

LA DENSITE, UN CRITERE DE QUALITE APPLICABLE EN ECLOSERIE AUX EMBRYONS DE *PECTEN MAXIMUS* (MOLLUSQUE BIVALVE)

FAURE C.¹, DEVAUCHELLE N.¹ et DORANGE G.²

laboratoire Mollusques PMDC, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 PLOUZANE

²*Laboratoire de Biologie Marine, Faculté des Sciences, 29287 BREST Cedex*

RESUME : La qualité des embryons de *Pecten maximus*, apparaît très variable en éclosion, ce qui se répercute sur les élevages larvaires. Cette variabilité dépend des qualités intrinsèques des reproducteurs mais aussi des méthodes de conditionnement et de ponte. En éclosion, il est souhaitable de disposer d'un test simple, permettant de juger rapidement de la qualité globale d'une ponte. La mesure de densité des embryons, évaluée à partir de centrifugations isopycniques sur gradient de percoll préformé semble répondre à cet objectif. En effet, les embryons de deux heures se répartissent en trois strates lors d'une centrifugation, à des densités de 1,018 à 1,075. La strate intermédiaire, est constituée des embryons les plus compétents à se développer. L'épaisseur relative de cette strate intermédiaire est corrélée à la survie des larves à 2, 9 et 16 jours ainsi qu'à la croissance entre 2 et 23 jours et constitue donc un bon indicateur de la qualité des pontes.

Mots clés : embryon, *Pecten maximus*, gradient densité, qualité

THE DENSITY, AN INDICATOR OF QUALITY APPLICABLE IN HATCHERIES FOR THE *PECTEN MAXIMUS* EMBRYOS

ABSTRACT : *The quality of the scallop embryos is determined by the spawners characteristics as well as by the external factors they support during the maturation and the spawning phases. All these parameters are not still well controlled during the artificial conditioning in the hatcheries. As a consequence, the quality of the embryos is drastically variable and with them, the larval performances in terms of survival and growth rates. It would be interesting to get a simple and quick test which would allow the estimation of the spawns quality. The embryos density, evaluated by isopycnic centrifugation of percoll medium, is well adapted to this objective. Actually, a centrifugation of embryos two hours after fertilization separates them in 3 stratum with their density ranging from 1,018 to 1,075. The medium stratum contains the best embryos. The relative thickness of this medium stratum is positively correlated with the larvae survival at day 2, 9 and 16, and with the larvae growth between day 2 and day 23. That is why the thickness of this medium stratum is a good indicator of the quality of the spawning.*

Keywords : embryo, *Pecten maximus*, density stratum, quality

I INTRODUCTION.

La coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus* L., est un Mollusque Bivalve de haut intérêt commercial en France. La diminution des stocks naturels de cette espèce a conduit à sa production en éclosérie pour tenter d'assurer le repeuplement des zones surexploitées (Boucher et Dao, 1989). Cependant, une forte variabilité des performances d'élevages larvaires menés en éclosérie peut être mise en évidence. L'action de deux types de facteurs (intrinsèques et extrinsèques) se répercute sur les caractéristiques de ponte : rythme, fécondité et qualité des gamètes émis puis des embryons ou larves (Cochard et Devauchelle, sous presse ; Devauchelle et Mingant, sous presse). La qualité des gamètes, quant à elle, a un impact sur le développement larvaire et le recrutement. Néanmoins, ces facteurs ne sont pas tous contrôlés actuellement. Par ailleurs, l'obtention de gamètes de coquille Saint-Jacques en éclosérie nécessite une stimulation artificielle des géniteurs qui selon le moment de la gamétogenèse auquel elle intervient, introduit une source supplémentaire de variabilité dans la qualité des ovocytes (Dorange, 1989).

Dans l'attente d'un meilleur contrôle de la maturation et de la ponte par le biais d'une amélioration du conditionnement des géniteurs, il est nécessaire pour les écloséries de disposer d'un indicateur de qualité des ovocytes. Des recherches antérieures de critères de qualité des ovocytes de Bivalves ont porté sur les relations entre les performances des élevages larvaires et la charge lipidique des gamètes femelles appréciée par coloration vitale (Gallager et al., 1986) ou par cytochimie couplée à l'analyse d'image (Paulet et Dorange, 1988 ; Dorange et al., 1989 ; Gueguen, 1989 ; Le Pennée et al., sous presse). L'objectif de notre travail a été de tenter de mettre au point un test simple, rapide, applicable directement en éclosérie permettant de juger de la qualité globale d'une ponte donc de prédire la réussite de l'élevage larvaire. Le critère que nous avons retenu est la densité des embryons deux heures après fécondation.

II MATERIEL ET METHODES.

Des reproducteurs de deux origines géographiques (rade de Brest et Baie de Saint-Brieuc), conditionnés ou non conditionnés, ont été stimulés thermiquement pour déclencher l'émission des gamètes. Deux heures après fécondation croisée, un million d'embryons ont été prélevés sur tamis de 20 μm et déposés à la surface d'un gradient de percoll préformé. La préformation a été effectuée par centrifugation à 30 000 g pendant vingt minutes. Le milieu était constitué de 66 % d'eau de mer filtrée à 1 μm et de 3[^] % d'une solution mère contenant 9 volumes de percoll pur pour un volume d'eau de mer filtrée à 1 μm . L'ensemble embryons-percoll préformé a été centrifugé à 3000 g pendant vingt minutes, permettant la migration des embryons à leur densité propre.

Des embryons ont été prélevés dans le gradient de percoll à chaque niveau après stabilisation pour une observation en microscopie photonique directe d'une part et pour un examen sur coupes semi-fines d'autre part. Les embryons destinés à l'examen sur coupes semi-fines ont été concentrés par centrifugation à 50 g pendant quinze minutes et ont subi une double fixation glutaraldéhyde 2,5 % puis tetroxyde d'osmium 1 % en tampon cacodylate 0,2 M pH 7,2 (ajusté à 1300 mOsmoles par NaCl). Après déshydratation, ils ont été inclus en résine de Spurr (1969). Les coupes semi-fines de 1 μm d'épaisseur ont été colorées au bleu de toluidine.

En parallèle, des aliquotes de même origine que les embryons centrifugés sur percoll ont été mis directement en élevage en eau de mer stagnante filtrée à 1 µm. L'élevage a fait l'objet d'un suivi régulier de la **survie** et de la **croissance** à 2, 9, 16 et 23 jours.

Des relations statistiques ont été recherchées entre l'épaisseur relative des bandes (= couches) d'embryons dans le percoll et les paramètres de l'élevage, au moyen de tests de régression et de F-tests. L'épaisseur relative d'une bande est définie comme le rapport entre son épaisseur et celle de toutes les bandes cumulées.

III RESULTATS.

1. Centrifugation isopycnique sur gradient de percoll.

Les expériences montrent que quelle que soit la ponte, les embryons se répartissent en plusieurs couches sur le gradient (tableau 1). L'examen direct et l'observation des coupes semi-fines (rendue difficile par la présence de stries dues à la silice résiduelle constitutive du percoll) permettent en fait de les regrouper en trois strates principales (tableau 1) :

- une strate supérieure de densité 1,018 à 1,035.
- une strate intermédiaire de densité 1,035 à 1,051, pouvant même parfois exceptionnellement se prolonger jusqu'à 1,062 dans le cas des meilleures pontes (tableau 1, ponte n°1, coquille 3)>
- une strate de densité 1,050 à 1,075. remontant parfois vers des densités plus faibles dans le cas des plus mauvaises pontes (tabl.1 : ponte n°1, coquille 1 ; ponte n°2, coquille 6).

La **strate supérieure** (de densité 1,018 à 1,035). apparaît constituée de une à trois couches de débris cellulaires, d'enveloppes vitellines, ou d'ovocytes altérés à des degrés variables (pl.1, ph.1, ph.2 et ph.3).

La **couche de surface** de densité peu élevée, renferme les débris de la lyse ovocytaire : enveloppes et quelques organites cellulaires (pl.1, ph.1). Dans la **bande sous-jacente**, des ovocytes atrésiés au contenu anormalement clair sont présents (pl.1, ph.2), mais le stade de dégénérescence est moins avancé que dans la couche précédente. Dans la **couche de plus haute densité**, seul un début d'atrésie est visible (pl.1, ph.3).

La **strate intermédiaire** (intervalle de densité 1,035 à 1,051), contient des embryons d'aspect globalement normal (pl.1, ph.4).

La **subdivision en couches** de cette strate est due essentiellement à un stade de développement embryonnaire plus ou moins évolué. Les embryons les plus développés apparaissent aux densités plus élevées. Une réserve doit cependant être faite concernant la définition des limites de cette strate intermédiaire : dans le cas de la coquille 1 de la ponte n°1 (tableau 1), toutes les couches de la strate ne contenaient pas forcément des embryons viables. L'observation en microscopie photonique a en effet montré qu'une couche d'embryons anormaux était présente. Il apparaît donc nécessaire de coupler le calcul des épaisseurs relatives à l'observation de l'état des embryons au microscope photonique. Toutefois, ces bandes qui pourraient prêter à confusion, sont d'épaisseur très faible, ce qui minimise l'erreur, La **strate inférieure** (densité 1,050-1,075), est constituée d'ovocytes qui semblent être, sur les coupes semi-fines, de plus petite taille, hypercolorables, rétractés, parfois altérés (pl.1, ph.5). Ces ovocytes, également repérés par examen direct, ont été mesurés. Une vérification statistique sur 60 échantillons a confirmé leur taille ($33.0 \mu\text{m} \pm 3.5$)

PLANCHE 1.

Photos 1-5 : coupes semi-fines (colorées au bleu de toluidine) des prélèvements provenant des strates (et couches) du gradient de percoll.

Echelle : 50 μ m.

Photo 1, 2 et 3 : strate supérieure (1,018 à 1,035).

Photo 1 : couche P1 (la plus haute dans le tube). On note la présence d'innombrables enveloppes ovocytaires "nues" (\Rightarrow). Quelques ovocytes très altérés sont aussi présents (Oly).

Photo 2 : couche P2 sous-jacente. Des enveloppes "nues" sont encore visibles (\Rightarrow). Mais ce sont essentiellement des ovocytes atrésiés qui sont observés (Oly).

Photo 3 : couche P3 (couche de la strate supérieure la plus profonde). Quelques débris sont encore visibles (\Rightarrow). Les ovocytes (Oly) sont altérés mais le stade de dégénérescence est moins évolué que dans la couche P2.

Photo h : strate intermédiaire (1,035 à 1,051). Jeunes embryons d'aspect normal. On notera cependant la dilatation des espaces intercellulaires (\rightarrow).

Photo 5 : strate inférieure (1,050 à 1,075) essentiellement constituée de petits ovocytes rétractés (*).

Photos 6-8 : anomalies observées sur les coupes semi-fines.

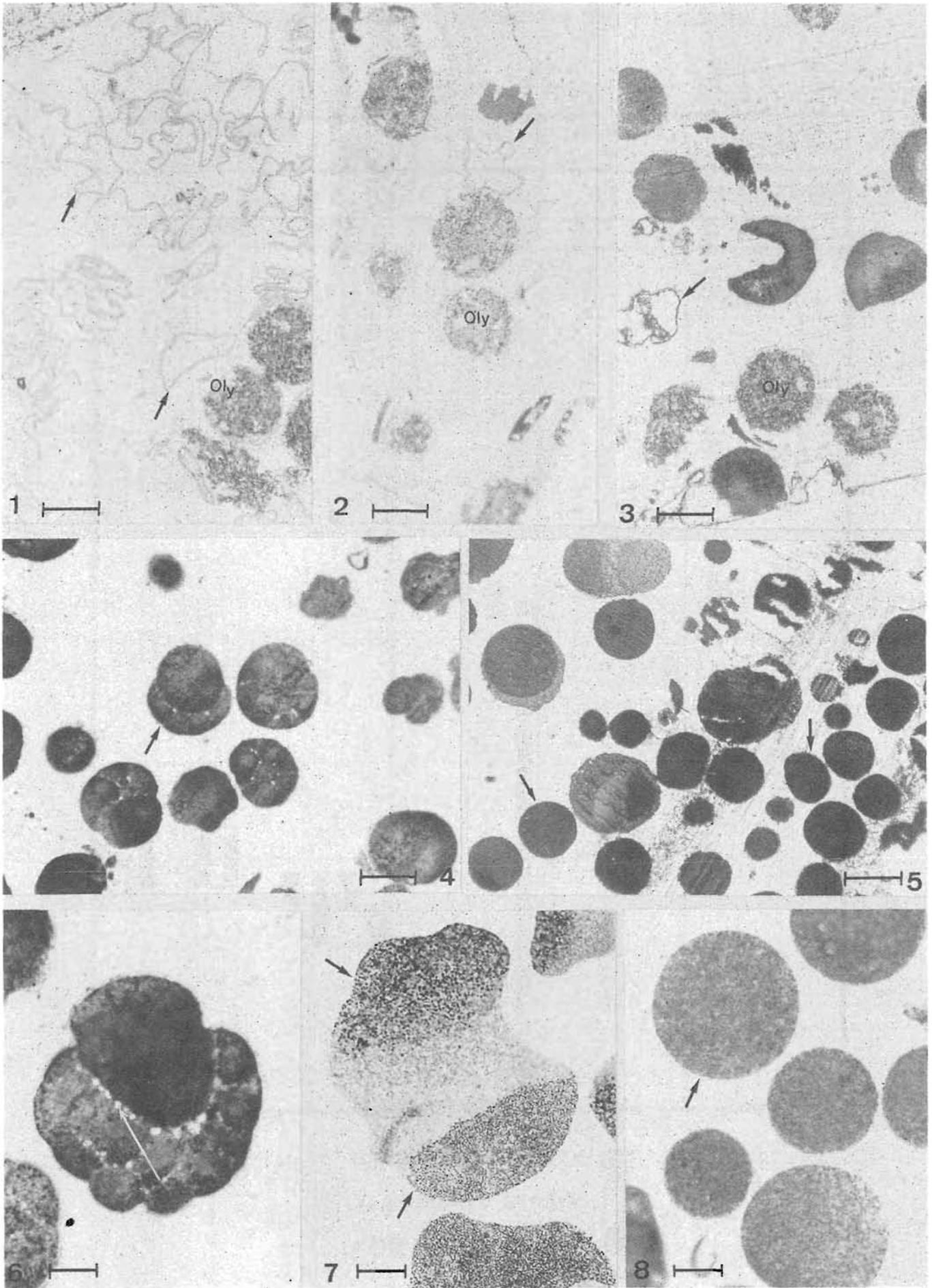
Echelle : 20 μ m.

Photo 6 : embryon dont les espaces intercellulaires sont anormalement dilatés (*).

Photo 7 : embryon au contenu anormalement polarisé (\Rightarrow).

Photo 8 : ovocytes rétractés dépourvus d'enveloppe (\rightarrow).

PLANCHE I



inférieure à celle des ovocytes présents dans la strate intermédiaire (67,5 um i 4,7).

Dans tous les cas étudiés, les couches apparaissent constituées d'embryons de qualité croissante (dont les caractéristiques cytologiques s'améliorent) au fur et à mesure que l'on descend dans le tube vers de hauts niveaux de densité, à l'exception cependant de la couche la plus profonde.

Cependant, l'examen des coupes semi-fines des "bonnes strates" révèlent des images anormales d'embryons :

- au contenu polarisé (pl.1, ph.7),
- dont les espaces intercellulaires sont dilatés (pl.1, ph.4 et ph.6),
- parfois dépourvus d'enveloppes (pl.1, ph.5 et ph.8).

2. Elevages larvaires.

Les taux de survie et la croissance (figurant en abscisse des graphes 1, 2, 3 et 4) apparaissent très variables en fonction des dates de ponte et en fonction des individus pour une ponte donnée. Cela était d'ailleurs souhaité dans le cadre de ce travail.

^ . Relations entre les résultats de la centrifugation isopycnique sur gradient de percoll préformé et les paramètres d'élevage.

Une régression logarithmique a été calculée entre l'épaisseur relative de la strate intermédiaire contenant des embryons d'apparence normale et la survie à **deux jours** (taux d'éclosion) :

Epaisseur relative = a log (Taux d'éclosion) + b

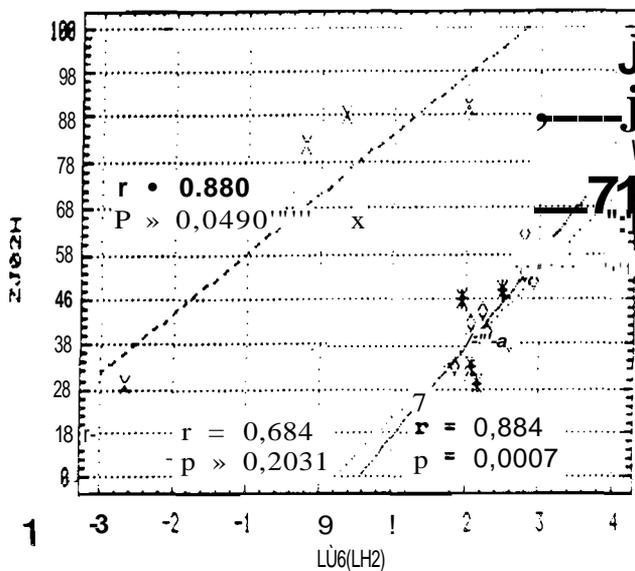
Les coefficients de corrélation (0,880, 0,684 et 0,884 respectivement pour la ponte n°1, n°2, et n°3) sont significatifs et les probabilités d'erreurs (0,0490, 0,2031 et 0,0007) sont minimales (graphe 1).

Une ponte dont le taux d'éclosion est élevé (tableau 1, coquille 10, ponte 2 par exemple), est caractérisée par une épaisseur importante de la strate intermédiaire (densité 1,035~1,051) tandis que la strate supérieure (de 1,018 à 1,035) et celle du fond (de 1,050 à 1,075) sont de faible épaisseur.

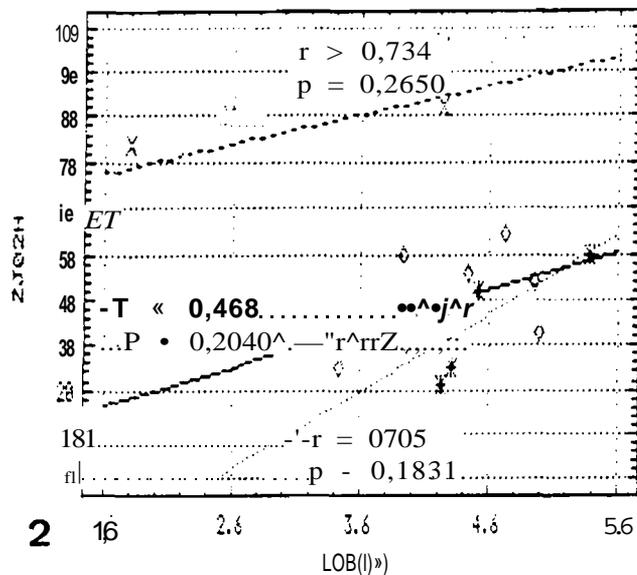
Au contraire, pour une mauvaise ponte (tableau 1, coquille 6, ponte 2), l'épaisseur relative de la strate intermédiaire (1,035-1,051) est faible alors que celle de la strate supérieure (1,018-1,035), par ailleurs constituée dans ce cas de plusieurs sous-couches, est forte.

Les relations entre l'épaisseur relative de la strate intermédiaire et les taux de survie des larves à **9 et 16 jours** sont elles aussi significatives. Les coefficients de corrélation sont cependant inférieurs à ceux obtenus le deuxième jour (graphes 2 et 3). Us sont surtout plus variables d'une ponte à l'autre : par exemple pour la ponte n°3 la relation n'est pas significative (coefficient de régression = 0,468). Dans tous les cas, la corrélation est toutefois meilleure **au seizième jour** qu'**au neuvième jour**, de manière inattendue. L'origine de ces phénomènes n'a pu être expliquée.

Une relation inverse significative apparaît entre l'épaisseur de la strate intermédiaire et la croissance des larves **entre 2 et 23 jours** (graphe 4). La variabilité inter-pontes est toutefois élevée : la relation est très significative pour la ponte n°1 (coefficient de régression (r) = -0,916), elle l'est un peu moins pour la ponte n°2 (r = -0,800) et n'existe pas pour



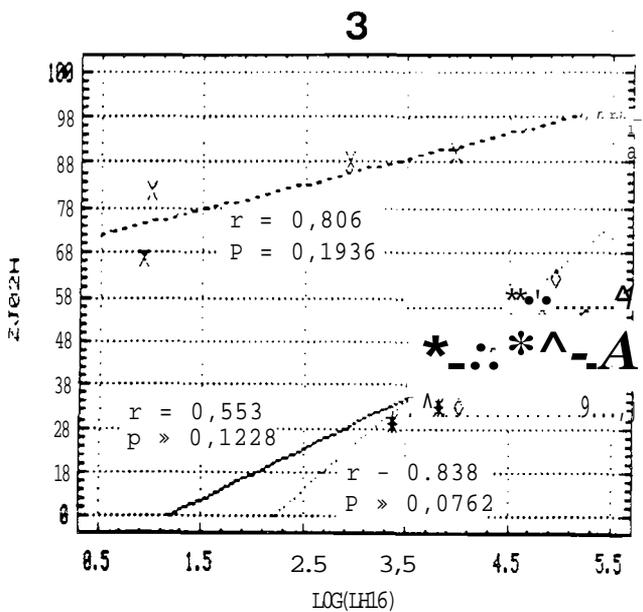
1



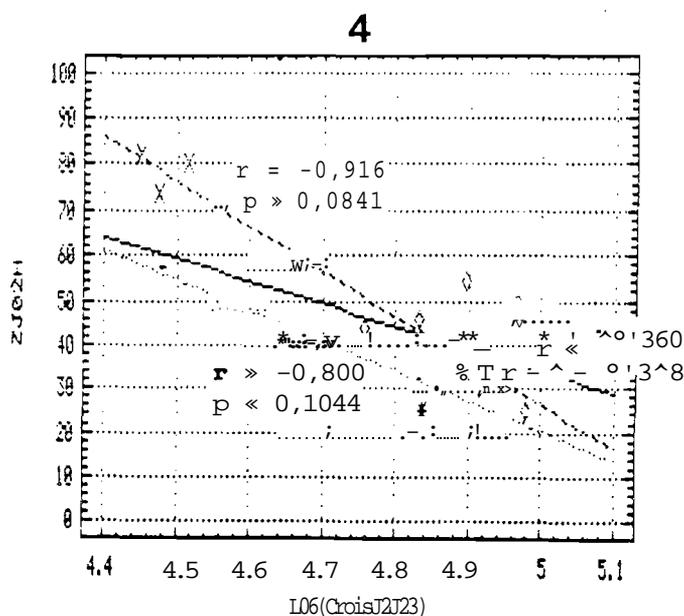
2

GRAPHE 1. Régression entre l'épaisseur de la strate intermédiaire (ZJ02H) et le taux de survie des larves normales à 2 Jours (LN2).

GRAPHE 2. Régression entre l'épaisseur relative de la strate intermédiaire (ZJ02H) et le taux de survie des larves normales à 9 jours (LN9).



3



4

GRAPHE 3. Régression entre l'épaisseur relative de la strate intermédiaire (ZJ02H) et le taux de survie des larves normales à 16 jours (LN16).

GRAPHE 4. Régression entre l'épaisseur relative de la strate intermédiaire (ZJ02H) et la croissance des larves entre 2 et 23 jours (CrJ2J23).

Ponte n°1	-----	x	19 Harm 1990
Ponte n°2	y	08 Avril 1990
Ponte n°3	-----	^	16 Mal 1990
r - coefficient de corrélation			
p - probabilité d'erreur			

la ponte n°3 ($r = -0,360$). Pour les pontes n°1 et n°2, les ajustements sont fiables statistiquement. Cette corrélation inverse traduit une excellente survie des larves provenant de pontes de bonne qualité dont la croissance est cependant freinée compte tenu de leur forte concentration dans les béchers. Il s'agit donc d'une relation indirecte entre croissance et densité.

Aucune corrélation n'est mise en évidence entre l'épaisseur des strates d'embryons dans le percoll et les taux d'anomalies larvaires.

IV DISCUSSION ET CONCLUSION.

Il n'existe pas, à notre connaissance, d'expérience équivalente sur cette espèce ou sur d'autres espèces de Bivalves permettant de disposer d'éléments de comparaison pour les relations établies au cours de ce travail. Mais ces relations (corrélation entre épaisseur des strates et réussite des élevages) peuvent logiquement s'expliquer par l'état de maturité variable des ovocytes au moment de l'émission (immaturité, maturité, ou surmaturité) et dépendent probablement de la composition chimique des embryons et/ou de l'état de leur enveloppe vitelline, dont la fragilité peut d'ailleurs être révélée par la centrifugation. Chez les poissons marins, ce type de relations est aussi soupçonné (Devauchelle et al., 1988). Des études complémentaires, d'ordre biochimique notamment, s'avèrent nécessaires pour expliquer les différences de densité des embryons.

Le test sur gradient de percoll paraît être un bon indicateur de la qualité des pontes : l'épaisseur relative de la strate intermédiaire (densité 1,035 à 1,051) contenant des embryons d'apparence normale permet de prédire la réussite d'un élevage.

Cette technique possède de nombreux avantages. Elle est facile à mettre en oeuvre en éclosérie. Les gradients de percoll précentrifugés peuvent être conservés plusieurs mois et le matériel nécessaire n'est pas extrêmement sophistiqué. Bien que le percoll pur soit un produit coûteux, il faut mettre en regard son prix de revient avec celui de la main d'oeuvre et du matériel nécessaire à un élevage mené au minimum pendant deux jours. En effet, dans les écloséries, cette durée est nécessaire pour apprécier à posteriori la qualité d'une ponte, et pour prendre la décision d'arrêter ou de poursuivre un élevage. Le test sur percoll réduit le temps de décision à trois heures. Pour valider le test, les expériences doivent cependant être répétées et devront être réalisées avec des pools d'embryons issus de plusieurs géniteurs afin de se placer dans les conditions réelles d'élevage en écloséries industrielles. Dans certaines expériences destinées à juger de l'effet sur les gamètes d'un traitement appliqué aux reproducteurs, cette technique pourrait avantageusement remplacer les élevages larvaires. Le test sur gradient de percoll pourrait également être utilisé pour trier des spermatozoïdes et des ovocytes destinés à la fertilisation ou des embryons à fort potentiel de développement à mettre en élevage, chez *Pecten maximus* ou chez d'autres espèces. Une technique similaire est d'ailleurs employée pour la purification des gamètes mâles humains dans le domaine de l'insémination artificielle (Lessley et Garner, 1983 ; Dravland et Mortimer, 1985 ; Kaneko et al., 1986 ; Le Lannou et Blanchard, 1988 ; Tambaichitr et al., 1988 ; Junca, 1990). Dans ce cas, une amélioration des techniques de centrifugation (paramètres de centrifugation et osmolarité du milieu employé) s'impose (Devauchelle et al., en préparation) car les observations sur coupes semi-fines ont révélé des problèmes

vraisemblablement liés aux conditions de centrifugation (dilatation, polarisation, absence d'enveloppe vitelline).

BOUCHER, J., DAO, J.C., 1989. Repeuplement et forçage du recrutement de la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*). IN : "L'homme et les écosystèmes halieutiques et aquacoles marins", éd. J.P. TROADEC : 312-359-
COCHARD, J.C., DEVAUCHELLE, N., (sous presse). Controlled reproduction in hatchery of five *Pecten maximus* batches, from différent origin.

DEVAUCHELLE, N., ALEXANDRE, J.C., LE CORRE, N., LETTY, Y., 1988. Spawning of Turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. *Aquaculture*, 69 : 159-184.

DEVAUCHELLE, N., MINGANT, C., (sous presse). The intensive aquaculture of the scallop (*Pecten maximus* L.) : research status on the reproductive physiology.

DEVAUCHELLE, N., FAURE, C., DORANGE, G., (en préparation). Présentation d'une technique de séparation des gamètes ou des embryons de coquille Saint-Jacques.

DORANGE, G., 1989- Les gamètes de *Pecten maximus* L. (Mollusca, Bivalvia). Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Vol.I : 140 p, Vol.II : 33 planches.

DORANGE, G., PAULET, Y.M., LE PENNEC, M., COCHARD, J.C., 1989. Critères histologiques d'évaluation de la qualité des ovocytes émis par *Pecten maximus* (Mollusque Bivalve). *CE. Acad. Sci. Paris*, 309 (Série III) : 113-120.

DRAVLAND, J.E., MORTIMER, D., 1985. A simple discontinuous Percoll gradient procedure for washing human spermatozoa. *IRCS Med. sci.*, 13 : 16-17.

GALLAGER, S.M., MANN, R., SASAKI, G.C., 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture*, 56 : 81-103.

GUEGUEN, F., 1989. Contenu lipidique et compétence des ovocytes émis chez *Pecten maximus* L. Rapport de D.E.A., Université de Bretagne Occidentale : 30 p.

JUNCA, A.M., 1990. Les techniques d'amélioration du sperme humain en vue de procréations médicalement assistées. *Contraception-fertilité-sexualité*, 18(1) : 15-24.

KANEKO, S., OSHIO, S., KOBANAWA, K., MOHRI, H., IIZUKA, R., 1986. Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an innercolumn. *Biol. Eepr.*, 35 : 1059-1063.

LE LANNOU, D., BLANCHARD, Y., 1988. Nuclear maturity and morphology of human sperm selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J. Eepr. Fert.*, 84 : 551-556.

LE PENNEC, M., GUEGUEN, F., COCHARD, J.C., PAULET, Y. M., DORANGE, G. Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* (Mollusque Bivalve) et les performances des larves en élevage. *Haliotis*, 20, sous presse.

LESSLEY, B.A., GARNER, D.L., 1983. Isolation of motile spermatozoa by density centrifugation in Percoll. *Gamète. Ees.*, 7 : 49-61.

PAULET, Y.M., DORANGE, G., 1988. Etude du contenu lipidique des ovocytes émis de *Pecten maximus* L. Rapport scientifique. Contrat universitaire N° : 87-2.511035- P.N.D.R. Université de Bretagne Occidentale : 23 p.

SPURR, A.R., 1969. Low viscosity-epoxy-resine embedding for électron microscopy. *J. Vltrastruct. Res.*, 26 : 31-43-

TAMPHAICHITR, N., MILLETTE, CF., AGULNICK, A., FITZGERALD, L.M., 1988. Egg-penetration ability and structural properties of human sperm prepared by percoll-gradient centrifugation. *Gamète research*, 20 : 67-81.