

Découvrez un ensemble de documents, scientifiques ou techniques,
dans la base Archimer : <http://www.ifremer.fr/docelec/>

ifremer

S. Pouvreau^{1*}, A. Davenel², S. Quellec², M. Rambeau³

Projet Jeunes Chercheurs Rapport d'Avancement 2002-2003

Évaluation des potentialités de l'IRM pour la recherche sur la Physiologie des Bivalves

Premiers résultats anatomiques et perspectives

1 IFREMER- Laboratoire de Physiologie des Mollusques Marins
Station Expérimentale d'Argenton
Presqu'île du Vivier
29840 Argenton en Landunvez
E-Mail : Stephane.Pouvreau@ifremer.fr

2 CEMAGREF
Unité de Recherche « Technologies des Équipements Agro-alimentaires »
17, avenue de Cueille
35044 Rennes Cedex

3 Association pour les Technologies
Nouvelles en Radiologie
Département de Radiologie et Imagerie
Médicale - Hôpital Sud
16, bd de Bulgarie BP 90347
35203 Rennes cedex 2

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier sincèrement :

Messieurs Maurice Héral (Directeur Scientifique de l'IFREMER) et Philippe Jacques Hatt (Direction Scientifique Adjoint de l'IFREMER) pour avoir contribué à la réalisation de ces travaux en accordant un financement "Jeune Chercheur" sur ce sujet à l'auteur.

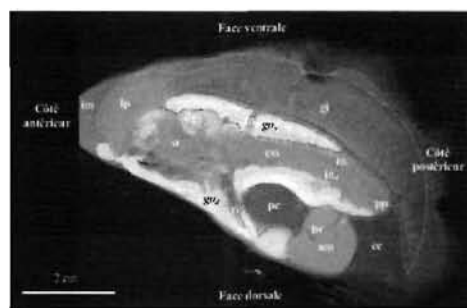
Dr Jean Claude Cochard (Responsable du laboratoire de Physiologie des Mollusques Marins, DRV/RA/LPI, Ifremer Centre de Brest) pour avoir permis la réalisation concrète des travaux.

Dr René Robert (Laboratoire de Physiologie des Mollusques Marins, DRV/RA/LPI, Ifremer Station Expérimentale d'Argenton) d'avoir faciliter la prise de contact avec le Docteur Marc Rambeau.

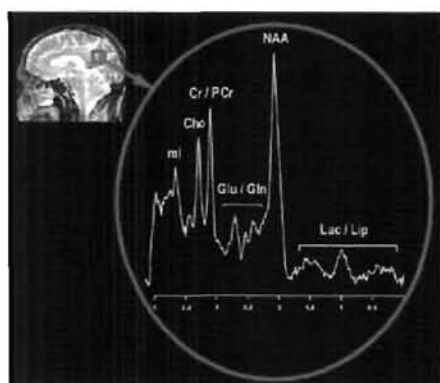
Résumé

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est de plus en plus utilisée en biologie et l'apparition de plate-formes (Rennes, Strasbourg, Marseille...) d'imagerie et de spectroscopie structurale et/ou métabolique (IRM/SRM) dédié au petit animal montre l'engouement récent pour ces techniques d'investigation.

Pourtant, à ce jour et à notre connaissance, aucune approche de ce style n'a été développée chez les mollusques marins, *a fortiori* chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. De part son importance économique, ce mollusque bivalve fait l'objet de nombreuses recherches en physiologie, au point de devenir, à l'IFREMER, un modèle biologique chez les invertébrés marins. Néanmoins, la plupart des méthodologies développées pour l'étudier sont destructives, ce qui (1) empêche la réalisation de suivi individuel, (2) limite voire interdit notre compréhension de certains processus biologiques et (3) nécessite la mise en place et l'entretien de population expérimentale aux coûts élevés. En terme d'innovation technologique, il nous a semblé nécessaire de réaliser une première expertise technologique des potentialités de l'IRM. Ce rapport présente donc les premiers résultats en matière d'imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire obtenus sur l'huître creuse. Il constitue une synthèse des travaux menés en collaboration avec deux équipes rennaises (CEMAGREF et CHU) depuis 2002 et démontre clairement la faisabilité et l'intérêt **exceptionnel** de cette technique pour l'étude de la physiologie de l'huître creuse.



Imagerie morphologique et biométrie non invasive chez l'huître (Coupe sagittale, IRM 1.5 T). Le bio-volume des principaux organes peut être calculé...



Imagerie fonctionnelle ou métabolique non invasive, imaginons les perspectives en terme de physiologie *in vivo* ...

Ce rapport ne présente que des résultats **d'imagerie morphologique et paramétrique**. Ces résultats constituent une base de travail mais sont probablement **anecdotiques** par rapport aux potentialités de **l'imagerie fonctionnelle (ou métabolique) *in vivo***. Nous proposons que cette approche fasse l'objet de prochains travaux en 2004-2005. Par ailleurs, nous avons utilisé des IRM bas et moyen champ (0.2 T et 1.5 T). Une expertise des potentialités d'un **IRM haut champ** (4.7 T) s'avère aussi l'une des priorités à venir en terme d'imagerie anatomique à haute résolution (réalisation d'un atlas numérique chez l'huître creuse).

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	5
1.1. Contexte	5
1.2. Question scientifique et intérêt pratique éventuel	6
1.3. État de l'art	6
1.4. Préambule	7
2. MATÉRIEL ET MÉTHODE	7
2.1. Principe de base	7
2.2. Caractéristiques des IRM et des séquences utilisées	8
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	9
3.1. Anatomie fine	9
3.1.1. Anatomie en coupe sagittale	9
3.1.2. Anatomie en coupe transversale et détails complémentaires	14
3.1.3. Comparaison de méthodes	14
3.1.4. Discussion	15
3.2. Biométrie générale et suivi de gamétogenèse	15
3.2.1. Exemple de suivi individuel	15
3.2.2. Discussion	16
3.3. Détermination du sexe	17
3.3.1. Biochimie préliminaire	18
3.3.2. Analyse RMN	18
3.3.3. Premiers essais	19
3.3.4. Discussion	20
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	20
4.1. Conclusion	20
4.2. Perspectives	21
4.3. Plus d'infos sur le web*	22
4.4. Communications et publications réalisées et en préparation	22
5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	23
6. ANNEXES : RAPPORTS DE CONTRAT	24

1. Introduction générale

1.1. Contexte

En septembre 2001, le CNRS a lancé en partenariat avec l'INSERM le programme "Imagerie du petit animal". Doté d'un budget 1,07 million d'euros, l'objectif consistait à développer de nouvelles méthodologies permettant d'obtenir in vivo des images anatomiques ou fonctionnelles chez les rongeurs et de créer ou d'appuyer des unités de recherche spécialisées dans ce domaine. Ci-joint un extrait de l'introduction de ce Programme:

"L'imagerie à haute résolution du petit animal pratiquée in vivo bouleverse nos connaissances en Sciences du vivant en fournissant des informations quantitatives intégrées dépassant les données habituelles fournies par les approches in vitro. L'insuffisance constatée des investissements en équipements, en fonctionnement et en personnel dans le domaine de l'Imagerie du Petit Animal, en particulier pour le développement de la post-génomique et de la physiologie intégrative, justifie un effort particulier auquel le CNRS et l'INSERM sont en mesure d'apporter une contribution significative. Les domaines d'application de l'Imagerie du Petit Animal (rongeurs) sont très larges compte tenu des nouvelles possibilités offertes d'obtenir in vivo, et en respectant l'intégrité cellulaire, des informations anatomiques, biochimiques, physiologiques, génétiques, pharmacologiques etc.... "

En 2002, la Direction Scientifique de l'IFREMER lançait un appel d'offres "jeunes chercheurs", dont l'intitulé était le suivant:

"Les jeunes chercheurs ont des idées neuves et l'enthousiasme nécessaire pour les mettre en application. L'Ifremer se doit de tirer un meilleur parti de ce potentiel. Afin de faciliter leur travail, un financement particulier leur sera accordé.

Chacun pourra recevoir au plus 150KF par an pendant 1 ou 2 ans. Au plus 5 projets seront donc financés dès cette année et 7 l'année prochaine (maximum 5 en 2ème année et minimum 2 en 1ère). Les projets en collaboration avec des entités extérieures seront privilégiés. Chaque proposition devra être partie intégrante des programmes de l'équipe/ laboratoire/ département de rattachement. Elle devra avoir l'accord de la direction opérationnelle. Elle sera évaluée par des experts extérieurs.

La forme des propositions sera classique : thématique de rattachement, description du projet scientifique ou technologique de rattachement, justification des crédits supplémentaires demandés. Ces crédits pourront être utilisés pour l'achat d'équipements ou des contrats d'étude avec des équipes extérieures (crédits d'investissement obligent)."

Depuis 2000, l'une des thématiques de notre laboratoire réside dans la compréhension de la physiologie de la reproduction chez l'huître creuse:

"L'huître creuse est tout sauf un modèle pour étudier la physiologie et la gamétogenèse des bivalves : (1) l'organisme est enfermé dans une coquille hermétique ce qui nécessite l'utilisation de méthodes destructives (ouverture) ou "stressantes" (biopsie) ; (2) le développement de la gonade se fait de façon diffuse ce qui rend difficile les mesures quantitatives de croissance gonadique. Afin d'améliorer le rythme d'acquisition de nos connaissances en biologie de la reproduction chez C. gigas et pour nous permettre de travailler plus efficacement, nous pensons qu'il devient nécessaire voire indispensable de rechercher de nouveaux outils non destructeurs et quantitatifs."

Le présent travail se trouve à la croisée de ces trois chemins.

1.2. Question scientifique et intérêt pratique éventuel

« *Bien souvent en biologie, étudier un phénomène, c'est le modifier.* »

Dans la plupart des cas, la recherche en physiologie des mollusques se heurte à ce paradoxe récurrent : pour comprendre le fonctionnement d'un bivalve, il faut bien souvent l'ouvrir et donc le tuer. Ce problème interdit tout suivi individuel et implique de maintenir des populations d'échantillonnage de taille élevée. Par conséquent les moyens et les coûts logistiques des expérimentations sont conséquents, et rendent parfois impossible certains protocoles. C'est notamment le cas pour beaucoup de travaux menés sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

Si ce mollusque fait actuellement l'objet d'une aquaculture florissante, force est de constater que l'on doit faire face chaque année à des phénomènes de mortalités anormales récurrents, généralement en période de reproduction. Par ailleurs, la culture de cette espèce repose à 90 % sur du collectage naturel qui, comme on le sait, présente une forte variabilité inter-annuelle et une évolution à moyen terme inconnue. La pérennité de cette culture passe donc, entre autres, par la maîtrise de la production de juvéniles en éclosion et la compréhension des causes de mortalités en milieu naturel. Ces deux objectifs ont un point en commun : ils nécessitent, dans les

deux cas, la compréhension, sous des aspects quantitatifs, du cycle de reproduction de l'huître creuse. Or, rien n'est plus compliqué que la reproduction de ce bivalve à la sexualité phénotypique dominante. Après plus de 20 années de recherche dans ces domaines (*e.g.* synthèse in Devauchelle et al., 1995), notre compréhension des processus biologiques et des coûts énergétiques de la reproduction chez les bivalves reste limitée, et la maîtrise de leur reproduction empirique. Pourquoi ce constat d'échec ? Probablement à cause d'un manque d'outil macroscopique non destructeur pour étudier « *ce que renferme la coquille d'un bivalve* ».

Désormais, et développé pour la radiologie en médecine, des outils performants d'observation, non destructeurs et peu stressants, existent. Parmi les différentes techniques d'imageries disponibles et après différents essais, l'imagerie en résonance magnétique a retenu très fortement notre attention en matière de veille et d'innovation technologique pour la recherche en physiologie des organismes marins mais aussi pour des applications beaucoup plus pratiques comme nous le verrons au fil de ce document.

1.3. État de l'art

Si l'imagerie en résonance magnétique a été employée sur différents échantillons

biologiques (e.g. Mansfield & Morris, 1982), plus récemment sur des insectes (e.g. Goodman *et al.* 1995; Jasanoff & Sun, 2002; Wecker *et al.* 2002), cet outil reste pour l'instant, très peu utilisé en biologie marine sur des échantillons vivants. A titre d'exemple, les rares travaux dans ce domaine concernent (1) l'étude des courants branchiaux chez une carpe (Van Den Berg, 1995), (2) les flux d'hémolymphe chez une araignée de mer (Bock *et al.*, 2001) et (3) très récemment de la physiologie *in vivo* chez une littorine (Sokolova *et al.* 2000) et chez un poisson (Mark *et al.*, 2002). Dans ces derniers travaux, l'utilisation couplée de l'IRM et de la spectroscopie RMN du phosphore ³¹P permet l'investigation non invasive du métabolisme énergétique, du pH intracellulaire, de la régulation acido-basique; une technologie très prometteuse pour la physiologie des mollusques marins. Pour l'instant, à notre connaissance, il n'existe aucun travail en IRM sur les bivalves, et *a fortiori* sur les huîtres. Pourtant, il s'agit d'espèces qui se prêtent bien à ce type d'analyse, car elles peuvent être exondées sans problème et restés immobiles dans l'imageur.

1.4. Préambule

Ne disposant pas à l'IFREMER de laboratoire couplant d'Imagerie et de Spectroscopie par Résonance Magnétique

Nucléaire (respectivement IRM et SRM), le contrat d'incitation jeune chercheur nous a permis d'initier des collaborations avec deux laboratoires: l'un (CHU Rennes) possédant un IRM moyen champ (1.5 T) et l'autre possédant un IRM bas champ (0.2 T) couplé à un laboratoire RMN (Cemagref Rennes).

L'ensemble des travaux réalisés dans ces laboratoires est regroupé dans les deux rapports de contrat remis en 2003 et joints en annexe au présent document. Le lecteur pourra si référer pour approfondir sa lecture. Nous nous proposons ici de réaliser une synthèse de ces recherches, en reprenant les principaux éléments marquants, en ré-analysant certains résultats, et en approfondissant la discussion et les perspectives.

2. Matériel et méthode

2.1. Principe de base

Pour un description détaillée de la technologie IRM, nous renvoyons le lecteur à un très bon ouvrage didactique (Kastler *et al.*, 2001). D'une façon générale, l'IRM est basée sur l'analyse du comportement des protons contenus dans les tissus de l'échantillon et soumis un champ magnétique statique B₀ et une onde de radiofréquence RF dite d'excitation. Lors de l'excitation, le proton emmagasine de l'énergie qu'il restitue à l'arrêt de l'impulsion RF lors de la relaxation et que

l'on récupère sous forme d'un signal électrique (FID). Ce signal dépend des temps de relaxation T1 et T2, mesurés classiquement en RMN. Excitation et émission sont transmis par une antenne, dont la forme, le volume, la taille est la mieux adaptée à l'échantillon étudié. Ce signal, codé géographiquement à partir d'un gradient de champ magnétique, est analysé et intégré dans un espace 3D et converti après transformée de Fourier en une image à niveaux de gris par un système informatique. Le signal émis et donc le niveau de gris de l'image dépend, entre autres, de la nature des tissus, *i.e.* de leurs propriétés T1 et T2.

2.2. Caractéristiques des IRM et des séquences utilisées

Depuis 2001, mais surtout en 2002-2003, la réalisation d'un nombre conséquent de séances (plus d'une dizaine par IRM) a

permis d'améliorer la qualité des séquences et d'obtenir des images RM d'assez nombreuses d'huîtres de différents âges, de différentes origines et dans différents états de maturation. L'écho de gradient "spoilé" de type Flash ou SPGR (appellation variable en fonction du constructeur) a permis d'obtenir des images satisfaisantes dont le contraste a été amélioré par l'optimisation des temps TR et TE. D'une façon générale, les caractéristiques des séquences sont résumées dans le tableau I.

Les images présentées dans la partie résultats ne constituent qu'un échantillon de la bibliothèque d'images RM réalisée au cours de cette année. Elles démontrent, comme on pourra le constater, les potentialités de la technologie IRM.

Tableau I: Caractéristiques générales des IRM et des séquences utilisés au cours de notre étude

Paramètres	IRM CHU	IRM Cemagref
Type d'IRM	General electric <i>Signa</i>	Siemens <i>Open</i>
Champ B ₀	1.5 T	0.2 T
Gradient B ₁	10 mT/m	23 mT/m
Antenne	Poignet (10 cm)	Tête (20 cm)
Type de séquence	Écho de gradient spoilé (SPGR)	Écho de gradient spoilé (Flash)
Nombre d'huîtres	1	4
Paramètre TR	200-400 ms	400 ms
Paramètre TE	4-5 ms	9 ms
FOV	512 x 256 mm ²	120 x 120 mm ²
Matrice	120 x 90	128 x 128
Résolution	0.23 mm ²	0.98 mm ²
Direction de coupe	Sagittale/transversale	Transversale
Épaisseur de coupe	3 mm	4 mm
Nombre d'accumulation	10/22	15
Durée de la séquence	5/6 min	12 min

3. Résultats et discussion

3.1. Anatomie fine

3.1.1. Anatomie en coupe sagittale

La figure 1 représente une coupe sagittale extraite d'une série de coupe d'une séquence IRM présentée en figure 2. Cette coupe obtenue dans le plan sagittal moyen d'une huître de 3 ans présente clairement la plupart des organes, à l'exception de la coquille, que l'on peut néanmoins deviner sur d'autres sections (grâce aux galeries créées par les vers *Polydora sp.* et autres chambrages).

Le manteau peut être observer en périphérie de l'ensemble des organes, mais se distingue plus aisément en plan

transversal (voir ci dessous). Les branchies apparaissent en niveaux de gris relativement bas (ca. 80) sur ce type de séquence. La résolution est suffisante pour dévoiler leur structure filamenteuse. Le muscle adducteur apparaît clairement en niveaux de gris moyen (ca. 120), on y distingue clairement un vaisseau sanguin.

Dans la masse viscérale, la plupart des organes sont visibles : les palpes labiaux, la glande digestive, la gonade diffuse, l'appareil digestif et la cavité péricardique. Les palpes labiaux, d'un niveau de gris de 120, se fondent dans la masse viscérale, principalement avec la glande digestive. Cet organe, quant à lui, entourant l'estomac et noyé dans la gonade se distingue

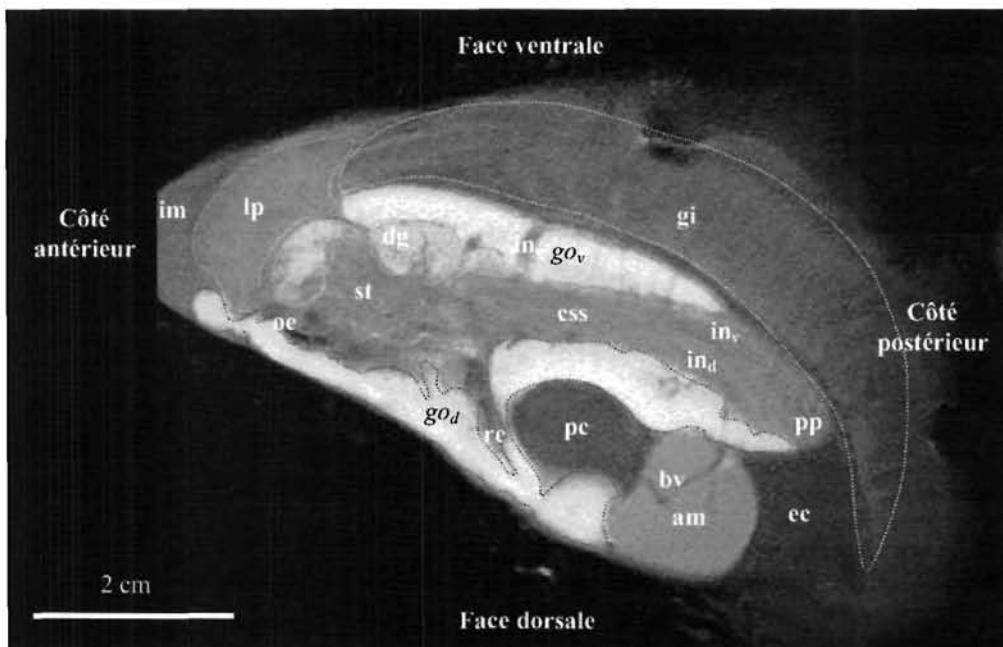


Figure 1 : Coupe sagittale au niveau du cœur d'une huître de 3 ans (120 g). On y distingue selon un axe antéro-postérieur: l'isthme du manteau (im), les palpes labiaux (lp), les branchies (gi), l'œsophage (oe), la glande digestive (dg), l'estomac (st), la gonade face ventrale (gov) et dorsale (god), le sac du stylet cristallin l'intestin (css), le sac péricardique (pc), le rectum (re), l'anse ventral et dorsal de l'intestin (inv et ind), la poche pylorique (pp), le muscle adducteur (am) contenant une arborescence de vaisseaux sanguins (bv) et espace epi-branchiale (ec).

parfaitement en terme de niveau de gris : avec une valeur moyenne de 150, cet organe présente un niveau de gris intermédiaire entre l'estomac (autour de 100) et glande digestive (autour de 150). Sur ce type de séquence, la gonade, riche en lipides, constitue l'organe le plus facile à distinguer avec des pixels d'une valeur supérieure à 190, elle présente un caractère diffus bien caractéristique en entourant tous les organes de la masse viscérale. L'appareil digestif constitue une structure tri-dimensionnelle relativement compliquée, et par conséquent l'interprétation de cette structure ne peut se faire qu'à partir de l'ensemble des sections présent sur la planche (fig. 2). D'une façon générale, les éléments de l'appareil digestif apparaissent en niveaux de gris relativement bas sur ce type de séquence (ca. 90). L'œsophage, l'estomac, le sac du stylet cristallin, une partie de l'intestin et le rectum sont visibles sur la figure 1. Après avoir quitté l'estomac (fig. 2e), la première partie de l'intestin s'étend postérieurement jusqu'au processus pylorique, puis tourne ventralement et longe le sac du stylet cristallin. Il repasse dorsalement (fig. 2f & fig. 2g) et entoure la partie gauche de l'estomac (fig. 2c). Puis la partie terminale de l'intestin passe à proximité de la cavité péricardique (fig. 1e) et se termine par le rectum à côté du muscle adducteur (fig. 1f & fig. 1g).

Enfin, la cavité péricardique, riche en hémolymphe, se distingue très bien: avec un niveau de gris extrêmement bas (ca. 62), elle contraste très fortement avec les organes adjacents. De forme ronde, elle est logée au milieu de la gonade et adossé au muscle. Sur ce type de section, les compartiments internes ne sont pas visibles (cf ci-dessous), par contre on distingue (fig. 1f) clairement (1) antérieurement, l'aorte sortant du ventricule et (2) postérieurement les vaisseaux hémolymphatiques en provenance des organes entrant dans les oreillettes.

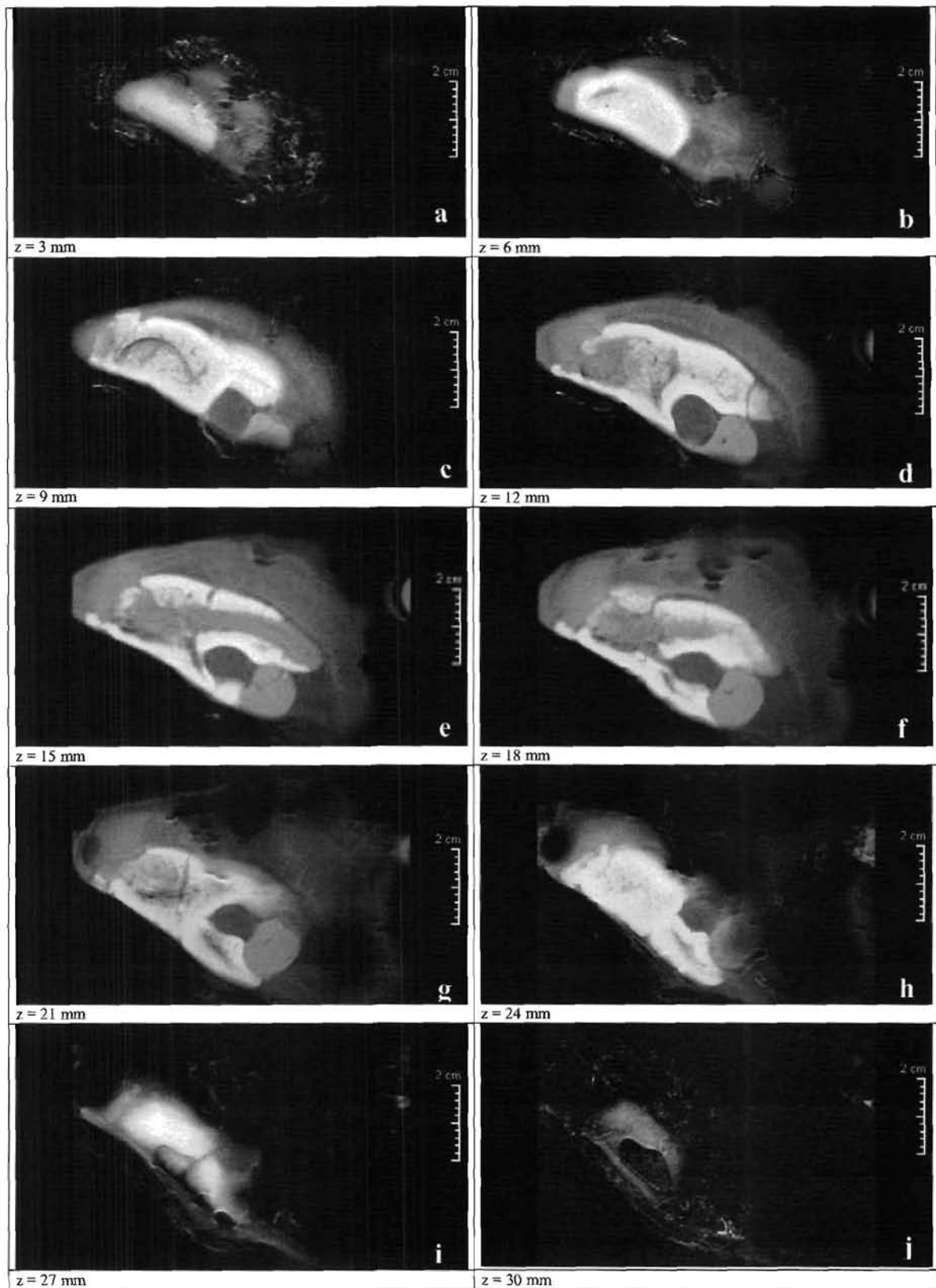


Figure 2 : Exemple d'une acquisition d'images de coupes sagittales chez *C. gigas* (3 ans, 11 cm, 150 g). Les coupes de 3 mm d'épaisseur sont réalisées tous les 3 mm, depuis la base de la valve creuse. Temps d'acquisition : 6 minutes.

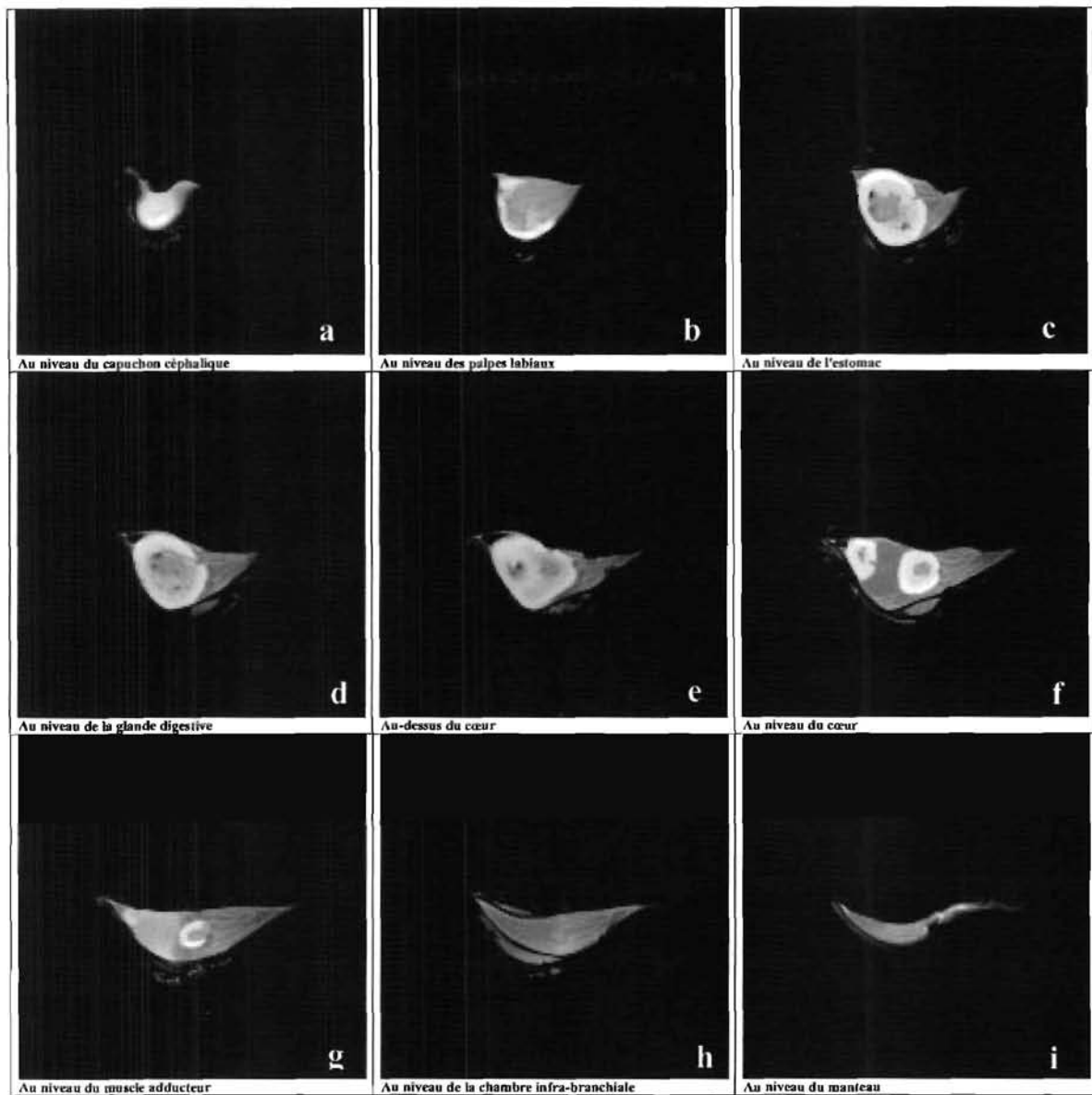


Figure 3 : Exemple d'une acquisition d'images de coupes transversales chez *C. gigas* (3 ans). Les coupes de 3 mm d'épaisseur sont réalisées tous les 3 mm, depuis la charnière. Seulement une coupe sur trois a été sélectionnée sur cette planche. Temps d'acquisition : 6 minutes.

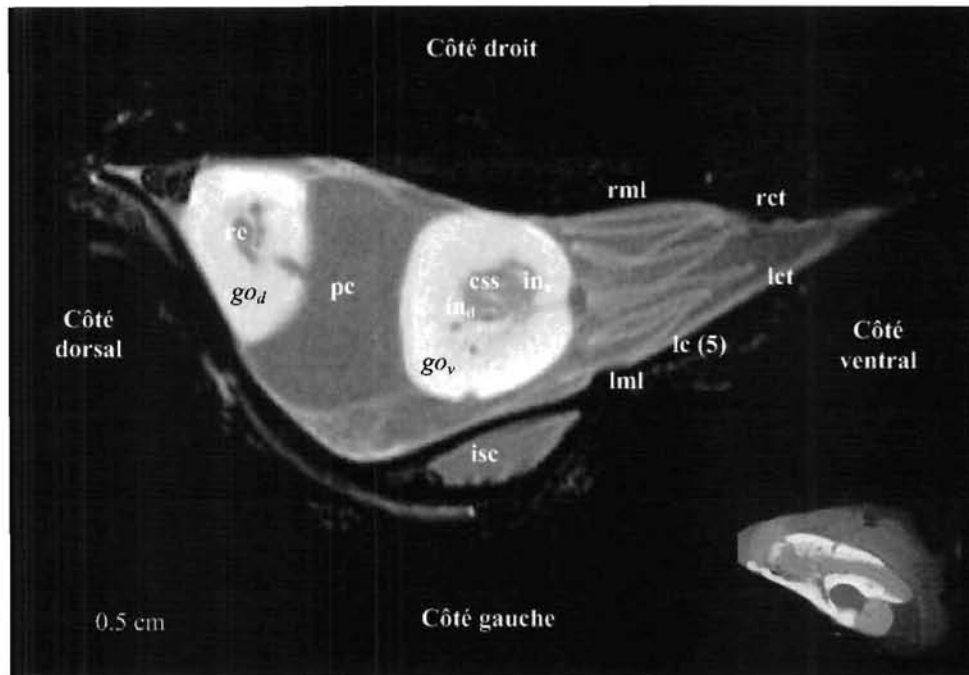


Figure 4: Coupe transversale au niveau du cœur d'une huître de 2 ans (70 g). On y distingue selon un axe dorso-ventral: la gonade côté dorsal (go_d), le rectum (re), la cavité péricardique (pc), la gonade côté ventral (go_v), les différentes parties de l'intestin (in_d et in_v), le sac du stylet cristallin (css), les cténidies droites (rct) et gauches (lct) des branchies, les axes branchiaux (lc), les lobes droit et gauche du manteau (rml et lml), ainsi qu'une cavité dans la coquille (isc).

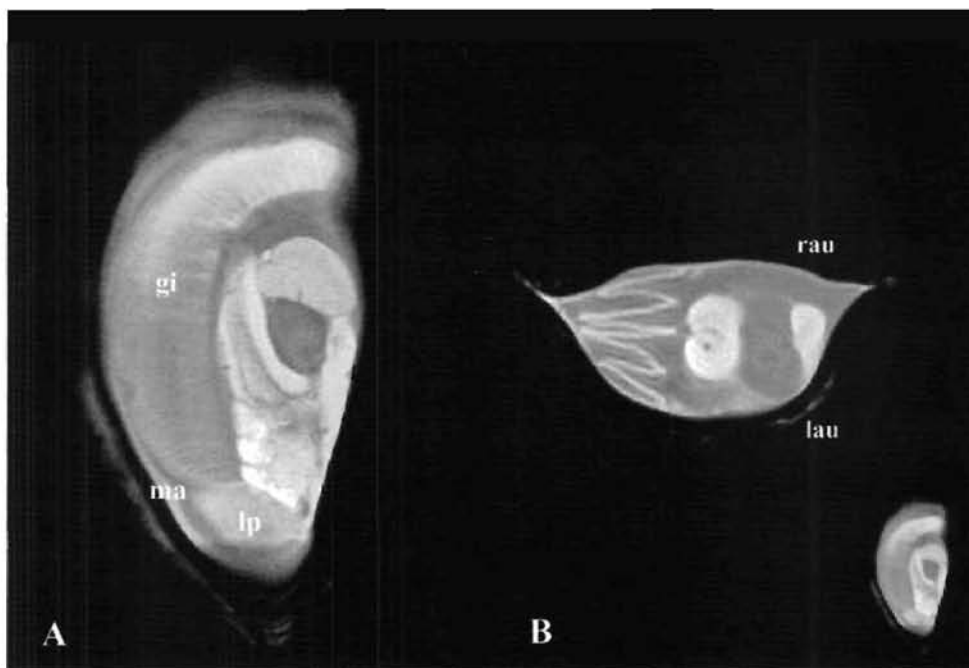


Figure 5 : Sur ces coupes (sagittale et transversale) d'une huître de 1 an (40 g), on distingue plus facilement: sur la coupe A: les branchies (gi), le manteau (ma), les palpes labiaux (lp) et sur la coupe B: l'oreillette droite (rau) et gauche (lau) du cœur.

3.1.2. Anatomie en coupe transversale et détails complémentaires

Des détails anatomiques complémentaires sont visibles sur d'autres plans. Par exemple sur la figure 4, extraite de la planche présentée en figure 3, on distingue clairement la fine structure du manteau dessinant le pourtour intérieur de la coquille, ainsi que les 4 feuillets branchiaux (demi-branchies). Cette section transversale montre aussi clairement la cavité péricardique logée entre les deux extrémités postérieures de la gonade. Au centre des deux extrémités de la gonade, on distingue clairement les différentes parties de l'intestin. En complément, la figure 5 révèle des détails supplémentaires sur des organes peu visibles sur les autres images. Sur la figure 5A, on distingue clairement le manteau, les branchies et les

palpes labiaux. Sur la figure 5B, les oreillettes droite et gauche se distinguent parfaitement, comme deux poches au pourtour très fin logées dans la cavité péricardique.

3.1.3. Comparaison de méthodes

Enfin, comme conclusion à cette partie, la figure 6 permet une comparaison entre une coupe histologique classique et une image RM. Les huîtres présentées sur ces deux images ne sont pas les mêmes, et la coupe histologique ne passe pas obligatoirement exactement au niveau de la coupe RM. Néanmoins, la comparaison entre les deux images permet de montrer le niveau de détail que peut fournir une image RM avec le type de séquence rapide utilisée. On retrouve clairement sur ces deux images (en opposition de contraste d'ailleurs) : le manteau, la gonade, la glande digestive,

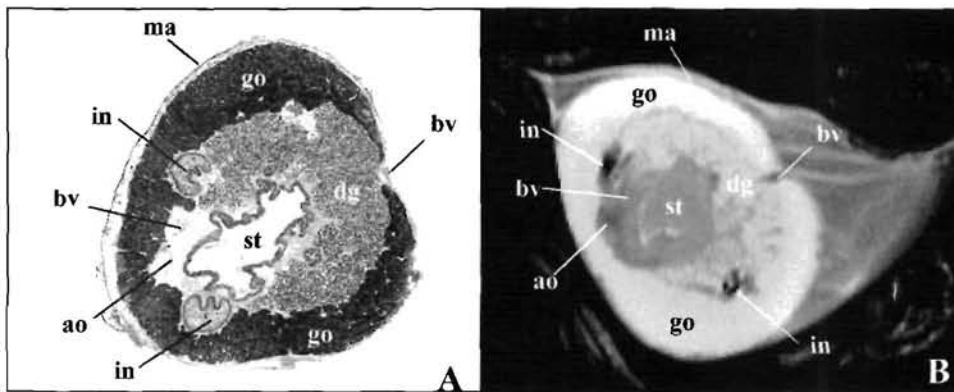


Figure 6: Comparaison entre une coupe histologique (A) et une image RM (B) toutes deux réalisées dans le plan transverse au milieu de la glande digestive. Les organes observés en coupe histologique se reconnaissent aisément sur l'image RM. On distingue, de la périphérie vers le centre: le manteau (**ma**), la gonade (**go**), les différentes parties de l'intestin (**in**), l'aorte (**ao**) et des vaisseaux sanguins (**bv**), la glande digestive (**dg**) et l'estomac (**st**).

l'estomac, les différentes branches de l'intestin, l'aorte et des vaisseaux sanguins.

3.1.4. Discussion

Il y a peu d'images RM chez les invertébrés, *a fortiori* chez les mollusques marins. Ce travail est à notre connaissance pionnier chez l'huître creuse. Néanmoins depuis peu, des travaux en IRM et SRM émergent sur les invertébrés marins : sur la littorine (Sokolova et al., 2000), sur l'araignée de mer (Bock et al., 2001) et mais aussi sur la coquille Saint jacques (Bailey et al., 2004), montrant l'intérêt de telles techniques. Dans nos champs de recherche.

Les résultats présentés ici en terme d'image anatomique ne représentent qu'une première investigation sur un IRM moyen champ ($B_0=1.5$ T) avec des temps d'accumulation relativement court (5-6 min pour l'ensemble des coupe) et des gradients B_1 de 23 mT/m. En utilisant un IRM haut champ (amélioration du signal), des gradients plus élevés, des FOV plus petites, et/ou en augmentant le temps d'accumulation, on devrait logiquement atteindre des images d'une très grande résolution (30-50 μm , *e.g.* Goodman et al. 1995, Jasanoff & Sun, 2002). Ceci pourrait faire l'objet d'un travail en 2004-2005 (projet BIOYSTER) dont l'objectif consisterait en la réalisation d'un atlas numérique d'images anatomiques RM

(2D/3D) de l'huître creuse (voire d'autres mollusques marins).

Pour l'instant, la résolution est bien évidemment meilleure sur la coupe histologique (5 μm), mais pour information, la réalisation de la coupe histologique (qui reste en outre une méthode destructrice) nécessite une heure de main d'œuvre (de la dissection à la prise de vue) sans compter le délai d'analyse, une image RM (méthode non destructrice) est obtenue en 30 secondes, soit 100 fois plus rapidement. En terme de réduction des coûts en temps personnel, le gain est vraiment intéressant et mérite réflexion sans parler bien évidemment du gain scientifique de réaliser des suivis sur les mêmes individus.

3.2. Biométrie générale et suivi de gamétogenèse

3.2.1. Exemple de suivi individuel

Une fois que la reconnaissance des organes a été établie clairement, il devient possible de suivre dans le temps des caractéristiques biométriques diverses. La gamétogenèse fait l'objet de nombreuses recherches, toujours destructrice et souvent fastidieuses. Les figures 7 et 8 montrent, pour la première fois, le suivi non destructeur de la gamétogenèse chez des huîtres. La figure 7 détaille la gonadogenèse printanière et estivale (avec l'émission des gamètes en juillet) chez une

huître de 1 an. La figure 8 montrent l'évolution de la gonade et la ponte d'une femelle de 3 ans conditionnée en écloserie. L'analyse d'image permet ensuite de calculer différents indices de condition et de maturité, voir un calcul de bio-volume

d'occupation de la gonade sur l'ensemble de l'organisme.

3.2.2. Discussion

Les premiers suivis présentés ici attestent clairement de la faisabilité de suivi

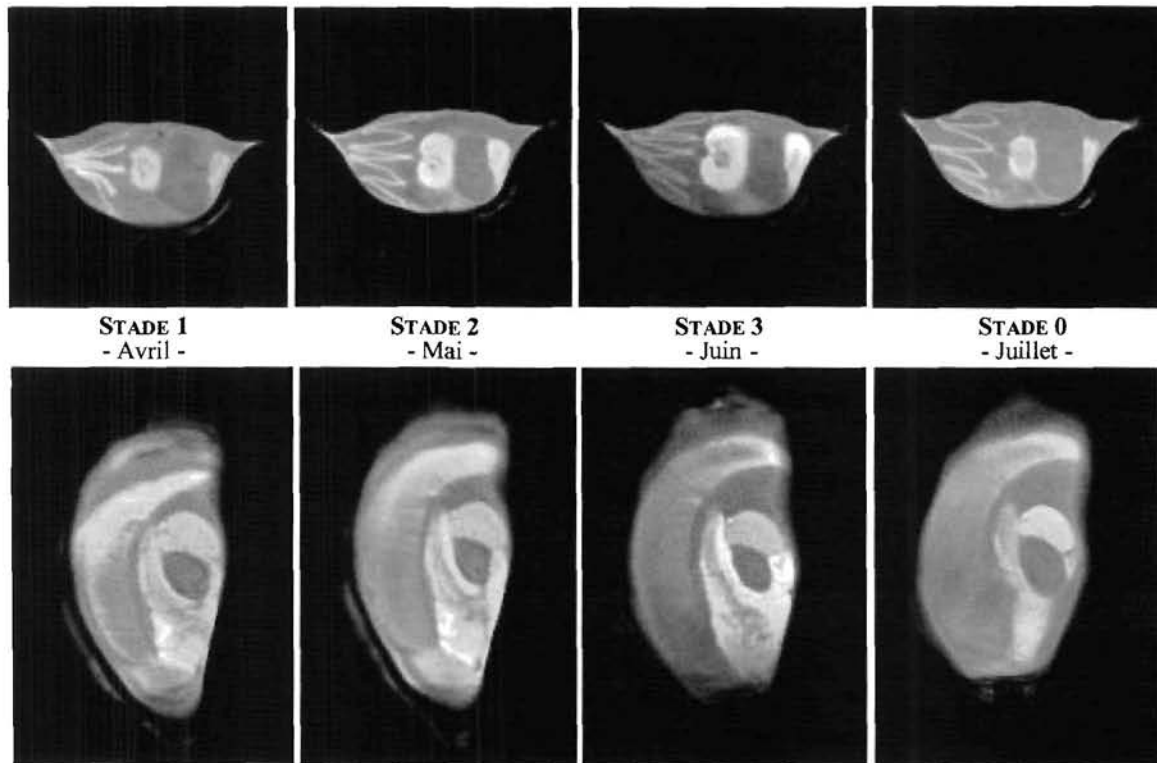


Figure 7: Suivi de la gamétogenèse et de l'émission des gamètes chez une huître creuse de 1 an (40 g) sur un plan sagittal et transversal (au niveau du cœur). On observe clairement la croissance de la gonade d'avril à juin et sa résorption en juillet suite à l'émission des gamètes.

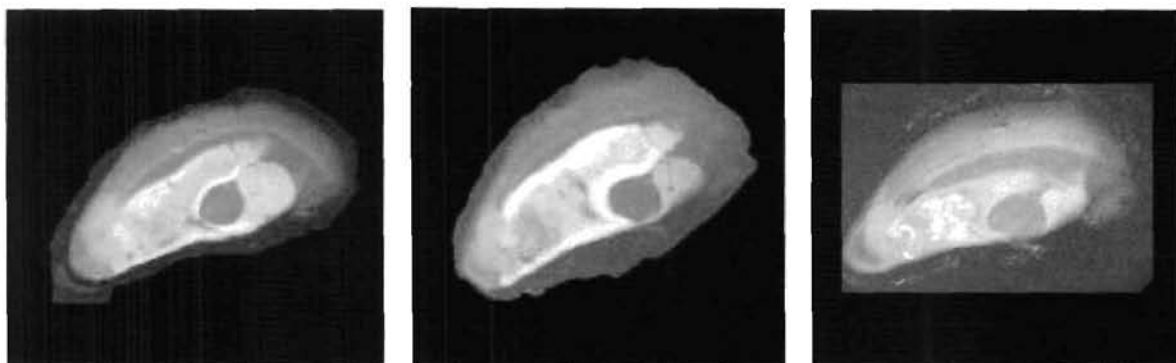


Figure 8: Gamétogenèse et ponte chez une huître creuse de 3 ans (120 g) placées en conditionnement en écloserie de début mai (A) à fin juin (B). La ponte a été provoquée en juillet, l'image C montre clairement la réduction du volume de la gonade, et le caractère total de la ponte.

sont toutefois possibles, non sans échec. Ce paragraphe présente les premières pistes en terme de détermination non invasive du sexe par IRM chez l'huître creuse.

3.3.1. Biochimie préliminaire

La RMN et par voie de conséquence l'IRM sont des techniques très sensibles à la composition biochimique des tissus étudiés. La composition biochimique de l'huître change au cours du temps en fonction de la gamétogenèse et de la mise en réserve, mais aussi en fonction du sexe étudié. Ces constats sont très bien décrits dans un récent travail présenté par Li et al. (2000). La figure 9 présente les principaux résultats de ce travail en montrant l'évolution de la composition biochimique des gonades male et femelle chez *C. gigas* au cours de la gamétogenèse. On constate clairement que si les gonades male et femelle ont pratiquement la même composition au démarrage de la gamétogenèse, i.e. au moment de la différenciation sexuelle, leur composition se différencie très nettement à la pleine maturité (en août). A cette époque de l'année, les ovaires contiennent proportionnellement plus de lipides et de protéines que les testicules. Par conséquent, cette différence devrait se répercuter sur les images RM, à condition

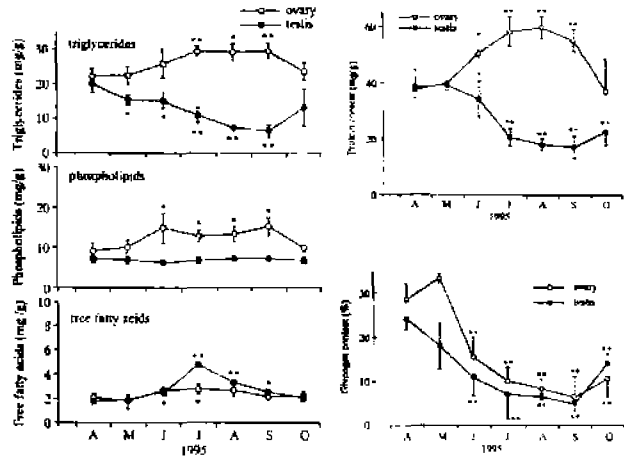


Figure 9 : Évolution de la composition biochimique des gonades mâles et femelles de *C. gigas* au cours d'un cycle de gamétogenèse (d'après Li et al., 2002)

d'optimiser au mieux le protocole des séquences (notamment le TR et TE).

3.3.2. Analyse RMN

Même si de premiers résultats IRM semblaient prometteurs en terme de détermination du sexe par IRM, une optimisation des séquences doit néanmoins être engagée afin d'obtenir le meilleur

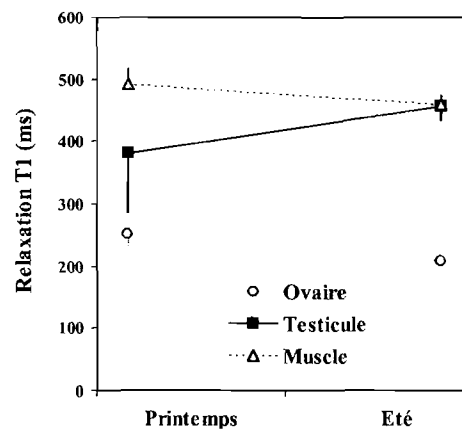


Figure 10: Valeur et évolution du temps de relaxation T1 (ms) chez *C. gigas* en fonction de la saison. Les valeurs de T1 deviennent progressivement très différentes entre l'ovaire et le testicule au cours de la gamétogenèse.

contraste entre les mâles et les femelles, pour éviter toute erreur. Pour se faire, il était nécessaire de disposer du temps de relaxation T_1 pour chacun des organes. Sa mesure a été réalisée par spectrométrie RMN à partir d'extrait humide de gonades à deux périodes de l'année: au début et au maximum de la gamétogenèse. La figure 10 montre très clairement la différence entre les temps de relaxation du muscle adducteur, de la gonade mâle et de la gonade femelle. Le temps de relaxation T_1 du muscle adducteur reste stable autour de 480 ms, la valeur T_1 des testicules augmente progressivement jusqu'à ca. 460 ms à pleine maturation (valeur très proche de celle du muscle) alors que la valeur des ovaires diminue pour atteindre ca. 210 ms. Ces mesures montrent clairement que le temps de relaxation T_1 est très différent entre les gonades male et femelle, cette

différence étant encore plus marquée lorsque la maturation est à son maximum. A la lueur de ces résultats, la différenciation des huîtres mâles et femelles par IRM devrait donc être réalisable après optimisation des séquences.

3.3.3. Premiers essais

L'approfondissement de ce travail sur la détermination du sexe fera l'objet des perspectives 2003/2004. Néanmoins, de premières images (figure 11) confirment clairement les théories énoncées dans les deux premiers paragraphes. En prenant comme référence pour le niveau de gris du muscle adducteur, on constate que sur la fig.11A, le muscle et la gonade ont sensiblement le même niveau de gris, d'après la figure 10, ce serait donc un mâle. A l'inverse, sur la figure 11B, la gonade et

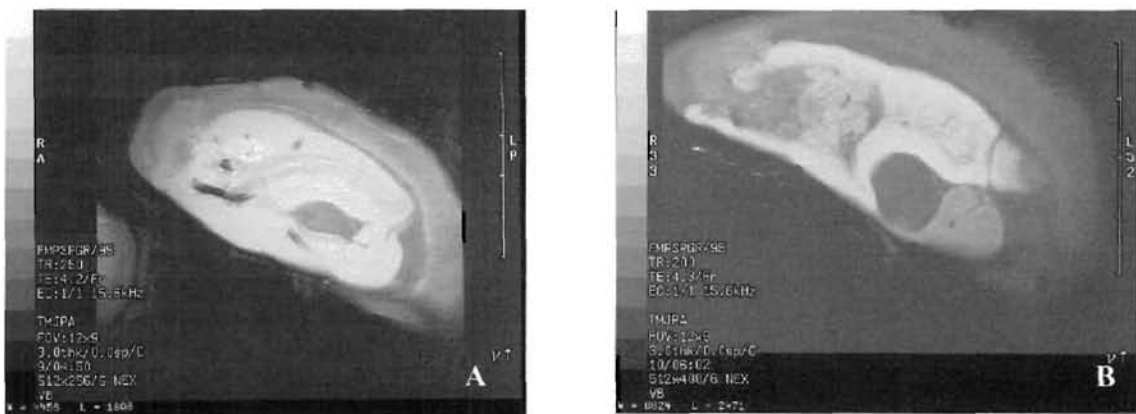


Figure 11: Les images A et B ont été obtenues avec un TR court (200 ms) permettant une pondération T_1 de l'image. On constate dans ce cas, que sur l'image A, le muscle et la gonade présentent le même niveau de gris, alors que sur l'image B, le muscle et la gonade présentent des niveaux de gris différents. L'huître de l'image A est un mâle, celle de l'image B est une femelle.

le muscle présente un contraste très fort, ce serait donc une femelle. Ces résultats ont effectivement été confirmés *a posteriori* par une biopsie.

3.3.4. Discussion

La détermination du sexe chez l'huître creuse peut se faire par une biopsie avec anesthésie. Cette méthode présente néanmoins de nombreux désavantages : (1) le temps d'attente pour l'ouverture est relativement long; (2) toutes les huîtres ne s'ouvrent pas; (3) la biopsie est une source d'infection voire de mortalités; (4) quand l'huître est en pleine gamétogenèse, les manipulations peuvent entraîner des émissions spontanées de gamètes. Enfin, cette technique est très coûteuse en temps humains si elle doit être pratiquée sur des lots d'individus importants ($n > 100$).

Déterminer le sexe par une méthode non invasive et *a fortiori* rapide pourrait solutionner bien des problèmes pratiques en éclosion de mollusques en permettant une démarche simple de criblage des mâles et des femelles (diploïde et tétraploïde, e.g. Devauchelle et al., 1995). En outre, d'un point de vue scientifique, cette méthode permettrait d'imaginer toute une série de protocoles et d'expérimentations sur les facteurs déterminant le sexe chez *C. gigas*. Ces protocoles sont pour l'instant fastidieux voire impossibles à réaliser par les méthodes actuelles. La mise au point

d'une méthode routinière et non-invasive de détermination du sexe chez *C. gigas* fera donc l'objet d'une action en 2004-2005 en partenariat avec le CEMAGREF. Ce travail est, à notre connaissance, là aussi pionnier sur l'huître creuse.

4. Conclusion et perspectives

4.1. Conclusion

Le rapport ci dessus a présenté une synthèse des résultats acquis depuis 2002 dans le cadre de ce projet. Les 2 rapports fournis en annexe apportent beaucoup plus de détails. Il ressort d'une façon générale que l'imagerie par résonance magnétique fournit d'excellents résultats sur l'huître creuse en terme d'anatomie et de biométrie non-destructive. La plupart des organes de l'huître sont très nettement discernables même avec des IRM bas champ. La résolution est améliorée à l'IRM moyen champ. Des mesures de toute une série d'indices biométriques sont aisément réalisables. L'IRM pourrait remplacer, à terme, bon nombre de méthodes biométriques, histologiques et biochimiques destructrices et coûteuses en temps personnel.

En terme d'application pratique, les potentialités de la technique semblent intéressantes surtout pour la détermination de la fécondité et du sexe des géniteurs,

détermination nécessaire en éclosion de mollusques-bivalves.

En terme scientifique, notre travail n'a consisté pour l'instant qu'à tester les potentialités de l'IRM en terme d'imagerie anatomique, mais comme nous allons le voir, l'IRM pourrait être aussi utilisé à des fins de physiologie *in vivo*.

4.2. Perspectives

Plusieurs actions claires peuvent déjà découler de ce travail. Elles peuvent être organisées en trois sous-projets: la premier et le troisième seraient à vocation très scientifique alors que le deuxième aurait un objectif beaucoup plus appliqué en terme de maîtrise des éclosions de mollusques. Les deux premiers projets seraient à envisager pour la période 2004-2005, le troisième leur faisant suite.

Sous-projet 1: Anatomie à haute résolution de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Réalisation d'un **atlas numérique** détaillé comprenant des planches de comparaison IRM/histologie. Expertise chez d'autres d'organismes marins d'intérêt aquacole. Demande d'une bourse Post Doctorale Espagnole en cours en rapport avec ce sous-projet, nommé BIOYSTER.

Sous-projet 2: Mise en place d'une méthode de routine non invasive de **détermination du sexe**, de la fécondité et de la fertilité chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

Sous-projet 3: Étude des potentialités des technologies IRM/SRM (^1H , ^{31}P , ^{13}C) pour l'étude de la physiologie *in vivo* (**imagerie métabolique**) chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

Le CEMAGREF reste un partenaire de choix, principalement pour le sous-projet 2. Il est probable néanmoins qu'une recherche de nouvelles collaborations sera nécessaire surtout pour le sous-projet 3.

5. Références Bibliographiques

- Bailey DM., Peck LS., Bock C., Pörtner HO. (2004).** High energy phosphate metabolism during exercise and recovery in temperate and Antarctic scallops ? an in vivo ^{31}P -NMR study, *Physiological and biochemical zoology*, in press.
- Bock C., Frederich M., Wittig RM, Pörtner HO. (2001)** Simultaneous observations of haemolymph flow and ventilation in marine spider crabs at different temperatures: a flow weighted MRI study. *Magn. Reson. Imaging* **19**, 1113-1124.
- Bock C., Frederich M., Wittig RM, Pörtner HO. (2001)** Simultaneous observations of haemolymph flow and ventilation in marine spider crabs at different temperatures: a flow weighted MRI study. *Magn. Reson. Imaging* **19**, 1113-1124.
- Bock C., Sartoris FJ., Pörtner HO. (2002).** In vivo MR spectroscopy and MR imaging on non-anaesthetized marine fish: techniques and first results. *Magn. Reson. Imaging* **20**, 165-172.
- Evseev GA, Yakovlev YM, Li X (1996)** The anatomy of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thurnberg) (Bivalvia: Ostreidae). *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* **37**: 239-255.
- Goodman BA., Gordon SC., Chudek JA., Hunter G., Woodford JAT (1995)** Nuclear Magnetic Resonance Microscopy as a non-invasive tool to study the development of lepidopteran pupae. *J. Insect. Physiol.* **41**, 419-424
- Jasanoff A., Sun P. (2002)** *In vivo* magnetic resonance microscopy of brain structure in unanesthetized flies. *J. Magn. Reson* **158**, 79-85.
- Li Q., Osada M., Mori K. (2000)** Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries science*, **66**, 502-508.
- Mark FC., Bock C., Pörtner HO. (2002)** Oxygen limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by magnetic resonance imaging (MRI) and spectroscopy (^{31}P -MRS), *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **283**, R1254- R1262.
- Sokolova IM., Bock C., Pörtner, HO. (2000).** Resistance to freshwater exposure in White Sea *Littorina* spp II. Acid-base regulation. *J. Comp. Physiol. B.* **170**, 105-115.
- Van den berg C., Van dusschoten DV, Van As H., Terlouw A., Schaafsma TJ, Osse JWM (1995)** Visualising the water flow in a breathing carp using NMRi. *Neth. J. Zool* **45**: 338-346.
- Wecker S., Hörnshemeyer T., Hoehn M. (2002)** Investigation of insect morphology by MRI: Assessment of spatial and temporal resolution. *Magn. Reson. Imaging* **20**: 105-111

6. Annexes : Rapports de contrat

Cette synthèse 2002-2003 présente des résultats issus de deux rapports de contrat :

Rambeau M. (2003) Anatomie fine et description in vivo de la gamétogenèse de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en IRM haut champ. IFREMER Brest / Contrat d'Incitation IFREMER/partie A. 16 p

Davenel A., Quellec S. (2003) Élaboration d'une méthode rapide et non invasive d'évaluation de l'état de maturité et du sexe chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en IRM bas champ. IFREMER Brest / Contrat d'Incitation IFREMER/partie B. 18 p