical changes in fed and starved oysters *Ostrea edulis* growth. *Journ. of mar. Biol. Assess. of U.K.*, **53** : 287-298.
- Marsh J.B. and D.B. Weinstein, 1966.** Sample charring method for determination of lipids. *J. Lip. Res.*, **7** : 574-576.
- Mélard J. et J.P. Blancheton, 1990.** Effluents aquacoles marins. Contribution à l'étude du recyclage. Activation des filtres biologiques. *Aqua Revue*, **28** : 37-40.
- Millar R.H. and J.M. Scott, 1967.** The larvae of the oyster *Ostrea edulis* during starvation. *Journ. of mar. Biol. Assess. of U.K.*, **47** : 475-484.
- Walne P.R. and R. Mann, 1975.** Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. In : Proc. 9th Europ. mar. biol. Symp. Harold Barnes Editor. Aberdeen Univ. Press. : 587-607.

## **CONTROLE DE LA GAMETOGENESE DES HUITRES CREUSES ET PLATES. RELATIONS "REPRODUCTION" ET "GENETIQUE".**

**A. GERARD, Y. NACIRI-GRAVEN, P. BOUDRY, S. LAUNAY, S. HEURTEBISE, C. LEDU ET P. PHELIPOT.**

*Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie, Unité de Recherche en Génétique  
IFREMER, BP133 - 17390 La Tremblade. (F).*

**Résumé :** *A la fin des années 1980, après deux décennies d'acquis zootechniques sur les mollusques, l'IFREMER engage les premières recherches dans le domaine de la génétique. Très rapidement, ces nouvelles études font ressortir les limites des connaissances zootechniques, notamment en matière de contrôle de la reproduction des huîtres. Cet exposé tente de faire une synthèse dans ce domaine.*

*En particulier, il est souligné que la maîtrise zootechnique des années 80 se situait à l'échelle d'une population de reproducteurs et que la génétique réclame désormais une nouvelle zootechnie, permettant non plus de travailler sur des populations mais sur des individus préalablement identifiés. Cette maîtrise individuelle du contrôle de la reproduction chez les huîtres, pose des questions totalement nouvelles auxquelles ne répondent pas les protocoles existants en matière de contrôle du sexe, de maturation individuelle, de synchronisme des pontes, d'échanges chimiques entre géniteurs...*

Un inventaire des potentialités aquacoles de diverses espèces de mollusques bivalves a été réalisé dans les années 70 à 90. Ce travail a été conduit à partir d'un matériel sauvage sur lequel les connaissances de base étaient rudimentaires. A la fin des années 1980, fort de ces acquis zootechniques, l'IFREMER a engagé les premières recherches disciplinaires dans divers domaines, dont la génétique des mollusques.

Ce document, illustré par des exemples empruntés aux expérimentations génétiques, tente de faire ressortir les limites de nos connaissances en matière de contrôle de la reproduction des huîtres. Il décrit les stratégies mises en place par l'équipe de génétique pour compenser ces carences, et, énonce nos besoins en matière de recherche sur la physiologie de la reproduction.

### **1. LES ACQUIS ZOOTECHNIQUES**

C'est à partir d'élevages, réalisés souvent de façon empirique, que durant les années 70 et 80, les bases zootechniques de la reproduction artificielle des bivalves marins ont été établies. Ces travaux ont permis de maîtriser, plus ou moins complètement, certaines phases du développement du mollusque (maturation en toute saison, induction de la ponte, élevages larvaire et post-larvaire, métamorphose et prégrossissement) et son alimentation à base d'algues phytoplanctoniques. Ces productions de masse, réalisées principalement sur la palourde du pacifique *Ruditapes philippinarum* et sur la coquille St-Jacques *Pecten maximus*, présentaient une variabilité importante en termes de croissance et de survie. Ces études ont néanmoins entraîné un essor d'écloseries et de nurseries privées sur la palourde.

A la fin des années 1980, suite à la maladie de l'anneau brun et aux problèmes économiques liés au développement de la palourde du Pacifique dans le milieu naturel, la filière éclosion s'est reconvertie dans la production d'huîtres. A la même période, les premiers travaux de

génétique ont fait ressortir les limites de nos connaissances en matière de contrôle de la reproduction des huîtres. Nous avons rencontré les mêmes difficultés zootechniques que les écloseurs privés dans la conduite de nos élevages (blocage de la croissance larvaire avant le stade umboné), auxquelles se sont ajoutés des problèmes plus spécifiques liés à la problématique génétique. Contrairement au mandat défini dans les cahiers d'objectifs du département Ressources Aquacoles, l'équipe de génétique s'est retrouvée dans l'obligation de mener une recherche zootechnique d'accompagnement aux programmes et de soutien à la profession.

Trois raisons principales peuvent expliquer cette situation :

- il n'y avait en réalité que peu d'acquis au niveau de l'Institut dans le domaine de l'élevage contrôlé des huîtres, les rares travaux en matière d'élevage contrôlé que l'on puisse citer, sont ceux de His et Robert (1987), Robert *et al.* (1989) sur *Crassostrea gigas*;
- nos acquis zootechniques en matière de maîtrise de la reproduction se situent à **l'échelle d'une population** de reproducteurs. Pour une éclosérie de production, la ponte en masse de géniteurs est suffisante pour assurer la production de naissain. Les besoins de la recherche sont tout autres, la génétique impose un travail sur des individus préalablement identifiés, ce qui suppose une maîtrise de la reproduction à **l'échelle de l'individu**;
- le choix dans les années 80, **d'un modèle biologique** (*Pecten maximus*) qui a absorbé l'essentiel des efforts de recherche en matière de physiologie de la reproduction et de la nutrition pendant une dizaine d'années. Pourtant la grande diversité des sexualités et des stratégies de reproduction rencontrée chez les mollusques bivalves, aurait dû fort logiquement aller à l'encontre d'un tel **choix exclusif**.

## 2. SEXUALITE ET DETERMINISME DU SEXE

### 2.1. Etat des connaissances

Les bivalves n'ont pas de chromosomes sexuels, ils possèdent potentiellement les deux sexes. Cette bipotentialité se traduit par l'existence d'un hermaphrodisme juvénile, certaines espèces s'orientent ensuite vers un gonochorisme (Mytilidés, Vénéridés, Cardidés, Solénidés), et d'autres, comme les huîtres, présentent diverses formes d'hermaphrodisme (Lubet, 1991).

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Ostréidé ovipare) présente un **hermaphrodisme asynchrone**, correspondant à des maturations déphasées des lignées mâle et femelle, et une **sexualité alternative** (gonochorisme apparent masquant un hermaphrodisme alternatif) entraînant un possible changement de sexe chaque année. L'huître plate *Ostrea edulis* (Ostréidé larvipare) présente également un **hermaphrodisme asynchrone** mais avec une **sexualité consécutive rythmique**, plusieurs inversions sexuelles pouvant se dérouler au cours d'une même saison de reproduction (Marteil, 1976). La tendance à la protandrie est de règle chez les deux espèces au début de leur activité sexuelle.

Les mécanismes physiologiques contrôlant le déterminisme des changements de sexe sont encore mal connus, comme le sont les facteurs externes pouvant les déclencher (température, nutrition). On ne connaît pas l'évolution du sexe des individus d'une même population élevée en milieu contrôlé et en milieu ouvert. Il n'existe actuellement pas de techniques de maturation permettant d'orienter les lignées germinales vers un sexe donné.

## 2.2. Stratégies mises en place

En l'absence de données précises sur le contrôle du sexe, diverses méthodologies ont été adoptées ou mises au point par l'équipe de génétique afin de pouvoir réaliser ses programmes.

### 2.2.1. Programmes nécessitant une maîtrise à l'échelle de la population

Comme nous le détaillerons plus loin, pour les *Crassostrea*, nous avons très vite abandonné les chocs thermiques pour induire les pontes, au profit d'une technique développée outre-Atlantique, le "stripping" (Allen *et al.*, 1989). Un des avantages de cette technique est de pouvoir sexer et trier les huîtres par observation des gamètes au microscope avant d'entamer les expérimentations. En cas de déficit en huîtres mâles, une recherche systématique est effectuée parmi les plus petits individus (protandrie). En cas de déficit en femelles (100% de mâles dans une population de *Crassostrea rivularis* par exemple cette année), il n'y a actuellement pas de solution.

Pour *Ostrea edulis*, il n'y a actuellement pas de réelle possibilité de sexage, les pontes sont généralement réalisées en masse dans le bac de maturation, sans contrôle effectif des individus qui participent à la ponte. L'emploi de la sérotonine comme inducteur de ponte, permet en partie de contourner cette difficulté, mais seuls les mâles répondent à cette stimulation.

### 2.2.2. Programmes nécessitant une maîtrise à l'échelle de l'individu

Le sexage peut être réalisé pendant la période de maturation par anesthésie au chlorure de magnésium et biopsie de la gonade chez *Crassostrea gigas*, mais il n'y a pas de solution en cas de déséquilibre de la sex-ratio puisqu'il n'existe pas de technique permettant d'orienter les lignées germinales vers un sexe donné.

Chez *Ostrea edulis*, dans le cadre du programme de sélection de souches résistantes ou tolérantes à la bonamiose, les croisements sont réalisés sur des huîtres préalablement identifiées. Pour contourner les difficultés liées à l'espèce (larvipare, sexage difficile car les lignées mâles et femelles coexistent généralement à l'intérieur de la gonade, induction individuelle de la ponte non maîtrisée), un dispositif de maturation dénommé HLM ("Habitation à Logettes de Maturation") a été mis au point.

Ce dispositif, qui comprend 100 aquariums de 20 litres et un nombre identique de tamis pour récupérer les larves, repose sur un principe simple : en associant deux huîtres dans un aquarium, on a théoriquement une chance sur deux d'avoir un couple mâle-femelle. Plus de cent croisements, issus de parents bien identifiés, ont ainsi été obtenus en 1995. Un résultat particulièrement intéressant a par ailleurs été noté. Si l'on excepte les croisements qui n'ont pas abouti pour cause de mortalité d'une des deux huîtres, 153 types de croisements biparentaux ont été tentés qui auraient dû théoriquement fournir entre 75 et 80 familles de plein-frères. Nous en avons obtenu 112, soit un succès proche de 75%, très éloigné des 50% théoriques. Ce résultat qui demande à être confirmé en 1996, soulève une question fondamentale pour le déterminisme du sexe : existe-t-il chez cette espèce des substances chimiques capables d'orienter le sexe du partenaire ?



### 3. CONDITIONNEMENT DES REPRODUCTEURS

Parmi les nombreux facteurs externes ou internes, reconnus comme pouvant influencer le déroulement de la gamétogenèse, il faut distinguer les facteurs **déclenchant** et les facteurs de **contrôle** de la gamétogenèse.

#### 3.1. Les facteurs déclenchant la gamétogenèse

L'huître plate *Ostrea edulis* présente une réelle phase de repos sexuel entre les mois de novembre et février. La reprise de l'activité génitale débute pour la majorité des auteurs (Lubet, 1991) aux environ de 10°C, Mann (1979) trouve par calcul une température de 6.75°C. A contrario, les maturations hivernales conduites depuis plusieurs années à La Tremblade, semblent montrer que le facteur déclenchant est indépendant du facteur température. La photopériode joue-t-elle un rôle chez *Ostrea edulis* comme chez *Pecten maximus* (Devauchelle et Mingant, 1991) ? Nous avons en effet remarqué que le naissain d'huître plate est très sensible aux variations lumineuses.

Chez *Crassostrea gigas*, il n'y a pas de véritable phase de repos sexuel, la gamétogenèse se déroule à un rythme très lent pendant la période hivernale (mitoses goniales), ce qui permet en écloserie de la réactiver par conditionnement thermique (Lubet, 1991). Dans le bassin de Marennes-Oléron, Héral (1989) a montré une corrélation négative entre les températures automnales et la reprise de l'activité génitale, et, une quasi indépendance vis à vis des températures hivernales. Le début de la phase active de la gamétogenèse coïncide avec les plus basses températures hivernales.

#### 3.2. Les facteurs contrôlant la gamétogenèse

Parmi les facteurs qui contrôlent le déroulement de la gamétogenèse, on distingue habituellement, les **facteurs externes** (influence de l'environnement) et les **facteurs intrinsèques**, bien que ces facteurs soient étroitement liés.

##### 3.2.1. Les facteurs intrinsèques

Parmi les facteurs intrinsèques il faut citer d'une part, les facteurs neuroendocriniens dont les modalités d'action sont encore trop mal connues pour espérer une application à court terme au sein des écloséries, et, d'autre part l'état général de l'individu : l'âge, la taille, le niveau des réserves glucidiques. Ce dernier point est important car l'énergie accumulée pendant l'hiver chez les huîtres soutient l'effort de reproduction (Deslous-Paoli et Héral, 1988). **Il est essentiel de savoir dans quel état de réserve doivent se trouver les géniteurs pour mener à bien leur conditionnement en écloserie.**

##### 3.2.2. Les facteurs externes

Les facteurs externes les plus couramment décrits dans la littérature sont la température, la nourriture, la salinité et la photopériode. Un facteur est souvent omis, la zootechnie. Ces facteurs doivent être hiérarchisés en fonction de leur degré d'incidence sur la gamétogenèse.

La **température** semble être le paramètre le plus important. Elle a fait l'objet de nombreuses études dans le milieu naturel et dans les écloséries. Dans le bassin de Marennes-Oléron, il a été montré qu'il existait chez *Crassostrea gigas*, une corrélation positive entre les températures printanières et la cinétique de la gamétogenèse (Héral, 1989). Le conditionnement des géniteurs est, selon les écloséries, effectué entre 20 et 25°C, l'optimum se situant à 22°C. Sa durée est d'autant plus courte que les géniteurs utilisés sont proches de la

maturité sexuelle. A une température de 22°C, il faut 30 à 45 jours en période hivernale pour obtenir des huîtres aptes à émettre leurs gamètes, il faut 15 à 20 jours aux mois d'avril-mai à la même température. A côté de ces considérations purement zootechniques, il ne faut pas oublier les relations entre température et problèmes pathologiques. Les données récentes concernant le facteur température dans l'expression de l'Herpès virus (Le Deuff *et al.*, sous presse), sont susceptibles d'entraîner des modifications dans les techniques de conditionnement.

Le conditionnement d'*Ostrea edulis* est généralement réalisé à une température de 20°C. En fonction de facteurs déclenchants restant à déterminer, la durée du conditionnement hivernal peut varier selon les années, de 20 à 70 jours. Cette durée est beaucoup plus réduite lors du deuxième cycle de maturation, en 1995 elle a été en moyenne de 22 jours dans les HLM, certaines huîtres étant capables d'émettre de nouveaux gamètes en moins de 10 jours.

La **nutrition** exerce un rôle considérable dans la reproduction des mollusques. Pour les huîtres, ce rôle est tout aussi important pendant la phase hivernale de stockage de réserves énergétiques qui sont mobilisées au printemps pour la fabrication des gamètes, que pendant tout le déroulement de la gamétogenèse (Deslous-Paoli *et al.*, 1981). La nutrition conditionne la fécondité et le recrutement. En éclosérie, seul un régime à base d'algues phytoplanctoniques est actuellement fourni, pourtant dans le milieu naturel ces microalgues ne représentent qu'une part des éléments particuliers et nous savons par ailleurs que les éléments dissous et les bactéries sont également une source essentielle de nourriture (Héral, 1989). L'absence de contrôle des éléments dissous dans les essais de conditionnement en circuit fermé, peuvent expliquer les faibles fécondités obtenues.

A La Tremblade, le conditionnement est réalisé en circuit ouvert, l'eau de mer est renouvelée à raison de 4 à 5 litres/heure/géniteur et enrichie par une double injection de phytoplancton (du *Skeletonema costatum* produit en grande quantité à l'extérieur du bâtiment et un mélange de trois espèces d'algues produites à l'intérieur). Des comptages systématiques de ces apports quotidiens ont été réalisés en 1994; ils montrent que malgré cette double injection, l'apport nutritionnel provenant du milieu naturel ("Divers 300m<sup>3</sup>" dans la légende des figures 1 et 2) est loin d'être négligeable puisqu'il représente en moyenne 30 à 50% des algues proposées aux géniteurs auxquels il faut ajouter la part des matières organiques dissoutes.

L'action de la **salinité** sur la gamétogenèse est toujours discutée, il semble toutefois admis que, pour les bivalves vivant dans une large gamme de salinités, la reproduction se déroule normalement à l'intérieur des limites létales spécifiques (Lubet, 1991). Dans le milieu naturel, sur *Crassostrea gigas*, Héral (1989) a montré qu'une forte corrélation existait entre température et salinité pour prédire les bonnes reproductions. Chez *Ostrea edulis*, nous avons observé des problèmes de reprise de la gamétogenèse pour des salinités proche de 20‰. Comme pour beaucoup d'autres paramètres, il nous manque pour le conditionnement des huîtres en éclosérie, les limites réelles de salinité à l'intérieur desquelles la gamétogenèse ne s'effectue pas.

La **photopériode** est un paramètre qui n'a pas fait l'objet d'étude chez les huîtres, de façon empirique, une photopériode croissante est réalisée dans la salle de maturation pendant le conditionnement hivernal des huîtres plates.

Les paramètres **zootechniques** sont rarement cités comme facteurs externes dans les études concernant le conditionnement des géniteurs, bien qu'ils aient une grande influence sur le déroulement de la gamétogenèse. A titre d'exemple, rappelons que le conditionnement de *Pecten maximus* est actuellement réalisé dans des bacs avec fond de sédiment faisant office de filtre biologique. Cette technique, mise au point par l'équipe de l'éclosérie du Tinduff

Figure : 1

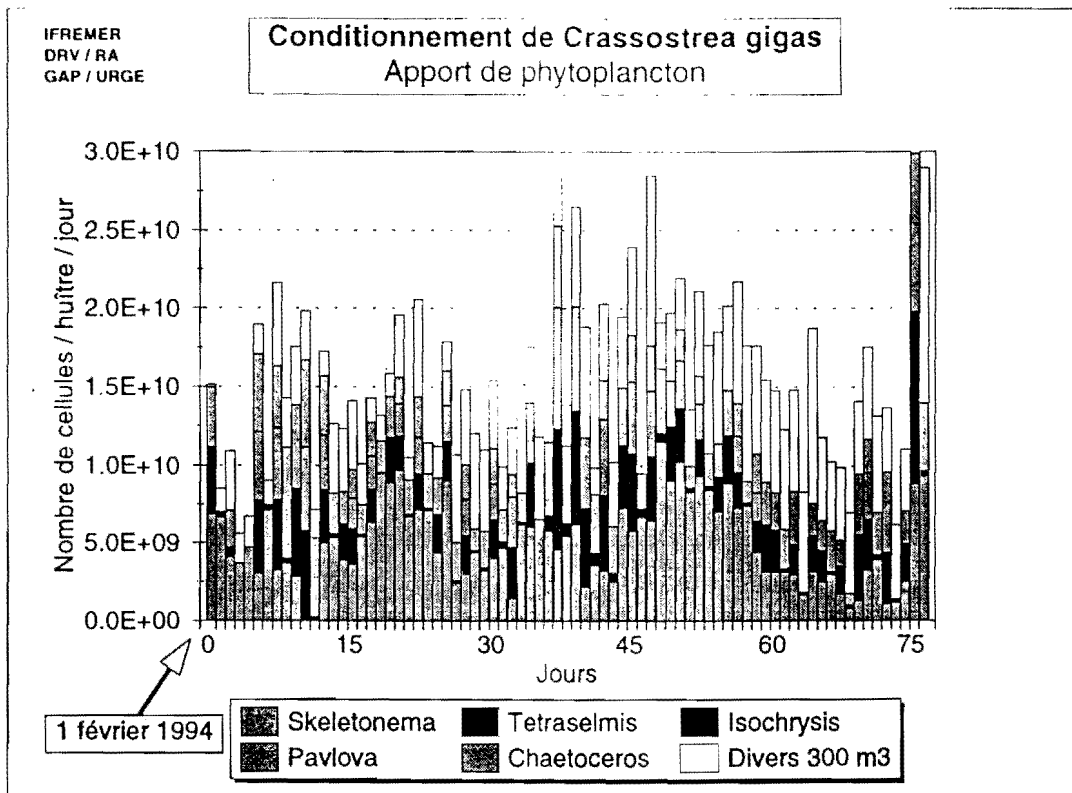
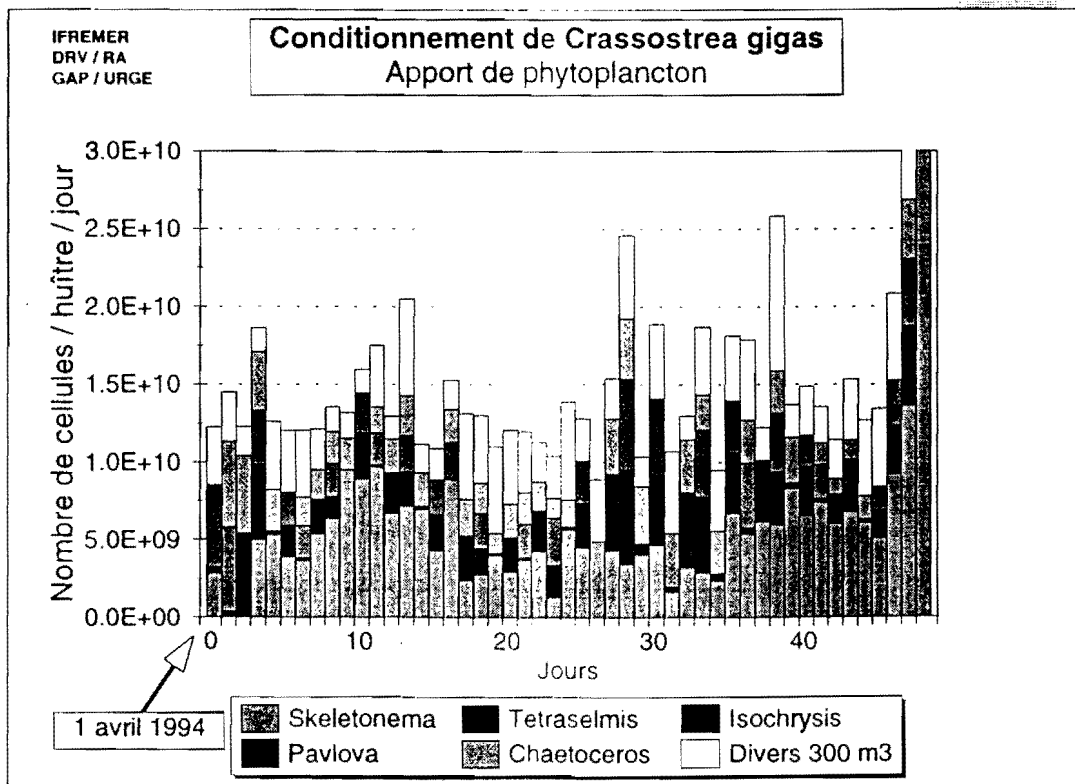


Figure : 2



(Bretagne) au début des années 80 (Gérard, non publié), a été déterminante pour le conditionnement de la coquille St Jacques en se montrant nettement plus performante que la technique utilisant des bacs à fond nu. Des paramètres tels que la taille du bac de conditionnement, le volume d'eau de mer disponible par géniteur, le débit d'eau de mer, le type de renouvellement (circuit ouvert ou fermé), le rythme des nettoyages... sont de nature à modifier le déroulement de la gamétogenèse.

## 4. INDUCTION DE LA PONTE

### 4.1. Huître creuse

Le procédé le plus classiquement utilisé en éclosérie industrielle est le choc thermique parfois associé à une addition de produits sexuels d'animaux sacrifiés. Ces techniques de stimulation donnent des résultats variables tant au niveau de la qualité des gamètes que du synchronisme de la ponte.

L'efficacité des traitements d'induction de la triploïdie chez *Crassostrea gigas* étant basée en partie sur le synchronisme embryonnaire, une autre méthode d'obtention des gamètes est employée à La Tremblade : le "stripping". Cette technique qui consiste à récupérer les gamètes par scarification de la gonade (Allen *et al.*, 1989), présente l'avantage de supprimer toute fécondation incontrôlée, d'obtenir des gamètes à un même stade de développement, de pouvoir contrôler leur qualité au microscope et de programmer à la minute près le début d'une expérience. L'inconvénient majeur d'une telle technique réside dans le sacrifice des géniteurs et dans le risque de ne pas recueillir des gamètes à l'optimum de leur pouvoir fécondant. Les huîtres creuses sont les rares bivalves dont les produits génitaux sont fonctionnels après un tel traitement, les croissances et survies larvaires n'en sont pas affectées.

### 4.2. Huître plate

Le procédé habituellement utilisé dans les écloséries de production, consiste à placer des géniteurs dans un bac qui sert à la fois pour la maturation, la ponte et l'émission des larves. Ces dernières sont recueillies dans un tamis au fur et à mesure de leur émission, il n'y a aucun contrôle du moment de la ponte.

En 1991, pour mettre au point les techniques d'induction de la triploïdie chez *Ostrea edulis*, nos besoins étaient tout autres. Des pontes individuelles synchrones étaient nécessaires. Elles ont été obtenues en faisant murer des lots d'une cinquantaine d'huîtres, placées individuellement dans des récipients de 5 litres. Malgré le sacrifice régulier de quelques individus pour apprécier leur état de maturité, plusieurs échecs ont été enregistrés lors de l'induction de la ponte par choc thermique. Si des émissions de sperme étaient régulièrement obtenues, les émissions d'ovocytes étaient plus rares. *Le synchronisme requis dans ce type de programme se situe à l'échelle d'une population de géniteurs, la ponte doit être synchronisée, la fécondation entièrement contrôlée.*

Dans le cadre du programme de sélection de souches résistantes, le niveau de maîtrise est encore différent. *Le synchronisme requis se situe à l'échelle des deux parents identifiés, le moment de la ponte est indifférent, la fécondation n'a pas besoin d'être contrôlée si les deux partenaires sont isolés.* En attendant les résultats d'une recherche permettant d'accroître la maîtrise individuelle de la maturation, le dispositif HLM (§ 2.2.2) permettant de recueillir des

Figure : 3

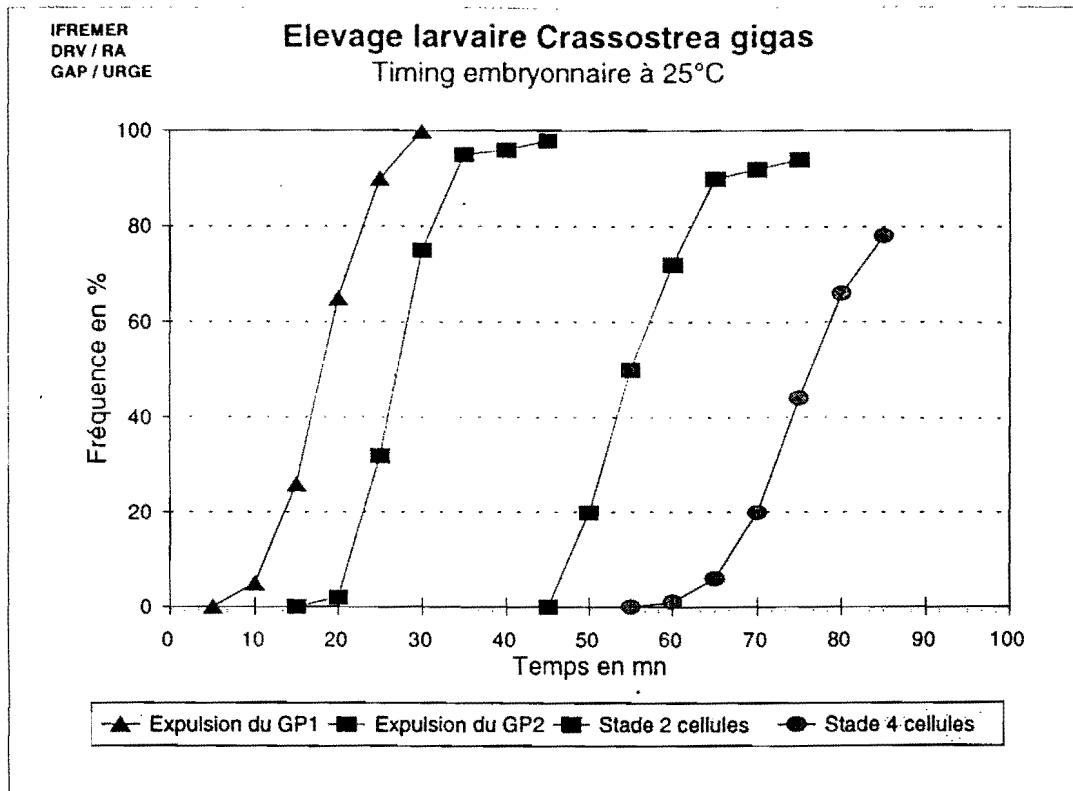
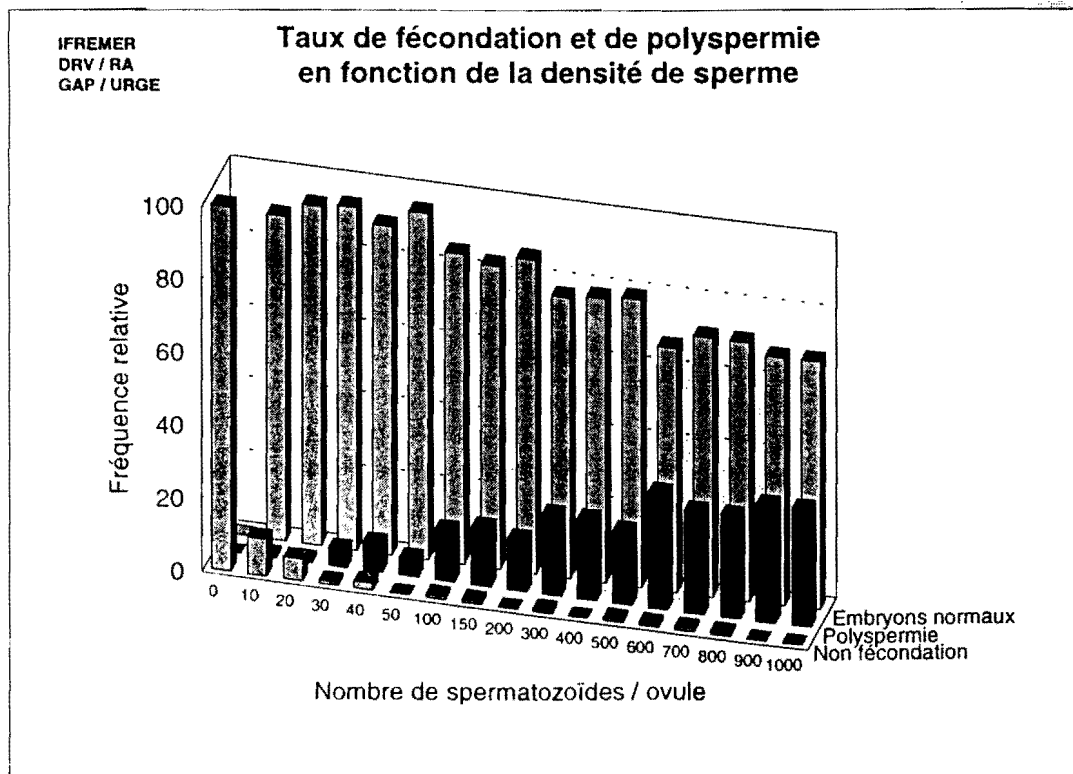


Figure : 4



larves issues de deux huîtres sélectionnées, répond à ces critères. Toutefois ce dispositif est "chronophage", tant au niveau de l'entretien de la structure qu'au niveau du temps nécessaire à l'obtention des croisements, il a fallu cinq mois pour obtenir 112 croisements biparentaux en 1995. En 1994, des tentatives de maturation individuelle dans le même dispositif s'étaient soldées par de nombreux échecs au moment de l'application des chocs thermiques. Des inductions de la ponte par un neurotransmetteur, la sérotonine, n'avaient abouti qu'à des émissions de sperme. Pendant la phase de maturation, plusieurs autofécondations avaient également été observées.

## **5. FECONDATION**

La fécondation est externe chez les mollusques, elle se déroule dans le milieu extérieur pour les huîtres creuses et dans la cavité palléale pour l'huître plate. Le contrôle quantitatif et qualitatif de la fécondation s'effectue par l'analyse des taux de fécondation et par l'étude du développement embryonnaire précoce en microscopie à épifluorescence. Une technique de comptage des spermatozoïdes et des ovocytes par imagerie numérique a été mise au point.

### **5.1. Huître creuse**

Afin d'améliorer le synchronisme embryonnaire dans les expériences d'induction de la triploïdie et de la tétraploïdie, l'étude du développement embryonnaire précoce en microscopie à épifluorescence a été d'une grande utilité. Grâce à cette technique, la chronologie entre la fécondation et le stade 4 cellules est très bien connue (figure 3) et un ratio optimal de spermatozoïdes par ovocyte (100 sp/ov) tenant compte d'un taux de polyspermie limité à 10% (figure 4) a été déterminé. Elle a aussi permis de standardiser le temps entre le prélèvement des ovocytes et la fécondation. Les ovocytes sont récupérés par stripping au stade prophase I de la méiose. En l'absence de toute fécondation, ils évoluent dans l'eau de mer jusqu'au stade métaphase I en passant par différents stades : rupture de la vésicule germinative, condensation des chromosomes et regroupement sur le plan équatorial. Chez *Crassostrea gigas* il faut environ 20 à 30 mn à 25°C pour atteindre ce stade, et toutes les expériences d'induction de la polyplôïdie débutent désormais à T<sub>0</sub>-30mn.

### **5.2. Huître plate**

En raison de son mode de reproduction (larvipare), nos connaissances en matière de qualité des gamètes et de fécondation sont encore plus limitées que pour l'huître creuse. Toutefois, les expériences d'élevage *in vitro* réalisées dans le cadre de l'induction de la triploïdie ont permis d'acquérir des données sur le développement embryonnaire précoce qui est beaucoup plus lent que chez *Crassostrea gigas*. Une autre particularité réside dans l'émission des spermatozoïdes qui se fait sous forme de balles de sperme. Il est préférable de réaliser les fécondations avec du sperme de ce type plutôt qu'avec du sperme déjà individualisé.

## **6. QUALITE DES GAMETES ET QUALITE DES ELEVAGES LARVAIRES.**

En l'absence de tests de qualité des gamètes, fiables et rapides, une forte variabilité dans les performances des élevages larvaires est souvent enregistrée. Cette variabilité est surtout sensible chez *Crassostrea gigas*.

Figure : 5

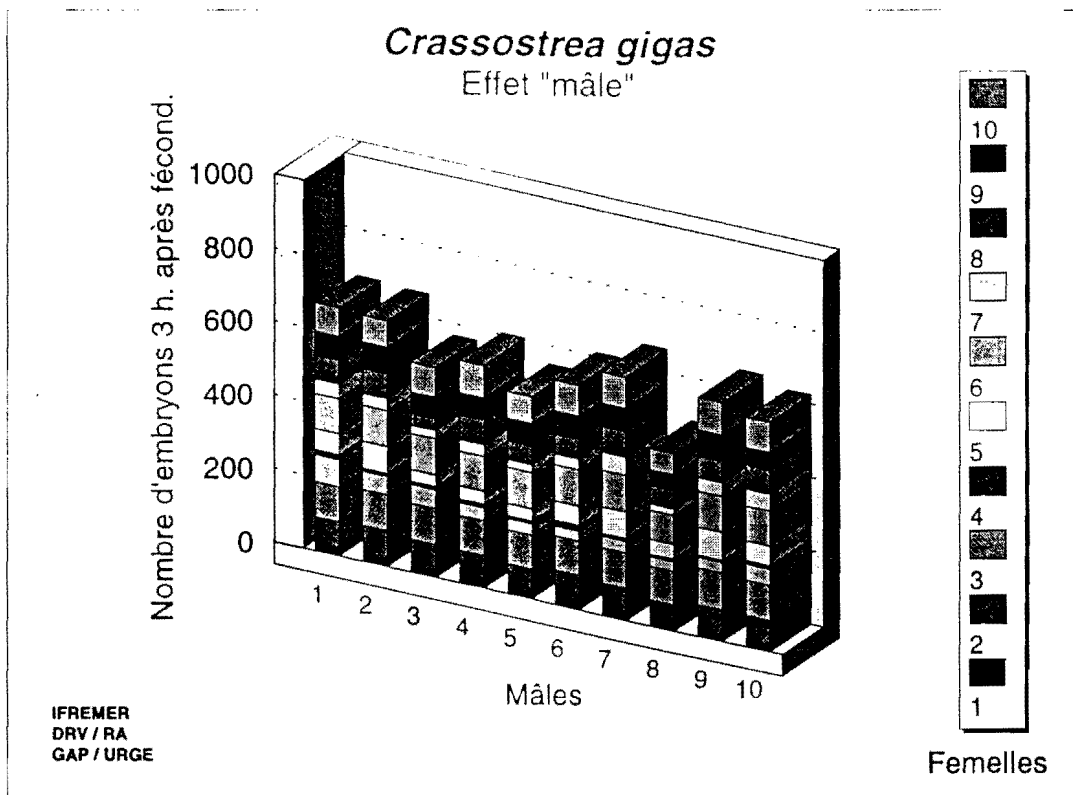
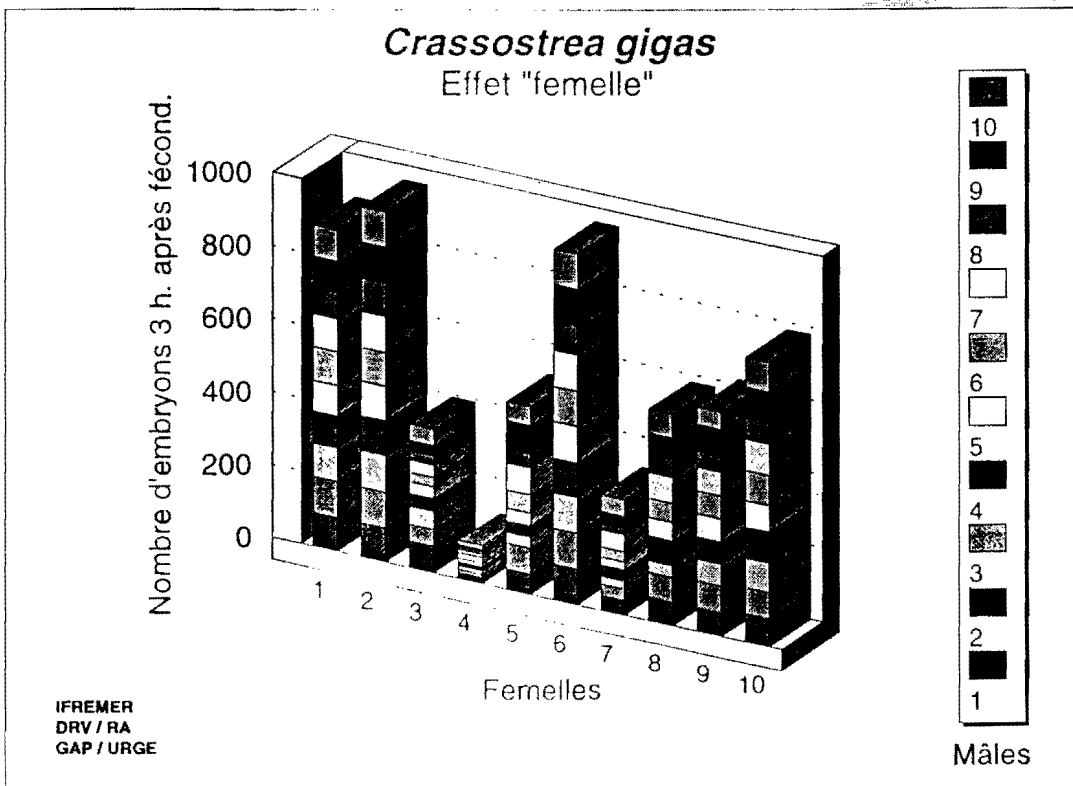


Figure : 6



### **6.1. Huître creuse**

Hormis les observations microscopiques classiques (motilité du sperme, présence d'une vésicule germinative chez les ovules) nous n'avons que peu d'éléments pour juger de la qualité des gamètes. Une expérience réalisée en 1995 pour le futur programme européen GENEPHYS illustre fort bien la variabilité qui existe au sein d'une même population de géniteurs. A partir d'un plan factoriel de croisement, comprenant 10 mâles et 10 femelles, les 100 croisements obtenus ont été analysés en microscopie à épifluorescence 3 heures après fécondation. Sur chaque croisement, 100 produits ont été comptabilisés (ovules non fécondés, ovules fécondés mais bloqués à un stade précoce, embryons à développement normal). En cumulant le nombre d'embryons normaux obtenu par mâle ou par femelle avec les 10 autres congénères (soit un maximum de 1000 descendants), il est possible de faire ressortir la variabilité de qualité des gamètes (figure 5 et 6). Une analyse de variance montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les mâles, par contre elle est hautement significative entre les femelles. ***Ces résultats indiquent qu'en matière de recherche sur la qualité des gamètes, priorité doit être donnée aux travaux sur les gamètes femelles.***

Les relations entre d'une part, la qualité des gamètes, les caractéristiques des embryons et des larves D, et d'autre part, la qualité des élevages larvaires, sont à établir. Selon les élevages, une proportion plus ou moins importante de larves ne passe pas le stade umboné (100µm), ce qui se traduit par des taux assez faibles de larves atteignant le stade pédivéligère (entre 20 et 50%). Ces blocages de croissance, liés à des carences en certains éléments essentiels, trouvent sûrement leur origine dans les conditions de maturation. Le passage du stade umboné (8 à 10 jours) semble être une étape décisive permettant de vérifier l'aptitude des gamètes et embryons à fournir des larves de qualité.

### **6.2. Huître plate**

L'huître plate étant une espèce larvipare, les larves se développent pendant 8 jours environ dans la cavité palléale. Elles sont expulsées à une taille de 180µm en moyenne. Si l'on excepte les élevages *in vitro* conduits dans le cadre des recherches sur la polyploïdisation, les croissances larvaires sont en règle générale plus rapides et plus harmonieuses que celles de l'huître creuse, et, une forte proportion des larves atteint le stade pédivéligère (60 à 90%).

### **6.3. Conservation des gamètes ou des embryons**

Les techniques de cryoconservation des gamètes ou des embryons dans le domaine aquacole sont très faiblement développées. Il est pourtant essentiel pour les recherches en génétique (autofécondation, hybridations, sélection sur descendance...) de pouvoir maîtriser ces techniques. Chez les huîtres, on peut citer les travaux de Lannan (1971) sur la conservation du sperme de *Crassostrea gigas*, travaux repris par Bougrier et Rabenomanana (1986), et, les recherches récentes de Chao *et al.* (1994) sur la cryoconservation des embryons.

## **CONCLUSION**

De réels progrès ont été réalisés ces dernières années dans la connaissance des mécanismes de contrôle de la gamétogenèse, de la ponte et de la fécondation, mais sur une seule espèce *Pecten maximus*, et à l'échelle d'une population de géniteurs. Ce document, qui fait le parallèle entre les programmes "reproduction" et "génétique", souligne les lacunes restant à combler



chez les huîtres, notamment dans le domaine de la maîtrise de la gamétogenèse à **une échelle individuelle**.

Il est bien entendu que les généticiens ne sont et ne doivent pas être les seuls bénéficiaires des recherches dans le domaine de la maîtrise de la fertilité. Toutefois nos demandes rejoignent en grande partie les préoccupations actuelles des éclosiers de production, même si le niveau d'étude ne réclame pas la même finesse : maîtrise au niveau de l'individu pour la recherche et au niveau de la population pour la production.

Les sujets d'étude évoqués dans cette courte synthèse sont nombreux, ils peuvent être regroupés en plusieurs rubriques d'inégale importance selon l'espèce :

- choix des géniteurs (concerne surtout l'huître creuse) :
  - origine géographique,
  - relations âge et taille du reproducteur, et, quantité et qualité des gamètes,
  - importance des réserves glucidiques,
  - en fonction de critères pathologiques (herpès virus) ;
- déterminisme du sexe (toutes les huîtres mais priorité à la plate) :
  - mécanismes physiologiques contrôlant les changements de sexe,
  - influence de l'âge et de la taille sur le déterminisme du sexe,
  - recherche de substances susceptibles d'orienter le sexe des huîtres environnantes,
  - orientation artificielle des lignées germinales,
  - méthodes de sexage ;
- maturation (toutes les huîtres mais priorité à la creuse) :
  - nature et rôle des facteurs déclenchant la gamétogenèse (huître plate),
  - étude des facteurs exogènes et endogènes contrôlant la gamétogenèse, et étude de leurs effets synergiques,
  - qualité et quantité de l'alimentation des reproducteurs, rôle des éléments dissous, diversification des espèces et des souches d'algues phytoplanctoniques,
  - désaisonnalisation des gamétogenèses ;
- induction de la ponte (toutes les huîtres mais priorité à la plate) :
  - synchronisation des pontes,
  - induction individuelle ;
- qualité des gamètes (toutes les huîtres mais priorité à la creuse) :
  - définir des critères de qualité des gamètes, avec une priorité aux gamètes femelles,
  - établir les relations entre qualité des gamètes, qualité des embryons et qualité des élevages larvaires,
  - cryoconservation des gamètes ou des embryons ;
- fécondation (concerne surtout l'huître creuse) :
  - optimisation des procédures de fécondation,
  - ratio sperme/ovocyte (bien connu mais à affiner en fonction de la qualité des gamètes),
  - synchronisation du développement embryonnaire précoce (sujet déjà bien maîtrisé dans le cadre des programmes cytogénétiques).

La multiplicité des études à aborder sous-entend la mise en place de moyens humains et financiers. Ceux-ci étant de plus en plus limités, il convient de bien définir les axes prioritaires, de rechercher les collaborations en interne (actions conjointes sur certains sujets des groupes reproduction, nutrition, zootechnie, génétique) et de bien cibler les coopérations externes.

## Références

- Allen S.K., S.L. Downing and K.K. Chew, 1989.** Hatchery manual for producing triploid oysters. Distributed by University of Washington Press, Seattle, Washington. 27 p.
- Bougrier S. and L.D. Rabenomanana, 1986.** Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **58** : 277-280.
- Chao N. H., C.P. Chiang, H.W. Hsu, C.T. Tsai and T.T. Lin, 1994 .** Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquat. Living Resour.*, **7** : 99-104
- Deslous-Paoli J.M., M. Héral, J.P. Berthome, D. Razet et J. Garnier, 1982.** Reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* Thurnberg dans le bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981: aspects biochimiques et énergétiques. *Rev.Trav. Inst. Pêches marit.*, **45** : 319-327.
- Deslous-Paoli J.M. and M. Héral, 1988.** Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat. Liv. Resour.*, **1** : 239-249.
- Devauchelle N. and C. Mingant, 1991.** Review of reproductive physiology of scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.*, **4** : 41-51.
- Héral M., 1989.** L'ostréiculture traditionnelle. In : Aquaculture - G. Barnabé coordonateur, Lavoisier (Tec. Doc.) Ed., Paris : 348-397.
- Héral M. et J.M. Deslous-Paoli, 1983.** Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* estimée par mesures microcalorimétriques et par dosages biochimiques. *Oceanol. Acta*, 1983, **6**(2) : 193-199.
- His E. et R. Robert, 1987.** Impact des facteurs anthropiques sur le recrutement de l'huître : l'exemple du bassin d'Arcachon. *Océanis*, **13**(3) : 317-335
- Lannan J.E., 1971.** Experimental self-fertilisation of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* , utilising cryopreserved sperm. *Genetics*, **68** : 599-601.
- Le Deuff R.M., T. Renault, A. Gérard and Y. Naciri, (sous presse).** Thermal effects on Herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*.
- Lubet P., 1991.** Reproduction des mollusques. In : Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture - G. Barnabé Coordonateur, Lavoisier (Tec. Doc.) Ed., Paris : 166-210.
- 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. Ass. U.K.* **59** : 95-110.
- Marteil L., 1976.** La conchyliculture Française. (2ème partie). Biologie de l'huître et de la moule. *Rev. Trav. Inst. Pêches Mar.*, **40** (2) : 149-346.
- Robert R., T. Noël and R. Galois, 1989.** The food value of five unicellular diatoms to the larvae of *Crassostrea gigas* Thunberg. *EAS, Spec. Publ.* **10** : 215-216.



## ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LA REPRODUCTION ARTIFICIELLE DE L'HUITRE *Crassostrea angulata* AU PORTUGAL

C. MASSAPINA\*, E. DORES\*, D. MATIAS\*, S. JOAQUIM\* ET N. DEVAUCHELLE\*\*

\* IPIMAR/CIMSul, Av. 5 de Outubro, 8700 - Olhão, Portugal.

\*\* IFREMER, Centre de Brest, DRV/A, BP 70, 29280 Plouzané, (F).

**Résumé :** La recherche sur la reproduction artificielle de cette espèce est relativement récente au Portugal et se centre sur l'optimisation de la qualité des larves.

Les résultats présentés portent sur :

i) les aspects méthodologiques de la ponte, de la fécondation et de l'incubation : les essais sur l'effet de la méthode d'obtention des gamètes - choc thermique, injection de sérotonine et scarification de la gonade - sur la viabilité des larves ont montré que le taux d'éclosion est plutôt dépendant de la qualité des ovocytes que de la méthode d'induction. On vérifie une forte variabilité entre la viabilité des larves provenant de chaque femelle. En ce qui concerne l'effet de la température d'induction, de fécondation et d'incubation et le délai entre l'émission des ovocytes et la fécondation sur le taux d'éclosion des larves, ce dernier paramètre est le plus fortement corrélé avec la survie des larves D ( $r = -0.8105$   $P > 0.01$ ) ;

ii) la comparaison des caractéristiques de la ponte des huîtres sauvages et des huîtres conditionnées : ces expériences ont montré que les femelles conditionnées peuvent atteindre une fécondité plus forte que les femelles sauvages pendant la saison de ponte. Le nombre d'ovocytes émis par les huîtres conditionnées est rapporté à l'état des animaux en début de manipulation ;

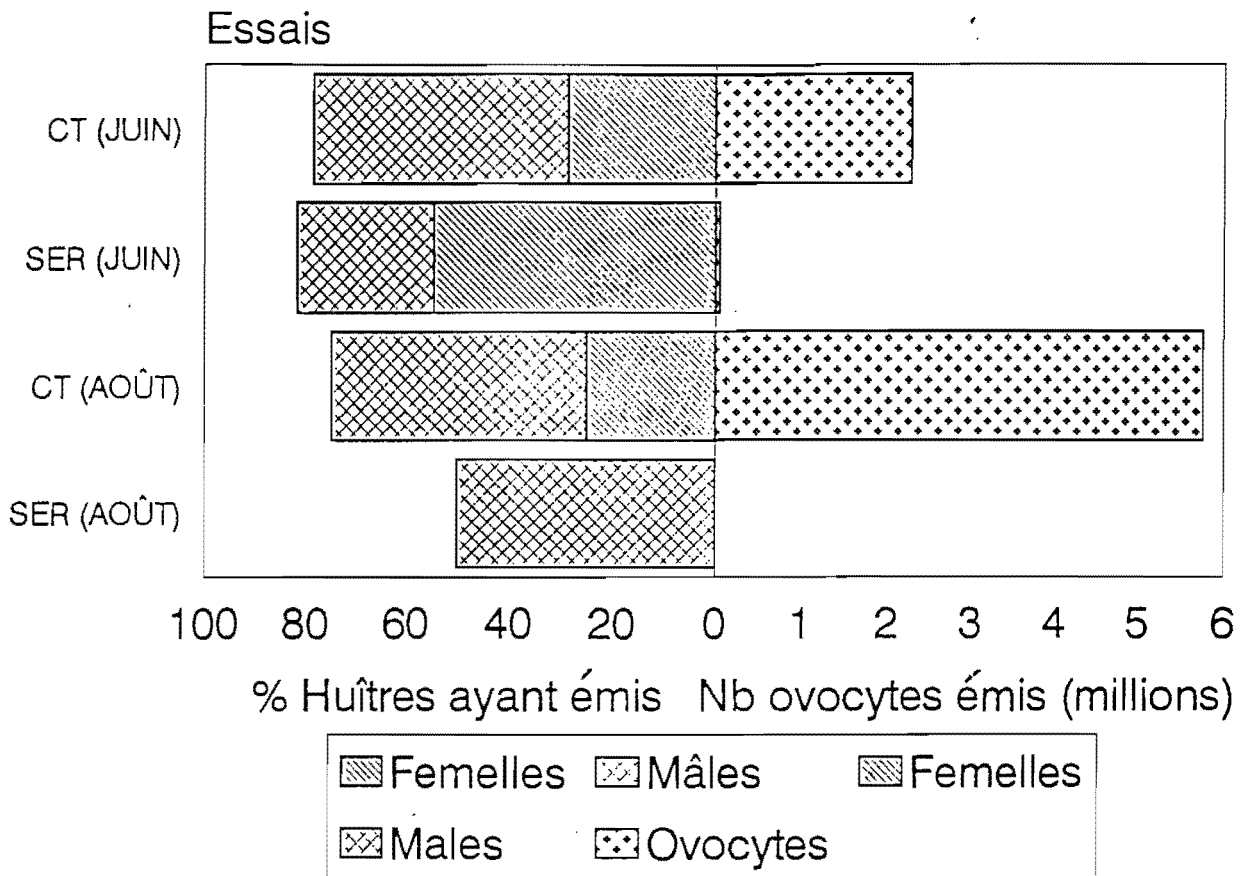
iii) la condition des géniteurs et la qualité des ovocytes émis pendant une saison de ponte (printemps/été 1995) : des échantillons bimensuels d'animaux ont montré qu'il y a des relations entre certains paramètres des géniteurs (l'indice de condition, le diamètre des ovocytes pris dans la gonade) et ceux des ovocytes (nombre émis) et des larves (taux d'éclosion). Le taux d'éclosion des larves baisse pendant l'époque de ponte.

Pour le futur, la recherche devra porter sur la définition des critères de la qualité des ovocytes obtenus en laboratoire par rapport aux ovocytes des animaux provenant du milieu naturel.

### 1. INTRODUCTION

Les huîtres creuses, *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*, sont historiquement connues comme des bivalves bien adaptés à l'aquaculture.

Au Portugal l'ostréiculture s'effectue d'une part avec du naissain importé de France et d'Irlande et d'autre part avec du naissain capté en mer. Actuellement, l'hétérogénéité des populations (huîtres importées et indigènes) existant dans les systèmes estuariens et lagunaires conjuguée avec des difficultés concernant l'identification des espèces, laissent des doutes sur l'espèce cultivée. Toutefois, des auteurs comme Vilela (1972), Barre (1981) et Biocca et Matta (1982) réfèrent que *C. angulata* et *C. gigas* ne sont pas des espèces distinctes car les hybrides sont fertiles et on les considère plutôt comme deux races géographiques, différant seulement par quelques adaptations physiologiques. D'après la FAO (1987) les deux huîtres peuvent avoir la même désignation, soit *C. angulata*, soit *C. gigas*. Dans ce travail nous avons adopté la désignation *C. angulata*.



**Figure 1.** Comparaison du pourcentage de réponse et de la fécondité entre les huîtres stimulées par choc thermique (CT) et par sérotonine (SER).

Etant donné qu'il est indispensable de pouvoir compter, dans le futur, avec du naissain produit en éclosérie pour la planification de la production et la bonne gestion de l'ostréiculture, l'IPIMAR/CIMSul développe un projet de recherche concernant la qualité de la reproduction artificielle de cette espèce.

En milieu naturel, d'après Vilela (1972), l'huître creuse de la rivière Sado, présente une période élargie de ponte, depuis avril/mai jusqu'à la fin octobre/début novembre. En reproduction contrôlée, Vieira et Schuller (1989) ont fait une description de l'éclosérie expérimentale de bivalves (IPIMAR/CIMSul) qu'ils ont installée et dans laquelle ils ont produit, pour la première fois au Portugal, du naissain d'huître.

Le présent travail fait un bilan des travaux réalisés dans cette éclosérie depuis 1991, lesquels apportent une information sur: i) des aspects méthodologiques de la ponte, de la fécondation et de l'incubation; ii) la comparaison des caractéristiques de la ponte des huîtres sauvages et des huîtres conditionnées; iii) la condition des géniteurs et la qualité des ovocytes émis pendant une saison de ponte (printemps/été 1995).

## **2. MATERIEL ET METHODES**

### **2.1. Les géniteurs**

Tous les essais ont été réalisés avec des huîtres creuses provenant de la Ria Formosa - Sud du Portugal.

#### **2.1.1. Huîtres conditionnées**

Au cours des années 1991, 1992 et 1993, 9 expériences de conditionnement ont été réalisées. Le conditionnement a consisté en une stabulation dans des bacs avec une densité d'élevage d'une huître/150 cm<sup>2</sup>, avec un renouvellement de deux volumes en deux jours de l'eau thermorégulée à 20°C et un apport continu de microalgues (1.74.10<sup>9</sup> cellules.animal<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> du mélange 50% *Isochrysis aff galbana* et 50% *Chaetoceros calcitrans*). Ce conditionnement a eu une durée variable, généralement de un à deux mois. Le stade de maturation sexuelle a été déterminé par observation microscopique d'un frottis de la gonade.

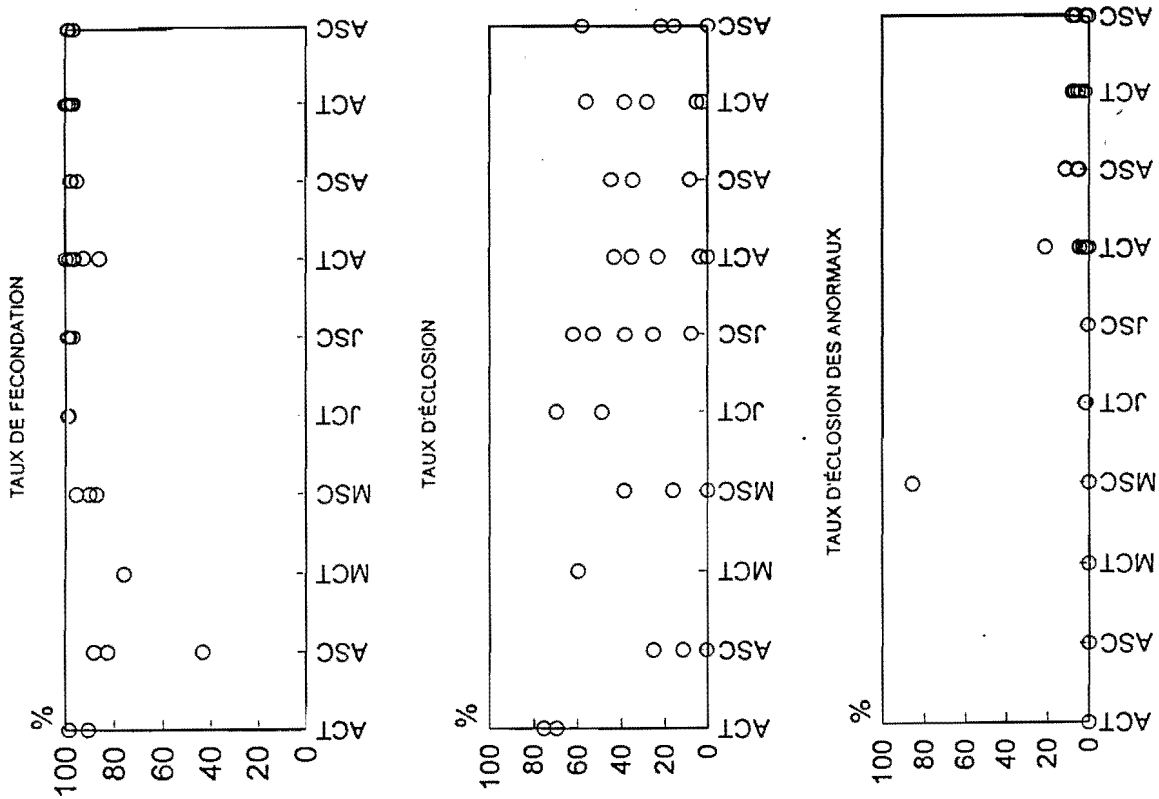
#### **2.1.2. Huîtres sauvages**

Pendant l'été 1991 et le printemps/été 1995, 6 et 11 prélèvements bimensuels d'huîtres ont été respectivement réalisés. En 1995, les paramètres pour caractériser les géniteurs ont été la détermination de deux indices de condition : IC<sub>1</sub> - poids sec de la chair sans cendre / poids sec de la coquille (Walne et Mann, 1975); et IC<sub>2</sub> - (poids sec de la chair / volume intervalvaire)x1000 (Quayle, 1951); mesurés sur 10 huîtres et le diamètre moyen des ovocytes pris de la gonade (mesure de 50 ovocytes/femelle dans 10 femelles/essai. Des lots de 30 huîtres ont été utilisés pour induire la ponte et déterminer le pourcentage de réponse à la stimulation et le taux de fécondation et d'éclosion (normaux et anormaux).

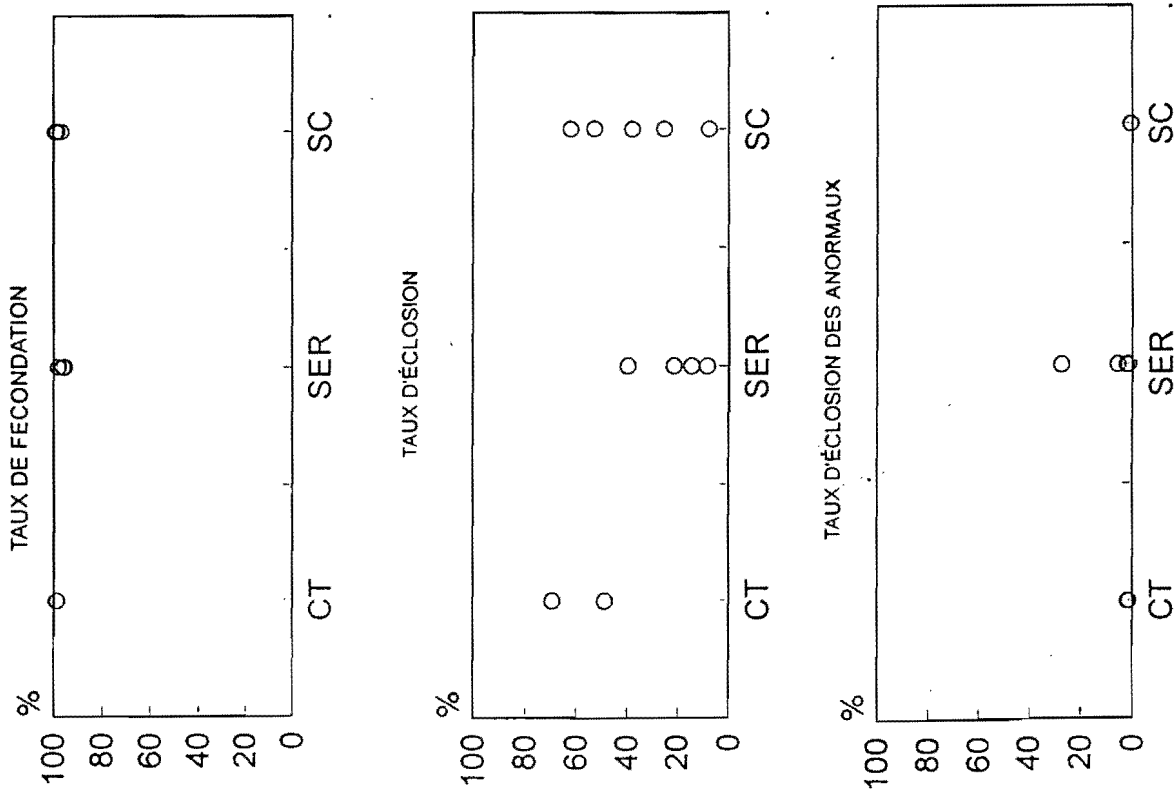
### **2.2. Obtention des gamètes, fécondation et incubation**

En général, la ponte a été induite par choc thermique des animaux (amplitude thermique : 10°C) et la fécondation a été réalisée dans une période maximum de 60 minutes après l'obtention des gamètes, à raison de 10 spermatozoïdes par ovocyte (observation sous microscope photonique).

Les ovocytes ont été incubés en petit volume (avec duplica) - béciers de 5 l. L'eau n'a pas subi de bullage, la densité d'incubation a été de 100 ovocytes/ml et la température de 22±2°C.



**Figure 2.** Comparaison du taux de fécondation et d'éclosion des larves normaux et anormaux obtenus par choc thermique (CT) et par scarification de la gonade (SC) (A- avril, M - mai, J - juin, A- août).



**Figure 3.** Comparaison du taux de fécondation et d'éclosion des larves normaux et anormaux obtenus par choc thermique (CT), par sérotonine (SER) et par scarification de la gonade (SC).

Le pourcentage d'huîtres ayant émis a été déterminé et des prélèvements d'ovocytes ont été effectués avant fécondation puis 2 et 24 heures après fécondation pour évaluation de :

- la quantité d'ovocytes émis par huître,
- le taux de fécondation et d'éclosion (normaux et anormaux).

Dans les essais réalisés dans le but d'évaluer l'effet de la méthode d'obtention des gamètes sur la viabilité des larves, trois méthodes ont été testées :

- i) choc thermique (CT) - 5 essais - 18 femelles ;
- ii) injection intragonadique de 0.4 ml par animal d'une solution 2 mM de sérotonine (5-HT) (SER) - 2 essais - 4 femelles ;
- iii) scarification de la gonade (SC) - 5 essais - 19 femelles. Les ovocytes provenant de chaque femelle ont été incubés en triple.

Dans les manipulations réalisées pour évaluer l'effet des paramètres d'induction, de fécondation et d'incubation sur le taux d'éclosion des larves, les variables testées ont été : la température d'induction (24, 27, 30 et 34°C), de fécondation (24, 26 et 28°C) et d'incubation (18, 20, 22, 23 et 25°C) et le délai entre l'émission des ovocytes et la fécondation (45, 60, 75, 105 et 135 minutes).

### **3. RESULTATS**

#### **3.1. Les méthodes d'obtention des gamètes, de fécondation et d'incubation**

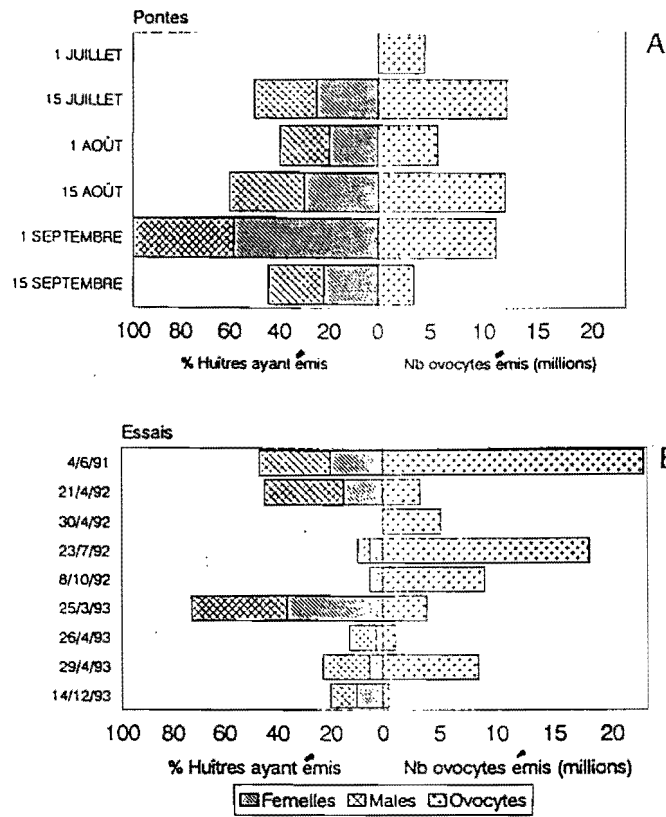
##### **3.1.1. La stimulation thermique, hormonale et la scarification de la gonade**

Les essais effectués pour comparer l'induction de la ponte par choc thermique et par la sérotonine ont montré que le délai induction/émission des gamètes est de 2 heures pour le choc thermique et de 1 heure pour la sérotonine. Le pourcentage de réponse à l'induction et le nombre moyen d'ovocytes provenant des huîtres stimulées par ces deux méthodes sont donnés sur la Figure 1. Il n'y a pas de différence importante au niveau du pourcentage d'animaux ayant émis mais, par contre, le nombre d'ovocytes est beaucoup plus élevé avec la stimulation thermique.

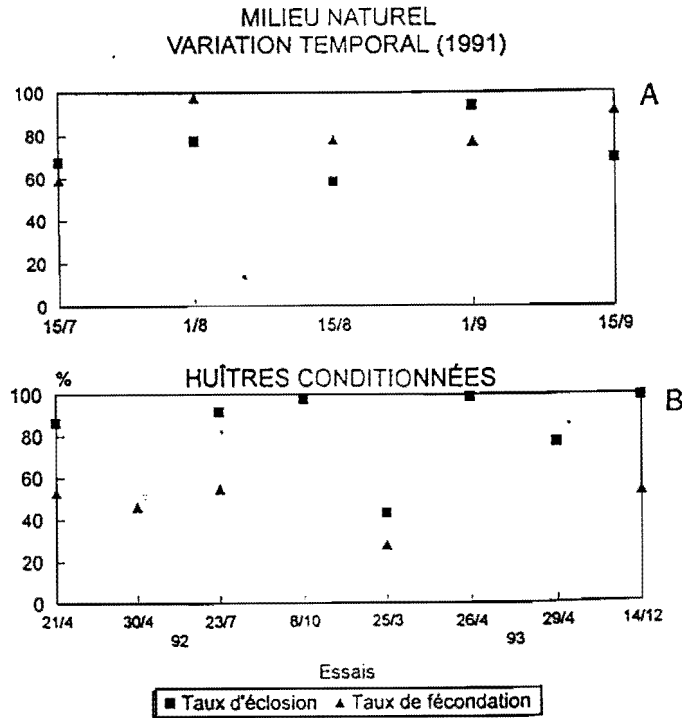
En ce qui concerne la comparaison du choc thermique avec la scarification de la gonade, les résultats obtenus par femelle et par essai sont présentés dans la Figure 2. Le taux de fécondation se situe, en général, au-dessus de 80% à l'exception d'une femelle scarifiée au mois d'avril. En général, le taux d'éclosion présente une variabilité très importante. Ce paramètre tend à être supérieur en utilisant le choc thermique par rapport à la scarification aux mois d'avril (CT-72.5%, SC-12.4%) et mai (CT-59.8%, SC-18.3%), tandis qu'aux autres mois on n'observe pas cette tendance. Un test statistique ANOVA (3 entrées) appliqué aux données, organisé pour deux époques (printemps et été) a montré qu'il y a des différences significatives entre femelles, entre essais et entre méthodes ( $p < 0.05$ ). L'éclosion des anormaux varie entre 0% et 21% à l'exception d'une femelle scarifiée au mois de Mai.

La Figure 3 montre les résultats obtenus avec induction par choc thermique, induction par la sérotonine et scarification de la gonade. Au niveau du taux de fécondation il n'y a pas de différence entre les trois méthodes tandis que pour le taux d'éclosion le choc thermique tend à montrer les meilleurs résultats (55.6%), suivi par la scarification (37.2%) et par la sérotonine (21.9%). Le test ANOVA (3 entrées) a aussi montré qu'il existe des différences significatives entre femelles, entre essais et entre méthodes ( $p < 0.05$ ). Le taux d'éclosion des anormaux ne présente une variabilité que pour l'induction hormonale.





**Figure 4.** Pourcentage d'huîtres ayant répondu à la stimulation nombre d'ovocytes émis. A - Huîtres sauvages (1991); B - Huîtres conditionnées (1991, 1992, 1993).



**Figure 5.** Taux de fécondation et d'écllosion des larves des huîtres sauvages (A) et des huîtres conditionnées (B).

### 3.1.2. L'effet des paramètres d'induction, de fécondation et d'incubation sur le taux de fécondation et d'éclosion

En tenant compte de la diversité des variables qui intervient depuis la ponte jusqu'à l'éclosion on a eu l'objectif de les fixer.

Les corrélations obtenues entre les paramètres étudiés et le pourcentage d'huîtres ayant émis et le taux de fécondation et d'éclosion sont présentées dans le Tableau 1.

**Tableau 1.** Corrélations obtenues entre les variables de la ponte et de l'incubation et les paramètres - pourcentage de réponse des huîtres et taux de fécondation et d'éclosion. NS - non significatif; (\*)  $0.10 < P < 0.05$ ; (\*\*)  $0.05 < P < 0.02$ ; (\*\*\*)  $0.02 < P < 0.01$ ; (\*\*\*\*)  $P > 0.01$ .

	% Huîtres ayant émi	Taux de fécondation	Taux d'éclosion
Température d'induction	$r = 0.5265$ ** n = 16	$r = 0.2089$ NS n = 12	$r = - 0.5971$ ** n = 14
Température de fécondation	—	$r = - 0.6255$ NS n = 7	$r = - 0.4006$ NS n = 7
Délai émission/ fécondation	—	$r = - 0.4513$ * n = 15	$r = - 0.8105$ **** n = 17
Température d'incubation	—	—	$r = - 0.6623$ *** n = 13

Parmi les variables testées on observe qu'au niveau du taux de fécondation on ne trouve qu'une corrélation faiblement significative ( $r = - 0.4513$ ,  $0.10 < P < 0.05$ ) avec le délai émission des ovocytes/fécondation. Cependant le délai émission des ovocytes/fécondation, la température d'incubation et la température d'induction sont tous corrélés négativement avec la survie des larves D.

### 3.2. Comparaison des caractéristiques de la ponte des huîtres sauvages et des huîtres conditionnées

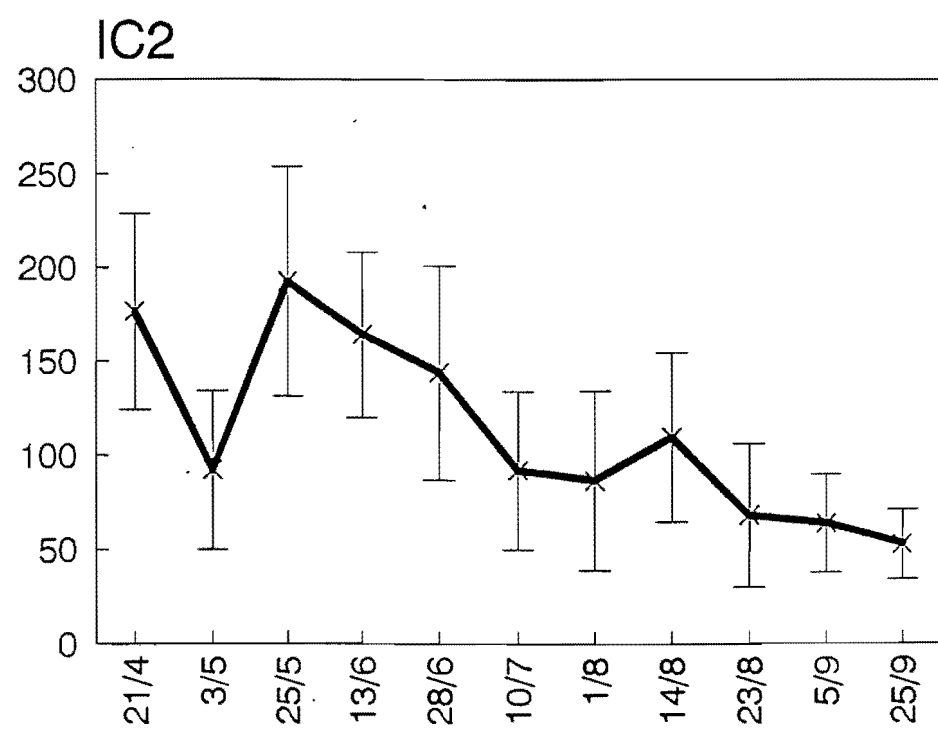
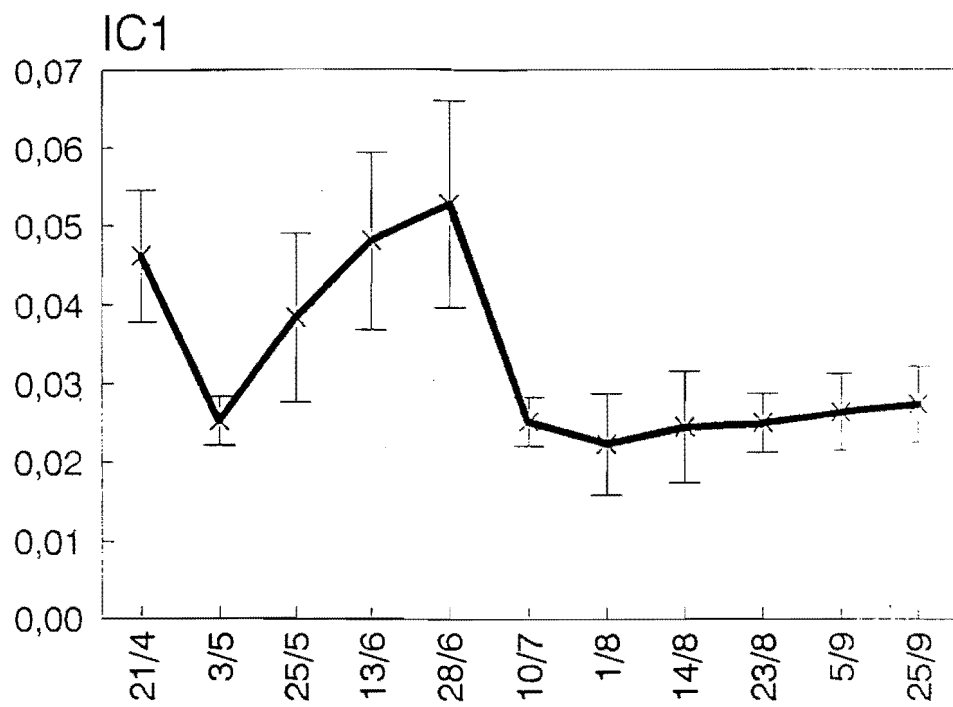
En ce qui concerne le comportement des huîtres sauvages pendant l'été 1991 (Figure 4.A) on peut observer que le nombre d'ovocytes émis présente deux maxima, le 15 juillet ( $12.2 \cdot 10^6$ ) et pendant la deuxième quinzaine d'août ( $11.5 \cdot 10^6$ ). Le pourcentage d'huîtres ayant émis suit la même tendance.

La fécondité des huîtres conditionnées (Figure 4.B) présente une variabilité importante selon l'époque de l'année. Les meilleurs résultats ont été obtenus en Juin et Juillet et les plus mauvais en Décembre. Dans ce cas, le pourcentage d'animaux ayant émi n'est pas corrélé avec le nombre d'ovocytes émis.

Les taux de fécondation et d'éclosion des larves des géniteurs sauvages et conditionnés (Figure 5 A et B) montrent aussi des différences. En général, le taux d'éclosion des larves des géniteurs conditionnés est supérieur à celui des larves des huîtres sauvages. Le taux de fécondation se comporte de façon inverse.

### 3.3. Condition des géniteurs et évaluation de la qualité des ovocytes émis pendant une saison de ponte (printemps/été 1995)

La condition des géniteurs a été évaluée par la variation des indices de condition ( $IC_1$  et  $IC_2$ ) et du diamètre moyen des ovocytes pris dans gonade (Figure 6). Les deux indices ne varient pas de la même façon. Une décroissance au mois de Mai est commune, cependant l' $IC_1$  montre un maximum durant Juin tandis que l' $IC_2$  présente un maximum au mois de Mai et un autre,



**Figure 6.** Variation des indices de condition pendant le printemps/été 1995.

moins net, en milieu Août. Les variations de l'IC<sub>2</sub>, du diamètre des ovocytes (Figure 7), du pourcentage d'huîtres ayant émi (Figure 8) et du nombre d'ovocytes émis (Figure 9) suivent la même tendance - trois périodes d'activité de ponte plus intense : avril, juin et août. La qualité des ovocytes a été évaluée à partir de la survie des larves D (Figure 10), laquelle décroît pendant la période des essais. Le taux d'éclosion des anormaux augmente légèrement à partir de juillet. Le taux de fécondation présente une seule valeur au-dessous de 80% en début mai.

#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSION

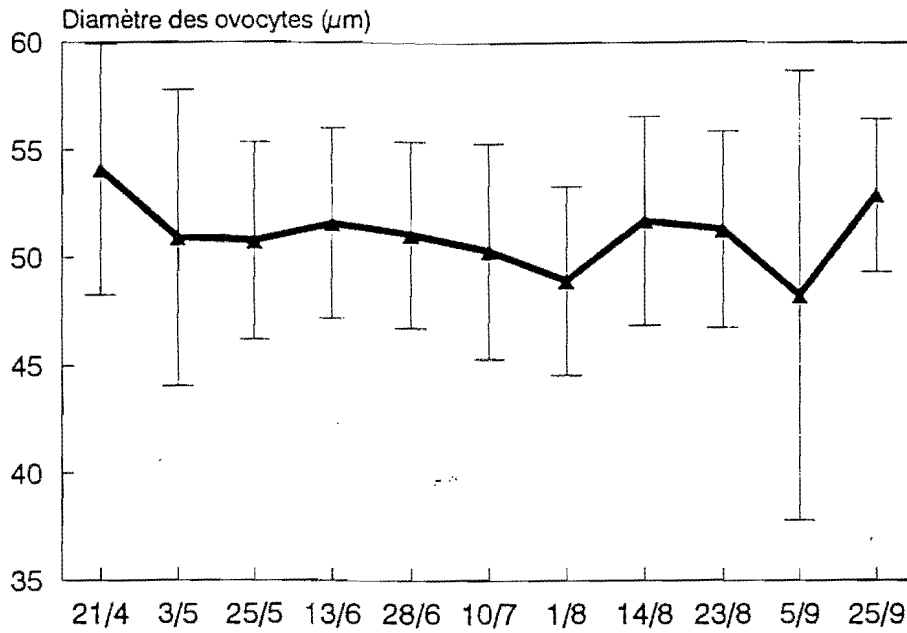
En ce qui concerne l'induction de la ponte des bivalves, plusieurs méthodes ont été utilisées - Le Pennec (1981), Gibbons et Castagna (1984), Widowatti *et al.* (1992)-, bien que les mécanismes qui contrôlent l'émission des gamètes ne soient pas encore connus.

La comparaison des trois méthodes essayées a montré que le taux de fécondation n'a pas présenté une dispersion importante. Cette tendance a été déjà montrée par Le Pennec (1981) en utilisant la stimulation thermique pour plusieurs espèces de bivalves. Ces résultats montrent que la fécondation est plutôt dépendante de la qualité des spermatozoïdes et de la juste proportion spermatozoïdes/ovocytes que de la méthode d'induction. Par contre, le taux d'éclosion a présenté pour toutes les méthodes une variabilité significative, soit entre femelles, soit entre méthodes et soit entre essais. Bien que les géniteurs aient été dans une période de maturation sexuelle pendant les essais (avril, mai, juin et août), ces résultats semblent être rapportés à l'état des animaux quand on fait l'induction ce qui est aussi exprimé par l'hétérogénéité des ovocytes qu'on trouve dans une même gonade. Cet argument est valide pour toutes les méthodes une fois que l'huître peut émettre des ovocytes immatures (en poire), lesquels sont fécondables. La variation, entre méthodes, du taux des anormaux n'a pas aussi montré des différences importantes et, en général, présente des valeurs basses. En résumé, étant donné que la variabilité de la survie larvaire est plutôt dépendante de l'état des géniteurs que de la méthode d'induction, on suggère l'utilisation du choc thermique pour des fins de production et la scarification de la gonade ou l'induction par la sérotonine pour des fins de recherche.

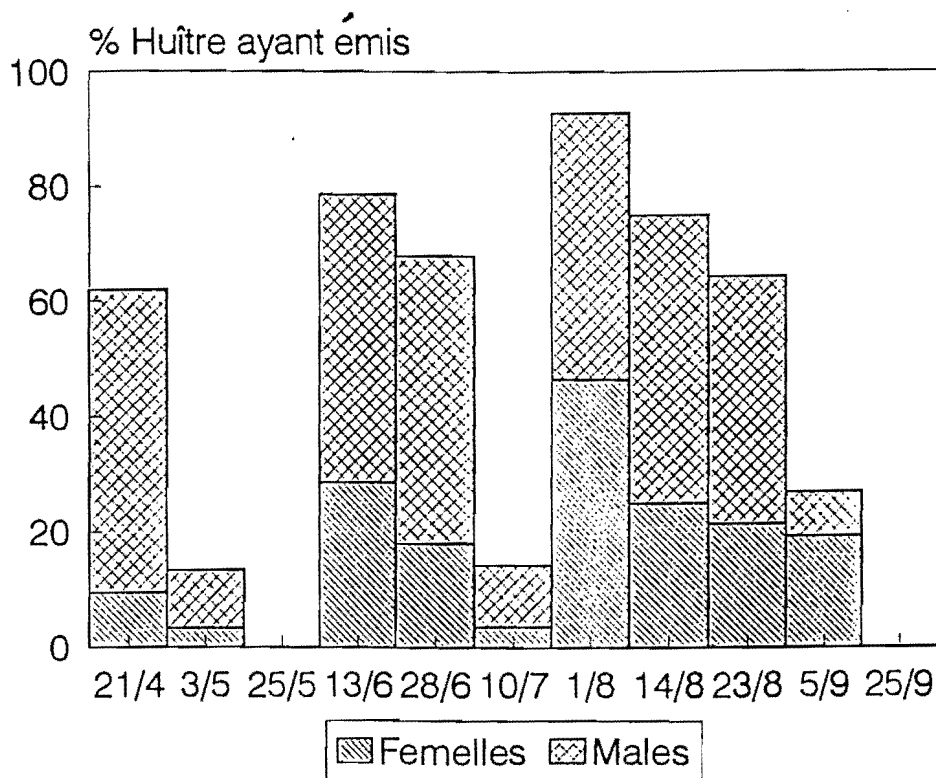
Etant donné que les aspects méthodologiques de la production de bivalves jouent un rôle très important au niveau de la survie larvaire, dans ce travail on a fixé quelques variables - la température d'induction : 30°C, la température de fécondation : 28°C, le délai entre l'émission des ovocytes et la fécondation : 60 minutes et la température d'incubation : 20±2°C.

Ces conclusions résultent, d'une part, des résultats obtenus et, d'autre part, de la pratique. Une seule et faible corrélation trouvée entre les variables étudiées et le taux de fécondation met en évidence encore une fois l'importance de la qualité du sperme (mobilité).

Les variations des résultats concernant le nombre d'ovocytes obtenus et le pourcentage d'émission des huîtres sauvages pendant 1991 confirment le caractère d'émetteur partiel de cette espèce. Les essais effectués avec les huîtres conditionnées montrent l'existence d'une variabilité importante au niveau de la fécondité des femelles selon l'époque de l'année. Ce comportement doit être rapporté à l'état des huîtres en début de conditionnement. Ces résultats tendent aussi à indiquer que les huîtres ont besoin d'avoir une période de repos sexuel. La fécondité des huîtres conditionnées peut réussir avec des quantités d'ovocytes comparativement supérieures à celles des huîtres sauvages ce qui selon Devauchelle (1990), en étudiant la palourde, est directement corrélé avec la quantité de nourriture. D'autre part, les larves D provenant des huîtres conditionnées tendent à présenter une meilleure viabilité que celle des huîtres sauvages. Le taux de fécondation se comporte de façon inverse, en faisant



**Figure 7.** Variation du diamètre moyen des ovocytes pendant le printemps/été 1995.



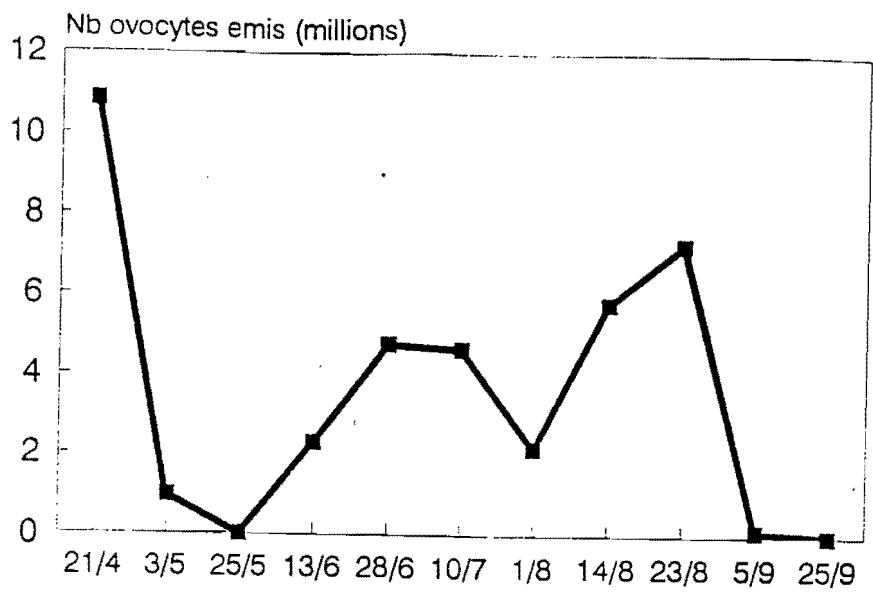
**Figure 8.** Variation du pourcentage d'huître ayant émi pendant le printemps/été 1995.

penser que la qualité du sperme est meilleure dans les huîtres sauvages que dans les huîtres conditionnées ou alors que, en conditions contrôlées, la maturation des mâles et des femelles n'est pas synchronisée.

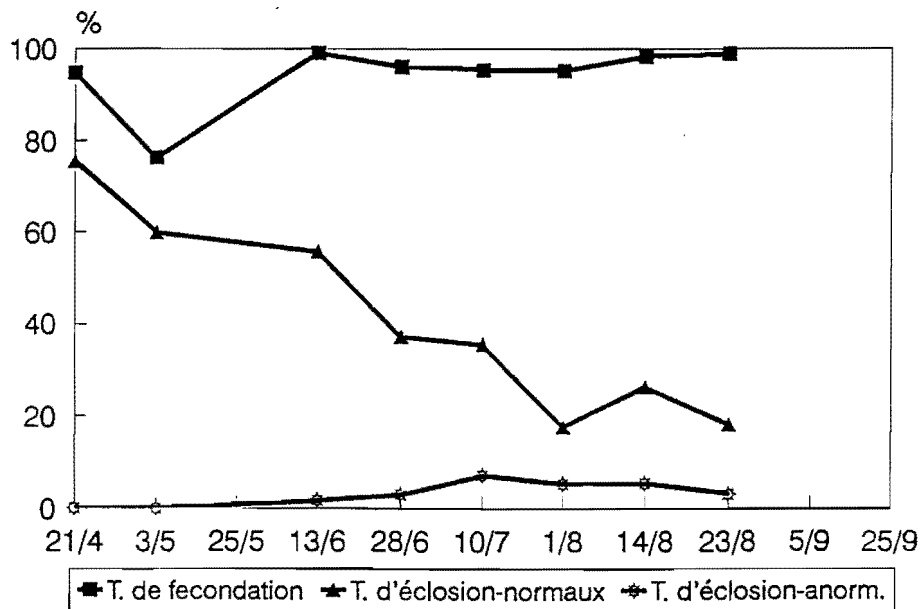
L'étude effectuée durant 1995 a montré l'existence de trois périodes de plus intense activité de ponte: avril, juin et août. Ces résultats autant que ceux de 1991 rappellent de nouveau la dynamique de la production des gamètes de cette espèce. La qualité des ovocytes pendant la période de ponte 1995 présente son maximum au début de la saison.

## Références

- Barre D. P. G., 1981.** Implantation de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le bassin de Marennes-Oléron. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. 159 p.
- Biocca E. et F. Matta, 1982.** *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), synonyme de *Crassostrea gigas* (Phunberg, 1793): études morphologiques et génétiques. *Parasitologie*. Vol XXIV, 2,3 : 211-222.
- Devauchelle N., 1990.** Sexual development and maturity of *Tapes philippinarum*. In : *Tapes philippinarum* : Biologia e Sperimentazione. E.S.A.V., Trieste : 49-62.
- FAO. 1987.** Végétaux et invertébrés en Méditerranée et Mer Noire, Zone de Pêche 37, Révision 1. Vol. 1. Rome. : 500-509.
- Gibbons and Castagna, 1984.** Serotonin as an induce of spawning in six bivalve species. *Aquaculture*. 40 : 189-191.
- Le Pennec M., 1981.** Les méthodes expérimentales induisant la ponte chez les mollusques bivalves marins. *Haliotis*. 11 : 139-155.
- Quayle D.B., 1951.** The seasonal growth of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ladysmith Harbour. B. C. Prov. Dept. Fish. Annu. Rep. : 85-90.
- Vieira A. and M.J. Schuller, 1989.** Laboratório de Moluscicultura de Olhão - Esquema de funcionamento e produção. *Relatório Interno do INIP* (não publicado).
- Vilela H. 1972.** A respeito de ostras. Biologia-Exploração-Salubridade. *Crassostrea angulata* (Lamarck) em especial. Parte II Biologia (A Ostra Portuguesa). Ed. *Orbis Ilustrações Lda*. 101p.
- Walne P. R. and R. Mann, 1975.** Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. In : *Proc. Ninth Europ. Mar. Biol. Symp.*, edited by Barnes. Aberdeen University Press. Aberdeen : 587-607.
- Widowatti I., J.C. Cochard, G. Dorange et M. Le Pennec, 1992.** Etude expérimentale de la maturation ovocytaire chez *Pecten maximus* et *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Actes des colloques Société Française de Malacologie*. 13 : 47-56.



**Figure 9.** Variation du nombre d'ovocytes émis pendant le printemps/été 1995.



**Figure 10.** Variation du taux de fécondation et du taux d'éclosion des larves pendant le printemps/été 1995.

## CONTROLE DE LA GAMETOGENESE CHEZ LA COQUILLE SAINT-JACQUES

### Température et photopériode

**J. BARRET ET N. DEVAUCHELLE**

*IFREMER, Laboratoire de Physiologie des Mollusques, B.P. 70, 29 280 Plouzané (F)*

**Résumé :** *Les études sur la reproduction des coquilles St-Jacques dans le milieu naturel ont montré que des facteurs externes intervenaient sur la gamétogenèse principalement, la température, la photopériode et la nourriture :*

- *la température peut accélérer ou inhiber la gamétogenèse,*
- *la photopériode a un rôle de déclencheur de la gamétogenèse.*

*Après une période au cours de laquelle on se contentait de prélever les géniteurs dans le milieu et de stimuler la ponte, les écloséries ont conditionné les géniteurs en intervenant sur la température et la photopériode, tout en assurant une nourriture en quantité. Ceci a permis d'obtenir des pontes décalées par rapport au cycle naturel.*

*Le standard actuel pour **Pecten maximus** « température 13°5, photopériode croissante: +2mn/jour » autorise, après 2 mois de conditionnement, la stimulation des pontes par choc thermique. Les résultats obtenus sont corrects pendant le premier semestre.*

*La stratégie d'élevage « disponibilité des installations d'élevage post-larvaire et du matériel de pré-élevage (de 2 à 25/30 mm) demande des pontes plus tardives, dites estivales. De nouveaux protocoles sont en cours d'étude.*

*L'avenir de la conchyliculture passera par les écloséries (souches sélectionnées, nouvelles espèces...). Ceci nécessitera une gestion pluriannuelle des stocks de géniteurs et des méthodes fiables pour gérer ces populations. Pourquoi ne pas s'inspirer des protocoles utilisés pour d'autres groupes d'espèces (poissons, crustacés) et assurer un décalage artificiel en inversant les conditions de température et de photopériode ?*

## INTRODUCTION

De nombreux travaux effectués sur les mollusques bivalves tendent à montrer que la reproduction est soumise à l'influence de facteurs internes - âge, morphologie, taux de croissance antérieur au développement des gonades, état sanitaire, hérédité...- et de facteurs externes pouvant être regroupés en quatre rubriques :

- caractères physico-chimiques du milieu
  - température, salinité, pH, profondeur, turbidité, particules dissoutes
- nourriture au plan quantitatif et qualitatif
  - phytoplancton, matière organique présente
- influence de la lumière
  - photopériode, phase lunaire, intensité lumineuse
- mécaniques.
  - chocs, action des vagues...

Pour certaines espèces, il a été démontré que les facteurs externes agissent sur la reproduction via l'émission dans les ganglions nerveux de neuropeptides et de neurohormones (Fig. 1) Des « feedbacks » assurent la liaison entre la gamétogenèse et les cellules neurosecrétices (Lubet, 1959 ; Sastry, 1975).



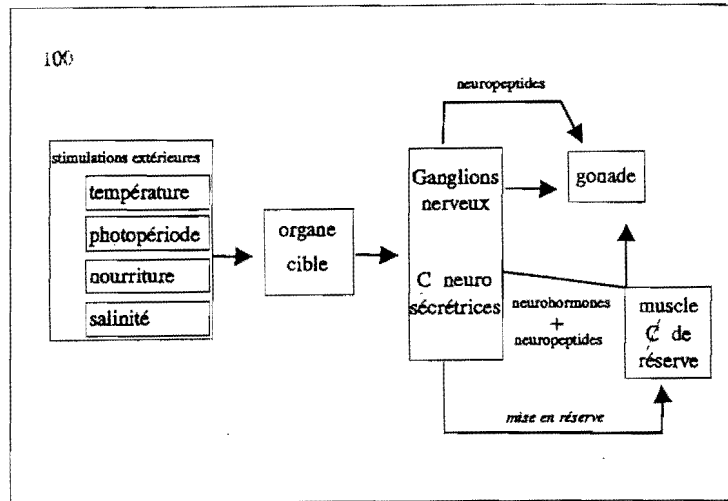


Figure 1. Diagramme schématique du contrôle de la reproduction des bivalves

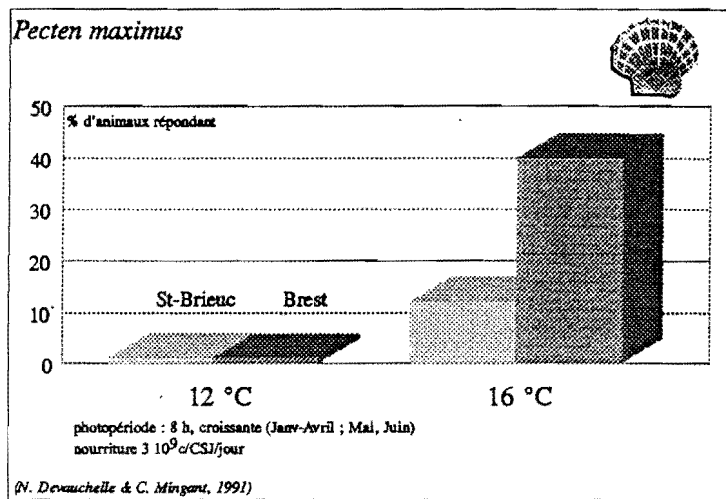


Figure 2. Effet de la température sur la gamétogenèse chez *Pecten maximus*, comparaison des souches brestoïse et briochine.

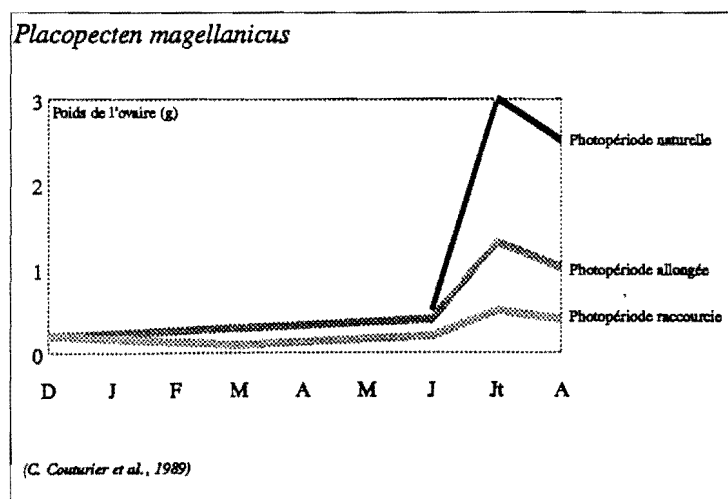


Figure 3. Effet de la photopériode sur la gamétogenèse chez *Placopecten magellanicus*

Parmi les facteurs externes, trois ont une action prépondérante : la température, la nourriture et la photopériode. Nous nous intéresserons à l'effet de la température et de la photopériode. Une synthèse de leurs effets sur la reproduction des bivalves a été faite en 1984 par Mackie.

En ce qui concerne les bivalves intéressant la conchyliculture, Lubet (1980) a montré que la température a une action sur le déclenchement de la gamétogenèse chez *Crassostrea gigas*; Marteil (1976) lie le début de la gamétogenèse chez *Ostrea edulis* à un seuil de température; de même, pour les moules, *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* (Marteil, 1976; Lubet et Aloui, 1987). L'influence de la photopériode sur ces espèces n'est pas démontrée.

Qu'en est-il pour les pectinidés, et plus particulièrement pour *Pecten maximus* ?

## **I. EFFETS DE LA TEMPERATURE ET DE LA PHOTOPERIODE SUR LA REPRODUCTION DES PECTINIDES DANS LE MILIEU NATUREL**

Barber et Blake (1991) ont fait une revue des actions de la température et de la lumière sur la reproduction des pectinidés. Selon eux, le facteur le plus important est la température.

Si de nombreux pectinidés, *Placopecten magellanicus*, *Pecten novaezelandiae*, *Patinopecten yessoensis* ont un début de gamétogenèse coïncidant au minimum de la température, le développement gonadique est lié à l'augmentation de la température.

D'autres pectinidés ont besoin que la température atteigne un seuil pour déclencher la gamétogenèse. C'est le cas de certaines populations d'*Argopecten irradians*.

*Amusium balloti*, *Argopecten purpuratus* calent le début de la gamétogenèse sur le maximum de température.

La conclusion de ces auteurs est que la relation entre l'induction et la durée de la gamétogenèse et la température de l'eau est caractéristique d'une population dans les conditions naturelles.

Chez *Pecten maximus*, la croissance de la gonade est corrélée aux variations saisonnières de la température (Hardy and Walford, 1994. Paulet et Boucher (1991), ont étudié dans le cadre du PNDR -Programme National du Déterminisme du Développement- les coquilles St-Jacques de la Baie de St-Brieuc; ils concluent que le cycle de reproduction est lié au cycle annuel de la température. Pour les coquilles de la Rade de Brest, Paulet *et al.* (1995) écrivent : « La température du milieu, si elle agit sur le processus reproducteur, ne le fait pas de manière simple et continue, mais avec différentes modalités selon la fenêtre temporelle considérée. .. »

Le rôle de la photopériode est moins bien évalué en zone tempérée. Lucas (1965) constate que la gamétogenèse chez *Chlamys varia* débute en mars, et cesse en septembre, ce qui correspond à une période où la durée du jour est supérieure à 12 heures,

Tous les auteurs lient l'action de ces deux facteurs à la nourriture, le développement du phytoplancton étant directement lié à la lumière, et à la température.

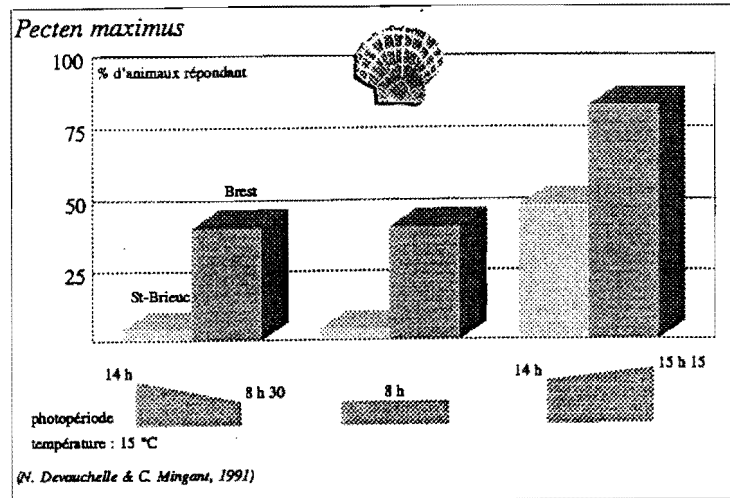


Figure 4. Effet de la photopériode sur la gamétogenèse chez *Pecten maximus*.

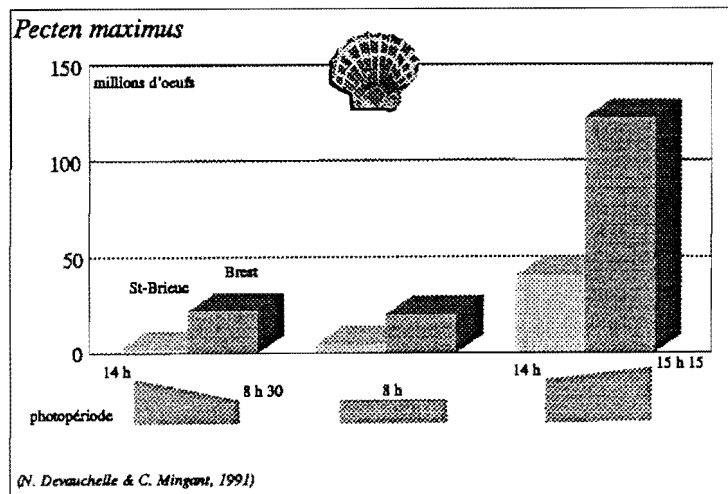


Figure 5. Effet de la photopériode sur le nombre d'oeufs pondus chez *Pecten maximus*.

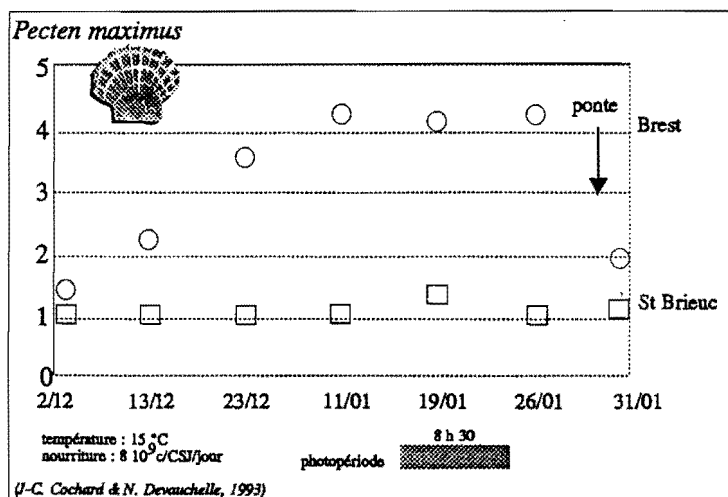


Figure 6. Effet de la photopériode sur l'évolution de l'indice gonadique chez *Pecten maximus*.

## II. MISE EN EVIDENCE EXPERIMENTALE DES EFFETS DE LA TEMPERATURE ET DE LA PHOTOPERIODE SUR LA REPRODUCTION DE PLUSIEURS PECTINIDES.

### Température

Lucas (1965) maintient en aquarium chauffé à 17 °C un lot de pétoncle *Chlamys varia*, en novembre et décembre. Quelques animaux présentent, après 50 jours, un début de gamétogenèse, alors que les animaux prélevés dans le milieu naturel (T décroissante de 11 à 8 °C sur la même période) ont leurs gonades complètement vides. Il démontre ainsi un effet déclencheur de la température sur la gamétogenèse, et confirme des résultats obtenus chez *Argopecten irradians*.

Devauchelle et Mingant (1991) ont travaillé sur deux populations distinctes de coquilles St-Jacques. L'une, issue de la baie de St-Brieuc présente un repos sexuel marqué en hiver, et un synchronisme fort, la seconde provenant de la rade de Brest est caractérisée par un asynchronisme et une absence de repos sexuel marqué. Ces auteurs ont soumis deux lots de coquilles briochines et brestoises en hiver, à deux températures 12 et 16 °C. Après une période de deux mois, les lots à 16 °C répondent à une stimulation (Fig. 2). Les coquilles brestoises montrent à 16°C une accélération de la gamétogenèse, tandis que les briochines, en repos sexuel à cette époque, déclenchent le processus de gamétogenèse. Les coupes histologiques de la gonade confirment les observations *in vivo*. Ainsi, les rôles déclencheur et accélérateur de la température sont démontrés pour la gamétogenèse de *Pecten maximus*.

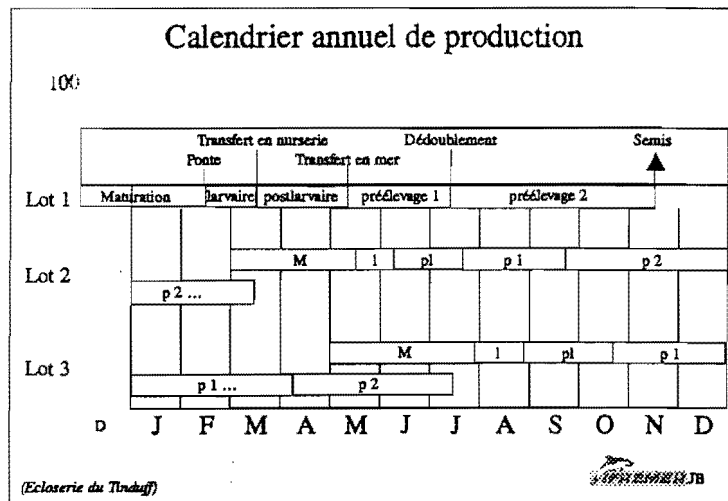
Par ailleurs, le déclenchement des pontes des coquilles St-Jacques est obtenu en éclosérie en leur faisant subir un choc thermique brutal, de quelques degrés, ce en augmentant ou en diminuant la température.

### Photopériode

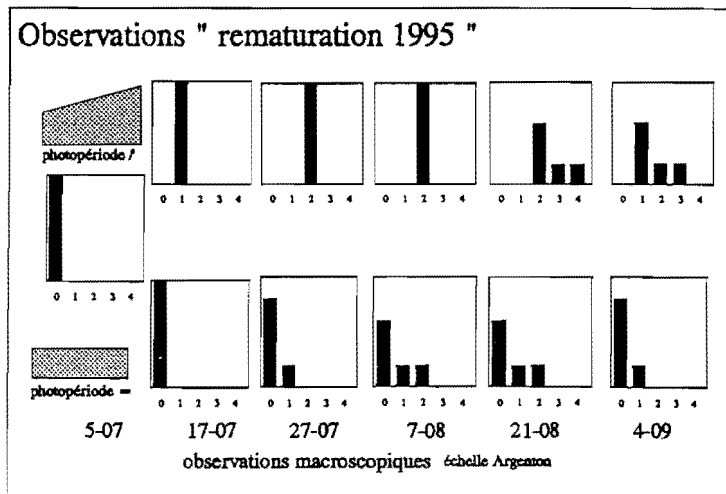
Lucas (1965) a mis en évidence l'effet de la photopériode sur la gamétogenèse de *Chlamys varia*, en isolant un lot de pétoncle de la lumière naturelle durant le premier semestre. Ce lot présente en fin d'expérience un retard significatif du développement des gonades par rapport au lot recevant la lumière naturelle. Lucas (1965) montre ainsi le rôle accélérateur d'une photopériode croissante (janvier-mai).

Couturier et Aiken (1989) montrent que des *Placopecten magellanicus* soumises à une photopériode courte ont peu d'ovocytes en prévitellogenèse, et donc une fécondité réduite par rapport à des coquilles soumises à une photopériode longue, pendant le premier semestre (Fig. 3).

Devauchelle et Mingant (1991), soumettent des lots de coquilles St-Jacques briochines et brestoises à différentes photopériodes, avec une température de conditionnement constante (15 °C). Les résultats (Fig. 4) montrent qu'une photopériode croissante a un effet positif quelle que soit l'origine des coquilles. Elle entraîne une accélération de la gamétogenèse pour les coquilles brestoises, et une initiation de la gamétogenèse (mitoses goniales) chez les coquilles briochines qui sont alors en repos sexuel -expérience menée en janvier et février-. Le nombre d'oeufs émis corrobore ces résultats (Fig. 5)



**Figure 7.** Calendrier annuel des trois productions de coquille saint-Jacques du conditionnement au semis.



**Figure 8.** Evolution de l'indice gonadique de coquilles st-Jacques soumises à deux photopériodes différentes, après avoir provoqué une ponte de vidange, par effet de la température.

Deux lots de *Pecten maximus* (St-Brieuc et Brest) soumis en décembre et janvier à une photopériode courte et constante, ont une évolution de l'indice gonadique différente (Fig. 6). Les brestoises, dont la gamétogenèse avait déjà démarré, ont une évolution positive de cet indice, tandis que les briochines, en repos sexuel en décembre, ne présente pas d'évolution (Cochard et Devauchelle, 1993).

Il a donc été démontré expérimentalement que la température et la photopériode ont des effets sur la gamétogenèse des pectinidés, et particulièrement de *Pecten maximus* :

- la température peut accélérer ou inhiber la gamétogenèse,
- la photopériode a un rôle de déclencheur de la gamétogenèse.

### III. APPLICATIONS AU CONDITIONNEMENT DES GENITEURS EN ECLOSERIE

Si, dans un premier temps, les écloséries travaillant avec des coquilles brestoises, prélevaient des géniteurs matures, se contentaient de stimuler la ponte et obtenaient des résultats suffisants pour les besoins, bien vite, ces besoins augmentant, il a fallu les rendre indépendantes des cycles de reproduction naturelle.

Un standard de conditionnement basé sur les expériences décrites ci-dessus, est appliqué température constante de 14-15 °C, photopériode croissante + 2mn/jour (et nourriture correcte)- à des géniteurs rentrés en novembre et en janvier. Les pontes obtenues sont satisfaisantes pour le premier semestre.

Cependant, une gestion correcte des installations de l'écloserie et du site de pré-élevage nécessite de lancer une troisième production en été (Fig. 7). Si quelques coquilles pondent naturellement en cette période, le prélèvement de géniteurs matures dans la rade ne permet plus depuis quelques années d'assurer cette production. Il devient nécessaire de conditionner en été, les coquilles afin d'obtenir des pontes dites automnales. Deux voies sont actuellement explorées :

- la mise en « dormance » de géniteurs prélevés en début d'hiver (travaux relatés dans d'autres contributions),
- la rematuration de géniteurs, après une vidange.

Dobrovick (1994) a mis des coquilles St-Jacques (brestoises) en conditionnement, en augmentant la température jusqu'à 22 °C, pendant deux semaines, puis en les mettant en conditions standard ; une ponte a été obtenue après 15 jours à 22 °C, ponte de vidange, puis l'auteur a constaté une reprise de la gamétogenèse, plus rapide pour les animaux soumis à une photopériode croissante.

Nous avons, en 1995 repris cette expérience. Des géniteurs ont été soumis dans un premier temps à une température de 20 °C, et une ponte a été obtenue. Le stade (observation macroscopique) de toutes les coquilles correspondait alors au stade I - échelle définie par Cochard et Devauchelle, 1993-. Deux lots, avec replica ont été constitués, le premier soumis à une photopériode croissante (14 h + 2 mn/jour), et l'autre à une photopériode constante de 14 h, la température étant fixée à 14 °C.

L'évolution de l'indice macroscopique des gonades (Fig. 8) montre une reprise de la gamétogenèse pour tous les lots, mais avec un synchronisme total pour le lot soumis à une

photopériode croissante. Des problèmes zootechniques (augmentation incontrôlable de la température) a entraîné des régressions. Les études histologiques sont en cours, et devraient confirmer cette régression.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les différentes expériences conduites par l'IFREMER, ont permis de démontrer les rôles de la température et de la photopériode sur la gamétogenèse de *Pecten maximus* :

- la température peut initier ou inhiber la gamétogenèse,
- la photopériode a un rôle de déclencheur de la gamétogenèse.

Cependant, les résultats obtenus en conditionnant les coquilles St-Jacques en appliquant le standard, sont toujours inférieurs à ceux observés dans le milieu naturel. Ceci s'expliquant principalement par l'effet d'un autre facteur externe qui est la nourriture.

Quel que soit le modèle utilisé (huître, moule ou autre bivalve), un décalage des pontes par rapport au cycle naturel demandera de :

- disposer d'installations expérimentales fiables,
- savoir mettre et maintenir les animaux en repos sexuel,
- disposer de méthodes fiables d'estimation des stades
- adapter l'alimentation (rythme et régime).

Il sera alors possible d'envisager une gestion à plus long terme des stocks de géniteurs, rendue indispensable dans le cadre des sélections génétiques, et également de jouer sur le décalage des pontes, en inversant les conditions de température et de lumière.

## Références.

- Barber B.J. and N.J. Blake, 1991.** Reproductive physiology. *In* Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture. S.E. Shumway (ed.) Elsevier : 377-428
- Cochard J.C. and N. Devauchelle, 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.* **169** : 41-56
- Couturier S. and D.E. Aiken, 1989.** Possible role of photoperiod in sea scallop reproduction. *C.R. Ass. Ann. Assoc. Agri. Canada*, **3** : 65-67
- Devauchelle N. and C. Mingant, 1991.** Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.*, **4** : 41-51.
- Doubovick N., 1994.** Contribution à l'amélioration de la reproduction de la coquille St-Jacques *Pecten maximus*. Mémoire Ingénieur des techniques agricoles, ENITA Bordeaux 63p.
- Hardy D. and A. Walford, 1994.** The biology of scallop farming. Aquaculture support. 214 p
- Lubet P., 1959.** Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **23** : 389-548.
- Lubet P., 1980.** Influence des facteurs externes sur la reproduction des lamellibranches. *Oceanis* **6(5)** : 469-489.

- Lubet P. et N. Aloui, 1987.** Limites léthales thermiques et action de la température sur la gamétogenèse et l'activité neurosécrétoire chez la moule (*M. edulis* et *M. galloprovincialis*), mollusque bivalve. *Haliotis*, **16** : 309-316.
- Lucas A., 1965.** Recherche sur la sexualité des mollusques bivalves. Thèse Université des Sciences de Rennes. 135 pp.
- Mackie G.L., 1984.** Bivalves. In *The Mollusca* Vol. 7 ; Reproduction. A.S. Stompi, N.H. Verdon, J.A.M. Van den Bigeelaar (Eds.) Academic Press Inc. : 351-418.
- Marteil L., 1976.** La conchyliculture française II. Biologie de l'huître et de la moule. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* **18-1** : 7-130.
- Paulet Y.M. and J. Boucher, 1991.** Is reproduction mainly regulated by temperature or photoperiod in *Pecten maximus*? *Invertebrate Reproduction and Development*, **19(1)** : 61-70
- Paulet Y.M., F. Bekhadra, N. Devauchelle, A. Donval et G. Dorange, 1995.** Cycles saisonniers de reproduction et qualité des ovocytes chez *Pecten maximus* en Rade de Brest. Actes de Colloque (II) 3<sup>ème</sup> rencontres scientifiques internationales du Contrat de Baie de la Rade de Brest, 14-16 mars 1995. Brest, France 13 p.
- Sastry A.-N., 1975.** Physiology and ecology of reproduction in marine invertebrates. *In* : *Physiological Ecology of Estuarine Organisms*. (F.J. Vernberg ed.) Univ. of South Carolina press. Columbia : 279-299.





## NUTRITION ET REPRODUCTION DES BIVALVES

J.F. SAMAIN, C. SAOUT\*, P. SOUDANT, J.R. LE COZ, C. SEGUINEAU, C. QUERE,  
J.P. CONNAN, M. MAZURET, P. MINER, M.L. MUZELLEC\*\* Y. MARTY\*\*\*, J.  
MOAL, Y.M.PAULET\* ET R.ROBERT

*Laboratoire de physiologie des mollusques IFREMER Centre de Brest, BP 70, 29280  
Plouzané (F)*

*\*Laboratoire "Flux de matière et réponse du vivant", URA CNRS 1513, IUEM, UBO, BP452,  
29275 Brest. (F)*

*\*\*Ecloserie du Tinduff, 29 Plougastel-Daoulas (F)*

*\*\*\*Laboratoire de chimie marine, URA CNRS 322, UBO 29200 Brest (F)*

**Résumé :** *Une revue bibliographique concernant la nutrition des géniteurs des huîtres **C. gigas** et **O. edulis**, de la palourde **R. philippinarum**, et de plusieurs espèces de pectinidés, permet de faire le point sur les connaissances dans le domaine et d'identifier les questions qui ne sont pas encore bien résolues.*

*Les besoins quantitatifs de l'oeuf : l'énergie utilisée pour l'embryogénèse est variable selon les espèces et leur conditionnement : de l'ordre de 40 à 96% fournie par les lipides, 40% par les protéines et 7 à 10% par les sucres. Le stockage de cette énergie est obtenu avec des régimes de l'ordre de 3 à 6% d'algues (poids sec d'algues/poids sec de chair) pour les différentes espèces de bivalve, à leur optimum thermique. Chez la Coquille Saint-Jacques on peut orienter l'accumulation de réserves, soit vers le compartiment somatique, soit vers le compartiment germinal, en manipulant le couple température-photopériode.*

*La quantité des réserves lipidiques de l'oeuf est importante pour la survie et le développement larvaire, mais n'est pas suffisante. Plusieurs auteurs montrent que le nombre de larves produites et leur survie dépend aussi de la qualité lipidique de l'ovocyte. D'un point de vue qualitatif, le 20:5W3 de l'ovocyte aurait aussi un rôle énergétique car il est consommé intensivement pendant l'embryogénèse. Le 22:6W3 apparaît indispensable pour la reproduction et l'embryogénèse.*

*Pour préciser ces données, nous avons réalisé une étude sur la Coquille Saint-Jacques qui a permis de montrer le fort impact de la qualité en stérols et en PUFA de la nourriture des géniteurs, sur la composition des lipides de réserve et des membranes dans la gonade et les ovocytes. Des conséquences sur les performances de gamétogénèse et d'embryogénèse ont été observées. La rétention préférentielle du cholestérol et des acides gras 22:6W3, 20:5:W3 et 20:4W6 dans certains phospholipides des ovocytes, au cours de la gamétogénèse souligne leur essentialité. Ces mécanismes permettent d'approcher les besoins lipidiques des géniteurs. Enfin, une forte utilisation des réserves en vitamines des oeufs, durant l'embryogénèse souligne l'importance qu'il faudra accorder à ce nouvel aspect.*

## INTRODUCTION

Les relations entre la nutrition des géniteurs et les performances de reproduction ont été étudiées sous plusieurs aspects qui feront l'objet d'une analyse bibliographique complétée par des résultats originaux acquis par le laboratoire. Les différents aspects auxquels on s'intéressera sont les suivants : besoins en algues des géniteurs, modalités de transfert de l'énergie vers le compartiment somatique (manteau, muscle, glande digestive), ou le compartiment germinal, utilisation quantitative et qualitative des réserves de l'oeuf pour le développement larvaire, influence de la composition qualitative de la nourriture sur la composition des oeufs. Les critères d'appréciation de la qualité de la reproduction et du développement sont, outre la composition biochimique, l'indice somatique, l'indice

gonadique, la vitesse de gamétogénèse, la fécondité, le taux de fécondation, le taux de larves D, la survie et la croissance larvaire.

## 1. ASPECTS QUANTITATIF :

### 1.1 Besoins en algues des géniteurs

Le tableau 1 résume les données de la littérature sur le sujet. Les besoins varient selon les auteurs, en relation avec les espèces, mais surtout les conditions thermiques. Ces variations diminuent quand les conditions de maturation sont proches des conditions naturelles de reproduction. Les valeurs approchent alors un taux de 3 à 6% de poids sec d'algues par poids sec de chair de mollusque.

**Tableau 1.** Besoins en algues des géniteurs

ESPECES	pds sec algues/pds sec chair	REFERENCES
<i>C.gigas</i>	8mg/2 ans	Muranaka and Lannan 84
	sup 2%	Robinson 92 a, b, c
<i>O.edulis</i>	0.2 à 1%	Gabbot, Walker 71
	5,6%	Helm <i>et al.</i> 73
	3 à 9%	Utting 93
	3 à 7%	Millican , Helm 94
	inf 9%	Stephenson 73
<i>O.chiliensis</i>	sup 1.5%	Chaparro 90
<i>T.phillipinarum</i>	14%	Mann 79
	6%	Utting 93
	sup 3%	Leal 94
<i>P.maximus</i>	3%	Unpub. Conwy 95
	8%	Devauchelle et Mingant 91
MOYENNE	6%	Utting and Millican 95

La quantité de nourriture a un effet sur les réserves somatiques, le temps de maturation, sur la fécondité, le nombre de larves et de naissains produits, la viabilité pendant l'embryogénèse et le développement larvaire, mais aurait peu d'effet sur la croissance larvaire (un seul cas est rapporté, Utting 1993 pour l'huître plate).

En dessous de 6%, la matière organique du compartiment somatique peut décroître (de 30 à 50% pour *O.edulis* (Utting and Millican 1995), pendant la gamétogénèse. Autour de 6%, ce compartiment est peu affecté, au dessus de 6%, il peut s'enrichir en matière organique, parfois au détriment de la gamétogénèse (Stephenson, 1973).

### 1.2. Orientation du transfert :

Pour tester l'influence du couple température-photopériode sur le processus d'accumulation somatique et gonadique, deux expérimentations ont été menées en parallèle :

Des géniteurs de coquilles Saint Jacques prélevés en novembre ont été répartis en deux lots. L'un a été maintenu à 8°C et photopériode de 8 heures de jour, l'autre a été placé à 14°C et photopériode de 16 heures de jour.

Après trois mois de conditionnement en nourriture saturante, la partie somatique des animaux maintenus au froid présente un indice et une composition lipidique, protéique et glucidique significativement supérieure à celle des animaux conditionnés à 14°C. Inversement, la partie germinale présente un indice et une composition en lipides, protéines et glucides significativement inférieure à celle des animaux conditionnés à 14°C (Tableau 2). Le bilan énergétique montre que pour les animaux maintenus au froid, 81% de l'énergie s'accumule dans le compartiment somatique et 19% dans le compartiment germinale, alors que pour les animaux conditionnés à 14°C, 23% de l'énergie est accumulée dans le compartiment somatique et 77% dans le germinale. Le couple température photopériode contrôlerait donc l'orientation des flux énergétiques pour des animaux pris en début de cycle naturel. Il restera à vérifier que ce mécanisme est vrai à une autre période de l'année.

**Tableau 2.** Indices somatiques et gonadiques, lipides, protéines, glucides de la glande digestive (GD), du muscle (M) et de la gonade (en g par organe) après 3 mois de conditionnement selon deux protocoles du couple température photopériode : 8°C et 8h. de jour ou 14°C et 16h. de jour

Soma	Indice somatique	Lipides GD	Protéines GD	Sucres GD	Lipides M	Protéines M	sucres M
8°C et 8h de J j	12	.80	.60	.19	.28	3.5	2.0
14°C, 16h de J.	10	.55	.40	.12	.25	2.9	1.3

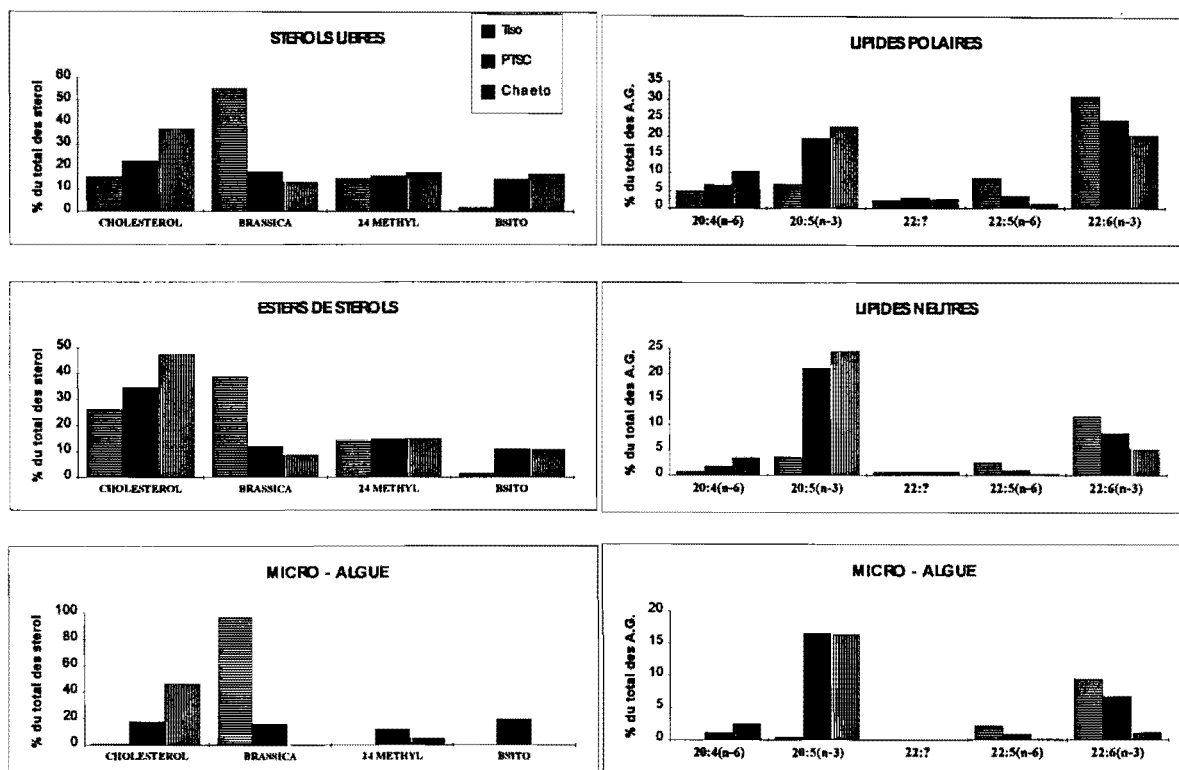
gonades femelles	Indice gonadique	Lipides	Protéines	Sucres
8°C et 8h de J.	2	.20	.7	.09
14°C, 16h de J.	4	.35	1.0	.14

### 1.3. Utilisation des réserves de l'oeuf pendant l'embryogénèse :

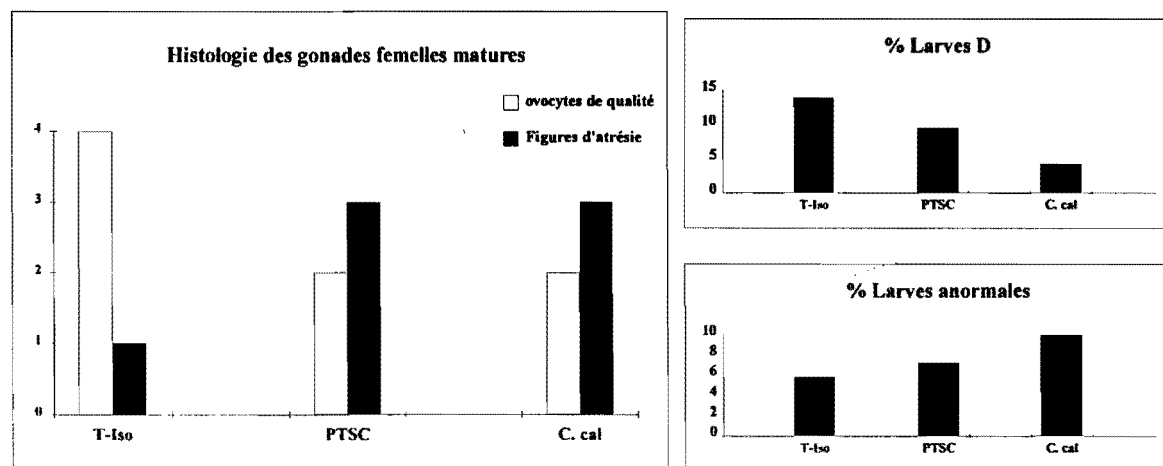
Selon les auteurs et les espèces, les réserves lipidiques et protéiques de l'oeuf sont mises majoritairement à contribution pendant l'embryogénèse (tableau 3). Ces réserves ont probablement un rôle énergétique et leur utilisation augmente avec des conditions défavorables pendant le développement. Leur utilisation augmente chez les triploïdes, et s'accroît quand les larves sont maintenues à jeûn ( Millar and Scott 1967, Gallager and Mann 1986, Utting and Doyou 1992, Utting 1993).

**Tableau 3.** Origine de l'énergie consommée pendant l'embryogénèse

ESPECES	LIPIDES	PROTEINES	SUCRES	REFERENCES
<i>C.virginica</i>	55 à 96%			Gallager et Mann 86
<i>M. mercenaria</i>	50 à 60%			idem
<i>O.edulis</i>	13 à 36%			Utting et Doyou 92
<i>P.yessoensis</i>	48%	45%	7.5%	Whyte <i>et al.</i> 91
<i>C.gigantea</i>	46%	43%	9.8%	Whyte <i>et al.</i> 90
<i>P.maximus</i>	0 à 60%	ND	ND	Delaunay <i>et al.</i> 92



**Figure 1.** Composition en sterols et acides gras des lipides neutres (réserves) et polaires (membranes) des gonades de géniteurs après 11 semaines de conditionnement avec les régimes *T.Iso*, *PTCS* et *Chaeto*. Composition correspondante des microalgues.



**Figure 2.** Histologie des gonades femelles, taux de formation de larves D et taux de larves D anormales, après un conditionnement de 11 semaines avec les trois régimes *T.Iso*, *PTCS* et *Chaeto*.

D'après la littérature, la quantité de lipides contenue dans les oeufs, est nécessaire, mais n'est pas suffisante pour assurer de bonnes performances larvaires (croissance, survie ; Tableau 4)

**Tableau 4.** Quantité de lipides des oeufs et développement larvaire

ESPECES	EFFET lipides des oeufs	REFERENCES
<i>P.maximus</i>	Quantité de lipides et taux d'éclosion	Devauchelle, Mingant 91
<i>O.edulis</i>	Quantité de lipides, croissance larvaire et métamorphose	Helm <i>et al.</i> 73
<i>C.virginica</i> , <i>M.mercenaria</i>	Quantité de lipides et survie larvaire et nombre de pédivéligères	Gallager et Mann 86
<i>C.virginica</i> <i>M.mercenaria</i>	- Pas de relation entre quantité de lipides et croissance larvaire. - Les quantités de lipides ne garantissent pas la survie larvaire	Gallager and Mann 86
<i>O.edulis</i>	idem	Gallager <i>et al.</i> 86
<i>P.maximus</i>	idem	Delaunay <i>et al.</i> 92

Si la quantité et la qualité du régime des géniteurs peuvent influencer la fécondité, il semble que la quantité de lipides des oeufs soit relativement régulée (tableau 5).

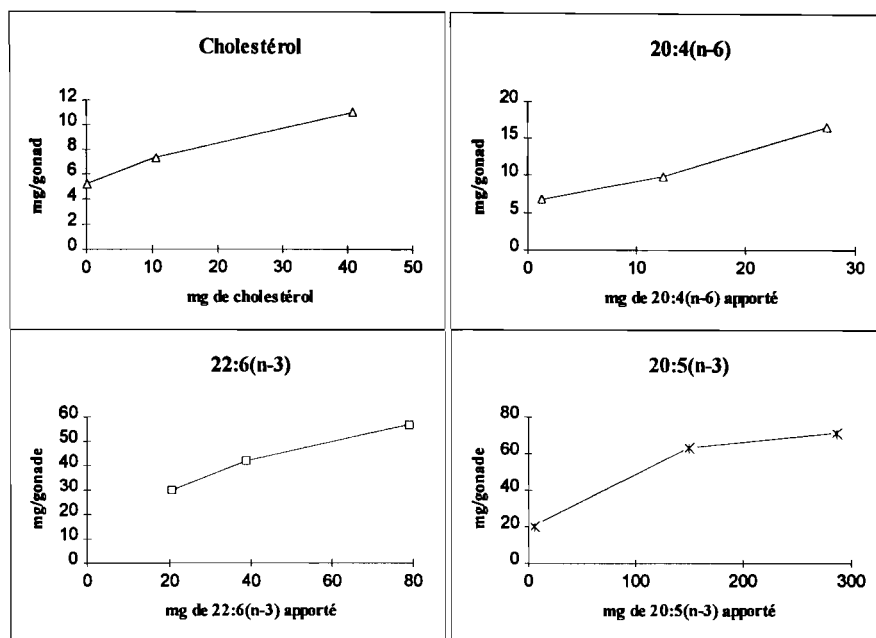
**Tableau 5.** Effet du régime de conditionnement sur la quantité de lipides dans les oeufs, la fécondité et la viabilité larvaire

ESPECES	EFFET du régime	REFERENCES
<i>O.edulis</i> <i>C.gigas</i> <i>T.philippinarum</i>	Pas de relation sur les lipides totaux des oeufs. Les lipides totaux des oeufs sont relativement régulés	Helm <i>et al.</i> 73 Muranaka and Lannan 84 Laing et Lopez-Alvaredo 94 Leal 94
<i>C.gigas</i>	Peut influencer la fécondité, mais pas la viabilité larvaire	Muranaka and Lannan 84

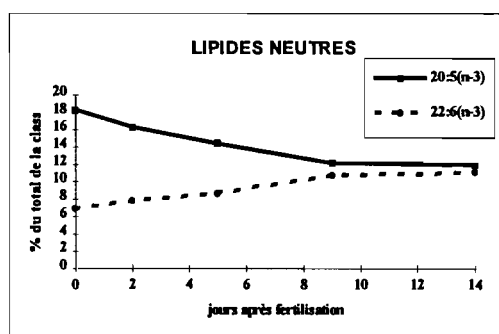
## 2. ASPECTS QUALITATIFS :

### 2.1. Qualité lipidique des oeufs

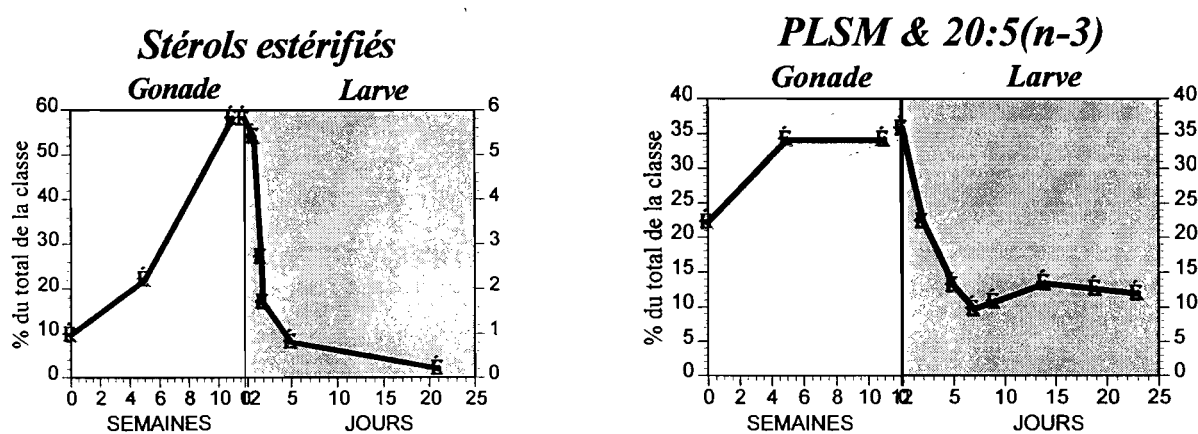
Les bivalves ne disposent pas de désaturases permettant de produire des acides gras à longues chaînes ou ont de faibles capacités d'effectuer ces désaturations. Les acides gras polyinsaturés sont donc essentiels pour la survie, la croissance et la reproduction des mollusques (Trider et Castell, 1980 ; Langdon et Waldoock, 1981 ; Chu and Greaves, 1991). Plusieurs auteurs ont ainsi montré le rôle particulier du 20:5(n-3) et du 22:6(n-3) pour plusieurs paramètres de la reproduction : temps de maturation, fécondité, embryogénèse, survie et croissance larvaire (Tableau 6).



**Figure 3.** Quantités de cholestérol, de 20:4(n-6), de 22:6(n-3) et de 20:5(n-3) apportées pendant 11 semaines de conditionnement et quantités correspondantes dans les gonades femelles.



**Figure 4.** Pourcentages de 20:5(n-3) et 22:6(n-3) dans les lipides neutres au cours du développement larvaire de *P. maximus*.



**Figure 5.** Pourcentage de stérols estérifiés et de 20:5(n-3) des plasmalogènes (PLSM) au cours du conditionnement, dans la gonade femelle, et pendant le développement larvaire.

**Tableau 6.** Importance des PUFA pour la reproduction et le développement larvaire

ESPECES	Importance des PUFA pour les bivalves	REFERENCES
<i>O.edulis</i>	Fécondité, croissance de chair, survie larvaire, améliorées avec régime <i>T.Isochrysis</i> (22:6W3) en comparaison avec <i>D.tertiolecta</i> (sans 20:5 ni 22:6W3)	Millican and Helm 94
<i>O.edulis</i>	- 20:5 sup 22:6 dans les larves issues du milieu naturel - 20:5 inf 22:6 pour larves conditionnées - 20:5 = 22:6	Helm <i>et al.</i> . 91 Napolitano <i>et al.</i> . 88 Frolov et Pankov 92
<i>O.edulis</i>	20:5W3 consommé 22:6W3 préservé pendant l'embryogenèse	Helm <i>et al.</i> . 91
<i>P.maximus</i>	idem	Marty <i>et al.</i> . 92
<i>C.gigas</i>	Essentialité du 20:5 et 22:6	Langdon & Waldock 81
<i>C.gigas</i>	temps de maturation varie avec la qualité du régime (460 à 700D°)	Leal 94

Il a, par ailleurs, été montré qu'il était possible de modifier la qualité lipidique des oeufs en modifiant la qualité lipidique du régime alimentaire (Tableau 7).

**Tableau 7.** Effet de la composition lipidique du régime sur la composition lipidique des oeufs

<i>O.edulis</i>	La manipulation du régime influe sur la composition des oeufs	Utting et Doyou 92 Utting 93 Leal 94 Millican et Helm 94
<i>P.maximus</i>	PUFAs du régime influent PUFAs des LN et LP des oeufs	Marty <i>et al.</i> . 92 Samain <i>et al.</i> . 92

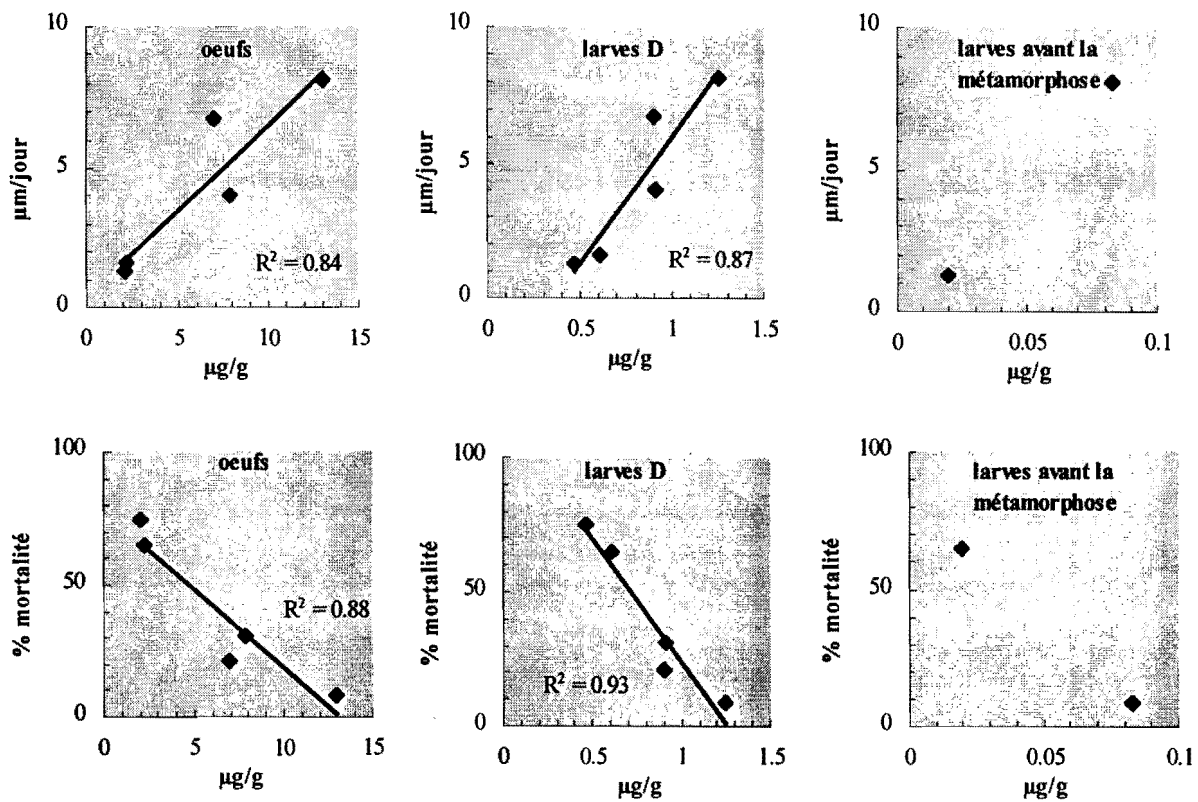
Nous avons précisé chez la coquille Saint Jacques, les relations entre la qualité du régime des géniteurs (PUFA et stérols) et la qualité des oeufs.

Des géniteurs ont été conditionnés avec deux régimes carencés respectivement en 20:5(n-3) (régime *T.Isochrysis*) et en 22:6(n-3) (régime *Chaetoceros calcitrans*) par rapport au témoin (régime PTCS : *Pavlova lutheri*, *T. Isochrysis galbana* (clone Tahiti), *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum*). On a observé un fort marquage des lipides de réserves (triglycerides et esters de stérols) et de membranes (phospholipides et stérols libres) des gonades femelles après 11 semaines de conditionnement (Fig 1). La composition des oeufs émis est identique à celle des gonades femelles avant la ponte.

L'histologie des gonades avant la ponte a montré une présence plus importante d'ovocytes de bonne qualité pour le régime *T.Iso* que pour le régime témoin PTCS ou le régime *C. calcitrans*. De même, le taux de larves D normales est supérieur respectivement pour *T.Iso*/PTCS/ *Chaeto* et inversement pour le taux de larves anormales (Fig.2 ; Soudant *et al.*. 96).

L'étude des relations entre la quantité de cholestérol, de 20:4(n-6), de 20:5(n-3) et de 22:6(n-3) apportée par l'aliment et la quantité retrouvée dans les gonades, montre une relative saturation pour le 20:5(n-3) à partir de 150mg, alors que les autres courbes ne montrent pas de





**Figure 6.** Relations entre la composition en vitamines B1 des oeufs, des larves ou des larves avant la métamorphose et la croissance larvaire ou la mortalité.

saturation (Fig.3). Ces résultats tendent à montrer que le cholestérol, le (20:4n-6) et le 22:6 (n-3) ne sont pas arrivés à saturation dans les oeufs. Pour vérifier si ces molécules sont limitantes, une complémentation du régime devra être réalisée et les performances des oeufs produits devront être évaluées.

L'étude de l'impact de la qualité de la nourriture au niveau des classes de phospholipides (Soudant *et al.* 95), permet de montrer la spécificité de composition de ces classes et pour certaines, une rétention sélective de certains acides gras : le 20:4(n-6) dans la Phosphatidyl inositol (PI), le 22:6(n-3) dans les plasmalogènes (PLSM), le 20:5(n-3) dans la Phosphatidyl Ethanolamine (PE). Le rôle majeur de la PI et de l'acide arachidonique dans la messagerie cellulaire est bien connu chez les mammifères et les poissons. L'incorporation sélective observée pour les autres acides gras dans les classes citées, peut traduire des fonctions similaires encore inconnues. De même, le cholestérol semble particulièrement retenu par rapport aux autres phytostérols. Son rôle est essentiel dans la structure des membranes ainsi qu'en temps que précurseur des hormones stéroïdes.

Au cours de l'embryogénèse, on observe une forte diminution du pourcentage de 20:5(n-3) dans les lipides neutres et dans les plasmalogènes (Fig.4), suggérant un possible rôle énergétique de cet acide gras (Whyte *et al.*1990) ou une accumulation préférentielle de 22:6(n-3) dans les lipides neutres (Marty *et al.* 1992). Dans les phospholipides, le pourcentage de 20:5(n-3) baisse aussi très rapidement dans les plasmalogènes (Fig.5). Il serait intéressant de vérifier la localisation cellulaire des PLSM qui pourraient être associés aux lipoprotéines des réserves vitellines de l'oeuf, utilisées pendant l'embryogénèse. La forte baisse des esters de stérols pendant cette période est probablement associée à l'utilisation de cette source de stérols pour la biosynthèse des nouvelles membranes de l'embryon (Fig5).

## 2.2. Les vitamines

Ce domaine n'a pas du tout été exploré pour les bivalves. Nos travaux les plus récents montrent que la composition en vitamines B1 et B2 des oeufs varie considérablement d'une ponte à l'autre. Comme pour la vitamine C chez les poissons (Dabrowsky *et al.*, 1995), les niveaux vitaminiques chutent de huit fois leur valeur initiale en 2 jours, pendant l'embryogénèse. Des corrélations sont mises en évidence entre le niveau de vitamine B1 et dans une moindre mesure pour la vitamine B2, et la survie ou la croissance larvaire ultérieure (Fig.6). Chez les poissons, de fortes teneurs en vitamine C des oeufs sont associées à une meilleure survie et résistance au stress. Les modalités par lesquelles les oeufs s'enrichissent en vitamines restent à déterminer.

## CONCLUSION

1/ La quantité d'algues nécessaire pour le conditionnement des géniteurs est de l'ordre de 6% (poids sec algues / poids sec chair). Mais elle dépend aussi de l'espèce et surtout de la température d'adaptation de l'espèce considérée.

2/ L'état des réserves somatiques avant la mise en conditionnement pourrait compenser d'éventuelles carences issues du régime de conditionnement, ce qui peut expliquer la variabilité des performances de ponte selon la saison, même en appliquant des techniques de conditionnement identiques. Il est recommandé de préconditionner les géniteurs dans ce sens,

mais des recherches sont à développer pour déterminer si un stockage préalable resterait nécessaire, dans des conditions de nutrition optimales pendant le conditionnement.

3/ Les mélanges d'algues ont plus de chance de prévenir les carences que les régimes monospécifiques qui peuvent être déséquilibrés en éléments essentiels et sont donc risqués.

Il faut apporter un équilibre entre 20:4W6, 20:5W3, 22:6W3, Cholestérol, Vitamines.

Les recherches sont à développer pour mieux définir les besoins. Des microparticules sont à mettre au point pour compléter les régimes de base.

4/ La qualité des oeufs :

- les quantités de lipides, de protéines, de glucides sont importantes mais pas suffisantes.

- la qualité en PUFA des LN et LP, esters de Cholestérol, Vitamines, qui doivent être accumulés dans l'oeuf pour l'embryogenèse sont déterminantes pour la réussite des phases de reproduction et de développement larvaire. Leur étude est une voie d'approche des besoins en éléments essentiels.

5/ La consommation des réserves quantitatives et qualitatives des oeufs pendant le développement larvaire, dépendra de la qualité du milieu, des conditions de température, de la ploïdie, du niveau nutritionnel pendant le développement larvaire.

## Références

- Chaparro O.R., 1990.** Effect of temperature and feeding on conditioning of *Ostrea chilensis* Philippi, 1845 reproducers. *Aquacult. Fisher. Manag.*, **21** : 399-405.
- Chu F.-L.E. and J. Greaves, 1991.** Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, **110** : 229-236.
- Dabrowski K., A. Ciereszko and J. Blom, 1995.** Ascorbic acid (vitamin C) function in fish gametogenesis and fertility. In Larvi'95, Fish and shellfish larviculture symposium, EAS special publication no 24, Gent, Belgium. Lavens P., Jaspers E. and Roelants Eds. p. 11.
- Delaunay F., Marty, Y., Moal, J. and J-F. Samain, 1992.** Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **163** : 209-219
- Devauchelle N. and C. Mingant, 1991.** Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.*, **4** : 41-51.
- Frolov A.V. and S.L. Pankov, 1992.** The reproduction strategy of oyster *Ostrea edulis* L. from the biochemical point of view. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103B** : 161-182.
- Gabbott P.A. and A.J.M. Walker, 1971.** Changes in the condition index and biochemical content of adult oysters (*Ostrea edulis* L.) maintained under hatchery conditions. *J. Cons. int. Explor. Mer.*, **34** : 99-106.
- Gallager S.M. and R. Mann, 1986.** Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, **56** : 105-121.
- Gallager S.M., R. Mann and G.C. Sasaki, 1986.** Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture*, **56** : 81-103.
- Helm M.M., D.L. Holland and R.R. Stephenson, 1973.** The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **53** : 673-684.

- Helm M.M., D.L. Holland, S.D. Utting, and J. East, 1991.** Fatty acid composition of early non-feeding larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **71** : 691-705.
- Laing I. and J. Lopez-Alvarado, 1994.** Effect of dried algae diets on conditioning and fecundity of Manila clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). *Aquacult. Fish. Manage.*, **25** : 157-166.
- Langdon C.J. and M.J. Waldock, 1981.** The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **62** : 431-448.
- Leal A.M., 1994.** Conditioning of Manila clam broodstock on natural and artificial diets. PhD Thesis, School of Ocean Sciences, University College of North Wales, Bangor, 343p.
- 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. UK*, **59** : 95-110.
- Marty Y., F. Delaunay, J. Moal and J-F. Samain, 1992.** Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **163** : 221-234.
- Millar R.H. and J.M. Scott, 1967.** The larva of the oyster *Ostrea edulis* during starvation. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **47** : 475-484.
- Millican P.F. and M.M. Helm, 1994.** Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **123** : 83-94.
- Muranaka M.S. and J.E. Lannan, 1984.** Broodstock management of *Crassostrea gigas*: Environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*, **39** : 217-228.
- Napolitano G.E., W.M.N. Ratnayake and R.G. Ackman, 1988.** Fatty acid components of larval *Ostrea edulis* (L.): importance of triacylglycerols as a fatty acid reserve. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B** : 875-883.
- Robinson A., 1992a.** Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg): I Effects on gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis. *J. Shellfish Res.*, **11** : 437-441.
- Robinson A., 1992b.** Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture*, **106** : 89-97.
- Robinson A., 1992c.** Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg): II Effects on glycogen, lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. *J. Shellfish Res.*, **11** : 443-447.
- Samain J.-F., C. Séguineau, J-C. Cochard, F. Delaunay, J-L. Nicolas, Y. Marty, R. Galois, M. Mathieu, and J. Moal, 1992.** What about growth variability for *Pecten maximus* production? *Océanis*, **18** : 49-66.
- Soudant P., Y. Marty, J. Moal and J. F. Samain, 1995** Separation of major polar lipids in *Pecten maximus* by high-performance liquid chromatography and analysis of their fatty acids using gas chromatography. *Journal of Chromatography. B*, **673** : 15-26.
- Soudant P., Y. Marty, J. Moal, C. Quéré, J. R. Lecoq, R. Robert and J. F. Samain, (sous presse)** . Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* female gonad composition and reproduction process. *Aquaculture*.
- Stephenson R.R., 1973.** Some aspects of reproduction of the oyster (*Ostrea edulis* L.), in the field and laboratory. PhD Thesis, Marine Science Laboratory, University College of North Wales, 88 p.

- Trider D.J. and J.D. Castell, 1980.** Effect of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of Nutrition.*, 110 : 1303-1309.
- Utting S.D., 1993.** Procedures for the maintenance and hatchery conditioning of bivalve broodstocks. *World Aquacult.*, 24 : 78-82.
- Utting S.D. and J. Doyou, 1992.** The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Aquaculture*, 103 : 17-28.
- Utting S.D. and P.F. Millican, 1995.** Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *In Larvi'95, Fish and shellfish larviculture symposium, EAS special publication no 24, Gent, Belgium. Lavens P., Jaspers E. and Roelants Eds. p. 64.*
- Whyte J.N.C., N. Bourne and N.G. Ginther, 1990.** Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Mar. Biol.*, 106 : 239-244.
- Whyte J.N.C., N. Bourne and N.G. Ginther, 1991.** Depletion of nutrient reserves during embryogenesis in the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 149 : 67-79.

## INDUCTION DE LA PONTE CHEZ LA COQUILLE SAINT-JACQUES : UTILISATION DES NEUROMEDIATEURS

**N. DEVAUCHELLE\*, N. ROBILLARD\*\*, P. MICARELLI\* ET P. GUERRIER\*\*\***

\* IFREMER BREST, DRV-RA, LABORATOIRE PMDC, BP 70, F- 29280 PLOUZANE.

\*\* 34 AVENUE PRAUD, 44300 NANTES,

\*\*\* E.N.S. LYON.

**Résumé :** Les gamètes de coquille St-Jacques sont récoltés de manière empirique dans les écloséries. Les produits sont obtenus dans des délais variables, en quantité et en qualité imprévisibles. L'effet des neuromédiateurs en tant que régulateurs potentiels du phénomène d'émission des gamètes, communément appelé ponte, a été testé. La sérotonine s'est avérée être un excellent régulateur de la spermiation. Un protocole de collecte du sperme a été établi. En revanche l'obtention des ovocytes s'est révélée plus délicate. Elle est possible, mais un protocole standard n'a pu être défini.

### INTRODUCTION

L'émission provoquée des gamètes de bivalves se fait généralement à la suite de chocs thermiques de 5 à 10 °C auxquels sont soumis des individus dont la maturité est jugée adéquate, à la suite d'une observation macroscopique.

Les produits sexuels sont obtenus dans des délais variables, en quantité et en qualité imprévisibles. Ceci constitue un obstacle aux rendements d'élevage larvaire, dans les écloséries, ainsi qu'à toutes les études portant sur les gamètes.

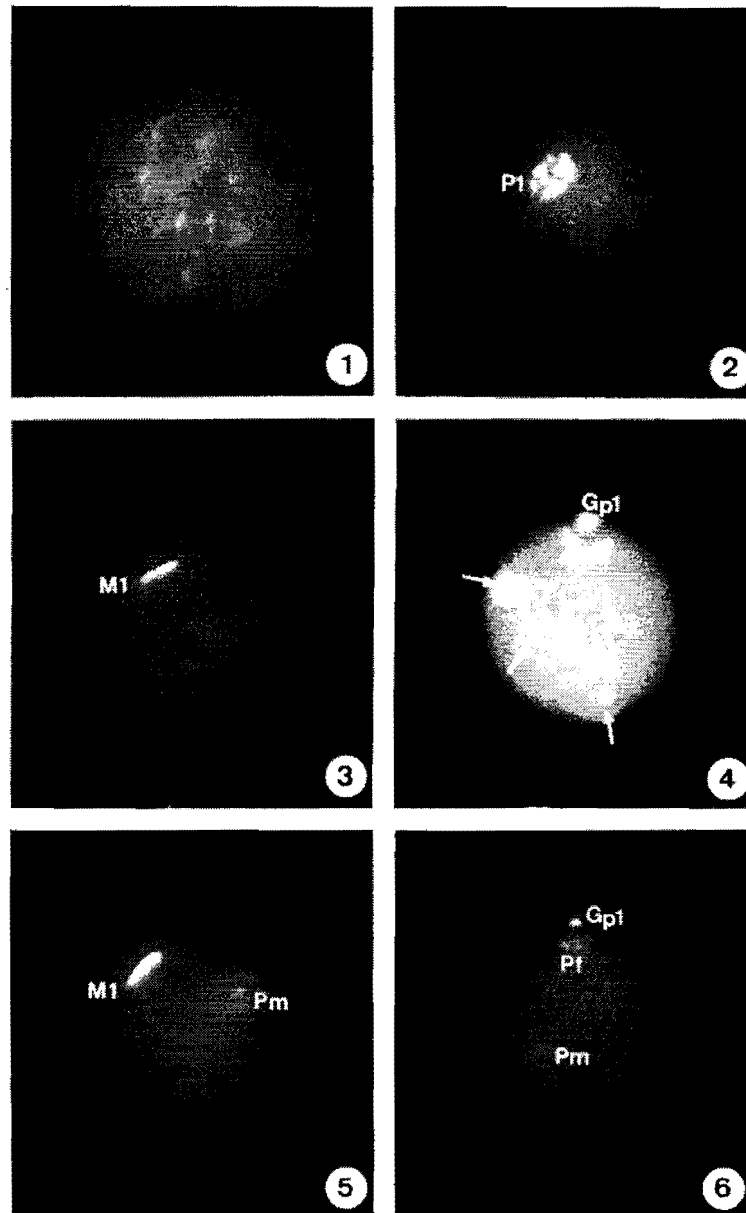
C'est pourquoi, nous avons vérifié si l'usage de neuromédiateurs pouvait permettre de lever cet obstacle. Des traitements d'ovocytes ont tout d'abord été réalisés in vitro pour vérifier leur effet et celui de leurs agonistes sur la reprise de méiose. Puis, l'effet d'injections dans les gonades a été étudié.

Le choix des neuromédiateurs testés a été fait en fonction d'expériences japonaises et françaises. En 1982, Matsutani et Nomura démontraient qu'une injection de sérotonine (5 hydroxytryptamine ou 5-HT) pouvait induire l'émission des gamètes chez *Patinopecten yessoensis*.

En 1994, Widowati démontrait que la maturation ovocytaire de la coquille Saint-Jacques s'effectue en deux étapes : la première étape est le passage du stade de prophase 1 au stade de métaphase 1 ; la deuxième étape est la levée de la métaphase 1. L'ovocyte émis par les voies naturelles est au stade métaphase 1. Il est alors fécondable. La figure 1 récapitule les principales étapes.

En 1993, Jégou démontrait, à partir de suspensions cellulaires de gamètes mises en présence d'extraits de ganglions cérébro-pédiéux et pariéto-viscéraux, que, chez la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*, des substances libérées par le système nerveux ont un effet sur la gamétogenèse.

Enfin, il a été montré que, chez des espèces de bivalves, par exemple *Mytilus edulis* ou *Ruditapes philippinarum*, dont la fécondation ne peut être obtenue qu'avec les ovocytes au stade de Germinal Vesicle Break Down - GVBD- (Krantic *et al.*, 1991, Abdelmajid *et al.*, 1993a et 1993b), la sérotonine peut lever le blocage en prophase 1, induire la GVBD et ainsi



**Figure 1.** Ovocytes et oeufs de *Pecten maximus* en microscopie à épifluorescence après coloration au hoechst 33258, avant et après la reprise de méiose.

- Photo 1** - Ovocyte immature, au stade vésicule germinale : les chromosomes sont décondensés.
- Photo 2** - Ovocyte mature dont la vésicule germinale s'est rompue : les chromosomes sont condensés, le pronucleus femelle (P1) est en prophase de la 1ère division de méiose.
- Photo 3** - Ovocyte mature, dont le pronucleus femelle (M1) est en métaphase de première division de méiose.
- Photo 4** - Polyspermie : plusieurs têtes spermatisques (-->) sont présentes à l'intérieur de l'oeuf. Le pronucleus femelle (Pf) et le premier globule polaire (Gp1) sont visibles.
- Photo 5** - Oeuf dont le pronucleus femelle (M1) est en métaphase 1, et dont le pronucleus mâle (Pm) est décondensé.
- Photo 6** - Oeuf montrant le premier globule polaire (Gp1), le pronucleus femelle (Pf), et le pronucleus mâle (Pm) décondensé.

préparer l'ovocyte à la fécondation. Ce phénomène est décrit comme étant une réponse à des signaux extracellulaires qui déclenchent un enchaînement d'événements aboutissant à une augmentation du calcium intracellulaire et à la rupture de la vésicule germinative (Guerrier *et al.*, 1993, Gobet *et al.*, 1994).

### **L'EFFET DE NEUROMEDIATEURS *IN VITRO***

La décision de rechercher des substances neuromédiatrices utilisables pour standardiser les conditions d'obtention des gamètes de coquille St-Jacques et optimiser les résultats tout en préservant la fertilité de l'espèce date, pour l'*IFREMER*, de 1991. D'abord, des expériences *in vitro* ont été réalisées par P. Guerrier en 1992. La technique de liaison du ligand 5-HT radioactif a été appliquée à des préparations semi purifiées de membranes ovocytaires. Elle a permis de déterminer les caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des récepteurs. L'espèce *Pecten maximus* réagit de manière très originale comparée à d'autres espèces puisqu'elle répond à deux agonistes de la sérotonine, le TFMPP (1-3 trifluorométhylpiperazine) et le 8 OH-DPAT (8 hydroxy-2-di-N-propylamnotetralin hydrobiomide) mais pas à la sérotonine elle-même (Figure 2).

Une étude *in vitro* a été conduite à IFREMER/Brest, pour déterminer l'effet des mêmes effecteurs ainsi que celui de la dopamine et de ses agonistes, la bromocriptine et le quinpirole, sur l'apparition de la GVBD et des blocs métaphasiques. Les résultats montrent que les agonistes de la sérotonine se sont, en fait, révélés bien plus efficaces que les agonistes de la dopamine pour induire la GVBD. Le TFMPP a été particulièrement efficace aux concentrations de  $5 \cdot 10^{-4}$  M et  $10^{-3}$  M en induisant 85 à 99% de GVBD (Micarelli, 1992, Devauchelle *et al.*, 1994). Les blocs métaphasiques ont cependant été observés en très faible proportion (maximum 1%).

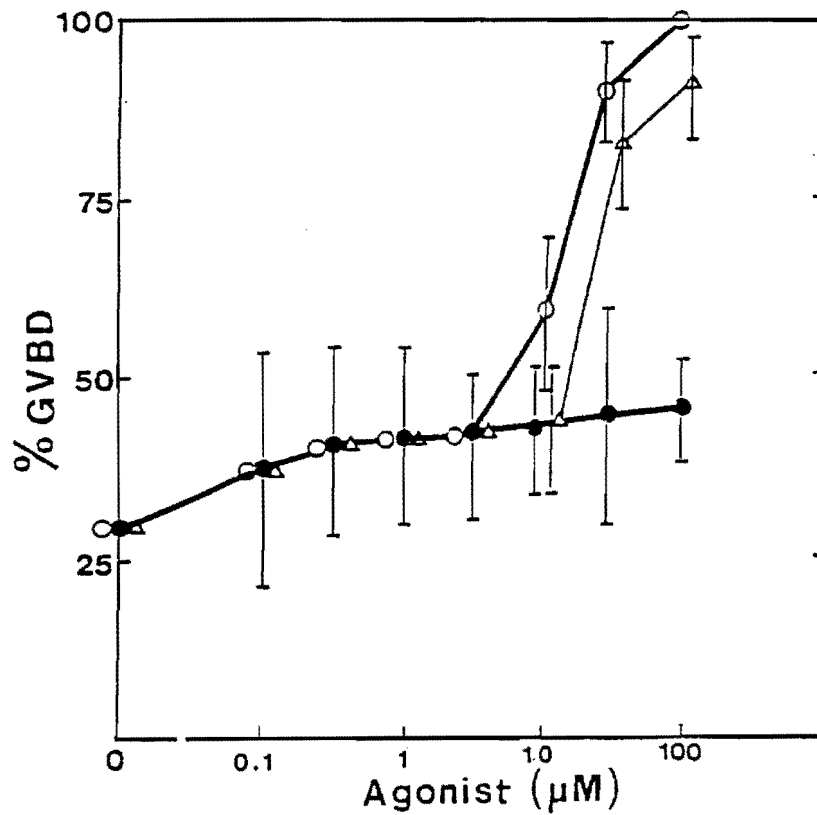
Les ovocytes traités au TFMPP ont pu être fécondés. Le taux moyen de fécondation est resté inférieur à 10%. Mais, il est encourageant car il démontre que la reprise de méiose artificiellement induite a une signification biologique. Un bon taux de fécondation étant l'aboutissement de ce type de travail à application aquacole, il devrait, à l'avenir, être arbitre de l'efficacité d'expériences similaires.

### **L'EFFET DES NEUROMEDIATEURS INJECTES DANS LA GONADE DES COQUILLES SAINT-JACQUES**

Les injections ont été pratiquées en deux endroits de la gonade. En tout, 0,4 ml d'une solution saline a été injecté par animal traité. L'effet des traitements a été évalué au nombre d'animaux ayant émis des gamètes, au délai d'émission des gamètes, au nombre des gamètes émis et à leur qualité. A ce titre, des essais de fécondation ont ponctuellement été réalisés et des embryons ont été incubés. Le but était alors de vérifier si nos premiers essais, tout en étant perfectibles, permettaient d'espérer des développements embryonnaires.

Les neuromédiateurs utilisés ont été la sérotonine, la dopamine et leurs agonistes TFMPP, 8 OH-DPAT, le quinpirole et la bromocriptine (Devauchelle *et al.*, 1994).





**Figure 2.** Effet de la sérotonine 5HT (●) et de deux agonistes TFMPP (○) et 8 OH-DPAT (▷) sur le déclenchement de la reprise de méiose des ovocytes de *Pecten maximus* exprimé en % de GVBD.

Les résultats montrent que la sérotonine, à la concentration de  $10^{-3}$  M, est la plus efficace pour induire l'émission des gamètes. L'émission du sperme suit l'injection d'une vingtaine de minutes en moyenne. Dans ce cas, et lorsque les gonades sont macroscopiquement identifiées au stade de maturité 4 (échelle classique de Cochard et Devauchelle, 1993), plus de 80 % des animaux émettent des spermatozoïdes féconds (tableau 1). La qualité du sperme récolté après le traitement à la sérotonine est comparable (et excellente) à celle du sperme récolté après un choc thermique, émis en milieu aqueux (tableau 2 : Faure *et al.*, 1994, Faure, 1996). L'injection des agonistes de la sérotonine, de la dopamine et de ses agonistes n'a pas permis d'induire d'émissions de sperme aux doses testées (Devauchelle *et al.*, 1994).

Pour obtenir des ovocytes, seule la sérotonine s'est révélée active. La sérotonine a été injectée selon deux protocoles différents : d'une part, suivant le protocole « sérotonine » efficace pour la spermiation et, d'autre part, en doubles injections. Le travail de Micarelli et Paesanti (commun. pers.) réalisé en Italie sur *Pecten jacobaeus*, en effet, montré que deux injections de sérotonine espacées de 15 jours permettaient l'émission des ovocytes. Les résultats d'émissions d'ovocytes sont assez imprévisibles. Dans les deux cas, des ovocytes ont été collectés et l'effet de l'injection pourrait dépendre de l'état d'avancement de la gamétogenèse (tableau 3: Doubovick, 1994). Des larves viables ont été obtenues. Cependant, un taux d'anomalies élevé a été observé. Différents facteurs pouvaient être à l'origine de ces anomalies. Aucun lien de cause à effet entre les anomalies et le traitement lui-même n'a été établi.

A titre anecdotique, on notera que d'autres effecteurs, reliés à l'activité reproductrice des vertébrés, ont été testés mais n'ont donné aucune réponse d'émissions d'ovocytes aux doses utilisées. Par exemple, une prostaglandine PGE<sub>2</sub>, la LHRH, l'ocytocine et la mélatonine (Doubovick, 1994).

## CONCLUSION

Les tests réalisés *in vitro* et *in vivo* donnent des résultats contradictoires quant à l'efficacité de la sérotonine comparée à celle de ses agonistes. Ce travail pose donc la question de la limite des applications de tests réalisés *in vivo*.

S'il indique que la sérotonine peut être utilisée de manière courante et efficace pour l'obtention de spermiation, il met en évidence la plus grande difficulté d'obtenir des ovocytes. Ce résultat est en parfait accord avec les données d'immunolocalisation obtenues sur *Placopecten magellanicus* où seuls les mâles émettent des gamètes après traitements à la sérotonine. Le fait de pouvoir utiliser la sérotonine pour récolter des ovocytes mûrs (GVBD) est très positif. Le fait d'obtenir des ovocytes après des délais variables pourrait signifier que les ovocytes sont plus ou moins réceptifs à la sérotonine, et peut-être qu'ils pourraient le devenir plus après un conditionnement au neuromédiateur. L'étude de l'évolution de la constitution membranaire des ovocytes faite sur des biopsies non destructrices pratiquées dans la gonade, à différents pas de temps après qu'une injection de sérotonine ait été pratiquée pourrait aider à comprendre la variabilité des résultats.

La sérotonine pourrait aussi agir suivant d'autres voies que celle de l'action directe sur des récepteurs ovocytaires. On lui connaît, en effet, des effets très diversifiés dans le règne animal, notamment un effet vasoconstricteur qui faciliterait l'expulsion « mécanique » des gamètes.

On notera que chez un autre pectinidé, *Argopecten purpuratus*, l'émission de sperme s'obtient plus facilement que l'émission d'ovocytes en associant PGE<sub>2</sub> et 5HT ou dopamine et eau de

**Tableau 1.** Effets d'injections de sérotonine, de dopamine et de leurs analogues dans la gonade de coquille St-Jacques.

Inducteur	[C] M	Nombre d'animaux testés	Animaux ayant émis du sperme % (N)	Animaux ayant émis des ovocytes % (N)
Sérotonine	$5 \times 10^{-4}$	25	84 (21)	0
	$10^{-3}$	15	87(13)	
Dopamine	$10^{-6}$	5	0	0
	$10^{-5}$	5	0	0
	$10^{-4}$	5	0	0
	$10^{-3}$	5	0	0
TFMPP	$2 \times 10^{-4}$	14	0	0
	$5 \times 10^{-4}$	24	0	0
	$10^{-3}$	10	0	0
	$5 \times 10^{-3}$	10	0	0
8 OH-DPAT	$5 \times 10^{-4}$	15	0	7(1)
	$10^{-3}$	5	0	0
Quinpirole	$10^{-6}$	5	0	0
	$10^{-5}$	5	0	0
	$10^{-4}$	5	0	0
	$10^{-3}$	5	0	0
Bromocriptine	$10^{-4}$	10	0	0
Eau de mer		30	0	0

**Tableau 2.** Effet du mode d'obtention du sperme sur les paramètres physiologiques des spermatozoïdes.

Mode d'obtention	Stimulation thermique		Stimulation chimique à la sérotonine
	Gonopore	Eau de mer	Gonopore
Lieu de prélèvement	Gonopore	Eau de mer	Gonopore
Respiration (nmolO <sub>2</sub> /min par mg prot.	127	/	115
Indice de mobilité (échelle de 1 à 5)	5	5	5
Forme de la trajectoire	homogène circulaire	homogène circulaire	homogène circulaire
Aspect des mouvements	propulsifs	propulsifs	propulsifs
Indice de linéarité	0,7	0,7	0,7
Fréquence flagellaire (Hz)	38	38	38
Vitesse moyenne (µm/sec)	255	230	235
Pouvoir fécondant (%)	29	82	77

**Tableau 3.** Émissions d'ovocytes obtenues après une seule injection de sérotonine

	Stade des gonades des coquilles	Injection	Nombre de coquilles	Nbre de coq. ayant émis du sperme	Nbre de coq. ayant émis des ovocytes
Lot Témoin	4	Eau de Mer	10	1	0
Lot Expérimental	4	Sérotonine ( $10^{-3}$ M)	30	28	21

mer (Martinez, commun. pers.). Ces résultats chiliens n'ont pas été comparés à des résultats témoins, et, la variabilité interindividuelle étant très grande, il est difficile d'interpréter l'effet des associations de neuromédiateurs.

Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, nous avons montré que des traitements à la sérotonine permettent, comme chez *Pecten maximus*, l'obtention de sperme plus facilement que celle des ovocytes. Le délai de spermiation est seulement de 2-3 minutes après l'injection. Des ovocytes peuvent être récoltés après une seule injection de sérotonine. Mais l'étude du rôle que pourraient jouer les neuromédiateurs dans cette espèce apparaît moins important à traiter, dans une optique d'application aquacole. Il est couramment admis que le sperme et les ovocytes d'huître creuse peuvent, en effet, être obtenus par scarification, sans dommage. Les ovocytes récoltés, au stade de prophase 1, sont fécondables. Pour cette espèce, l'intérêt va donc plutôt dans le sens de l'établissement d'une relation de cause à effet entre les critères de maturité des ovocytes ou du sperme et la fécondance ou la fécondabilité des gamètes, après scarification. Toutefois, des programmes de sélection génétique peuvent obliger à utiliser et à conserver vivants, des reproducteurs pendant x années. Dans ce cas, la possibilité de recueillir des ovocytes sans sacrifier l'animal et de manière efficace, serait à privilégier.

## Références

- Abdelmajid H., P. Guerrier, P. Colas, Y. Durocher, I. Gobet, S. Krantic, C. Leclerc-David, M. Moreau, I. Néant, P. Rivailier and M. Tomkowiak, 1993a.** Role of calcium during release of mollusc oocytes from their blocks in meiotic prophase and metaphase, *Biol. Cell.*, **78** : 137-143.
- Abdelmajid H., C. Leclerc-David, M. Moreau, P. Guerrier and A. Ryazanov, 1993b.** Release from the metaphase I block in invertebrate oocytes : possible involvement of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase III, *Int.J.Dev.Biol.* **37** : 279-290.
- Cochard J.C. and N. Devauchelle, 1993.** Spawning, fecundity and larval survival and growth in relation to controlled conditioning in native and translated populations of *Pecten maximus* (L.). Evidence for the existence of separate stocks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **169(1)** : 41-56.
- Devauchelle N., P. Micarelli, P. Guerrier and J. Desilets, 1994.** The neurohormonal induction of the release of oocytes and sperm from *Pecten maximus*. In : Proceedings of the 9th International Pectinid Workshop, Nanaimo, B.C., Canada, *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Science*, Bourne N.F., Bunting B.L., Townsend L.D (Eds), Vol. 1 : 148-158.
- Dobovick N., 1994.** Contribution à l'amélioration de la reproduction de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* L. Mémoire d'Ingénieur des Techniques Agricoles, Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles de Bordeaux, 63 p.
- Faure C., N. Devauchelle, J.P. Girard and J. Cosson, 1994.** The quality of *Pecten maximus* sperm. In : Proceedings of the 9th International Pectinid Workshop, Nanaimo, B.C., Canada, *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Science*, Bourne N.F., Bunting B.L., Townsend LD (Eds), Vol. 1 : 28-37.
- Faure C., 1996.** Paramètres physiologiques de l'émission et de l'activation des gamètes mâles de deux Mollusques Bivalves ; la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg). Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest. 254 p.

- Gobet I., Y. Durocher, C. Leclerc, M. Moreau and P. Guerrier, 1994.** Reception and transduction of the serotonin signal responsible for meiosis reinitiation in oocytes of Japanese clam *Ruditapes philippinarum*, *Dev.Biol.* **164** : 540-549.
- Guerrier P., 1992.** Reproduction des mollusques bivalves d'aquaculture nouvelle. Compte rendu final -contrat d'incitation *IFREMER*, exercice 91 - 11 p.
- Guerrier P., C. Leclerc-David and M. Moreau, 1993.** Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalve mollusc, *Ruditapes philippinarum*, *Dev.Biol.* **159** : 474-484.
- Jegou F., 1993.** Neuroendocrinologie de la reproduction de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* : Recherche de substances agissant sur la gamétogenèse. *Thèse de docteur vétérinaire*, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 93 p.
- Krantic S., F. Dube, R. Quirion and P. Guerrier, 1991.** Pharmacology of the Serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes, *Developmental Biology*, **146** : 491-498.
- Matsutani T. and T. Nomura, 1982.** Induction of spawning by serotonin in the scallop, *Pactinopecten yessoensis* (JAY), *Marine Biology Letters*, **3** : 352-358.
- Micarelli P., 1992.** Induction de la maturation des ovocytes de coquille St-Jacques (*Pecten maximus*) et déclenchement de la ponte par des neurotransmetteurs : Sérotonine-like, Dopamine-like et Prostaglandine PGE<sub>2</sub>. Rapport de D.E.A. d'Océanologie Biologique et Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale, 31 p.
- Widowati I., 1994.** Gonadogenèse et relation trophique intestin-gonade chez *Pecten maximus* (mollusque bivalve). Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest. 152 p.

## DISCUSSIONS

### ONTROLE ARTIFICIEL DE LA REPRODUCTION

rapporteur Yamama NACIRI

La séance a commencé par un exposé de **Nicole DEVAUCHELLE** portant sur les problèmes méthodologiques que pose, lorsqu'on ne recourt pas au sacrifice des animaux, l'estimation individuelle des stades physiologiques. Plusieurs techniques ont été présentées (ouverture, biopsie...) et comparées (micro et macro analyses, biopsie).

**Catherine VERCELLI** a poursuivi par la présentation d'une expérience portant sur l'étude de l'évolution de la gamétogenèse d'huîtres plates *Ostrea edulis* maintenues au froid pendant 8 mois. Les résultats montrent que la gamétogenèse s'est effectuée tout au long de la période de suivi malgré les conditions de faible température (autour de 7-8°C) et d'alimentation réduite. Des maturations ont pu être obtenues tous au long du suivi, le nombre de larves baissant néanmoins au court du temps.

**André GERARD** a posé le problème de la reproduction des mollusques dans le cadre des besoins exprimés par l'équipe de génétique sur les huîtres creuses *Crassostrea gigas* et plates *Ostrea edulis*. Il a en particulier souligné la difficulté du passage à un contrôle individuel de la maturation lorsque seules des techniques de ponte en masse ont été mises au point.

**Clara MASSAPINA** a fait une synthèse des facteurs influençant la qualité des larves de *Crassostrea angulata* : influence prépondérante des femelles, qualité du conditionnement, période de ponte, technique d'induction de ponte...

**Jean BARRET** a parlé de température et de photopériode en tant que facteurs externes influençant la maturation des géniteurs. Il a souligné l'importance de la photopériode qui serait un déclencheur/inhibiteur de la gamétogenèse et qui, dans certaines conditions, pourrait avoir davantage d'importance que la température.

**Jean-François SAMAIN** a présenté des résultats concernant *Pecten maximus* et intégrant les stades allant du stockage de réserves à la formation des oeufs. Sa conclusion portait sur l'importance des aspects qualitatifs (qualité de la nourriture) pour augmenter la vitesse de maturation, améliorer la qualité des gamètes et donc optimiser la survie et la croissance larvaire.

**Nadia ROBILLARD** a parlé de l'influence des neuromédiateurs sur *Pecten maximus*, et en particulier de la sérotonine. Ce produit permet d'obtenir des émissions de sperme mais rarement des émissions d'ovocytes à moins de renouveler l'injection 15 jours après. Les problèmes qui se posent pour l'utilisation de neuromédiateurs tiennent principalement à l'évaluation du stade physiologique des animaux au moment de l'injection et à la connaissance précise des mécanismes hormonaux impliqués.

Intervenant sur les poissons marins, **Jean-Louis GIGNON** (*contribution en fin du rapport*) a situé l'état d'avancement des recherches : il n'y a pas actuellement de problèmes de reproduction en masse cependant l'énorme variabilité individuelle constatée sur le bar ou le turbot ne permet pas une maîtrise individuelle de la reproduction. L'approche adoptée par l'IFREMER est intégrée et s'attache à l'étude de la reproduction et des stades précoces. Les buts sont d'abord d'améliorer les performances des animaux tout en évitant les inconvénients d'une croissance trop rapide, ensuite d'améliorer la qualité et en particulier les performances larvaires.

## **Discussion**

Le président de séance Jean-Pierre GIRARD a lancé la discussion en insistant sur l'intérêt de l'approche d'André GERARD dans la définition des problématiques à aborder pour la physiologie de la reproduction chez les mollusques. René ROBERT a posé le problème de la multiplicité et de la spécificité des modèles de travail : les notions de ressources, de qualité, le poids du conditionnement sont très différents d'une espèce à l'autre. Henri GRIZEL a rappelé la variabilité des conditions dans le temps qui souligne la nécessité de mise au point de protocoles reproductibles ainsi que l'importance de la variabilité individuelle. Pierre BOUDRY a renchéri sur ce dernier point en proposant la mise en place éventuelle de lignées de référence qui permettraient de s'affranchir de la variabilité due aux animaux eux-mêmes. Nicole DEVAUCHELLE a insisté, quant à elle, sur l'importance de la standardisation des techniques. Gilles BOEUF a rappelé que la reproduction des mollusques en France est un secteur d'étude pauvrement doté en personnel par comparaison au secteur poisson. L'étude de la reproduction des poissons a en effet commencé de façon systématique il y a une centaine d'années et les études ont immédiatement porté sur des aspects endocriniens par analogie aux mammifères, avec l'étude du cerveau, de l'hypophyse et de l'hypothalamus. Les études faites depuis ont essentiellement concerné les mécanismes hormonaux et l'étude des comportements n'est apparue que récemment (depuis une 20<sup>aine</sup> d'années). Enfin, Christian FAUVEL a rappelé l'intérêt de la génétique moléculaire comme outil, par exemple par le biais de l'utilisation de modèles préétablis.

**INDICATEURS DE QUALITE**

**REGARD SUR LA REPRODUCTION DES POISSONS**

**SYNTHESE ET DISCUSSION**





## CARACTERISATION DES PARTIES DURES DU REPRODUCTEUR DE COUILLE SAINT-JACQUES *PECTEN MAXIMUS*

LARVOR H.\*, N. DEVAUCHELLE\*, J.P. CUIF\*\* ET G. SALAUN\*

\* IFREMER, Laboratoire de Physiologie des Mollusques - BP.70 - 29280 PLOUZANE

\*\*Université Paris - Sud Orsay, Laboratoire de Pétrologie, sédimentologie et paléontologie.  
Bât. 504 - 91405 ORSAY Cedex (F).

**Résumé :** L'étude de la coquille St-Jacques a été engagée dans le but de savoir si des modifications de l'organisation coquillière peut servir à qualifier l'état « de santé » de l'animal, à prédire de mauvaises performances de reproduction, ou servir à situer des épisodes de stress pour l'animal.

L'analyse des parties internes des valves montre qu'elles ont, classiquement, une microstructure calcitique foliée, sauf au niveau des insertions musculaires où le carbonate de calcium est cristallisé sous forme d'aragonite. Les fractions organiques soluble et insoluble représentent 1 à 2 % du poids du test, et sont constituées majoritairement de protéines acides (60 à 70 % d'acides aminés acides : acides aspartique et glutamique).

Les anomalies rencontrées peuvent être :

- morphologiques (croissance anarchique liée au gymnodium, modifications structurales internes),
- poches organiques englobant des endobiontes, anneaux bruns, problèmes de colorations internes),
- microstructurales (altérations des cristaux foliés liées à des anomalies de coloration en milieu naturel, à des chocs salins ou à des traitements pesticides),
- de composition (modifications de la composition organique, protéique et pigmentaire).

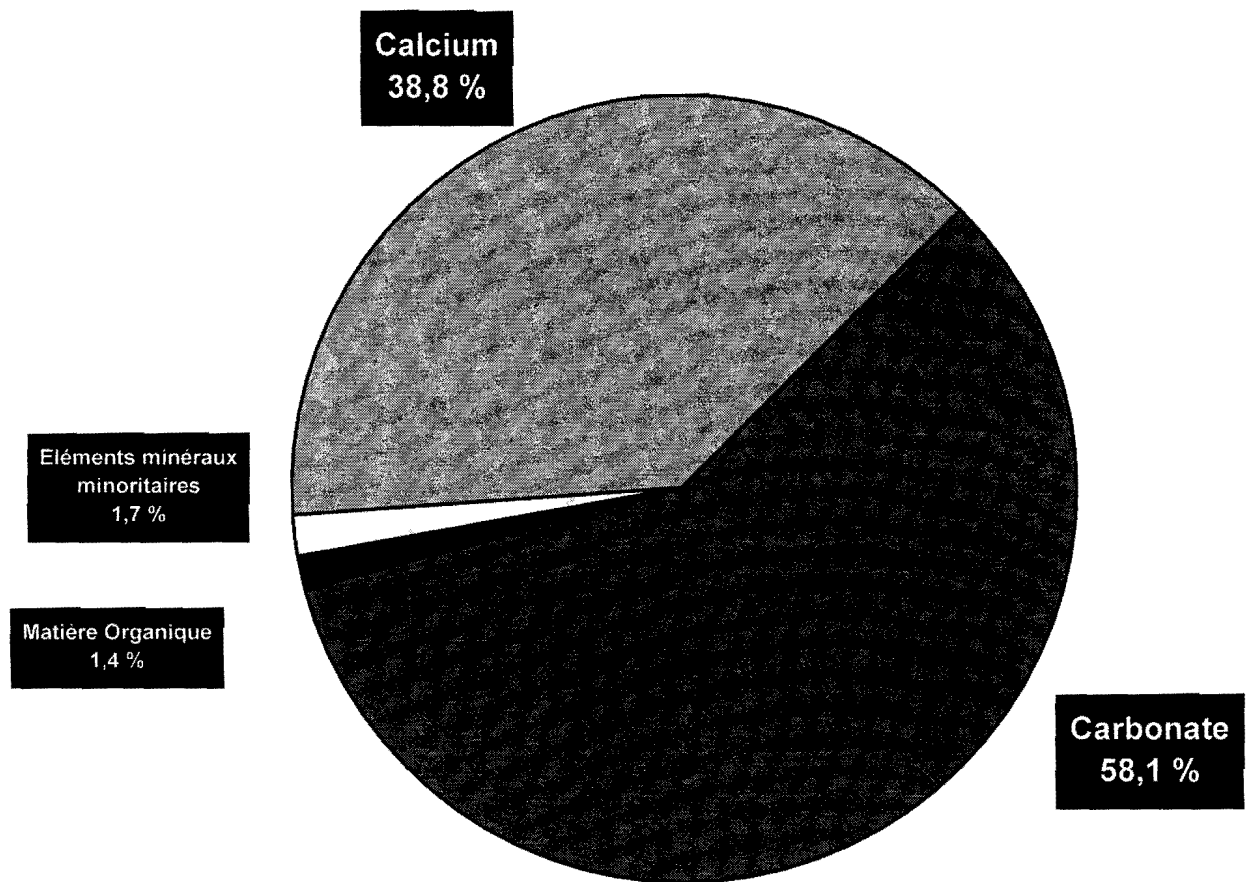
Dans le milieu naturel, ces modifications sont associées à des affaiblissements des bivalves. Dans le cas de brunissement étendu, on observe un amaigrissement et une forte teneur en eau dans le muscle et la gonade. Chez les coquilles, les plus brunes de la Rade de Brest, on a enregistré une accumulation de PCB et de Lindane dans la gonade.

En conditions contrôlées, l'élevage en eau contaminée par des pesticides (mécoprop et diuron) ou en eau de faible salinité engendre des altérations structurales et microstructurales de la coquille. Ces conditions « stressantes » provoquent un affaiblissement musculaire qui s'exprime par une augmentation significative de la teneur en eau. Le développement de la gonade semble également perturbé.

## INTRODUCTION

Pouvoir apprécier les chances de bonne évolution de la gamétogenèse chez les bivalves est un souhait que formulent les professionnels de la conchyliculture autant que les chercheurs qui souhaitent contrôler les causes de fertilité chez les bivalves.

Les critères, habituellement utilisés, sont basés sur des observations macroscopiques empiriques ou sur l'observation de préparations histologiques. Elles sont peu fiables, et nous cherchons à les fiabiliser par l'observation de biopsies et à les compléter par une appréciation globale de la qualité de l'animal. C'est dans ce but, qu'a démarré une étude concernant les parties calcifiées de la coquille St-Jacques. Son origine tient aux relations qui ont été établies sur le terrain entre l'intensité de la coloration brune des valves, la rareté des animaux dans un secteur donné et le faible recrutement observé dans ce secteur. Le lecteur trouvera une bibliographie complète et des informations détaillées concernant les lignes qui suivent dans la thèse d'Université d'Hélène Larvor (1996).



**Figure 1.** Composition de la coquille de Coquille Saint Jacques

## **MATERIEL et METHODES :**

Des plans d'échantillonnage de coquilles St-Jacques ont été mis en place en Rade de Brest, en Baie de Seine et au large de la Baie de Morlaix.

Les bivalves ont fait l'objet d'observations et analyses suivantes :

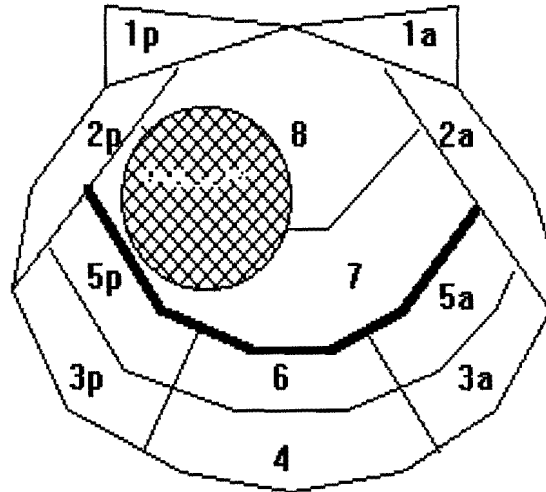
- morphologie, biométrie (indices de condition, mensurations),
- intensité du brunissement des valves conformément à l'échelle établie par H. Larvor,
- niveau de colonisation des valves par des endobiontes,
- analyse structurale de la partie interne des valves par microscopie électronique à balayage,
- analyses biochimique et chimique des parties organiques et non organiques des parties internes des valves.

## **RESULTATS ET CONCLUSIONS**

L'étude du brunissement pathologique des valves de la coquille St-Jacques a permis d'identifier différents types d'altérations des mécanismes de la calcification : des détériorations microstructurales concomitantes avec une pigmentation brune anormale de la couche interne des tests (Planches 1 et 2). Les mécanismes de biominéralisation contrôlant l'intégration du carbonate de calcium dans les structures coquillières ne sont pas altérés : le taux de calcium, la minéralogie et la composition en acides aminés des matrices organiques cristallines sont équivalents dans les valves brunes et les valves blanches (Figure 1). Par contre, la présence d'une eumélanine, responsable de la coloration brune, est détectée dans les matrices organiques insolubles des régions coquillières aux biocristaux difformes. Ce pigment perturbe donc le processus d'élaboration des cristaux calcitiques foliés, constituant la microstructure normale de *Pecten maximus*.

Ces altérations coquillières sont le signe d'une perturbation physiologique évidente chez l'organisme qui les a produites. Elles engendrent une dégradation des structures calcifiées propice au développement de parasites, générant à leur tour de profonds bouleversements dans les coquilles (Planches 3 et 4). La pigmentation et les altérations microstructurales constituent un signal précoce des perturbations affectant le bivalve, avant que celui-ci ne présente un affaiblissement visible dans sa chair, au niveau des organes commercialisés.

Un indice de brunissement des valves a été mis au point (Figure 2) de façon à permettre l'observation synthétique de l'ampleur de la pathologie dans le milieu naturel. L'analyse des résultats souligne alors le brunissement intense des individus vivants dans les zones littorales instables, soumis aux apports d'eau douce, vecteurs de produits polluants. Cet environnement global, fragile et déséquilibré périodiquement, induit une amplification des réponses des organismes benthiques aux perturbations d'origines anthropiques. Dans ce contexte, la présence de toxiques a des répercussions très préjudiciables au développement normal d'espèces sensibles. Les problèmes de calcification chez la coquille St-Jacques sont alors considérés comme l'expression de stress physiologiques générés par des perturbations écologiques, particulièrement évidente en milieu très littoral. La distribution des anomalies coquillières en Rade de Brest confirme les facteurs de dégradation de l'environnement soulevés dans plusieurs des travaux scientifiques de Contrat de Baie - Rade de Brest, notamment ceux enregistrés aux limites de l'espace marin et des estuaires.



**Figure 2** : Schéma de découpage de la surface interne de la valve gauche (plate) pour la détermination de l'indice de brunissement. La zone palléale interne est représentée en grisé pour la valve gauche (creuse), le découpage est symétrique.

La suture palléale (zone d'attache des muscles du manteau) délimite deux compartiments : l'un que l'on appellera compartiment externe qui comprend les zones 1 (antérieures et postérieures - a et p), 2 (a et p), 3 (a et p), 4, 5 (a et p) et 6, et un compartiment interne qui comprend les zones 7 et 8.

On donne à chacune des 10 zones externes (ze) touchées par le brunissement une valeur de 1 et à chacune des zones internes (zi) une valeur de 2. Le total pour toutes les zones touchées correspond à un indice d'extension sur une échelle de 1 à 14.

$$I_{extension} = N_{ze} + 2 \cdot N_{zi}$$

L'intensité de la coloration est également prise en compte en associant à chaque zone brune une valeur correspondant à sa couleur. Il a été choisi ici d'appliquer les valeurs suivantes : - zone brun clair (bc) : on garde la valeur attribuée précédemment, - zone brune (b) : valeur de la zone + 0,5, - zone brun foncé (bf) : valeur de la zone + 1.

$$I_{coloration} = N_{zebc} + 1,5 \cdot N_{zeb} + 2 \cdot N_{zebfb} + 2 \cdot N_{zibc} + 2,5 \cdot N_{zibb} + 3 \cdot N_{zibfb}$$

Défini comme indice de brunissement global, reflétant à la fois l'extension et l'intensité de la coloration, cet indice théorique peut donc varier sur une échelle de 1 à 26.

Les indices de brunissement global ont été répartis en 5 classes correspondant à des étapes dans la progression du phénomène. Les indices de rupture (8, 14, et 20) ont été choisis pour les colorations maximales (pl. 1, pl. 2) :

- stade 1 (indice 0) : la face interne des coquilles est bien blanche sans aucune trace brune,
- stade 2 (indice 1 à 8) : la face interne des valves présente un début de brunissement,
- stade 3 (indice 8,5 à 14) : le brunissement s'étend à toute la zone extrapalléale,
- stade 4 (indice 14,5 à 20) : le brunissement gagne la zone intrapalléale, l'intensité de la coloration augmente,
- stade 5 (indice 20,5 à 26) : toute la face interne des valves prend une coloration brun foncé.

Une première démarche expérimentale, sur les élevages en conditions contrôlées, a mis en évidence trois causes potentielles au développement des anomalies dans ces zones variables : une forte baisse de la salinité, et l'action de deux pesticides, à usage personnel ou agricole, couramment utilisés en Rade de Brest : le diuron et le mécoprop. C'est la première fois que de tels effets sont démontrés chez un Pectinidé. Les modifications induites dans les structures calcifiées sont rapidement mesurables par des méthodes de détection précoce des anomalies : l'analyse microstructurale et la colorimétrie (Figure 3, Planche 5).

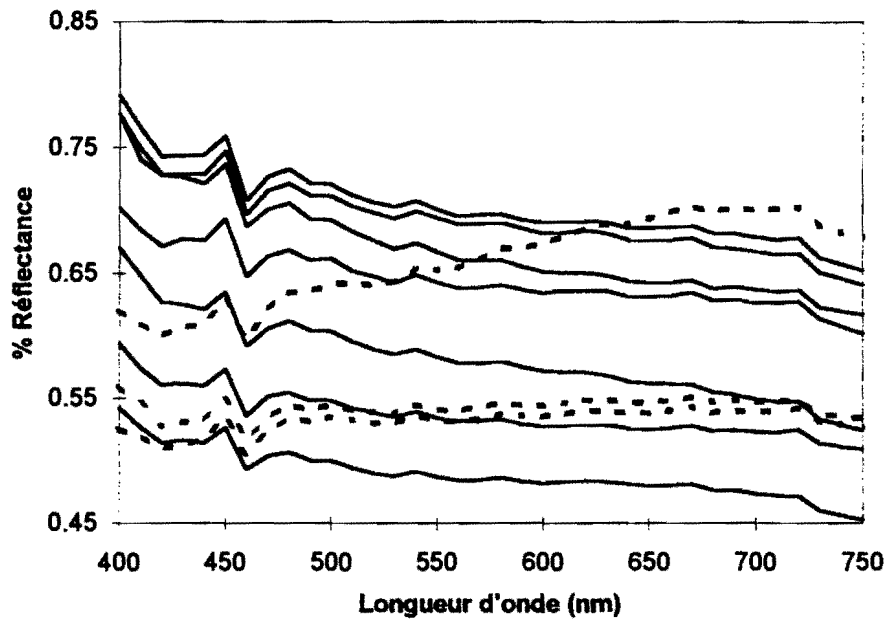
Concernant la reproduction, deux phénomènes apparaissent typiquement reliés aux traitements toxiques, ou à une forte dessalure (25‰) l'atrésie prématurée des ovocytes (planche 6) suivie d'une non-reprise de maturation, et les infiltrations hémocytaires dans la gonade. Les expériences, au cours desquelles ces phénomènes sont constatés, sont également ceux qui génèrent des anomalies coquillères. Ainsi, peut-on considérer d'ores et déjà la présence anormale d'hémocytes, et la lyse prématurée des ovocytes comme des indices de perturbation physiologique.

Toutes ces caractéristiques associées au développement des anomalies de calcification chez *Pecten maximus*, en font un indicateur biologique pertinent des perturbations des milieux littoraux, très utile : à l'écologiste, dans la surveillance du milieu aquatique, au producteur (surtout chez cette espèce commerciale), pour l'estimation de l'état de santé des gisements coquilliers et des propriétés conchylicoles potentielles des zones littorales.

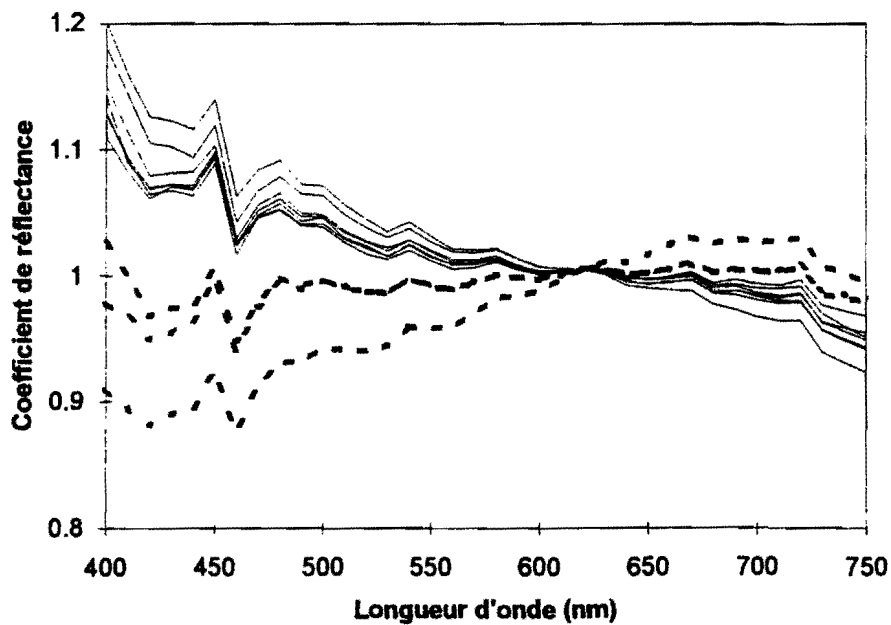
La mise en relation de la fertilité avec les indices d'altérations coquillères devrait être poursuivie.

## Référence

**Larvor H., 1996.** La biominéralisation de *Pecten maximus* L. : Anomalies liées aux perturbations du milieu, thèse soutenue à l'Université de Bretagne Occidentale, Brest. Volume 1 : 186 pages - texte, Volume 2 : 34 - planches photos.



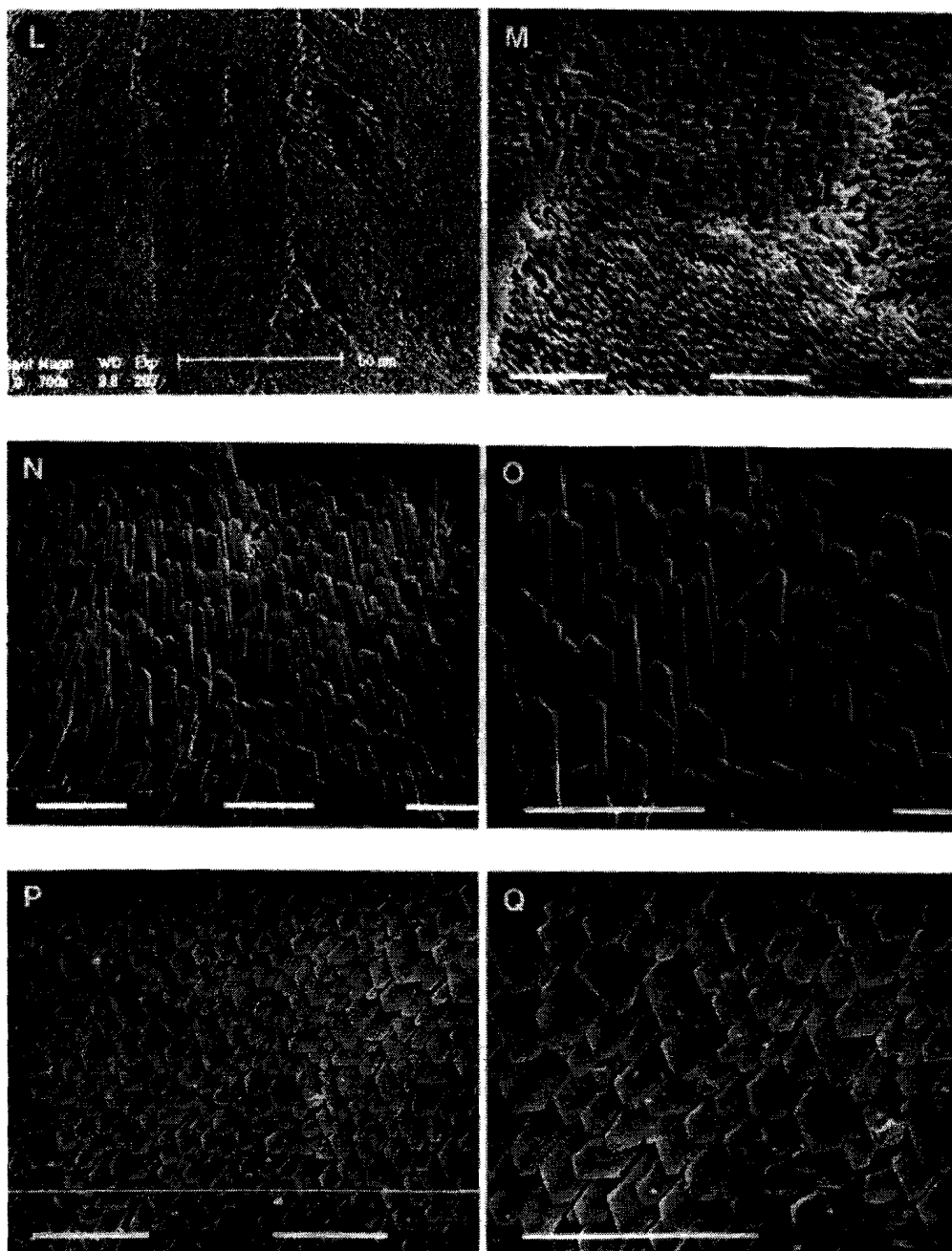
Spectre de réflectance directs de 10 coquilles blanches provenant de la Rade de Brest. La spectrophotométrie permet ici de déceler la présence du pigment dans 3 valves (tracés...) avant que la coloration ne soit visible à l'oeil nu.



Spectres de réflectance normalisés des mêmes coquilles. L'apparition de la pigmentation correspond à un basculement des spectres autour du point d'ordonnée 1 soit une diminution des coefficients dans les bleu-vert et une augmentation dans les rouges.

**Figure 3** : Spectres de réflectance de coquilles St-Jacques

## Planche 1



La microstructure foliée de la couche interne chez les individus sains, entièrement blancs, et dans les endroits blancs des coquilles brunes.

**L.** Aspect général de l'organisation des faisceaux de cristaux foliés à la surface interne des valves blanches.

MEB, échelle 50  $\mu\text{m}$ .

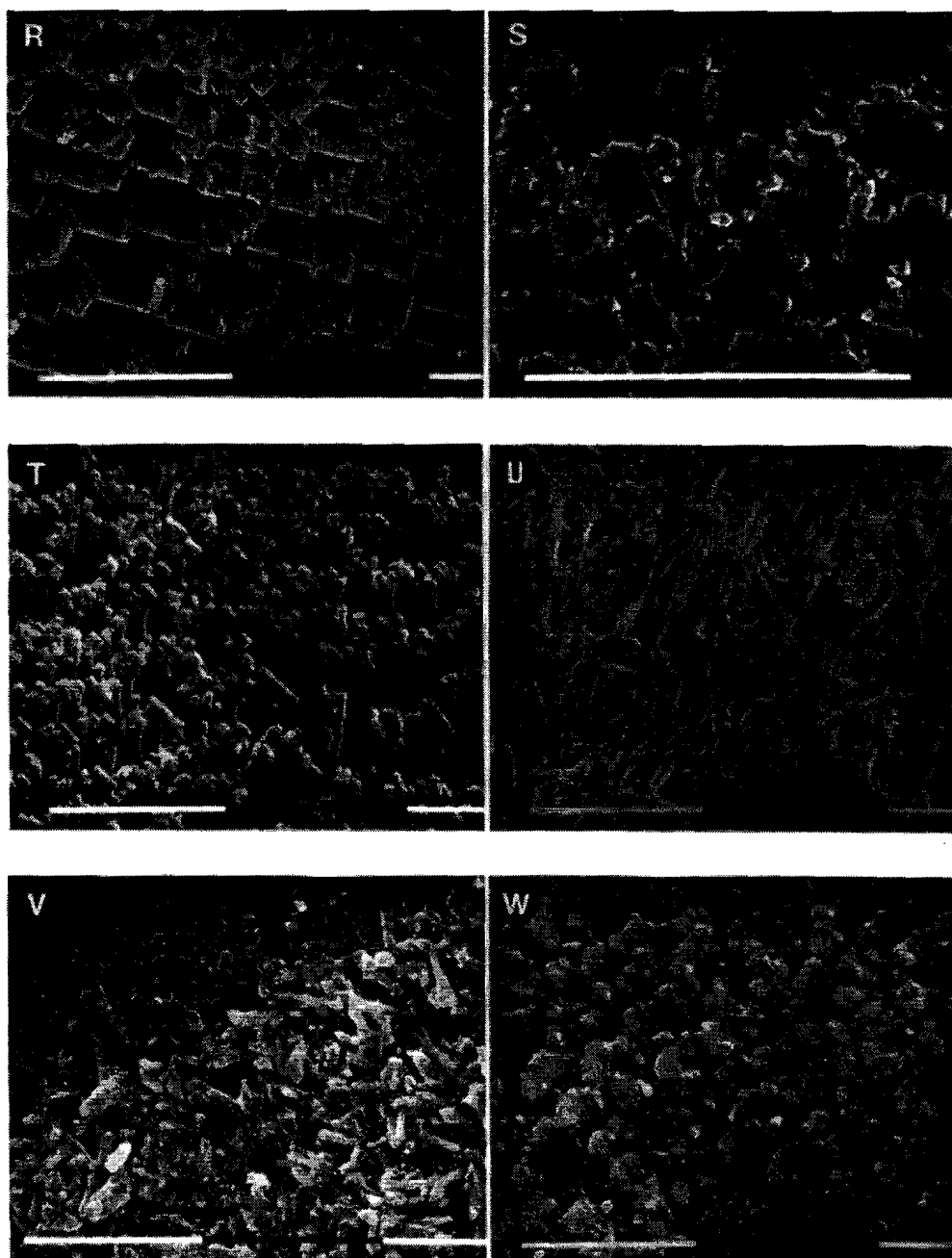
**M.** Les faisceaux cristallins affleurant à la surface interne -surface de croissance cristalline.

MEB, échelle 10  $\mu\text{m}$ .

**N, O, P et Q.** Les cristaux foliés typiques de la microstructure de la couche interne des coquilles saines de *Pecten maximus*. Les marges latérales et apicales des cristaux sont bien régulières. Dans l'épaisseur de certaines lattes (4), on distingue les empilements réguliers des couches de croissance cristalline. Des ponts organiques relient parfois les enveloppes des cristaux les unes aux autres. MEB, échelle 10  $\mu\text{m}$ .



## Planche 2



Les altérations microstructurales des coquilles brunes. Début de brunissement.

**R et S.** Les cristaux foliés sont encore distincts, mais leur extrémité, voire leurs marges latérales, sont bien « rongées ». MEB, échelle 10  $\mu\text{m}$ .

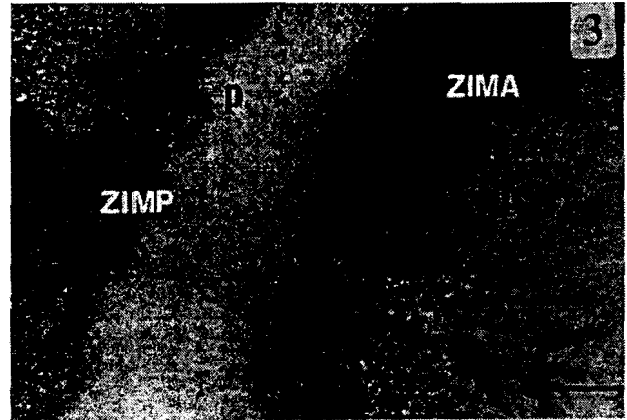
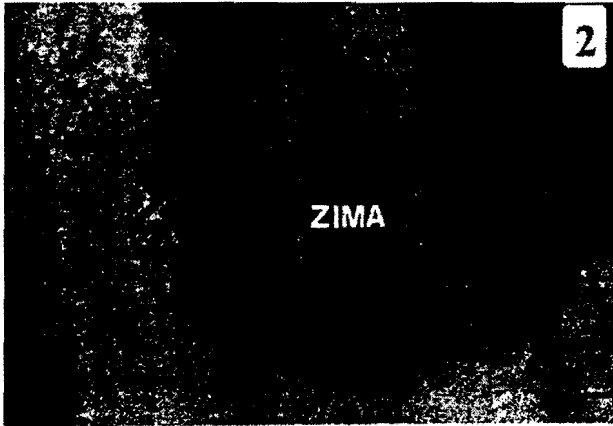
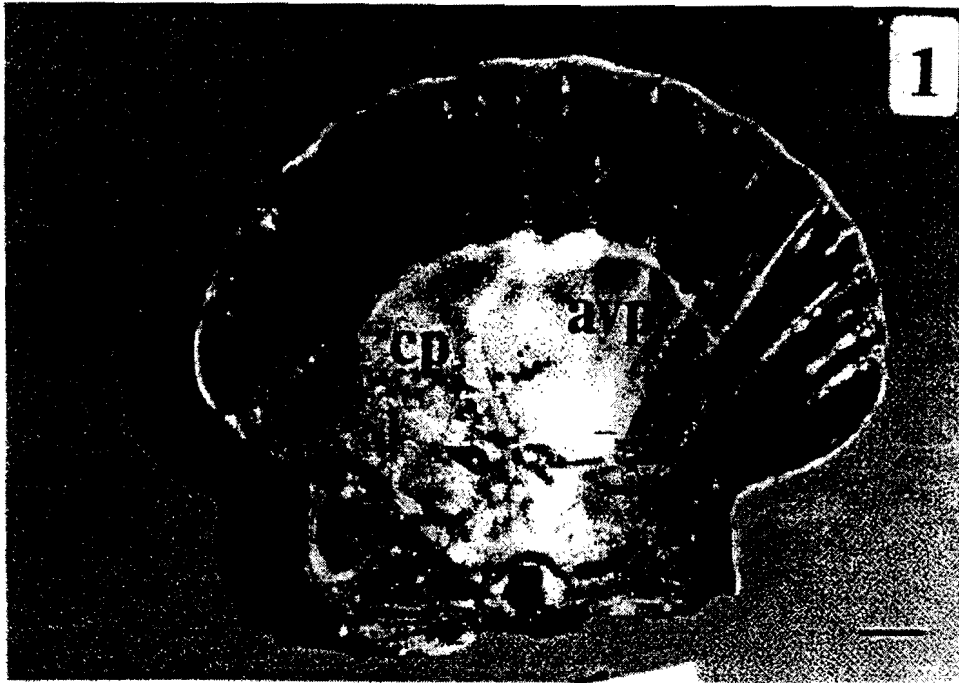
**T.** Les extrémités cristallines sont altérées et dédoublées, comme si un nouveau type cristallin se mettait en place, formé de petits cristaux quadrangulaires. MEB, échelle 10  $\mu\text{m}$ .

**U.** L'organisation et l'aspect des fibrocristaux sont complètement bouleversés. La microstructure foliée est remplacée par un réseau de fibres minces, souvent tordues. MEB, échelle 10  $\mu\text{m}$ .

**V.** La microstructure foliée a disparu, les cristaux néoformés sont très irréguliers et forment une structure lacuneuse. MEB, échelle 10  $\mu\text{m}$ .

**W.** Les cristaux foliés semblent complètement englués, leurs extrémités sont boursouflées. MEB, échelle 10  $\mu\text{m}$

### Planche 3



Les manifestations des endobiontes : les algues vertes performantes.

**1.** Valve gauche fortement parasitée par des endobiontes : des *Polydora* sp. (cp) et des algues vertes (avp), très développées sous le muscle adducteur, en particulier sous les fibres striées.

**2 et 3.** Détails de la surface coquillière dans les zones envahies d'algues vertes. L'affleurement de ces parasites au contact du manteau peut provoquer la formation de pustules (p).

**cp** : chambre de *Polydora*.

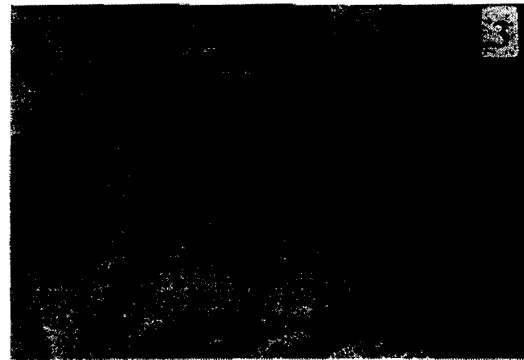
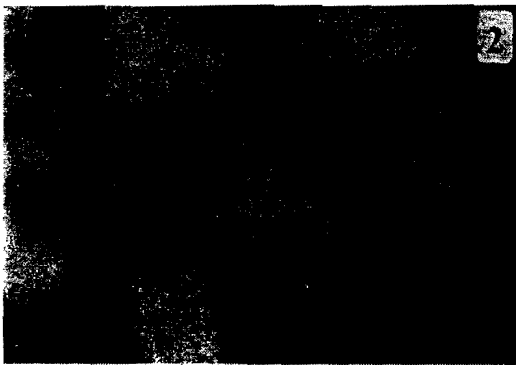
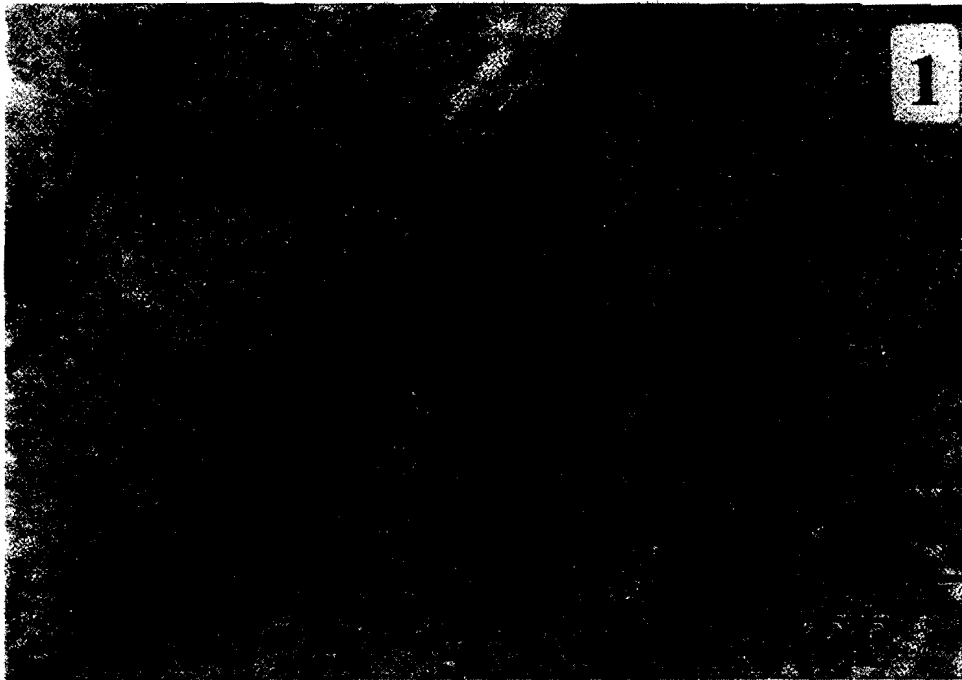
**avp** : algues vertes perforantes.

**zima** : zone d'insertion du muscle adducteur.

**zimp** : zone d'insertion des muscles palléaux.

**p** : pustules.

## Planche 4



Les manifestations des endobiontes : les éponges perforantes.

**1.** Les orifices des galeries forées par les éponges (oge), sur la face externe (fe) de la coquille.

**2 et 3.** Détails de zones de fracture dans la coquille fragilisée par les perforations dues aux éponges : toute l'épaisseur du test est creusé de profondes galeries (g), des pustules se forment lorsque la couche interne est perforée et que l'endobionte touche le manteau.

**fe** : face externe de la valve.

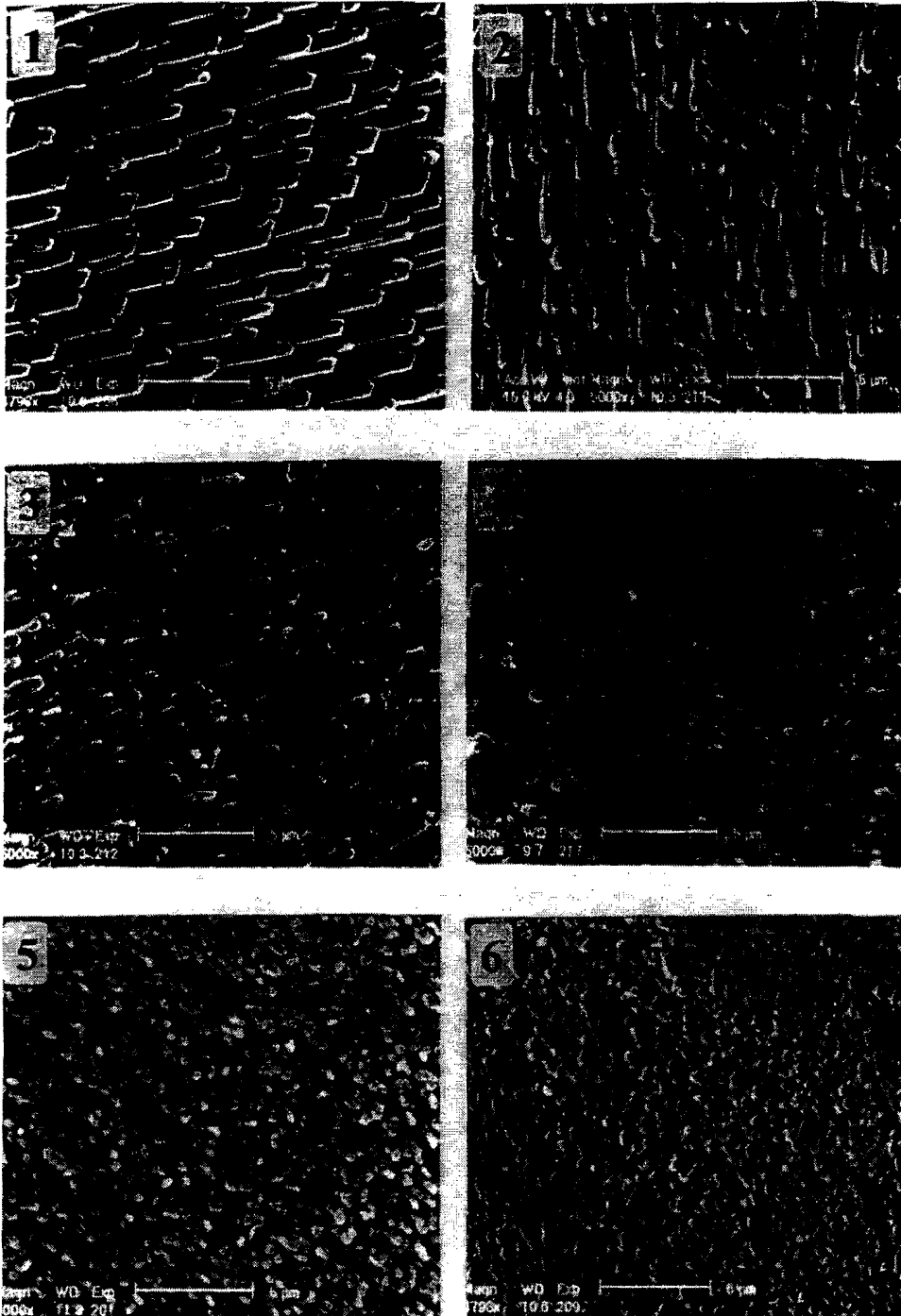
**fi** : face interne de la valve.

**g** : galerie.

**oge** : orifice de galerie.

**p** : pustule.

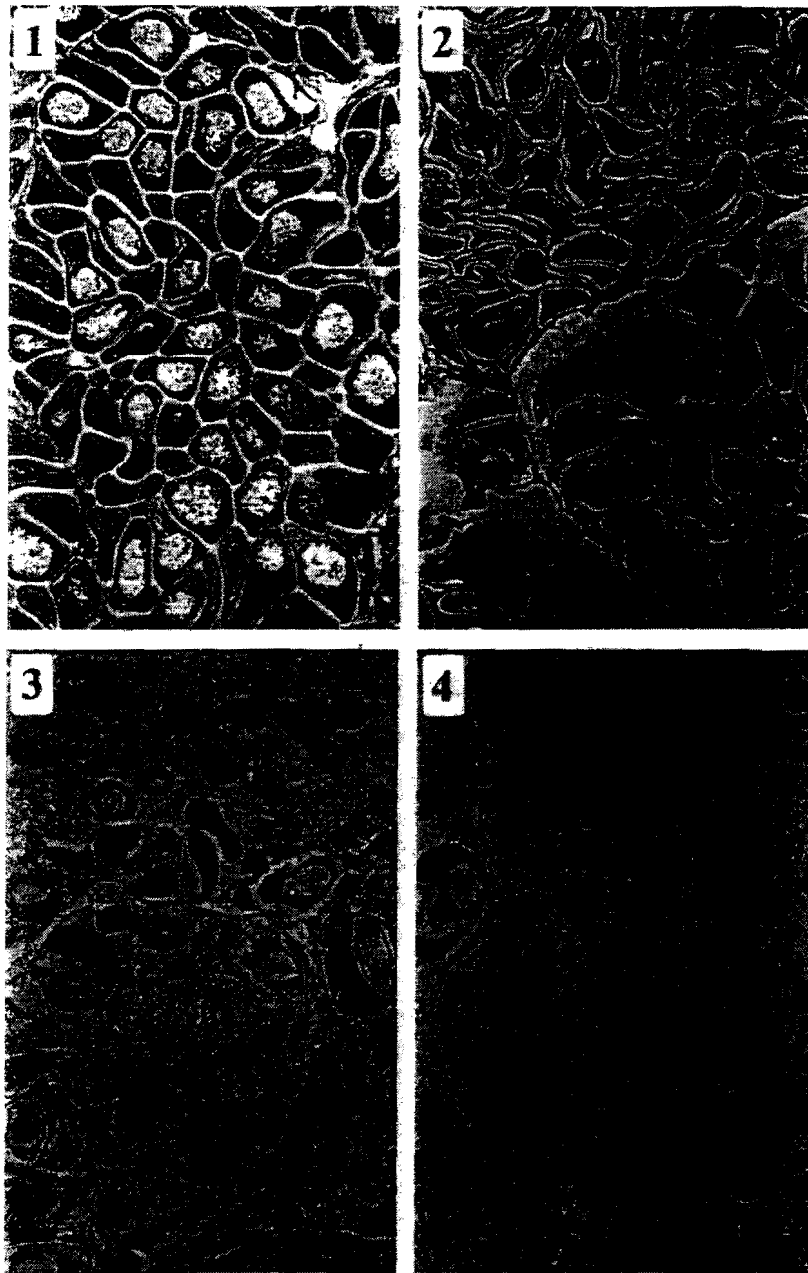
## Planche 5 :



Altérations microstructurales observées après différents traitements.

1. Altérations des extrémités des cristaux foliés chez une coquille juvénile, après 15 jours de traitement au mécoprop 10 µg/l.
2. Altérations après un mois de traitement au mécoprop 10 µg/l.
3. Modifications de la microstructure foliée d'une coquille juvénile après deux mois d'élevage à 28 °/°.
- 4, 5 et 6. Altérations observées sur les valves de coquilles juvéniles traitées au mécoprop 100 µg/l, après un mois (4) ou deux mois (5 et 6) de traitement.

## Planche 6



### Les gonades des coquilles conditionnées en milieu toxique L'atrésie ovocytaire

1. Coupe transversale dans une gonade pleine. Les acini sont bien remplis et les ovocytes sont matures. Coloration trichrome de Masson, échelle 50  $\mu\text{m}$ .
2. Atrésie ovocytaire généralisée. Coloration trichrome de Masson, échelle 50  $\mu\text{m}$ .
3. Les ovocytes situés dans la lumière des acini sont en cours de lyse avancée, il n'en subsiste que des « fantômes membraneux » (fo). On note la présence de kystes parasitaires (k). Coloration trichrome de Masson, échelle 50  $\mu\text{m}$ .
4. La lyse ovocytaire est pratiquement terminée. Coloration trichrome de Masson, échelle 50  $\mu\text{m}$ .

fo : « fantômes d'ovocytes ».

k : kyste parasitaire.

\* ovocytes immatures.

## VARIATIONS DE LA QUALITÉ DES EMBRYONS DE *Crassostrea gigas* ET DE *Pecten maximus* DUES À LA QUALITÉ DES GAMÈTES.

DEVAUCHELLE N.\*, J. COSSON\*\*, G. DORANGE\*\*\*, N. DOBOVICK\*, C.  
FAURE\*, J.P.GIRARD\*\*\*\*, P. MICARELLI\*, L. ORSINI\*,\*, M.E. VALDEZ\*\*\*,

\*Ifremer/centre de Brest, DRV/RA/Mollusques, BP 70, 29280, Plouzané (F)

\*\* URA, 671 du CNRS, Université de Paris 6, Station marine, 06230 Villefranche /mer (F)

\*\*\*Unité de culture cellulaire, UFR des Sciences et Techniques, Université de Bretagne  
Occidentale, 6 Avenue Le Gorgeu, BP 809, 29285, Brest cedex. (F)

\*\*\*\*Université de Nice Sophia Antipolis, faculté des Sciences, laboratoire de Physiologie  
cellulaire et comparée, Parc Valrose, 06034 Nice cedex (F).

**Résumé.** La variabilité qualitative des embryons de bivalves produits en éclosure est d'origine endogène ou exogène. La recherche de méthodes adaptées à la réduction de la variabilité et à l'optimisation des résultats d'élevage nous a conduit à étudier les causes possibles des variations de qualité.

Ce papier présente des résultats d'expériences conduites sur les relations entre variations de la qualité des gamètes mâles et fécondation ou développement embryonnaire. La qualité des gamètes femelles est traitée par la présentation de résultats sur les variations de la densité des ovocytes et par une analyse bibliographique.

### INTRODUCTION

La production artificielle de Mollusques Bivalves est réalisée à l'échelle industrielle, en France, depuis les années 70-80. Une forte variabilité dans la production a été constatée et pose problème. La qualité des gamètes mâle et femelle est, pour partie, à l'origine des variations de la qualité des embryons produits. Nous avons recherché sur le sperme d'huître creuse et de coquille St-Jacques les relations entre des caractéristiques anatomiques, morphologiques et physiologiques et leur pouvoir fécondant. Les résultats des expériences ont été publiés dans plusieurs documents (Devauchelle et al., 1994a, 1994b, Faure et al., 1992, 1994a, 1994b, Faure, 1996). Ce papier en présente une synthèse. La qualité des ovocytes, elle, a été appréciée chez la coquille St-Jacques par les relations entre les résultats de mesures de densité et les performances d'élevage des ovocytes fécondés. Les études réalisées sur les ovocytes sont moins nombreuses que celles réalisées sur le sperme. C'est pourquoi, en ce qui concerne les ovocytes, ce papier présente principalement les résultats d'une analyse bibliographique, qui indique quels sont les critères et les méthodes de mesure choisis, jusqu'à présent, pour qualifier les ovocytes de bivalves, les ovocytes d'autres espèces animales et d'autres modèles cellulaires que les ovocytes.

**Tableau 1** : Indice de mobilité des spermatozoïdes de *Pecten maximus* en fonction du mode d'obtention et du lieu de prélèvement du sperme.

Mode d'obtention du sperme	Sans stimulation	Stimulation thermique			Stimulation chimique	
		Gonade	Gonopore	Eau de mer	Gonade	Gonopore
Lieu de prélèvement du sperme	Gonade	Gonade	Gonopore	Eau de mer	Gonade	Gonopore
Indice de mobilité	1,8 ± 0,4 (6)	2,2 ± 0,3 (6)	5,0 ± 0 (6)	5,0 ± 0 (6)	2,0 ± 0,4 (6)	5,0 ± 0 (6)

Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme : moyenne ± erreur standard, le chiffre entre parenthèses indiquant le nombre de lots de sperme. L'échelle de mobilité de 1 à 5 est définie par : 1 = de 0 à moins de 1 % de cellules mobiles; 2 = de 1 à moins de 25 % de cellules mobiles; 3 = de 25 à moins de 50 % de cellules mobiles; 4 = de 50 à moins de 75 % de cellules mobiles; 5 = de 75 à 100 % de cellules mobiles.

**Tableau 2** : Vitesse de déplacement des spermatozoïdes de *Pecten maximus* en fonction du mode d'obtention et du lieu de prélèvement du sperme.

Mode d'obtention du sperme	Sans stimulation	Stimulation thermique			Stimulation chimique	
		Gonade	Gonopore	Eau de mer	Gonade	Gonopore
Lieu de prélèvement du sperme	Gonade	Gonade	Gonopore	Eau de mer	Gonade	Gonopore
Vitesse progressive (VSL) (µm/sec)	117 ± 7 (3) [20] [23] [24]	121 ± 10 (3) [18] [21] [22]	185 ± 9 (3) [19] [21] [23]	187 ± 8 (3) [21] [23] [24]	119 ± 7 (3) [19] [22] [25]	189 ± 7 (3) [16] [26] [28]
Vitesse curvilinéaire (VCL) (µm/sec)	159 ± 13 (3) [20] [23] [24]	164 ± 12 (3) [18] [21] [22]	266 ± 9 (3) [19] [21] [23]	273 ± 8 (3) [21] [23] [24]	160 ± 7 (3) [19] [22] [25]	281 ± 7 (3) [16] [26] [28]
Vitesse curvilinéaire (VCL) (µm/sec)	138 ± 7 (3) [20] [23] [24]	142 ± 9 (3) [18] [21] [22]	225 ± 8 (3) [19] [21] [23]	230 ± 7 (3) [21] [23] [24]	139 ± 6 (3) [19] [22] [25]	235 ± 6 (3) [16] [26] [28]

Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme : moyenne ± erreur standard, le chiffre entre parenthèses indique le nombre de lots de sperme, le chiffre entre crochets le nombre de spermatozoïdes dans chaque lot.

## IDENTIFICATION DES CAUSES DE LA VARIABILITÉ DES GAMÈTES MÂLES

### Généralités

*Pecten maximus* et *Crassostrea gigas* sont deux invertébrés marins se reproduisant par fécondation externe. Les gamètes sont donc libérés dans le milieu, l'eau de mer, où se produit leur interaction. Si l'ovocyte est une cellule inerte, le spermatozoïde dispose, en revanche, de structures qui lui permettent de se déplacer à la rencontre du gamète femelle ; c'est le processus de nage. La nage débute dès l'émission du spermatozoïde dans le milieu et sa durée est variable selon les espèces. Elle est généralement fonction du capital énergétique dont dispose le gamète mâle. Le déclenchement de la nage, donc du mouvement flagellaire du spermatozoïde résulte du phénomène d'activation mettant en jeu certains éléments physicochimiques du milieu : ions, pH, pression osmotique. Chez de nombreuses espèces, avant d'être actifs lors de l'émission, les spermatozoïdes sont maintenus sous une forme inactive dans les structures urogénitales, leur évitant ainsi une dépense précoce d'énergie. Les étapes d'émission et d'activation des gamètes mâles sont décisives pour la fécondation et le développement embryonnaire. Dans la mesure où l'émission des gamètes ne résulte pas de processus naturels, c'est le cas en éclosérie par exemple, les risques d'augmenter la variabilité des taux de développement sont réels, notamment lorsque les mécanismes d'activation et les signes d'identification de la maturité des gamètes mâles sont inconnus.

Sur le plan anatomique, le spermatozoïde d'huître et de coquille St-Jacques est de type primitif. Il est caractérisé par la présence d'une pièce intermédiaire réduite entourée de 4 mitochondries et est caractérisé par une petite taille (environ 50µm de long). Le spermatozoïde de coquille St Jacques n'a pas de bâtonnet axial, contrairement à celui de l'huître creuse.

### Facteurs de contrôle

#### Le cas de la coquille St-Jacques *Pecten maximus*

##### - Causes de variabilité

**Le mode de collecte** du sperme est une des causes de la variabilité de sa qualité. Selon le lieu de prélèvement, il est composé de cellules de la lignée germinale, de spermatozoïdes d'aspect normal, de spermatozoïdes anormaux et de spermatozoïdes altérés. Les proportions varient selon l'origine des échantillons de sperme observés (Figure 1). La respiration (Figure 2), la mobilité (Tableau 1) et le pouvoir fécondant (Figure 3) varient, eux aussi, selon les lieux de prélèvement. On distingue deux catégories de sperme :

\* la première catégorie correspond au sperme dont les valeurs de respiration, de mobilité et de pouvoir fécondant sont faibles. Il provient de ponctions pratiquées directement dans les gonades d'animaux, après que ou sans que les reproducteurs aient subi une stimulation d'émission de gamètes (injection de sérotonine ou choc thermique),

\* la seconde catégorie correspond au sperme dont les mobilité, respiration et pouvoir fécondant sont élevés. Un tel sperme est prélevé concentré au niveau du gonopore de géniteurs, ayant été soumis à une injection de sérotonine ou ayant subi un choc thermique, ou à du sperme émis dans l'eau de mer à la suite d'un choc thermique.

Si le mode de prélèvement du sperme modifie les capacités énergétiques des spermatozoïdes, donc l'intensité et la puissance de nage (Tableau 2) et le pouvoir fécondant (Figure 3, Tableau 3), en revanche, la forme de la trajectoire reste homogène et circulaire, (Figure 4) et l'aspect des mouvements ou l'indice de linéarité sont de caractéristiques constantes (Tableau 4).



**Tableau 3** : Analyse des corrélations entre la respiration, l'indice de mobilité et le pouvoir fécondant de spermatozoïdes de *Crassostrea gigas*.

	Respiration	Pouvoir fécondant	Indice de mobilité	Vitesse moyenne
Respiration	/	- 0,036	- 0,166	- 0,172
Pouvoir fécondant	-	/	- 0,165	- 0,170
Indice de mobilité	-	-	/	0,137
Vitesse moyenne	-	-	-	/

Valeurs du coefficient de corrélation ( R ) pour n=24 n= nombre de lots de sperme; la respiration (en nmol O<sub>2</sub>/min/mg protéines) est exprimée selon la formule : log (respiration), le pouvoir fécondant (en %) selon la formule : arcsinus (pouvoir fécondant /100), l'indice de mobilité selon l'échelle de 1 à 5 précédemment décrite et la vitesse moyenne en µm/sec.

**Tableau 4** : Forme de la trajectoire, aspect des mouvements et indice de linéarité des spermatozoïdes de *Pecten maximus* en fonction du mode d'obtention et du lieu de prélèvement du sperme.

Mode d'obtention du sperme	Sans stimulation	Stimulation thermique			Stimulation chimique	
		Gonade	Gonopore	Eau de mer	Gonade	Gonopore
Lieu de prélèvement du sperme	Gonade	Gonade	Gonopore	Eau de mer	Gonade	Gonopore
Forme de la trajectoire	homogène circulaire	homogène circulaire	homogène circulaire	homogène circulaire	homogène circulaire	homogène circulaire
Aspect des mouvements	propulsifs	propulsifs	propulsifs	propulsifs	propulsifs	propulsifs
Indice de linéarité (IL)	0,71 ± 0,04 (3) [20] [23] [24]	0,66 ± 0,02 (3) [18] [21] [22]	0,69 ± 0,02 (3) [19] [21] [23]	0,68 ± 0,02 (3) [21] [23] [24]	0,69 ± 0,03 (3) [19] [22] [25]	0,67 ± 0,02 (3) [16] [26] [28]

Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme : moyenne ± erreur standard. Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de lots de sperme, le chiffre entre crochets, le nombre de spermatozoïdes dans chaque lot. L'indice de linéarité, compris entre 0 et 1, est calculé par le rapport vitesse progressive/vitesse curvilinéaire.

La **durée de dilution** des lots de sperme dans l'eau de mer influence la durée de l'aptitude du sperme à féconder les ovocytes. A température ambiante, l'aptitude à féconder est optimale pendant une heure (Figure 5). Si le sperme est collecté concentré, par aspiration dans une seringue au niveau du gonopore et qu'ensuite il est dilué au fur et à mesure des besoins, il garde un pouvoir fécondant optimal pendant au moins 7 heures (6 heures de conservation au frais à 4°C) et 1 heure de dilution dans l'eau de mer (Figure 5).

**L'abaissement du pH dans le milieu de dilution** permet, par ailleurs, de bloquer la mobilité des spermatozoïdes (Figure 6) et d'en préserver les réserves énergétiques indispensables à la nage précédant la fécondation. Le blocage à pH 5 est réversible dans le cas de blocages de 10 à 15 minutes (Figure 7). L'abaissement du pH entraîne des modifications de la nage, un changement de trajectoire et une diminution de l'indice de linéarité.

Le pH des milieux gonadiques et rénaux est proche de 6,5. Cette valeur est inférieure aux pH de l'hémolymphe et du liquide péricardique proches de 7, lui-même inférieur au pH de l'eau de mer qui avoisine 8.

Si le pH paraît nettement impliqué dans les mécanismes de répression/activation de l'activité des spermatozoïdes, en revanche, **la pression osmotique et la concentration en sodium** ne semblent jouer aucun rôle à ce niveau.

Enfin, chez la coquille St-Jacques, les **variations individuelles** ont de faibles répercussions sur le pouvoir fécondant. Elles ne peuvent être considérées comme une cause de principale variabilité de la qualité des gamètes.

#### **- Solutions pratiques issues de ces résultats**

Les conditions d'obtention du sperme jouent un rôle déterminant sur les capacités physiques et physiologiques des spermatozoïdes. Le passage du sperme dans le rein est une étape nécessaire à l'activation des gamètes mâles. Par conséquent, pour disposer de sperme de qualité optimale, il convient de prélever du sperme concentré au niveau du gonopore après stimulation chimique des reproducteurs (voir document Devauchelle et *al.* sur l'induction de la ponte par les neurotransmetteurs, dans ce rapport), de le stocker à 4°C pour réduire les dépenses énergétiques des spermatozoïdes, d'éliminer les lots de sperme dont les spermatozoïdes bougent peu après la minute de dilution dans l'eau de mer, de prendre des précautions quant au ratio spermatozoïdes/ovocyte. Le chiffre de 100 spermatozoïdes par ovocyte est un ratio satisfaisant pour éviter la polyspermie et permettre la fécondation (Figure 8).

La concentration en spermatozoïdes d'un échantillon de sperme est évaluée par comptage sous microscope photonique, par comptage automatisé (logiciel d'analyses d'images) ou par mesure de l'absorption à 480nm .

#### Le cas de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

##### **- Causes de variabilité**

**Le mode de prélèvement du sperme** : Jusqu'à présent, lorsque le sperme est recueilli par scarification de la gonade, après une stimulation thermique ou chimique (5HT), les spermatozoïdes d'huître creuse paraissent avoir une assez faible mobilité (Figure 9). En moyenne, seulement 25 à 50 % des spermatozoïdes d'un lot de sperme sont mobiles. Leur consommation d'oxygène est faible (Figure 10) comparée à celle de spermatozoïdes de

coquille St-Jacques. Cependant, le pouvoir fécondant est en moyenne plus faible que celui du sperme de la coquille St Jacques, mais non négligeable (Figure 11).

Dans tous les cas, la trajectoire est hétérogène. Les mouvements apparaissent peu propulsifs c'est-à-dire que le déplacement des spermatozoïdes est peu important. Cette trajectoire erratique (Figure 12) diffère très nettement de celle des spermatozoïdes de *Pecten maximus*, qui nous l'avons vu, est homogène et circulaire.

Lorsque le sperme est collecté dès les premières émissions, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les paramètres de mobilité, de respiration et le pouvoir fécondant. Dans ces conditions, il n'a pas été établi que les changements de mode de prélèvement de sperme (scarification, prélèvement au niveau du gonopore ou dans l'eau de mer après chocs thermiques ou injections de sérotonine dans les gonades) induisent des variations nettes de la qualité des spermatozoïdes. Toutefois, la composition des lots de sperme diffère (Tableau 5). Lorsque le sperme est recueilli 10 minutes après les premières émissions, sa mobilité est accrue. Nous avons pu constater au cours de tests réalisés pendant l'été que dans ce cas, son pouvoir fécondant est lui aussi augmenté (Figure 13).

Sur le plan physiologique, chez l'huître creuse, les spermatozoïdes sont féconds en l'absence d'un transit par les voies rénales. Ce n'est pas le cas chez la coquille St Jacques.

**Tableau 5:** Caractéristiques des spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* en fonction du mode d'obtention et du lieu de prélèvement du sperme.

Mode d'obtention du sperme	Sans stimulation	Stimulation thermique		Stimulation chimique	
		Gonade	Gonopore	Gonade	Gonopore
Lieu de prélèvement du sperme	Gonade	Gonade	Gonopore	Gonade	Gonopore
Cellules jeunes de la lignée germinale mâle	oui: gonies et spermatocytes	oui : spermatocytes et spermatides	oui: quelques spermatocytes	débris cellulaires dans 1 lot	non observées sur les coupes sauf dans 1 lot spermatocytes
Spermatozoïdes normaux	selon les lots majoritaires ou minoritaires	oui	oui	minoritaires	majoritaires
Spermatozoïdes anormaux	oui	oui, nombreux selon les lots	oui	oui	oui
Spermatozoïdes altérés	oui	oui	oui	oui	oui

**Le mode de conservation à court terme** des spermatozoïdes a un effet sur la vitalité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Chez l'huître creuse, la mobilité (Figure 14) et le pouvoir fécondant (Figure 15) baissent très rapidement après que les spermatozoïdes aient été dilués dans l'eau de mer. Le stockage du sperme d'huître concentré, au frais (4°C) permet de reculer les opérations de fécondation de quelques heures (3 à 4 heures) sans altérer le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

**L'abaissement du pH** du milieu de dilution des spermatozoïdes réprime l'activité des spermatozoïdes (Figure 16), mais de manière moins sensible que chez la coquille St-Jacques.

Des modifications dans **la pression osmotique et la concentration en sodium** des milieux de dilution n'ont pas permis d'accentuer le blocage, de la mobilité. Le **potassium** pourrait, en revanche, être impliqué dans les mécanismes d'activation/inactivation des spermatozoïdes.

Chez l'huître, **les variations individuelles** de la qualité du sperme sont très marquées. Elles se traduisent par des pertes plus ou moins rapides de l'aptitude à féconder les ovocytes et par une grande variété des trajectoires des spermatozoïdes. De ce fait, le ratio optimal spermatozoïdes/ovocyte est fluctuant.

#### **- Solutions pratiques issues de ces résultats**

Il est conseillé, dans l'état actuel des connaissances, de récolter du sperme concentré au niveau du gonopore, après avoir injecté de la sérotonine (0.2 ml de solution 10<sup>-3</sup> M) dans la gonade, de le faire 10 minutes environ après les premières émissions. Le ratio spermatozoïdes/ovocyte de 500 (Figure 17) permet d'éviter l'insuffisance de spermatozoïdes fécondants et de limiter la polyspermie.

## **LA VARIABILITÉ DE LA QUALITÉ DES GAMETES FEMELLES**

Des expériences réalisées dans de nombreux sites d'élevage ont révélé l'existence d'une forte variabilité de la qualité des ovocytes.

La notion de « normalité ovocytaire » ou de « qualité ovocytaire » qui traduit la compétence des cellules sexuelles femelles à démarrer, après fécondation, un nouveau cycle biologique est une notion floue que nous cherchons à préciser à partir de critères objectifs.

Chez la coquille St-Jacques, nous avons montré que la densité des ovocytes, évaluée à partir des résultats d'une centrifugation sur gradient de percoll, pouvait refléter une valeur biologique de l'ovocyte en termes de taux de survie et de croissance des jeunes larves (Faure, 1990, Faure et al, 1992, Devauchelle et al, 1994a). Lorsque les densités diffèrent de la valeur de 1.041, cela signale la présence d'ovocytes immatures (densité forte) ou surmatures (densités plus faibles) : (Figure 18). L'origine des variations de la densité des cellules peut-être attribuée à des modifications biochimiques, anatomiques, ou morphologiques. La validation du test à l'échelle de l'écloserie n'est pas faite. Elle pourrait être développée en ayant comme objectif, dans un premier temps, d'utiliser le « test » percoll pour éviter de mettre en élevage des lots d'ovocytes de très faible viabilité.

A ce jour, aucun critère de vitalité fiable et simple n'est utilisé en écloserie. Avant d'approfondir la recherche de tels critères, nous avons procédé à une analyse bibliographique qui a été réalisée sans limitation d'espèces. Elle permet de constater que, quelque soient les espèces considérées, peu de relations ont, à ce jour, été établies entre paramètres dits de « qualité » de l'ovocyte et paramètres de survie et/ou de croissance (Tableaux 6 et 7). Les principales conclusions de l'analyse sont les suivantes :

**Tableau 6 : Récapitulatif des principaux critères globaux de la qualité des ovocytes, cités dans la littérature**

Critère	Méthode	Modèle	Relation critère- qualité des ovocytes	Référence
Aspects morphologiques :				
* forme	Observation directe (M.P.)*	Bivalves Poissons	(+) variable	Dorange et al. (1989a) Kjorsvik and Lonning (1983), Linhart et al. (1995)
* diamètre	Observation directe (M.P.)*	Crustacés Bivalves Echinodermes Poissons	variable (+) (-) (-) variable	Mashiko (1987) Paulet (1990) Couturier (1992); Cochard & Devauchelle (1993) George et al. (1991) Devauchelle & Coves (1988); Kjorsvik et al. (1990)
* structure	Coupes (M.E.)*	Mammifères	variable	Testart (1985); Kelly and Hu (1989)
* espace péritellin	Coupes (M.E.)*	Bivalves Poissons	(+) (+)	Dorange (1989); Paulet et al. (1989); Yemel'yanova (1980); Makeyeva et Mikodina (1977)
* atrésie	Observation directe (M.P.)*	Bivalves Poissons	(-) (+)	Girard & Devauchelle (com.pers.) Devauchelle & Coves (1988); Kjorsvik and Lonning (1983) (1984) Dorange et al. (1989a), (1989b) (1989c)
	Coupes (M.E.)* (M.P.)*	Bivalves Poissons		Grechenov & Volodin (1982); Chieffi Baccari et al. (1992) Parshard & Guraya (1978)
*intégrité des membranes	Bleu Trypan (Exclusion) Histologie classique Coupes (M.E.)	Bivalves Poissons Bivalves		Dorange, Valdez (com. pers.) Yemel'yanova (1980) Dorange (1989), Paulet (1990)
* intégrité des nucléotides	Tranfert d'énergie par fluorescence	Echinodermes		Hisatoshi et al. (1996)
Densité				
Régularité des premières divisions	Centrifugation sur gradient de Percoll	Bivalves	(+)	Faure et al. (1992); Devauchelle et al. (1994a) Kjorsvik (1990) Humeau (1985)
	Observation directe (M.P.)	Poissons Mammifères		Casse et al. (sous presse in Véliger) Whyte et al. (1990)
	Rapport RNA/DNA			Tazawa et al. (1985); (1986); Yasum asu et al. (1988) ; Gosh (1983); (1985)
Consommation d'O <sub>2</sub>	Oxymétrie	Bivalves Poissons		

Plusieurs paramètres ont été testés sur des gamètes et des embryons de bivalves. Loosanoff et Davis (1963) aux USA et Imai (1972), au Japon, évaluaient la qualité par l'état de maturation, surtout apprécié par la forme des gamètes. La proportion de spermatozoïdes/ovocyte nécessaire pour assurer une bonne fécondation et l'effet du stress sur les géniteurs étaient évalués par Gruffydd & Beaumont, 1970; Bayne, 1972; Bayne *et al.*, 1975; Lucas in Bougis *et al.*, 1976. Une approche différente de la conception de la qualité ovocytaire, basée sur les aspects structurels déjà mis en évidence par Coe & Turner (1938) s'est développée grâce à l'utilisation de la microscopie électronique à transmission (Daniels *et al.*, 1973; Gutierrez *et al.*, 1978; Kubo *et al.*, 1979; Lowe *et al.*, 1982). Puis, au cours de la précédente décennie, les études sur la morphologie et les composés biochimiques des cellules sexuelles matures ont été corrélés à leur aptitude au développement (Cochard, 1985; Pipe, 1985, 1987a, 1987b; Besnard, 1988; Lubet *et al.*, 1987; Paulet *et al.*, 1988, 1989; Dorange, 1989; Dorange *et al.*, 1989a; 1989b, 1989c; Gueguen, 1989; Devauchelle et Mingant, 1991; Paulet, 1990; Le Pennec *et al.*, 1990; Faure *et al.*, 1992; Delaunay, 1992; Marty *et al.*, 1992; Seguineau *et al.*, 1993; Delaunay *et al.*, 1993; Faure *et al.*, 1994a, 1994b; Devauchelle *et al.*, 1994a, 1994b; Soudant, 1995; Faure, 1996; Soudant *et al.*, 1996; Gérard *et al.*, dans ce document). Les bivalves étudiés sont principalement *Mytilus edulis* et *Pecten maximus* et plus rarement les ostréidés : *Ostrea edulis*, *Crassostrea virginica* et *Crassostrea gigas*.

Plus récemment, les recherches entreprises pour apprécier la qualité des ovocytes, non chez des Bivalves, mais chez des Echinodés, prennent en compte le pH intracellulaire et la structure moléculaire du contenu des gamètes (Chiba & Chichibu, 1993; Uchiyama *et al.*, 1996).

En raison de la diversité des modèles biologiques étudiés, les résultats des diverses méthodes mises en oeuvre pour évaluer la qualité globale des émissions gamétiques sont extrêmement variables. Les principaux résultats fournis par la littérature, les plus en relation avec notre étude, sont résumés dans les tableaux 6 et 7. Le tableau 8 résume les méthodologies employées dans l'évaluation de la qualité des cellules autres que les ovocytes.

De cet inventaire complexe, il est cependant possible d'identifier des pistes de recherche qui aboutissent à la détermination de la qualité des ovocytes de *Crassostrea gigas*. Ces pistes prennent compte des caractères que nous qualifierons de globaux et spécifiques, ils peuvent être résumés de la manière suivante :

- |                        |   |
|------------------------|---|
| Caractères globaux     | <ul style="list-style-type: none"> <li>● morphologie: aspect dimension, architecture structurale</li> <li>● densité</li> <li>● consommation d'oxygène</li> </ul>  |
| Caractères spécifiques | <ul style="list-style-type: none"> <li>● capacité énergétique</li> <li>● pH intracellulaire</li> <li>● hormones et stéroïdes</li> <li>● contenu biochimique : lipides, glucides, protides, vitamines</li> <li>● anomalies associées au génome.</li> </ul> |

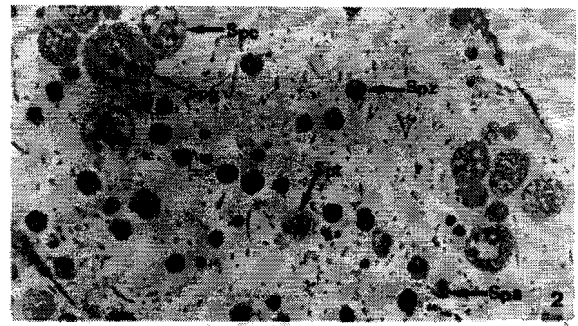
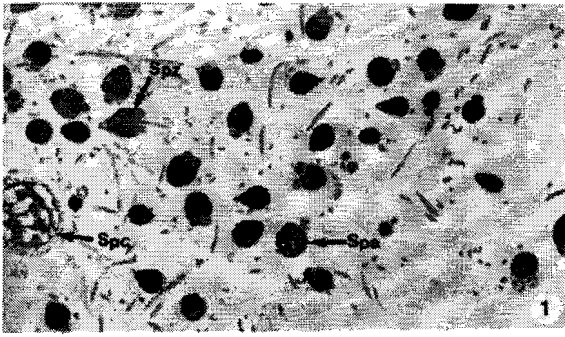
**Tableau 7 : Récapitulatif des principaux critères spécifiques de la qualité des ovocytes**

Critère	Méthode	Modèle	Relation critère- qualité des ovocytes	Référence
Capacité énergétique *rapport ATP/ADP	RMN	Bivalves Poissons		Dorange (com.pers.) Omnès (com.pers.), Chiba & Chichibu (1993)
Synthèse de protéines	Rapport RNA/DNA	Bivalves Poissons		Whyte <i>et al.</i> (1990); Whyte <i>et al.</i> (1991) Buckley (1984); Buckley & Bulow (1987).
pH intracellulaire	RMN	Echinodermes Poissons		Inoue & Yoshioka (1980) Grasdalen & Jorgensen (1985)
Osmolarité	Osmomètre	Poissons	(+)	Kjorsvik & Lonning (1983)
Reprise de méiose	RMN Test de fécondation Coloration de HOESHST	Amphibiens Poissons Bivalves		Morril <i>et al.</i> (1993) Yamamoto T. (1961) Devauchelle <i>et al.</i> (1994b)
Anomalies de méioses	Coloration HOESHST		(-)	Devauchelle & Micarelli (1996)
Hormones *stéroïdes	Dosage	Poissons Mammifères Amphibiens		Brown & Bern (1989); Testart (1985), Greenblatt <i>et al.</i> (1989) Akizawa <i>et al.</i> (1994)
Critères biochimiques (Protéines, Lipides, Glucides)	RMN			
	Sur coupes	Bivalves  Poissons		Dorange (1989); Paulet (1990) Le Pennec <i>et al.</i> (1990); Carajaville <i>et al.</i> (1991) Goodall <i>et al.</i> (1987)
	Dosage	Bivalves  Poissons	(-)	Marty <i>et al.</i> (1992); Ruiz <i>et al.</i> (1992); Delaunay (1992); Delaunay <i>et al.</i> (1993); Massapina & Devauchelle, dans ce document; Soudant <i>et al.</i> (1996); Pazos <i>et al.</i> (1996) Couturier (1992) Devauchelle <i>et al.</i> (1982)
Vitamines	Dosage		(+)	Evans <i>et al.</i> (1996)
		Bivalves Poissons	(+)	Seguineau <i>et al.</i> (1993) Mangor-Jensen <i>et al.</i> (1994) Soliman <i>et al.</i> (1986); Dabrowski and Blom (1993)
Anomalies associées au génom		Bivalves Poissons		Gérard <i>et al.</i> , dans ce document Longwell (1977); Kjorsvik <i>et al.</i> (1984)

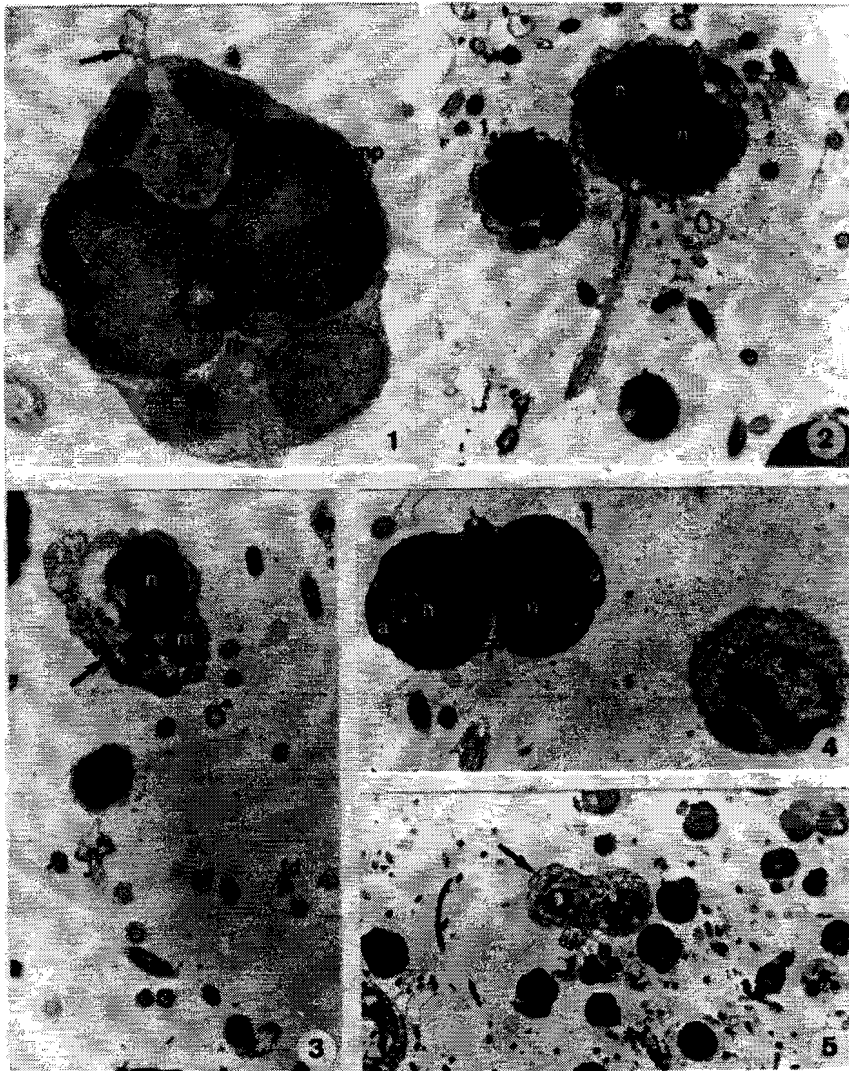
**Tableau 8 :** Récapitulatif des critères de qualité étudiés sur d'autres modèles cellulaires que l'ovocyte, dans un objectif de viabilité cellulaire ou des individus

Critère	Méthode	Modèle	Référence
Apoptose	Immuno marquage Biologie moléculaire Cytométrie de flux	Cellules de L'homme Cellules de L'homme Cellules de L'homme	Ameisnen (1996) Evan <i>et al.</i> (1997) Darzynkiewicz <i>et al.</i> (1997)
Morphologie et viabilité	Cytométrie de flux  Coloration et analyse d'image Perméabilité de membrane Respiration Mobilité	Hémocytes Fibroblastos et Splenocytes Hémocytes Cellules de mammifères Bivalves (sperme) Bivalves (sperme)	Lanz <i>et al.</i> (1993), Fattorossi <i>et al.</i> (1989) Combrier <i>et al.</i> (1989) Matipragada <i>et al.</i> (1990); Tucker <i>et al.</i> (1994) Cook & Mitchell (1989) Faure <i>et al.</i> (1994a); Devauchelle <i>et al.</i> (1994b); Faure (1996) Faure <i>et al.</i> (1994a); (1994b); Faure (1996)
Fonctionnel	Gradient de concentration ionique	Cellules d'animaux mammifères	Hochachka (1986)
Intégrité de la membrane	Radiobiologie	Cellules d'animaux mammifères	Herman R. H. (1961)
Dislocation de la membrane	Gradient de concentration ionique	Cellules d'animaux mammifères	Jewell <i>et al.</i> (1982)
Normalité du développement après induction de stress	Observation directe (M.P.)	Poissons (embryons)	Devauchelle (1978)
pH du milieu		Bivalves (sperme)	Faure (1996)
Composition biochimique	Dosage Dosage	Poissons (embryons) Poissons (embryons)	Devauchelle & Coves (1988), Devauchelle (1987) Devauchelle <i>et al.</i> (1987); (1988)
Densité	Taux d'humidité Poids	Poissons (embryons) Poissons (embryons)	Devauchelle & Cladas (1982) Devauchelle & Cladas (1982)



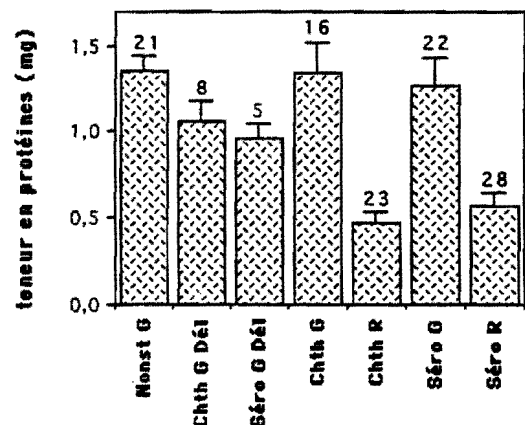
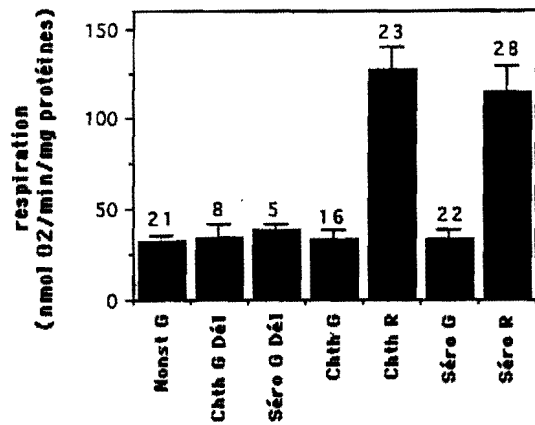


A. Spermatozoïdes anormaux



B. Présence de cellules jeunes de la lignée germinale dans le prélèvement de sperme chez *Pecten maximus* et *Crassostrea gigas* (M.E.T).

**Figure 1.** Structure et stades des spermatozoïdes observés dans des échantillons de sperme de *C. gigas*.



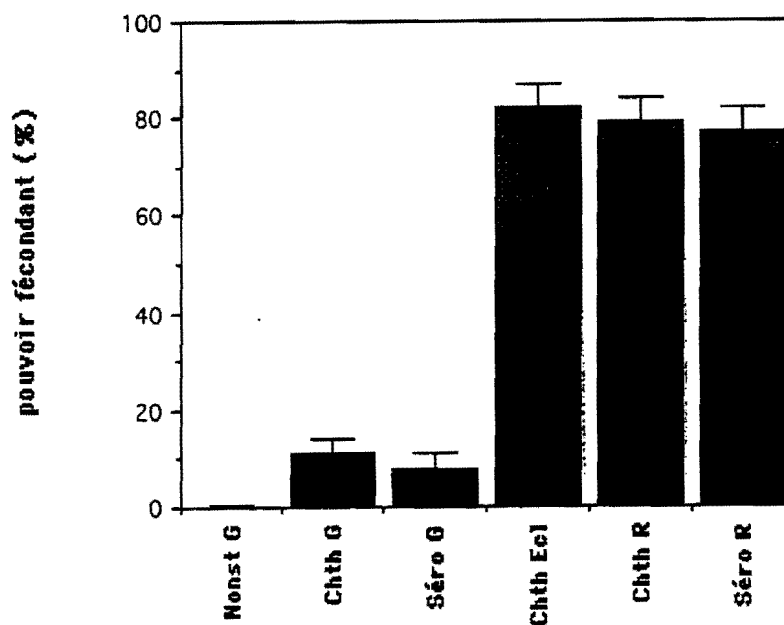
A. Consommation en oxygène

B. Teneur en protéines

**Figure 2.** Mesure de la consommation en oxygène et de la teneur en protéines des spermatozoïdes de *Pecten maximus* prélevés dans différentes conditions puis dilués en eau de mer.

Les spermatozoïdes sont prélevés dans la gonade de géniteurs non stimulés (lots Nonst G), dans la gonade de géniteurs au cours de la stimulation thermique (lots Chth G Dél) ou chimique (lots Séro G Dél), dans la gonade (lots Chth G) au gonopore (lots Chth R) de géniteurs stimulés thermiquement et dans la gonade (lots Séro G) ou au gonopore (lots Séro R) de géniteurs stimulés chimiquement au moment de l'émission des gamètes.

Les chiffres reportés au dessus des barres d'erreur standard indiquent le nombre de lots de sperme.



**Figure 3.** Pouvoir fécondant, en eau de mer naturelle, du sperme de *Pecten maximus* prélevé dans différentes conditions.

Le sperme est prélevé dans la gonade de géniteurs non stimulés (Nonst G); dans la gonade de géniteurs stimulés par chocs thermiques (Chth G) ou par une injection de sérotonine (Séro G); après avoir été émis en eau de mer par des animaux stimulés par chocs thermiques (Chth Ecl); au gonopore de géniteurs stimulés par chocs thermiques (Chth R) ou par une injection de sérotonine (Séro R).

n = nombre de lots de sperme; X = nombre de lots d'ovocytes; les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

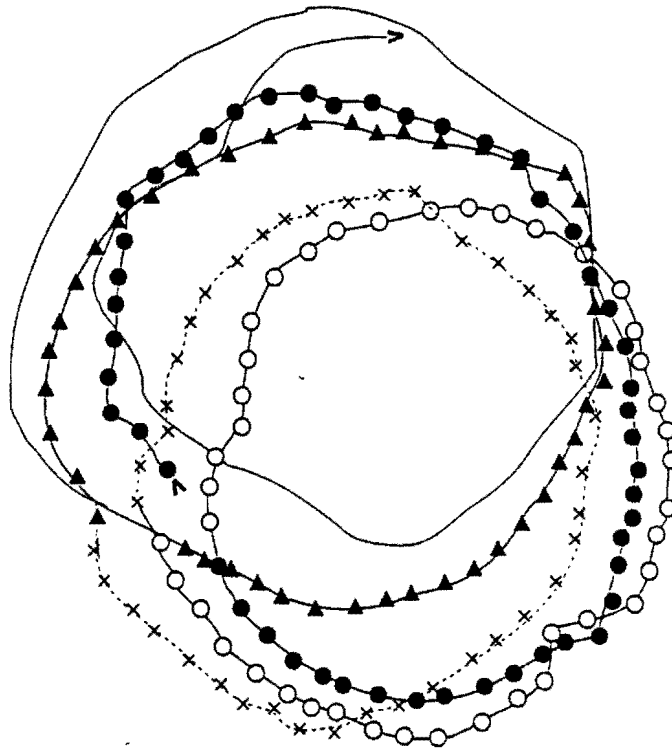


Figure 4. Trajectoire décrite par un spermatozoïde de *Pecten maximus*, en eau de mer.

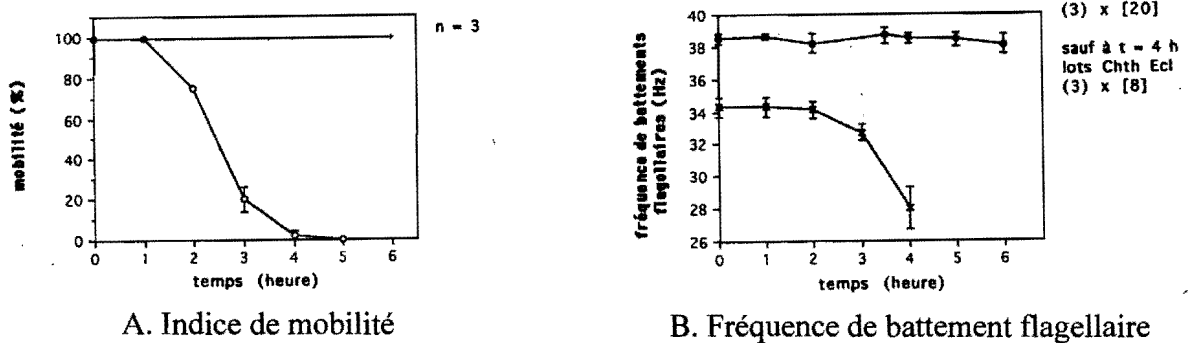
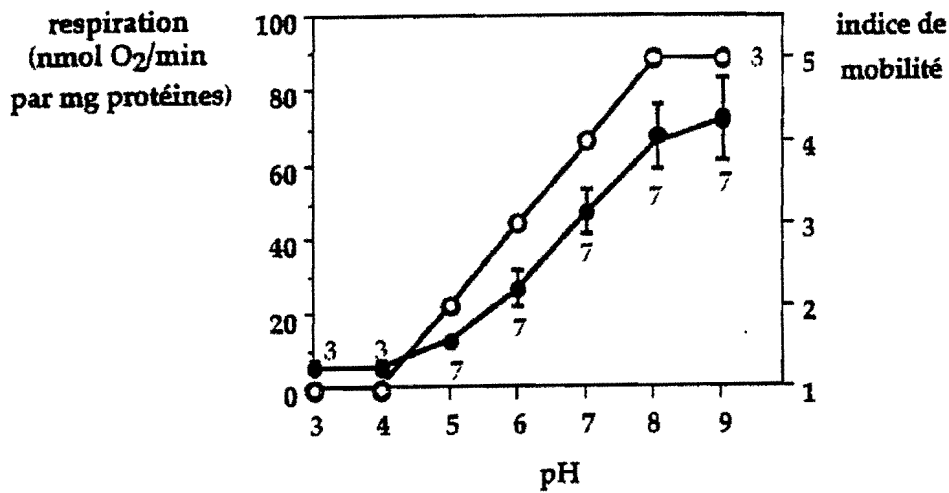


Figure 5. Indice de mobilité et fréquence de battements flagellaires de spermatozoïdes de *Pecten maximus* en fonction du temps pour des gamètes mâles émis en eau de mer par des géniteurs stimulés thermiquement puis conservés à 19°C avant activation (+) et (●); pour des gamètes mâles prélevés au gonopore de géniteurs stimulés chimiquement puis conservés sous forme concentrée à +4° avant activation (○) et (x).

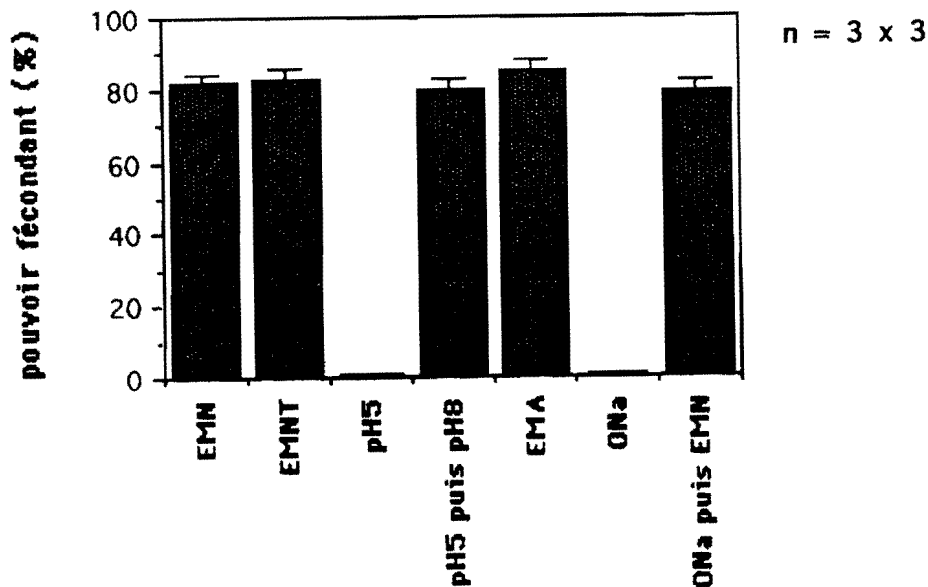
n= nombre de lots de sperme; les barres d'erreurs représentent les erreurs standard; les erreurs standard sont nulles pour la mobilité pour les lots Séro R; le chiffre entre parenthèses indique le nombre de lots de sperme et le chiffre entre crochets le nombre de spermatozoïdes.



**Figure 6.** Respiration et indice de mobilité des gamètes mâles : Eau de mer naturelle à pH variable.

*Pecten maximus*

Effet du pH du milieu de dilution sur la consommation en oxygène (●) et l'indice de mobilité (○) des spermatozoïdes.

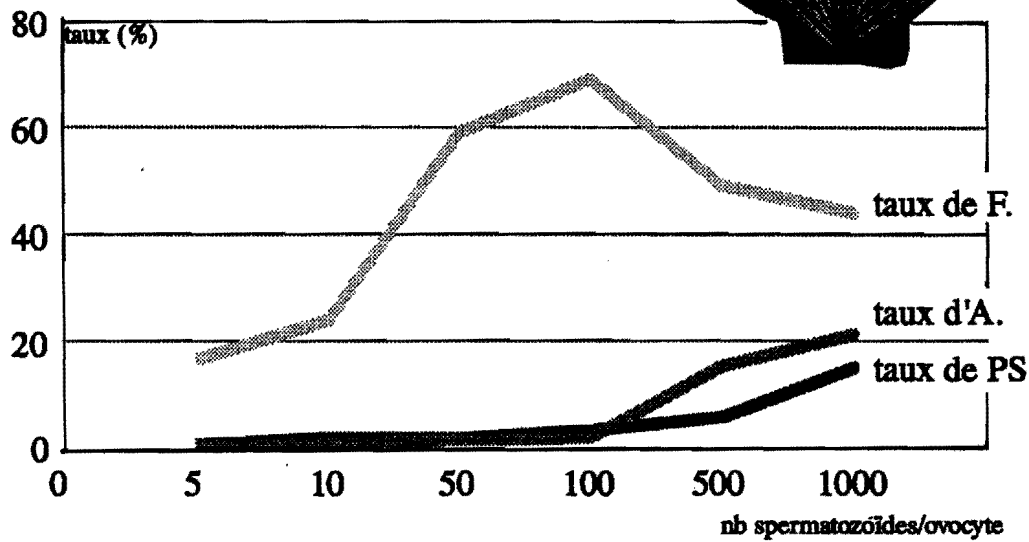
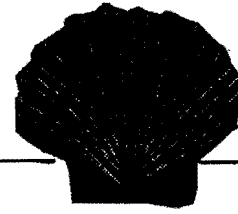


**Figure 7.** Pouvoir fécondant de spermatozoïdes de *Pecten maximus* dilués dans différents milieux

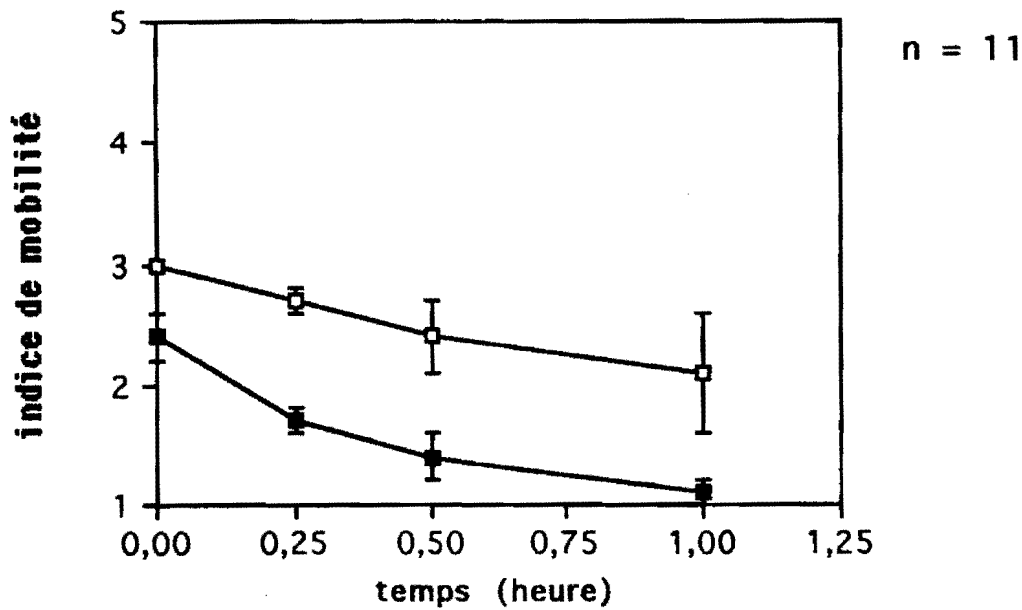
Les milieux de dilution sont les suivants : eau de mer naturelle (EMN), eau de mer naturelle tamponnée à pH 8 (EMNT), eau de mer naturelle à pH5 (pH5), inactivation en eau de mer naturelle tamponnée à pH 5 puis réactivation par adjonction de 25 mM de tris (pH5 puis pH8), eau de mer artificielle (EMA), eau de mer sans sodium (ONa), inactivation en eau de mer artificielle sans sodium puis réactivation en eau de mer naturelle (ONa puis EMN).

n= nombre de lots de sperme X nombre de lots d'ovocytes; les barres d'erreurs représentent les erreurs standard; ces dernières sont nulles en eau de mer naturelle à pH5 et en eau de mer artificielle sans sodium.

# sperme



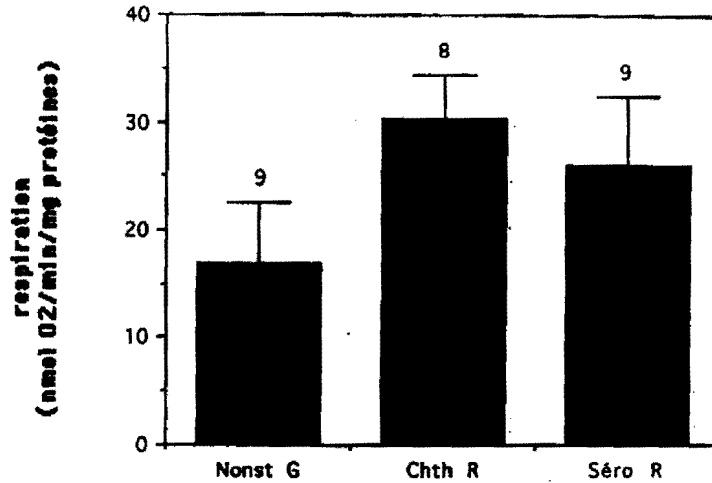
**Figure 8.** Evolution moyenne des taux de fécondation des ovocytes de coquille St-Jacques, des taux de polyspermie (PS) et du taux d'anomalies de développement (A) observés en fonction du ratio spermatozoïdes/ovocyte.



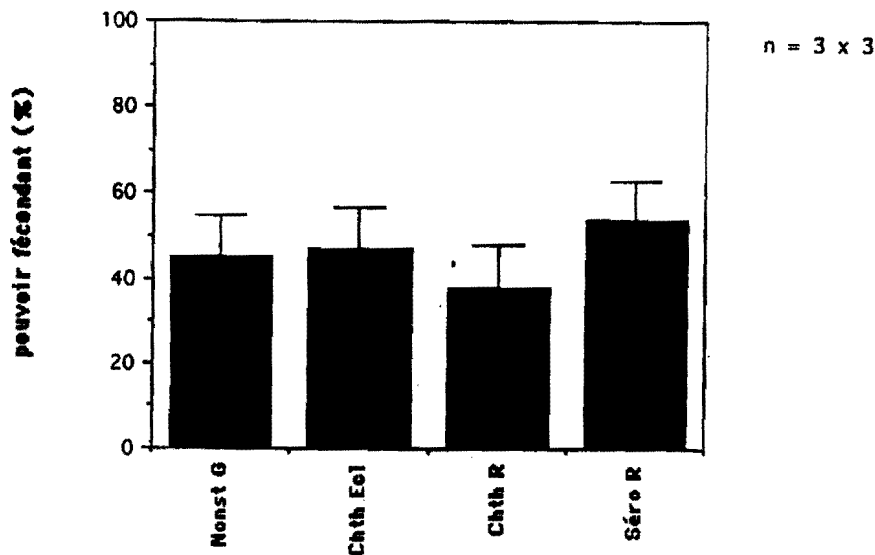
**Figure 9.** Indice de mobilité, au cours du temps, de spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* dilués en eau de mer (●) ou en eau de mer additionnée de 1 mg/ml de BSA (○).

Les spermatozoïdes sont prélevés dans la gonade de géniteurs non stimulés (lots Nonst G) et sont conservés sous forme concentrée à +4°C avant activation.

n= nombre de lots de sperme; l'échelle de mobilité de 1 à 5 est similaire à celle précédemment décrite ; les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.



**Figure 10.** Mesure de la consommation en oxygène du sperme de *Crassostrea gigas* prélevé dans différentes conditions puis dilué en eau de mer naturelle. Le sperme est prélevé dans la gonade de géniteurs non stimulés (Nonst G); au gonopore de géniteurs stimulés par chocs thermiques (Chth R) ou par une injection de sérotonine (Séro R).



**Figure 11.** Pouvoir fécondant, en eau de mer naturelle, du sperme de *Crassostrea gigas* prélevé dans différentes conditions. Le sperme est prélevé dans la gonade de géniteurs non stimulés (Nonst G); après avoir été émis en eau de mer par des animaux stimulés par chocs thermiques (Chth R) ou par une injection de sérotonine (Séro R).

n= nombre de lots de sperme; les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

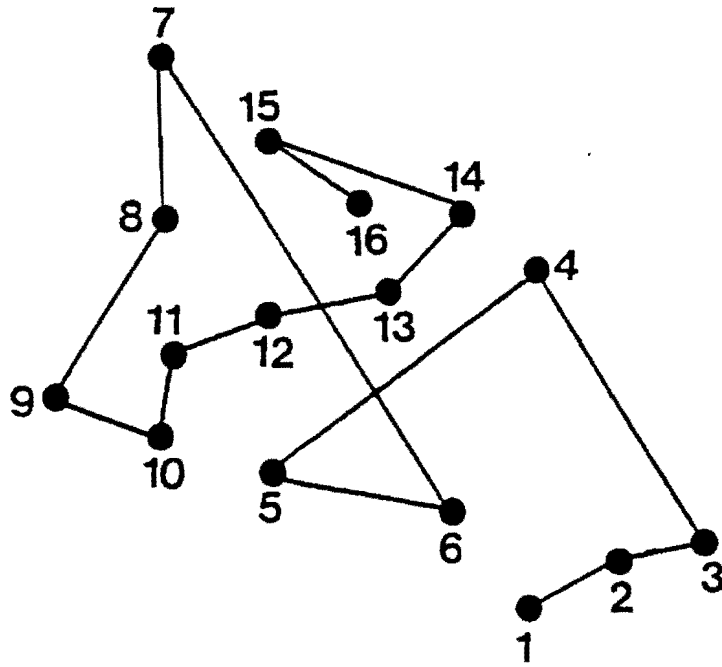


Figure 12. Trajectoire décrite par un spermatozoïde de *Crassostrea gigas*, en eau de mer.

### Gradient de qualité du sperme

pH = 8

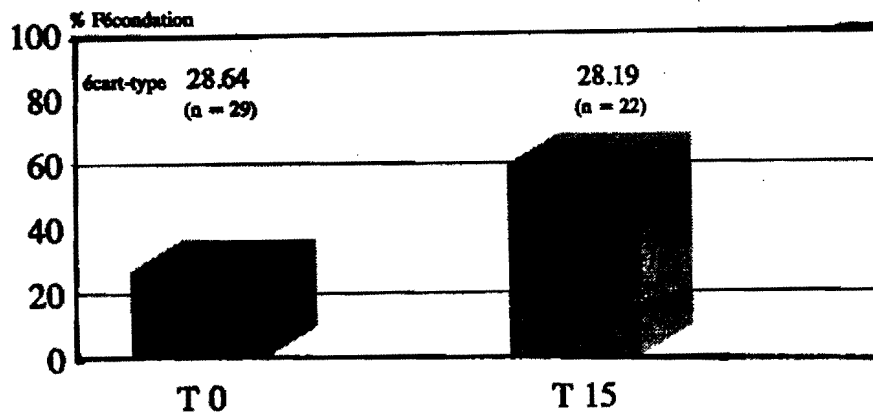
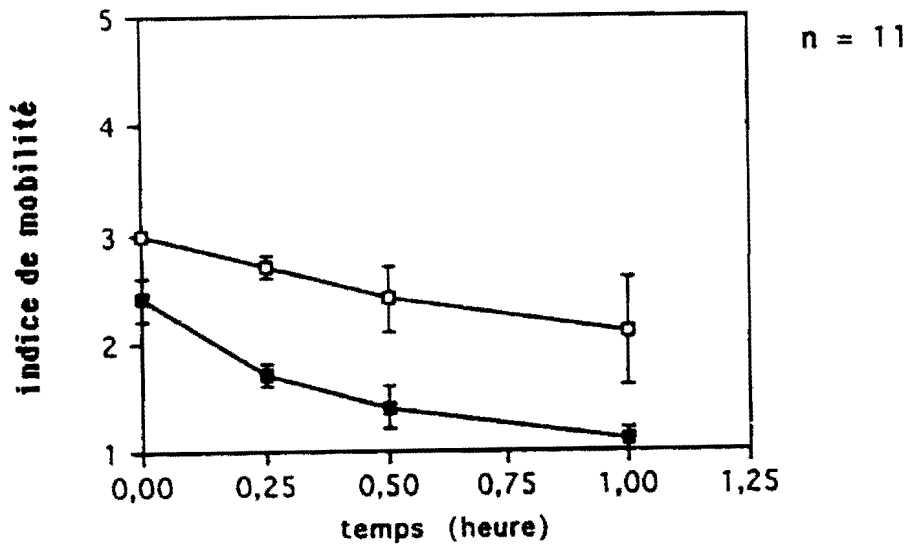


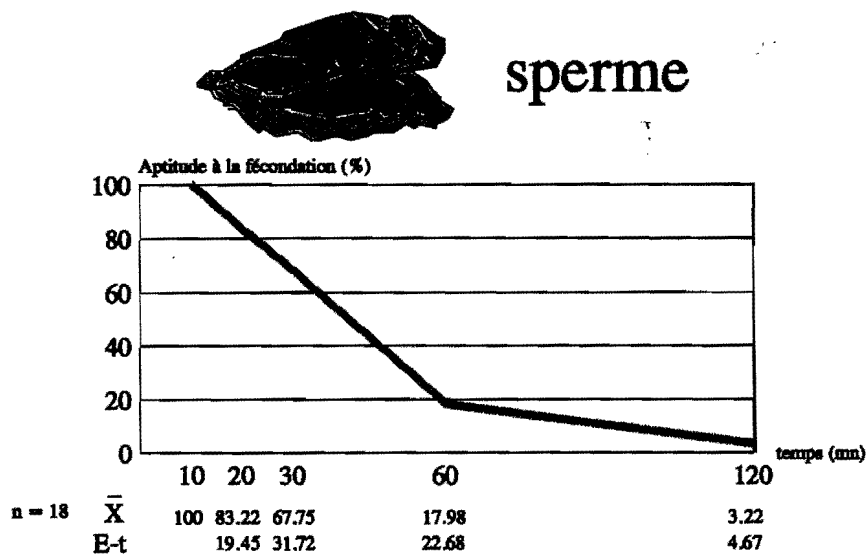
Figure 13. Mesures du pouvoir fécondant (% fécondation) du sperme d'huître creuse recueilli pendant la première minute de l'émission (T0), après 15 minutes d'émission.



**Figure 14.** Indice de mobilité au cours du temps de spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* dilués en eau de mer (■) ou en eau de mer additionnée de 1mg/ml de BSA (○).

Les spermatozoïdes sont prélevés dans la gonade de géniteurs non stimulés (lots Nonst G) et sont conservés sous forme concentrés à - 4°C avant activation.

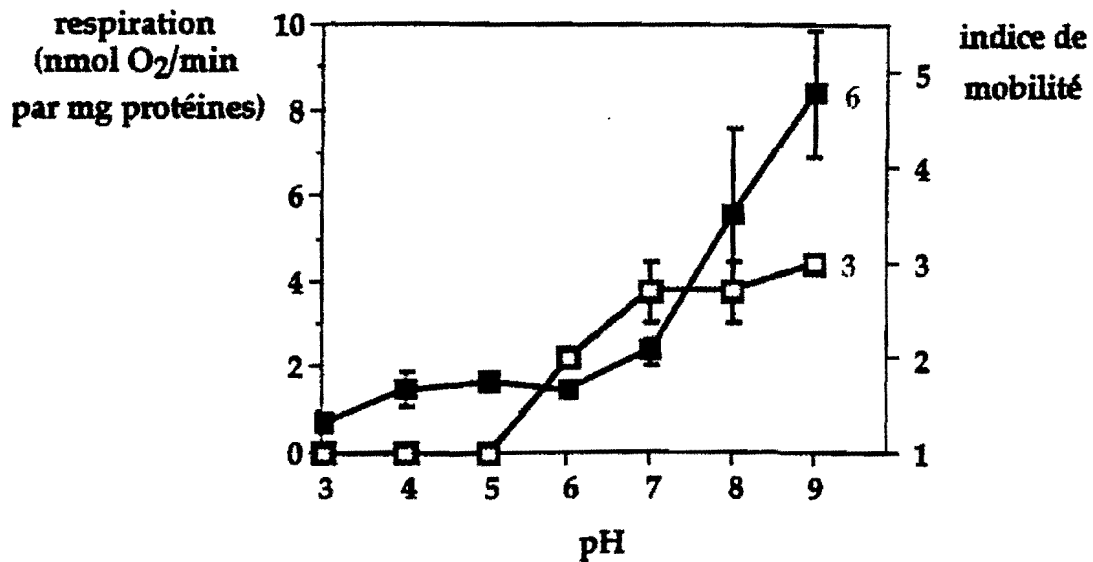
n= nombre de lots de sperme : l'échelle de mobilité de 1 à 5 est similaire à celle précédemment décrite; les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.



**Figure 15.** Evolution du pouvoir fécondant (%) du sperme d'huître creuse en fonction du temps.

n = souche d'échantillons analysés     $\bar{x}$  = valeur moyenne d'aptitude à la fécondation  
E-t = écart type

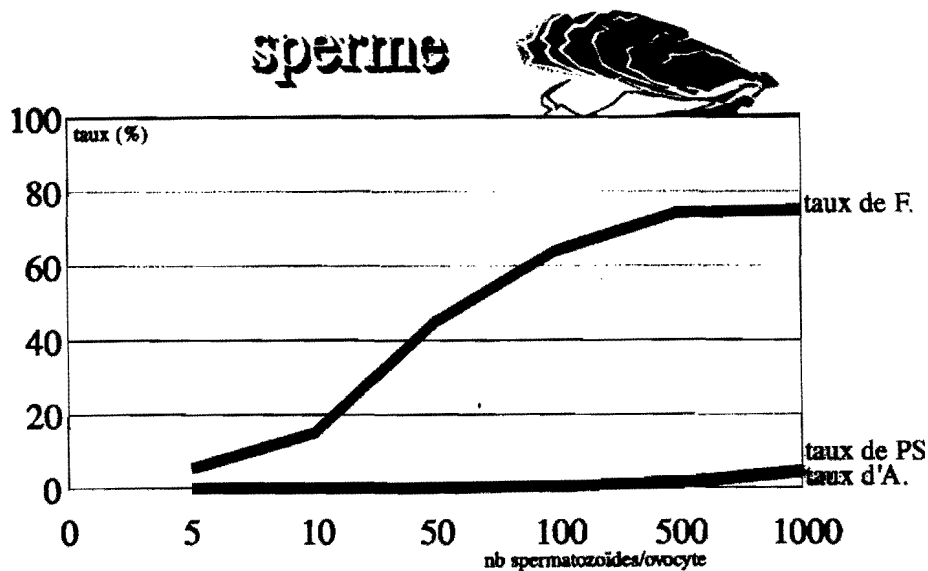




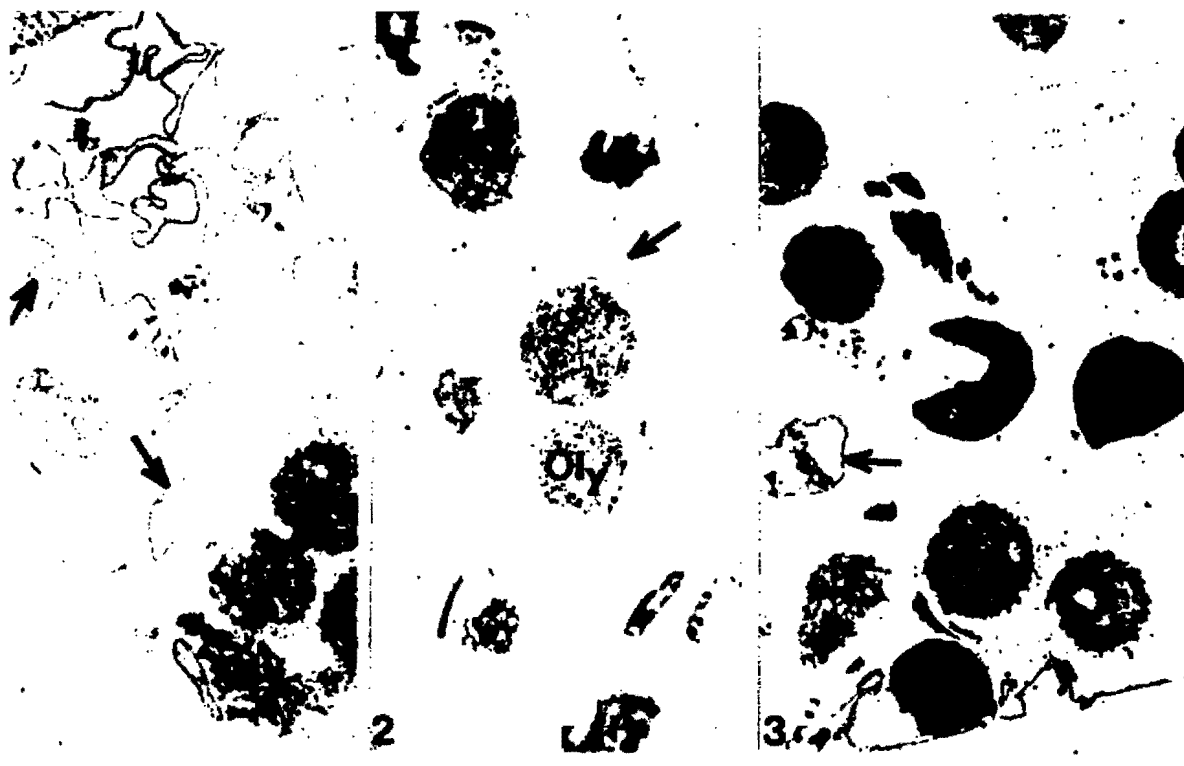
**Figure 16.** Respiration et indice de mobilité des gamètes mâles : eau de mer naturelle à pH variable

*Crassostrea gigas*

Effet du pH du milieu de dilution sur la consommation en oxygène ( ■ ) et l'indice de mobilité ( □ ) des spermatozoïdes



**Figure 17.** Evolution des taux de fécondation (F) des ovocytes d'huître creuse, des taux de polyspermie (PS) et des taux d'anomalies de développement (A) après fécondation, en fonction du ratio spermatozoïde/ovocyte.



Strate supérieure (densité : 1.018 à 1.025)

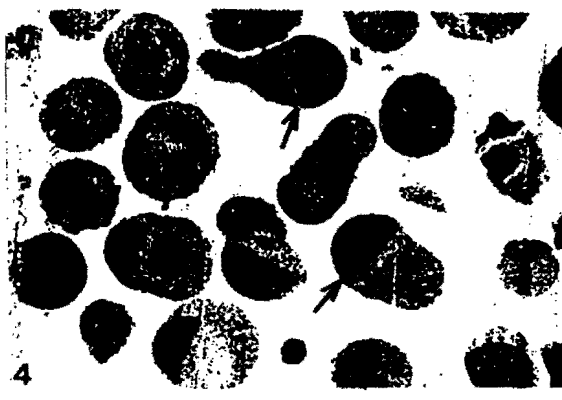
**Photo 1. Couche P1**

(la plus haute dans le cube). On note la présence d'innombrables enveloppes ovocytaires « nues » (↗). Quelques ovocytes très altérés sont aussi présents (Oly).

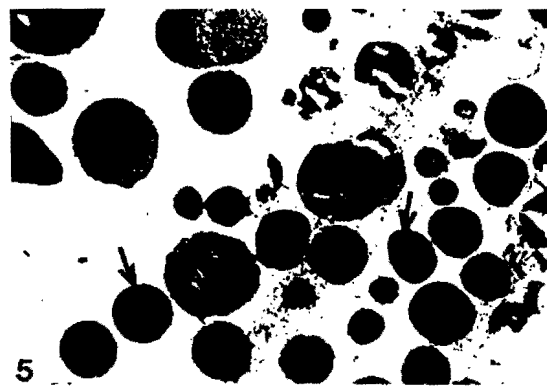
**Photo 2. Couche P2** sous-jacente. Des enveloppes « nues » sont encore visibles (↗). Mais ce sont essentiellement des ovocytes atrétiques qui sont observés (Oly).

**Photo 3. Couche P3**

(couche de la strate supérieure la plus profonde). Quelques débris sont encore visibles (↗). Mais, les ovocytes (Oly) sont généralement moins altérés.



**Photo 4. Strate intermédiaire** (densité : 1,035 à 1,051). Les oeufs ont un aspect normal, mais leur contenu est polarisé (↗).



**Photo 5 : Strate du fond** (densité : 1,050 à 1,075) essentiellement constituée de petits ovocytes rétractés (↗).

**Figure 18.** Coupes semi-fines (colorées au Bleu de Toluidine) d'ovocytes déposés en strates dans un gradient de Percoll pour une ponte de mauvaise qualité après fécondation, Echelle : 1,2 cm = 50µm.

## Références bibliographiques

- Akizawa T., T. Mukai, M. Matsukawa, M. Yoshioka, J.F. Morris and Butler V.P., 1994.** Structures of novel bufadienolides in the eggs of a toad, *Bufo marinus*. *Chem. Pharm. Bull.*, **42** : 754-756.
- Ameinsen J.C., 1996.** Le suicide des cellules. *Pour la science*, **224** : 52-59.
- Bayne B.L., 1972.** Some effects of stress in the adult on the larval development of *Mytilus edulis*. *Nature*, London, **237**, 459.
- Bayne B.L., P.A. Gabbott and Widdows J., 1975.** Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis*, *L. J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **55** : 675-689
- Besnard J.Y., 1988.** Étude des constituants lipidiques dans la gonade femelle et les larves de *Pecten maximus* L. (Mollusque, Lamellibranche). Thèse Doct. Univ. Université de Caen : 154 p.
- Bougis P. et coll., 1976.** Océanographie biologique appliquée. L'exploitation de la vie marine. Masson. Paris. Vol 1: 1-320.
- Brown C.L. and H.A. Bern, 1989.** Hormones in early development, with special reference to teleost fishes. Scanes and Schreiberman, editors. Hormones in development, maturation and senescence of neuroendocrine systems. Academic Press, New York, USA. 289-306.
- Buckley J.L., 1984.** RNA-DNA ratio : an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.* **80** : 291-298.
- Buckley J.L. and F.J. Bulow, 1987.** Techniques for the estimation of RNA, DNA, and protein in fish. *In* : Summerfelt R.C., Hall G.E. (eds) The age and growth of fish. Iowa State University. Press, Ames, Iowa : 345-354.
- Cajaraville M.P., J.A. Marigómez and E. Angulo, 1991.** Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocyte of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Arch. Environ. Toxicol.* **21** : 395-400.
- Casse N., N. Devauchelle, in press.** Embryonic development of *Pecten maximus* (L.), *Veliger*.
- Chiba A. and S. Chichibu, 1993.** Phosphorilation in crayfish (*Procambarus clarkii*) eggs during hatching. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106B**, **2** : 433-436.
- Chieffi Baccari G., S. Minucci, L. Matteo Di and G. Chieffi, 1992.** Ultrastructural investigation of the corpora atretica of the electronic Ray, *Torpedo marmorata*. *Gen. Comp. Endocrin.*, **86** : 72-80.
- Cochard J.C., 1985.** Observation sur la viabilité des oeufs de la coquille St-jacques en rade de Brest. 5th International Pectinid Workshop. La Coruna, Espagne, 1p..
- Cochard J.C. and N. Devauchelle, 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.Expl.Mar.Biol. Ecol.*, **169** : 41-56.
- Coe W.R. and M.J. Turner, 1938.** Development of the gonads and gametes in the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *J. Morphol.*, **62** (1) : 91-111
- Combrier E., P. Métézeau, X. Ronot, H. Gachelin H. and M. Adolphe, 1989.** Flow cytometric assessment of cell viability : a multifaceted analysis. *Cytotechnology* **2** : 27-37.
- Cook J.A. and J.B. Mitchell, 1989.** Review. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal. Biochem.* **179** : 1-7.

- Couturier C., 1992.** Egg size larval viability in sea scallops. *Bull. Aquacul. Canada*, **91-3** : 91-93.
- Dabrowski K. and J.H. Blom, 1993.** Ascorbic acid deposition in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. *Comp. Bioch. Physiol.* **108A**, **1** : 129-135.
- Daniels E.W., A.C. Lonwell, J.M. McNiff and R.W. Wolfgang, 1973.** Ultrastructure of oocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, **92** (3) : 337-349.
- Darzynkiewicz Z., G.J. Xun li, W. Gorczyca, T. Murakami and F. Traganos, 1997.** Cytometry in cell necrobiology : Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27** : 1-20.
- Delaunay F., 1992.** Nutrition lipidique de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.) au cours du développement larvaire. Thèse d' Université de Bretagne Occidentale, Brest, 201 p.
- Delaunay F., Y. Marty, J. Moal and J.F. Samain, 1993.** The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J. Exp. Biol. Ecol.*, **173** : 163-179.
- Devauchelle N., 1978.** Etude expérimentale de la chloration et des chocs mécaniques appliqués à des oeufs et larves de poissons marins. Rapport EDF du contrat n° 75/1746/F, 16 p.
- Devauchelle N., 1987.** Four marine spawners in European hatcheries. Publication MEDRAP/FAO, 48 p.
- Devauchelle N. et Y. Cladas, 1982.** Influence de la taille, du poids et du taux d'humidité des oeufs de trois espèces de poissons marins sur le taux d'éclosion et d'anomalies des larves. CIEM, Copenhague, Danemark, Cté de la Mariculture, F : 19: 14 p. (Communication et publication).
- Devauchelle N. and D. Coves, 1988.** The characteristics of the Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs : description, biochemical composition and hatching performances. *Aquat. Living Resour.*, **1** : 223-230.
- Devauchelle N. and C. Mingant, 1990.** Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.*, **4** : 41-51.
- Devauchelle N. and P. Micarelli, 1996.** Impact et devenir des rejets de station d'épuration dans les eaux littorales. Utilisation de Brotest. Rapport final IFREMER de contrat subvention du Ministère de l'environnement à l'IFREMER, N° 95149 : 19-27.
- Devauchelle N., G. Brichon, F. Lamour and G. Stephan, 1982.** Biochemical composition of ovules and fecund eggs of Sea bass (*Decentrarchus labrax*), Sole (*Solea vulgaris*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*). In : Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Wageningen, Netherlands, C.J.J. Richter and A.a; Th GOOS (Eds), 155-157.
- Devauchelle N., J.C. Alexandre, N. Le Corre and Y. Letty, 1987.** Spawning of Sole (*Solea solea*) in captivity. *Aquaculture*, **66** : 125-147.
- Devauchelle N., J.C. Alexandre, N. Le Corre and Y. Letty, 1988.** Spawning of tubot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. *Aquaculture*, **69** : 159-184.
- Devauchelle N., G. Dorange and C. Faure, 1994a.** A technique for separating high and low quality embryos of the scalop, *Pecten maximus* (L.) *Aquaculture*, **120** : 341-346.

- Devauchelle N., C. Faure and J.P. Girard, 1994b.** The quality of the sperm of two bivalves : the oyster, *Crassostrea gigas* and the scallop, *Pecten maximus*. Bordeaux Aquaculture, 23-25 mars (communication).
- Dorange G., 1989.** Les gamètes de *Pecten maximus* L. (Mollusca, Bivalvia). Thèse de Doct. d'Uni., Université de Bretagne Occidentale, I. 140 p. II 33pl.
- Dorange G., Y.M. Paulet, M. Le Pennec et J.C. Cochard, 1989a.** Critères histologiques d'évaluation de la qualité des ovocytes émis par *Pecten maximus* (Mollusque, Bivalve). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **309(3)** : 113-120.
- Dorange G., Y.M. Paulet and M. Le Pennec, 1989b.** Etude cytologique de la partie femelle de la gonade de *Pecten maximus* récolté en Baie de St-Brieuc. 1. Caractéristiques ultrastructurales de tissus somatiques. *Haliotis*, **19** : 287-297.
- Dorange G., Y.M. Paulet and M. Le Pennec, 1989c.** Étude cytologique de la partie femelle de la gonade de *Pecten maximus* récolté en Baie de St-Brieuc. 2. Ovogénèse et lyse ovocytaire. *Haliotis*, **19** : 299-314.
- Evan G.I., L. Brow, M. Whyte and E. Harrington, 1997.** *J. Cell Biol.*, **7** : 825-834.
- Evans R.P., C.C. Parrish, J.A. Brown and P.J. Davis, 1996.** Biochemical composition of eggs from repeat and first-time spawning captive Atlantic halibut (*Hyppoglossus hypoglossus*). *Aquaculture*, **139** : 139-149.
- Fattorossi A., R. Nisini, J.G. Pizzolo and R. D'Amelio, 1989.** New, simple flow cytometry technique to discriminate between internalized and membrane-bound particles in Phagocytosis. *Cytometry*, **10** : 320-325.
- Faure C., 1990.** Recherche d'un critère de qualité applicable en éclosion pour les ovocytes et les oeufs de *Pecten maximus*. Rapport de DEA de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, 130 p.
- Faure C., 1996.** Paramètres physiologiques de l'émission et de l'activation des gamètes mâles de deux mollusques bivalves : la coquille St-Jacques *Pecten maximus* (L.) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg). Thèse d'université, Université de Paris 7 : Denis Diderot, 254 p.
- Faure C., N. Devauchelle et G. Dorange, 1992.** La densité, un critère de qualité applicable en éclosion aux embryons de *Pecten maximus* (mollusque bivalve), *Haliotis*, **22** : 21-30.
- Faure C., N. Devauchelle and J.P. Girard, 1994a** Ionic factors affecting motility, respiration and fertilization rate of the sperm of the bivalve *Pecten maximus* (L.). *J. Comp. Physiol. B.*, **164** : 444-450.
- Faure C., N. Devauchelle, J.P. Girard and J. Cosson, 1994b.** The quality of *Pecten maximus* sperm. In : Proceedings of the 9th International Pectinid Workshop, Nanaimo, B.C., Canada. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Science, Bourne N.F., Bunting B.L. and Townsend L.D. (Eds.). Vol. 1 : 28-37.
- George S.B., J.M. Lawrence and L. Fenaux, 1991.** The effect of ration on the quality of eggs of *Ludia clathrata* (Say) (Echinodermata : Asteroidea). *Invert. Reprod. and Develop.* **20**, **3** : 237-242.
- Gérard A., Y. Naciri-Graven, P. Boudry, S. Launay, S. Heurtebise, C. Ledu et P. Phelipot,** dans ce document. Contrôle de la gamétogénèse des huîtres creuses et plates. Relations "reproduction" et "génétique". Rapport Groupe de Travail : La reproduction des Mollusques bivalves d'aquaculture marine ". IFREMER/Nantes, 11 p.
- Goodall J.A., M.F. Capra and A.W. Blackshaw, 1987.** Quantitative histology of the seasonal changes in the gonads of summer whiting, *Sillago cilliata*. *J. Fish Biol.* **30** : 589-595.

- Gosh R.I., 1983.** Chemical composition of ovarian fluid and oocytes in grass carp and common carp. *Gridobiol. Zh.*, **19** (1) : 81-85.
- Gosh R.I., 1985.** Energy metabolism of fish reproductive cells and embryos. Naukova Dumka, Kiev, 147 p.
- Grasdalen H. and L. Jorgensen, 1985.** <sup>31</sup>P-RMN studies on developing eggs and larvae of plaice. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81B**, **2** : 291-294.
- Grechenov I.G. and M.V. Volodin, 1982.** Experimental study of resorption in the testes of bream, *Abramis brama*, from Rybinsk reservoir. *J. Ichthyology*, **21** (6) : 158-162.
- Greenblatt M., C.L. Brown, M. Lee, S. Dauder and H.A. Bern, 1989.** Changes in thyroid hormone levels in eggs and larvae and in iodide uptake by eggs of coho and chinook salmon *Oncorhynchus kisutch* and *O. tshawytscha*. *Fish Physiol. and Biochem.* **6** : 261-278.
- Gruffydd Li D. and A.R. Beaumont, 1970.** Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* L. (Mollusca, Lamellibranchia). *Helgol. Wiss. Meeres*, **20** : 486-497.
- Gueguen F., 1989.** Contenu lipidique et compétence des ovocytes émis chez *Pecten maximus* L; Rapport de D.E.A., Université de Bretagne Occidentale, Brest, 30p.
- Gutierrez M., J. Perez Crespo and E. Pascual, 1978.** Ultraestructura de ovocytes y espermatozoides del ostión, *Crassostrea angulata* Lmk. de la costa sudatlántica de España. *Inv. Pesq.* **42** (1) : 167-178.
- Herman R.H., 1961.** Radiobiology. A general method for the quantitation of immune cytolysis. *Nature* **4772** : 269-270.
- Hisatochi U., H. Ken'ichi, K. Masaki and T. Kazurari, 1996.** Detection of undergraded oligonucleotides in vivo by fluorescence resonance energy transfer. Nuclease activities in living sea urchin eggs. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, **1** : 380-384.
- Hochachka P.W., 1986.** Defense strategies against hypoxia and hyperthermia. *Science*, **231** : 234-341.
- Humeau C., 1985.** Critères d'évaluation de la qualité des embryons obtenus par la FIV et de leur aptitude à l'implantation. *Ann. Biol. clin.*, **43** : 23-26.
- Imai T., 1972.** Present status and future prospects of invertebrate mariculture in Japan. *Fisheries*, New Series, **5** : 181-185.
- Inoue H. and T. Yoshioka, 1980.** Measurement of intracellular pH in sea eggs by <sup>31</sup>P NMR. *J. Cell. Physiol.*, **105** : 461-468.
- Jewell S.A., G. Bellomo, H. Thor H. and S. Orreinus, 1982.** Bled formation in hepatocytes during metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science*, **217** : 1257-1258.
- Kelly K. F. and Wei-Shou Hu, 1989.** Cell volume measurement as an estimation of mammalian cell biomass. *Biotech. and Bioengine.*, **36** : 191-197.
- Kjorsvik E. and S. Lonning, 1983.** Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the *Gadus morhua* L. *J. of Fish Biol.*, **23** : 1-12.
- Kjorsvik E., E. Stene and S. Lonning, 1984.** Morphological, physiological and genetical studies of egg quality in cod *Gadus morhua* L.). In "The propagation of Cod *Gadus morhua* L." (E. Dahl, D.S. Danielssen, E. Moksness and P. Solemdal, eds), Flodevigen rapport serie 1, 67-86.
- Kjorsvik E., A. Mangor-Jensen and I. Holmefjord, 1990.** Egg quality in fishes. *Advan. In Mar Biol.*, **26** : 71-92.
- Kubo M., M. Ishikawa and T. Numakunai, 1979.** Ultrastructural studies on early events in fertilization of the bivalve *Laternula limicola*. *Protoplasma*, **100** : 73-83.

- Lanz H., V. Tsutsumi and H. Aréchiga, 1993.** Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. *Develp. Comp. Immun.*, **17** : 389-387.
- Le Pennec M., F. Gueguen, J.C. Cochard, Y.M. Paulet et G. Dorange, 1990.** Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* et les performances des larves en élevage. *Haliotis*, **10** : 101-113.
- Linhart O., S. Kudo R. Billard, V. Slechta and E.V. Mikodina, 1995.** Morphology, composition and fertilization of carp eggs : a review. *Aquaculture*, **129** : 75-93.
- Longwell A.C., 1977.** A genetic look at eggs and oil. *Oceanus*, **20** : 45-58.
- Loosanoff V. L. and H.C. Davis, 1963.** Rearing of bivalve molluscs. *In* : Advances in Marine Biology. Russel F.S. (Ed.) Academic Press, London, Vol. 1 : 1-136.
- Lowe D.M., M.N. Moore and B.L. Bayne, 1982.** Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **62** : 133-145.
- Lubet P, G. Dorange and I. Robbins, 1987.** Cytological investigations on the annual reproductive cycle of the scallop (*Pecten maximus* L.) from the channel. V<sup>th</sup> International Pectinid Workshop, Menai Bridge, Wales, U.K.
- Makeyeva A.P. and V. Mikodina Ye, 1977.** The structure of the egg membranes of cyprinids and some data on their chemical nature. *Biol. nauki*, 9 p.
- Mangor-Jensen A., J.C. Holm, G. Rosenlund, O. Lie and E. Sandnes, 1994.** Effects of dietary vitamin C on maturation and egg quality of cod *Gadus morhua* L. *J. of the World Aquacul. Soc.* **25**,1 : 30-40.
- Marty Y., F. Delaunay, J. Moal and J.F. Samain, 1992.** Change in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Ecol.*, **163** : 221-234.
- Mashiko K., 1987.** Relationships between egg size and incubation time among the populations of two freshwater prawns. *Ecol. Res.* **2** : 97-99.
- Massapina C., E. Dores, D. Matias, S. Joaquim et N. Devauchelle, 1997.** Etat actuel des connaissances sur la reproduction artificielle de l'huître *Crassostrea angulata* au Portugal. *In* : La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France, Nantes (France), 14-15 novembre 1995, Groupe de travail, Devauchelle N., Barret J. et G.Salaun coord. IFREMER, rapport interne, DRV 97-11 RA/RST/Brest : 113-125.
- Matipragada S.S., V.M. Huynh and H.B. Fackrell, 1990.** Image analysis of biological systems with microcomputers. *Int. J. Biomed. Comput.*, **26** : 271-281.
- Morril G.A., Doi Kei, J. Erlichman and A.B. Kostellow, 1993.** Cyclic AMP binding to the amphibian oocyte plasma membrane and membrane fluidity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1158** : 146-154.
- Pashard V.R. and S.S.Guraya, 1978.** Morphological and histochemical observations on oocyte in *Centrorhynchus corvi* (Acantocephala). *Parasitology*, **77** : 133-138.
- Paulet Y.M., 1990.** Rôle de la reproduction dans le déterminisme du recrutement chez *Pecten maximus* (L) de la Baie de St-Brieuc. Thèse d'Université de Bretagne Occidentale, Brest, 337 p.
- Paulet Y.M., A. Lucas and A. Gerard, 1988.** Reproduction and larval development in two *Pecten maximus* (L.) populations from Brittany. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **119** : 154-156.
- Paulet Y.M., G. Dorange, J.C. Cochard and M. Le Pennec, 1989.** Quality assessment of spawned oocytes of *Pecten maximus*, 7<sup>th</sup> International Pectinid Workshop, Portland, Maine, U.S.A.

- Pazos A.J., G. Roman, C.P. Acosta, M. Abad and J.L. Sánchez, 1996.** Influence of the gametogenic cycle on the biochemical composition of the ovary of the great scallop. *Aquac. Intern.* **4** : 201-213.
- Pipe R.K., 1985.** Seasonal cycles and effects of starvation on egg development in *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. (Prog. Ser.)* **24** : 121-128.
- Pipe R.K., 1987a.** Oogenesis in the mussel *Mytilus edulis* : an ultrastructural study. *Mar. Biol.*, **95** : 405-414.
- Pipe R.K., 1987b.** Ultrastructure and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **96** : 519-528.
- Ruiz C., M. Abad, F. Sedano, L.O. García-Martin and J.L. Sánchez López, 1992.** Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspend culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Biol. Ecol.*, **155** : 249-262.
- Seguineau C., A. Laschi-Loquerie, M. Leclercq, J.F. Samain, J. Moal and V. Fayol, 1993.** Vitamin transfer from algal diet to *Pecten maximus* larvae. *J. Mar. Biol.*, **1** : 67-71.
- Soliman A.K., K. Jauncey and R.J. Roberts, 1986.** The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture*, **59** : 197-208.
- Soudant P., 1995.** Les Phospholipides et les sterols des geniteurs et des larves de coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.). Relations avec la nutrition. Thèse d'Université de Bretagne Occidentale, Brest, 294 p.
- Soudant P., Y. Marty, J. Moal and J.F. Samain, 1996.** Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquac. International*, **4** : 191 : 200.
- Tazawa E, A. Fujiwara and I. Yasumasu, 1985.** Change in glycogen level in the oyster eggs during development. *Zool. Scien.* **2** : 349-357.
- Tazawa E., A. Fujiwara, A. Hino, K. Asami and I. Yasumasu, 1986.** Respiration in oyster eggs before and after fertilization. *Zool. Scien.* **3** : 807-816.
- Testart J., 1985.** Critères d'évaluation de la qualité des ovocytes et leur aptitude à la FIV. *Anna. Biol. Chim.* , **43** : 17-21.
- Tucker K.G., S. Chalder, M. Al-Bubeai and C.R. Thomas, 1994.** Measurements of hybridoma cell number, viability and morphology using fully automated image analysis. *Enzyme Microb. Technol.*, **16** : 29-35.
- Uchiyama H., K. Hirano, M. Kashiwasake-Jibu and K. Taira, 1996.** Detection of undegraded oligonucleotides in vivo by fluorescence resonance energy transfer. Nuclease activities in living sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.*, **271** : 380-384.
- Whyte J.N.C., N. Bourne and N.G. Ginthe, 1990.** Biochemical and energy changes during embryogenesis in the scallop *Crassadoma gigantea*. *Mar. Biol.*, **106** : 239-244.
- Whyte J.N.C., N. Bourne and N.G. Ginthe, 1991.** Depletion of nutrient reserves during embryogenesis in the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). *J. Exp. Mar. Ecol.*, **149** : 67-79.
- Yamamoto T., 1961.** Physiology of fertilization in fish eggs. *Int. Rev. Physiol.*, **12** : 361-405.
- Yasumasu I., A. Hino, A. Fujiwara, E. Tazawa, S. Nemoto and K. Asami, 1988.** Fertilization-induced change in the respiration rate in eggs of several marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* **90B**, **1** : 69-75.
- Yemel'yanova N.G., 1980.** Electron-microscopic study on the egg membranes and ovarian follicle in the silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*. *J. Ichthyology*, **19(2)** : 95-104.





## LE PROGRAMME REPRODUCTION ET STADES PRECOCES DES POISSONS A L'IFREMER

**J.L. GAIGNON**

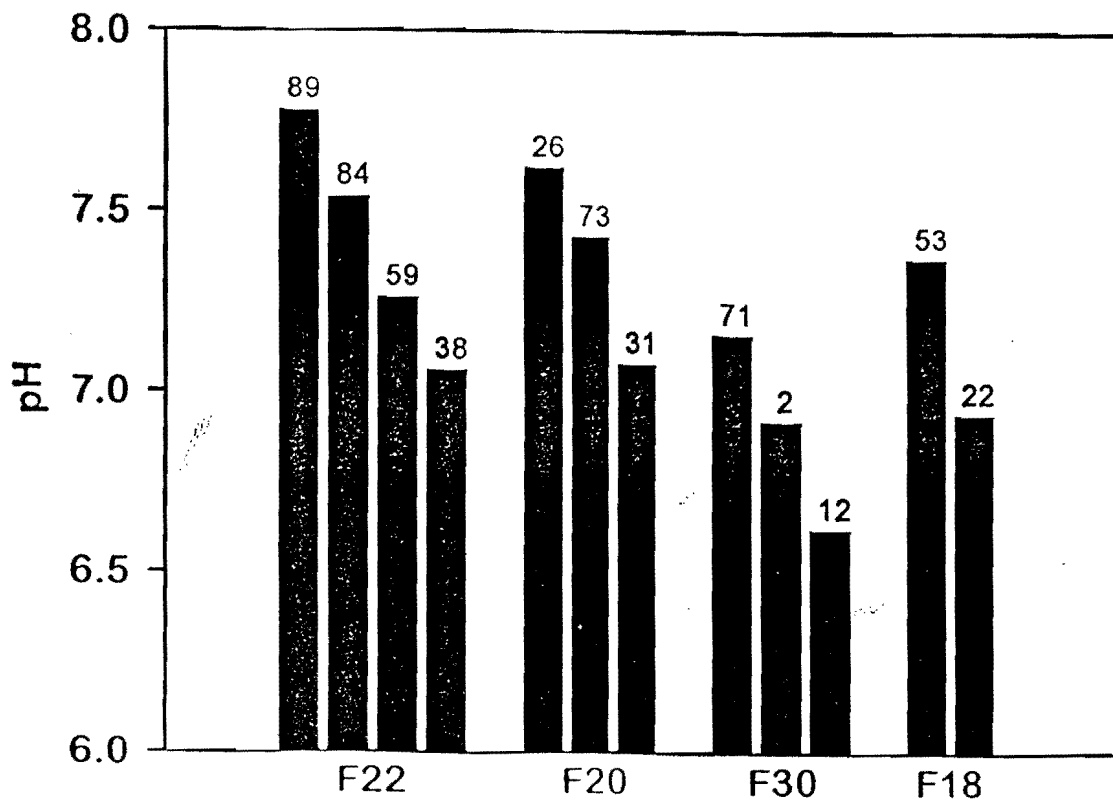
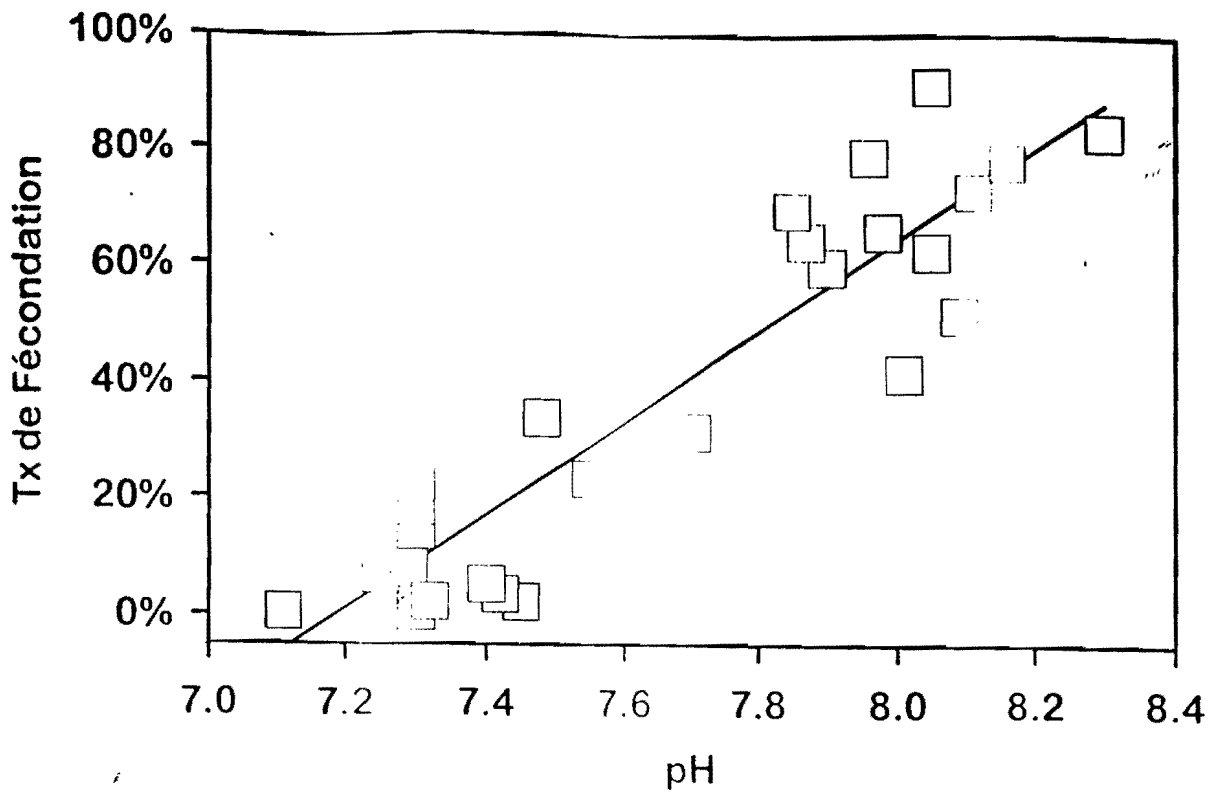
*IFREMER, Laboratoire Physiologie des Poissons, BP 70, 29280 Plouzané (F).*

*Ce papier n'est pas destiné à faire une présentation scientifique de l'ensemble des travaux menés par l'IFREMER dans le domaine, mais, plutôt, dans le cadre du groupe de travail sur la "Reproduction des Mollusques", de présenter les problématiques à partir d'un certain nombre de travaux effectués.*

Chez les poissons marins tempérés, la reproduction est assez bien connue. L'approvisionnement en gamètes et en larves n'est plus une contrainte quantitative au développement de l'activité aquacole. La production de gamètes tout au long de l'année est possible grâce aux techniques de décalage des saisons par contrôle de la photopériode et de la température. Par contre, la maîtrise individuelle de la reproduction permettant d'obtenir une bonne viabilité des produits n'est suffisante, ni pour la nécessaire fiabilisation de la production dans l'optique d'une diminution des coûts, ni pour permettre de mettre en oeuvre des techniques d'amélioration génétique. Le positionnement de l'IFREMER doit cependant tenir compte du fait que la recherche dans le domaine de la reproduction des Poissons est, contrairement à ce qui se passe pour les Mollusques, fort développée. Le domaine essentiel des travaux menés par les équipes extérieures est la physiologie, et en particulier, l'endocrinologie. Les travaux de l'IFREMER sont donc plus appliqués et cherchent à intégrer la reproduction dans l'ensemble du cycle biologique : la reproduction ne sera pas, dans cette optique, dissociée des stades précoces.

Les travaux sont menés en parallèle, à Brest et à Palavas, sur deux modèles complémentaires : le turbot (*Scophthalmus maximus*) et le loup (*Dicentrarchus labrax*). En captivité, le loup peut avoir une ovulation spontanée ou stimulée par traitement hormonal, mais la ponte est généralement spontanée et la fécondation naturelle. Cette absence de maîtrise de la fécondation empêche toute manipulation génétique. Dans le cas du turbot, par contre, l'ovulation est multiple et spontanée, la ponte s'effectue par stripping et la fécondation est artificielle. Le problème majeur dans ce cas est la surmaturation ovulaire intra-gonadique qui peut entraîner une dégradation de la qualité des gamètes.

L'objectif premier du programme, base de mise en oeuvre de techniques d'amélioration génétique, est d'accroître le contrôle de la reproduction au niveau individuel tout en améliorant la qualité des produits obtenus. Dans cette optique, il ne faut pas, oublier que les phénomènes liés à la reproduction sont antagonistes de la croissance, variable économiquement la plus importante pour l'optimisation des performances aquacoles. A cette fin (objectif n°2), on cherchera à l'avenir à appréhender la reproduction dans ces aspects néfastes sur la croissance.



**Figure 1.** La relation globale existant entre le pH de pontes de turbot et les taux de fécondation de ces mêmes pontes ( $r = 0,92$ ) (en haut) n'existe pas pour chaque femelle prise indépendamment (en bas) et dans ce cas un niveau de pH ne permet pas de prédire le taux de fécondation obtenus sur une ponte donnée.

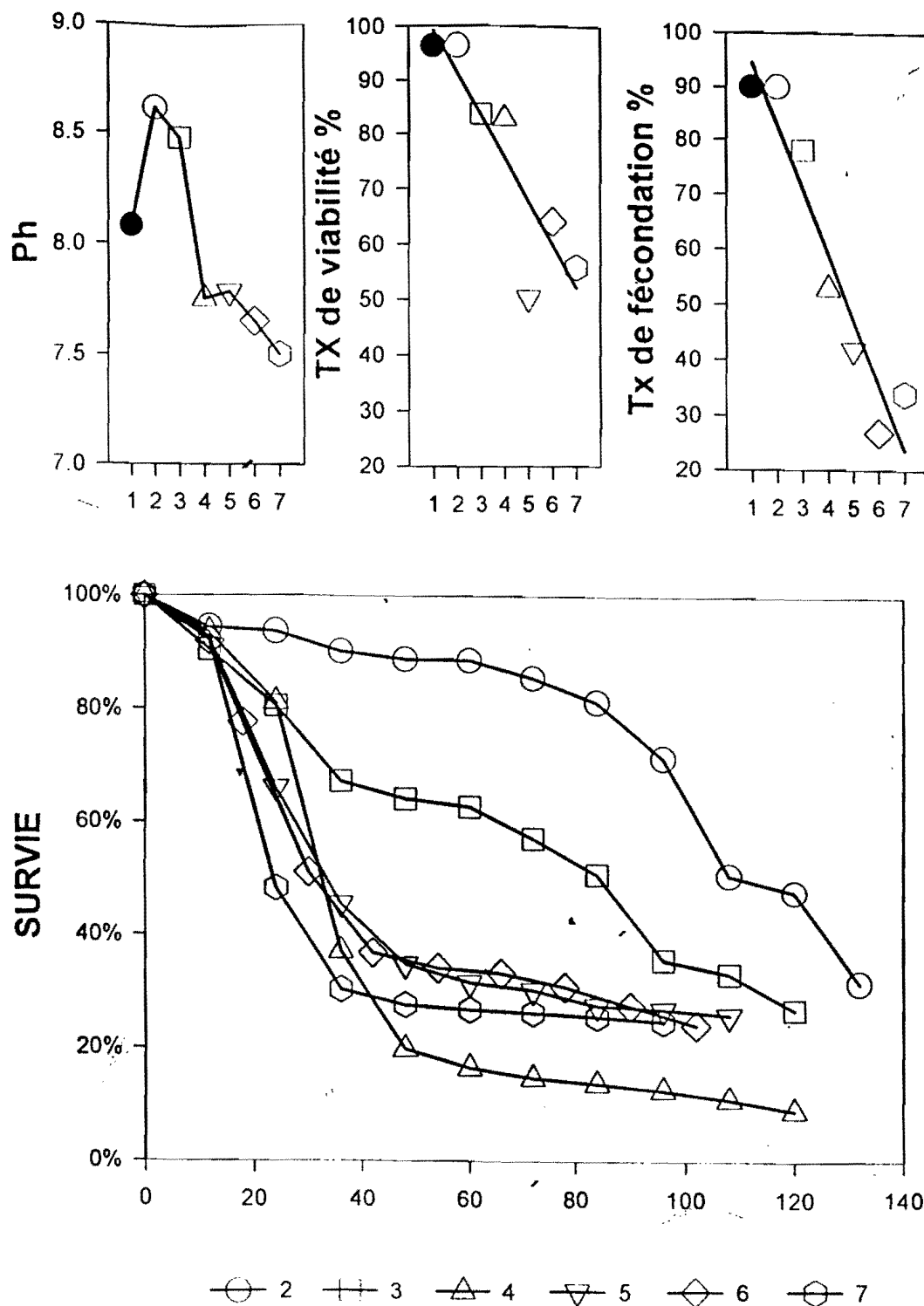
## **1 - OBJECTIF N°1 : ACCROITRE LE CONTROLE INDIVIDUEL TOUT EN AMELIORANT LA QUALITE**

Ces travaux sont basés sur les connaissances éco-physiologiques disponibles dans la littérature et acquises sur un grand nombre d'espèces de poissons. De plus, et même si l'on admet que la Nature ne doit pas être systématiquement la référence, on considère que la connaissance des conditions naturelles de reproduction est indispensable. Elle est généralement insuffisante et ne permet pas de répondre toujours aux interrogations que l'on se pose. Des travaux appliqués à des espèces particulières nécessitent, d'autre part, de s'appuyer sur des connaissances biologiques spécifiques concernant aussi bien la gamétogénèse que les phases de développement. Dès lors que celles-ci ne sont pas disponibles, il est essentiel de les acquérir. A cette fin, par exemple, la gamétogénèse du turbot (Mugnier, 1990), l'évolution de la croissance folliculaire chez le loup (Fauvel et Le Gall, commun. pers.) ont été décrites. Dans ce dernier cas, un pallier de croissance a été mis en évidence, ce qui conduit à s'interroger sur la validité du diamètre ovocytaire comme critère actuel de choix du moment de l'induction.

### **1.1 - Les critères d'amélioration de la qualité**

L'amélioration de la qualité nécessite (1) que l'on précise quelle acception on donne au terme de "qualité" et (2) que l'on dispose de moyens, c'est-à-dire de caractéristiques de description, afin de l'étudier. La définition retenue est "l'aptitude à donner une larve ayant le meilleur potentiel pour vivre, bien s'alimenter sur une nourriture exogène et croître". Les performances larvaires constituent donc la référence en terme de critères de qualité. La lourdeur de mise en oeuvre et le délai de réponse d'un élevage larvaire justifie cependant que l'on recherche des critères plus précoces qui sont des caractéristiques des gamètes et des larves et dont la réponse est connue comme étant corrélée à des performances ultérieures, et, en particulier aux performances larvaires. Dans cette optique, l'étude d'un ensemble de caractéristiques qui pourraient devenir des critères a été entreprise :

- Pour les gamètes mâles, les divers paramètres de mobilité (durée de nage, fréquence, nombre de cellules mobiles) ont été analysés dans le cadre de l'URM3 (coll. MNHN). Une relation avec le taux de fécondation a été trouvée mais demande cependant à être confirmée (Chauvaud, 1993).
- Pour les gamètes femelles, il existe, tout d'abord, un premier type de caractéristiques morphologiques dites "subjectives" car dépendantes de l'appréciation de l'observateur. L'exemple le plus connu et le plus usuel est la viabilité. Elle permet, sur des critères apparents, de discriminer des lots de qualité extrême. Par contre, dès lors que l'on souhaite différencier des lots de viabilité voisine, les critères fins de reconnaissance font défaut et conduisent à une absence de corrélation entre, par exemple, le taux de viabilité et le taux de fécondation. Une caractéristique du même type est la qualité de la symétrie de la segmentation. Même si des critères fins de classification existent (Shields, 1995), il n'en reste pas moins que la détermination de ceux-ci reste toujours du domaine de l'appréciation de l'observateur. Ces caractéristiques permettent de faire des tris grossiers et ne sont donc pas suffisamment fines par rapport aux attendus fixés dans le cadre de ce programme.
- Le nombre de globules lipidiques est par contre une caractéristique morphologique "objective" (quantifiable indépendamment de l'observateur) qui permet de différencier, chez le loup, des pontes obtenues soit spontanément, soit par induction.
- La composition biochimique est souvent considérée comme critère de qualité bien que les données de la littérature soient très contradictoires. Il n'en reste pas moins vrai que, la plupart



**Figure 2.** Effet de la surmaturation ovulaire intra-gonadique chez une femelle de turbot : après avoir cerné l'ovulation par des strippings à intervalles réguliers de 12 heures, des ovules sont récoltés toutes les 6 heures pendant 36 heures (point de 1 à 7) ; sur chaque ponte partielle ainsi récoltée, le pH est mesuré, le taux de viabilité et le taux de fécondation sont estimés et la mortalité en incubation est enregistrée ; une relation linéaire existe entre la durée de surmaturation et le taux de fécondation, cette relation est moindre avec le taux de viabilité et la survie en incubation, elle n'existe pas avec le pH de la ponte.

du temps, les analyses ne sont, ni immédiates, ni d'utilisation facile en routine. Un bon compromis semblait être la mesure du pH de la ponte qui de plus est corrélée avec le taux de fécondation (fig. 1a ; Fauvel *et al.*, 1993). Une étude fine montre cependant que la relation entre le pH et le taux de fécondation ne se retrouve pas systématiquement au niveau individuel (fig. 1b). Des corrélations avec d'autres caractéristiques sont nécessaires avant de définitivement considérer que le pH ne peut pas être un critère précoce de qualité (fig. 2). Le pH pose toutefois le problème de savoir ce que l'on attend d'un critère de qualité. Le pH dans ces valeurs extrêmes peut permettre de séparer une mauvaise ponte des autres. Il n'est cependant pas un moyen suffisamment précis et fiable pour discriminer individuellement des pontes, même si une relation générale existe avec le taux de fécondation.

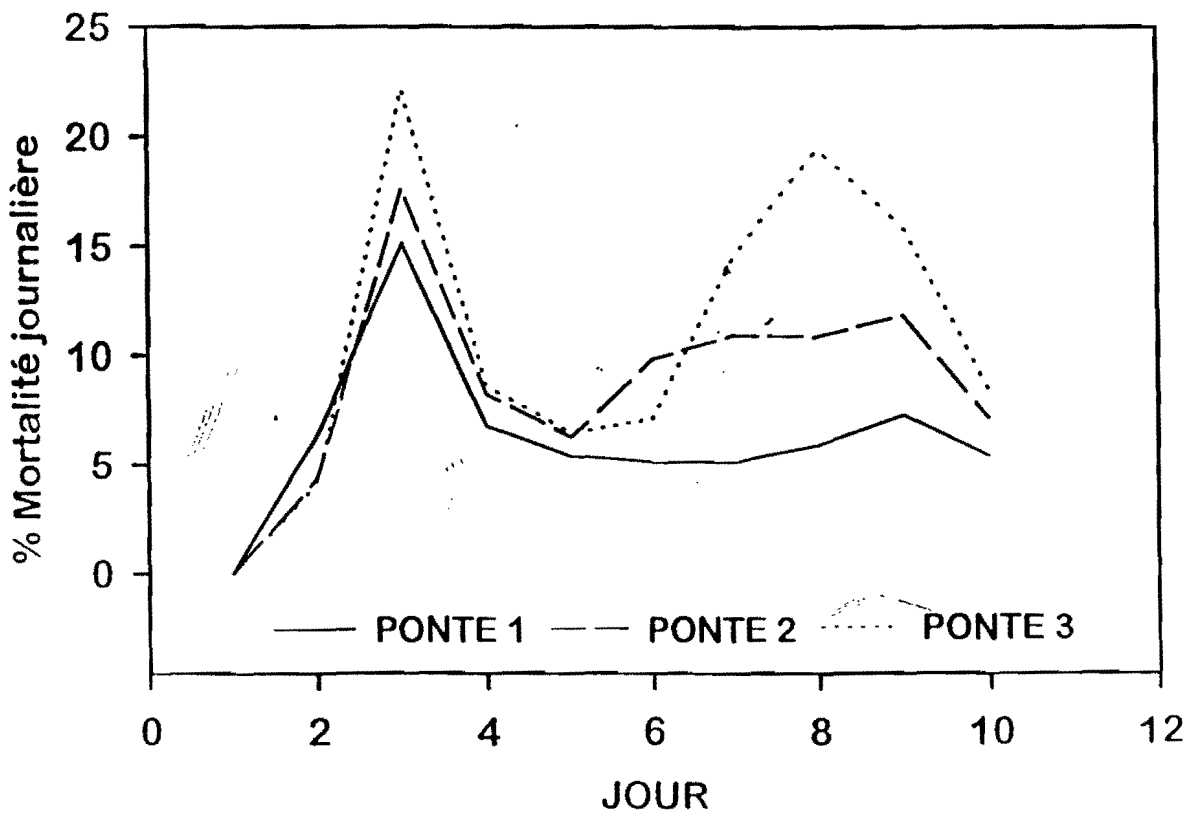
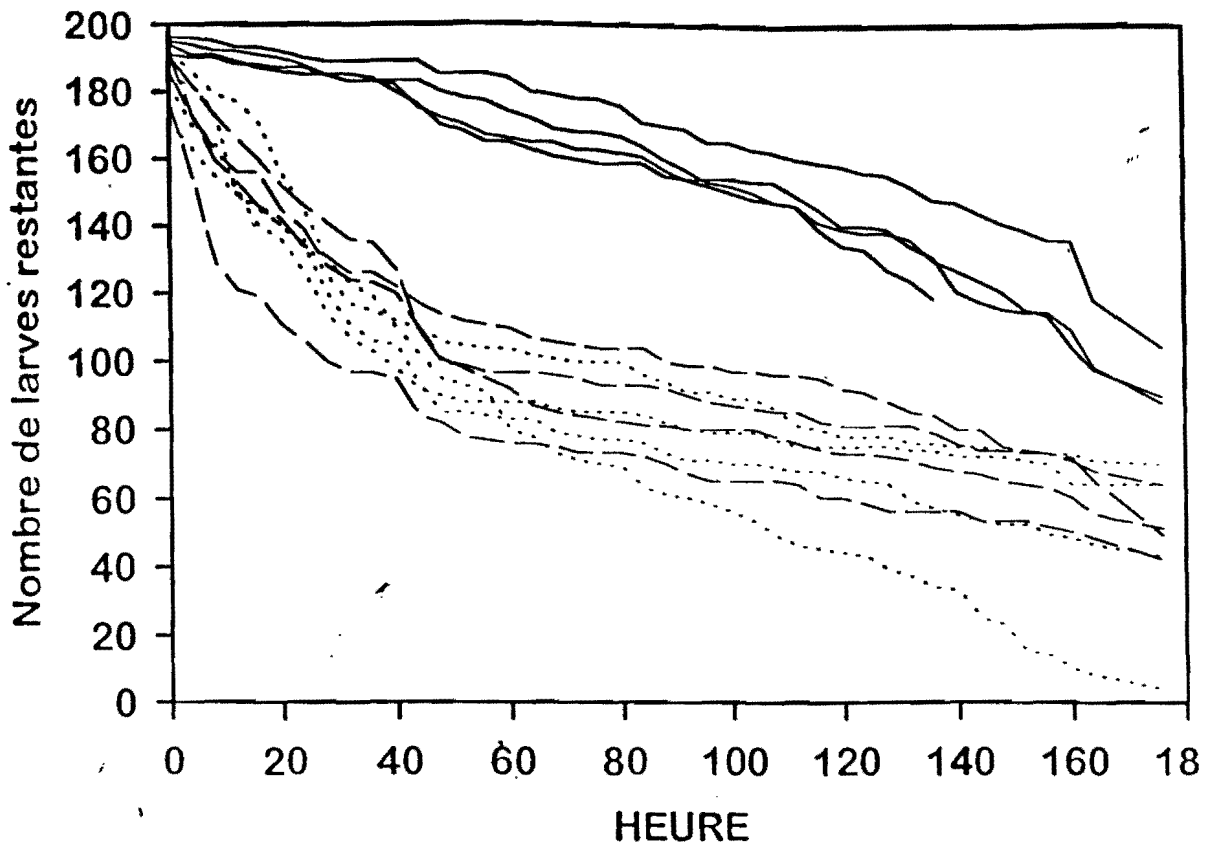
- Les performances larvaires sont le critère de référence, mais les contraintes de mise en oeuvre expérimentale sont lourdes. C'est pourquoi, (1) afin de ne pas avoir à mener systématiquement des élevages larvaires pour quantifier la qualité des gamètes et des oeufs, (2) de pouvoir traiter un grand nombre de cas et (3) d'intercalibrer, entre les élevages, les performances larvaires, on a cherché à mettre au point des outils d'évaluation des performances larvaires : les challenges ou épreuve de discrimination de qualité des larves. Les facteurs discriminants retenus dans un premier temps étaient la mise à jeun et la lumière. Les premiers essais ont montré (1) que l'on pouvait disposer de méthodes suffisamment fiables pour pouvoir suivre des cinétiques de mortalité de larves laissées à jeun dans le noir (fig. 3a), (2) que la réponse était très rapide, et (3) que, dans une première approche (fig. 3b), elle pouvait permettre de discriminer les performances de survie de différentes pontes.

- Quelle que soit la (ou les) caractéristique(s) qui sera(ront) retenue(s) ultérieurement il est essentiel que les performances larvaires qui serviront de référence soient obtenues de la manière la plus fiable possible et sans biais. Or de nombreux facteurs peuvent entraîner une dérive post-ponte. C'est pourquoi il est impératif de disposer de méthodes, d'une part les plus standardisées possibles, et d'autre part, permettant de discriminer les effets des facteurs étudiés. Un contrôle fort des facteurs non étudiés s'avère, en conséquence, nécessaire. Sur la phase d'élevage larvaire, les travaux ont consisté à étudier tous les facteurs qui pouvaient avoir un effet sur la survie larvaire, et qu'il était donc ultérieurement nécessaire de contrôler expérimentalement. Il est apparu que des facteurs liés à l'hydrodynamisme, et dont les conséquences sont généralement sous-estimées, ont un fort effet (Gaignon *et al.*, données non publiées). Leur contrôle, associé à un contrôle fin de l'ensemble des facteurs expérimentaux permet de diminuer fortement la variabilité inter-réplica. Ceci nous permet de déterminer des coefficients de variation expérimentaux propres aux outils dont on dispose et qui permettent de préciser les différences que l'on peut *a priori* mettre en évidence.

Certaines relations entre les diverses caractéristiques décrites ci-dessus ont été établies. Il reste toutefois à les étudier plus complètement pour différents facteurs de contrôle de la reproduction (surmaturation ovulaire intra-gonadique, moment de l'induction, ...).

## **1.2 - Contrôle individuel de la reproduction**

- Contrôle des mâles chez le turbot : un suivi de la production spermatique (Suquet, 1992) a permis de montrer que le turbot était spermiant une grande partie de l'année. Les paramètres de production (concentration), ont été précisés dans un premier temps. Des travaux plus récents permettent cependant d'identifier des processus de vieillissement des spermatozoïdes d'un stock de géniteurs mâles : deux mois après la saison de ponte des femelles, la capacité à féconder des mâles est inférieure à ce qu'elle était en fin de saison de ponte des femelles, et ceci est lié à une diminution du pourcentage de cellules mobiles. Au niveau des individus, les concentrations spermatiques sont différentes d'un jour à l'autre. La durée de stockage du



**Figure 3** Survie de trois lots de larves de turbot maintenues à jeun (en haut) et mortalités quotidiennes de ces mêmes lots de larves nourries en élevages larvaires (en bas).

sperme à température ambiante est courte et dépendante des individus (Suquet *et al.*, 1995), mais il n'y a pas de différence de capacité à féconder des mâles, un jour donné, à l'intérieur d'un stock donné.

- Contrôle des pontes chez le turbot : ce poisson étant un multipondeur, on a cherché à établir les cycles individuels de ponte de femelles. Si, dans certains cas (fig. 4a), les cycles sont très réguliers, dans d'autres cas (fig. 4b), l'irrégularité des cycles empêche une gestion aisée des pontes. Ceci pose d'autant plus de problèmes de qualité des pontes que des processus de vieillissement intra-gonadique apparaissent rapidement (Mc Evoy, 1984 ; fig. 2). Comme il n'est actuellement pas possible de situer facilement le moment de l'ovulation, la stimulation hormonale pourrait permettre à l'avenir de remédier à ces difficultés en autorisant une meilleure synchronisation des pontes.

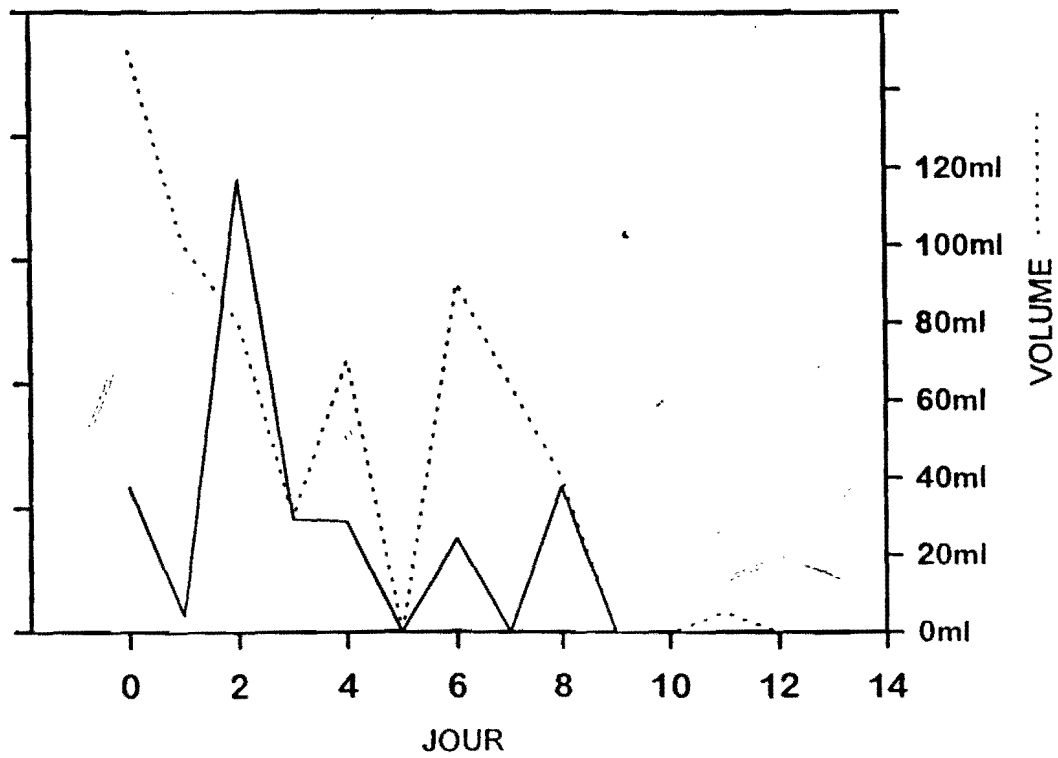
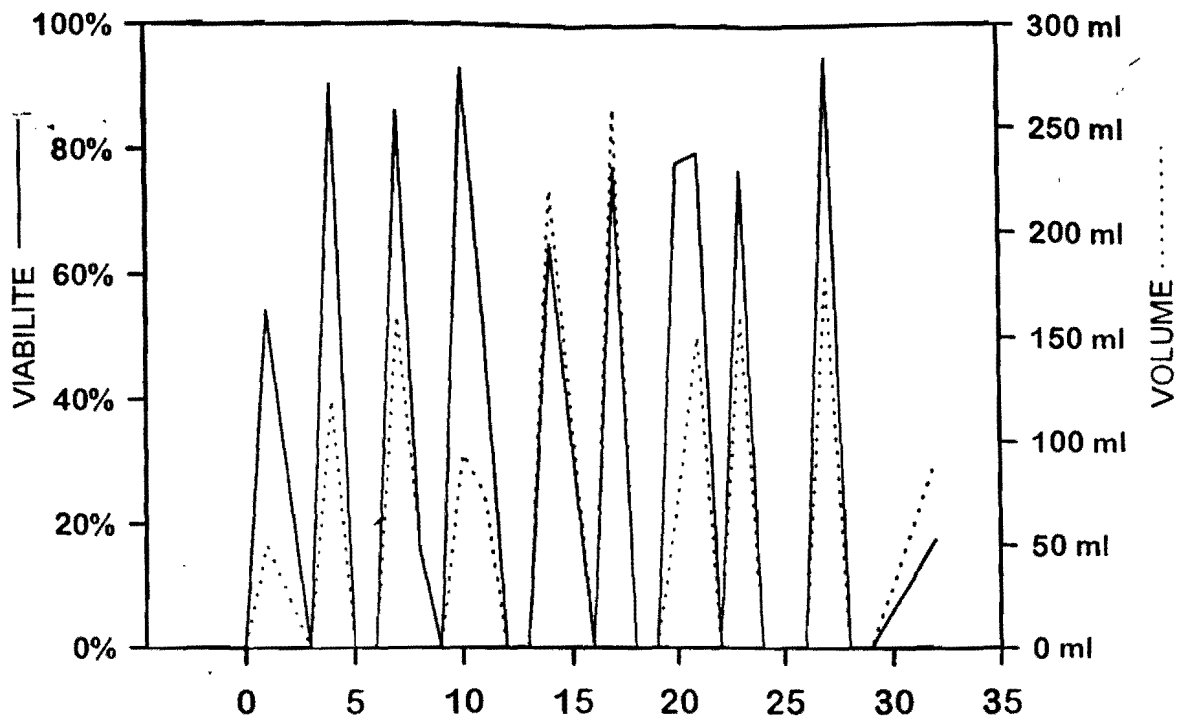
- Contrôle des pontes chez le loup : lorsque les femelles sont stimulées, le moment de l'induction a des effets sur le nombre de globules lipidiques des ovules (Fauvel et Le Gall, *commun. pers.*). Le moment de l'induction est actuellement caractérisé uniquement par des stades morphologiques des ovocytes. Il nous importe, afin de mieux les cerner, de préciser les processus post-vitellogénèse auxquels ils sont liés. Dans le cas du loup, le contrôle individuel nécessite, de plus, de pouvoir contrôler l'oviposition. Il a été montré récemment qu'elle était de nature comportementale ou sous contrôle phéromonal (Fauvel, *commun. pers.*) : des femelles individualisées ovulent sans pondre spontanément alors qu'une femelle mise avec une autre femelle, un mâle ou dont le bassin est alimenté en eau via un bassin dans lequel se trouve un autre poisson, pond spontanément. La contrainte pratique majeure en découlant est, qu'actuellement, il est nécessaire d'individualiser les femelles pour réaliser des fécondations artificielles, ce qui rend difficile la mise en place de schémas complexes de croisement.

- Maîtrise de la fécondation : l'augmentation du nombre de lots à féconder, une nécessaire fiabilisation des méthodes nous a conduit, dans un premier temps, à étudier des aspects méthodologiques. En plus de l'étude de la capacité individuelle des mâles à féconder (cf. ci-dessus), le dénombrement des ovules à féconder a été fiabilisé, la définition du taux de fécondation a été précisée, le contenant utilisé pour réaliser les fécondations, le blocage du développement pour homogénéiser les stades de lecture ont été étudiés (Suquet *et al.*, 1995). En complément de ces travaux, les effets de la contamination du sperme par l'urine qui pourrait entraîner une diminution de la mobilité des spermatozoïdes dans le cas de trop forte contamination ou une moindre capacité du sperme à se conserver ont été étudiés. Dans l'optique de la mise en oeuvre de plan expérimentaux se déroulant sur de longues durées ainsi que pour pouvoir aisément réaliser des plans de croisement, les premiers travaux sur la conservation à court terme et la cryopréservation ont été entrepris.

### **1.3 - Contrôle des facteurs d'environnement**

Dès lors (1) que des moyens seront disponibles pour analyser plus précisément la qualité des gamètes, et (2) que l'on disposera de techniques de contrôle individuel plus performantes, une analyse plus fine du rôle des facteurs d'environnement pourra être envisagée. Les travaux dans ce domaine sont donc encore peu importants. Chez le turbot, on s'attache, par exemple, à essayer de mettre en oeuvre des conditions les moins perturbantes possibles pour les géniteurs afin d'obtenir, comme par le passé, des pontes spontanées qui pourraient être une référence qualitative. L'alimentation du turbot est essentiellement composée de poissons fourrages : des essais de complémentarité nutritionnelle ont été effectués avec peu de succès et nous amènent





**Figure 4** Exemples de cycles de pontes obtenus sur deux femelles de turbot et établis d'après le volume d'oeufs récolté et le taux de viabilité.

à envisager rapidement de disposer d'un aliment artificiel qui serait une base plus contrôlée et permettrait un travail sur les incidences de la nutrition des géniteurs sur la qualité des gamètes.

#### **1.4 - Travaux futurs**

Ils sont le prolongement des travaux et des interrogations actuelles et sont destinés à fiabiliser la fécondation et l'incubation, à disposer de moyens de conservation à court ou long terme du sperme pour pouvoir contrôler (au sens expérimental) les effets mâles, d'un aliment artificiel, de techniques fiables de contrôle hormonal et à contrôler les facteurs environnementaux les plus importants quant à la qualité des gamètes.

De plus, et dans la mesure où les contraintes expérimentales, la difficulté d'approvisionnement en géniteurs et les faibles effectifs fondateurs risquent de conduire à une diminution progressive de la variabilité génétique de nos stocks, il est également prévu de mettre en place une gestion génétique des stocks ainsi qu'une analyse de leur variabilité.

## **2 - OBJECTIF N°2 : CONTROLER LES INCONVENIENTS DE LA REPRODUCTION SUR LA CROISSANCE**

Il s'agit de développements nouveaux du programme, destinés à disposer de bases zootechniques et/ou physiologiques pour pouvoir contrôler, par des facteurs d'environnement ou par voie génétique, les effets antagonistes de la reproduction et de la croissance :

- Dans un premier temps on étudiera en parallèle, à l'aide d'une description des processus hormonaux impliqués, l'entrée en puberté et la croissance ; des moyens de contrôle environnemental pourront ensuite être, si nécessaire, envisagés.

- Une description du dimorphisme sexuel sur la croissance et l'étude, dans nos conditions d'élevage, des sex-ratios nous amènera également, si nécessaire, à envisager d'étudier des moyens de contrôle environnemental. On s'intéressera, d'autre part, à la possibilité d'imposer un sexe phénotypique par voie hormonale afin de faire des populations mono-sexes.

## **CONCLUSION**

Dans le cadre des discussions de ce groupe de travail concernant la reproduction et l'amélioration de la qualité des gamètes, l'analyse de la situation des Poissons, les erreurs commises (!) ainsi que les travaux effectués permettent d'oser avancer, en guise de conclusion, les quelques remarques suivantes :

- la tendance "naturelle" à vouloir diminuer la durée des cycles biologiques ou du temps de réponse des animaux, à vouloir accroître les performances de croissance, en particulier par une élévation de la température, ne doit pas faire oublier, en l'état actuel de domestication des animaux, leurs conditions naturelles de vie : ainsi, par exemple on est en droit de se demander si les conditions d'élevage ne sont pas la cause du déséquilibre des sex-ratios obtenu systématiquement chez le loup ;

- les critères recherchés comme indicateurs de qualité sont en fait des caractéristiques liées à un ou des processus physiologiques. Plus les caractéristiques sont liées à ceux-ci, plus, en conséquence, ils sont fiables comme prédicteurs. Dès lors que l'on recherche des critères globaux, c'est-à-dire corrélés avec un ensemble complexe de processus, comme c'est le cas pour "la qualité", il semble beaucoup plus difficile de pouvoir envisager un "prédicteur fiable

et précis" : soit il sera grossier et permettra un tri entre des situations extrêmes (par exemple trier les mauvais des autres, et non pas des bons), soit il sera nécessaire de disposer d'une batterie de caractéristiques permettant de mieux cerner les différents aspects de la "qualité". On est donc en droit de s'interroger sur la possibilité de disposer d'UN indicateur précoce de qualité, précis, et qui serait la panacée ;

- les programmes d'amélioration génétique nécessitent des méthodes fiables de contrôle individuel de la reproduction et en particulier de fécondation. Cependant, ces programmes d'amélioration, en particulier ceux faisant appel aux techniques de cytogénétique dont les manipulations sont particulièrement traumatisantes, nécessitent en plus, pour avoir les meilleures chances de succès, d'être mises en oeuvre sur des gamètes ou des oeufs de "bonne qualité".

- l'amélioration de la qualité est le fruit d'une optimisation des techniques et donc des performances. En conséquence, elle justifie et nécessite que des retours en arrière sur les techniques d'élevage actuellement utilisées soit effectués.

## Références

- Chauvaud L., 1993.** Motilité et énergétique des spermatozoïdes de turbot. Rapport de DEA. Univ. Brest, 34 p.
- Fauvel C., M.H. Omnes, M. Suquet and Y. Normant, 1993.** Reliable assessment of overripening in turbot by a simple pH measurement. *Aquaculture*, **117** : 107-113.
- Mc Evoy, 1984.** Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Fish. Biol.*, **24** : 437-448.
- Mugnier C., 1990.** Etude des gamétogenèses mâles et femelles du turbot *Scophthalmus maximus* L. en captivité et en photopériode naturelle. DEA océanologie Biologique et Environnement Marin. Option Exploitation des Systèmes Aquatiques, 27 p.
- Shields, 1995.** The use of blastomer morphology as a predictive indicator of fish egg viability. Larvi'95. Fish and shellfish larviculture symposium. P. Lavens, E. Jaspers and I. Roelants (Eds). E.A.S., Special publication n° 24, Gent, Belgique.
- Suquet M., 1992.** La production de sperme chez le turbot (*Scophthalmus maximus*) : aspects descriptifs et expérimentaux. Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, 96 p.
- Suquet M., J.L. Gaignon, L. Quéméner and Y. Normant, 1995.** Artificial insemination of turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs : a procedure for experimental purposes. Larvi'95. Fish and shellfish larviculture symposium. P. Lavens, E. Jaspers and I. Roelants (Eds). E.A.S., Special publication n° 24, Gent, Belgique.

## SYNTHESE ET DISCUSSIONS

rapporteur Emmanuel THOUARD

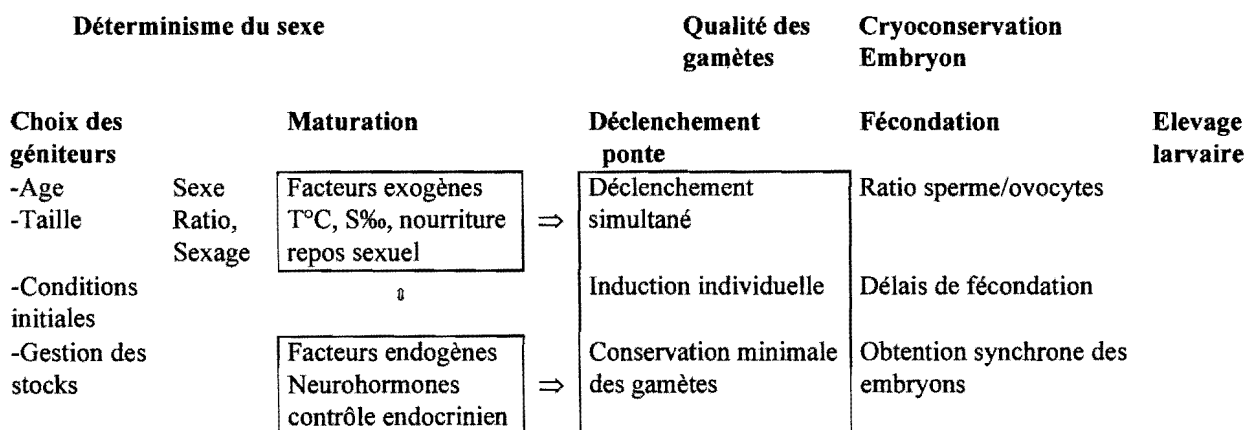
### INTRODUCTION

Henri GRIZEL ouvre cette discussion en remerciant vivement les participants pour ces journées qu'il juge particulièrement enrichissantes.

Il rappelle qu'elles ont été organisées pour satisfaire à une nécessité de synthèse des nombreux travaux accomplis dans le domaine de la reproduction des mollusques depuis plusieurs années. Pour l'IFREMER, la création d'une équipe Génétique (axée principalement sur la recherche de solutions aux problèmes de l'ostréiculture) et le développement des écloséries-nurseries, ont fait émerger la nécessité d'un programme de reproduction ou plus globalement d'un programme "maîtrise des productions en éclosérie".

Un tel programme doit se baser sur l'identification des points de blocage majeurs et ne peut être réalisé sans la participation des équipes de recherche extérieures. Les objectifs sont de dégager ces points de blocage et d'identifier ensemble les thèmes prioritaires de recherche. Pour faciliter la discussion les débats ont été articulés autour du schéma de discussion suivant :

### PRODUCTION EN ECLOSERIE



*Note du rapporteur: Les échanges sur les modèles biologiques ont été regroupés et placés en préambule de cette synthèse.*

## **- LE CHOIX DU "MODELE"**

La notion même de modèle semble déplacée en matière de mollusques. L'analyse des problèmes qu'il nous faut résoudre détermine le choix de l'espèce à étudier. Il ne s'agit donc plus d'étudier un modèle mais l'espèce qui nous intéresse directement.

Dans cet esprit les deux espèces d'huîtres doivent être étudiées : la plate et la creuse. La plate a autant d'importance que la creuse pour les équipes de la Tremblade. En effet la plate est la seule espèce pour le moment sur laquelle on peut travailler le problème de résistance aux pathologies au plan génétique.

Si la valeur économique peut être mise en avant pour hiérarchiser les priorités, l'huître creuse se place en première priorité. Cependant l'importance économique, en certains points du littoral français, de l'huître plate est rappelée.

H. Grizel souhaite à ce stade faire le point en rappelant:

**1- la coquille Saint-Jacques n'est plus étudiée par les équipes IFREMER.**

**2- il reste 3 espèces prioritaires à étudier: l'huître plate, espèce indigène présentant une valeur non négligeable, l'huître creuse dont l'importance est plus qu'évidente et enfin la moule qui reste, si l'on exclue la nacre perlière, la seconde production aquacole en France. La nacre n'est pas oubliée mais constitue un cas particulier pour lequel il n'y a pas à ce jour de projet d'écloserie.**

**3- nous sommes obligés de répondre à une demande sociale très forte sur les huîtres plates et creuses .**

**4- nos équipes et nos moyens sont réduits et ne permettent pas de tout faire, les espèces prioritaires sont bien les huîtres.**

**5- Le modèle Coquille Saint-Jacques jusqu'alors utilisé ne pourra servir que dans des cas très précis où les modèles précédents ne seront pas satisfaisants.**

## **1- CHOIX DES GENITEURS**

Le choix des géniteurs dépend de plusieurs paramètres dont certains sont reportés dans le tableau. Les discussions sur ce point ont eu lieu autour des relations (ou corrélations) existant entre l'âge, la taille, l'état initial des individus sur les performances de reproduction (qualité des gamètes et viabilité des larves).

Ces discussions ont d'abord fait ressortir le besoin très fort de faire une synthèse des connaissances acquises dans ce domaine et d'en faire l'analyse, car beaucoup de résultats ne sont pas concordants. L'intérêt majeur sera d'en identifier les raisons et conséquemment de bâtir des protocoles minimum rigoureux et reproductibles qui puissent servir de base de référence au développement de recherches dans le domaine de la reproduction des mollusques.

## **Standardisation des méthodes**

Par ailleurs, il est apparu utile de vérifier le rôle de plusieurs paramètres tels que :

- âge et taille,
- rôle de l'état initial des réserves glucidiques sur la reproduction sachant que celles-ci, à réserve égale, ne sont pas forcément mobilisables de la même manière,
- rôle de l'état initial du géniteur selon qu'il est ou non déjà entré en gamétogenèse lorsqu'il est introduit dans l'écloserie,
- rôle du repos sexuel sur le bon déroulement de la gamétogenèse.

Il a également été discuté du rôle possible des conditions environnementales sur la robustesse des animaux et sur leur adaptation (résistance aux variations thermiques importantes, aux températures extérieures etc..).

Sur le point du choix des géniteurs, la discussion a mis en évidence de nombreux programmes potentiels. Il faudrait à partir des données existantes définir les bases du travail à effectuer et standardiser les protocoles entre les équipes.

**Les sujets qui paraissent émerger portent sur :**

- **l'influence de l'âge, de la taille, de l'état des réserves sur la reproduction ;**
- **l'influence de la date de mise en conditionnement sur la mobilisation des réserves**

**Une chronologie de la méthode de travail pourrait être :**

- 1- connaissance de la population, notamment d'après les données acquises sur les populations sauvages**
- 2- connaissance individuelle**
- 3- méthode**
- 4- effet des facteurs**

Au cours de cette première partie on a pu noter à plusieurs reprises combien il était important de distinguer les besoins des chercheurs de ceux des professionnels producteurs. Concernant les critères de choix des reproducteurs la demande des généticiens et celle des professionnels (écloserie) ne se situent pas au même niveau de finesse. La maîtrise de la reproduction pour la production ne demande pas les mêmes connaissances que celle pour la recherche. La recherche demande une maîtrise au niveau de l'individu et la production au niveau de la population. Cependant le niveau individuel ne peut être étudié qu'après avoir affiné le niveau de masse.

Cette distinction doit être prise en compte au moment où l'on parle de programmes et de méthodes de travail, l'approche ne sera pas la même si l'on s'intéresse à la recherche ou à l'élevage (qui relève plutôt de l'ingénierie de la reproduction).

Il faut pourtant veiller à ce qu'il ne se crée pas de fossé entre les chercheurs "fondamentalistes" et "appliqués". La recherche que nous pratiquons est finalisée et il faut programmer la recherche fondamentale vers un objectif appliqué. Il faut donc transcrire les points de blocage en programme de recherche. D'autre part, la levée des points de blocage dits techniques passe par une bonne connaissance scientifique et fondamentale.

## 2- DETERMINISME DU SEXE

En complément au choix des géniteurs, la maîtrise de l'obtention de géniteurs mâles et femelles ainsi que leur sexage se sont révélés être importants. Des mécanismes de régulation existent dans la nature et sont relativement méconnus. De plus, des observations au laboratoire laissent à penser que les mécanismes du déterminisme du sexe pourraient varier sensiblement selon les espèces. Des études basées sur des expérimentations simples prenant en compte des paramètres tels que l'âge, le comportement des animaux, des paramètres physiques seraient de nature à préciser celui-ci.

Concernant les méthodes de sexage, des progrès ont été réalisés, mais il serait utile d'aboutir à une méthode plus rapide, non traumatisante permettant pendant la maturation ou/et avant la fécondation de trier les géniteurs. Peut-on identifier des molécules circulantes liées à l'ovogenèse ou à la spermatogenèse qui soient mesurables chez les huîtres ?

Ceci suppose d'identifier des molécules informatives liées à la gamétogenèse ainsi que les processus fins de déclenchement de la gamétogenèse, en particulier des mitoses goniales.

## 3- MATURATION

Le premier point souligné concerne la validation des données obtenues pour la coquille St6Jacques au modèle *C. gigas*. Cette validation concerne principalement les résultats acquis sur le rôle de la nutrition, en particulier des apports en acides gras essentiels et vitaminiques sur le bon déroulement de la gamétogenèse, notamment de l'ovogenèse.

En plus de cette problématique, il a été dégagé deux voies de recherche complémentaires et séquentielles. La première concerne le rôle des facteurs exogènes sur le déclenchement et le déroulement de la maturation (T°C, salinité, nourriture, éclairage, cycle lunaire), la deuxième le rôle des facteurs endogènes en particulier le rôle des neurohormones. En comparaison des données acquises chez les vertébrés, y compris chez les poissons, l'état actuel des connaissances chez les mollusques dans ces domaines est très fragmentaire et peu abondant.

Compte tenu de l'état actuel de ces connaissances et des expériences que nous ont présentées les collègues travaillant sur le poisson, la bonne stratégie pourrait être, dans un premier temps, de travailler sur la meilleure connaissance des facteurs externes qui servent de déclencheur, voire de régulateur, de la gamétogenèse sans se préoccuper de la "boîte noire" qu'est le mollusque à ce jour. Cette stratégie aurait le mérite de faire connaître l'effet des facteurs externes et par conséquent permettrait de bâtir des protocoles reproductibles pour aborder les études ultérieures, si besoin était, sur les facteurs endogènes. Il a aussi été souligné l'absence de lignées cellulaires adéquates pour conduire correctement des travaux nécessaires aux recherches sur les action hormonales.

En complément aux points précédents, il a été longuement discuté des critères d'évaluation de la gamétogenèse, ceux-ci étant nécessaires pour juger la validité des expériences réalisées. A ce jour, le critère le plus souvent utilisé est la mortalité larvaire: ce stade d'évaluation pose problème car il est tardif et nécessite de prolonger les essais et d'autres facteurs peuvent interférer pour expliquer les mortalités.

Il est ressorti des discussions que les contrôles pourraient se faire à deux phases, le stade D et à J+10, date critique pour ces élevages, notamment pour *C.gigas*. Il a été également évoqué l'examen de la prodissoconque comme critère possible d'évaluation pour l'obtention de larves compétentes.

Enfin, des suggestions de programmes ont été faites, comme les relations entre les caractéristiques des lipides des algues et celles des lipides membranaires des oeufs et des embryons et la maîtrise des productions algales correspondant aux besoins recensés pour la gamétogenèse.

#### **4- DECLENCHEMENT DES PONTES**

Ce thème recouvre plusieurs problématiques :

- déclenchements simultanés,
- induction individuelle,
- conservation des gamètes.

Il suppose que soient définis au préalable des critères de qualité des gamètes.

Très peu de travaux ont été réalisés dans ce domaine exceptés ceux sur les effets vasoconstricteurs de la sérotonine. Le problème est l'évaluation des stades de maturité sur lesquels on est très incertain.

Une comparaison est établie avec les travaux abondants réalisés sur les poissons : les dosages d'hormones circulantes à différents stades et différents âges. Pourrait-on utiliser plusieurs fois ou plusieurs années un mollusque pour savoir comment il évolue dans le temps ?

Dans un premier temps les méthodes de déclenchement actuellement utilisées doivent être standardisées pour permettre au moins la récolte de données comparables.

Un paramètre complètement incontrôlé est l'évaluation de la qualité de l'ovocyte au moment de son émission. Il existe peut être des repères hormonaux qu'il serait intéressant de rechercher.

Il serait certainement intéressant de se pencher sur la comparaison milieu naturel/écloserie. Cependant, on ne peut faire cette comparaison qu'une fois par an et, de plus, il existe une forte variabilité d'une année sur l'autre.

Les travaux présentés par A. Gérard (pontes en récipient individuel) montrent que la ponte pourrait être liée à des aspects phéromonaux qu'il serait intéressant d'étudier.

Concernant la qualité des gamètes, il paraît aujourd'hui plus important de se pencher sur l'étude des ovocytes que sur celle du sperme sur lequel on a plus de données.

A ce sujet, il est important de préciser à partir de quel moment l'influence de la qualité de l'ovocyte n'est plus prédominante pour le futur de l'animal par rapport aux autres facteurs.

Cette influence est estimée primordiale jusqu'à la larve D, ensuite les problèmes techniques et environnementaux prennent le pas. L'état des réserves est jugé déterminant pour définir cette influence (niveau des stéroïdes) .

Il y a une relation entre l'hétérogénéité dans les pontes (sur le plan des réserves) et le succès ultérieur de cette ponte. Concernant la relation entre les réserves et le succès de la ponte, il existe tous les cas de figure et la question mérite d'être approfondie.

La difficulté est de synchroniser la qualité de l'ovocyte et le déclenchement de la ponte.

Ce qui se passe dans la gonade est très important et il existe peut-être en amont un stade où les cohortes sont plus homogènes. Il serait intéressant de rechercher ce stade.



## 5- FECONDATION

La fécondation ne posant pas de problème majeur, les débats ont été autour du sujet de la cryoconservation. A ce jour ce sujet n'a fait l'objet que de travaux disparates et sans cohésion. Aujourd'hui il faut penser sérieusement à ce domaine.

Les travaux de G. Dorange sur la cryopréservation de cellules de coquille saint-Jacques pourraient servir de bases pour essayer dans les mêmes conditions de conserver des embryons. Il a cependant été fait remarqué qu'en matière de cryoconservation les résultats sont difficilement transposables.

Un blocage apparaît sur le sujet dont les raisons ne sont pas claires. Les résultats connus ne seraient-ils pas assez fiables ? Ce sujet doit être étudié en concertation avec les collègues travaillant sur les poissons.

A. Gérard et S. Arbault informe qu'une réunion s'est tenue sur le sujet. Une synthèse bibliographique sera réalisée par un stagiaire et devrait être disponible fin 1996.

En matière de cryoconservation il faut définir:

- l'espèce,
- le stade ou le type de cellules (sperme, ovocytes, embryons),
- les objectifs (commerciaux, support à l'exportation de souches, recherche génétique,...).

En effet, transcrire une méthode de cryoconservation d'un type cellulaire à un autre ne marche jamais. Par exemple, les techniques algues ne sont pas transposables aux animaux. D'autre part, des travaux sérieux en cryoconservation nécessitent de passer par certaines études fondamentales (connaissances sur les membranes par exemple) et de bien maîtriser la maturation.

Il faut à présent tenir compte de ce qui a déjà été fait afin de ne pas recommencer les erreurs du passé ; il faut des moyens techniques et enfin, il faut réunir les compétences existantes sur ce sujet.

## CONCLUSION

De nombreuses idées de programme ont émergé de ce débat. Le croisement entre les programmes (ou groupes de programmes) et les espèces pourrait donner le cadre suivant :

- **Choix des géniteurs : huîtres creuses**
- **Déterminisme du sexe : huîtres plates puis creuses**
- **Maturation : toutes espèces huîtres (priorité à la creuse)**
- **Déclenchement ponte : huîtres plates**

Au delà des programmes spécifiquement mollusques Y. Harache demande si tous les utilisateurs sont satisfaits par les méthodes de production d'algues ?

H. Grizel préconise le maintien d'un programme transversal sur les algues compte tenu des problèmes subsistant dans ce domaine. Il note que la qualité de l'eau d'élevage est aussi un problème de base qui joue un rôle dans les problèmes évoqués au cours de ce débat.

Il conclut la discussion en introduisant l'étape suivante qui sera la définition des programmes à mener ou à faire conduire par nos partenaires, ceux-ci devant être définis à partir des idées maîtresses qui ont été dégagées des discussions et en soulignant, compte tenu des efforts à réaliser, la nécessité de bien sérier et classer les points évoqués afin d'être le plus pragmatique et le plus efficace possible. L'exemple des programmes poissons serait intéressant à suivre à cet égard .

Le mot de la fin revient à A. Bodoy qui note que cette réunion aura permis d'identifier en commun les problèmes relatifs à la reproduction des mollusques bivalves. Il souhaite que cet exercice se traduise en programmation et permette de construire un dispositif de recherche efficace en interne et en externe. Il appelle les participants à proposer des axes de recherche qui seront évalués par le comité des programmes avant d'être traduits en opération de recherche et dotés des moyens nécessaires à leur réalisation.



## RIDRV97

N° RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUSION	NB PAGES	TIRAGE
97/01	RA	Physiologie des Poissons	J.L. Gaignon, L. Quémener, A. Fauré, Y. Harache	Croissance et survie marines de post-smolts de saumons atlantiques ( <i>Salmo salar</i> ) : effets de leur origine, de l'alimentation, des structures et des techniques d'élevage.	fév-97	libre	44	50
97/02	RA	U.R.A.P.C. La Tremblade	P. Gouletquer	A Bibliography of the Manila Clam <i>Tapes philippinarum</i>	mar-97	libre	120	100
97/03	RA	Martinique	B. Noguerra	Elements de biologie et données d'élevage de la dorade coryphène ( <i>Coryphaena hippurus</i> , L.1758) : synthèse bibliographique	avr-97	libre	30	50
97/04	RA	CREMA L'Hourmeau	N. Brossard, J. Hussenot	Maîtrise de la culture de masse de la diatomée <i>Skeletonema costatum</i> en système ouvert et continu sur un milieu en "eau de mer enrichie"	avr-97	restreinte	37	60
97/05	RA	L.R.C.P.L Bouin	J.P. Baud, E. Goyard	Programme qualité des huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> : 1ere année, (1995).	avr-97	libre	59	40
97/06	RA	Martinique	J.C. Falguière, O. Denis, V. Vianas, A. Sévère, G. Boeuf	Evaluation de la capacité d'adaptation à l'eau de mer de la souche hybride de tilapia rouge exploitée en eau douce aux Antilles françaises	avr-97	libre		50
97/07	RA	L.R.C.N. Port-en-Bessin	J. Kopp, J-P. Joly, E. Le Gagneur, F. Ruelle	Biomasses ostréicoles et mytilicoles de Normandie en 1995	mai-97	libre	65	100
97/08	RH	Martinique	G. Paulmier, F. Durand	Les peuplements benthiques du plateau insulaire de la Martinique et des zones bathyales adjacentes. Cas particulier de la malacofaune.	jun-97	libre	74	30
97/09	RH	ECOHAL Nantes	D. Halgand, G. Arzul, E. Erard-Le-Denn, L.Fiant, J. Huet, F. Quiniou, J. Le Claire	Surveillance écologique et halieutique de l'environnement marin du site de la centrale de Penly (Manche est) : année 1996	jun-97	restreinte	130	
97/10	RH	Martinique	A. Guillou, A. Lagin	Engins et techniques de pêche de la Martinique	jul-97	libre	215	25
97/11	RA	Brest	N. Devauchelle, J. Barret, G. Salaun	Rapport du Groupe de travail sur" la reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France", Nantes nov 95	oct-97	libre	217	



