

Groupe De Recherche IFREMER-Universités 2000-2005

Ecophysiologie de la reproduction chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*



Rapport final 2006

Coordinateurs : S. Pouvreau⁽¹⁾ et M. Lepenne⁽²⁾

Laboratoires participants:

⁽¹⁾ Département de
Physiologie Fonctionnelle
des Organismes Marins

UMR 100
Ifremer-Station d'Argenton
11, presqu'île du vivier
29840 Argenton

⁽²⁾ Laboratoire des
Sciences de
l'Environnement Marin

UMR 6539
IUEM
Place Nicolas Copernic
29280 Plouzané

⁽³⁾ Laboratoire
d'Ecophysiologie
Marine Intégrée

ISOMer
Université de Nantes
2 rue de la Houssinière
44322 Nantes

⁽⁴⁾ Centre de Biologie du
Développement

UMR 5547
Université Paul Sabatier
118, Route de Narbonne
31062 Toulouse cedex 04

Préambule

Ce document final regroupe l'ensemble des travaux réalisés dans le cadre d'un Groupe de Recherche (GDR) fédéré sur contrats d'incitation de l'Ifremer sur la période 2001-2005. Il synthétise l'ensemble des actions de recherches menées par ce groupe et fournit, en annexe, les 4 volumes de thèses réalisées dans le cadre de ce GDR.



Groupe De Recherche IFREMER-Universités 2000-2005

Ecophysiologie de la reproduction chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*



Document de synthèse

Laboratoires participants:

Département de Physiologie
Fonctionnelle des
Organismes Marins

UMR 100
Ifremer-Station d'Argenton
11, presque île du vivier
29840 Argenton

Laboratoire des Sciences
de l'Environnement
Marin

UMR 6539
IUEM
Place Nicolas Copernic
29280 Plouzané

Laboratoire
d'Ecophysiologie
Marine Intégrée

ISOMer
Université de Nantes
2 rue de la Houssinière
44322 Nantes

Centre de Biologie du
Développement

UMR 5547
Université Paul Sabatier
118, Route de Narbonne
31062 Toulouse cedex 04



Sommaire

PREAMBULE	3
PARTIE INTRODUCTIVE	4
Questions posées sur le contrôle de la gamétogenèse	6
Questions posées sur le contrôle de la fécondation et du développement	11
RESUME DES PRINCIPALES ACTIONS DU GDR	13
Origine et développement des cellules germinales chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> : Intérêt pour le contrôle de la reproduction en écloserie	14
Déterminisme du conditionnement de <i>Crassostrea gigas</i> : I. effet de la température et des réserves	16
Déterminisme du conditionnement de <i>Crassostrea gigas</i> : II. effet de la nourriture.	18
Traçage de l'allocation énergétique chez 2 modèles de bivalves par l'utilisation de marqueurs isotopiques.	20
Effet des facteurs externes sur la reproduction de l'huître creuse : Bilan des résultats et intégration dans un modèle bio-énergétique.....	22
Pourquoi les ovocytes de <i>Crassostrea gigas</i> sont fécondables en prophase ?.....	26
Effet du conditionnement des géniteurs sur la qualité des ovocytes et les performances larvaires et post-larvaires chez <i>Crassostrea gigas</i>	29
Effet du conditionnement de <i>Crassostrea gigas</i> sur la qualité des élevages larvaires.....	31
Étude sur le développement larvaire de <i>Crassostrea gigas</i> en conditions contrôlées : recherche d'index de qualité.....	33
Développement des larves, post-larves et juvéniles de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> - Identification de stades critiques.....	35
Eléments de perspectives : Présentation du GDR 'Qualité des gamètes d'espèces d'intérêt aquacole'	37
ANNEXES DES TRAVAUX.....	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	40



Préambule

Ce document constitue une introduction synthétique présentant les objectifs et les actions, dans leur grande ligne, du Groupe De Recherche 2001-2005 sur l'écophysiologie de la reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, liant contractuellement l'Ifremer et les Universités de Brest, Nantes et Toulouse.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce GDR est ensuite présenté au travers d'une série de résumés pour chaque action, mais surtout, de façon très détaillée, dans le CD Rom fourni avec ce document.



Partie introductive

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est une espèce d'intérêt majeur pour la conchyliculture nationale et mondiale. Si à l'heure actuelle, sa culture reste majoritairement basée sur du naissain issu de captage en milieu naturel (Robert et Gérard, 1999), la demande en juvéniles d'écloserie ne cesse d'augmenter depuis quelques années et représente désormais 20% des besoins en naissain.

D'une façon générale, les objectifs techniques à atteindre pour soutenir cette demande croissante seraient : (1) d'obtenir un allongement de la saison de reproduction, voire sa non-saisonnalité et (2) de produire des élevages fiables (des larves de bonne qualité, de taux de survie élevés...). Pour cela, il est nécessaire de maîtriser chacune des étapes du cycle de reproduction, ce qui implique, en terme scientifique, de comprendre les mécanismes physiologiques mis en jeu depuis l'initiation de la gamétogenèse jusqu'au développement larvaire ainsi que leur régulation par les facteurs internes et les paramètres environnementaux. Dans ce contexte, un GDR entre l'Ifremer et différentes universités (Brest, Nantes et Toulouse) a été mis en place en 2000, s'est clôturé en 2005 et a eu pour objectif principal d'apporter de nouvelles connaissances scientifiques sur la physiologie de la reproduction de l'huître creuse depuis l'initiation de la gamétogenèse jusqu'au succès du développement larvaire (figure 1).

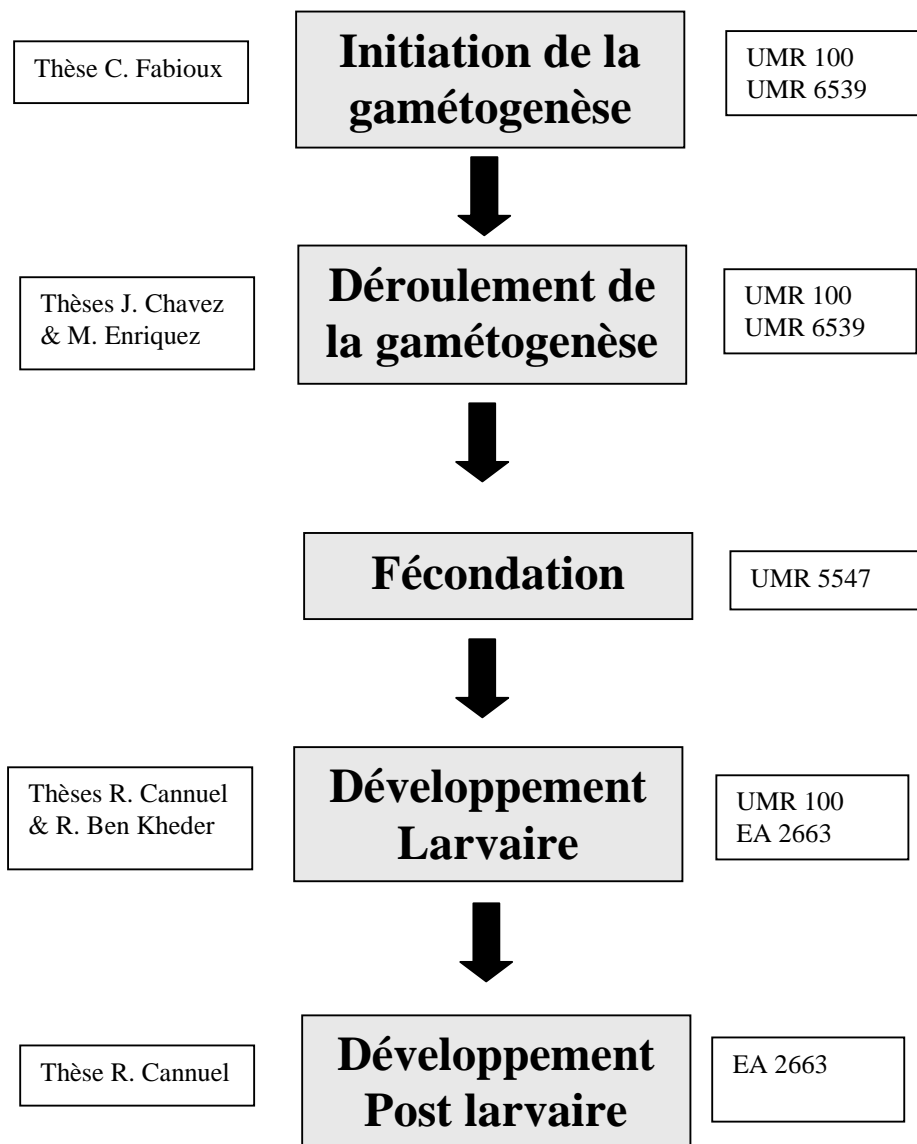


Figure 1 : Organisation schématique des actions de recherche du GDR pour chaque laboratoire impliqué et présentation des thèses réalisées dans le cadre de ce programme.



Questions posées sur le contrôle de la gamétogenèse

Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, à l'instar de beaucoup d'autres organismes ectothermes, la plupart des étapes spécifiques du cycle de vie est intimement liée aux phénomènes de saisonnalité, *i.e.* aux changements de conditions biotiques et abiotiques. Ainsi, la température agit sur toutes les fonctions biologiques de l'huître telles que l'alimentation, la respiration, l'utilisation des réserves, le développement, la croissance et, bien évidemment, la reproduction. Outre des variations de température, les huîtres subissent aussi l'action d'autres facteurs environnementaux tels que des variations de disponibilité en nourriture, de turbidité, de concentration en oxygène, de salinité, de pH, etc. Dans ce contexte, la compréhension de la biologie de l'huître passe nécessairement par des études faisant appel à de l'écophysiologie. *Sensu stricto*, cette discipline se consacre à analyser l'effet des facteurs externes sur la physiologie d'un animal. Dans le cas de l'huître, il est reconnu que l'environnement peut modifier, de façon importante, les performances de croissance. Ainsi, d'une année à l'autre ou d'un site à l'autre, la croissance de l'huître est amenée à varier. Mais de façon moins bien connue, il en est de même de la reproduction. Cette flexibilité physiologique est une caractéristique majeure de l'huître creuse, et analyser, de façon quantitative, l'effet des facteurs externes sur sa reproduction constitue un enjeu scientifique dont les applications pratiques peuvent directement servir aux métiers d'écloserie. C'est là tout le cœur de ce Groupe de Recherche.

Au démarrage de ce GDR, différents travaux étaient déjà disponibles sur la gamétogenèse de l'huître creuse. Une synthèse avait été réalisée (Devauchelle *et al.*, 1995) et fournissait un inventaire exhaustif des connaissances sur cette espèce. Il ressortait néanmoins quatre grands domaines dans la physiologie de la reproduction de *C. gigas* pour lesquels des actions spécifiques semblaient nécessaires.

(1) En règle général, le cycle reproductif de *C. gigas* présente un caractère saisonnier avec une période de gamétogenèse printanière qui aboutit à l'émission de gamètes (fraie) en



plein été. De façon plus détaillée, on distingue: i) le stockage hivernal (facultatif) de réserves (sous forme de glycogène) pour soutenir la gamétogenèse printanière; ii) la prolifération et la différenciation des cellules sexuelles; iii) la maturation des gamètes; iv) l'émission des gamètes matures et v) une éventuelle résorption des gamètes non émis (appelé abusivement 'régression') pour permettre le rétablissement d'un nouveau cycle (e.g. Berthelin *et al.*, 2000). Ainsi, lorsque les températures augmentent au printemps, l'épithélium germinal prolifère puis le développement et la maturation des gamètes commencent. En fin de printemps, tous les stades cellulaires peuvent être observés dans un même acinus gonadique. Le pourcentage de gamètes matures par rapport aux cellules sexuelles en cours de développement permet de fournir une échelle de description de l'avancée de la gamétogenèse (e.g. Lango-Reynoso *et al.*, 1999). Progressivement à l'approche de la période estivale, les acini se remplissent de gamètes matures. Puis, au cours de l'été, un stimulus extérieur déclenche l'émission des gamètes, généralement massive et synchrone dans la population. Ensuite, les follicules se rétrécissent et sont envahis par des cellules (phagocytes) qui résorbent les gamètes non émis, surtout dans le cas d'émissions partielles. Il s'en suit généralement une période de restauration des tissus pendant laquelle l'accumulation progressive de nouvelles réserves en glycogène a lieu, permettant l'initiation d'un nouveau cycle. Cette phase d'initiation est très méconnue et c'est là que de premières questions se posaient au début de ce GDR: **quand, où et comment se forment les cellules sexuelles responsables de l'initiation d'un nouveau cycle ; comment agissent les facteurs environnementaux sur ces ré-initiations ?**

(2) Le schéma général du cycle de reproduction présenté précédemment peut néanmoins être amené à varier. Ainsi, en milieu naturel, il apparaît clairement que la stratégie de reproduction chez *C. gigas* peut être considérée comme une véritable réponse phénotypique aux conditions environnementales. La température est certes un paramètre clé : il semble que la gamétogenèse démarre pour des températures supérieures à 8°C,



s'accélère avec le réchauffement printanier et les gamètes sont émis en période estivale dès lors que la température dépasse 19°C (Paniagua-Chávez et Acosta-Ruíz, 1995; Steele et Mulcahy, 1999). Cependant, la température a trop souvent été identifiée comme le seul facteur déterminant la gamétogenèse. L'huître creuse montre, pour sa reproduction, un déterminisme plus complexe, pour lequel la nourriture semble jouer un rôle tout aussi prioritaire. Ainsi, la gamétogenèse apparaît aussi sous la dépendance des efflorescences phytoplanctoniques printanières (Mori, 1979; Deslous-Paouli, 1982; Maurer et Borel, 1986; Kang *et al.*, 2000) mais est aussi conditionnée indirectement par les quantités hivernales de phytoplancton qui décident de l'accumulation de réserves (Deslous-Paouli, 1982 ; Maurer et Borel, 1986). En outre, dans le cas de zones trophiques très riches dite 'eutrophes' le développement gonadique de l'huître peut être amplifié menant à une hypertrophie de la gonade et pouvant ainsi conduire à des désordres physiologiques (Mori, 1979). En contre partie, une déficience dans la nourriture printanière peut retarder la maturation des gonades, entraînant alors un décalage de la ponte (Deslous-Paouli *et al.*, 1982).

Finalement, bien qu'un nombre significatif d'étude sur la variabilité de la gamétogenèse de l'huître creuse était disponible au début de ce GDR (Steele et Mulcahy, 1999; Lango *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 1992; Shpigel, 1989; Dinamani, 1987; Perdue et al., 1981; Yakovlev, 1978), il ressortait que différentes années d'étude, des stratégies d'échantillonnage variées, des méthodes d'analyses de la reproduction bien souvent purement qualitatives et de surcroît non comparables interdisaient toute synthèse rigoureuse et quantitative des données. De plus, rares étaient les études sur la reproduction qui tenaient compte en parallèle des conditions hydrobiologiques (physiques et trophiques). Pourtant, la connaissance précise de la physiologie de la reproduction dans le milieu naturel est un support essentiel à toute maîtrise en condition contrôlée. **Il apparaissait donc nécessaire, en début de GDR, de s'attacher à une description quantitative des évènements de la gamétogenèse en rapport avec l'évolution des facteurs**



environnementaux (température, nourriture et photopériode), et ce, à la fois en milieu naturel et en milieu contrôlé.

(3) Plus précisément en ce qui concerne le conditionnement de géniteurs en éclosion, des questions restaient encore posées. Il est reconnu qu'une part essentielle de l'énergie accumulée dans les ovocytes provient de l'alimentation des reproducteurs et plus particulièrement des algues planctoniques qui leur sont distribuées en quantité et en qualité (Gérard *et al.*, 1997). On considère généralement qu'un apport journalier de 6 % du poids sec des géniteurs est optimal (Utting et Millican, 1997). Cependant, cette approche empirique a rarement été vérifiée sur des bases écophysiologiques comme le reprochaient Utting et Millican (1997) et le contrôle de la consommation effective est rarement effectué en routine. Une meilleure connaissance de la prise alimentaire et de son devenir, d'un point de vue quantitatif, semblait donc indispensable à une meilleure compréhension des besoins énergétiques de la reproduction et, par conséquent, à une meilleure gestion des cheptels en conditionnement. **Ainsi, et afin de bien comprendre la gestion de l'énergie au cours d'un conditionnement, le suivi des fonctions écophysiologiques (nutrition, allocation d'énergie et métabolisme) au cours d'un cycle de reproduction se devait d'être analysé quantitativement, fixant ainsi le troisième objectif du GDR.**

(4) Finalement, en ce qui concerne la gamétogenèse, l'un des constats récurrents au début du GDR était le manque d'approches quantitatives. Afin de palier à ce manque, de nouvelles approches et de nouveaux outils devaient être utilisés. A cette fin, la construction d'un modèle bioénergétique pour *C. gigas*, incluant précisément les processus de gamétogenèse, pouvait constituer un outil très utile. Les modèles bioénergétiques ont en effet clairement démontré la très forte relation entre l'abondance de nourriture et la croissance gonadique chez différentes espèces de bivalves d'intérêt économique (Barillé *et al.*, 1997; Pouvreau *et al.* 2000). A titre d'exemple, chez *Pinctada margaritifera*, le modèle a



montré, qu'au dessous d'une concentration en matière organique de 0.4 mg.l^{-1} , la gamétogenèse devenait impossible. D'une façon plus générale, plusieurs modèles bioénergétiques ont été développés chez différentes espèces de bivalves (e.g., Ross et Nisbet, 1990; Brylinski et Sephton, 1991; Bacher *et al.*, 1991; Powell *et al.*, 1992; Hofmann *et al.*, 1992; Bensch *et al.*, 1992; Raillard *et al.*, 1993; Van Haren et Kooijman, 1993; Grant *et al.*, 1993; Barillé *et al.*, 1997; Pouvreau *et al.*, 2000). Ces modèles reposent sur la détermination du potentiel de croissance ("Scope for Growth", Warren et Davis, 1967; Bayne 1976) et son allocation dans les différents compartiments (soma, réserve, gonade). Si ces modèles sont de plus en plus performants en ce qui concerne la simulation du comportement alimentaire et la croissance somatique, ils restent néanmoins perfectibles sur la simulation des processus de la reproduction. En fait, trop peu de travaux portent sur la gamétogenèse d'un point de vue quantitatif et bioénergétique, pour permettre une modélisation détaillée (Ren et Ross, 2001). Au début du GDR, ces déficits empêchaient la mise au point d'un modèle déterministe de la reproduction de *C. gigas*, indispensable à toute clarification du processus reproductif et à son contrôle multifactoriel par les facteurs externes, approche complémentaire à toute maîtrise zootechnique raisonnée du conditionnement des géniteurs en éclosérie. **Le quatrième objectif du GDR résidait donc dans la construction d'un modèle déterministe de la reproduction chez *C. gigas*, modèle pouvant permettre d'évaluer les performances attendues des gamétogenèses en fonction de l'évolution des facteurs environnementaux, modèle permettant en outre de rassembler de façon synthétique l'ensemble des connaissances acquises sur cette espèce.**

Les questions soulevées par ces 4 points ont donc constitué le cœur de ce GDR. Néanmoins trois autres questions, plus en aval de la gamétogenèse, ont aussi été abordées au cours de ce GDR et l'introduction à ces questions fait l'objet du paragraphe suivant.



Questions posées sur le contrôle de la fécondation et du développement

Le lien entre gaméto-genèse et développement larvaire, voir post-larvaire est mal connu et au début du GDR, des questions sur ce lien se sont posées :

- (1) dans quelle mesure le déroulement de la gaméto-genèse peut il influencer le développement larvaire ?**
- (2) quels sont les mécanismes clés de la fécondation qui peuvent constituer un verrou biologique ?**
- (3) quelles sont les grandes étapes du développement qui peuvent être décisives au succès d'un élevage larvaire ?**

Certes, les réponses à ces 3 questions soulèvent beaucoup d'aspects et pourraient constituer à elle seule l'intégralité d'un autre GDR. Néanmoins, au cours de ce GDR, il a été envisagé d'y répondre pour partie, en ouvrant des perspectives pour la construction d'un nouveau GDR.

Pour répondre à la première question, il a été décidé d'adopter une méthode très pragmatique, visant simplement à valider le bon déroulement de la gaméto-genèse et la qualité des gamètes obtenus au travers de la qualité de l'élevage larvaire qui en découle. En effet, les travaux antérieurs dans le domaine (Robinson, 1992 a&b; Caers *et al.* 2002) ne permettaient pas d'établir un lien clair entre l'influence du conditionnement des géniteurs sur la qualité des gamètes produits et les performances des élevages larvaires menés ultérieurement. Les travaux issus de ce GDR devaient donc apporter de nouveaux éléments permettant de répondre à cette question.

En ce qui concerne la deuxième question, les partenaires GDR ne pouvaient prétendre étudier de façon exhaustive la fécondation. Néanmoins, une action visant à analyser certains de ses mécanismes intimes a été réalisée en parallèle du GDR et est présentée dans le présent document.



Enfin, en ce qui concerne la troisième question, malgré l'importance du groupe des Ostréidés dans les productions en éclosion, peu d'études s'étaient intéressées au développement des jeunes stades de l'huître creuse (larves, post-larves et juvéniles) et plus particulièrement à la mise en place des structures palléales impliquées dans l'alimentation suspensivore (branchies, palpes Labiaux et surface palléale). Certes, beaucoup d'études étaient disponibles pour la phase adulte (Ward *et al.*, 1994, 1998; Cognie *et al.*, 2003), permettant de mettre en évidence les capacités de tri pré-ingestif de l'huître creuse, mais rien n'était disponible sur les phases larvaires, post-larvaires et juvéniles. Pourtant, l'étude détaillée de la mise en place de ces structures peut permettre de mieux comprendre les phases critiques que peuvent présenter un élevage larvaire ou post-larvaire. Des biologistes du GDR se sont donc en partie focalisés sur ce dernier aspect.



Résumé des principales actions du GDR





Origine et développement des cellules germinales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion

Fabioux, C.^{1,2}, Huvet, A.¹, Pouvreau S.¹, Cochard, J.C.¹, Le Pennec, M.²

¹ UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer centre de Brest-Université de Caen, BP 70, 29280 Plouzané, France

² UMR CNRS 6539, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

Le renouvellement annuel de la population de cellules germinales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* est une étape clé de son cycle de reproduction. La compréhension de ces mécanismes est essentielle à la maîtrise de la reproduction contrôlée de *C. gigas*, indispensable pour répondre à une demande croissante des ostréiculteurs, de naissain produit en éclosion. Les objectifs de cette étude étaient de déterminer l'origine et les mécanismes de renouvellement annuel des cellules germinales de *C. gigas* et de comprendre l'influence des facteurs environnementaux sur ces processus.

Le gène Oyster *vasa*-like gene (*Oyvlg*), premier marqueur spécifique des cellules germinales découvert chez les bivalves a été caractérisé. Ce gène, exprimé spécifiquement dans les cellules de la lignée germinale, nous a permis de déterminer que les cellules germinales de *C. gigas*, d'origine mésodermique, étaient différenciées dès le stade embryonnaire sous la forme de cellules germinales primordiales (PGCs). Ces PGCs seraient spécifiées par la localisation de déterminants cytoplasmiques transmis maternellement à l'embryon, dans une structure équivalente à un cytoplasme germinal (Figure 1). Les ARNm *Oyvlg* seraient l'un de ces déterminants germinaux.



Figure 1 : Expression du gène *Oyvlg* (bleu foncé) dans un embryon de *C. gigas* au stade 4 cellules par hybridation *in toto*.

Au stade adulte, la population de cellules germinales apparaît renouvelée annuellement par la prolifération, au début du cycle de reproduction, de cellules germinales souches (GSCs), dispersées en petits groupes dans le tissu conjonctif pendant la période de repos sexuel. La différenciation des GSCs en gonies et la multiplication de ces gonies marque le début de la gamétogenèse. L'expression du gène *Oyvlg* se distingue parfaitement par hybridation *in situ*



au cours de la gamétogenèse, avec une décroissance progressive au cours de la maturation (Figure 2).

Afin de tester l'effet de la température et de la photopériode sur la gamétogenèse, des huîtres adultes ont été conditionnées expérimentalement pendant un an en éclosérie, dans trois conditions de température et de photopériode différentes : (1) conditions dites "naturelles" reproduisant les cycles de température et

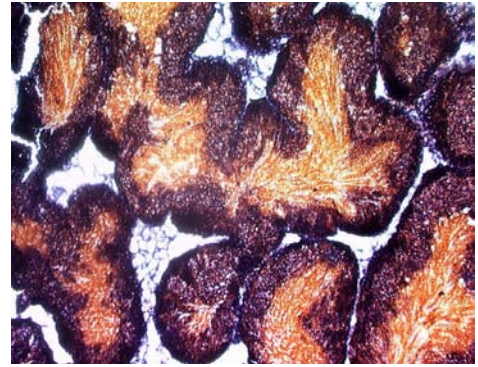


Figure 2 : Expression du gène Oyvlg (bleu foncé) dans les tubules gonadiques mâles de C. gigas au cours de la gamétogenèse par hybridation in situ. Grossissement X200

de photopériode moyens enregistrés à Marennes-Oléron, (2) conditions "accélérées", deux fois plus rapides que les cycles naturels, (3) conditions "hivernales" constantes à 8°C et 8 heures de jour. Ces expérimentations ont mis en évidence une grande plasticité physiologique de la reproduction de *C. gigas*, dont le rythme se synchronise parfaitement sur celui des facteurs température / photopériode. Des photopériodes décroissantes pourraient stimuler la prolifération des cellules germinales souches alors que la température apparaît comme le facteur prédominant dans la régulation des mitoses goniales et de la maturation. Les températures basses (8°C - 11°C) semblent déclencher les mitoses goniales et les températures élevées accélèrent le processus de maturation des cellules germinales. L'utilisation de cycles de température et de photopériode modifiés (accélérés ou hivernaux) permettent donc d'obtenir des gamètes toute l'année en éclosérie, y compris en période automnale généralement considérée comme réfractaire pour le conditionnement.



Déterminisme du conditionnement de *Crassostrea gigas* : I. effet de la température et des réserves

Chávez-Villalba, J.¹, Le Pennec, M.², Cochard, J.C.³, Pouvreau, S.³, Barret, J.³

¹ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., (Unidad Sonora) A.P. 349, 85400 Guaymas, Sonora, México. Tel. +52 622 22 12237, Fax. +52 622 22 1 2238, E-mail: jechávez04@cibnor.mx

² LEMAR, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280-Plouzané, France

³ UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer centre de Brest-Université de Caen, BP 70, 29280 Plouzané, France

L'effet de la température et des réserves sur le conditionnement de *Crassostrea gigas* ont été étudiés en trois étapes successives : 1) étude de l'effet de la température et la photopériode sur le conditionnement automnale, 2) conditionnements avec et sans nourriture pour observer le rôle de réserves au début du cycle de reproduction et 3) conditionnements avec et sans nourriture pendant trois périodes différentes de l'année, avec des huîtres provenant de six régions distinctes de la côte atlantique.

Les résultats nous ont permis d'établir que l'horloge interne qui régule la gamétogenèse chez *C. gigas* peut être modifiée par l'influence des facteurs du milieu, en particulier par la température. En outre, nous avons aussi pu montrer que la photopériode n'exerce pas un rôle majeur. Dans le cas des conditionnements avec différents lots d'animaux, nous avons observé que les huîtres montrent une adaptation très significative aux conditions environnementales particulières à chaque site de culture avec une réponse différente aux expériences de conditionnements en laboratoire.

Plus précisément (figure 1), les individus des régions les plus nordiques, baie des Veys et Aber Benoît, possèdent un stock plus important de réserves et présentent les meilleures performances en laboratoire. L'étude sur les réserves a montré que les huîtres de la baie des Veys utilisent les glucides comme support de la

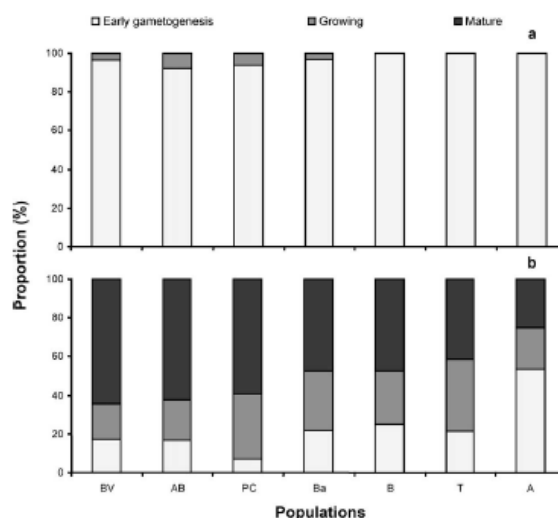


Figure 1 : Proportion des stades ovocytaires en début et fin de conditionnement pour des huîtres de différentes origines : BV : Baie des Veys – AB : Aber Benoît – PC : Pointe du Château – Ba : Baden – B : Bouin – T : La tremblade – A : Arcahon



gamétogenèse tandis que ceux du sud (La Tremblade), à part les glucides, utilisent leurs protéines comme source principale pour le développement des ovocytes. Les huîtres de la baie des Veys et de l'Aber Benoît maintenues sans nourriture, présentent une évolution de la gamétogenèse identique à celle des animaux nourris. La reprise de la gamétogenèse de *C. gigas* semble répondre à deux facteurs : la disponibilité de nourriture et une température minimale spécifique pour chaque lot d'huîtres qui peut varier selon la situation géographique.



Déterminisme du conditionnement de *Crassostrea gigas* : II. effet de la nourriture

Enriquez-Diaz M. ¹, Pouvreau S. ², Le Pennec M. ¹

¹ UMR CNRS 6539, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané France

² UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer centre de Brest-Université de Caen, BP 70, 29280 Plouzané, France

L'intérêt du contrôle de la reproduction des huîtres est l'obtention de larves et/ou de juvéniles de bonne qualité, en quantité suffisante et pendant une saison aussi longue que possible. Une étude sur la variabilité du cycle de reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, a été réalisée (1) *in situ* dans la Baie des Veys (BDV) et dans le Bassin de Marennes-Oléron (MO) et (2) en condition contrôlée à deux niveaux trophiques correspondant respectivement à un apport journalier de 4% et 12% de matière sèche d'algues par matière sèche d'huître. L'objectif général du travail était d'évaluer la relation entre l'abondance de nourriture et l'intensité de la gamétogenèse. L'activité reproductrice a été décrite sur la base d'analyses histologiques semi-quantitatives de la gonade (aire de la gonade). En conditions contrôlées, cette analyse a été complétée par l'étude des réponses physiologiques (filtration, bio-deposition et respiration) des huîtres en conditionnement.

Les huîtres élevées en présence d'une ration trophique riche (BDV et 12%) ont fortement développé leur gonade (fig.1). Cependant, l'efficacité pour émettre leurs gamètes était réduite, entraînant des phénomènes de ponte partielle et une période de résorption prolongée jusqu'à l'hiver. Par contre, les huîtres élevées en régime nutritionnel appauvri (MO et 4%) suivent un cycle de gamétogenèse saisonnier que l'on pourrait qualifier de

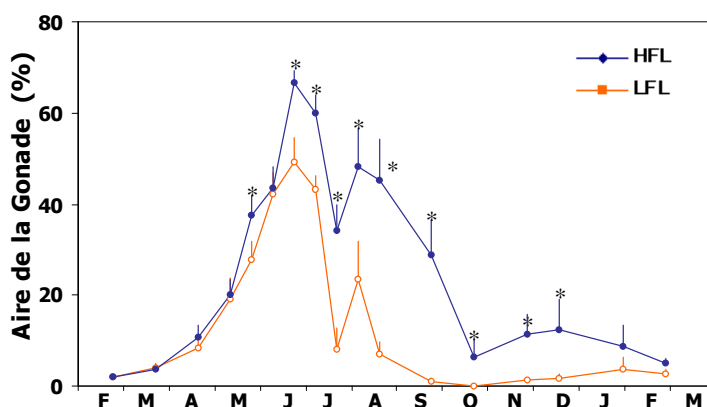


Figure 1 : Variations saisonnières de l'aire occupée par la gonade chez l'huître creuse. Huîtres nourries en condition trophique faible (LFL) et huîtres nourries en condition trophique forte (HFL). (Moyenne gonadique, i.e. % de l'aire occupée par la gonade \pm SE). * = différences significatives.



“classique”. Elles ont produit une gonade “normale” avec une émission de gamètes totale pendant l'été et avec un période de résorption courte pendant l'automne.

En outre, les mesures écophysiologiques réalisées montrent que la période de gamétogenèse influence considérablement la physiologie générale de l'organisme : augmentation du débit de filtration et du métabolisme respiratoire mais, paradoxalement, réduction de l'efficacité d'absorption. Ces résultats montrent aussi que le niveau trophique a influencé négativement le potentiel de croissance (SFG) des huîtres pendant la période gamétogenèse active : le SFG des huîtres en pleine gamétogenèse étant inférieur à celui des huîtres à gamétogenèse restreinte.

En conclusion, *Crassostrea gigas* a montré une stratégie reproductrice plastique aux différents niveaux de nourriture. Ainsi, la concentration de phytoplancton peut moduler le processus reproducteur au niveau de (1) la production de gamètes, (2) l'efficacité de l'émission de gamètes et (3) la durée de la période de maturité et de résorption de gamètes.



Traçage de l'allocation énergétique chez deux modèles de bivalves par l'utilisation de marqueurs isotopiques

Paulet, YM.¹, Lorrain A.¹, Richard J.¹, Pouvreau S.²

¹ UMR CNRS 6539, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

² UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer centre de Brest-Université de Caen, BP 70, 29280 Plouzané, France

Pouvoir connaître et suivre les stratégies d'allocation énergétique chez les mollusques-bivalves est une étape nécessaire à la compréhension de l'écologie d'une espèce dans son milieu, mais aussi une étape utile à tout gestion zootechnique en éclosion. Ainsi, afin de suivre les changements de stratégie d'allocation énergétique chez les bivalves, une méthode de traçage isotopique de la nourriture a été mise au point et comparée chez 2 espèces de bivalves aux stratégies d'allocation connues pour être différentes: l'huître creuse, *Crassostrea gigas* et la coquille Saint Jacques, *Pecten maximus*.

Les isotopes stables naturels du carbone ont été utilisés comme traceur de la nourriture lors de 4 expérimentations menées en condition contrôlée (Station Expérimentale d'Argenton). Chacune de ces expérimentations, caractéristique d'une saison, a consisté à mesurer le $\delta^{13}\text{C}$ d'un régime alimentaire fortement appauvri en ^{13}C et son incorporation dans les différents organes (gonade, muscle adducteur, glande digestive et branchies) de l'huître creuse et de la coquille saint jacques.

A chaque expérimentation, les valeurs isotopiques des différents organes ont été progressivement modifiées au cours du conditionnement et des différences significatives entre les organes, les saisons et les espèces ont été mises en évidence. Un indice d'incorporation (CII) du carbone a été calculé sur les 15 premiers jours de chaque expérimentation afin de comparer l'activité métabolique de chaque organe pour chaque espèce (Figure 1).

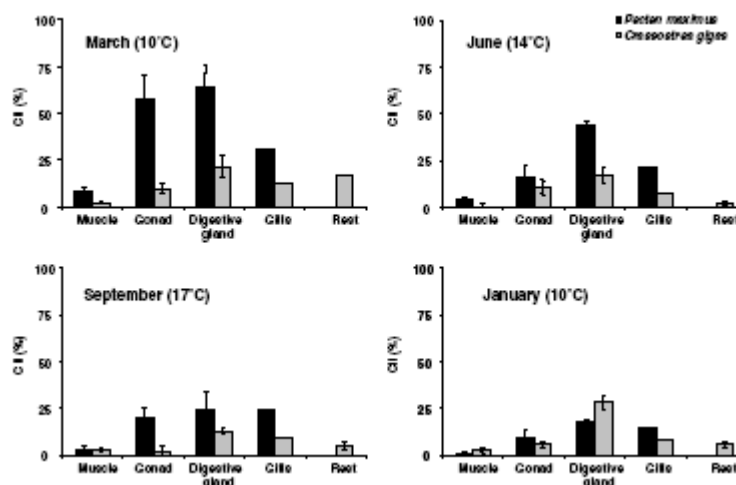


Figure 1 : Valeur de l'indice d'incorporation carbonée CII (%) dans les différents organes et au cours des saisons chez *C. gigas* et *P. maximus*.



Pour chaque espèce, la glande digestive a toujours l'indice CII le plus élevé, alors que le muscle adducteur a toujours eu l'indice le plus faible. Les branchies et les gonades ont présenté des valeurs intermédiaires. D'une façon générale, les valeurs de CII ont toujours été plus forte chez *P. maximus* que chez *C. gigas*, ce qui suggère une activité métabolique plus forte pour cette espèce.

Enfin des variations saisonnières de cet indice ont aussi été mises en évidence pour ces deux espèces et peuvent être interprétées comme des différences métaboliques traduisant des scénarios d'allocation énergétique différents entre les espèces (Figure 2). En outre, cette étude montre que les méthodes de traçage isotopique peuvent constituer un excellent outil pour suivre les stratégies d'allocation énergétique chez les mollusques-bivalves.

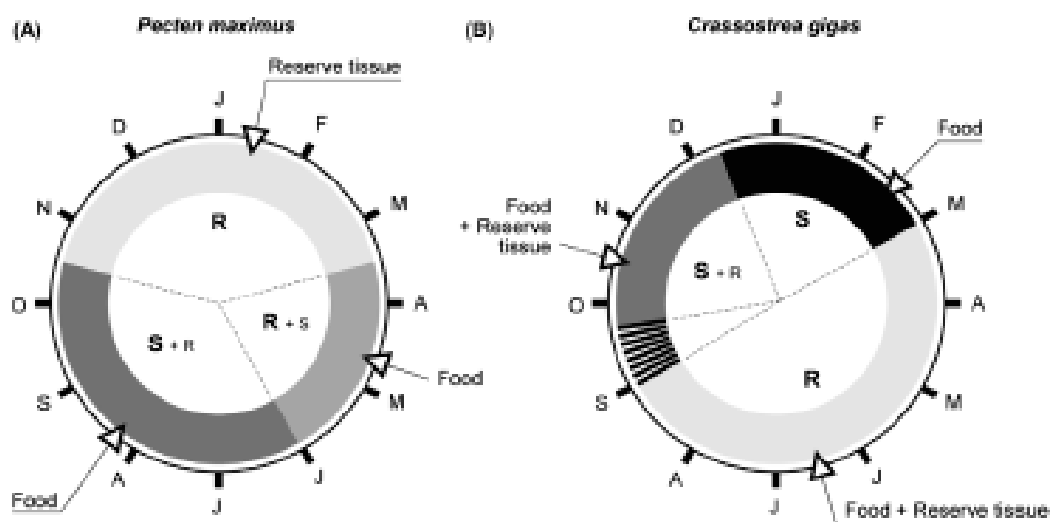


Figure 2 : Proposition d'un modèle conceptuel d'allocation d'énergie chez l'huître creuse et la coquille saint jacques. Les flèches illustrent les flux d'énergie et leur source au cours de trois périodes physiologiques clés pour chaque espèce : Période R pendant laquelle l'énergie est consacrée à la reproduction et Période S pendant laquelle l'énergie est consacrée à la croissance somatique.



Effet des facteurs externes sur la reproduction de l'huître creuse : Bilan des résultats et intégration dans un modèle bio-énergétique.

Pouvreau, S.¹, Bourles, Y.^{1,2}, Enriquez M.^{1,3}, Fabioux C.^{1,3}, P. Le Souchu¹, I. Queau¹, J.P. Conan¹, C. Mingant¹, M. Alunno-Bruscia² et J.C. Cochard¹

¹ UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer centre de Brest-Université de Caen, BP 70, 29280 Plouzané, France

² CREMA, Place du séminaire, 17137 L'Houmeau

³ UMR CNRS 6539, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

Au début du GDR, il avait été fait le constat d'un manque d'approches quantitatives permettant d'évaluer et de hiérarchiser l'effet des facteurs externes sur la gamétogenèse de l'huître creuse. Afin de palier à ce manque, il a été proposé de construire progressivement un modèle bioénergétique pour *C. gigas*, incluant précisément les processus de gamétogenèse et permettant d'analyser et de prévoir les performances de croissance et de reproduction de l'huître creuse en fonction de l'évolution son milieu de vie, de façon générique (tout type d'écosystèmes ostréicoles ou tout type de conditions contrôlées-écloserie/nurserie). La construction d'un tel modèle est une étape relativement lente, mais elle se concrétise en cette fin de GDR et fait actuellement l'objet d'une thèse 2005-2008 (Doctorant : Y. Bourles).

Pour mener à bien ce travail, la démarche au cours du GDR a été la suivante : (1) *In situ*, analyse des relations entre la gamétogenèse et le milieu hydrobiologique sur plusieurs sites ostréicoles en collaboration avec différents laboratoires côtiers de l'Ifremer (analyse de données existantes et ré-acquisition de nouveaux suivis) ; (2) En condition contrôlée, synthèse des résultats acquis sur l'effet des facteurs Température-Nourriture sur la gamétogenèse et analyses complémentaires; (3) Incorporation progressive de l'ensemble des informations dans un modèle bioénergétique de type DEB (Kooijman, 2000) et première phase de validation sur le terrain et en écloserie.



(1) Différents suivis de gamétogenèse sur le terrain ont été acquis au cours de ce GDR. Ils concernent l'Aber Benoit (en 1999, coll. avec J. Chavez, IUEM), l'étang de Thau (en 2001, coll. avec A. Gangnery, Ifremer), le Bassin de Marennes Oléron (en 2002, coll. avec P. Soletchnik, Ifremer), la Baie des Veys en Normandie (en 2002, coll. avec M. Ropert, Ifremer) et le Bassin d'Arcachon (en 2004, coll. avec D. Maurer, Ifremer). En outre, pour ce dernier site, un travail supplémentaire d'analyses de données acquises antérieurement a aussi été mené. L'ensemble de ces suivis ont été analysés en relation avec les

données environnementales fournies par le réseau REPHY de l'Ifremer. Il ressort de cette analyse *in situ* que l'huître creuse montre une reproduction extrêmement flexible intégralement soumise aux facteurs du milieu. Parmi les différents facteurs du milieu, la quantité de nourriture disponible est le paramètre clés qui décide, au printemps de la quantité de gamètes produits et en hiver du niveau d'accumulation des réserves. La température joue bien évidemment un rôle dans le synchronisme des cycles avec la saison et l'accélération des processus physiologiques, mais finalement de façon secondaire dans l'explication des différences entre les sites. Ces deux variables ont donc été intégrées en tant que variables forçantes du modèle.

(2) En condition contrôlée, l'effet de ces variables a été vérifié par des approches écophysologiques. Une augmentation de la nourriture (jusqu'à une valeur optimale compte tenu des caractéristiques de la filtration de *C. gigas*) permet de maximiser le flux d'énergie ingérée et par conséquent le flux assimilée, compte tenu d'une digestibilité plutôt élevée des

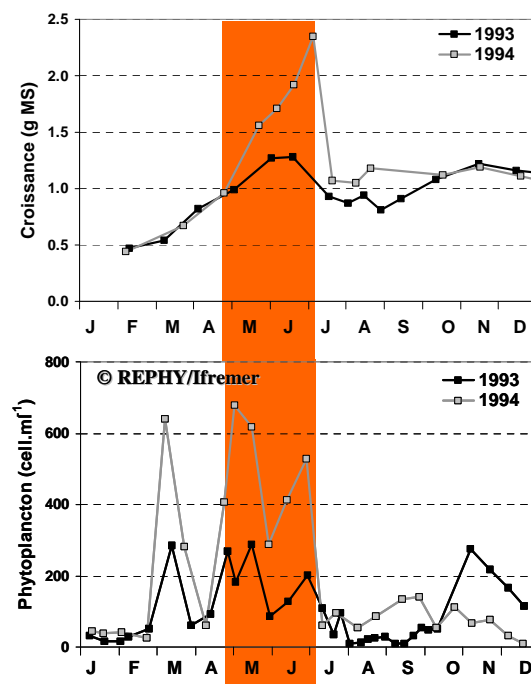


Figure 1 : Suivi de croissance et de gamétogenèse (l'émission des gamètes est très clair en 1994) dans le Bassin d'Arcachon (Source : D. Maurer et I. Auby, LER Arcachon, Ifremer) en relation avec la concentration phytoplanktonique à cette période (Source : Réseau REPHY/Ifremer).



micro-algues (0.75). Dès que de l'énergie est disponible, l'huître investit une part dans sa reproduction, soit directement lors de la gamétogenèse soit indirectement par la constitution de réserves en glycogène, véritable épargne pour une gamétogenèse future. L'effet de la température a aussi été analysé en condition contrôlée (Figure 2). On

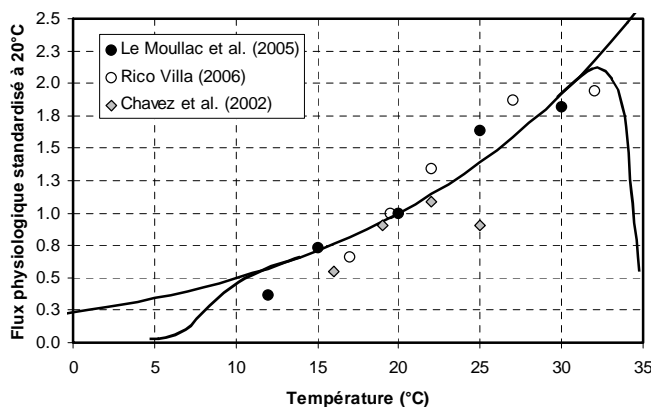


Figure 2 : Effet de la température sur les fonctions physiologiques de *C. gigas* (unité standardisée). Les données de Le Moullac (2006, comm. pers.) sont des valeurs de respiration, les données de Rico-villa (2006, comm. pers.) des taux de croissance larvaire et les données de Chavez (2001) des rapidités de croissance ovocytaires : tous les flux physiologiques suivent le même effet de la température (Kooijman, 2000). Le modèle général et les courbes au limite sont fournies par Van der veer et al. (2006)

retiendra surtout que la température agit selon la loi d'Arrhenius sur l'ensemble des fonctions physiologiques, dont la gamétogenèse, en ralentissant ou accélérant les processus dans une gamme thermique de 8 à 30°C.

(3) L'ensemble des résultats acquis a été intégré dans un modèle mécanistique de bioénergétique permettant d'expliquer et donc de prévoir, en fonction des fluctuations du milieu (température, nourriture) les performances de croissance, de gamétogenèse et de ponte au cours de la vie d'une huître creuse. Ce modèle, de type DEB (Kooijman, 2000), est en cours de validation, mais de premiers essais d'application sont fournis (Figure 3).

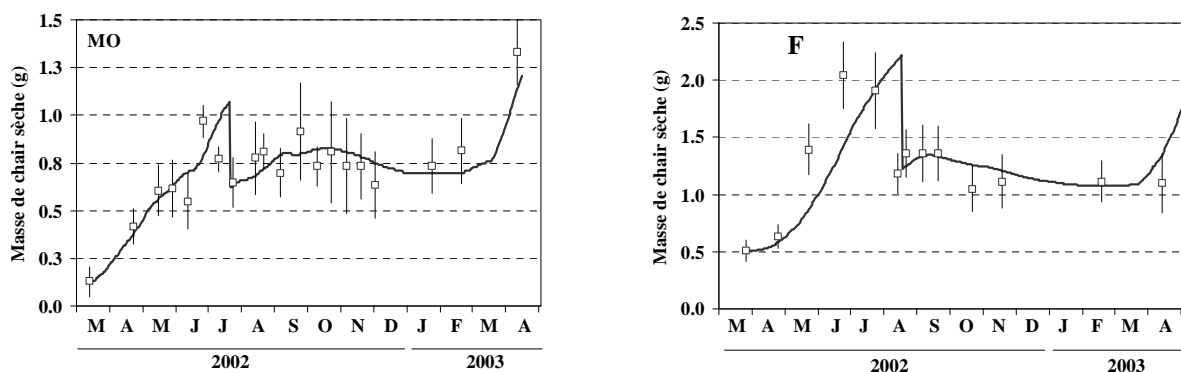


Figure 3 : Simulations de croissance et reproduction obtenues par le modèle à Marennes Oléron et en Baie des Veys. Les croissances observées sur le terrain sont représentées par leur moyenne (+/- Intervalles de confiance). L'émission des gamètes se distingue clairement par la brusque perte de masse, début juillet à Marennes Oléron et en août en Baie des Veys. Les données de milieux sont extraites de la base RÉPHY © IFREMER. Les données de croissance proviennent de Enriquez (2004) et Ropert & Gangnery (2005, comm. pers., LERN/IFREMER).



Enfin, d'une façon générale pour la maîtrise de la reproduction en éclosérie, cette présentation fournit une série de standard zootechnique permettant d'optimiser le conditionnement des géniteurs.



Pourquoi les ovocytes de *Crassostrea gigas* sont fécondables en prophase ?

Moreau M. & Leclerc C.

Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, et GDR 2688 Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 04

Les ovocytes de *Crassostrea gigas* sont bloqués dans la gonade en prophase I. *In vitro*, la sérotonine (5-HT) permet la reprise de la méiose et l'ovocyte se bloque de nouveau en métaphase I (voir fig1).

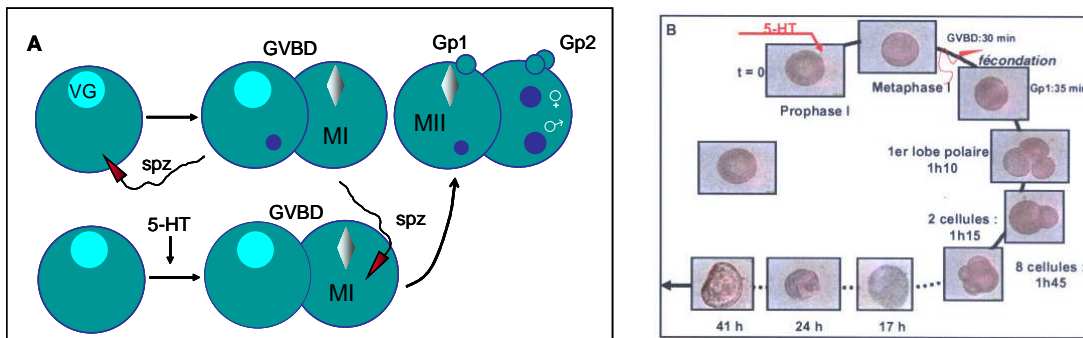


Figure 1 : Les premiers événements du développement de *Crassostrea Gigas*. **A.** Méiose et fécondation. **B.** Développement de l'huître depuis la fécondation jusqu'à la formation de la larve **D.** GVBD, Germinal Vesicle Breakdown ; MI, métaphase I ; MII, métaphase II ; spz, spermatozoïde ; Gp1, premier globule polaire ; Gp2, second globule polaire.

Nous avons montré par des techniques d'imagerie cellulaire que les levées des blocages prophasiques (rupture de la vésicule germinative ou GVBD) et métaphasique (émission du 1er globule polaire) étaient sous la dépendance d'une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Cette variation de Ca^{2+} résultant d'une activation de canaux Ca^{2+} voltage dépendants et d'une libération de Ca^{2+} à partir de stocks intracellulaires (fig. 2).

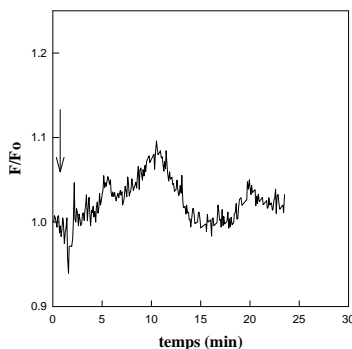


Figure 2 : Variation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), lors de la reprise de la méiose déclenchée par la 5-HT 10^{-5} M. Les mouvements de Ca^{2+} ont été détectés en fluorescence sur des ovocytes chargés en Fluo-3. La flèche indique l'addition de 5-HT.



Nous pensons que les éléments de transduction ionique doivent se mettre en place au plus tard lors du blocage en prophase I, voire pendant la vitellogénèse. In vivo, c'est le spermatozoïde qui produit la levée de ces blocages. Les fécondations sont impossibles dans un milieu dépourvu de calcium. Toutes nos expériences ont clairement indiqués que le rôle du spermatozoïde est de provoquer un influx de Ca^{2+} dans l'ovocyte. Cet influx va entraîner la levée du blocage en métaphase I et l'émission du premier globule polaire (Gp1). Cet influx de Ca^{2+} est lié à la présence de canaux de Ca^{2+} type L sur l'ovocyte. L'expression de ces canaux est requise pour obtenir une fécondation normale. Ainsi, nous envisageons les propriétés de fécondabilité à la fois au niveau du spermatozoïde et de l'ovocyte.

Au niveau du spermatozoïde :

Le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle fondamental dans les phénomènes ioniques associés à la fécondation in vitro. Le NO est vraisemblablement le déclencheur de la variation de Ca^{2+} . L'hypothèse de travail est que le NO est produit au niveau des gamètes via une NO synthase. Nous envisageons donc de mettre en évidence la présence de NO synthase au niveau des gamètes par marquage immunocytochimique. Les différences de fécondabilité des spermatozoïdes pourraient être dues à un niveau de NO synthase différent dans les spermatozoïdes. Nous nous proposons de tester cette dernière hypothèse en mettant en corrélation pouvoir fécondant, et niveau de NO synthase dans le spermatozoïde.

Au niveau de l'ovocyte :

Notre démarche globale consiste à faire une étude tout au cours de l'ovogénèse de l'expression des canaux calciques de type L et de corréler cette expression avec la fécondabilité. Les récents développements réalisés à la fois en microscopie et au niveau des sondes fluorescentes permettent de visualiser au niveau membranaire, les canaux calciques et de mettre en évidence l'activité individuelle de ceux-ci. Nous utilisons une technique de TIRFM (total internal reflection fluorescence microscopy) qui permet de visualiser les mouvements de calcium se produisant au niveau membranaire.

Cette technique permet d'enregistrer sur une image 2D une grande quantité de canaux simultanément (environ 300). Cette approche de microscopie optique possède un avantage certain sur l'enregistrement par techniques d'électrophysiologie (patch clamp), elle est



beaucoup moins traumatisante pour la cellule et donne une information spatiale précise et permet d'enregistrer indépendamment plusieurs centaines de canaux à la fois.

Les expériences ont été réalisées à Toulouse sur notre plateforme d'imagerie avec des huîtres à maturité sexuelle.

Dans cette phase exploratoire nous avons mis au point la technique de mesure en cherchant les meilleures conditions d'imagerie sur cette préparation. Ces résultats encourageants nous permettent de visualiser et de quantifier la densité de canaux présents à la surface de la membrane de l'ovocyte. Il semble d'autre part que ces canaux ne soient pas distribués de manière aléatoire (fig.3).

En terme de perspective, nous nous proposons d'analyser au cours d'une année l'évolution de la densité des canaux présents à la surface des ovocytes. La simple mesure de cette densité devrait nous permettre de déterminer à quel moment l'ovocyte est fécondable dans la mesure où les critères macroscopiques sont inefficaces.

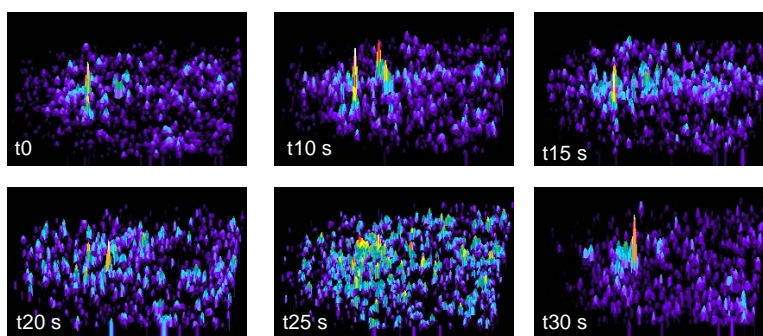


Figure 3: Enregistrement des fluctuations de fluorescence au niveau de la membrane plasmique de l'ovocyte d'huître après dépolarisation par le KCl. Ces fluctuations traduisent le passage de calcium à travers les canaux calciques voltage dépendants. Les variations d'intensité de fluorescence ont été codées en 3 dimensions. L'intensité est représentée selon l'axe Z et codée en fausses couleurs. Le rouge correspond à l'intensité maximum. On peut constater que la distribution des canaux n'est pas homogène. Ces vues sont extraites d'une séquence filmée.



Effet du conditionnement des géniteurs sur la qualité des ovocytes et les performances larvaires et post-larvaires chez *Crassostrea gigas*

Cannuel R. & Beninger P.

Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Ecophysiologie Marine Intégrée, EA 2663, ISOMer - UFR Sciences, BP 92208, Nantes Cedex 3, F-44322 France

L'effet de l'alimentation lors du conditionnement des géniteurs femelles de l'huître *Crassostrea gigas* échantillonnés à une période favorable de l'année a été étudié, utilisant des indices prédéfinis de qualité ovocytaire et de performances larvaires et post-larvaires subséquentes. Les géniteurs ont été collectés dans l'Aber Benoît à la fin avril 2002 et ont été divisés en deux lots : un lot témoin non nourri et un lot nourri (*Isochrysis galbana* T-Iso et *Chaetoceros calcitrans*) et maintenus dans ces conditions pendant 6 semaines avant les fécondations.

Pour chaque type de conditionnement, deux élevages larvaires puis post-larvaires issus de deux femelles distinctes ont été réalisés. Les critères de qualité ont été définis en termes de "prédicteurs" de qualité ovocytaire (teneur en lipides des ovocytes, diamètre des ovocytes matures, maturité ovarienne et présence / absence d'atrésie) et de "validateurs" de qualité ovocytaire (croissance larvaire, consommation algale et temps à la métamorphose, puis croissance post-larvaire).

Aucun effet du régime de conditionnement n'a été détecté, ni sur les prédicteurs de qualité ovocytaire, ni sur les validateurs subséquents, les performances des élevages larvaires et post-larvaires ayant été très bonnes dans les deux cas (figure 1).

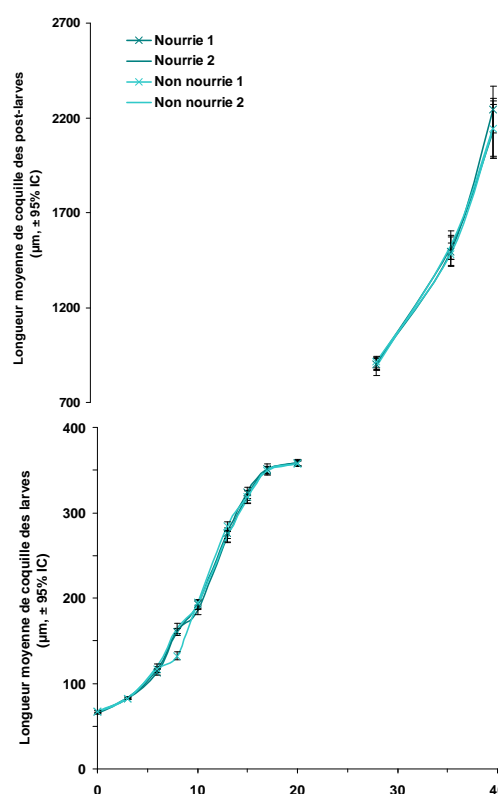


Figure 1 : Evolution des longueurs moyennes des larves et post-larves provenant des 4 géniteurs femelles : nourries et non nourries durant les élevages larvaires et post-larvaires. La longueur à J0 correspond au diamètre moyen des ovocytes. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance à 95% (n = 30).



Il semblerait que l'accumulation de réserves pendant l'hiver, dans l'environnement productif de l'Aber Benoît, soit plus déterminante que le conditionnement trophique lorsque le conditionnement est réalisé au printemps. Etant donné le coût considérable de l'alimentation abondante habituellement distribuée aux géniteurs pendant le conditionnement, nous suggérons de réduire, voire même de supprimer l'alimentation pendant le conditionnement lorsque les conditions hivernales ont été favorables, que le conditionnement est réalisé au printemps et que les gamètes sont collectés par stripping des gonades.



Effet du conditionnement de *Crassostrea gigas* sur la qualité des élevages larvaires

Chávez-Villalba, J.¹, Le Pennec, M.², Cochard, J.C.³, Barret, J.³

¹Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., (Unidad Sonora) A.P. 349, 85400 Guaymas, Sonora, México. Tel. +52 622 22 12237, Fax. +52 622 22 1 2238, E-mail: jechavez04@cibnor.mx

²LEMAR, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280-Plouzané, France

Le présent travail présente les résultats de différentes recherches sur l'effet du conditionnement de *Crassostrea gigas* sur la qualité des élevages larvaires, en 3 points successifs: 1) étude de l'effet de la température et la photopériode en période automnale, 2) étude des huîtres provenant de six régions distinctes de la côte atlantique et conditionnées avec et sans nourriture pendant trois périodes différentes de l'année, et 3) conditionnements avec et sans nourriture au début du cycle de reproduction pour observer le rôle de réserves sur la production d'ovocytes et qualité larvaire.

Ainsi, nous avons pu observer que la production d'ovocytes et de larves viables est possible en automne, pendant la période dite de « repos sexuel » de cette espèce. Concernant les huîtres provenant de différents sites, nous avons observé que les individus des régions les plus nordiques, baie des Veys et Aber Benoît, montrent une proportion plus élevée d'ovocytes matures à la fin des conditionnements et une production plus importante d'ovocytes après la scarification de la gonade. Cependant, les taux d'éclosion sont similaires entre les huîtres nourries et non nourries (figure 1). De plus, la croissance de larves n'est pas différente selon la période testée, entre celle provenant des animaux nourris et celles d'huîtres non nourries.

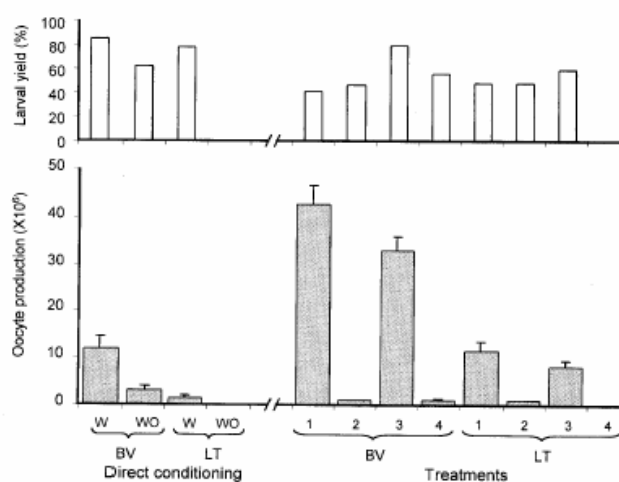


Figure 1 : Production d'ovocytes et de rendement larvaire issus obtenus à partir de différents conditionnements et origines de géniteurs (W : with food / WO : without food / BV : Baie des Veys / LT : La Tremblade)



Ainsi, il semble que les huîtres régulent la qualité des œufs, mais en réduisant leur nombre en condition de pauvreté de nourriture. Les résultats de la dernière expérience montrent que les huîtres nourries produisent significativement plus d'ovocytes que celles non nourries. Il semble que la quantité d'ovocytes produits en conditions artificielles dépende directement de la nourriture offerte pendant le conditionnement. Cependant, pour l'élevage larvaire, il n'existe pas de différences significatives des taux de rendement larvaire (larves « D ») entre les lots d'huîtres nourries et non nourries. Ainsi, la qualité des ovocytes semble liée non seulement à la quantité et à la qualité de la nourriture fournie pendant le conditionnement, mais également à la quantité et à la qualité de réserves accumulées par les huîtres durant leur séjour en mer.



Étude sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* en conditions contrôlées : recherche d'index de qualité

R. Ben Kheder et R. Robert

UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer-Station Expérimentale d'Argenton, 11, Presqu'île du Vivier, 29840 Landunvez

Actuellement, l'aquaculture est en phase d'activité grandissante. Les écloseries françaises fournissent environ 25 à 30 % des juvéniles d'huîtres et leur rôle dans l'industrie conchylicole en est fortement renforcé. Or cet approvisionnement se caractérise par son irrégularité du fait de la variabilité des résultats en termes de croissance, survie larvaire et succès à la métamorphose. Des indices prédictifs de la performance d'un élevage larvaire pourraient être des outils permettant la maîtrise des élevages et l'amélioration de la fiabilité des écloseries.

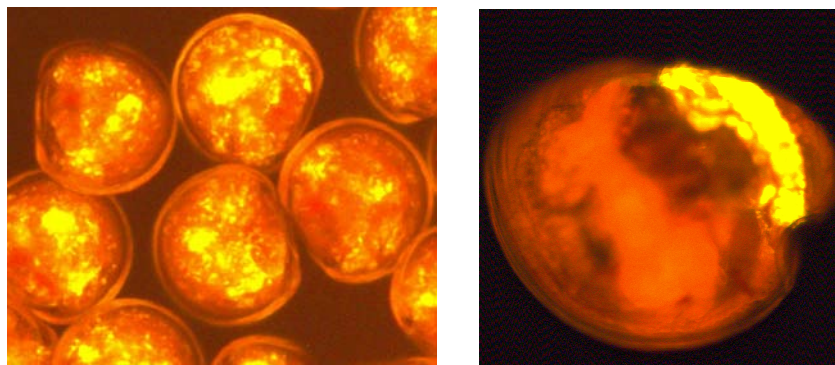
Dans la présente étude, nous avons essayé de valider trois groupes d'indices. Compte tenu l'importance des lipides, en particulier les lipides neutres, en tant que source d'énergie chez les Bivalves, et leur rôle comme indicateur de l'état physiologique des animaux, nos travaux ont consisté, à déterminer les teneurs de triglycérides (lipides de réserves) et de stéroïls (lipides de structure) au cours du développement larvaire en utilisant la technique de chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC). Un rapport triglycérides / stéroïls a été déterminé.

Le poids sec et la matière organique ont été déterminés également chez les larves au cours de l'élevage. Le pourcentage relatif de matière organique ($100 \cdot \text{MO/PS}$), appelé indice de condition larvaire, a été évalué.

Finalement, les réserves lipidiques larvaires ont été colorées spécifiquement par plusieurs procédures (colorant tel que l'Oil Red O, solvants tels que l'éthylène glycol, l'acétone et le diméthyl-sulfoxyde, différents temps de réaction...) mais le protocole le plus pertinent est la coloration fluorimétrique par le Rouge du Nil (Castell et Mann, 1994). L'originalité de la présente étude par rapport à ces auteurs réside dans le traitement des données par analyse d'images. Ainsi, un rapport de la surface de l'image occupée par les lipides à la surface totale



de la larve a été établi (IMAQ Vision Builder version 6) et nous avons pu suivre l'évolution des lipides de réserve lors d'un élevage larvaire (figure 1).



*Figure 1 : Coloration des réserves de lipides neutres chez la larve de *C. gigas*. Photographie prise au microscope à épifluorescence sur larves de *C. gigas* colorées au Rouge du Nil (Nile Red) : A : Larves âgées de deux jours ; B : Larves D âgée de 15 jours.*

Cependant, et afin de pouvoir déterminer la nature de corrélation reliant ces indices et les descripteurs d'élevage larvaire, nous avons divisé notre travail en deux parties majeures. La première a consisté à conduire des élevages larvaires dans les mêmes conditions standards et à déterminer l'expression de ces indices. Dans le second volet, nous avons imposé des conditions extrêmes de développement, notamment de température et de nourriture. A cet effet, trois grandes expérimentations ont été établies. Les deux premières ont pour objectif de déterminer respectivement l'effet de la température (17°C, 22°C, 27°C et 32°C) et de la nourriture (bas régime, moyen régime et haut régime) sur les performances d'élevage larvaire et expression sur les indices de qualité. La troisième est portée sur l'influence du jeûne sur la gestion des réserves lipidiques.



Développement des larves, post-larves et juvéniles de l'huître *Crassostrea gigas* : Identification de stades critiques

Cannuel R. & Beninger P.

Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Ecophysiologie Marine Intégrée, EA 2663, ISOMer - UFR Sciences, BP 92208, Nantes Cedex 3, F-44322 FRANCE

La mise en place des structures palléales responsables de l'alimentation suspensivore (branchies, voies de rejet du manteau et palpes labiaux) a été étudiée chez les larves, post-larves et juvéniles de l'huître *Crassostrea gigas*, afin de mieux comprendre la biologie de l'alimentation des jeunes stades et éventuellement d'identifier des stades potentiellement critiques du développement.

L'étude anatomique de la branchie en microscopie électronique à balayage (MEB) a permis de mettre en évidence le processus de "cavitation-extension" permettant la formation des filaments branchiaux à partir des bourgeons branchiaux. Les demi-branchies internes se formèrent entre 0,29 mm à 2,7 mm de longueur maximale de coquille (branchie en forme de V). Les demi-branchies externes se différencièrent ensuite rapidement entre 2,7 et 2,9 mm (branchie en forme de W). La branchie était alors homorhabdique, uniquement constituée de filaments ordinaires. L'acquisition de la condition hétérorhabdique, marquée par la différenciation des filaments principaux et par le plissement progressif de la branchie, s'effectua à partir de 7,5 mm. Les filaments principaux se formèrent à partir de la fusion de 3 filaments ordinaires, avec un élargissement simultané du filament

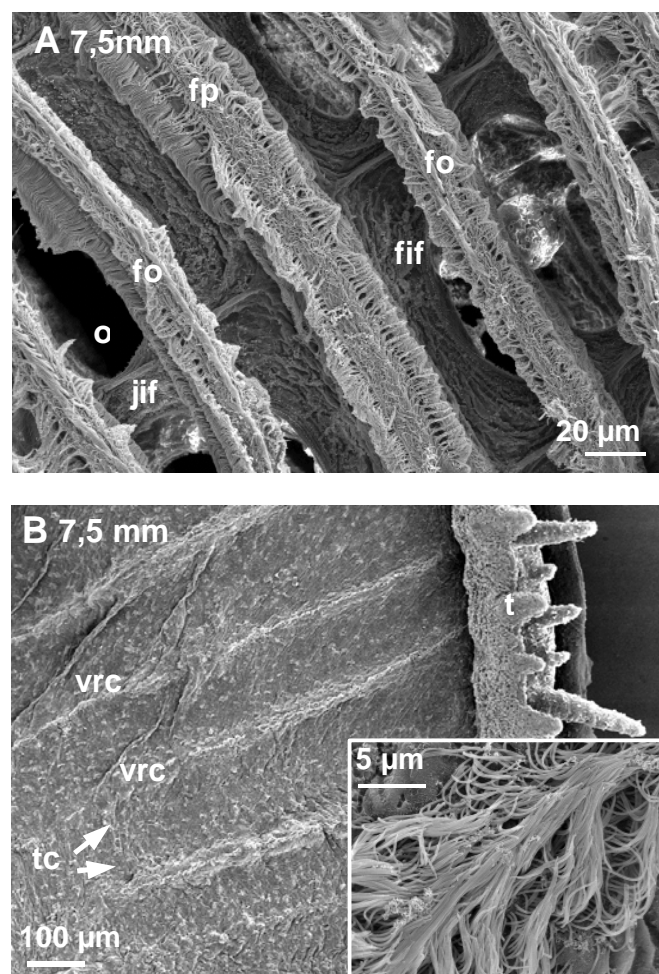


Figure 1: A- Vue frontale d'une lamelle branchiale chez un juvénile de 7,5 mm. fif : fusion inter-filamentaire, fo : filament ordinaire, fp : filament principal, jif : jonction inter-filamentaire, o : ostiole. B- Vue latérale de la surface infrabranchiale du manteau d'un juvénile de 7,5 mm. encart : détail d'une voie radiale de rejet ciliée. t : tentacule, tc : touffes de cils, vrc : voie radiale de rejet ciliée.



central du triplet. Parallèlement, l'étude de la distribution des mucocytes a montré que les filaments branchiaux étaient, à ce stade, déjà différenciés en fonction de leur situation sur les plis branchiaux. La ciliature des filaments ainsi que la mise en place des jonctions branchiales ont également été étudiées, montrant que le développement de la branchie était achevé chez les spécimens de 2,4 cm.

La mise en place du système de voies radiales de rejet du manteau, caractéristique des huîtres, a également été documentée, utilisant la MEB. Une voie marginale de rejet du manteau a été identifiée chez les larves pédivéligères, devenant ensuite le pli interne du bord du manteau chez les post-larves, les juvéniles et les adultes. Une seconde voie marginale ciliée éphémère a ensuite été observée chez les jeunes post-larves de 1,3 mm, ne persistant pas chez les stades ultérieurs. Une ciliature de transition, constituée uniquement de touffes de cils éparses, a été mise en évidence chez les spécimens de 2,7 mm, montrant l'absence de système de rejet des pseudofeces à ce stade. La présence des voies de rejet radiales caractéristiques a ensuite été constatée chez les spécimens de 2,9 mm, stade auquel les palpes labiaux paraissaient être fonctionnels. Le système de rejet complet, beaucoup plus complexe, de rejet des pseudofeces, constitué de voies radiales multiples et d'une voie marginale de collecte composée de voies contiguës, n'a pas été observé avant 1 - 2,4 cm.

Les données anatomiques et micro-anatomiques collectées au cours de ces travaux ont permis de mettre en évidence 3 stades potentiellement critiques pour les jeunes individus :

- (1) la transition du velum à la branchie comme structure responsable de la collecte des particules alimentaires lors de fixation et de la métamorphose (0,33 - 0,42 mm) ;
- (2) la transition d'une branchie en forme de V à une branchie en forme de W ainsi que l'absence de système de rejet des pseudofeces chez les spécimens de 2,7 mm ;
- (3) la transition de la condition homorhabdique à la condition hétérorhabdique à partir de 7,5 mm, la spécialisation cellulaire des filaments branchiaux précédant leur spécialisation anatomique.



Éléments de perspectives : Présentation du GDR 'Qualité des gamètes d'espèces d'intérêt aquacole'

Suquet M.

UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer-Station Expérimentale d'Argenton, 11, Presqu'île du Vivier, 29840 Landunvez. msuquet@ifremer.fr, tel : 02.98.22.43.94

La plupart des espèces marines élevées présentent une forte fécondité. Mais, des survies ultérieures très variables sont obtenues en éclosérie. La reproduction des espèces marines en élevage présente donc moins des problèmes de type quantitatif que qualitatif. Dans ses conclusions, le GDR « Ecophysiologie de la reproduction de l'huître creuse » souligne qu'une approche qualitative est aujourd'hui nécessaire. Cette conclusion est reprise dans le contrat Cryoyster (financé par Ofimer), montrant que l'amélioration de la survie à la congélation était liée au contrôle de la qualité des gamètes de l'huître creuse. L'aquaculture évolue vers un contrôle de plus en plus strict de ses productions. La phase de reproduction n'échappe pas à cette règle, mettant en place des actions de sélection et de création de lignées d'intérêt qui nécessitent l'utilisation de techniques de gestion des gamètes (conservation, obtention de croisements contrôlés), appliquées à des gamètes de qualité contrôlée et optimisée.

La qualité des gamètes est définie comme étant la capacité à produire une descendance viable dont les performances ultérieures sont élevées. Les deux aspects complémentaires de la qualité seront pris en compte :

- Décrire la qualité des gamètes grâce à une panoplie de critères,
- Chercher à comprendre le déterminisme de cette qualité.

Le GDR « Qualité des gamètes d'espèces d'intérêt aquacole » devrait poursuivre un triple but:

- Mettre en place des indicateurs de qualité des gamètes des espèces étudiées,
- Evaluer la variabilité de la qualité des gamètes lors des pratiques d'éclosérie,
- Chercher à contrôler et optimiser cette qualité.

Les deux espèces concernées sont les deux principaux modèles marins représentés à Ifremer :

- L'huître creuse, *Crassostrea gigas* : la qualité des gamètes est mal connue chez cette espèce. Les conséquences de l'extension en éclosérie de la saison naturelle de ponte sur les gamètes ne sont ainsi pas connues.



- Le bar, *Dicentrarchus labrax* : bien que de nombreux éléments de la biologie des gamètes soient connus, une variabilité importante est encore constatée.

Propositions de travail envisagées :

L'huître creuse :

- Mise en place de descripteurs de la qualité des gamètes,
- Qualité des gamètes selon un cycle annuel et diagnostique zoo sanitaire,
- Effet de la durée de la période de conditionnement sur la qualité des gamètes.

Le bar :

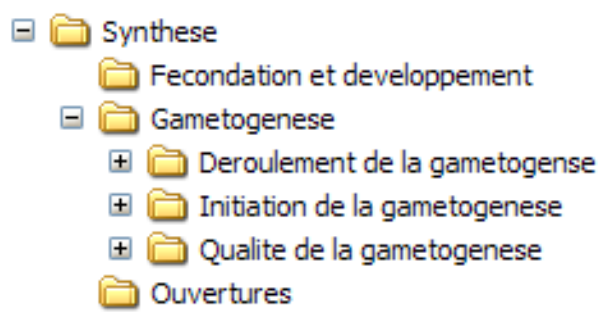
- Mise en place de descripteurs de la qualité des gamètes,
- Qualité des spermatozoïdes hors des voies génitales,
- Qualité et maturation du sperme intra testiculaire,
- Compétence à la maturation des ovocytes.

Ce GDR se composerait de 12 personnes de différents organismes (Ifremer, INRA, CNRS, Sysaaf, IUEM, Université de Caen) et représentant différentes approches de la mesure de la qualité des gamètes. Le projet est en cours de construction et devra être évalué à partir de juin 2006.



Annexes des travaux

L'ensemble des travaux de ce GDR a été compilé sur un CD-Rom fourni avec ce document. Ce CD rassemble, sous forme de fichier PDF, l'ensemble des thèses, publications (parues ou sous presse) et rapports finaux de contrat, selon l'arborescence suivante :





Références Bibliographiques

- Bacher C., Héral M., Deslous-Paoli J.M., Razet D. (1991) Modèle énergétique uniboîte de la croissance des huîtres (*Crassostrea gigas*) dans le bassin de Marennes-Oléron. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 391-404.
- Barillé L., Héral M., Barillé-Boyer A.L. (1997) Modélisation de l'écophysiologie de l'huître *Crassostrea gigas* dans un environnement estuarien. *Aquat. Living Resour.* 10, 31-48.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M. (2000) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West coast of France). *Com. Biochem. Physiol. Part. B.* 125, 359-369.
- Deslous-Paoli, J. M. (1982) Croissance et qualité de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg en élevage dans le bassin de Marennes-Oléron. *TETHYS* 10 (4), 365-371.
- Devauchelle N., Barret J., Salaun G. (1997) La reproduction naturelle et contrôlée des Bivalves cultivés en France. DRV/RA/RST 97-11, Ifremer Brest, 217 pp.
- Dinamani, P., 1987. Gametogenic patterns in populations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Northland, New Zealand. *Aquaculture* 64,65-76.
- Gérard A., Naciri-Graven Y., Boudry P., Launay S., Heurtebise S., Ledu C., Phelipot P. (1997) Contrôle de la gamétognèse des huîtres creuses et plates. In: La reproduction naturelle et contrôlée des Bivalves cultivés en France, Devauchelle N., Barret J., Salaun G. (1997) DRV/RA/RST 97-11, Ifremer Brest, 217 pp.
- Gouletquer P. (1997) Cycle de reproduction naturelle de l'huître creuse *Crassostrea gigas* In: La reproduction naturelle et contrôlée des Bivalves cultivés en France, Devauchelle N., Barret J., Salaun G. (1997). DRV/RA/RST 97-11, Ifremer Brest, 217 pp.
- Hofmann E.E., E.N. Powell, J.M. Klinck, E.A. Wilson (1992) Modelling oyster populations. III Critical feeding periods, growth and reproduction. *J. Shelf. Res.* 11, 399-416.
- Kang, Ch-K., Park, M.S., Lee, P. Y., Choi, W-J. and Lee, W-Ch. (2000) Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the



- Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. J. Shellfish Res. 19(2),771-778.
- Kooijman S.A.L.M. (1986). What the hen can tell about her eggs: egg development on the basis of energy budgets. J. Math. Biol., 23, 163-185.
- Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Pennec, M., Hatt, P. J. (1999) Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest", France. Invertebr. Reprod. Dev. 36(1-3), 141-144.
- Maurer, D., Borel, M. (1986) Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon: comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. Haliotis 15, 125-134.
- Mori, K. (1979) Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 53, 361-369.
- Paniagua-Chávez, C. G., Acosta-Ruiz, M. J. (1995) Gonadal development of *Crassostrea gigas* in Bahía San Quintín, Baja California, Mexico. Ciencias Marinas 20(2), 225-242.
- Perdue J.A. (1982) Gametogenesis and growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). J. Shellfish Res. 2, 105-106.
- Perdue, J. A., Beattie, J. H., Chew, K. K. (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. J. Shellfish Res. 1, 9-16.
- Pouvreau S., Bacher C., Héral M. (2000) Ecophysiological model of growth and reproduction of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, in the planktonic food web of Takapoto lagoon (French Polynesia). Aquaculture 186, 117-144.
- Powell E.N., E.E. Hofmann, J.M Klinck, S.M. Ray (1992). Modeling oyster populations. I. A commentary on filtration rate. Is faster always better ?. J. Shelf. Res. 11, 387-398.
- Raillard O., J-M. Deslous-Paoli, M. Héral, D. Razet (1993) Modélisation du comportement nutritionnel et de la croissance de l'huître japonaise *Crassostrea gigas*. Oceanol. acta 16, 73-82.
- Robert, R., Gérard, A. (1999) Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. Aquat. Living Resour. 12, 121-130.



- Robinson, A., (1992) Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture* 106, 89-97.
- Ross A.H., Nibet R.M. (1990) Dynamic models of growth and reproduction of the mussel *Mytilus edulis* L. *Funct. Ecology* 4, 777-787.
- Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., García-Martín, F. O., Sánchez-López, J. L., (1992) Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 155, 249-262.
- Sphigel, M., Barber, B. J., Mann, R., (1992) Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161,15-25.
- Steele, S., Mulcahy M.F., (1999) Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 79, 673-686.
- Utting S.D. (1993) Procedures for the maintenance and hatchery-conditioning of bivalve broodstocks for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *World Aquaculture* 24, 78-82.
- Utting, S. D., Millican, P. F., (1997) Techniques for the hatchery conditioning of bivalves broodstock and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155, 45-54.
- Van Haren R.J.F., S.A.L.M. Kooijman (1993) Application of dynamic energy budget model to *Mytilus edulis* (L.). *Neth. J. of Sea Reas.* 31, 119-133.
- Willows, R.I. (1992) Optimal digestive investment - A model for filter feeders experiencing variable diets. *Limnol. Oceanog.* 37, 829-847.
- Yakovlev, Y.M. (1977) Reproductive cycle of the Pacific oyster in the sea of Japan. *Biolog. Moyra* 3, 85-87.

Groupe De Recherche IFREMER-Universités 2000-2005

Ecophysiologie de la reproduction chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*



Coordinateurs :

S. Pouvreau⁽¹⁾ et M. Lepennec⁽²⁾

Laboratoires participants:

⁽¹⁾ Département de
Physiologie Fonctionnelle
des Organismes Marins

UMR 100
Ifremer-Station d'Argenton
11, presqu'île du vivier
29840 Argenton

⁽²⁾ Laboratoire des
Sciences de
l'Environnement Marin

UMR 6539
IUEM
Place Nicolas Copernic
29280 Plouzané

⁽³⁾ Laboratoire
d'Ecophysiologie
Marine Intégrée

ISOMer
Université de Nantes
2 rue de la Houssinière
44322 Nantes

⁽⁴⁾ Centre de Biologie du
Développement

UMR 5547
Université Paul Sabatier
118, Route de Narbonne
31062 Toulouse cedex 04

Annexe

La partie annexe de ce document regroupe les 4 volumes de thèses réalisées dans le cadre de ce GDR :

Thèse de Caroline Fabioux (2004)

« Origine et développement des cellules germinales chez l'huître creuse »

Thèse de Jorge Chavez-Villalba (2001)

« Conditionnement expérimental de l'huître creuse »

Thèse de Martha Enriquez-Diaz (2004)

« Variabilité et bio-énergétique de la reproduction chez l'huître creuse »

Thèse de Rozenn Cannuel (2005)

« Bases biologiques de la reproduction de 2 mollusques d'intérêt économique »

