

**Caractéristiques biologiques
des gamètes et larves d'huître
plate européenne
(*Ostrea edulis*) :
données préliminaires**



Caractéristiques biologiques des gamètes et larves d'huître plate européenne (*Ostrea edulis*)

Données préliminaires

sommaire

Résumé	p. 4
Abstract	p. 4
1) Introduction	p. 5
2) Matériel et méthodes	p. 6
3) Résultats	p. 7
4) Discussion	p. 11
Remerciements	p. 18
Références	p. 18

Résumé

Les connaissances disponibles sur les gamètes et larves des espèces de mollusques incubant leurs embryons restent limitées. Le présent rapport expose les résultats obtenus en 2016 sur les caractéristiques biologiques des gamètes et larves de l'huître plate européenne.

Les mesures sont réalisées sur une cinquantaine d'individus, récoltés en plongée dans la rade de Brest (Finistère) et durant la saison de reproduction de l'espèce. Le pH des gonades est acide ($6,58 \pm 0,54$). Après dissociation des spermatozeugmata, dans lesquels les gamètes mâles sont insérés, un pourcentage de spermatozoïdes mobiles de 20 à 34% est observé et la vitesse de déplacement est comprise entre 70 et $85 \mu\text{m/s}$ (Velocity of the Average Path). L'émission de spermatozeugmata est constatée après injection de sérotonine. Des ovocytes (taille moyenne : $129,4 \pm 19,1 \mu\text{m}$) ne sont récoltés que chez 2 huîtres sur 50. Des larves blanches (quantité moyenne : $2,14 \cdot 10^6$ larves/huître) et ardoisées ($1,23 \cdot 10^6$) sont observées chez quelques reproducteurs en phase d'incubation. Des survies comprises entre 39 et 59% sont enregistrées après incubation des larves en béciers.

Les caractéristiques biologiques des gamètes et larves d'huître plate européenne sont comparées à celles d'autres mollusques. Ces données descriptives devraient améliorer la connaissance de la reproduction de l'espèce, aider à sa protection dans le milieu naturel et favoriser la mise en place de procédures de gestion de ses gamètes et larves.

Abstract

Biological characteristics of gametes and larvae in European flat oyster (Ostrea edulis): preliminary data.

The biology of gametes and larvae in brooding mollusc species remains little explored. The aim of this study is to present the results obtained in 2016, on biological characteristics of gametes and larvae of European flat oyster.

Measurements were carried out on 50 oysters, collected by divers in the Rade de Brest (Finistère, France), during the spawning period of this species. Gonad pH is acidic (6.58 ± 0.54). After the dissociation of spermatozeugmata, an acellular structure to which the spermatozoa are clustered, the percentage of motile spermatozoa ranged from 20 to 34% and the Velocity of the Average Path from 70 to $85 \mu\text{m/s}$. Spermatozeugmata were shed after serotonin injection. Oocytes (mean diameter: $129.4 \pm 19.1 \mu\text{m}$) were rarely observed (2 oysters/50). White (mean quantity: $2.14 \cdot 10^6$ larvae/oyster) and grey ($1.23 \cdot 10^6$) larvae were collected. After incubation in beakers, the survival rates ranged from 39 to 59%.

Biological characteristics of European flat oyster gametes and larvae are compared to those observed in other mollusc species. The present results would improve the knowledge of reproduction, support the protection and favour the establishment of management protocols of gametes and larvae in this species.

1. Introduction

Comparée à l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, qui émet ses gamètes dans le milieu naturel où la fécondation est observée, le comportement reproducteur de l'huître plate européenne, *Ostrea edulis*, est original : après émission dans le milieu naturel, les spermatozoïdes sont filtrés par la femelle et les ovocytes sont fécondés dans la cavité palléale maternelle. Les larves y sont ensuite incubées puis émises dans le milieu, 7 à 10 jours après fécondation (Martin *et al.*, 1997). Sellmer (1967) liste une centaine de bivalves qui suivent ce comportement d'incubation des larves. Chez les huîtres, près de la moitié des espèces adoptent ce même comportement reproducteur, incluant une phase d'incubation des larves (O'Foighil et Taylor, 2000). La durée de la phase d'incubation dépend de l'espèce : 3 à 9 jours chez l'huître d'Argentine, *O. puelchana*, une à deux semaines pour l'huître plate européenne, l'huître australienne (*O. angasi*) ou encore l'huître plate du Pacifique (*O. lurida*) et jusqu'à 8 semaines chez l'huître chilienne (*O. chilensis* ; Mardones-Toledo, 2015).

Les connaissances disponibles sur la biologie des gamètes et larves progressent chez les espèces émettant leurs gamètes directement dans le milieu naturel, soutenues par des besoins nouveaux comme l'émergence des écloséries, la mise en place de schémas de sélection, de lignées originales telles que les huîtres tétraploïdes ou encore la conservation de génomes dans les cryobanques. A l'opposé, les publications concernant les espèces incubant leurs larves restent rares et la connaissance des traits biologiques de leur gamètes demeure limitée.

Contrairement à l'huître creuse, les spermatozoïdes d'huître plate ne sont pas émis librement dans l'eau de mer, mais maintenus dans une structure biologique, les spermatozeugmata (singulier spermatozeugma ; en anglais : « sperm bundle », « sperm morula » ou encore « sperm balls »), décrits par O'Foighil (1989). Les têtes spermatiques sont insérées dans une matrice extracellulaire, produite durant la condensation des spermatides et les flagelles restent extérieurs à cette structure. Quelques centaines à quelques milliers de spermatozoïdes sont ainsi maintenus dans le spermatozeugma qui s'ouvre quelques heures après émission dans l'eau de mer. Cette structure de maintien des spermatozoïdes est également décrite chez l'huître plate du Pacifique (Hori, 1933) ou encore chez l'huître australienne chez laquelle le temps nécessaire à sa dissociation est fonction du niveau de masculinité du reproducteur (mâle, hermaphrodite à tendance mâle ou femelle ; Hassan *et al.*, 2016). Chez les mollusques, les spermatozoïdes peuvent être émis par choc chaud des reproducteurs, par addition de peroxyde d'hydrogène dans le milieu de ponte (Morse *et al.*, 1977) ou par injection intragonadale d'un neuromédiateur, la sérotonine (Gibbons et Castagna, 1984). Chez les espèces émettant des spermatozeugmata comme les vers marins, *Arenicola marina* et *A. defodians*, l'injection d'acide eicosatriénoïque a pour conséquence l'émission de sperme (Watson *et al.*, 1998).

A l'intérieur de la chambre intervalvaire maternelle de l'huître chilienne, les larves nagent librement et se nourrissent de particules suspendues dans cette cavité (Chaparro *et al.*, 1993). Chez l'huître plate européenne, la fécondité s'accroît avec l'âge des reproductrices (Cole, 1949).

L'huître plate européenne est l'espèce traditionnellement élevée en France. Les stocks d'huître plate ont été décimés en raison d'une surpêche et d'épidémies successives (Hegaret et Mazurié, 2005 ; Duchêne *et al.*, 2016). Une meilleure connaissance de la reproduction de l'huître plate est donc essentielle, la convention européenne OSPAR (Convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic) ayant reconnu la nécessité de renforcer la protection de cette espèce (Ospar, 2013). Une connaissance des caractéristiques biologiques de la reproduction devrait favoriser la gestion de l'espèce dans le milieu naturel mais aussi soutenir d'éventuelles possibilités de repeuplement comme de conservation de génomes en cryobanque (Horvath *et al.*, 2012).

Le présent rapport expose les résultats obtenus durant l'année 2016 sur la reproduction de l'huître plate européenne et plus particulièrement sur la description des éléments biologiques des gamètes et larves de cette espèce.

2. Matériel et méthodes

Les huîtres plates (poids moyen±écart type : 118,5±39,1g) sont récoltées lors de plongées en rade de Brest (Finistère, anse du Roz), entre le 10 mai et le 12 juillet 2016, durant la saison naturelle de ponte de l'espèce. Les animaux sont ensuite transférés à l'écloserie expérimentale d'Argenton et placés en conditionnement, afin d'achever leur maturation. Les huîtres sont maintenues par lots de 100 individus dans des bassins de type « race way », d'un volume de 100L et soumis à un renouvellement constant de l'eau de mer. Les conditions d'élevage favorisent la maturation des reproducteurs : température de l'eau 19°C et distribution journalière d'un cocktail de micro algues (*Tisochrysis lutea* clone tahitien T-iso et *Chaetoceros muelleri*), selon un protocole mis au point précédemment (Chavez Villalba *et al.*, 2002).

Chez le mâle et après ouverture de la coquille supérieure, une incision est réalisée dans la gonade et le pH est enregistré après insertion d'une micro sonde (IQ Scientific instrument, n=12 huîtres, triplicat de mesure). La même observation est réalisée dans la partie digestive de l'animal. Un prélèvement de 20µl est réalisé dans le testicule, à l'aide d'une pipette. Pour faciliter l'examen des spermatozeugmata, le prélèvement est dilué dans 500µl de milieu d'activation (MA : eau de mer, 20mM Tris, pH 8,2, 2g/L BSA et température 19°C) et 12 µl de ce mélange sont insérés dans une cellule d'observation (Fast Read 102, Biosigma). Les spermatozeugmata sont observés au microscope à contraste de phase (Olympus BX51, objectif x10 ou 20) et leur taille est mesurée (n=5 mâles). La cinétique d'ouverture des spermatozeugmata est décrite à deux temps après ajout d'eau de mer à 19°C: 30 et 150 min (n=1 mâle). D'autre part, le mouvement des spermatozoïdes libérés du spermatozeugmata est enregistré (Qicam fast, 60 images/s et 4s de durée/film) 5 minutes après activation dans le milieu MA. Les caractéristiques du mouvement sont:

- VCL : curvilinear velocity, calculée en suivant l'intégralité du déplacement des spermatozoïdes
- VAP, velocity of the average path, calculée en suivant un déplacement moyen des spermatozoïdes

- Linéarité, définissant la forme de la trajectoire suivie par les spermatozoïdes

L'analyse est réalisée à l'aide du plugin CASA, développé pour le logiciel Image J et selon un script préalablement défini pour l'huître creuse (Suquet *et al.*, 2016 ; n> 30 spermatozoïdes pour chacun des 3 mâles)

Enfin, l'effet de chocs de température (passages successifs de 19 à 14 puis retour à 19°C) et d'inducteurs de la ponte (maintien dans une solution de 5mM H₂O₂, injection intragonadale de 13µg/huître d'acide eicosatriénoïque 8-11-14 dilués dans du méthanol ou injection intragonadale de 100µl de sérotonine à 50mM dilués dans l'eau de mer filtrée) est observé (n=5 huîtres, sauf sérotonine : n=4). Après traitement, les huîtres sont maintenues en bêche (600ml d'eau de mer à 20°C) et l'éventuelle émission de sperme est observée.

Chez les femelle, des ovocytes sont prélevés et leur taille mesurée (n=2 femelles sur 50 observées, 15 ovocytes). Lors des prélèvements du 17 juin et du 12 juillet 2016, des larves sont collectées immédiatement après ouverture des femelles, sans passage des animaux par une phase de conditionnement préalable. Le diamètre des larves blanches (n=4 femelles, 160 larves mesurées) et ardoisées (n=2 femelles, 11 larves mesurées) est estimé à l'aide du logiciel Image J. Des essais d'incubation des larves hors de la mère sont réalisés: 1) le 17 juin, des larves collectées chez 6 femelles (3 lots larves blanches et 3 lots de larves ardoisées) sont mises en incubation (5 000 larves par bêche de 5L, entouré de papier aluminium permettant de diminuer l'intensité lumineuse). Le milieu est remplacé tous les 2 jours (filtration des larves à 40µm et eau de mer à 20°C) et la nourriture est distribuée à cette occasion (même cocktail de micro algues que celui distribué aux reproducteurs). La survie est estimée après 4 jours, 2) le 6 juillet, des larves blanches collectées chez une seule femelle maintenue en conditionnement, sont placées en incubation dans des conditions identiques au premier essai (triplicat). La survie est estimée après 7 jours.

Les résultats sont présentés sous la forme moyenne±écart type.

3. Résultats

Le pH moyen mesuré dans les gonades est de 6,58±0,54 et la valeur relevée dans la partie digestive est de 6,34±0,43.

Chez le mâle, des spermatozeugmata sont observés dont la forme est variée : de ronde jusqu'à une absence de forme géométrique identifiable, selon le degré de dissociation de la structure dans l'eau de mer. Les têtes spermatiques sont insérées dans la structure centrale et les flagelles apparaissent à la périphérie. Un mouvement lent des flagelles est le plus souvent observé dont la conséquence est, parfois, un déplacement limité des spermatozeugmata.

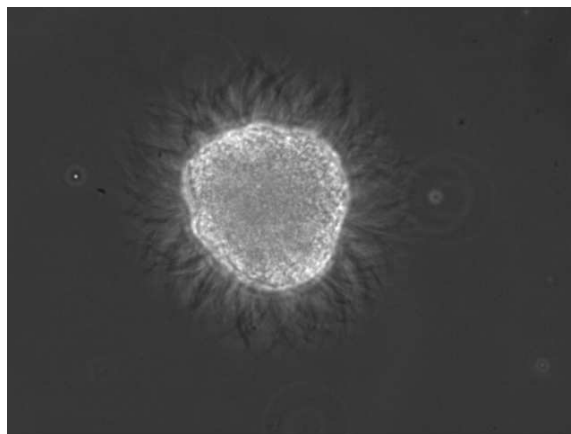


Fig 1. Spermatozeugma observé après prélèvement dans un testicule (x 40).

La longueur maximale des spermatozeugmata est comprise entre $46,5 \pm 11,8$ et $73,8 \pm 30,9 \mu\text{m}$, selon les individus.

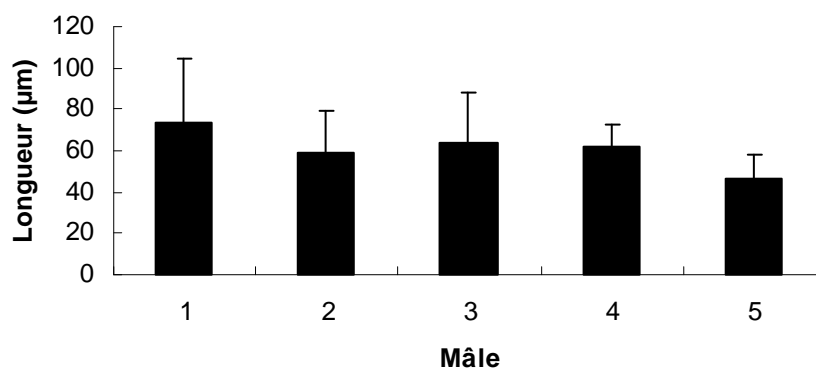


Fig. 2. Variation individuelle de la longueur maximale des spermatozeugmata.

Après deux heures d'incubation dans l'eau de mer, la taille des spermatozeugmata est divisée par un facteur de 2,5.

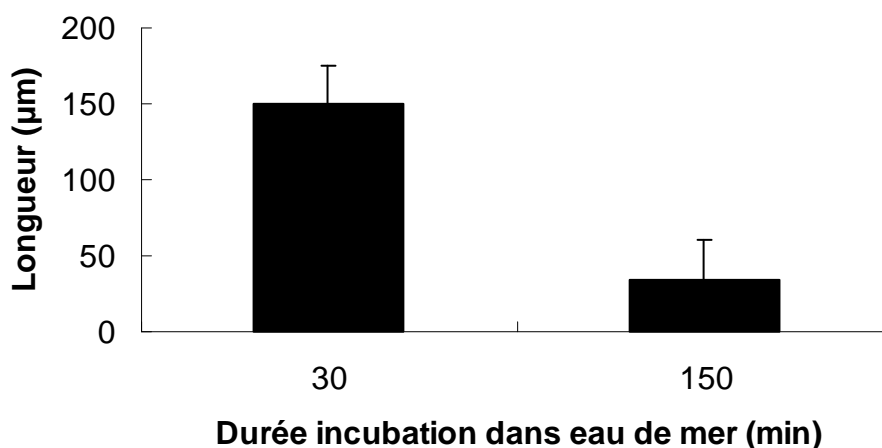


Fig. 3. Evolution de la longueur maximale des spermatozeugmata en fonction de la durée d'incubation dans l'eau de mer.

Des spermatozeugmata partiellement vidés des spermatozoïdes sont observés.

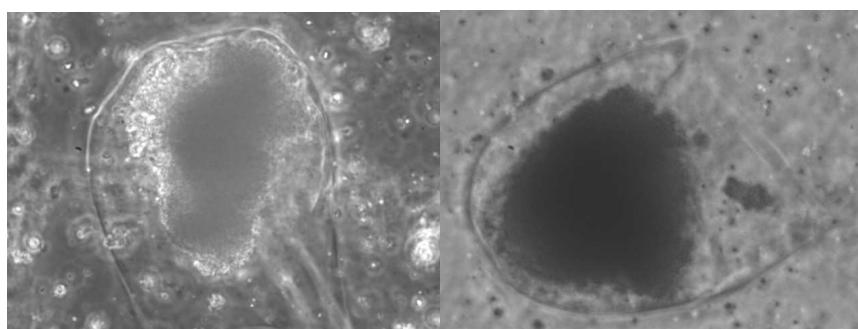


Fig. 4. Spermatozeugmata partiellement vidés des spermatozoïdes (x40)

Quelques caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes, libérés des spermatozeugmata, sont résumées dans le tableau 1.

Male n°	Spermatozoïdes mobiles (%)	VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	Linéarité
1	33,8	129,3±4,6	85,5±5,9	0,857±0,030
2	19,3	140,0±12,5	70,1±7,9	0,801±0,020
3	31,1	177,8±42,4	70,6±22,1	0,588±0,113

Tableau 1. Caractéristiques du mouvement de spermatozoïdes après libération des spermatozeugmata

L'émission de sperme n'est pas constatée après chocs successifs de température appliqués aux reproducteurs ou incubation des huîtres dans une solution d'eau de mer et H_2O_2 ou encore après injection d'acide eicosatriénoïque dans la gonade. Deux heures après l'injection d'une solution de sérotonine, l'émission de sperme est observée chez les 4 individus traités. Le comptage du nombre de spermatozoïdes émis est délicat puisque la présence de spermatozeugmata, contenant des gamètes insérés dans la structure, varie en fonction du temps après émission. Six heures après injection, l'un des individus a émis $5,5 \times 10^9$ spermatozoïdes, libérés des spermatozeugmata.

Chez la femelle, des ovocytes sont observés chez un faible nombre d'individus (2 huîtres sur 50). De plus, des spermatozeugmata sont observés chez des individus chez lesquels des ovocytes sont également relevés.

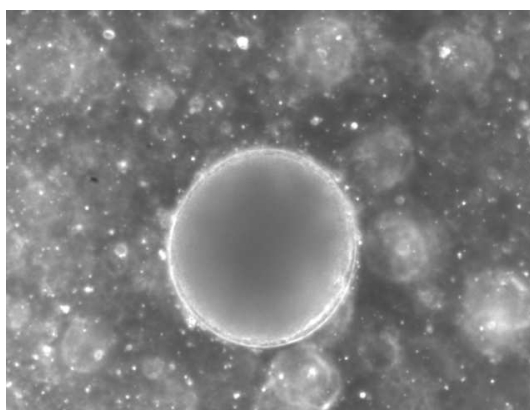


Fig. 5. Ovocyte d'huître plate (x20).

La taille moyenne des ovocytes est de $129,4 \pm 19,1 \mu\text{m}$.

A l'occasion de pêches dans le milieu naturel, des larves blanches, plus jeunes (nombre moyen par reproducteur : $2,14 \pm 0,31 \cdot 10^6$) et ardoisées ($1,23 \pm 0,42 \cdot 10^6$) sont observées.

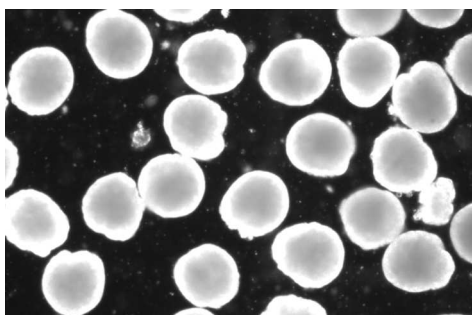


Fig. 6 Larves blanches (x 10)

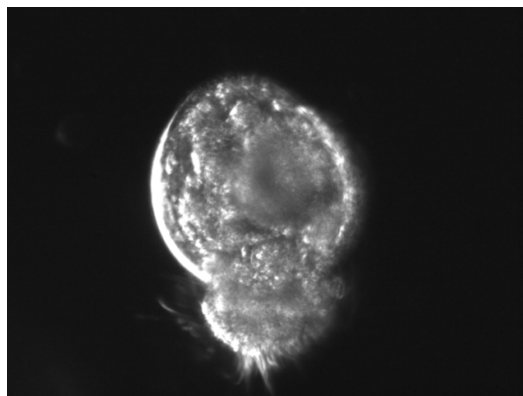


Fig. 7. Larve ardoisée (x 20)

Selon le stade larvaire, blanc ou ardoisé, les tailles moyennes diffèrent.

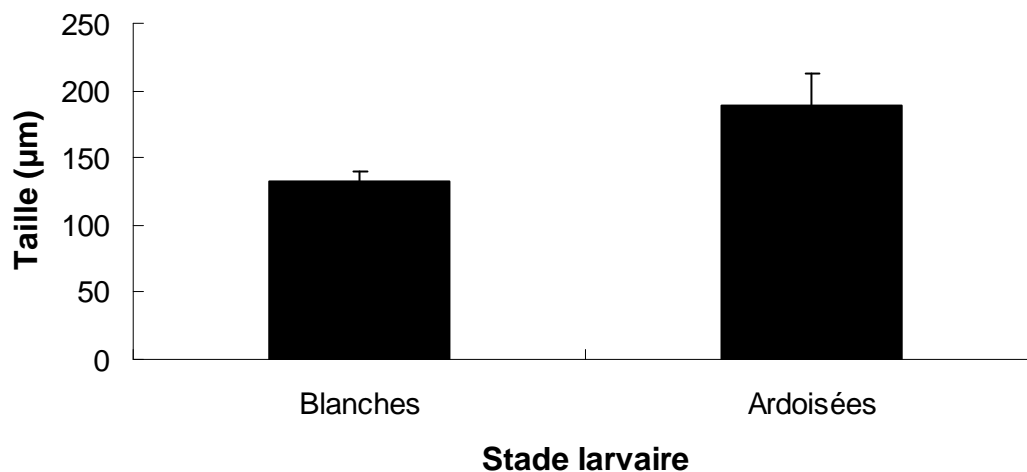


Fig. 8. Taille moyenne des larves en incubation maternelle

Lors du premier essai et après 4 jours d'élevage en béciers, la survie de larves blanches ou ardoisées est respectivement de $59,0 \pm 17,7\%$ et $50,7 \pm 4,6\%$. Lors du deuxième essai, la survie moyenne de larves initialement blanches est de $38,7 \pm 13,3\%$, après 7j d'incubation.

4. Discussion

La présence de spermatozeugmata constatée au sein du sperme d'huître plate, est commune à de nombreuses espèces animales, d'eau douce comme marines.

Groupe	Espèce	Environnement	Référence
Vers	<i>Arenicola marina</i>	Marin	Bentley, 1985
Vers	<i>Thysanocardia nigra</i>	Marin	Maiorova et Adriano, 2005
Holothurie	<i>Pseudopythina tsurumaru</i>	Marin	Lutzen <i>et al.</i> , 2004
Bivalve	<i>Lampsilis straminea</i>	Eau douce	Mosley <i>et al.</i> , 2014
Bivalve	<i>Tiostrea chilensis</i>	Marin	Jeffs, 1998
Bivalve	<i>Anodonta grandis</i>	Eau douce	Lynn, 1994
Bivalve	<i>Truncila truncata</i>	Eau douce	Waller et Lasee, 1997
Bivalve	<i>Nutricula confusa</i>	Marin	Falese <i>et al.</i> , 2011
Bivalve	<i>Nutricula tantilla</i>	Marin	Falese <i>et al.</i> , 2011
Bivalve	<i>Arthritica bifurca</i>	Marin	Jespersen et Lutzen, 2009
Bivalve	<i>Ostrea angasi</i>	Marin	Hassan <i>et al.</i> , 2016
Bivalve	<i>Ostrea lurida</i>	Marin	Coe, 1931.
Bivalve	<i>Ostrea puelchana</i>	Marin	Morriconi et Calvo, 1979
Poisson	<i>Potamotrygon magdalenae</i>	Marin	Pereros-Sierra et Ramirez-Pinilla, 2015
Poisson	<i>Centroscymnus coelolepis</i>	Marin	Girard <i>et al.</i> , 2000
Poisson	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Eau douce	Melo <i>et al.</i> , 2011
Poisson	<i>Galeorhinus galeus</i>	Marin	Mc Clusky M.L., 2015
Poisson	<i>Poecilia reticulata</i>	Eau douce	Kinnberg et Toft, 2003
Poisson	<i>Carcharias taurus</i>	Marin	Lucifora <i>et al.</i> , 2002

Tableau 2. Présence de spermatozeugmata rapportée chez quelques espèces animales aquatiques.

Les spermatozeugmata sont communs chez les vers, concombres de mer, tubifex, raies, requins, poissons chats, gastéropodes (Robertson, 2007) et bivalves dont les huîtres plates. Selon les auteurs et l'espèce étudiée, les spermatozeugmata pourraient jouer différents rôles :

- Diminuer l'incidence de l'autofécondation (Coe, 1931)
- Protéger les spermatozoïdes contre de possibles réactions du système immunitaire de la femelle (Parreira *et al.*, 2009)
- Améliorer la protection des spermatozoïdes face à l'environnement (O'Foighil, 1989 ; Lynn, 1994 ; Ishibashi *et al.*, 2000)
- Maintenir les spermatozoïdes immobiles en favorisant la conservation des réserves en ATP intracellulaire (Serrao et Havenhand, 2009)

- Fournir aux spermatozoïdes des réserves énergétiques sous des formes complémentaires telles que les lipides, comme suggéré chez la littorine (*Littorina sitkana* ; Bucklands-Nicks et Chia, 1977)
- Favoriser le transport des spermatozoïdes vers les femelles (Lynn, 1994).

Pour de faibles courants, des transports des spermatozeugmata sur une distance de 5 à 8 km, correspondant à des durées de 48 à 72h, sont calculés chez la moule d'eau douce (*Lampsilis straminea* ; Mosley *et al.*, 2014), les structures de maintien des spermatozoïdes conservant leur qualité initiale. Chez une autre moule d'eau douce émettant des spermatozeugmata, *Lampsilis cardium*, des ovocytes sont fécondés par apport de sperme émis par des individus situés à plus de 16km en amont (Ferguson *et al.*, 2013). Chez l'huître d'Argentine, des spermatozeugmata sont observés chez des mâles solitaires de grande taille, tandis que des reproducteurs plus petits et dont le comportement est de se maintenir à proximité des femelles (Calvo et Morriconi, 1978 ; Morriconi et Calvo, 1979) ou d'être portés par les secondes (Pascual, 1997) émettent des spermatozoïdes libérés de cette structure. L'ensemble de ces comportements reproducteurs a pour conséquence une optimisation de la fécondation des ovocytes retenus par la femelle et, ultérieurement, du recrutement de l'espèce et de la formation de bancs. Chez la moule d'eau douce, *Lampsilis straminea*, 25 spermatozeugmata contenant chacun 6 000 spermatozoïdes, pourraient être suffisants pour féconder la ponte d'une même femelle comptant 150 000 ovocytes (Mosley *et al.*, 2014). La forme des spermatozeugmata peut varier : de ronds ou sans forme géométrique identifiable chez l'huître plate, le spermatozeugma présente une forme proche d'une méduse chez les vénérédés, *Nutricula confusa* et *N. tantilla*, les flagelles émergeant d'un seul côté du cœur de la structure dans laquelle sont insérées les têtes spermatisées (Falese *et al.*, 2011). Enfin, des structures proches des spermatozeugmata sont rapportées selon les espèces comme des sphères, observées chez plusieurs moules d'eau douce au Japon (Ishibashi *et al.*, 2000).

Selon les espèces, le nombre de spermatozoïdes insérés dans les spermatozeugmata diffère: 300 à 350 chez le vers *Thysanocardia nigra* (Maiorova *et al.*, 2005), 440 à 2 900 dans le groupe des poissons Clinidae essentiellement représentés par la famille des blennies (Fishelson *et al.*, 2007), 250 à 2 000 chez l'huître plate du Pacifique (Coe, 1931), jusqu'à 2 800 chez la moule d'eau douce Anodonte (*Anodonta grandis*, Lynn, 1994) et 8 à 9 000 chez la moule d'eau douce Deertoe (*Truncilla truncata* ; Waller et Lasee, 1997). Cependant, la détermination du nombre précis de spermatozoïdes reste difficile en utilisant les moyens d'observation classiques. Dans le cadre du présent travail, la taille maximale des spermatozeugmata observée chez l'huître plate européenne (47 à 74µm, selon les individus) est proche de celle relevée par O'Foighil (1989) pour la même espèce (25 à 80µm), comme de celle de l'huître plate du Pacifique (40 à 60µm ; Coe, 1931) ou de l'anodonte (40 à 50µm ; Lynn, 1994). Cette taille est par contre supérieure chez l'huître australienne (117µm ; Hassan *et al.*, 2016). Ces comparaisons doivent être tempérées par la diminution de la taille des spermatozeugmata, observée dans ce travail après incubation dans l'eau de mer et suggérant que ces mesures doivent être liées à un temps de contact avec ce milieu.

Comme décrit précédemment (O'Foighil, 1989), les spermatozeugmata peuvent être collectés par prélèvement direct dans la gonade de l'huître plate. Un phénomène de maturation des gamètes le long du tractus génital est rapporté chez plusieurs bivalves, affectant la qualité de spermatozoïdes directement prélevés dans la gonade: chez l'huître perlière (*Pinctada fucata martensii*), le mouvement des spermatozoïdes prélevé à ce niveau ne peut être activé (Demoy-Schneider *et al.*, 2002). Une augmentation croissante des caractéristiques de la mobilité des spermatozoïdes de coquille saint Jacques (*Pecten maximus*)

est relevée lorsque les gamètes sont prélevés de la partie distale du testicule jusqu'au gonopore, suggérant l'existence d'un phénomène de maturation le long du tractus génital (Suquet *et al.*, 2013). L'existence d'un tel phénomène de maturation le long des voies génitales n'a pas été étudié chez l'huître plate et plus généralement chez des espèces émettant des spermatozoïdes. Cependant, afin de récolter des cellules pleinement matures, l'émission des gamètes par voie naturelle est le plus souvent favorisée. Contrairement à ce qui est classiquement observé chez les mollusques, l'émission de gamètes n'est pas relevée dans le présent travail à la suite de chocs successifs de température ni après injection d'acide gras eicosatriénoïque 8-11-14, comme cela est rapporté chez l'arénicole (Pacey et Bentley, 1992). L'injection d'un neuromédiateur, la sérotonine, favorise l'émission de sperme chez l'huître plate européenne. L'effet de la sérotonine sur l'émission de sperme a été préalablement observée chez six espèces de bivalves (Gibbons et Castagna, 1984) ou chez la coquille saint Jacques mais pour des doses injectées 25 fois plus faibles que celles utilisées dans le présent travail et des temps d'attente entre l'injection et la ponte, quatre fois plus courts (Suquet *et al.*, 2013). Si l'efficacité de la sérotonine sur l'émission de sperme n'est pas rapportée chez des espèces émettant des spermatozoïdes, celle de la fluoxétine, le composé actif du Prozac, est décrite chez la moule d'eau douce, *Elliptio complanata* (Bringolf *et al.*, 2010). La fluoxétine, un antidépresseur fréquemment retrouvé dans les rejets urbains, est un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine qui rétablit le rôle de ce composé sur la reproduction (Fong *et al.*, 1998). La présence de sérotonine est relevée dans le tissu nerveux de sept espèces de mollusques, sans que l'huître plate européenne ne fasse partie des espèces étudiées dans ce travail (Welsh et Moorhead, 1960).

En présence d'eau de mer, l'ouverture des spermatozoïdes et la libération de spermatozoïdes sont observées. La dissociation totale des spermatozoïdes d'huître plate européenne n'est relevée qu'après 24h d'incubation dans l'eau de mer à 14°C (O'Foighil, 1989). Chez l'huître plate australienne, la dissociation des spermatozoïdes est observée après 4, 10 ou 20 heures, selon le sexe du reproducteur (respectivement femelle hermaphrodite, mâle hermaphrodite et mâle ; Hassan et Li, 2016). L'étude de O'Foighil (1989) signale que cette dissociation est précédée par une augmentation graduelle du mouvement des flagelles émergeant du spermatozoïde et que la matrice extracellulaire dans laquelle les têtes spermatozoïdes sont insérées, s'érode progressivement, libérant les spermatozoïdes. Le mécanisme d'ouverture des spermatozoïdes ainsi que l'élément responsable de l'activation rapide du mouvement des spermatozoïdes ne sont pas décrits. Cependant, le pH acide mesuré dans la gonade de l'huître plate européenne (6,58) suggère un mécanisme d'activation lié au changement de pH lors de l'émission dans l'eau de mer, comme constaté chez l'huître creuse (Boulais, 2014) qu'il conviendra cependant de confirmer par des travaux complémentaires. Chez l'arénicole, un mécanisme complexe d'activation des spermatozoïdes est décrit, comprenant deux phases : i) la dissociation des spermatozoïdes en présence d'un facteur de maturation des spermatozoïdes, l'acide eicosatriénoïque 8-11-14 et, ii) la stimulation du battement flagellaire induisant le mouvement du spermatozoïde, sous contrôle d'un changement de pH entre la gonade et l'environnement marin (Pacey *et al.*, 1994).

Lors de l'ouverture du spermatozoïde, des spermatozoïdes libres sont expulsés et les caractéristiques de leur mouvement sont comparées dans le tableau ci dessous avec celles enregistrées chez quelques bivalves. Comparé aux autres espèces, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles mesuré chez l'huître plate est faible. La vitesse de déplacement est comparable à celle observée chez l'huître creuse, mais plus faible que celle enregistrée chez les trois autres espèces.

Espèce	Pourcentage de spermatozoïdes mobiles	VAP ($\mu\text{m/s}$)	Référence
Huître plate	28	75	Présent travail
Huître creuse	73	46	Boulais, 2014
Huître perlière	40	221	Demoy-Schneider <i>et al.</i> , 2012
Pétoncle noir	67	182	Présent travail
Coquille Saint Jacques	82	162	Suquet <i>et al.</i> , 2013

Tableau 3. Caractéristiques du mouvement de spermatozoïdes de cinq espèces de bivalves

La durée de mouvement des spermatozoïdes d’huître plate n’a pas été mesurée dans le cadre de ce travail. Techniquement, cette mesure est délicate en raison de la libération continue de nouveaux gamètes par ouverture du spermatozeugma. Chez cinq espèces de moules, le mouvement des spermatozoïdes libérés des sphères dans lesquelles ils sont insérés lors de leur émission, est limité à quelques minutes dans l’eau douce (Ishibashi *et al.*, 2000). De façon plus générale, le mouvement des spermatozoïdes d’espèces émettant leurs gamètes librement dans l’environnement marin a pour objectif de favoriser la rencontre entre les gamètes mâles et femelles et la fécondation des ovocytes. Selon l’espèce, les caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes peuvent compenser le comportement reproducteur des parents. Lorsque les reproducteurs peuvent se mouvoir et se rapprocher, comme chez les poissons, le mouvement des spermatozoïdes est de courte durée et la distance parcourue lors de la phase de mouvement, limitée. Lorsque les parents sont immobiles, comme chez l’huître creuse, la durée du mouvement des spermatozoïdes est élevée, soutenue par un renouvellement continu des réserves en ATP intracellulaire et une longue distance est parcourue durant la phase de mouvement (Suquet *et al.*, 2012). Le cas de l’huître plate est original, puisque les spermatozeugmata sont émis à proximité des femelles et entraînés par le courant inhalant, créé par les huîtres, vers les ovocytes. La faible distance que doivent parcourir les spermatozoïdes suggère une adaptation des caractéristiques du mouvement chez cette espèce qui reste à confirmer lors de travaux ultérieurs.

De façon originale, la présence d’ovocytes est rarement observée dans les gonades des 50 huîtres plates observées dans le cadre de ce travail, malgré des prélèvements multiples réalisés sur plusieurs individus. Les animaux pêchés en rade de Brest sont âgés des 3 à 7 années. Les huîtres âgées de plus de deux années tendent pourtant à produire le plus souvent des ovocytes (Orton, 1927). Le changement de sexe de l’huître plate est un phénomène complexe et l’effet de nombreux facteurs comme l’âge des animaux, la température de l’eau et la disponibilité en nourriture a été décrit, sans qu’il soit possible de mettre en évidence un déterminisme majeur (Joyce *et al.*, 2013). La prédominance de mâles (pourcentage de femelles compris entre 13 et 14% selon les années) a été soulignée dans une population d’huîtres plates, proche de l’île de Wight (Kamphausen *et al.*, 2011). Un nombre de femelles compris entre 8 et 27% est observé sur des animaux âgés de 3 à 6 années,

récoltés sur les bancs au large de la Trinité sur mer (Dantan, 1912). Le même auteur observe la présence d'ovocytes chez 6,7% des 133 individus récoltés à Arcachon (Dantan, 1913).

La taille moyenne des ovocytes d'huître plate européenne, observée dans le cadre de ce travail, est proche de celle rapportée dans la littérature pour cette même espèce (150µm, Waller, 1981). Parmi les différentes espèces d'huîtres plates, cette taille est intermédiaire et supérieure à celle de l'huître creuse.

Espèce	<i>T. chilensis</i>	<i>O. edulis</i>	<i>O. lurida</i>	<i>O. permollis</i>	<i>C. gigas</i>
Taille de l'ovocyte (µm)	285	150	103	70	52

Tableau 4. Taille comparée de l'ovocyte de différentes espèces d'huître
(adapté de Buroker, 1985)

La littérature scientifique souligne que le nombre de larves produites par huître plate européenne double chaque année : 92 000 pour un animal âgé d'une année jusqu'à 900 000 à 4 ans (Cole, 1949). Pour ces mêmes âges, un autre travail estime l'augmentation de la production de 100 000 à 1 100 000 larves et jusqu'à 1 500 000 larves à 7 ans (Walne, 1974). En élevage et chez des huîtres âgées de deux années, la fécondité individuelle est comprise entre 160 000 et 390 000 larves, selon le régime algal distribué aux reproducteurs (Gonzalez-Araya *et al.*, 2012). Dans le présent travail, le nombre de larves produites par individu âgé de 3 à 7 années, est donc élevé et compris entre 900 000 et 2 500 000 par huître.

La taille moyenne des larves blanches (140µm) est inférieure à celle des larves ardoisées (190µm). Comme pour les ovocytes, la taille des larves d'huître plate européenne, lors de leur émission dans le milieu naturel, est intermédiaire parmi les autres espèces d'huître plate et supérieure à celle de l'huître creuse.

Espèce	<i>T. chilensis</i>	<i>O. edulis</i>	<i>O. lurida</i>	<i>O. permollis</i>	<i>C. gigas</i>
Taille de la larve (µm)	469	185	177	118	90

Tableau 5. Taille comparée de larves de différentes espèces d'huître
(adapté de Buroker, 1985)

L'incubation de larves d'huître plate européenne, blanches ou ardoisées, est possible et aboutit à des survies comprises entre 40 et 60% selon les essais. Le comportement des larves d'huître plate européenne, durant la phase d'incubation dans la chambre intervalvaire maternelle, n'est pas décrit. Lors de leur incubation, les larves d'huître chilienne s'alimentent (Chaparro *et al.*, 1993). C'est pourquoi, des micro algues ont été apportées aux larves d'huître durant les essais d'incubation réalisés dans le cadre de la présente étude.

En conclusion, quelques unes des caractéristiques biologiques des gamètes et larves d'huître plate européenne ont été décrites dans le cadre de cette étude. Elles mettent en évidence l'originalité du comportement reproducteur de l'huître plate européenne, comparé

aux espèces le plus souvent étudiées. Ces données doivent être complétées par des études ultérieures portant sur la biologie de la reproduction de l'espèce : contrôle de l'émission des gamètes, description de l'ouverture des spermatozeugmata et de l'activation des spermatozoïdes, caractéristiques biologiques des gamètes. Ces éléments devraient améliorer la description de la stratégie de reproduction adoptée par l'huître plate européenne et aider à proposer des mesures adaptées à la conservation et la restauration des bancs sauvages, en milieu naturel. En effet, une meilleure connaissance de l'efficacité de la reproduction en fonction de l'éloignement des reproducteurs, devrait aider à définir les densités minimales à respecter sur les bancs naturels. D'autre part, la définition de techniques de cryopréservation des gamètes pourrait soutenir la conservation à long terme du patrimoine génétique de l'huître plate européenne. Enfin, la mise en place d'une véritable gestion des gamètes et larves de cette espèce devrait soutenir le développement de l'élevage, réalisé à des fins de consommation humaine comme de soutien au développement des bancs naturels.

Remerciements

Les auteurs remercient Sébastien Petton (Ifremer/LPI) et Matthias Huber (Ifremer/LPI) pour les captures de reproducteurs d'huître plate en plongée, en rade de Brest. M.S. remercie également Jacky Cosson (Faculty of Fisheries and Protection of Waters, Université de sud Bohême, République Tchèque) pour les discussions concernant le modèle animal. Ce travail a été financé dans le cadre du projet CRB-Anim (ANR-11-INBS-0003), investissements d'avenir.

References

- Bentley M.G., 1985. Sperm maturation response in *Arenicola marina* L.: an in vitro assay for sperm maturation factor and its partial purification. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 8, 139-148.
- Boulais M., 2014. Métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Thèse, Université Bretagne Occidentale, Brest, 140pp.
- Calvo J. et Morriconi E., 1978. Epibiontie et protandrie chez *Ostrea puelchana*. *Haliotis* 9, 85-88.
- Chapparo O.R., Thompson R.J. et Ward J.E., 1993. In vivo observations of larval brooding in the Chilean oyster, *Ostrea chilensis* Philippi, 1845. *Biological Bulletin*, 185: 365-372.
- Chavez-Villalba J., Pommier J., Andriamiseza J., Pouvreau S., Barret J., Cochard J.C. et Le Pennec M., 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effects. *Aquaculture* 214, 115-130.
- Coe W.R., 1931. Spermatogenesis in the California oyster (*Ostrea lurida*). *Biological Bulletin* 61, 309-315.
- Cole H.A., 1949. The fecundity of *Ostrea edulis*. *Journal of the Marine Biological Association* 25, 243-260.
- Dantan J.L., 1912. Le fonctionnement de la glande génitale chez l'*Ostrea edulis* (L.) et le *Grypaea angulata* (Lam.). La protection des bancs naturels. *Compte rendu de l'Académie des Sciences* 155, 324-327.
- Dantan J.L., 1913. La fécondité de l'*Ostrea edulis* (L.). *Compte rendu de l'Académie des Sciences* 157, 871-873.
- Demoy-Schneider M., Levêque A., Schmitt N., le Pennec M. et Cosson J., 2012. Motility activation and metabolism characteristics of the black-lip-pearl oyster *Pinctada margaritifera* var : *cumingii* (Jameson, 1901). *Theriogenology* 77, 53-64.
- Duchêne J., Bernard I. et Pouvreau S., 2016. Vers un retour de l'huître indigène en rade de Brest. *Espèces* 16, 52-57.
- Falese L.E., Russell M.P. et Dollahon N., 2011. Spermcasting of spermatozeugmata by the bivalves *Nutricula confusa* and *N. tanilla*. *Invertebrate Biology* 130, 334-343.

- Ferguson C.D., Blum M.J., Raymer M.L., Eackles M.S. et Krane D.E., 2013. Population structure, multiple paternity, and long-distance transport of spermatozoa in the freshwater mussel *Lampsilis cardium* (Bivalvia: Unionidae). *Freshwater Science* 32, 267-282.
- Fishelson L., Gon F., Holdengreber V. et Delarea Y., 2007. Comparative spermatogenesis, spermatocytogenesis, and spermatozeugata formation in males of viviparous species of Clinid fishes (Teleostei: Clinidae, Blenniodei). *The Anatomical Record* 290, 311-323.
- Fong P.P., Huminski P.T. et D'Urso L.M., 1998. Induction and potentiation of parturition in Fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *Journal of Experimental Zoology* 280, 260-264.
- Gibbons M.C. et Castagna M., 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture* 40, 189-191.
- Girard M., Rivalan P. et Siquin G., 2000. Testis and sperm morphology in two deep-water squaloid sharks, *Centroscymus coelolepis* and *Centrophorus squamosus*. *Journal of Fish Biology* 57, 1575-1589.
- Gonzalez-Araya R., Mingant C., Petton B. et Robert R., 2012. Influence of diet assemblage on *Ostrea edulis* broodstock conditioning and subsequent larval development. *Aquaculture* 364-365, 272-280.
- Hassan M.M., Qin J.G. et Li X., 2016. Spermatozeugmata structure and dissociation of the Australian flat oyster *Ostrea angasi* : implications for reproductive strategy. *Tissue and Cell*, 48: 152-159.
- Hegaret H. et Mazurié J., 2005. Restoration of oyster production in France by introduction of non-native species : History and overview. *Journal of Shellfish Research* 24, 323-324.
- Hori J., 1933. On the development of the Olympia oyster, *Ostrea lurida* Carpenter, transplanted from United States to Japan. *Bulletin Japanese Society Science and Fisheries* 1, 269-276.
- Horvath A., Bubalo A., Cucevic A., Bartulovic V., Kotrik L., Urbanyi B. et Glamuzina B., 2012. Cryopreservation of sperm and larvae of the European flat oyster (*Ostrea edulis*). *Journal of Applied Ichthyology* 28, 948-951.
- Ishibashi R., Komaru A. et Kondo T., 2000. Sperm sphere in Unionid mussels (Bivalvia : Unionidae). *Biological Science* 17, 947-950.
- Jeffs A.G., 1998. Gametogenic cycle of the Chilean oyster, *Tiostrea chilensis* (Philippi, 1845), in north-eastern New Zealand. *Invertebrate Reproduction and Development* 34, 109-116.
- Jespersen A. et Lutzen J., 2009. Structure of sperm, spermatozeugmata and lateral organs in the bivalve *Arthritica* (Galeommatoidae: Leptonidae). *Acta Zoologica* 90, 51-67.
- Joyce A., Holthuis T.D., Charrier G. et Lindegarth S., 2013. Experimental effects of temperature and photoperiod on synchrony of gametogenesis and sex ratio in the European oyster *Ostrea edulis* (Linnaeus). *Journal of Shellfish Research* 32, 1-12.
- Kinnberg K. et Toft G., 2002. Effects of oestrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 16-24.

- Lucfora L.O., Menni R.C. et Escalante A.H., 2002. Reproductive ecology and abundance of the sand tiger shark, *Carcharias taurus*, from the Southwestern Atlantic. ICES Journal of Marine Science 59, 553-561.
- Lutzen J., Jespersen A., Takahashi T. et Kai T., 2004. Morphology, structure of dimorphic sperm, and reproduction in the hermaphroditic commensal bivalve *Pseudopythina tsurumaru* (Galeommatoidea: Kellidae). Journal of Morphology 262, 407-420.
- Lynn J.W., 1994. The ultrastructure of the sperm and motile spermatozeugmata from the freshwater mussel *Anodonta grandis* (Mollusca, Bivalvia, Unionidae). Canadian Journal of Zoology 72, 1452-1461.
- Maiorova A.S. et Adianov A.V., 2005. Spermatozeugmata and sperm ultrastructure of *Thysanocardia nigra*, Ikeda, 1904 (Sipuncula : Sipunculidae). Invertebrate Reproduction and Development 47, 125-131.
- Mardones-Toledo D.A., Montory J.A., Joyce A., Thompson R.J., Diedrich C.M., Pechenik J.A, Mardones M.L. et Chaparro O.R., 2015. Brooding in the Chilean oyster, *Ostrea chilensis* : unexpected complexity in the movements of brooded offspring within the mantle cavity. Plos one, avril 2013.
- Martin A.G., Littaye-Mariette A., Langlade A. et Allenou J.P., 1997. Cycle de reproduction naturelle de l'huître plate, *Ostrea edulis*. La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France. Groupe de travail Ifremer, Nantes, 14 et 15 novembre, pp. 21-33.
- Melo R.M.C., Arantes F.P., Sato Y., dos Santos J.E., Rizzo E. et Bazzoli N., 2011. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei : Siluriformes). Journal of Morphology 272, 525-535.
- Morriconi E. et Calvo J., 1979. Ciclo reproductivo y alternancia de sexos en *Ostrea puelchana*. Physis 38, 1-7.
- Morse D. E., Duncan H., Hooker N. et Morse A., 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in molluscs, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. Science 196, 298-300.
- O'Foighil D., 1985. Sperm transfer and storage in the brooding bivalve *Mysella Tumida*. Biological Bulletin 169, 602-614.
- O'Foighil D., 1989. Role of spermatozeugmata in the spawning ecology of the brooding oyster *Ostrea edulis*. Gamete Research, 24: 219-228.
- O'Foighil D. et Taylor D.J., 2000. Evolution of parental care and ovulation behaviour in oysters. Molecular Phylogenetics and Evolution, 15: 301-3213.
- Orton J.H., 1927. Observations and experiments on sex-change in the European oyster (*O. edulis*). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 14, 967-1045.
- Ospar, 2013. www.ospar.org/documents?d=32969
- Pacey A.A., Cosson J.C. et Bentley M.G., 1994. The acquisition of forward motility in the spermatozoa of the polychaete *Arenicola marina*. Journal of Experimental Biology 195, 259-280.
- Parreira G.G., Chiarini-Garcia H., Melo R.C.N., Vieira F.O. et Godinho H.P., 2009. Spermatozoon and its relationship with the ovarian lamellae in the internally inseminating catfish *Trachelyopterus galeatus*. Microscopy Research and Technique 72, 889-897.

- Pascual M.S., 1997. Carriage of dwarf males by adult female puelche oysters : the role of chitons. *Journal of Experimental Biology and Ecology* 212, 173-185.
- Pedrerros-Sierra T.D.M. et Ramirez-Pinilla M., 2015. Morphology of the reproductive tract and acquisition of sexual maturity in males of *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii : Potamotrygonidae). *Journal of Morphology* 276, 273-289.
- Pouvreau S., 2017. Underwater images of the last native oysters beds in Brittany (France). IFREMER. <https://image.ifremer.fr/data/00377/48842/>
- Robertson R., 2007. Taxonomic occurrences of gastropod spermatozeugmata and non-stylommatophoran spermatophores updated. *American Malacological Bulletin* 23, 11-16.
- Sellmer G.P., 1967. Functional morphology and ecological life history of the gem clam *Gemma gemma* (Eulamellibranchia: Veneridae). *Malacologia* 5, 137-223.
- Serrao E.A. et Havenhand J., 2009. Fertilization strategies. Dans: *Marine hard bottom communities: patterns, dynamics, diversity, and change*. Wahl M. ed., Springer, Dordrecht, 149-164.
- Suquet M., Quéré C., Mingant C., Lebrun L., Ratiskol D., Miner P. et Cosson J., 2013. Effect of sampling location, release technique and time after activation on the movement characteristics of scallop (*Pecten maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources* 26, 215-220.
- Suquet M., Malo F., Quéré C., Ledu C., Le Grand J. et Benabdelmouna A., 2016. Gamete quality in triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 451, 11-15.
- Waller T.R., 1981. Functionnal morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linné. *Smithsonian Contribution to Zoology* n°328, 70pp.
- Waller D. et Lasee B.A., 1997. External morphology of spermatozoa and spermatozeugmata of the freshwater mussel *Truncilla truncata* (Mollusca : Bivalvia : Unionidae). *American Midland Naturalist* 138, 220-223.
- Watson G.J., Cadman P.S., Paterson L.A., Bentley M.G. et Auckland M.F., 1998. Control of oocyte maturation, sperm activation and spawning in two lugworm species: *Arenicola marina* and *A. defodiens*. *Marine Ecology Progress Series* 175, 167-176.
- Welsh J.H. et Moorhead M., 1960. The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the invertebrates, especially in their nervous system. *Journal of Neurochemistry* 6, 146-169.