

**APPROCHES BIBLIOGRAPHIQUE ET  
EXPERIMENTALE DE METHODES PERMETTANT  
D'ÉVALUER L'ÉTAT DE MATURITE SEXUELLE DES  
BIVALVES.**

**Maryse THIELLEY**

**DRV/RA/Brest**

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 04209

**Avril 1995**



**IFREMER**

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche mené par l'unité de reproduction du laboratoire de physiologie des mollusques du centre IFREMER Brest, portant sur l'étude de la qualité de la reproduction contrôlée des bivalves marins. Il a été réalisé lors d'un C.D.D. (de fin février à début mai 95) sous la responsabilité de Nicole Devauchelle.

## RESUME

A l'heure actuelle, l'objectif des écloséries d'huîtres est d'atteindre une autonomie d'approvisionnement en larves quelle que soit la saison et donc d'étaler les émissions de gamètes sur toute l'année. A la suite de problèmes rencontrés pour atteindre cet objectif, il s'est avéré nécessaire d'entreprendre des études sur les méthodes à mettre en oeuvre pour contrôler la qualité de la reproduction en éclosérie et notamment l'état de maturité des géniteurs.

Notre étude porte sur ce dernier point. Une étude bibliographique présente les différentes méthodes plus ou moins précises, actuellement utilisées pour contrôler l'état de maturité des gonades de bivalves. La majorité d'entre elles nécessite le sacrifice d'animaux.

Une approche expérimentale portant principalement sur *Crassostrea gigas*, a permis de tester une nouvelle méthode d'évaluation de l'état de maturité individuelle des bivalves, sans sacrifier d'animaux.

Cette méthode repose sur l'observation macroscopique de la gonade couplée par l'observation microscopique de coupes histologiques d'un fragment de gonade prélevé par biopsie. Les animaux sont au préalable traités par le chlorure de magnésium pour que les valves s'ouvrent largement. Les premiers résultats sont très satisfaisants: pas de mortalité suite aux manipulations, biopsies de qualité correcte, bonne détermination de l'état de maturité.

Cependant, les résultats ne peuvent être obtenus qu'après un délai de 36 heures et les biopsies sont délicates à effectuer lorsque l'animal présente une gonade peu développée. Du fait de ces contraintes, l'utilisation de cette méthode pourrait être réservée pour déterminer de façon très précise le sexe des animaux, en éclosérie pour contrôler l'homogénéité des stades de maturité dans les lots de géniteurs, ou encore pour suivre l'état de développement des gonades dans le cadre d'études expérimentales.

D'autres méthodes plus rapides n'entraînant pas de sacrifices sont proposées.

Enfin, le traitement par le chlorure de magnésium s'est avéré de manière incidente très efficace pour éliminer le ver *Polydora* des huîtres.

**Mots clés:** *Crassostrea gigas*, bivalves, reproduction, maturité sexuelle, biopsie.

**CHAPITRE 1:**

**RAPPEL DES METHODES ACTUELLEMENT UTILISEES POUR CONTRÔLER L'ETAT DE MATURITE DES GONADES DES BIVALVES.**

**1-1) INTRODUCTION**

7

**1-2) PRESENTATION DES DIFFERENTES METHODES D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE DES BIVALVES.**

8

**1-2-1) METHODES D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE APPORTANT PRINCIPALEMENT DES INFORMATIONS QUANTITATIVES.**

8

***1-2-1-1) EVALUATION DES STADES DE MATURITE PAR OBSERVATION MACROSCOPIQUE DE LA GONADE.***

8

***1-2-1-2) EVALUATION PAR MESURE D'UN INDICE GONADIQUE.***

10

***1-2-1-3) CALCUL DU DIAMETRE MOYEN DES OVOCYTES A PARTIR DE COUPES HISTOLOGIQUES OU DE FROTTIS.***

11

**1-2-2) METHODE D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE APPORTANT PRINCIPALEMENT DES INFORMATIONS QUALITATIVES.**

12

***1-2-2-1) EVALUATION DES STADES DE MATURITE PAR OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE LA GONADE SUR COUPES HISTOLOGIQUES.***

12

***1-2-2-2) EVALUATION DES STADES DE MATURITE PAR OBSERVATION DES OVOCYTES SUR FROTTIS.***

13

<b>1-2-3) METHODE D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE APPORTANT A LA FOIS DES INFORMATIONS QUALITATIVES ET QUANTITATIVES.</b>	<b>13</b>
<b><i>1-2-3-1) EVALUATION DES STADES DE MATURITE PAR OBSERVATIONS A LA FOIS MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES DE LA GONADE.</i></b>	<b>13</b>
<b>1-2-3-1-1) Exemple d'échelle d'évaluation des stades de maturité par observations à la fois macroscopique et histologique de la gonade.</b>	<b>14</b>
<b>1-2-3-1-2) Exemple d'échelle d'évaluation des stades de maturité par observations à la fois macroscopique de la gonade et microscopique de gamètes sur frottis.</b>	<b>14</b>
<b><i>1-2-3-2) REPARTITION DES GAMETES EN DIFFERENTES CLASSES A PARTIR DE COUPES HISTOLOGIQUES OU DE FROTTIS.</i></b>	<b>15</b>
<b><i>1-2-3-3) ANALYSE DE LA CONSTITUTION DE LA GONADE A PARTIR DE COUPES HISTOLOGIQUES.</i></b>	<b>15</b>
<b><u>1-3) DISCUSSION</u></b>	<b>16</b>
<b><u>1-4) CONCLUSION</u></b>	<b>19</b>

## CHAPITRE 2:

### RECHERCHE EXPERIMENTALE D'UNE METHODE PERMETTANT DE CONTRÔLER L'ETAT DE MATURITE DES GONADES DES BIVALVES SANS SACRIFICE D'ANIMAUX.

<b><u>2-1) INTRODUCTION</u></b>	<b>20</b>
<b><u>2-2) MATERIEL ET METHODES</u></b>	<b>20</b>
<b>2-2-1) MATERIEL BIOLOGIQUE</b>	<b>20</b>
<b>2-2-2) METHODES</b>	<b>21</b>
<b>2-2-2-1) TECHNIQUES D'OUVERTURE DES BIVALVES.</b>	<b>21</b>
* Ouverture des huîtres	21
* Ouverture des coquilles Saint-Jacques	22
<b>2-2-2-2) METHODE D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE PAR COUPLAGE D'OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES ET HISTOLOGIQUES.</b>	<b>22</b>
* Présentation de la méthode.	22
* Protocole expérimental.	22
<b>2-2-2-3) PARAMETRES SUIVIS</b>	<b>23</b>
* Survie des animaux.	23
* Qualité des biopsies.	23
* Efficacité de notre méthode.	23
* Influence de notre méthode sur le développement post-manipulations de la gonade.	23
<b>2-2-2-4) TECHNIQUES UTILISEES.</b>	<b>24</b>
* Biopsies.	24
* Prélèvement de la totalité de la gonade.	24
* Histologie	24
* Echelle d'évaluation histologique de référence utilisée pour la totalité de la gonade et les biopsies.	24
* Echelles d'évaluation macroscopique.	26
* Stades finaux.	26

<b><u>2-3) RESULTATS</u></b>	<b>27</b>
<b>2-3-1) OUVERTURE DES VALVES.</b>	<b>27</b>
<b><i>2-3-1-1) OUVERTURE DES HUITRES.</i></b>	<b>27</b>
* Ouverture par le froid.	<b>27</b>
* Ouverture par le chlorure de magnésium.	<b>28</b>
<b><i>2-3-1-2) OUVERTURE DES COUILLES SAINT-JACQUES</i></b>	<b>28</b>
<b>2-3-2) ACTION DU CHLORURE DE MAGNESIUM SUR UN PARASITE DE L'HUITRE, LE VER <i>POLYDORA</i>.</b>	<b>28</b>
<b>2-3-3) METHODE D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE PAR COUPLAGE D'OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES ET HISTOLOGIQUES.</b>	<b>28</b>
<b><i>2-3-3-1) TABLEAU I DES STADES FINAUX</i></b>	<b>28</b>
<b><i>2-3-3-2) TABLEAU II DES RESULTATS EXPERIMENTAUX.</i></b>	<b>30</b>
<b><i>2-3-3-3) REALISATION.</i></b>	<b>31</b>
<b><i>2-3-3-4) SURVIE DES ANIMAUX.</i></b>	<b>31</b>
<b><i>2-3-3-5) QUALITE DES BIOPSIES</i></b>	<b>31</b>
<b><i>2-3-3-6) EFFICACITE DE LA METHODE.</i></b>	<b>32</b>
<b><u>2-4) DISCUSSION</u></b>	<b>33</b>
<b><u>2-5) CONCLUSION</u></b>	<b>38</b>
<b><u>CONCLUSION GENERALE</u></b>	<b>39</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>40</b>

## INTRODUCTION GENERALE

A l'heure actuelle, l'objectif des écloséries d'huîtres est d'atteindre une autonomie d'approvisionnement en larves quelle que soit la saison et donc d'étaler les émissions de gamètes sur toute l'année. Or, si la fourniture de larves viables ne semble pas poser de problèmes particuliers en hiver et au printemps, l'été et l'automne se révèlent être des périodes au cours desquelles il est souvent plus délicat d'obtenir des pontes et de mener à terme des élevages larvaires.

A la suite de ces problèmes rencontrés par les écloséries d'huîtres *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, il s'est avéré nécessaire d'entreprendre des études sur les méthodes à mettre en oeuvre pour contrôler la qualité de la reproduction en éclosérie.

Des essais de contrôle des maturations et du calendrier des émissions par la méthode de "décalage-retard froid" qui consiste à soumettre les géniteurs à une exposition prolongée au froid, ont été menés sur *Ostrea edulis* à la station IFREMER de Palavas (Coatanea *et al.*, 1994). Les premiers résultats obtenus sont très encourageants et montrent que la reproduction des huîtres en éclosérie peut être améliorée, entre autre par l'utilisation de nouvelles techniques de contrôle de la maturation des géniteurs.

D'autres améliorations peuvent également être apportées, notamment par l'utilisation de nouvelles méthodes d'évaluation des stades de maturité. Il apparaît effectivement intéressant de pouvoir suivre l'évolution individuelle des gonades lors d'études expérimentales de biologie, physiologie et génétique, ou en éclosérie, du fait notamment de l'hétérogénéité interindividuelle souvent signalée. L'influence de cette hétérogénéité dans les lots de géniteurs sur les résultats des pontes et des élevages larvaires est non négligeable. De plus, le sacrifice n'est pas toujours souhaité par les écloséries pour qui le nombre de géniteurs peut être restreint lorsqu'il s'agit d'évaluer l'état moyen de gamétogenèse dans un groupe.

Il apparaît également nécessaire, de pouvoir contrôler la qualité des gamètes ainsi que la qualité des élevages de larves et de post-larves.

Notre étude porte principalement sur le premier point: contrôle de l'état de maturité des huîtres. Elle présente, par un rappel bibliographique, les différentes méthodes qui permettent actuellement de contrôler l'état de maturité des gonades des bivalves. L'approche expérimentale sur les huîtres *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, porte sur la mise au point d'une méthode ne nécessitant pas le sacrifice d'animaux. Une application de cette méthode est proposée sur la coquille Saint-Jacques.

# CHAPITRE 1:

## RAPPEL DES METHODES ACTUELLEMENT UTILISEES POUR CONTRÔLER L'ETAT DE MATURETE DES GONADES DES BIVALVES.

### 1-1) INTRODUCTION

A l'heure actuelle, la plupart des méthodes utilisées pour contrôler l'état de maturité des bivalves repose sur l'examen des gonades de mollusques sacrifiés. Ces méthodes pratiquées en éclosion pour contrôler l'état de maturité des géniteurs, ou dans le milieu naturel pour établir le cycle de reproduction d'une population, sont basées sur l'observation à dates régulières des gonades, après ouverture d'un certain nombre d'individus.

L'évolution de la gonade passe par différents stades que de nombreux auteurs se sont efforcés de définir en établissant une classification que l'on appelle communément une échelle. Chez les mollusques, les principales échelles utilisées sont, ou dérivent, des échelles de Chipperfield (1953) et Lubet (1959) pour la moule, Lubet (1959) et Lucas (1965) pour le pétoncle, Mason (1958) pour la coquille Saint-Jacques, ainsi que Le Dantec (1968) et Marteil (1976) pour les huîtres.

Les stades de maturité des gonades peuvent être évalués selon divers critères:

- *des critères macroscopiques* (état de maigreur ou de réplétion, épaisseur du tissu gonadique, indice gonadique, coloration de la gonade)

- *des critères microscopiques* (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 informations apportées par les différentes méthodes d'évaluation peuvent être quantitatives ou qualitatives:

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

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



## **1-2) PRESENTATION DES DIFFERENTES METHODES D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE DES BIVALVES.**

### **1-2-1) METHODES D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE APPORTANT PRINCIPALEMENT DES INFORMATIONS QUANTITATIVES.**

#### ***1-2-1-1) EVALUATION DES STADES DE MATURITE PAR OBSERVATION MACROSCOPIQUE DE LA GONADE.***

Cette méthode consiste à attribuer à la gonade observée macroscopiquement un stade d'évolution. Les différents stades d'évolution sont définis dans des échelles d'évaluation.

#### **Exemples d'échelles d'évaluation macroscopique des stades de maturité:**

**\* Echelle de Le Dantec (1968), pour les huîtres du genre *Crassostrea*. (L'animal est sacrifié).**

*Stade 0:* gonade vide; correspond au repos sexuel; se confond avec le stade 5.

*Stade 1:* apparition des follicules qui recouvrent au plus la moitié de la masse viscérale. Il est difficile d'obtenir des gamètes même par forte pression sur la gonade.

*Stade 2:* les follicules sont bien développés et recouvrent entièrement la glande digestive mais les gamètes ne sont pas mûrs, on les obtient par pression modérée, mais leur dissociation est difficile.

*Stade 3P:* état moyen de réplétion de la gonade, gamètes abondants et facilement dissociables.

*Stade 3H:* état maximum de réplétion de la gonade; elle est hypertrophiée; une épaisse couche blanc crème enveloppe la masse viscérale; les gamètes sont très abondants et obtenus par pression très légère.

*Stade 4:* il y a régression du volume de la gonade dont la coloration devient jaunâtre; la glande digestive est visible, dans la partie antérieure notamment; les gamètes sont moins abondants; ce stade correspond ou à une déplétion partielle de la gonade, ou à un stade de restauration entre deux émissions successives.

*Stade 5:* la déplétion est presque complète; l'animal est d'apparence "maigre" bien que l'on distingue encore quelques follicules; nous confondons ce stade avec le stade 0 du repos sexuel.

**\* Echelle de Marteil (1976), légèrement modifiée par Coatanea *et al.* (1994), utilisée par la station IFREMER de Palavas pour *Ostrea edulis*. (L'animal est sacrifié).**

*Stade 0*: la gonade vide est transparente.

*Stade 1*: la gonade commence à recouvrir la glande digestive.

*Stade 2*: la gonade recouvre entièrement la glande digestive.

*Stade 3*: la gonade est épaisse est striée de réseaux.

*Stade 4*: l'huître est laiteuse (émission de trocophores).

*Stade 5*: l'huître est ardoisée (larves incubées).

**\* Echelle de Cochard et Devauchelle (1993) d'après Mason (1958) pour la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*. (L'animal n'est pas sacrifié).**

*Stade 1*: correspond au stade VII de Mason (vide): gonade faiblement différenciée en ovaire et testicule; ovaire uniformément translucide de couleur brun-orangé; testicule légèrement blanchâtre avec très peu de follicules visibles.

*Stade 2*: gonade clairement différenciée en un testicule blanc et un ovaire orange. Les follicules sont encore petits et clairsemés. La totalité de la boucle de l'intestin est visible.

*Stade 3*: follicules plus gros et plus denses, mais encore séparés par des espaces. L'intestin est difficile à voir sous les follicules, mais cause encore un renflement de la gonade.

*Stade 4*: gonade encore flasque mais les follicules se resserrent. L'intestin cause encore un renflement de la gonade, mais ne peut être observé que dans la partie distale de la boucle.

*Stade 5*: gonade ferme, arrondie à la pointe. Les follicules sont très serrés. L'intestin n'est plus discernable.

**\* Echelle utilisée par l'écloserie d'Argenton pour la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus* (Robert *et al*, 1994). (L'animal n'est pas sacrifié).**

*Stade 0*: la gonade est flasque, translucide et anguleuse. La boucle de l'intestin est totalement visible et il n'existe que peu de différence de coloration entre les parties mâles et femelles.

*Stade 1*: c'est le début de la maturation. La gonade est petite, peu épaisse, anguleuse. Le testicule est blanchâtre et la boucle de l'intestin est seulement visible au niveau de l'ovaire.

*Stade 2*: la maturation est en cours. La gonade commence à s'arrondir mais l'extrémité de l'ovaire reste anguleuse. On observe une nette différence de coloration entre le testicule et l'ovaire avec présence de granulations sur le testicule. La boucle de l'intestin est seulement visible sur le bord de la paroi de l'ovaire.

*Stade 3*: la gonade est peu gonflée mais nettement arrondie y compris à l'extrémité de l'ovaire. Les granulations et la boucle de l'intestin sont visibles.

*Stade 4*: c'est la fin de maturation. La gonade est très gonflée, très arrondie et occupe la majeure partie de l'animal.

### **1-2-1-2) EVALUATION PAR MESURE D'UN INDICE GONADIQUE.**

**\* A partir de critères macroscopiques.**

Cette méthode est basée sur le fait que le poids ou le volume de chair des mollusques est fonction de l'état de maturité de la gonade. Ainsi, de nombreuses formules ont été établies afin de définir des indices gonadiques par mesure, d'une part, d'un paramètre relatif à la gonade (poids ou volume de gonade) et d'autre part, d'un autre paramètre supposé relativement stable quel que soit l'état de maturité de l'animal (poids ou volume des tissus somatiques, poids ou dimensions de la coquille, etc.).

Cette méthode est utilisée en particulier lorsque la gonade peut être facilement isolée des autres tissus, comme c'est le cas chez la coquille Saint-Jacques.

Chez les huîtres, par contre, la gonade se développe de façon diffuse autour de la glande digestive. Il est par conséquent très difficile de la séparer de cette dernière. Cependant, Galtsoff (1964) parvient chez *Crassostrea virginica* à isoler la gonade de la glande digestive à l'aide de petits ciseaux courbés.

#### **Exemples d'indices gonadiques = IG**

**Lorsque la gonade a été isolée:**

IG = poids sec de gonade / poids sec des coquilles

IG = poids de la gonade égouttée / hauteur de la valve supérieure

IG = (poids frais de la gonade / poids frais des tissus somatiques) = rapport gonado-somatique.

## **Exemples d'indices de condition = IC**

**Lorsque la gonade n'a pas été isolée:**

IC = poids ou volume de chair / poids ou volume de coquille

IC = poids ou volume de l'ensemble "gonade + glande digestive" / poids ou volume total de chair

IC = hauteur / poids total de chair

*Bien que l'indice de condition reflète l'état de plusieurs organes, il apporte des informations sur l'état de maturité de la gonade qui influence largement l'évolution du poids ou du volume de chair de l'animal.*

### **\* A partir de critères microscopiques.**

Des coupes histologiques de l'ensemble "gonade + glande digestive" sont confectionnées. L'indice gonadique est représenté par le volume de la gonade par rapport au volume de l'ensemble "gonade + glande digestive". L'évaluation de ces volumes se fait par l'intermédiaire du calcul de la surface de ces deux organes sur des coupes sériées de l'ensemble "gonade + glande digestive". A l'heure actuelle, ces mesures sont relativement faciles à effectuer par analyse d'image.

*Cette méthode est utilisée chez les mollusques pour lesquels la méthode classique d'évaluation d'un indice gonadique ne donne pas de résultats précis, leur gonade étant difficilement dissociable de leur glande digestive.*

### **1-2-1-3) CALCUL DU DIAMETRE MOYEN DES OVOCYTES A PARTIR DE COUPES HISTOLOGIQUES OU DE FROTTIS.**

Cette méthode consiste, après mesure du diamètre d'un certain nombre d'ovocytes, à établir une moyenne qui permet d'évaluer le stade de maturité de la gonade. Parfois, seuls les ovocytes les plus gros sont mesurés.

*Cette méthode nécessite que l'échantillon (nombre et choix des ovocytes mesurés) soit conforme aux méthodes statistiques d'échantillonnage. Les mesures peuvent être effectuées par analyse d'image.*

## **1-2-2) METHODE D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE APPORTANT PRINCIPALEMENT DES INFORMATIONS QUALITATIVES.**

### ***1-2-2-1) EVALUATION DES STADES DE MATURITE PAR OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE LA GONADE SUR COUPES HISTOLOGIQUES.***

Cette méthode consiste en un examen de coupes histologiques. Comme pour la méthode d'observation macroscopique de la gonade, différents stades d'évolution du tissu gonadique ont été décrits dans des échelles d'évaluation.

#### **Exemple d'échelle d'évaluation microscopique des stades de maturité:**

**\* Echelle de His (1976) répartie selon la classification de Le Dantec (1968) pour *Crassostrea gigas*.**

***Remarque: Cet auteur n'a pas observé de stade 4 parmi les huîtres qu'il a étudié.***

***Stade 0:*** repos sexuel

#### ***Gonade femelle:***

***Stade 1:*** tubules de la gonade en formation, se développant dans le tissu conjonctif lacuneux, entre l'épiderme et le tube digestif. Présence d'oogonies en cours de différenciation.

***Stade 2:*** follicules bien développés. Ovocytes et cellules germinales en cours de différenciation bordent encore la paroi des follicules. Rares ovocytes mûrs, reliés à la paroi des follicules par un pédicule allongé.

***Stade 3P:*** follicules ayant envahi le tissu conjonctif de soutien. Gamètes femelles abondants.

***Stade 3H:*** follicules très volumineux; ovules très nombreux, arrondis, ayant envahi la lumière des acini.

***Stade 5:*** ponte sub-totale. Follicules presque vides contenant quelques gamètes résiduels.

#### ***Gonade mâle:***

***Stade 1:*** tubules de la gonade en formation, se développant dans le tissu conjonctif lacuneux, entre l'épiderme et le tube digestif.

***Stade 2:*** acini bien développés contenant de nombreux spermatozoïdes en cours de formation. Rares gamètes mâles mûrs.

*Stade 3P*: les acini ont envahi la presque totalité du tissu conjonctif de soutien; spermatogenèse et spermiogenèse actives; présence de nombreux spermatozoïdes mûrs, libres dans la lumière des acini.

*Stade 3H*: testicule à son développement maximum. Tout le tissu conjonctif de soutien a été envahi; très nombreux spermatozoïdes libres dans la lumière des acini.

*Stade 5*: testicule après une éjaculation massive. Volume de la gonade fortement diminué. Absence presque totale de spermatozoïdes dans la lumière des acini. A la suite de ce premier cycle de gamétogenèse, la gonade est ici en voie de restauration.

### **1-2-2-2) EVALUATION DES STADES DE MATURITE PAR OBSERVATION DES OVOCYTES SUR FROTTIS.**

Cette méthode consiste à attribuer à la gonade un stade d'évolution défini dans une échelle d'évaluation. L'échelle est réalisée d'après la description des gamètes. A notre connaissance, cette méthode n'est utilisée qu'à travers l'observation d'ovocytes.

#### **Exemple d'échelle d'évaluation par observation microscopique d'ovocytes:**

\* **Echelle de Braley 1984 (Chez les bécotiers *Tridacna gigas* et *Tridacna derasa*).**

*En cours de développement*: ovocytes de taille supérieure à 110 µm, généralement divers tailles d'ovocytes étant en cours de développement.

*Mature*: ovocytes mesurant 110 µm et plus, vitellogenèse complète (cytoplasme des ovocytes rempli de vitellus), ovocytes se rompant facilement.

*Régression*: (après la ponte) ovocytes de toutes tailles mais dégénérés.

*Restauration*: pas d'ovocytes dans les échantillons.

### **1-2-3) METHODE D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE APPORTANT A LA FOIS DES INFORMATIONS QUALITATIVES ET QUANTITATIVES.**

#### **1-2-3-1) EVALUATION DES STADES DE MATURITE PAR OBSERVATIONS A LA FOIS MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES DE LA GONADE.**

Certains auteurs ont établi des échelles d'évaluation des stades de maturité des gonades en couplant des observations macroscopiques et microscopiques. Les observations microscopiques peuvent être effectuées sur coupes histologiques ou sur frottis.

**1-2-3-1-1) Exemple d'échelle d'évaluation des stades de maturité par observations à la fois macroscopique et histologique de la gonade.**

**\* Echelle de Lubet (1959) (moule et pétoncle).**

*Stade 0:* stade de repos sexuel. Glande presque transparente. Développement du tissu conjonctif. Les follicules sont encore présents mais leur diamètre a diminué. Leurs parois sont tapissées de gonies.

*Stade I:* organisation des follicules, multiplication des gonies. Macroscopiquement, masse viscérale encore transparente, mais le dessin des follicules forme un léger réseau blanchâtre.

*Stade II:* phénomènes de gamétogenèse. La masse viscérale est devenue opaque et blanchâtre. Histologiquement on peut trouver tous les stades de la gamétogenèse.

*Stade III:* période de reproduction.  
Lubet y distingue de nombreuses étapes.

*Au stade III A 1,* la glande est très gonflée, la gamétogenèse est très avancée, mais les animaux ne sont pas encore susceptibles d'émettre leurs produits sexuels sous l'effet d'excitation.

*Au stade III A 2,* les excitations provoquent une émission.

*Au stade III B,* la ponte ou éjaculation ont eu lieu. Macroscopiquement la glande est aplatie et la couleur est devenue uniforme. L'examen histologique révèle qu'il existe des produits sexuels non émis et des gonies en cours de multiplication.

*Au stade III C,* période de restauration d'environ trois semaines, tandis que se prépare une seconde maturation.

**1-2-3-1-2) Exemple d'échelle d'évaluation des stades de maturité par observations à la fois macroscopique de la gonade et microscopique de gamètes sur frottis.**

**\* Echelle de Lucas (1965) (Bivalves).**

*Stade A:* le sexe n'est pas déterminable. La glande génitale n'a pas de coloration propre. Par grattage on n'obtient que des débris tissulaires non identifiables au microscope.

*Stade B:* la glande tend à s'opacifier, mais les produits sexuels sont rares. Cependant le sexe est déterminable par examen microscopique des produits obtenus par grattage de la gonade.

*Stade C:* la glande génitale est opaque, plus ou moins gonflée, colorée. Lorsque la glande est sectionnée, des produits génitaux s'écoulent. Chez certains bivalves la

couleur ou la consistance des produits peut indiquer le sexe, pour d'autres, l'examen microscopique est toujours nécessaire.

*Les informations qualitatives apportées par l'observation microscopique des frottis de gamètes, sont très limitées dans cette échelle.*

### **1-2-3-2) REPARTITION DES GAMETES EN DIFFERENTES CLASSES A PARTIR DE COUPES HISTOLOGIQUES OU DE FROTTIS.**

Des gamètes échantillonnés sont classés selon leur stade de maturité (ovogonie, ovocyte prévitellogénique etc. pour les gamètes femelles et spermatogonie, spermatocyte de premier ordre etc. pour les gamètes mâles) ainsi que selon des critères morphologiques (diamètre des cellules, diamètre des noyaux etc.).

Pour chaque gonade, les pourcentages de chaque classe de gamètes sont alors établis.

*Cette méthode nécessite que l'échantillon (nombre et choix des gamètes observés) soit conforme aux méthodes statistiques d'échantillonnage. Certains critères utilisés pour classer les gamètes, notamment leur taille, peuvent être calculés par analyse d'image.*

### **1-2-3-3) ANALYSE DE LA CONSTITUTION DE LA GONADE A PARTIR DE COUPES HISTOLOGIQUES.**

Cette méthode consiste à analyser la constitution de la gonade d'après un ou plusieurs champs sélectionnés statistiquement sur une ou plusieurs coupes histologiques.

Ces champs sont en général des carrés de 250 µm de côté.

#### **Différents paramètres sont calculés comme par exemple:**

- le pourcentage de l'aire de la gonade occupée par des follicules
- le pourcentage de l'aire des follicules occupé par des ovocytes
- le nombre d'ovocytes par carré
- le pourcentage d'ovocytes atrétiques
- le diamètre moyen des ovocytes
- le pourcentage de l'aire des follicules occupée par des spermatogonies ou des spermatocytes
- le pourcentage de l'aire des follicules occupée par des spermatozoïdes
- etc.

*Cette analyse peut se faire par analyse d'image ou par la technique de planimétrie. Elle peut également être réalisée sur des volumes grâce à la technique complémentaire de stéréologie.*



### 1-3) DISCUSSION

La méthode d'évaluation des stades de maturité par **observation macroscopique de la gonade** a l'avantage d'être rapide et simple. Elle est par conséquent couramment utilisée en particulier par les écloseries (Robert *et al*, 1994). Cette méthode a l'avantage de pouvoir être utilisée sans sacrifice d'animaux lorsque l'ouverture du bivalve n'entraîne aucune lésion pour l'animal et est suffisante pour pouvoir observer correctement la gonade. Elle est de ce fait principalement utilisée chez la coquille Saint-Jacques qui peut s'ouvrir très largement de façon naturelle, notamment lorsqu'elle est émergée.

Cependant, la description macroscopique de la gonade n'apporte que des renseignements approximatifs sur les stades de maturité de celle-ci. Elle procure principalement des informations sur le développement quantitatif de la gonade. De plus, cette méthode n'exclut pas certaines interprétations subjectives. **La plupart des auteurs qui utilisent l'examen macroscopique de la gonade comme méthode principale pour évaluer l'état de maturité des individus, associent à cette méthode l'observation microscopique des gamètes sur frottis et dans les cas litigieux, l'observation de coupes histologiques** (Chipperfield, 1953; His, 1976; Cochard et Devauchelle, 1993). Ils peuvent également utiliser une échelle d'évaluation des stades de maturité s'appuyant à la fois sur des observation macroscopiques de la gonade et sur l'observation microscopique de gamètes sur frottis (Lucas, 1965).

Les méthodes d'évaluation d'un **indice gonadique** à partir du volume, du poids, ou de l'épaisseur de la gonade, utilisant des critères macroscopiques ou microscopiques, sont des méthodes qui procurent des informations quantitatives sur le développement gonadique. Or, comme le souligne Lucas (1965), la grosseur de la gonade n'indique pas toujours un état de maturité. De même, Besnard (1988) constate que parfois, chez *Pecten maximus*, le rapport gonado-somatique atteint une valeur maximale avant la complète maturité sexuelle. Selon cet auteur, les valeurs maximales correspondent aux quantités maximales d'ovocytes dans la gonade (ovocytes normaux + ovocytes en lyse). Il suppose qu'une quantité importante d'ovocytes atrétiques est évacuée ou détruite avant la ponte.

Ces méthodes quantitatives d'évaluation de l'état de maturité des gonades, ne peuvent être que complémentaires à d'autres méthodes d'évaluation qualitative pour permettre une évaluation précise du stade de maturité.

Dans le cadre d'études du cycle de reproduction de certaines espèces comme la coquille Saint-Jacques chez qui la gonade est facilement isolable, la méthode de calcul d'indices gonadiques est très largement utilisée en complémentarité avec d'autres méthodes, du fait de la simplicité de sa mise en oeuvre (Barber et Blake, 1983; Wilson, 1987; Besnard, 1988; Devauchelle et Mingant, 1991; Paulet et Boucher, 1991; Cochard et Devauchelle, 1993).

L'indice gonadique n'est que rarement évalué chez les autres bivalves et notamment chez l'huître (Galtsoff, 1964; Hayes et Menzel, 1981). Pour les bivalves autres que la coquille St-Jacques, les auteurs préfèrent évaluer 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** ou du diamètre des plus gros ovocytes constitue un critère qui ne peut à lui seul apporter des informations précises sur le stade de maturité des gonades femelles. Cette méthode est systématiquement couplée avec d'autres méthodes (Le Dantec, 1968; Barber et Blake, 1983; Wilson et Simons, 1985; Jones *et al*, 1986; Morvan et Ansell, 1988; Paulet *et al*, 1992; Laruelle *et al*, 1994).

**La méthode d'évaluation des stades de maturité par observation des gamètes sur frottis** est pratiquée par Braley (1984) sur le bénitier *Tridacna gigas* sans sacrifice d'animaux.

Les gamètes sont prélevés à l'aide d'une seringue hypodermique introduite en force entre les valves. L'auteur définit un stade de maturité à partir de l'observation du prélèvement, à l'aide d'une échelle d'évaluation établie selon des critères principalement qualitatifs. Cependant, la description des différents stades de maturité n'est pas d'une très grande précision. De plus, selon Shelley et Reid (1988), cette technique utilisée de façon standard chez les *Tridacnidae* entraîne un grand nombre de mortalités lorsqu'elle est utilisée sur *Hippopus hippopus*. La cause principale de ces mortalités serait due à une perforation du péricarde au cours de la manipulation.

Cette méthode a aussi été pratiquée occasionnellement sur la palourde *Ruditapes philippinarium* après perforation de la coquille et sur la coquille Saint-Jacques sans mortalités par Devauchelle (résultats non publiés).

**Selon les données actuelles de la littérature, les mesures et observations faites en histologie apparaissent comme étant plus précises pour évaluer les différents stades de maturité de la gonade.**

Ainsi, la plupart des auteurs qui désirent suivre avec précision l'état de maturité des gonades d'une espèce, utilisent des échelles microscopiques d'évaluation des stades de maturité (Loosanoff, 1962; Mann, 1979; Brousseau, 1982; Kennedy et Krantz, 1982; Dorange, 1989; Thielley, 1993).

Cependant, cette méthode d'évaluation microscopique des stades de maturité à partir d'observations de coupes histologiques n'apportant que des informations qualitatives, elle est très souvent couplée avec d'autres méthodes apportant des informations quantitatives sur le développement de la gonade, tel qu'un indice de condition ou un indice gonadique (Hayes et Menzel, 1981; Peterson et Fegley, 1986; Wilson, 1987; Guillou et Tartu, 1992).

L'utilisation d'une échelle d'évaluation des stades de maturité à partir de critères à la fois macroscopiques et histologiques peut également être envisagée (Lubet, 1959).

Parfois même, les auteurs utilisent de nombreuses méthodes complémentaires (Besnard, 1988; Heffernan *et al*, 1988; Paulet *et al*, 1992; Cochard et Devauchelle, 1993; Coatanea *et al*, 1994; Laruelle *et al*, 1994).

La méthode qui consiste à **répartir les gamètes en différentes classes** n'est utilisée qu'en complément à d'autres méthodes (Lannan *et al*, 1980; Jones *et al*, 1986; Besnard, 1988). Elle apporte des informations à la fois qualitatives et quantitatives qui sont relativement précises lorsque les observations sont réalisées sur des coupes histologiques.

**L'analyse de la constitution de la gonade** à partir de coupes histologiques permet d'évaluer de façon très précise l'état de maturité des gonades. Elle apporte en effet des informations à la fois qualitatives et quantitatives. Cette analyse effectuée par l'intermédiaire de la technique de planimétrie représente un travail considérable (Wilson et Simons, 1985). A l'heure actuelle, les auteurs utilisent l'analyse d'image (Heffernan et Walker, 1989) qu'ils couplent très souvent à la technique de stéréologie (Lowe *et al.*, 1982; Borrero, 1987; Morvan et Ansell, 1988; Paulet *et al.*, 1992).

#### **1-4) CONCLUSION**

D'après les données de la littérature, nous avons pu constater qu'il existe de nombreuses méthodes plus ou moins précises pour évaluer l'état de maturité des gonades de bivalves. Ces méthodes peuvent apporter des informations qualitatives et/ou quantitatives et sont par conséquent très souvent complémentaires. C'est pourquoi, la plupart des auteurs utilisent plusieurs méthodes.

L'étude histologique apparaît à l'heure actuelle comme la méthode la plus précise pour évaluer l'état de maturité des gonades, notamment lorsque les coupes sont analysées grâce au traitement d'image.

Les données de la littérature sont très pauvres sur les méthodes utilisées en routine pour évaluer le stade de maturité des gonades de bivalves sans sacrifice. Les seules techniques actuellement pratiquées (observation macroscopique de la gonade ou évaluation des stades de maturité par observation des gamètes sur frottis) n'apportent que des informations très approximatives sur l'état réel des gonades.

## **CHAPITRE 2:**

### **RECHERCHE EXPERIMENTALE D'UNE METHODE PERMETTANT DE CONTRÔLER L'ETAT DE MATURITE DES GONADES DES BIVALVES SANS SACRIFICE D'ANIMAUX.**

#### **2-1) INTRODUCTION**

A l'heure actuelle, les méthodes d'évaluation des stades de maturité des gonades de bivalves sans sacrifice sont très peu pratiquées.

D'après les données de la littérature, nous avons pu constater que l'étude histologique qualitative et quantitative était actuellement la méthode la plus précise pour évaluer les stades de maturité des gonades. Mais jusqu'à présent, cette méthode ne concerne qu'une partie importante de gonade et ne peut être utilisée qu'après sacrifice des animaux.

Dans le cadre de notre étude, nous avons donc essayé de mettre au point une méthode qui procure des informations quantitatives et qualitatives, en s'appuyant sur des observations à la fois macroscopiques et histologiques de la gonade. L'histologie étant effectuée sur une biopsie de gonade (biopsie = prélèvement d'un fragment de tissu sur un organisme vivant), cette méthode ne nécessite aucun sacrifice.

La durée très courte durant laquelle cette étude a été menée, a limitée le nombre d'expériences qui ont été centrées sur la biopsie (réalisation et qualité) et sur la survie des animaux après manipulation.

Un aperçu sur l'efficacité de cette méthode a été donné en comparant nos résultats avec ceux obtenus par une méthode de référence.

#### **2-2) MATERIEL ET METHODES**

##### **2-2-1) MATERIEL BIOLOGIQUE**

Cette étude ayant été conduite en Bretagne à la fin de l'hiver (de mi-février à mi-mars), il nous a été difficile d'obtenir des huîtres dont les gonades présentaient un développement suffisamment avancé pour nous permettre d'effectuer des biopsies sans risquer de toucher à d'autres organes. Nous avons cependant utilisé quelques huîtres de la région dont les gonades étaient vides, principalement pour tester nos méthodes d'ouverture des valves. L'efficacité de notre méthode a pu être testée sur quelques *Crassostrea gigas* présentant une

gonade moyennement développée. Ces animaux avaient été conditionnés à l'écloserie d'Argenton. Les différentes catégories d'animaux utilisées sont les suivantes:

- *Crassostrea gigas* provenant d'une ferme ostréicole de Bretagne (gonade vide; 22 individus).
- *Ostrea edulis* provenant de fermes ostréicoles de Bretagne (gonade vide; 22 individus).
- *Crassostrea gigas* ayant été conditionnées à l'écloserie d'Argenton et dont la gonade était suffisamment développée pour permettre le prélèvement de biopsies sans risquer de toucher à d'autres organes (9 individus).
- coquilles Saint-Jacques du genre *Pecten maximus* dont la ponte avait été provoquée un mois avant nos manipulations (ponte réalisée pour d'autres expériences au sein du laboratoire) (3 individus).

Toutes les biopsies effectuées sur ces différentes espèces ont été réalisées principalement pour tester la qualité des prélèvements et la survie des animaux après manipulation.

## **2-2-2) METHODES**

### **2-2-2-1) TECHNIQUES D'OUVERTURE DES BIVALVES.**

Différentes techniques ont été testées pour permettre l'ouverture des bivalves:

#### **\* Ouverture des huîtres**

Deux techniques ont été utilisées pour ouvrir les huîtres sans risquer de les blesser.

##### **- Ouverture par le froid:**

10 *Crassostrea gigas* et 10 *Ostrea edulis* provenant de fermes ostréicoles de la région ont été placées à sec à une température de 0°C pendant plusieurs heures ou plusieurs jours, puis immergées dans l'eau de mer à température ambiante (15°C) dès l'ouverture des valves.

##### **- Ouverture par le chlorure de magnésium:**

10 *Crassostrea gigas* et 10 *Ostrea edulis* provenant de fermes ostréicoles de la région ont été immergées dans une solution aqueuse de chlorure de magnésium à 35‰ pendant plusieurs heures, puis immergées dans l'eau de mer à température ambiante (15°C) dès l'ouverture des valves.

9 *Crassostrea gigas* provenant de l'écloserie d'Argenton où elles étaient conditionnées à 17°C, ont été immergées dans une solution aqueuse de chlorure de magnésium à 35‰ pendant une nuit, puis immergées dans l'eau de mer à 17°C après avoir subi une biopsie de gonade.

Le maintien de la température et de la salinité a été respecté de manière à ne pas faire subir de chocs thermique ou salin à ces géniteurs.

#### **\* Ouverture des coquilles Saint-Jacques**

Les coquilles Saint-Jacques ont été émergées pendant quelques minutes et maintenues ouvertes à la main le temps d'effectuer les biopsies.

### **2-2-2-2) METHODE D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE PAR COUPLAGE D'OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES ET HISTOLOGIQUES.**

#### **\* Présentation de la méthode.**

Cette méthode consiste d'une part à évaluer le stade de maturité à partir de l'observation macroscopique de la gonade ("stade macro" qui apporte principalement des informations quantitatives) et d'autre part, à effectuer une deuxième évaluation à partir de l'observation microscopique de coupes histologiques d'une biopsie de la gonade ("stade biopsie" qui apporte principalement des informations qualitatives). Le stade final d'évaluation de l'état de maturité de l'animal est obtenu en consultant un tableau dans lequel les différentes combinaisons possibles entre les "stade macro" et les "stade biopsie" sont reportées.

#### **\* Protocole expérimental.**

Deux séries de biopsies ont été réalisées à un mois d'intervalle:

**Le 2 mars**, des biopsies ont été prélevées sur 5 *Crassostrea gigas* provenant de l'écloserie d'Argenton et 2 *Ostrea edulis*.

**Le 6 avril**, ces mêmes animaux ont été sacrifiés après avoir subis une seconde biopsie. La totalité de leur gonade a été prélevée.

Des biopsies ont été effectuées sur un lot témoin de 4 autres *Crassostrea gigas* provenant de l'écloserie d'Argenton.

Des biopsies ont également été réalisées sur 3 coquilles Saint-Jacques (2 biopsies pour chaque individu: une dans la partie femelle et une dans la partie mâle de la gonade).

### **2-2-2-3) PARAMETRES SUIVIS**

#### **\* Survie des animaux.**

Pour évaluer la survie des animaux après manipulation (biopsie, technique d'ouverture), ils ont été maintenus dans leur bac respectif pendant une période minimum de 15 jours. Après ce délai, nous avons jugé que les animaux avaient survécu.

#### **\* Qualité des biopsies.**

La qualité des 26 biopsies effectuées (16 sur *Crassostrea gigas*, 4 sur *Ostrea edulis* et 6 sur *Pecten maximus*) a été évaluée en observant des coupes histologiques de ces prélèvements. Les critères utilisés pour évaluer cette qualité ont été l'écrasement, le déchirement ou toute autre altération des tissus prélevés.

#### **\* Efficacité de notre méthode.**

Les prélèvements effectués le 6 avril sur le lot I (*Crassostrea gigas* d'Argenton) ont permis d'effectuer une comparaison entre les résultats obtenus par notre méthode (observation macroscopique + histologie sur biopsie) et ceux obtenus par la méthode de référence (histologie sur la totalité de la gonade).

#### **\* Influence de notre méthode sur le développement post-manipulations de la gonade.**

Pour détecter une éventuelle perturbation du développement de la gonade due aux manipulations (ouverture + biopsie), les résultats obtenus à partir des prélèvements effectués le 2 mars sur le lot I (*Crassostrea gigas* d'Argenton) ont été comparés avec ceux obtenus le 6 avril sur ce même lot. Ces différents résultats ont ensuite été comparés avec ceux obtenus le 6 avril sur un lot témoin (lot II = *Crassostrea gigas* provenant d'Argenton).



#### **2-2-2-4) TECHNIQUES UTILISEES.**

##### **\* Biopsies.**

Les fragments de gonade ont été prélevés à l'aide d'une pince bronchoscopique que nous possédions au laboratoire pour effectuer des biopsies chez les poissons (Devauchelle, 1985). Cette micro-pince mesure 2 mm de diamètre et permet le prélèvement d'échantillons de tissu de forme sphérique d'un diamètre de 1,5 mm. La paroi de la gonade a été légèrement percée à l'aide de l'aiguille d'une seringue afin de faciliter l'introduction de la micro-pince à l'intérieur du tissu gonadique. Les fragments ont été traités pour une étude histologique.

##### **\* Prélèvement de la totalité de la gonade.**

Après sacrifice de l'animal, l'ensemble "gonade + glande digestive" a été prélevé et traité pour une étude histologique.

##### **\* Histologie (in Gabe, 1968)**

Les échantillons de tissu (biopsies et "gonade + glande digestive") ont été fixés par le liquide de Bouin pendant 24 h, puis déshydratés et inclus dans la paraffine. Des coupes de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur réalisées avec un microtome, ont été collées sur lames à l'eau gélatinée puis colorées au trichrome de Masson. Le montage a été réalisé à froid dans une résine synthétique.

##### **\* Echelle d'évaluation histologique de référence utilisée pour la totalité de la gonade et les biopsies.**

Les échelles existant actuellement pour évaluer microscopiquement les stades de maturité des gonades de *Crassostrea gigas* ne nous satisfaisant que partiellement, nous avons préféré construire notre propre échelle. Nous avons plus ou moins modifié la formulation de l'échelle de His (1976) avec des termes qui nous étaient plus familiers inspirés par l'échelle de Thielley (1993). Les noms attribués aux différents stades de notre échelle sont volontairement identiques à ceux de l'échelle d'évaluation macroscopique de Le Dantec (1968) que nous utilisons dans notre méthode, de manière à garder une homogénéité dans les différentes appellations.

Pour les quelques observations effectuées sur *Ostrea edulis* et *Pecten maximus* dont les gonades étaient d'apparence vide, nous ne nous sommes pas attardés en utilisant d'autres échelles d'évaluation. L'étude histologique des biopsies a été réalisée en empruntant les stades 0 et 1 de notre échelle d'évaluation présentée pour *Crassostrea gigas*.

*Stade 0:* repos sexuel.

### ***Gonade femelle***

*Stade 1:* les tubules gonadiques peu volumineux renferment des ovogonies, des ovocytes prévitellogéniques et quelques ovocytes en début de vitellogenèse. Le tissu conjonctif est bien développé.

*Stade 2:* les tubules sont plus volumineux qu'au stade précédant, d'où une réduction du tissu conjonctif intergonadique. Ils renferment principalement des ovocytes prévitellogéniques ou en début de vitellogenèse bordant la paroi des follicules. Les ovocytes d'apparence mature sont encore peu nombreux.

*Stade 3P:* les follicules sont volumineux et le tissu conjonctif interstitiel n'est pratiquement plus discernable. Les ovocytes en fin de vitellogenèse sont très nombreux, mais il n'est pas rare de rencontrer des ovocytes prévitellogéniques ou en début de vitellogenèse.

*Stade 3H:* la gonade est mature, les tubules sont turgescents. Le tissu conjonctif intergonadique a quasiment disparu. Les acini ne renferment que des ovocytes d'apparence mature ou proches de la maturité.

*Stade 4:* C'est un stade de régression partielle. La gonade ne s'est pas totalement vidée. Les tubules, légèrement rétractés, prennent une forme irrégulière laissant entre eux des espaces dans lesquels le tissu conjonctif pourra se développer. A l'intérieur des tubules, des ovocytes souvent en cours de dégénérescence sont présents. Lorsqu'une ponte partielle a eu lieu avant la maturité totale de la gonade, ou lorsque l'individu a déjà réinitié un nouveau cycle gamétogénique, il est possible de rencontrer des ovocytes prévitellogéniques ou en début de vitellogenèse.

*Stade 5:* ponte sub-totale. Les tubules très rétractés ne renferment que quelques ovocytes résiduels. L'espace très important laissé entre les tubules va être comblé par du tissu conjonctif.

### ***Gonade mâle***

*Stade 1:* les quelques tubules observables sont peu nombreux, dispersés dans le tissu conjonctif. A l'intérieur des tubules il y a prédominance des spermatogonies et des spermatocytes. Quelques spermatozoïdes peuvent être distingués.

*Stade 2:* les tubules sont plus volumineux qu'au stade 1. Le tissu conjonctif intergonadique est bien développé. Sur les coupes transversales de tubules, les spermatogonies et les spermatocytes se rencontrent à la périphérie formant une large couronne, alors que les spermatozoïdes occupent la partie centrale.

*Stade 3P:* les tubules chargés de cellules germinales sont volumineux; Le tissu conjonctif est réduit. Les spermatozoïdes très nombreux occupent la majeure partie de la lumière des tubules. Toutefois, on distingue encore nettement à la périphérie, une couronne plus claire constituée par les spermatogonies et les spermatocytes.

*Stade 3H*: les tubules sont turgescents. Le tissu conjonctif est pratiquement inexistant. Les spermatozoïdes occupent la totalité de la lumière des acini. Quelques rares îlots de spermatocytes peuvent parfois être distingués à la périphérie.

*Stade 4*: C'est un stade de régression partielle. Les gamètes n'ont pas tous été évacués lors de la déplétion. Des espaces importants, dans lesquels le tissu conjonctif se développe, apparaissent entre les tubules rétractés. La lumière des acini est occupée par des spermatozoïdes. Des spermatogonies et des spermatocytes sont également présents lorsque la déplétion partielle s'est produite avant la maturité totale de la gonade, ou lorsque l'individu a déjà réinitié un nouveau cycle gamétogénique.

*Stade 5*: C'est un stade de régression totale. La gonade s'est entièrement vidée. Les tubules se sont rétractés et ne renferment que quelques spermatozoïdes résiduels. Le tissu conjonctif est bien développé.

#### **\* Echelles d'évaluation macroscopique.**

Nous avons utilisé des échelles présentées dans le § (1-2-1-1):

- pour *Crassostrea gigas*, l'échelle d'évaluation macroscopique des stades de maturité de Le Dantec (1968) classiquement utilisée pour les huîtres du genre *Crassostrea*,
- pour *Ostrea edulis*, l'échelle utilisée par la station IFREMER de Palavas (Coatanea *et al*, 1994),
- pour *Pecten maximus*, l'échelle utilisée par l'écloserie d'Argenton (Robert *et al*, 1994)

#### **\* Stades finaux.**

Les stades finaux sont évalués à partir des différentes combinaisons qui peuvent se présenter entre le "stade macro" et le "stade biopsie".

**Les règles que nous avons définies pour établir le tableau I des stades finaux sont les suivantes:**

- Lorsque l'animal présente une gonade en cours de développement ou de régression à l'examen macroscopique (stade 1, 2, 3P, 3H, 4 ou 5), les biopsies correspondantes qui ne présentent que du tissu conjonctif (stade 0) ont été considérées comme mauvaises car prélevées en dehors de la gonade. Le stade final ne peut donc pas être défini.
- Lorsque le stade de développement évalué macroscopiquement (stades 1, 2 ou 3P) est moins avancé que le stade évalué par l'observation microscopique de la biopsie, ce dernier "stade biopsie" est prédominant. Nous considérons en effet qu'une gonade peut être peu développée quantitativement et que l'information qualitative est prédominante dans ce cas.

- Lorsqu'un stade de développement 2 ou 3P évalué macroscopiquement est plus avancé que le stade de développement 1 ou 2 évalué par l'observation de la biopsie, il est prédominant. En effet, lors des observations microscopiques, la distinction entre les stades de développement (1 et 2) ou les stades de développement (2 et 3P) n'est pas toujours évidente, les critères s'appuyant en partie sur un développement quantitatif de la gonade. Dans une biopsie, ces critères quantitatifs peuvent être difficiles à évaluer du fait de la faible dimension de l'échantillon. Nous considérons donc, dans ce cas, que le stade évalué macroscopiquement permet de rectifier une sous-évaluation qui peut avoir lieu lors de l'observation de la biopsie.

- Lorsque le stade de développement évalué macroscopiquement est 3P ou 3H, la gonade est très développée quantitativement. Une gonade très développée ne se rencontre normalement que lorsque le stade de maturité évalué microscopiquement est 3P, 3H ou 4. Seul un de ces stades peut être envisagé comme stade final et l'information qualitative apportée par la biopsie permet de le déterminer (développement, maturité ou régression).

- Lorsque le stade évalué macroscopiquement est un stade de régression 4 ou 5, il sera dominant si l'information de régression est confirmée par la biopsie. Par contre, si la biopsie révèle un stade de maturité 3H ou de développement 1, 2 ou 3P ces stades définiront les stades finaux, l'information qualitative étant plus précise dans ce cas. Cependant, si le stade 4 a été évalué macroscopiquement et qu'un stade 1 a été évalué microscopiquement, nous considérons que la biopsie a sous-évalué un stade de développement 2 qui correspond à une gonade assez développée (stade macro 4) et en développement (stade biopsie 1).

Certaines combinaisons ne devraient pas se rencontrer en pratique. Pour ces cas particuliers, les stades finaux ont été présentés en italique dans notre tableau.

## **2-3) RESULTATS**

### **2-3-1) OUVERTURE DES VALVES.**

#### ***2-3-1-1) OUVERTURE DES HUITRES.***

##### **\* Ouverture par le froid**

Les huîtres du genre *Ostrea edulis* ayant été placées à 0°C, se sont ouvertes après 4 heures pour les premières et 4 jours pour les dernières.

Les huîtres du genre *Crassostrea gigas* ont été beaucoup plus longues à s'ouvrir. En effet, un minimum de 2 jours a été nécessaire pour que les premières huîtres s'ouvrent et après 15 jours, bien que la majorité d'entre elles se soit ouvertes, 3 huîtres étaient toujours fermées.

Aucune mortalité n'a été constatée parmi ces lots qui ont été replacés dans des bacs d'eau de mer. Les huîtres se sont refermées après plusieurs heures (24h pour celles qui avaient été les plus tardives à s'ouvrir).

### \* Ouverture par le chlorure de magnésium.

Après immersion dans une solution de chlorure de magnésium à 35‰, les huîtres du genre *Ostrea edulis* se sont ouvertes au bout de quelques heures (1h30 à 3h). Les huîtres du genre *Crassostrea gigas* sont restées une nuit dans cette même solution avant de s'ouvrir.

Aucune mortalité n'a été observée pour ces deux lots qui ont été replacés dans des bacs d'eau de mer. Les huîtres se sont refermées après 3 ou 4 heures.

Cette technique a été utilisée pour permettre l'ouverture des huîtres sur lesquelles notre méthode d'évaluation des stades de maturité a été appliquée. Les animaux étaient parfaitement anesthésiés et l'ouverture des valves suffisamment large pour évaluer macroscopiquement le stade de maturité de la gonade et effectuer une biopsie.

### 2-3-1-2) OUVERTURE DES COQUILLES SAINT-JACQUES.

Les coquilles Saint-Jacques se sont ouvertes très largement après avoir été émergées quelques minutes. Cette technique n'entraîne aucune mortalité si les animaux sont replacés rapidement dans l'eau de mer.

### 2-3-2) ACTION DU CHLORURE DE MAGNESIUM SUR UN PARASITE DE L'HUITRE, LE VER *POLYDORA*.

Parmi les 10 *Crassostrea gigas* provenant de l'écloserie d'Argenton, 3 étaient parasitées par un ver annélide polychète du genre *Polydora*. Ces parasites ont systématiquement quitté les huîtres sous l'action de notre traitement par le chlorure de magnésium.

### 2-3-3) METHODE D'EVALUATION DE L'ETAT DE MATURITE PAR COUPLAGE D'OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES ET HISTOLOGIQUES.

#### 2-3-3-1) TABLEAU I DES STADES FINAUX

Le tableau des stades finaux a été établi selon les règles définies § (2-2-2-3)

#### **Légende :**

**Stade macro:** stade de maturité évalué d'après examen macroscopique de la gonade.

**Stade biopsie:** stade de maturité évalué après examen de coupe histologiques à travers la biopsie.

**Stade final:** stade final d'évaluation de l'état de maturité établi selon les règles que nous avons proposées.

**Stades en italique:** cas extrêmes de combinaisons qui ne devraient pas se rencontrer de façon concrète.

**Tableau I: tableau des stades finaux**

<b>stade macro</b>	<b>stade biopsie</b>	<b>stade final</b>
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>1</b>	<b>1</b>
	<b>2</b>	<b>2</b>
	<b>3P</b>	<b>3P</b>
	<b>3H</b>	<b>3H</b>
	<b>4</b>	<b>5</b>
	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	
	<b>1</b>	<b>1</b>
	<b>2</b>	<b>2</b>
	<b>3P</b>	<b>3P</b>
	<b>3H</b>	<b>3H</b>
	<b>4</b>	<b>4</b>
	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>0</b>	
	<b>1</b>	<b>2</b>
	<b>2</b>	<b>2</b>
	<b>3P</b>	<b>3P</b>
	<b>3H</b>	<b>3H</b>
	<b>4</b>	<b>4</b>
	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>3P</b>	<b>0</b>	
	<b>1</b>	<b>3P</b>
	<b>2</b>	<b>3P</b>
	<b>3P</b>	<b>3P</b>
	<b>3H</b>	<b>3H</b>
	<b>4</b>	<b>4</b>
	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>3H</b>	<b>0</b>	
	<b>1</b>	<b>3P</b>
	<b>2</b>	<b>3P</b>
	<b>3P</b>	<b>3P</b>
	<b>3H</b>	<b>3H</b>
	<b>4</b>	<b>4</b>
	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>0</b>	
	<b>1</b>	<b>2</b>
	<b>2</b>	<b>2</b>
	<b>3P</b>	<b>3P</b>
	<b>3H</b>	<b>3H</b>
	<b>4</b>	<b>4</b>
	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>0</b>	
	<b>1</b>	<b>1</b>
	<b>2</b>	<b>2</b>
	<b>3P</b>	<b>3P</b>
	<b>3H</b>	<b>3H</b>
	<b>4</b>	<b>5</b>
	<b>5</b>	<b>5</b>

2-3-3-2) TABLEAU II DES RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Tableau II: résultats expérimentaux.

Prélèvements du 2 mars 1995							Prélèvements du 6 avril 1995				
n° lot	n°i	sexe	stade macro.	stade biopsie	stade final	survie	stade macro	stade biopsie	stade final	stade micro	survie
I	1	m	2	2	2	oui	3P	3P	3P	3P	sacrifice
I	2* <sup>▲</sup>	f	2	2	2	oui	2	4	4	4	sacrifice
I	3	f	2	2	2	oui	3P	2	3P	3P	sacrifice
I	4	f	2	2	2	oui	3P	3H	3H	3H	sacrifice
I	5 <sup>▲</sup>	f	2	2	2	oui	2	mauvaise		2	sacrifice
II	6	f					2	2	2		oui
II	7 <sup>▲</sup>	f					2	2	2		oui
II	8	f					3P	2	3P		oui
II	9	f					3P	mauvaise			oui
III	10	m et f	0	0	0	oui	0	1	1	1	sacrifice
III	11	m et f	0	0	0	oui	1	1	1	1	sacrifice
IV	12	f	0	1	1	oui					
IV	13	indét.	0	0	0	oui					
V	14	m et f					0	1	1		oui
V	15	m et f					0	1	1		oui
V	16	m et f					0	1	1		oui

**Légende:**

\*: animal malade (intérieur des coquilles recouvert d'une pellicule brunâtre)

▲: animal parasité par un *polydora*.

**Stade macro:** stade de maturité évalué après examen macroscopique de la gonade.

**Stade micro:** stade de maturité évalué après examen de coupes histologiques à travers la totalité de la gonade.

**Stade final:** stade final d'évaluation de l'état de maturité d'après le tableau I.

**Stade biopsie:** stade de maturité évalué après examen de coupes histologiques à travers la biopsie.

**Survie:** survie de l'animal 15 jours après la biopsie.

**Lot I:** *Crassostrea gigas* provenant de l'écloserie d'Argenton.

**Lot II:** *Crassostrea gigas* provenant de l'écloserie d'Argenton (lot témoin).

**Lot III:** *Ostrea edulis* provenant d'une ferme ostréicole de Bretagne.

**Lot IV:** *Crassostrea gigas* provenant d'une ferme ostréicole de Bretagne.

**Lot V:** *Pecten maximus*.

### **2-3-3-3) REALISATION.**

Les résultats ont été obtenus 48 h après le prélèvement des biopsies (24 h pour la fixation, 12 h pour la déshydratation et l'inclusion en paraffine et 12 h pour la confection, la coloration et l'observation des coupes).

Parmi les 14 biopsies réalisées sur les lots I et II (géniteurs d'Argenton), 2 n'ont pu être utilisées. Ces prélèvements ont en effet été effectués dans du tissu conjonctif et seuls quelques gamètes étaient présents. Les 12 autres biopsies ont permis l'évaluation d'un stade de maturité.

Les biopsies réalisées sur les lots III et IV (huîtres provenant de fermes ostréicoles de la région), ont été plus délicates à effectuer du fait de l'absence de développement de la gonade chez ces individus. L'une de nos biopsies a notamment été effectuée en grande partie dans la glande digestive de l'animal.

Chez les coquille Saint-Jacques, la gonade étant nettement distincte des autres organes, les biopsies ont été particulièrement faciles à réaliser.

### **2-3-3-4) SURVIE DES ANIMAUX.**

Les résultats de ces quelques expériences nous permettent de constater que ces techniques d'ouverture des bivalves et de biopsie de gonade n'entraînent aucune mortalité.

### **2-3-3-5) QUALITE DES BIOPSIES.**

Toutes les biopsies que nous avons réalisées, 23 au total, sont de qualité satisfaisante pour permettre une observation correcte au microscope. En effet, les tissus n'ont pas été écrasés lors des prélèvements et la taille de l'échantillon permet l'observation correcte d'un à trois acini lorsque la biopsie a été effectuée à l'intérieur de la gonade. La qualité des prélèvements effectués sur les coquilles Saint-Jacques est excellente.

Le sexe des l'animaux peut être déterminé de façon très précise. Pour le lot III en particulier, les *Ostrea edulis* présentaient des gonades bisexuées. Dans un même acinus, des lignées germinales mâles et femelles ont pu être clairement observées comme étant toutes deux en début de développement (stade 1).

Certaines biopsies qui n'avaient pas été effectuées au niveau des acini ont dû être écartées.



### 2-3-3-6) EFFICACITE DE LA METHODE.

Pour le lot I, les résultats obtenus à partir des prélèvements effectués le 6 avril, montrent que sur les 4 biopsies utilisables, 3 présentent une évaluation du stade de maturité identique à l'évaluation de référence réalisée à partir des coupes de la gonade entière. Il est intéressant de noter que pour l'individu n°2 présentant une gonade en régression (stade 4), ainsi que pour l'individu n°4 se trouvant dans un état de maturité finale (stade 3H), ces stades ont été détectés par la biopsie alors qu'ils étaient passés inaperçu lors de l'examen macroscopique de la gonade. Pour les animaux présentant une gonade en cours de développement, le stade 3P n'a été évalué par la biopsie que pour l'individu n°1. Pour l'individu n°3, le résultat de la biopsie montre une sous évaluation alors que le résultat obtenu par l'observation macroscopique de la gonade montre effectivement un développement au stade 3P.

Cependant, lorsque nous comparons le stade final avec le stade de référence, les résultats sont identiques. Les quelques règles de base que nous proposons pour identifier le stade final ont donc permis la correction de certaines erreurs d'interprétation qui peuvent avoir lieu lorsque chaque méthode d'évaluation (à partir de l'examen macroscopique de la gonade ou de l'examen microscopique de biopsies), sont utilisées individuellement.

Bien que les biopsies réalisées sur les lots III (*Ostrea edulis* provenant de fermes ostréicoles de la région), aient été plus délicates à effectuer du fait de l'absence de développement de la gonade chez ces individus, nous constatons que les résultats finaux correspondent aux résultats de référence.

L'excellente qualité des biopsies effectuées sur les coquilles Saint-Jacques, nous a permis de détecter un début de développement passé inaperçu lors de l'examen macroscopique.

Pour les individus du lot I, il semble que les gonades aient subis une certaine évolution entre le 2 mars et le 6 avril. En effet, en début de manipulation, les animaux présentaient des gonades peu développées (stade 2), alors que les résultats du 6 avril montrent un développement plus avancés (stades 3).

Le semblant d'évolution constaté sur le développement des gonades des individus du lot I ne peut être confirmé de façon certaine. En effet, l'évaluation des stades de maturité des individus en début de manipulation a été effectuée à partir de l'examen macroscopique des gonades ainsi que de l'examen microscopique des biopsies, et non pas à partir de l'observation des coupes de gonade entières qui nous sert de référence. Il est donc possible que cette évaluation ne soit pas tout à fait exacte. D'autre part, les individus du lot témoin n°II ne semblent pas présenter en fin de manipulation un développement aussi avancé que ceux du lot I.

Cependant, nos manipulations ne semblent pas avoir perturbées de façon importante le développement des gonades des individus du lot n°I, sauf peut être pour l'individu n°2, dont la gonade commençait à se développer le 2 mars et qui a été retrouvé dans un état de régression un mois plus tard.

## 2-4) DISCUSSION

Chez les huîtres, le temps de réaction avant ouverture des valves par la technique du froid est très différent d'une espèce à l'autre, voire d'un individu à l'autre. De plus, ces temps de réaction peuvent être particulièrement longs. La réponse des huîtres à ce traitement n'est donc pas satisfaisante pour une utilisation pratique de cette technique.

Par contre, l'utilisation du chlorure de magnésium à 35‰ donne de bons résultats en particulier chez *Ostrea edulis* pour qui le laps de temps avant ouverture est relativement court (maximum 3 h). Les animaux récupèrent rapidement après ce traitement et ne subissent à première vue aucun traumatisme. Cette technique d'ouverture des huîtres est couramment employée par la station IFREMER de la Tremblade qui applique un traitement d'une nuit dans un mélange d'eau douce et d'eau de mer (50/50), additionné de chlorure de magnésium à 50‰.

Une étude sur l'efficacité de différents anesthésiques a été menée par Culloty et Mulcahy (1992) sur *Ostrea edulis*. Un certain nombre de produits ont été testés tels que l'uréthane, le sodium pentobarbitone, le chlorure de magnésium, le menthol, le sulfate de magnésium, le chloral hydrate et l'ethyl-4 aminobenzoate. D'après les résultats obtenus par ces auteurs, le chlorure de magnésium (35‰) s'est révélé comme étant le produit le plus efficace et le plus adapté à une utilisation de routine (anesthésie relativement rapide (90 mn maximum), temps de récupération du même ordre, absence de mortalité parmi les huîtres saines et coût relativement bas).

D'autres méthodes qui consistent à perforer la coquille des bivalves, ont été utilisées par un certain nombre d'auteurs afin d'atteindre les parties molles de l'animal et d'effectuer des ponctions ou des injections à l'aide d'une seringue.

Ainsi, Choi *et al.* (1994) pratiquent une entaille en forme de V dans la partie postérieure des coquilles de *Crassostrea virginica*. Chez la moule *Amblema plicata perlicata*, Petit (1978), fore les coquilles jusqu'à ce qu'il ne reste qu'une mince couche de nacre qui est ensuite facilement percée avec une aiguille pour atteindre la cavité palléale.

Neudecker (1980) a testé plusieurs méthodes sur *Crassostrea gigas* pour lui permettre d'effectuer, à l'aide d'une seringue, des prélèvements de gamètes afin de déterminer le sexe des animaux. Selon cet auteur, la méthode qui consiste à introduire de force une aiguille entre les valves, entraîne de fortes mortalités, des organes vitaux pouvant être percés lors de cette manipulation. Une autre technique décrite par cet auteur, consiste à perforer une valve au dessus de la gonade. Cette méthode n'a pas été retenue car l'animal est très souvent endommagé lors de cette opération. Finalement, Neudecker (1980) adopta une méthode qui consistait à couper ou à limer la coquille au niveau de la tranche de l'huître, jusqu'à apparition d'une ouverture entre les deux valves. L'animal n'a besoin que de un à trois jours pour réparer ses valves en sécrétant une mince couche de coquille nouvelle.

Toutefois, la présence de polychètes qui peuvent profiter de cette ouverture pour pénétrer facilement dans les huîtres, doit être surveillée. En effet, ces parasites peuvent entraîner des problèmes pouvant conduire à la mort de l'animal.

Toutes ces techniques qui consistent à perforer la coquille, peuvent être envisagées pour permettre le passage d'une seringue. La technique retenue par Neudecker (1980) qui consiste à

limer la tranche du bivalve, apparaît comme étant la plus performante. Etant donné la taille de la pince bronchoscopique que nous avons utilisée, il nous a semblé préférable d'utiliser une technique qui permette une large ouverture des valves afin de pouvoir manipuler avec un maximum de précisions. Cependant, l'utilisation de ces différentes techniques de perforation des valves pourrait ultérieurement être envisagée si la technique d'ouverture par le chlorure de magnésium s'avérait être néfaste pour le développement des gamètes.

Nous avons pu constater par hasard que le traitement par le chlorure de magnésium permettait l'évacuation des vers *Polydora* qui parasitent parfois les huîtres. Ce parasite et non seulement préjudiciable à la qualité commerciale des huîtres, mais il entraîne également, d'après certains auteurs, un affaiblissement du mollusque (Catherine et al., 1990) et parfois la mort de l'animal (Witelegge, 1890; Roughley, 1925; Carazzi, 1893).

Plusieurs traitements ont été testés pour débarrasser les huîtres de ces parasites, notamment par l'eau douce, par la saumure, ou encore par l'eau formolée. Notre étude a montrée que le traitement par le chlorure de magnésium était également efficace pour épurer les huîtres des *Polydora*. Dans le cadre d'une éclosérie ou d'une étude expérimentale, ce traitement pourrait être envisagé sur les huîtres, en particulier sur les géniteurs avant leur mise en maturation. Ceci permettrait en effet de suivre l'évolution d'animaux pour lesquels l'influence des *Polydora* pourrait être totalement écartée.

Dans le cadre de notre étude qui ne constitue qu'une approche expérimentale, nous avons proposé un tableau de stades finaux établi selon certaines règles que nous avons définies. Ces stades finaux ne sont bien sûr qu'hypothétiques pour l'instant et devront être vérifiés par une étude expérimentale complète (nombre d'individus par échantillon et nombre d'échantillonnages étalés sur l'année statistiquement suffisants). Cette étude consisterait à comparer les résultats obtenus par la méthode de référence avec les combinaisons résultant de l'évaluation macroscopique et de l'évaluation microscopique d'après biopsie, de l'état de maturité. Le stade final pourrait ainsi être obtenu de façon statistique.

La méthode que nous proposons permet d'obtenir des résultats en 48 h. Ce délai peut vraisemblablement être ramené à 36 h en réduisant les temps de fixation et de déhydratation, ce qui ne devrait pas poser de problèmes étant donné la taille minuscule des échantillons.

Si la qualité des biopsies s'est révélée satisfaisante, certaines d'entre elles n'ont pu être utilisées dans le cadre de notre méthode car elles avaient été prélevées à l'extérieur de la gonade, dans du tissu conjonctif par exemple. Ainsi, sur les 14 biopsies que nous avons réalisées sur les *Crassostrea gigas* provenant de l'éclosérie d'Argenton et dont la gonade présentait un développement moyen, 2 ont été prélevées dans du tissu conjonctif et n'ont pas pu être utilisées. Il est vraisemblable dans ce cas, que la pince à biopsie n'ait pas pénétré suffisamment à l'intérieur de la gonade lors des prélèvements.

Notre méthode ne semble pas perturber de façon importante le développement ultérieur de la gonade. L'individu n°2 dont la gonade commençait à se développer le 2 mars et qui a été retrouvé dans un état de régression un mois après nos manipulations, venait de se vider partiellement. Plusieurs interprétations peuvent être envisagées pour ce cas particulier: gonade s'étant développée jusqu'à totale maturité suivie d'une ponte, ou gonade s'étant vidangée avant d'avoir atteint la maturité finale.

Il est possible que la biopsie soit à l'origine d'une vidange prématurée chez cet individu. Nous noterons cependant que cette huître était visiblement malade depuis plusieurs mois et que cette vidange prématurée pourrait avoir comme origine l'action combinée de l'état maladif de l'animal et de la biopsie.

Bien que les résultats obtenus par notre méthode paraissent tout à fait satisfaisants, il serait cependant nécessaire pour valider cette méthode, d'effectuer une étude complète sur la totalité du cycle de reproduction de chaque espèce, de manière à observer précisément toutes les combinaisons qui peuvent se rencontrer et à vérifier statistiquement le tableau des stades finaux que nous proposons. Il apparaît également nécessaire d'évaluer précisément les conséquences de telles manipulations sur le développement de la gonade, ainsi que sur le déclenchement des pontes lorsque les animaux atteignent un état de maturité complète.

Notre méthode peut toutefois présenter quelques inconvénients.

En effet, pour les bivalves comme les huîtres (dont la gonade se développe de façon diffuse autour de la glande digestive), lorsque les individus présentent macroscopiquement une gonade au stade 0, les biopsies sont très délicates à effectuer. Ainsi, bien que dans le cadre de nos expériences, les biopsies effectuées sur des individus présentant une gonade vide n'aient entraîné aucune mortalité, il est préférable de ne pas effectuer de biopsie sur des individus dont la gonade n'est pas développée. Dans ce cas, l'individu risque en effet de garder des lésions importantes dues à la biopsie. De plus, même si l'animal se trouve en tout début de développement (stade 1) ou en stade avancé de régression (stade 5) ce qui peut être le cas pour un stade 0 évalué macroscopiquement, la gonade est si peu développée que la probabilité d'effectuer une biopsie dans des acini est très faible. Le prélèvement risque le plus souvent d'être effectué dans le tissu conjonctif qui entoure les acini ou dans la glande digestive.

Dans ce cas, l'observation macroscopique nous semble suffisante pour le suivi du cycle de reproduction en éclosérie. Le stade 5 apparaît logiquement après la ponte et le stade 0 juste avant la nouvelle période de maturation. Il est ainsi possible pour les écloséries, par un suivi chronologique des différents stades de développement des gonades et l'observation des pontes, de distinguer approximativement ces deux stades.

Pour la coquille St-Jacques par contre, les biopsies de gonade ne semblent pas poser de problèmes même lorsque le stade de développement a été évalué macroscopiquement comme étant nul (stade 0).

Chez certains bivalves, l'évolution des lignées germinales est souvent asynchrone entre diverses régions d'une même gonade (Lubet *et al*, 1987). C'est notamment le cas chez *Pecten maximus* (Dorange, communication personnelle). Chez de telles espèces, une étude particulière doit être envisagée afin de définir le nombre de biopsies nécessaires pour évaluer correctement le "stade biopsie".

Enfin, notre méthode demande des manipulations relativement importantes et ne permet pas l'obtention immédiate des résultats (36 h minimum). Elle peut être utilisée dans le cadre d'études expérimentales. Pour les écloséries, sans être utilisée en routine, elle pourrait permettre le contrôle de l'homogénéité des stades de développement de la gonade dans les lots de géniteurs.

Cependant, les résultats obtenus en utilisant le chlorure de magnésium pour ouvrir les huîtres, permettent de lever une barrière majeure et d'envisager **d'autres méthodes pour évaluer l'état de maturité des gonades, sans avoir recours au sacrifice d'animaux**. Il est fort probable que le chlorure de magnésium puisse avoir une action semblable sur d'autres espèces de bivalves.

A titre d'exemple, quelques **variantes de notre méthode** peuvent être proposées. Le principe de la méthode que nous avons proposée est d'évaluer un stade final de maturation en combinant les résultats obtenus par l'observation macroscopique de la gonade "stade macro" et par l'observation microscopique de la biopsie "stade biopsie". Le "stade biopsie" est évalué sur coupes histologiques en utilisant une échelle d'évaluation des stades de maturité.

D'autres méthodes peuvent être envisagées pour évaluer ce "stade biopsie" à partir de coupes histologiques, telles que l'analyse de la constitution de la biopsie par traitement d'image (§ I-2-3-3), le classement des gamètes en différentes classes (§ 1-2-3-2), le calcul du diamètre moyen des ovocytes (§ 1-2-1-3) ou l'utilisation d'une échelle d'évaluation du stade de maturité par examen de la morphologie des ovocytes (§ 1-2-2-2).

Les méthodes d'observation des gamètes sur frottis (répartition des gamètes en différentes classes (§ 1-2-3-2), calcul du diamètre moyen des ovocytes (§1-2-1-3), évaluation du stade de maturité par examen morphologique des ovocytes (§ 1-2-2-2)) peuvent également être envisagées pour évaluer de façon beaucoup plus rapide le "stade biopsie" à partir d'un frottis de la biopsie.

L'évaluation reste toutefois plus précise lorsqu'elle est réalisée à partir de coupes histologiques de la biopsie .

L'évaluation d'un stade final de maturation peut également être envisagée en **combinant les résultats obtenus par une observation macroscopique de la gonade "stade macro" avec les résultats obtenus par l'observation microscopique de gamètes prélevés à l'aide d'une seringue introduite dans la gonade "stade ponction"**.

Le "stade ponction" peut être évalué en utilisant les méthodes d'observation des gamètes sur frottis (répartition des gamètes en différentes classes (§ 1-2-3-2), calcul du diamètre moyen des ovocytes (§1-2-1-3), évaluation du stade de maturité par examen morphologique des ovocytes (§ 1-2-2-2)).

Cependant, il est fort probable que les gamètes fortement accrochés à la paroi des acini (ce qui est le cas des gamètes en début de développement), ne soient pas prélevés lors de la ponction. L'évaluation se trouve alors biaisée. Toutefois, ce biais peut être diminué en augmentant le diamètre de l'aiguille utilisée pour le prélèvement, en restant bien sûr dans des conditions qui n'entraînent pas de lésions graves pour l'animal.

Les prélèvements par ponctions pourraient permettre de compléter la liste des critères d'évaluation des stades de maturité actuellement utilisés, par d'autres critères tels que la fertilité

des gamètes ou la mobilité des spermatozoïdes. Pour tester la fertilité, il est en effet possible, dans ce cas, de suivre la fécondation sous microscope

Enfin, des **dosages hormonaux** pourraient être envisagés pour évaluer le stade de maturité des animaux. En effet, certains auteurs ont pu mettre en évidence une corrélation entre le cycle de reproduction et l'activité sécrétrice de certaines hormones (Paulet *et al.*, 1993). Dans le cadre de nos recherches, il serait possible d'envisager un dosage sur une faible quantité d'hémolymphe prélevé dans l'animal. Cependant, les techniques actuelles ne permettent pas ce genre de dosage sur des quantités aussi faibles.

## 2-5) CONCLUSION

Cette approche expérimentale a permis d'apporter des réponses positives à certains problèmes posés par notre méthode d'évaluation de l'état de maturité des bivalves (examen macroscopique de la gonade couplé par un examen de coupes histologiques de biopsie de gonade). Nous avons en effet pu démontrer les points suivants:

- L'utilisation du chlorure de magnésium pour ouvrir les huîtres *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis* donne de très bons résultats. Ce produit peut également être utilisé pour débarrasser les huîtres des vers parasites du genre *Polydora*.
  
- Notre méthode d'évaluation de l'état de maturité des bivalves, n'entraîne aucune mortalité.
  
- Les biopsies prélevées à l'intérieur de la gonade sont de qualité satisfaisante pour permettre l'observation correcte sur coupe histologique de un à trois acini et la détermination précise du sexe.
  
- La qualité des résultats obtenus par cette méthode s'est avérée très satisfaisante dans le cadre de nos expériences et les biopsies ne semblent pas entraîner de perturbations importantes sur le développement ultérieur de la gonade. Cependant, ces résultats ont été obtenus à partir d'un échantillon dont le nombre d'individus était beaucoup trop faible pour pouvoir tirer des conclusions statistiquement significatives. Nous ne présentons donc ici qu'une approche pour de futurs sujets de recherche.

Cette méthode demande tout de même des manipulations relativement importantes et ne permet pas l'obtention immédiate des résultats (minimum 36 h).

Elle peut être conseillée pour des études expérimentales, pour déterminer de façon très précise le sexe des animaux, ou encore en écloserie pour contrôler l'homogénéité des stades de développement de la gonade dans les lots de géniteurs.

Certaines variantes de la méthode d'évaluation des stades de maturité des bivalves sans sacrifices que nous proposons, peuvent être envisagées. La biopsie peut en effet être remplacée par une ponction réalisée à l'aide d'une seringue et bien que les résultats soient moins précis, cette méthode permet une évaluation plus rapide du stade de maturité. De plus, la fertilité des gamètes peut être testée en suivant la fécondation sous le microscope, ainsi que la mobilité des spermatozoïdes.

L'activité sécrétrice de certaines hormones étant corrélée avec le cycle de reproduction, il est possible d'envisager une méthode de dosage hormonal sur des prélèvements d'hémolymphe pour évaluer l'état de maturité des bivalves. Cependant, les techniques actuelles ne permettent pas encore ce genre de dosage sur de faibles quantités d'hémolymphe et de plus, il est vraisemblable que pour un stade de maturité donné, le taux d'hormone soit soumis à des variations interindividuelles.

## CONCLUSION GENERALE

Notre étude bibliographique a montrée qu'il existait de nombreuses méthodes plus ou moins précises pour évaluer l'état de maturité des gonades des bivalves en s'appuyant sur des critères qualitatifs et/ou quantitatifs, mais la plupart d'entre elles nécessite le sacrifice d'animaux.

Les seules méthodes actuellement utilisées pour évaluer l'état de maturité sexuelle des bivalves sans sacrifice, n'apportent que des informations très approximatives sur l'état réel des gonades.

La méthode d'évaluation de l'état de maturité des bivalves sans sacrifice que nous proposons (évaluation d'un stade final de maturité à partir d'évaluations d'après observation macroscopique de la gonade et observation de coupes histologiques de biopsie de gonade), semble pouvoir donner de bons résultats.

L'approche expérimentale que nous avons réalisée a permis d'apporter des réponses positives à certains problèmes posés par cette méthode:

- l'utilisation du chlorure de magnésium pour ouvrir les huîtres *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis* donne de très bons résultats, ce produit pouvant également être utilisé pour débarrasser les huîtres des parasites du genre *Polydora*;

- cette méthode n'entraîne aucune mortalité;

- les biopsies prélevées à l'intérieur de la gonade sont de qualité satisfaisante pour permettre l'observation correcte sur coupe histologique de un à trois acini et déterminer précisément le sexe de l'animal;

- la qualité des résultats obtenus par cette méthode a été très satisfaisante dans le cadre de nos expériences. Des études complémentaires sont cependant nécessaires pour tester statistiquement son efficacité.

Cependant, cette méthode nécessite des manipulations relativement importantes et les résultats ne peuvent être obtenus qu'après un délai de 36 heures. De plus, les biopsies sont délicates à effectuer lorsque l'animal présente une gonade peu développée. Du fait de ses contraintes, son utilisation pourrait être réservée dans le cadre d'une écloserie pour contrôler l'homogénéité de l'état de maturité des géniteurs à l'intérieur d'un même lot en cours de maturation, ou pour déterminer de façon très précise le sexe des animaux.

Il est possibles d'envisager d'autres méthodes plus rapides basées sur le même principe, mais pour lesquelles les observations histologiques de la biopsie seraient remplacées par des observations sur frottis.

Une autre méthode dans laquelle la biopsie serait remplacée par une ponction pourrait également permettre l'obtention rapide de résultats et être effectuée aisément à tous les stades de développement de la gonade. La méthode utilisant l'histologie reste cependant plus précise au niveau des résultats.



## BIBLIOGRAPHIE

- Barber, B.J. & Blake, N.J., 1983.** Growth and reproduction of the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck) at its southern distributional limit. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 66: 247-256.
- 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 pp.
- 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.
- Carazzi, D., 1893.** Revisione del gener *Polydora* Bosc e cenni su due specie che vivono sulle ostriche. *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, 11: 4-45. *Cité par Catherine et al. Op. Cit.*
- Catherine, M., Blateau, D., Mazurié, J. & Le Bec, C., 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.
- Choi, K.-S., Powell, E.N., Lewis, D.H. & Ray, S.M., 1994.** Instantaneous reproductive effort in female american oysters, *Crassostrea virginica*, measured by a new immunoprecipitation assay. *Biol. Bull.*, 186: 41-61.
- Coatanea, D., Vercelli, C., Chabiran, J.-M. & Oheix, J., 1994.** Contrôle de la maturation et du calendrier d'émissions larvaires d'un stock de géniteurs d'huîtres plates *Ostrea edulis* méditerranéennes. *Rapp. intermédiaire de convention IFREMER/Région Languedoc Rousillon, Palavas, (FRANCE)*, 57 pp.
- Cochard, J.-C. & Devauchelle, N., 1993.** Spawning, fecundity and larval survival and growth in relation to controlled conditioning in native and transplanted populations of *Pecten maximus* (L.): evidence for the existence of separate stocks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 0: 1-16.
- Culloty, S.C. & Mulcahi, M.F., 1992.** An evaluation of anaesthetics for *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture*, 107: 249-252.
- Devauchelle, N., 1985.** Identification du sexe et prélèvements d'ovocytes sur turbots (*Scophthalmus maximus*) vivants. *Bull. Fr. Pisc.*, 293/294: 65-71.

- Devauchelle, N. & Mingant, C., 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 pp.
- Gabe, M., 1968.** Techniques histologiques. *Masson et cie., Paris*, 113 pp.
- Galtsoff, P.S., 1964.** The american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *U.S. Fish. Wildl. Serv., Fish. Bull.*, 64: 480 pp.
- Guillou, J. & Tartu, C., 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. & Menzel, R.W., 1981.** The reproductive cycle of early setting *Crassostrea virginica* (Gmelin) in the northern gulf of Mexico, and its implications for population recruitment. *Biol. Bull.*, 160: 80-88.
- Heffernan, P.B. & Walker, R.L., 1989.** Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. *J. Moll. Stud.*, 55: 135-137.
- Heffernan, P.B., Walker, R.L. & Carr, J.L., 1988.** The reproductive cycle of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in Wassaw Sound, Georgia. *Nat. Shellfisheries Ass., Abstracts Annual Meeting, June 25-30, New Orleans, Louisiana*, 208-209.
- His, E., 1976.** Contribution à l'étude biologique de l'huître dans le bassin d'Arcachon. Activité valvaire de *Crassostrea angulata* et de *Crassostrea gigas*; application à l'étude de la reproduction de l'huître japonaise. *Thèse Université de Bordeaux I, (FRANCE)*, 63 pp.
- Jones, H.A., Simpson, R.D. & Humphrey, C.L., 1986.** The reproductive cycles and glochidia of fresh-water mussels (bivalvia: hydriidae) of the Macleay river, northern New South Wales, Australia. *Malacologia*, 27 (1): 185-202.
- Kennedy, V.S. & Krantz, L.B., 1982.** Comparative gametogenic and spawning patterns of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) in central Chesapeake bay. *J. Shellfish Res.*, 2 (2): 133-140.
- Lannan, J.E., Robinson, A. & Breese, W.P., 1980.** Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture*, 21: 337-345.
- Laruelle, F., Guillou, J. & Paulet, Y.-M., 1994.** Reproductive pattern of clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 74: 351-366.
- Le Dantec, J., 1968.** Ecologie et reproduction de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lamarck) dans le bassin d'Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 32 (3): 237-362.
- 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., Moore, M.N. & Bayne, B.L., 1982.** Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L.. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 62: 133-145.
- Lubet, P., 1959.** Recherches sur le cycle et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (Mollusques bivalves). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 23 (4): 548 pp.
- Lubet, P., Mathieu, M. & Lenoir, F., 1987.** Contrôle endocrinien de la reproduction chez les mollusques bivalves. *Océanis*, 13 (3): 291-304.
- Lucas, A., 1965.** Recherche sur la sexualité des mollusques bivalves. *Thèse Université de Rennes, (FRANCE)*, 135 pp.
- 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. & Ansell, A.D., 1988.** Srereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Mar. Biol.*, 97: 355-364.
- Neudecker, T., 1980.** Sex determination and maturation of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) of the german coast. *Publ. Eur. Maricult. Soc.*, 249-254.
- Paulet, Y.-M. & Boucher, J., 1991.** Is reproduction mainly regulated by temperature or photoperiod in *Pecten maximus*? *Inv. Reprod. Dev.*, 19 (1): 61-70.
- Paulet, Y.-M., Donval, A. & Bekhadra, F, 1993.** Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. *Inv. Reprod. Dev.*, 23 (2-3): 89-94.
- Paulet, Y.-M., Dorange, G., Cochard, J.-C. & Le Pennec, M., 1992.** Reproduction et recrutement chez *Pecten maximus* L.. *Ann. Inst. Océanogr., Paris*, 68 (1-2): 45-64.
- Peterson, C.H. & Fegley, S.R., 1986.** Seasonal allocation of resources to growth of shell, soma, and gonads in *Mercenaria mercenaria*. *Bioll. Bull.*, 171: 597-610.
- Petit, H., 1978.** Recherche sur des séquences d'évènements périostracaux lors de l'élaboration de la coquille d'*Amblema plicata perlicata* Conrad (1834). *Université de Bretagne Occidentale, (FRANCE)*, 186 pp.
- Robert, R., Miner, P., Mazuret, M. & Connan, J.-P., 1994.** Ecloserie expérimentale de mollusques d'Argenton, bilan et perspective. *Equinoxe*, 49: 20-33.
- Roughley, T.C., 1925.** The story of the oysters. *Aust. Mus. Mag.*, 2: 1-32. *Cité par Catherine et al., op. Cit.*

- Shelley, C.C. & Reid, R.G.B., 1988.** An improved gonad biopsy technique for *Hippopus hippopus*. In: COPLAND, J.W. & LUCAS, J.S. (ed). Giant clams in Asia and the Pacific. *Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra*, 95-97.
- 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 pp.
- Whitelegge, T., 1890.** Report on the worm disease affecting the oysters on the coast of New South Wales. *Rec. Aust. Mus.*, 1: 41-54. *Cité par Catherine et al., op. cit.*.
- Wilson, J.H. & Simons, J., 1985.** Gametogenesis and breeding of *Ostrea edulis* on the west coast of Ireland. *Aquaculture*, 46: 307-321.
- Wilson, J.H., 1987.** Spawning of *Pecten maximus* (Pectinidae) and the artificial collection of juveniles in two bays in the west of Ireland. *Aquaculture*, 61: 99-111.