

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

---

ÉCOLE DOCTORALE • CHIMIE BIOLOGIE

Année 2005

Bases biologiques de la production de deux  
Mollusques d'intérêt économique: reproduction  
chez *Megathura crenulata*, reproduction et  
développement chez *Crassostrea gigas*

---



THÈSE DE DOCTORAT  
Discipline: Biologie  
Spécialité: Océanologie biologique

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Rozenn CANNUEL**

*Le 28 octobre 2005, devant le jury ci-dessous*

*Rapporteurs* M. LE PENNEC Marcel, *professeur* • Université de Bretagne Occidentale  
Mme DUFOUR Suzanne, *chercheur* • Université du Québec  
*Examineurs* M. FLEURENCE Joël, *professeur* • Université de Nantes  
M. BARILLÉ Laurent, *maître de conférences* • Université de Nantes  
M. POUVREAU Stéphane, *chercheur* • IFREMER  
M. ROBERT René, *chercheur* • IFREMER

*Directeur de thèse:* M. Peter G. BENINGER, *professeur* • Université de Nantes

## **Remerciements**

*Je tiens à remercier en premier lieu le professeur Peter G. Beninger, qui m'a dirigée pendant ce travail de thèse, pour la qualité de son encadrement, son soutien, ses conseils, son expérience et sa patience.*

*Je remercie également Jean-Michel Robert et Joël Fleurence qui ont permis la réalisation de ces travaux en m'accueillant au sein de leur laboratoire.*

*Je remercie Suzanne Dufour, chercheur à l'Université du Québec, et Marcel Le Pennec, professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, qui ont accepté d'arbitrer ce manuscrit en qualité de rapporteurs, ainsi que MM. Laurent Barillé, Joël Fleurence, Stéphane Pouvreau et René Robert qui ont accepté d'être membres du jury.*

*Je remercie les différents organismes qui ont financé les études réalisées au cours de cette thèse : le Conseil Régional des Pays de Loire pour l'allocation de recherche qui m'a été attribuée, le SMEL et Biosyn Arzneimittel, l'IFREMER et le Conseil Général de Loire Atlantique.*

*Je remercie aussi JC Cochard, S Pouvreau, R Robert, C Mingant, P Le Souchu et tout le personnel de l'Ecloserie expérimentale d'Argenton (IFREMER), pour leur accueil, leur aide et leurs conseils. Je remercie également S Angéri de Vendée Naissain qui nous a gracieusement fourni des juvéniles d'huître.*

*Merci aussi à A Barreau pour ses compétences en Microscopie Electronique à Balayage et à O Aumaille pour son aide en histologie.*

*Je remercie tous les membres du Laboratoire de Biologie Marine de l'Université de Nantes, ainsi que tous les "habitants" d'hier et d'aujourd'hui de la salle 225, dite salle des "thésards", pour leur soutien et leur bonne humeur.*

*Enfin, je tiens à remercier mes deux hommes, le petit et le grand, pour leurs encouragements...*

# SOMMAIRE

Introduction générale	1
<hr/>	
Chapitre 1. Caractéristiques de la reproduction de <i>Megathura crenulata</i> et de <i>Crassostrea gigas</i>	
<hr/>	
1.1 Contexte des travaux	7
1.2 Caractéristiques histologiques et histochimiques de la reproduction de l'archéogastropode d'intérêt médical <i>Megathura crenulata</i> <i>Article publié dans Journal of Shellfish Research</i>	9
A- Abstract	9
B- Résumé	10
C- Introduction	10
D- Material and methods	11
1- Specimen collection and dissection	11
2- Histological techniques	13
3- Stereology	14
4- Oocyte diameters	14
E- Results	14
1- Males	14
<i>Gonad structure</i>	14
<i>Stereology</i>	15
2- Females	16
<i>Gonad structure and oocyte histochemistry</i>	16
<i>Stereology</i>	17
<i>Oocyte diameters</i>	19
F- Discussion	20
1- Gonad structure	20
2- Reproductive cycle	20
3- Oocyte histochemistry	21
G- Acknowledgements	22

1.3 Expérimentation de colorations lipo-spécifiques pour la quantification des réserves vitellines des ovocytes de <i>Megathura crenulata</i> et <i>Crassostrea gigas</i>	25
A- Introduction	25
B- Matériels et méthodes	27
1- Récolte et fixation des ovocytes	27
2- Caractérisation chimique des réserves vitellines de <i>Megathura crenulata</i>	27
3- Mise au point du protocole de coloration à l'ORO des ovocytes de <i>Crassostrea gigas</i>	28
<i>Biométrie des ovocytes</i>	28
<i>Protocole de coloration</i>	28
<i>Dosage des lipides</i>	30
C- Résultats	30
1- <i>Megathura crenulata</i>	30
<i>Structure de la gonade femelle</i>	30
<i>Caractérisation des réserves ovocytaires</i>	30
2- <i>Crassostrea gigas</i>	31
<i>Résultat des colorations</i>	31
<i>Diamètres des ovocytes</i>	31
<i>Absorbances des ovocytes colorés et teneurs en lipides</i>	32
D- Discussion et conclusion	33
E- Remerciements	34

## Chapitre 2. Relation entre reproduction et développement des jeunes stades chez l'huître *Crassostrea gigas*

---

2.1 Contexte des travaux	38
2.2 Etude des effets du jeûne lors du conditionnement en éclosion des géniteurs femelles de <i>Crassostrea gigas</i> sur la qualité des ovocytes et les performances larvaires et post-larvaires ultérieures	
<i>Article publié dans Aquatic Living Resources</i>	39
A- Abstract	39
B- Résumé	40
C- Introduction	41
D- Materials and methods	43
1- Oyster conditioning	43
2- Predictors: Oocyte characteristics	44
<i>Stereology</i>	44
<i>Oocyte diameters</i>	44
<i>Atresia</i>	44
<i>Lipid content</i>	45
3- Fertilizations, larval and post-larval cultures	45
4- Validators: Larval and post-larval performances	46
<i>Algal consumption</i>	46
<i>Growth</i>	46
<i>Time to metamorphosis</i>	46
5- Statistics	47
E- Results	47
1- Predictors: Oocyte characteristics	47
<i>Stereology and oocyte diameters</i>	47
<i>Atresia</i>	49
<i>Oocyte lipid contents</i>	49
2- Validators: Larval and post-larval performances	50
<i>Algal consumption and mortality</i>	50
<i>Larval growth and time to metamorphosis</i>	51
<i>Post-larval growth</i>	52
F- Discussion	54
G- Acknowledgements	56

## Chapitre 3. Développement des larves, post-larves et juvéniles de l'huître *Crassostrea gigas*

---

3.1 Contexte des travaux	57
3.2 Traitement des particules sur les plis branchiaux de l'huître adulte <i>Crassostrea gigas</i> : distribution des mucocytes à fine échelle et implications fonctionnelles	
<i>Article publié dans Marine Ecology Progress Series</i>	60
A- Abstract	60
B- Résumé	61
C- Introduction	62
D- Materials and methods	64
1- Specimen sampling and histological processing	64
2- Estimation of tissue shrinkage and filament width homogeneity	64
3- Mucocyte counts	65
4- Hypotheses and statistical analyses	66
E- Results	66
1- Tissue shrinkage	66
2- Mucocyte types	67
3- Relative mucocyte density on the component filaments	67
4- Mucocyte distribution within the apical filaments	68
5- Mucocyte distribution within the lateral filaments	70
F- Discussion	71
1- Mucocyte types and relative particle processing activity of the filaments	71
2- Alternative functions of the lateral filaments	71
3- Relative mucocyte distributions on the apical filament frontal ciliated tracts	72
4- Functional correlates: Frontal median tract (FMT)	73
5- Functional correlates: Frontal lateral tracts (FLT)	74
G- Conclusions	75
H- Acknowledgements	76

3.3 Acquisition de la capacité de traitement des particules chez les larves et les juvéniles de <i>Crassostrea gigas</i> : étude du développement de la branchie	
<i>Article publié dans Marine Biology</i>	79
A- Abstract	79
B- Résumé	80
C- Introduction	81
D- Materials and methods	83
1- Larval and juvenile rearings	83
2- Juvenile and adult collection	83
3- Scanning electron microscopy (SEM) preparation	84
E- Results	84
1- Overview of the major developmental events	85
2- Detailed chronology of developmental events	86
0.29 mm / 15 days	86
0.33 mm / 20 days	86
0.42 mm / 22 days	86
1.30 mm / 29 days	87
2.70 mm / 36 days	87
2.85 mm / 10 weeks	88
7.50 mm / 13 weeks	88
10.06 mm / 16 weeks	89
23.83 mm / 22 weeks	89
92.33 mm / adults	89
3- Filament number and shell size	91
F- Discussion	92
1- Initial development, inner and outer demibranch formation	92
2- Principal filament differentiation and plica establishment	93
3- Ciliation	95
4- Formation of the ventral particle groove	96
5- Evolutionary implications	96
6- Ecological and aquacultural implications	97
G- Acknowledgements	97

3.4 Etude de la distribution des mucocytes sur la surface frontale des filaments branchiaux – Relation avec l’acquisition de la condition hétérorhabdique chez les juvéniles de <i>Crassostrea gigas</i>	112
A- Introduction	112
B- Matériels et méthodes	113
1- Echantillonnage des juvéniles et traitement histologique	113
2- Mesures de la largeur de la surface frontale des filaments branchiaux	114
3- Comptage des mucocytes	114
4- Calcul du volume relatif des AMPS sécrétés à la surface frontale des trois catégories de filaments définies	115
5- Analyses statistiques	115
C- Résultats	116
1- Type et volume des mucocytes	116
2- Evolution de la largeur de la surface frontale des filaments ordinaires et des filaments principaux	117
3- Evolution des densités et des volumes totaux des mucocytes	118
4- Volume relatif des AMPS produits à la surface frontale des filaments ordinaires apicaux et latéraux, et des filaments principaux	123
D- Discussion et conclusion	124
E- Remerciements	126
3.5 Acquisition de la capacité de traitement des particules chez les larves, post-larves et juvéniles de <i>Crassostrea gigas</i> : ontogénie des voies de rejet des pseudofeces sur le manteau <i>Article accepté dans Marine Ecology Progress Series</i>	127
A- Abstract	127
B- Résumé	128
C- Introduction	128
D- Materials and methods	130
1- Larval and postlarval cultures	130
2- Juvenile collection	131
3- Scanning electron microscopy (SEM) preparation	131



E- Results	132
1- Pediveliger larvae: the marginal rejection tract	133
2- Postlarvae: larval marginal mantle tract evolution to inner mantle fold, appearance of a new marginal ciliary tract	134
3- Transitional phase	134
4- Juveniles: radial and collecting rejection tracts	134
F- Discussion	136
1- The larval marginal tract	136
2- Shift to adult mantle rejection system	136
3- Evolutionary implications	137
4- Ecological and aquacultural implications	138
G- Acknowledgements	139
3.6 Synthèse	149
Conclusion générale	155
Bibliographie	161

---

---

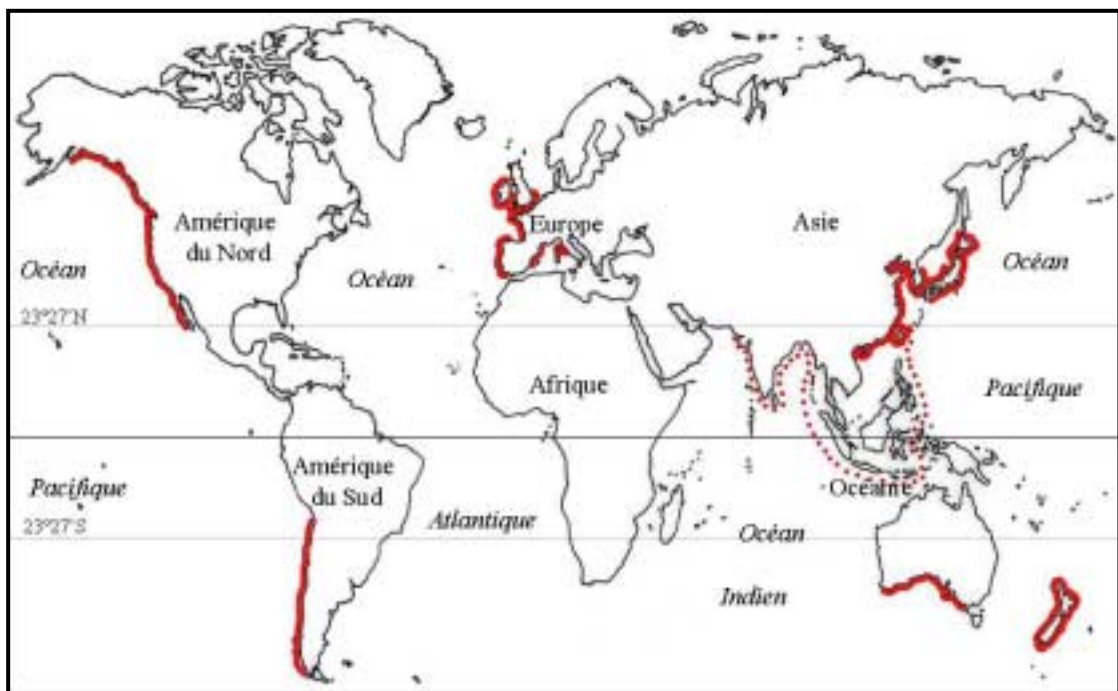
# **Introduction générale**

Les organismes marins présentent un intérêt économique double étant donné qu'ils sont utilisés à la fois comme ressource alimentaire, et, plus récemment, comme source de substances naturelles actives. En ce qui concerne l'exploitation de la biomasse à des fins alimentaires, la production des ressources marines vivantes a connu un essor au cours des vingt dernières années avec une production totale d'environ 87,8 millions de tonnes (MT) en 1984 et de 146,3 MT en 2003, soit une multiplication par un facteur de 1,7 (FAO, 2005). Cependant, une grande hétérogénéité apparaît selon les secteurs considérés. Ainsi si la production totale de poissons est passée de 73,1 à 103,4 MT (soit une augmentation d'un facteur 1,4, inférieure à celle de tous les secteurs confondus, entre 1984 et 2003), certaines productions ont augmenté remarquablement au cours des vingt dernières années. Cet essor concerne en particulier les productions animales côtières, comme par exemple les Crustacés (crevettes, homards, langoustes), les Poissons (bars, saumons) et les Mollusques (ormeaux, coques, moules, huîtres, pétoncles). En effet, entre 1984 et 2003, la généralisation de l'aquaculture ont permis une augmentation de l'exploitation du littoral, et les productions sont passées de 0,92 à 10,5 MT (soit un facteur de 11,5) pour les Crustacés entre 1984 et 2003, de 1,4 à 10,8 MT pour les Poissons (facteur de 7,7) et de 1,8 à 11,5 MT pour les Mollusques (facteur de 6,5) (données FAO, 2005).

En ce qui concerne plus particulièrement les Mollusques, la plus grande part de la production de l'aquaculture en 2003 est assurée par la culture des Bivalves, qui représentent 93,7% de la biomasse produite, soit 10,8 MT (FAO, 2005). La classe des Bivalves, regroupant environ 7500 espèces (Gosling, 2003) dont plusieurs sont exploitées commercialement, notamment les coques, les palourdes, les pétoncles, les moules et les huîtres. Parmi ces coquillages, les huîtres représentent un effectif particulièrement important étant donné que 35,3% des Bivalves produits en aquaculture sont des huîtres, ce qui correspond à une biomasse produite de 3,8 MT en 2003. Avec une production de 3,7 MT en 2003, soit 97,2% de la production totale d'huîtres, l'huître creuse japonaise, *Crassostrea gigas*, apparaît comme l'espèce la plus importante en terme de biomasse (FAO, 2005).

D'un point de vue géographique, *Crassostrea gigas* est une espèce très largement répandue dans le monde (Fig. 1). Originnaire d'Asie, et introduite avec succès dans de nombreuses autres régions du monde (Amérique, Europe, Australie), *C. gigas* est ubiquiste. Alors que l'Asie assure aujourd'hui près de 90% de la production de l'huître creuse japonaise, avec 3,3 MT produites en 2003 (FAO, 2005), l'Europe arrive en deuxième rang avec une production de 0,3 MT, soit environ 8% de la production mondiale en 2003. L'Amérique (Nord et Sud), l'Océanie (Australie, Nouvelle Calédonie et Nouvelle Zélande) puis l'Afrique

assurent ensuite une part mineure de la production. En ce qui concerne l'Europe, la France est le premier pays producteur, assurant environ 94% de la production globale européenne (FAO, 2005), avec environ 110 000 tonnes d'huîtres creuses japonaises produites en 2003, majoritairement sur la côte ouest (Agreste, 2003). Ainsi, du fait de son importance économique régionale mais également nationale et mondiale, la culture de *C. gigas* représente non seulement une ressource alimentaire importante, mais également une source d'emplois et de revenus dans les sites où elle est cultivée, cette espèce est un sujet de recherche privilégié pour les études réalisées en aquaculture.

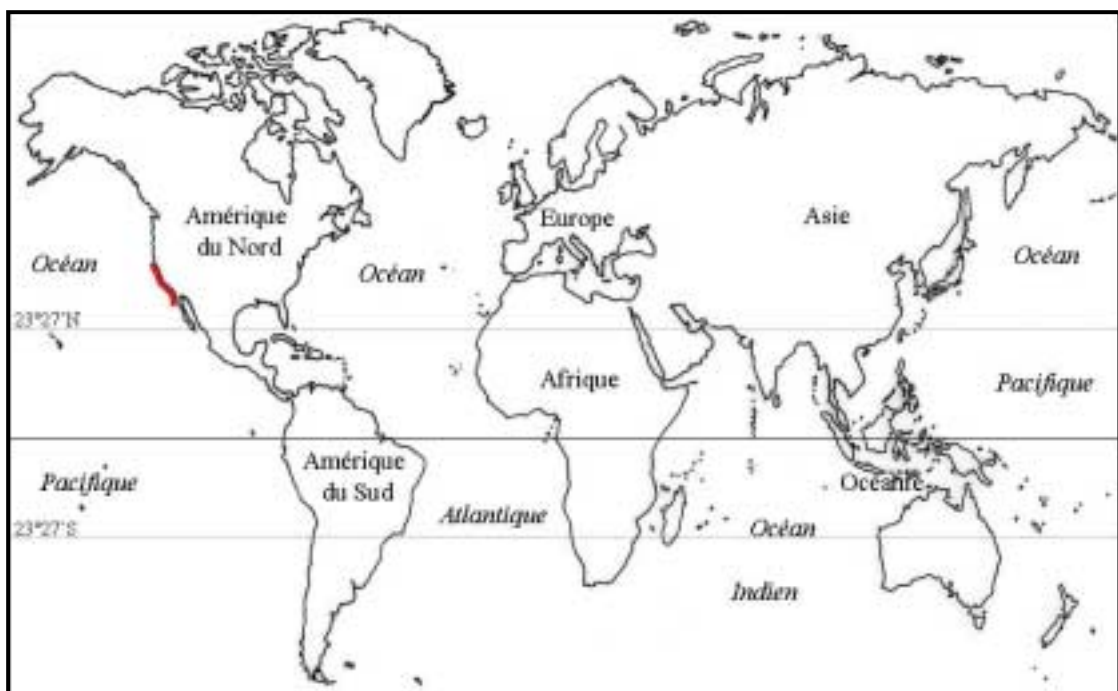


**Figure 1.** *Crassostrea gigas*. Carte de répartition. D'après Carriker & Gaffney (1996) et Gosling (2003).

Parallèlement à la consommation alimentaire des ressources vivantes marines, une autre filière s'est développée beaucoup plus récemment, au début des années 1970, avec la mise en évidence de l'activité biologique de certaines substances isolées à partir d'organismes marins. L'importante biodiversité marine offre en effet un vaste champ de recherche pour l'isolation et l'identification de composés présentant des propriétés intéressantes, notamment des activités anticancéreuses, antitumorales, immunologiques, et écologiques (Hellio *et al.*, 2005) intéressantes et un grand nombre de substances marines à activité biologique a été répertorié jusqu'à ce jour, provenant aussi bien d'organismes végétaux qu'animaux (Faulkner, 1998, 2000; Kornprobst, 2005). Chez les végétaux, alors que les macroalgues sont déjà abondamment utilisées pour la production d'alginate dans le secteur de l'agro-alimentaire, elles s'avèrent également être des sources potentielles de substances bioactives (Itoh *et al.*, 1993; Fuller *et al.*, 1994). De la même façon, certaines substances provenant de microalgues présentent des propriétés thérapeutiques (Shimizu, 1993; Bergé *et al.*, 1999; Carbonnelle *et al.*, 1999; Yim *et al.*, 2005). Des composés bioactifs ont également été isolés à partir d'animaux très variés, comme par exemple des Porifères (Faulkner, 2000) ou leurs symbiontes (Lee *et al.*, 2001), des Cnidaires et Cténares, des Ascidies (Jimeno, 2002), des Echinodermes, des Mollusques (Madden *et al.*, 2000; Jimeno, 2002) et des Vertébrés (voir Kornprobst, 2005). La pharmacologie marine étant une science récente, une très faible part de ces substances bioactives est effectivement commercialisée et seulement 6 molécules sont actuellement disponibles sur le marché. La mise sur la marché d'une nouvelle molécule peut en effet prendre de 10 à 15 ans au cours desquels ont lieu la mise en évidence de son activité biologique, l'isolement et la caractérisation du principe actif et les essais cliniques (Bourguet-Kondracki & Kornprobst, 2005). De plus, le fait que certaines substances ne puissent être obtenues uniquement par extraction à partir de l'organisme marin le synthétisant, alors que d'autres molécules peuvent être aisément synthétisées, est un facteur limitant, posant ainsi le problème de la disponibilité et de l'exploitation de la ressource lorsque l'organisme est rare, ou lorsque son élevage n'est pas encore réalisable.

C'est dans le cadre de la recherche de substances à activité anticancéreuse que l'archéogastropode *Megathura crenulata* est apparu comme une espèce de Mollusque particulièrement intéressante, rencontrée dans les eaux côtières californiennes et dont la présence a été rapportée de Mendocino County (Californie ; 40°N, 115°O) à Isla Asuncion (Mexique ; 27°N, 115°O) (Fig. 2). En effet, une macromolécule isolée à partir de son hémolymphe, le KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), présente une activité anticancéreuse, et est utilisée notamment dans le traitement des cancers de la vessie (Harris & Markl, 1999,

2000). Enfin, le KLH est un stimulant immunitaire, utilisé seul ou associé à d'autres antigènes (Markl *et al.*, 2001). Le KLH est une protéine complexe associée au cuivre d'environ 8 MDa, présentant une structure quaternaire cylindrique et constituée de vingt chaînes polypeptidiques d'environ 400 kDa, repliées en huit sous-unités globulaires. Cette protéine, non synthétisable, fait partie des 6 principes actifs disponibles sur le marché (Bourguet-Kondracki & Kornprobst, 2005). L'importance économique du marché déjà établie par la commercialisation du KLH, l'intérêt médical de l'outil thérapeutique que constitue le KLH et le fait que celui-ci ne soit pas synthétisable mais extrait des animaux, font de *M. crenulata* un sujet de recherche particulièrement pertinent.



**Figure 2.** *Megathura crenulata*. Carte de répartition.

Les activités économiques présentées ci-dessus, basées sur l'élevage ou l'exploitation de populations naturelles de ces deux Mollusques, *Crassostrea gigas* et *Megathura crenulata*, malgré les différences qui les séparent, ont le point commun de présenter certaines faiblesses qui en font des filières fragiles. En effet dans le cas de *M. crenulata*, étant donné l'aire de répartition restreinte de ce Mollusque, la faible disponibilité de la ressource est un facteur limitant majeur à la production de KLH en grandes quantités qui ne peut se baser sur l'exploitation intensive de ces populations naturelles limitées. En plus du souci de préservation de cette espèce, les opérations de prélèvement du KLH sont coûteuses et insatisfaisantes (prélèvements des animaux en mer, saignées des animaux, puis transport de l'hémolymphe jusqu'aux laboratoires). L'élevage de *M. crenulata* constituerait donc une

solution à la fois pour assurer une production constante de KLH, et pour épargner les populations naturelles. Cependant très peu de données sont à ce jour disponibles concernant les aspects fondamentaux de sa biologie, tels que son régime alimentaire et les modalités de sa reproduction et de son développement et le peu de connaissances acquises ne sont pas suffisantes pour envisager l'élevage de ce Mollusque (Tyler, 1939; Webber, 1977; Beninger & Barnathan, données non publiées). Dans le cas de l'huître *C. gigas*, espèce ubiquiste et déjà produite en grandes quantités en aquaculture, la fragilité de la filière ne repose pas sur la rareté de la ressource. En France particulièrement, le fait que la filière ostréicole soit essentiellement basée sur la production de cette espèce représente un risque important en cas d'apparition de pathogènes, comme cela a été le cas pour *Ostrea edulis* et *Crassostrea angulata* (Barnaud, 2001). La production ostréicole dépend également étroitement de facteurs abiotiques non contrôlés et non contrôlables tels que les conditions météorologiques et environnementales, comme par exemple des épisodes de pollution tel que celui engendré par le naufrage de l'Erika en décembre 1999, entraînant des contaminations à plus ou moins long terme (Auffret *et al.*, 2004; Chiffolleau *et al.*, 2005). En France, la filière ostréicole dépend en grande partie du captage de naissain naturel (Gosling, 2003), et le recrutement des juvéniles étant étroitement lié aux conditions environnementales, ceci représente un point faible de la filière. Pour pallier ce problème, l'activité des écloséries, produisant du naissain grâce à des géniteurs maintenus en conditions contrôlées, est en augmentation et représente actuellement environ 25% de l'approvisionnement en naissain. Si les caractéristiques de la reproduction de *C. gigas* sont relativement bien connues (Lubet & Mann, 1987; Lango-Reynoso *et al.*, 1999, 2000; Heude Berthelin *et al.*, 2001; Chávez-Villalba *et al.*, 2001, 2002, 2003 a, b; Gosling, 2003) à l'inverse de *M. crenulata* et si une zootechnie performante a été mise en place pour la production de naissain, peu de connaissances fondamentales des jeunes stades de cette espèce ont été dégagées jusqu'alors. Afin d'apporter d'éventuelles améliorations à l'élevage de cette espèce, il paraissait primordial de documenter la biologie du développement ainsi que les fonctionnements particuliers liés à ces stades sub-adultes.

Les études présentées dans cet ouvrage se sont ainsi centrées sur la reproduction de *Megathura crenulata* ainsi que sur la reproduction et le développement de *Crassostrea gigas*. Dans un premier temps, les travaux ont porté sur la reproduction de ces deux Mollusques. Chez *M. crenulata*, l'objectif des travaux était de dégager les caractéristiques fondamentales de la reproduction, comme le cycle reproducteur, la structure et la dynamique temporelle des gonades et la sexualité, afin d'apporter des éléments nécessaires à l'élevage de ce Mollusque. Dans un deuxième temps, les ovocytes de *M. crenulata* et de *C. gigas* ont été plus

particulièrement étudiés, en termes d'outil d'évaluation de la maturité des femelles et en termes de qualité. En effet, la qualité des ovocytes semblant être un facteur déterminant pouvant influencer la réussite des élevages menés ultérieurement, il paraissait intéressant de pouvoir l'évaluer. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le premier chapitre intitulé "Caractéristiques de la reproduction de *Megathura crenulata* et de *Crassostrea gigas*".

La relation entre le conditionnement trophique des géniteurs, la qualité des ovocytes et les performances des élevages larvaires et post-larvaires ultérieurs a ensuite été abordée. L'objectif était alors d'étudier l'impact de l'alimentation abondante, et particulièrement coûteuse, habituellement fournie aux géniteurs pendant leur conditionnement. Ces résultats font l'objet d'un 2<sup>ème</sup> chapitre intitulé "Relation entre reproduction et développement des jeunes stades chez l'huître *Crassostrea gigas*".

Enfin, dans le 3<sup>ème</sup> chapitre ayant pour sujet le "Développement des larves, post-larves et juvéniles de *Crassostrea gigas*", la mise en place des organes impliqués dans l'alimentation de l'huître a été documentée. La branchie et la surface du manteau ont été plus particulièrement étudiées. Cette partie des travaux a été conduite avec pour objectif l'amélioration des connaissances concernant l'acquisition de la capacité d'alimentation suspensivore chez l'huître, du stade larvaire au stade adulte, et la mise en évidence de stades potentiellement problématiques à la fois en milieu naturel et en élevage.



# **Chapitre 1**

## **Caractéristiques de la reproduction de *Megathura crenulata* et de *Crassostrea gigas***

## 1.1 Contexte des travaux

---

L'étude du cycle reproducteur des Mollusques dans leur milieu naturel permet non seulement de mieux gérer l'exploitation des populations naturelles, mais également d'envisager leur élevage. Celui-ci nécessite en premier lieu le maintien et le conditionnement des géniteurs en milieu contrôlé, la réalisation de fécondations *in vitro* puis l'élevage de juvéniles pour assurer une production d'individus indépendante des variations des conditions environnementales et des variations des ressources naturelles. Dans ce premier chapitre, les travaux se sont ainsi concentrés sur les caractéristiques de la reproduction des deux Mollusques choisis comme sujets d'étude, à savoir *Megathura crenulata* et *Crassostrea gigas*.

Dans le cas de *M. crenulata*, un des obstacles principaux à la réalisation d'élevages est l'absence de données fondamentales concernant la biologie de cette espèce, aussi bien sur son alimentation, sa croissance, ses pathologies, mais également sur les modalités de sa reproduction. Financé et piloté par l'entreprise pharmaceutique allemande Biosyn Arzneimittel GmbH (Fellbach, Allemagne), qui commercialise le KLH extrait de ce Mollusque, et coordonné par le Syndicat Mixte pour l'Équipement de la Mer (SMEL, Blainville, France), un programme de recherche sur la biologie de *M. crenulata*, comportant plusieurs volets, a ainsi été envisagé en 1999/2000, concernant à la fois son alimentation, sa croissance, sa reproduction et son développement. Plusieurs équipes de recherche ont alors été impliquées dans le programme de recherche, s'intéressant chacune à des aspects bien particuliers de la biologie de *M. crenulata*.

L'étude des caractéristiques fondamentales de la reproduction de *M. crenulata* est abordée dans la première partie de ce chapitre, intitulée "Caractéristiques histologiques et histochimiques de la reproduction de l'archéogastropode d'intérêt médical *Megathura crenulata*". Aucune étude de ce type n'ayant été réalisée auparavant chez cette espèce, cette partie des travaux rapporte les premiers résultats concernant son cycle reproducteur. En raison du coût de chaque spécimen, seulement 5 individus ont pu être échantillonnés chaque mois pendant un an, permettant cependant d'obtenir des données exploitables. À l'aide de l'histologie et de la stéréologie, techniques classiquement employées pour étudier les cycles reproducteurs chez les Mollusques (Weibel *et al.*, 1966; Freere, 1967; Webber, 1977; Beninger, 1987; Morvan & Ansell, 1988; Barber & Blake, 1991; Mayhew, 2000; Gosling, 2003) et permettant de dégager des caractéristiques fondamentales du cycle reproducteur non identifiables par le calcul des indices gono-somatiques (Beninger, 1987), plusieurs aspects ont

été étudiés dont la structure de la gonade et le cycle reproducteur annuel. Enfin, l'histochimie a été utilisée pour étudier plus particulièrement les ovocytes de *M. crenulata*.

Suite aux résultats obtenus dans la première partie de l'étude, des techniques alternatives de coloration des réserves vitellines ont été expérimentées à la fois sur des ovocytes de *M. crenulata* et de *Crassostrea gigas*, utilisant l'Oil Red O (Gallager & Mann, 1981; Gallager & Mann, 1986; Gallager *et al.*, 1986) et le Nile Red (Greenspan *et al.*, 1985; Castell & Mann, 1994; Alonzo & Mayzaud, 1999). Chez *M. crenulata*, ces colorations ont été utilisées afin d'obtenir une confirmation de la nature chimique des réserves ovocytaires et de tenter de mettre au point un moyen simple et applicable dans le contexte d'un élevage de localiser la période de ponte et donc de pouvoir planifier et gérer les élevages. Pour *C. gigas*, le contexte de l'étude était différent. En effet, contrairement à *M. crenulata*, une littérature relativement abondante sur la reproduction de cette espèce est disponible, mais malgré tout, certains aspects de celle-ci demeurent encore non élucidés, notamment en ce qui concerne la qualité des ovocytes produits par les géniteurs femelles. Depuis une dizaine d'années, une partie des études réalisées en aquaculture, aussi bien chez les Poissons (Kjørsvik *et al.*, 2003; Mazorra *et al.*, 2003) et les Crustacés (Arcos *et al.*, 2003), que chez les Bivalves (Dorange *et al.*, 1989; Soudant *et al.*, 1996a; Utting & Millican, 1997; Pernet *et al.*, 2003), et notamment les huîtres (Robinson, 1992a,b; Massapina *et al.*, 1999; Valdez Ramirez, 1999; Valdez Ramirez *et al.*, 1999), s'intéresse à la qualité des ovocytes. Ainsi, de nombreux critères ont été envisagés pour évaluer la qualité des ovocytes afin de prévoir le taux de réussite des fécondations et des élevages larvaires ultérieurs (voir Valdez Ramirez, 1999). Si plusieurs critères permettent de présumer de la bonne qualité des ovocytes (taille, forme, intégrité des membranes, teneurs en lipides), il n'existe à l'heure actuelle aucun critère unique permettant d'évaluer de façon simple et rapide la qualité des ovocytes produits par les huîtres. Or, afin d'apporter d'éventuelles améliorations à l'efficacité des écloséries, dont le secteur est en pleine expansion, il paraissait intéressant de mettre au point une technique basée sur une quantification simple et rapide des réserves lipidiques des ovocytes chez *C. gigas*, et applicable dans le contexte d'une éclosérie. Les résultats obtenus lors de l'utilisation des techniques de coloration sur les ovocytes de *M. crenulata* et de *C. gigas* sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre, intitulée "Expérimentation de colorations lipo-spécifiques pour la quantification des réserves vitellines des ovocytes de *Megathura crenulata* et de *Crassostrea gigas*".

## **1.2 Caractéristiques histologiques et histochimiques de la reproduction de l'archéogastropode d'intérêt médical *Megathura crenulata***

---

Article publié:

Journal of Shellfish Research, Volume 20, Pages 301-307, June 2001

### **Reproductive characteristics of the archaeogastropod *Megathura crenulata*.**

**Peter G. BENINGER, Rozenn CANNUEL, Jean-Louis BLIN, Sébastien PIEN & Olivier RICHARD**

#### **A- Abstract**

A histological and histochemical study was performed on individuals of the archaeogastropod *Megathura crenulata* sampled in the field, in order to ascertain the fundamental features of reproductive biology in this species. Basic aspects addressed were gonad and gamete structure, nature of vitelline reserves, and composition of oocyte coat. Stereological counts and oocyte measurements were performed to obtain a quantitative assessment of the reproductive cycle from June 1999 to June 2000. No simultaneous hermaphrodites were observed. The gonad structure of *M. crenulata* consisted of traversing trabeculae from which gametes developed centrifugally. The gonad of both males and females were homogeneous, allowing reliable data to be obtained from a single histological sample of each individual. Mature gametes greatly dominated the profile throughout the study period; coated oocyte diameters were also very stable. These techniques, routinely applied to the study of reproductive cycles, did not allow the identification of spawning preparedness in this species. Vitelline reserves were dominated by non-staining (putatively lipid) vacuoles; no appreciable quantities of glycogen were observed. The oocyte coat was chiefly composed of acid mucopolysaccharides, conferring both mechanical and antimicrobial protection, as well as limiting egg and larval dispersal.

## **B- Résumé**

Une étude histologique et histochimique a été réalisée sur des individus de l'archéogastéropode *Megathura crenulata* échantillonnés dans le milieu naturel pour établir les aspects fondamentaux de la biologie de la reproduction de cette espèce. Les aspects de base ont été abordés: la structure des gonades et des gamètes, la nature des réserves vitellines et la composition de la gaine des ovocytes. Des comptages stéréologiques et des mesures des diamètres ovocytaires ont été effectués de juin 1999 à juin 2000 pour obtenir des données quantitatives sur le cycle reproducteur. Aucun hermaphrodite simultané n'a été rencontré parmi les individus prélevés. La gonade de *M. crenulata* était constituée de travées de tissu conjonctif à partir desquelles les gamètes se développaient de manière centrifuge. Les gonades à la fois des mâles et des femelles étaient homogènes, permettant d'obtenir des données fiables à partir d'un seul prélèvement histologique par individu. Les gamètes matures étaient très majoritaires dans les profils stéréologiques tout au long de la période d'étude; les diamètres des ovocytes gainés étaient également très stables. Ces techniques, habituellement utilisées en routine pour l'étude des cycles reproducteurs, n'ont pas permis de localiser la période d'émission des gamètes chez cette espèce. Les réserves vitellines étaient majoritairement constituées de globules non colorables (probablement de nature lipidique); aucune quantité perceptible de glycogène n'a été décelée dans les ovocytes. L'enveloppe des ovocytes s'est avérée être principalement composée de mucopolysaccharides acides, conférant à la fois une protection mécanique et antimicrobienne aux masses d'œufs et limitant la dispersion des œufs et des larves.

## **C- Introduction**

Many marine natural products present biological activity in humans, and are used in medical testing or in pharmaceuticals (Munro *et al.*, 1987; Ireland *et al.*, 1989; Kobayashi *et al.*, 1989; Suffness *et al.*, 1989; Faulkner, 2000). The archaeogastropod *Megathura crenulata* is a keyhole limpet native to the California Pacific Coast, with a reported range from Mendocino County (40°N; 124°W) to Isla Asuncio (27°N; 115°W). Keyhole limpet hemocyanin (KLH) of this organism is used in the treatment of certain forms of bladder cancer (Harris & Markl, 1999, 2000). It is thus of considerable medical and economic interest to rear this organism for extraction and purification of the active compound. This goal

requires knowledge concerning essential aspects of *M. crenulata* biology, notably feeding, growth and reproduction.

The sparse studies on reproduction in *M. crenulata* chiefly concern modes of fertilization, which is external and involves several hormonal agents (Tyler, 1939; Webber, 1977). The lack of data on the reproductive biology of *M. crenulata* may be contrasted with the relatively abundant information concerning the highly-prized abalones (*Haliotis spp*), which are commercially important, edible archaeogastropods (Newman, 1967; Purchon, 1977; Fretter, 1984; Hahn, 1989). The present study documents the gonad structure, oocyte histochemistry and reproductive cycle of *M. crenulata* in its natural habitat, with a view toward the long-term objective of cultivation.

## **D- Material and methods**

### **1- Specimen collection and dissection**

The animals used in the present study were obtained from June 1999 to June 2000 from the subtidal zone of Long Beach, California (33°45'N; 118°10'W). The specimens were sent by air to France, where they were dissected and fixed in the SMEL (Syndicat Mixte pour l'Equipeement du Littoral) laboratory in Blainville, Normandy. Five individuals were dissected each month, except in October 1999, when no sampling was possible. In order to verify the structural homogeneity of the gonad, the entire organ was removed in certain individuals of certain months, and several regions were examined (Table 1): a median region (M), a distal extremity (DE) and a proximal extremity (PE). For samples from February, May and June 2000, tissue pieces were obtained from labelled L, M and R regions, allowing the distinction of left (L), median (M), and right (R) regions of the gonad. The types of histological sample are summarized in Table 1 for each individual and each sampling date.

**Table 1.** *Megathura crenulata*. Summary of histological sample types for males and females examined. I: undetermined gonad region; M: median gonad region; P: proximal region of non-oriented gonad (organ previously removed from individual); D: distal region of non-oriented gonad; R: right region of oriented gonad; L: left region of oriented gonad.

**Tableau 1.** *Megathura crenulata*. Résumé des types d'échantillons histologiques examinés pour les mâles et femelles. I: partie indéterminée de la gonade; M: partie médiane de la gonade; P: partie proximale de la gonade non-orientée (gonade préalablement extraite de l'individu et non orientable); D: partie distale de la gonade non-orientée; R: partie droite de la gonade orientée; L: partie gauche de la gonade orientée.

Date	Males	Male gonad regions	Females	Female gonad regions
06/99	-	-	1	I
	-	-	2	M, P, D
	-	-	3	I
07/99	1	I	1	I
	2	M, P, D	2	I
	3	I	-	-
08/99	1	M, P, D	1	M, P, D
	2	M, P, D	2	I
	3	I	-	-
09/99	1	I	1	M, P, D
	2	I	2	I
	-	-	3	M, P, D
10/99	-	-	-	-
11/99	1	I	1	I
	2	I	2	I
	-	-	3	M, P, D
12/99	1	I	1	I
	2	I	2	I
	-	-	3	M, P, D
01/00	1	M, P, D	1	I
	2	I	2	M, P, D
	3	I	-	-
02/00	1	R, L, M	1	R, L, M
	2	R, L, M	2	R, L, M
	-	-	3	R, L, M
03/00	-	-	-	-
04/00	-	-	1	R, L, M
05/00	1	R, L, M	1	R, L, M
	2	R, L, M	2	R, L, M
	3	R, L, M	-	-
06/00	1	R, L, M	1	R, L, M
	-	-	2	I
	-	-	3	R, L, M
	-	-	4	I

## 2- Histological techniques

In most cases, entire gonads were fixed in aqueous Bouin's solution. In an effort to improve fixation, small pieces of the gonad were fixed in March and April; however, the resulting sections showed that this provoked extensive leakage of gametes, such that the sections could not be used for males in either month, and for females in March. From February, May, and June 2000, in which the dissections allowed the distinction of three different regions of the gonad, histological samples were directly fixed. After rinsing for a minimum of 10 h and dehydration in an ascending ethanol – Bioclear ® series, the biopsies were embedded in paraffin and sectioned at 7 µm.

Several staining protocols were developed for this study, based on Martoja and Martoja-Pierson (1967), Gabe (1968) and Vacca (1985), as indicated in Table 2. A modified Masson's trichrome protocol using fast green, trioxymatein, and acid fuchsin allowed the topological study of the gonads, distinguishing connective tissue, oocyte coat, cytoplasm, nucleus, chromatin, and nucleolus. Periodic acid-Schiff reagents with positive (oyster digestive gland) and negative (amylase-digested sections of gonad) controls were used to determine the eventual presence of glycogen in the oocyte cytoplasm, as well as neutral mucopolysaccharides (NMPS) in the oocyte coat. Alcian blue was used to determine the presence of acid mucopolysaccharides (AMPS) in the oocyte coat.

**Table 2.** *Megathura crenulata*. Summary of stains used, and cellular and molecular components targeted.

**Tableau 2.** *Megathura crenulata*. Résumé des colorants utilisés et des composants moléculaires et cellulaires cibles.

Stain used	Structures and molecules targeted	Cellular and tissue constituents
Acid fuchsin	Cytoplasmic granules	Cytoplasmic granules
Fast green	Reticulate fibres, collagen	Connective tissue
Trioxymatein	Nucleic acids	Nucleus, nucleolus and chromatin
PAS-alcian blue	Neutral and acid mucopolysaccharides; Glycogen	Oocyte coat Possible glycogen



### **3- Stereology**

Stereological counts were performed in order to quantify the proportions of the different tissue types in the histological sections; variations in the proportions of the different tissue categories thus reflected variations in the different phases of reproductive activity (Weibel *et al.*, 1966; Briarty, 1975; Beninger, 1987; Morvan & Ansell, 1988; Pazos *et al.*, 1996; Mayhew, 2000); counts were performed on surfaces of measured area, using a  $9 \times 9$  point matrix on a microscope projector.

In males, four tissue categories were identified for stereological purposes: trabecular tissue, developing gametes, mature gametes, and unoccupied space. In females, three tissue categories were identified: coated oocytes, non-coated oocytes, and trabecular tissue. Due to the loose nature of the female gonad tissue, it was impossible to determine whether observed unoccupied spaces were real or artefacts of gonad dissection. Stereological counts were therefore performed only on areas without visible unoccupied space.

Nine counts were performed for each individual and region of the gonad, and the means (with 95% confidence intervals) of all male and female counts were plotted.

### **4- Oocyte diameters**

Oocyte diameters were measured for 30 coated oocytes for each female and for each gonad region, using a calibrated optical micrometer. In order to standardize the measurements, only oocytes in which the nucleolus was visible (approximately the center of the cell) were selected. The evolution of oocyte diameters could then be recorded throughout the year.

## **E- Results**

### **1- Males**

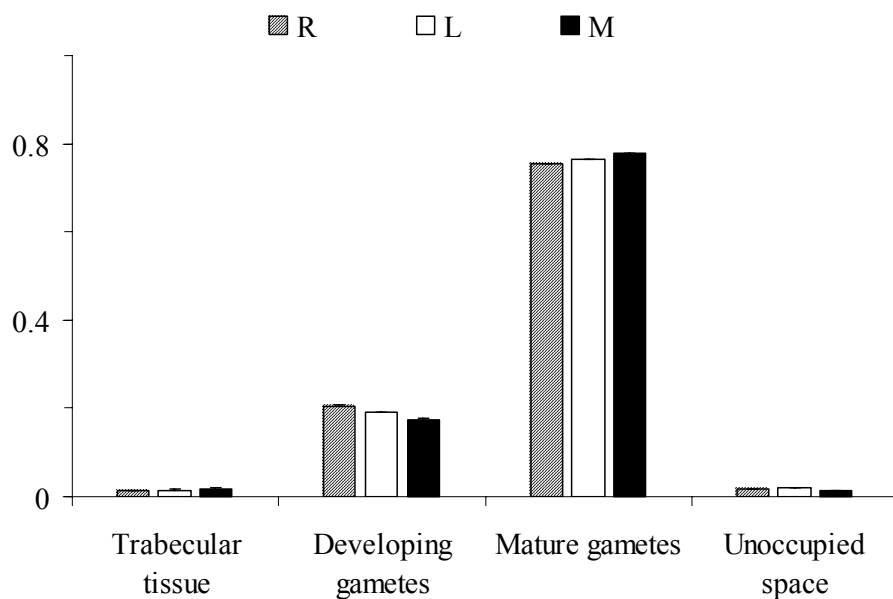
#### *Gonad structure*

The general structure of the male gonad is presented in Figure 3-1. The gonad was composed of connective tissue trabeculae, from which arise centrifugally the germ cells, first visible as developing aflagellate gametes, and then the mature flagellate spermatozoa. The mature spermatozoa occupied the majority of the sectional area (Fig. 3-1, Fig. 4).

### Stereology

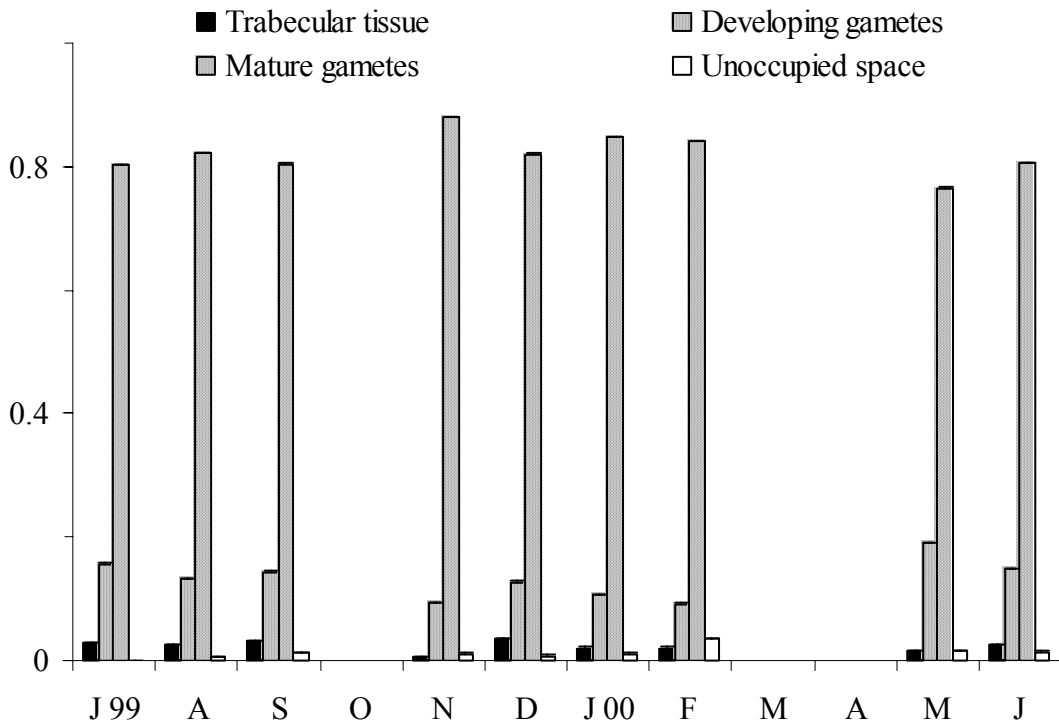
Testicle homogeneity was verified in 1 to 3 individuals from July, August 1999 and January, February and May 2000, using stereological counts. The results shown in Figure 4 indicate that the male gonad was structurally homogeneous and gametogenetically synchronous. Reliable data for histological study may therefore be obtained from only one histological sample per individual.

The male gonad presented a stable histological profile throughout the study period from July 1999 to June 2000. Mature spermatozoa occupied almost the entire gonad, with mean volume fractions of 0.77 (May 2000) to 0.88 (November 1999). In comparison, developing gametes occupied a low proportion of the gonad, from 0.095 (November 1999) to 0.16 (July 1999). Trabecular tissue occupied a low and stable proportion of the testicle (approximately 0.03). Unoccupied space was rare (Fig. 5).



**Figure 4.** *Megathura crenulata*. Volume fractions of tissue categories in right (R), left (L), and median (M) gonad regions of three males sampled in May 2000. The 95% confidence intervals are too small to be seen.

**Figure 4.** *Megathura crenulata*. Fractions de volume de gonade pour chaque catégorie de tissu dans les régions droite (R), gauche (L) et médiane (M) de la gonade de trois mâles échantillonnés en mai 2000. Les intervalles de confiance à 95%, trop petits, ne sont pas visibles.



**Figure 5.** *Megathura crenulata*. Evolution of tissue volume fractions in males, July 1999 to June 2000. The 95% confidence intervals are too small to be seen. Data unavailable in October, March and April due to sampling difficulties.

**Figure 5.** *Megathura crenulata*. Evolution des fractions de volume de tissu chez les mâles, de juillet 1999 à juin 2000. Les intervalles de confiance à 95%, trop petits, ne sont pas visibles. Données non disponibles en octobre, mars et avril en raison de difficultés d'échantillonnage.

## 2- Females

### *Gonad structure and oocyte histochemistry*

The structure of the female gonad is shown in Figure 3-2. Trabeculae consisted of connective tissue (Fast Green positive) and were often masked by the acid fuchsin. Uncoated oocytes adhered to the trabecular tissue and were small (approximately 25  $\mu\text{m}$ ); their cytoplasm was less intensely stained compared to coated oocytes. Unstained regions of trichrome – stained sections corresponded to the oocyte coat, which like the oocytes themselves appeared to be of constant dimension when the sectional plane passed through the nucleus. The cytoplasm of coated oocytes stained intensely with both trioxyhematein and acid fuchsin, indicating the presence of numerous cytoplasmic globules. Many unstained globules (poorly visible in photographs due to the great staining heterogeneity of the sections) were present in the cytoplasm of the coated oocytes (Fig. 3-2, 3-5, 3-6). Of the major biochemical tissue constituents, Masson's trichrome does not stain lipids (which are extracted

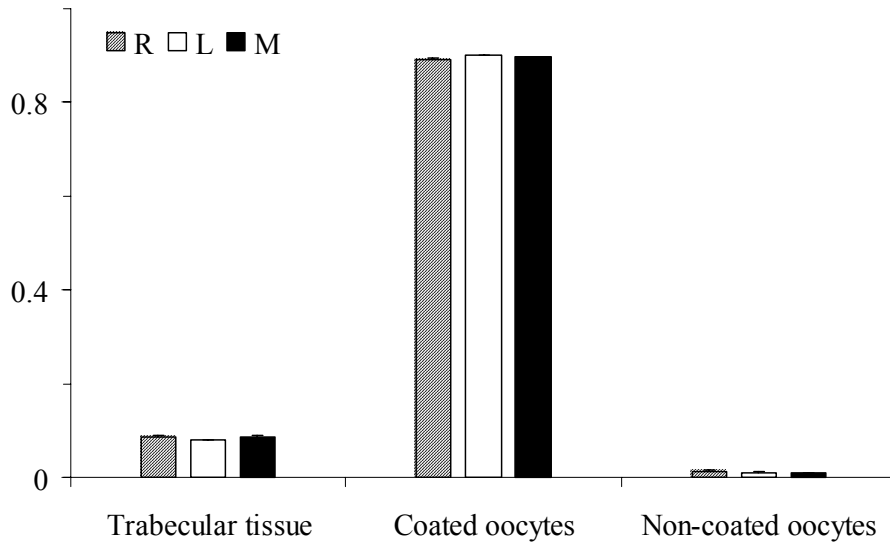
during section preparation) or AMPS; as the globules were not alcian-blue positive (Fig. 3-3 to 3-6), they were very probably lipid in nature.

The intensity of the cytoplasmic staining obscured the nucleus of those oocytes for which the sectional plane did not pass through the nucleus. When visible, the large nucleus (approximately 75  $\mu\text{m}$ ) presented dispersed heterochromatin and a single nucleolus (Fig. 3-2).

The oocyte coat appeared to be composed of two layers: a high-density proximal layer and a lower-density distal layer (Fig. 3-2). Staining with alcian blue confirmed this structure, and identified the principal coat constituent as AMPS (Fig. 1-3 to 1-6). Counterstaining with trioxymethine was extensive in the cytoplasm, indicating the presence of large quantities of nucleic acids, suggesting considerable anabolic activity (Fig. 3-3, 3-4). The negative PAS reaction indicated both an absence of appreciable quantities of glycogen in the oocytes, and an absence of NMPS in the oocyte coat (Fig. 3-5, 3-6).

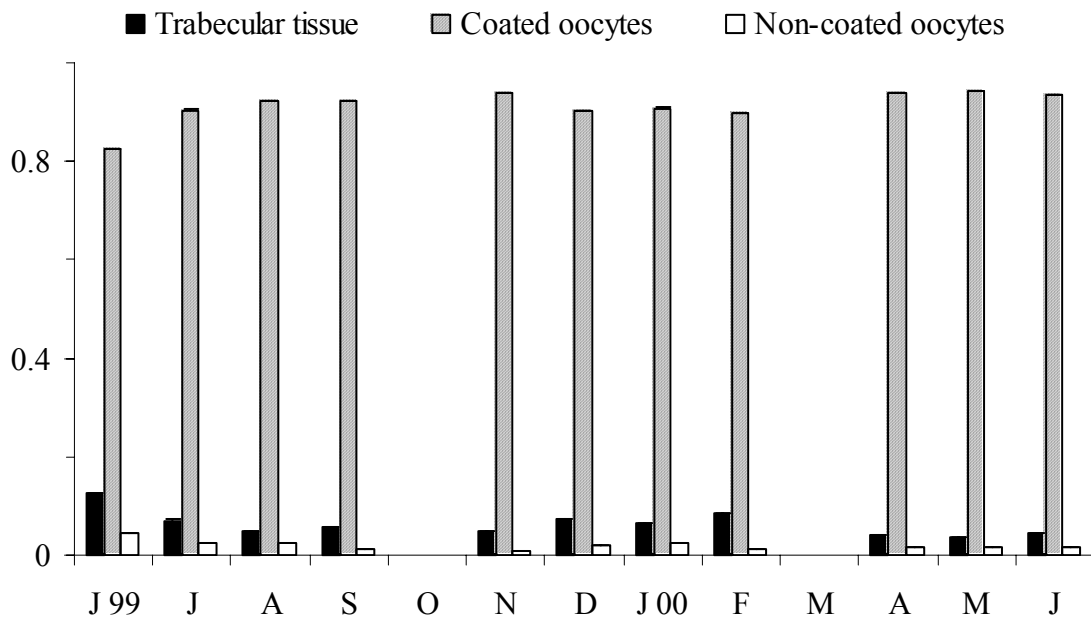
#### *Stereology*

Ovarian homogeneity was verified in June, August, September, November and December 1999, and in February, April, May and June 2000. The near-identical volume fractions for the three identified ovary regions demonstrated the homogeneity of this organ (Fig. 6). These data confirm that the female gonad was structurally homogenous and gametogenetically synchronous. As was the case for the male gonad, representative histological data may thus be obtained from a single histological sample per individual. Similarly, the female gonad showed a stable tissue profile throughout the sampling period. Coated oocytes represented the great majority of the mean volume fraction (Fig. 7), from 0.83 (June 1999) to 0.94 (November 1999). Uncoated oocytes represented a small mean volume fraction, from 0.01 (November 1999) to 0.04 (June 1999). The mean volume fraction of trabecular tissue was also small: 0.035 (May 2000) to 0.12 (June 1999).



**Figure 6.** *Megathura crenulata*. Volume fractions of tissue categories in right (R), left (L), and median (M) gonad regions of three females sampled in February 2000. The 95% confidence intervals are too small to be seen.

**Figure 6.** *Megathura crenulata*. Fractions de volume de gonade de chaque catégorie de tissu dans les parties droites (R), gauche (L) et médiane (M) de la gonade de trois femelles échantillonnées en février 2000. Les intervalles de confiance à 95%, trop petits, ne sont pas visibles.

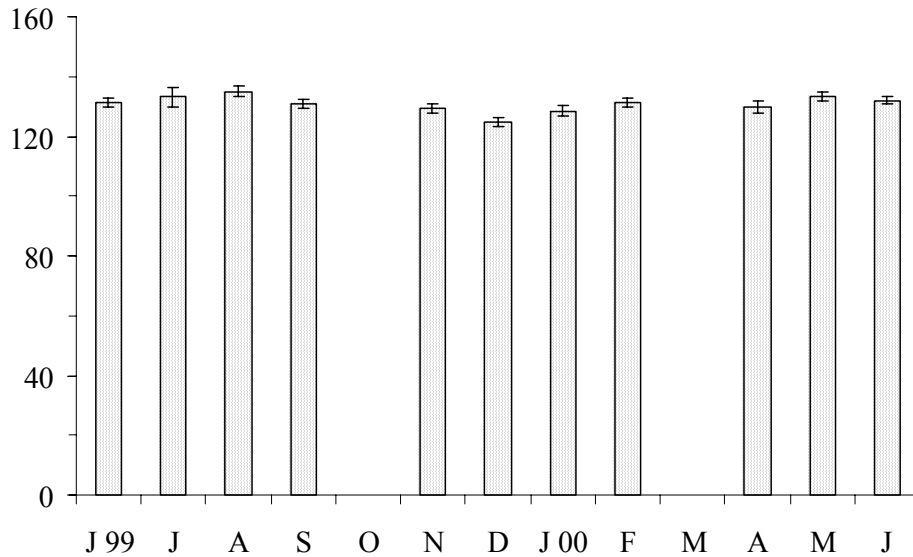


**Figure 7.** *Megathura crenulata*. Evolution of tissue volume fractions in females, June 1999 to June 2000. The 95% confidence intervals are too small to be seen. Data unavailable in October and March due to sampling difficulties.

**Figure 7.** *Megathura crenulata*. Evolution des fractions de volume de tissu chez les femelles, de juin 1999 à juin 2000. Les intervalles de confiance à 95%, trop petits, ne sont pas visibles. Données non disponibles pour octobre et mars en raison de difficultés d'échantillonnage.

### *Oocyte diameters*

Given the homogeneity of the ovary, oocyte diameters were pooled for all females of a given sampling date. Mean diameters varied only slightly, from 125 to 135  $\mu\text{m}$  without the coat (Fig. 8). This difference was not statistically significant (parametric ANOVA, normality and heteroscedasticity verified,  $P \geq 0.05$ ).



**Figure 8.** Evolution of *Megathura crenulata* coated-oocyte mean diameters (measured without their coats) from June 1999 to June 2000. Vertical bars are 95% confidence intervals. Data unavailable in October and March due to sampling difficulties.

**Figure 8.** Evolution des diamètres moyens des ovocytes avec gaine (mesurés sans tenir compte de l'épaisseur de la gaine) de juin 1999 à juillet 2000 chez les femelles de *Megathura crenulata*. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance à 95%. Données non disponibles en octobre et mars en raison de difficultés d'échantillonnage.

## **F- Discussion**

To our knowledge, the results of the present study constitute the first report on the gonad structure, reproductive cycle and oocyte histochemistry in *Megathura crenulata*. A much more abundant literature exists for the commercially exploited archaeogastropods of the family Haliotidae, to which frequent reference will be made.

### **1- Gonad structure**

The gonad structure of *M. crenulata*, with gametes developing centrifugally from traversing trabeculae, resembles the well-known example of the Haliotidae (Newman, 1967; Young & DeMartini, 1970; Cochard, 1980). In all of these cases, no ciliated evacuating ducts were observed; gametes are presumably expelled via contractions of the gonad tegument, as is in *Haliotis midae* (Newman, 1967).

No simultaneous hermaphrodites were observed in any of the specimens studied; the dominant possible sexual modes for *M. crenulata* are therefore either gonochoric or successive hermaphrodite. Most prosobranchs are gonochoric, but there are a small number of hermaphroditic species (Fretter & Graham, 1964; Fretter, 1984). Complete resolution of this question in *M. crenulata* will require extensive sampling and long-term rearing.

Gonad structure was shown to be homogeneous for both male and female *M. crenulata*, as is also the case for *H. midae* (Newman, 1967). This result will facilitate future studies on the gonad of this species. By standardizing the histological sampling zone, it should be possible to reduce even further the residual inter-individual variation.

### **2- Reproductive cycle**

The marked stability of both the male and female *M. crenulata* gonad histological profile throughout the sampling period, as well as the uniform oocyte size, preclude the use of either criterion in determining gamete maturity, or even the state of spawning readiness of the gonad. The stable histological profile raises an interesting possibility: spawning readiness may depend on fine-tuning oocyte reserves rather than on synchronizing protracted periods of vitellogenesis. This is in contrast to the situation in the Haliotidae. A bimodal oocyte size distribution was observed in *H. midae* (Newman, 1967); in *H. roei*, three oocyte maturation stages, characterized by different diameters, were observed (Shepherd & Laws, 1974). Several oocyte sizes co-exist in *H. tuberculata*, with progressive growth from January to mid-July (Cochard, 1980). Similarly, marked changes in histological profile characterize the

reproductive cycle of *H. midae* males (Newman, 1967). Whereas mature spermatozoa were found in *H. rufescens*, this appeared to correspond to a lack of variation in gonad indices and therefore year-round dribble spawning (Young & DeMartini, 1970). Similarly, *H. asinina* synchronously spawns every two weeks on the Southern Great Barrier Reef (Jebreen *et al.*, 2000). In the present case, the gonad appears ready to spawn at any moment in the reproductive cycle. The true state of gamete maturity must therefore be ascertained by other means, as suggested below.

A crude indicator of spawning readiness could involve determination of a gonosomatic index (DeVlaming *et al.*, 1982); indeed, despite the uniform histological profile, considerable variations in gonad volume were observed over the sampling period in the few individuals dissected for histological processing. However, such a technique requires the sacrifice of relatively large numbers of animals and is therefore not feasible in the context of the commercial exploitation of this species reared in captivity for repeated extraction of valuable hemolymph.

### **3- Oocyte histochemistry**

The presence of an oocyte coat, observed in mature oocytes of *M. crenulata*, is typical of archaeogastropods (Newman, 1967; Cochard, 1980). In gastropods with coated oocytes, gamones intervene in the modification of the coat to permit fertilization (Fretter & Graham, 1964; Webber, 1977; Fretter, 1984). The results of the present study establish AMPS as a dominant component of the oocyte coat in *M. crenulata*. AMPS possess several chemical and mechanical properties which may confer important advantages to the oocytes: (1) due to the high viscosity of AMPS (Beninger & St-Jean, 1997a; Davies & Hawkins, 1998), they provide mechanical protection to the oocytes; (2) AMPS reduce frictional resistance, thus allowing better water movement (Hoyt, 1975; Daniel, 1981; Davies & Hawkins, 1998) over the egg masses, and hence improved gas exchange and metabolic waste removal. The reduced frictional resistance would also reduce the probability of dislodging the egg masses; (3) AMPS possess anti-microbial properties (Sasikala & Subramoniam, 1987; Subramoniam, 1991; Beninger & Larocque, 1998), potentially conferring protection from opportunistic microbes in the egg masses; (4) the relatively high density of the AMPS coats could act to confer negative buoyancy to the otherwise positively buoyant (due to the high lipid content) oocytes, allowing the egg masses to remain on the substrate rather than in the water column. This characteristic is important in species which limit propagule dispersal; further studies on the reproductive biology of *M. crenulata* could address this possibility; (5)



AMPS adhere to and agglutinate particles strongly, as shown in the context of bivalve particle processing (Beninger & St-Jean, 1997a). This property would once again reduce the dispersal of the oocytes, which are oviposited as egg masses.

The lack of positive PAS staining in the oocyte cytoplasm eliminates the possibility of glycogen as a reserve in the oocytes of this species. The chief oocyte reserve appears to be lipid (visible as clear globules in the trichrome-stained sections), as is the rule in the Mollusca (Gallager & Mann, 1986; Lucas *et al.*, 1986; Caers *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999). Large lipid reserves have been reported in the ovaries of both *Haliotis* and *Megathura* genera (Webber, 1977).

Although histological examination is a well-established technique for the detailed documentation of reproductive cycles (Webber, 1977; Beninger, 1987; Barber & Blake, 1991), the results of the present study show that this approach, while very useful for elucidating other aspects of the reproductive biology of *M. crenulata*, cannot be used to follow and pinpoint spawning preparedness in this species. However, the eventual rearing of *M. crenulata* will require this information; even more desirable would be a non-destructive technique of monitoring the reproductive status of broodstock. Such biological monitoring of broodstock could lead to increased fertilization success, and hence increased production of adults for pharmacological use.

Several additional aspects of the reproductive biology of *M. crenulata* which could be usefully pursued include the dynamics of gametogenesis (especially the transition from small uncoated oocytes to large coated ones), the buildup of vitelline reserves, the characteristics of gamete storage, and the mechanisms of gametogenetic synchronization. Such information will be most helpful in both the management of wild stocks, and in future aquaculture operations.

## **G- Acknowledgements**

We thank Herr O Kottwitz and Biosyn Arzneimittel GmbH (Fellbach, Germany) for having made research funding available for this project, as well as F Hennequart for his initial role as intermediary.

**Figure 3.** *Megathura crenulata* gonad. Photomicrographs of paraffin-embedded sections. Area (1) Histological section of male gonad. Modified Masson's trichrom protocol. T: trabecular tissue, DG: developing gametes, MG: mature gametes, FL: flagella, US: unoccupied space. Area (2) Histological section of female gonad. Modified Masson's trichrom protocol. N: nucleus, T: trabecular tissue, CO: coated oocyte, O: non-coated oocyte, C: coat, NU: nucleolus, PL: proximal layer of oocyte coat, DL: distal layer of oocyte coat, CY: cytoplasm, CH: heterochromatin, CG: unstained cytoplasmic globule. Area (3,4) Female gonad. Trioxymatein and alcian blue stains. DL: distal layer of oocyte coat, PL: proximal layer of oocyte coat, N: nucleus, NU: nucleolus, CH: heterochromatin. Area (5,6) Female gonad. PAS-alcian blue protocol. N: unstained nucleus, DL: distal layer of oocyte coat, PL: proximal layer of oocyte coat, CG: cytoplasmic globule.

**Figure 3.** Gonade de *Megathura crenulata*. Photomicrographies de coupes histologiques. (1) Coupe histologique de la gonade mâle. Protocole trichrome de Masson modifié. (2) Coupe histologique de la gonade femelle. Protocole trichrome de Masson modifié. (3,4) Gonade femelle. Coloration à la trioxymatéine et au bleu alcian. (5,6) Gonade femelle. Protocole APS-Bleu alcian.

### **Liste des abréviations**

**c:** enveloppe ovocytaire  
**cg:** globules cytoplasmiques  
**ch:** hétérochromatine  
**co:** ovocyte gainé  
**cy:** cytoplasme  
**dg:** gamètes en développement  
**dl:** couche distale de l'enveloppe ovocytaire  
**fl:** flagelles  
**mg:** gamètes matures  
**n:** noyau  
**nu:** nucléole  
**o:** ovocyte non gainé  
**pl:** couche proximale de l'enveloppe ovocytaire  
**t:** tissu des trabécules  
**us:** espace vide

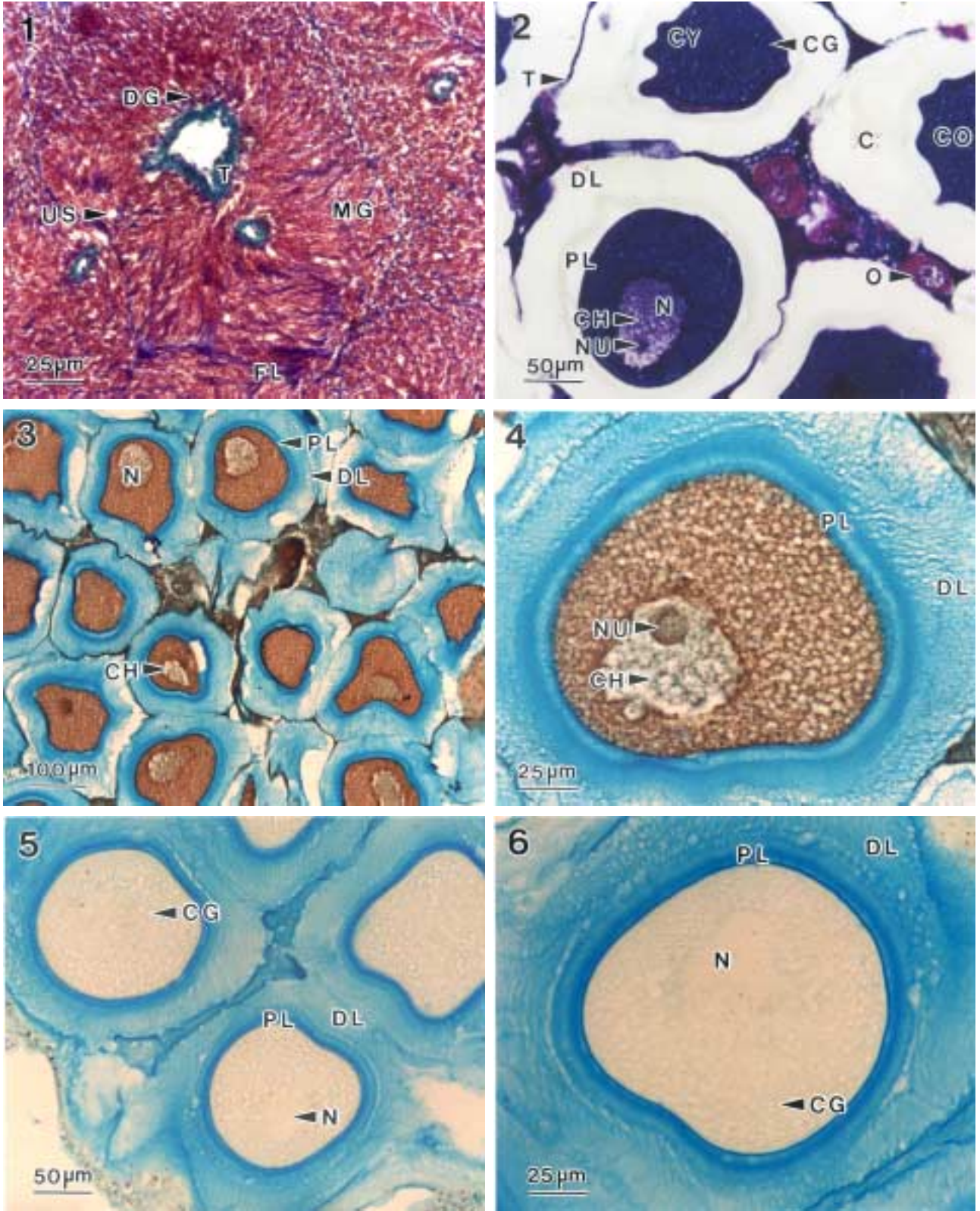


Figure 3. *Megathura crenulata* gonad.

### 1.3 Expérimentation de colorations lipo-spécifiques pour la quantification des réserves vitellines des ovocytes de *Megathura crenulata* et de *Crassostrea gigas*

---

#### A- Introduction

Suite aux travaux de Beninger *et al.* (2001 – première partie de ce chapitre), il paraissait intéressant dans un premier temps de vérifier la nature supposée lipidique des réserves ovocytaires, puis d'élaborer un moyen de déterminer l'imminence de la ponte chez les femelles de *Megathura crenulata*, dans l'optique de l'élevage de cette espèce. En effet, étant donné l'échec de l'utilisation des techniques habituellement employées (histologie, stéréologie - Beninger *et al.*, 2001) pour étudier le cycle reproducteur de *M. crenulata*, l'utilisation de méthodes alternatives était à envisager. Deux stratégies possibles s'imposaient alors : 1) une stratégie plus fondamentale, avec augmentation de l'effort d'échantillonnage par rapport à l'étude précédente, calculs des indices gono-somatiques, estimation du nombre total de gamètes, dosages des lipides dans les ovocytes au cours du cycle reproducteur, avec le sacrifice d'un grand nombre d'individus, ou encore une approche indirecte du cycle reproducteur en étudiant la dynamique du recrutement, et 2) une stratégie plus appliquée visant à mettre au point, en utilisant un nombre d'individus limité, une technique pour localiser la période de ponte ou d'imminence de la ponte, toujours dans l'optique de l'élevage de *M. crenulata*. Afin d'obtenir des résultats directement applicables dans le contexte de l'élevage et de la commercialisation de *M. crenulata*, et compte tenu de l'intérêt économique évident de cet élevage, il a été choisi de poursuivre l'étude selon la deuxième stratégie. Ainsi, il a été envisagé de mettre au point une technique d'évaluation de la maturité des ovocytes, ceux-ci étant obtenus par ponction par exemple, en adaptant la technique de coloration à l'Oil Red O (ORO – Croll, 1972; Gallagher & Mann, 1981; Gallagher & Mann, 1986; Gallagher *et al.*, 1986). Parallèlement, il a été envisagé d'adapter également cette technique pour l'étude de la qualité des ovocytes de *Crassostrea gigas*, car les nombreux avantages de la production de naissains en écloséries encouragent à apporter des améliorations à l'efficacité de celles-ci.

La qualité des ovocytes est un facteur fondamental pour la survie et le succès du développement des larves issues de la fécondation (Gallagher & Mann, 1986 chez *Crassostrea virginica* et *Mercenaria mercenaria* - Dorange *et al.*, 1989; Le Pennec *et al.*, 1990 chez

*Pecten maximus*). Chez *C. gigas*, Massapina *et al.* (1999) ont démontré que la teneur en lipides totaux des ovocytes est un des paramètres qui peut être utilisé pour définir la qualité des ovocytes. Cette "qualité" ovocytaire se traduit notamment en termes de *quantité* et de *qualité* des réserves lipidiques. En effet, lors du passage du stade d'endotrophie au stade définitif d'exotrophie durant le développement larvaire (Lucas *et al.*, 1986), un catabolisme de ces lipides de réserve est observé chez *C. virginica* et *M. mercenaria* (Lee & Heffernan, 1991), *C. gigas* (Barlett, 1979), *Argopecten concentricus* (Lu *et al.*, 1999), *Ostrea chilensis* (Videla *et al.*, 1998), *Patinopecten yessoensis* et *Crassadoma gigantea* (Whyte *et al.*, 1987, 1990). Ces réserves endogènes, accumulées lors de la maturation des ovocytes, jouent un rôle prépondérant dans la croissance et la survie des larves. En effet, la *quantité* de lipides neutres apparaît comme étant un facteur influençant le succès des élevages des larves d'huîtres (Kennedy, 1996), et elle joue également un rôle important dans la croissance ultérieure de ces larves (Gallager *et al.*, 1986). La *qualité* des lipides ovocytaires (composition en acides gras) semble également influencer la croissance des larves et elle dépend aussi des sources exogènes alimentaires de celles-ci (Soudant *et al.*, 1996; Jonsson *et al.*, 1999). Or pendant la vitellogenèse, une diminution des réserves de glycogène à la faveur d'une augmentation des lipides (des triacyl-glycérols notamment) est observée chez *C. virginica* (Swift *et al.*, 1979) et *C. gigas* (Li *et al.*, 2000), et fortement soupçonnée chez les Bivalves en général (Gabbott, 1975; Lubet & Mann, 1987). L'accumulation de réserves énergétiques suffisantes est très liée à l'état physiologique et à la condition des géniteurs (Le Pennec *et al.*, 1998, chez les Pectinidés). Même s'il semble acquis que la teneur en lipides des ovocytes est un critère de qualité des ovocytes, il n'est pas encore certain à quel point ces teneurs sont déterminées par des facteurs génétiques ou environnementaux.

Ainsi, cette partie de l'étude concerne les tentatives de mise au point d'une méthode de quantification des lipides des ovocytes de *M. crenulata* et de *C. gigas*, utilisant principalement l'ORO comme colorant lipo-spécifique.

## B- Matériels et méthodes

### 1- Récolte et fixation des ovocytes

Les ovocytes d'une femelle adulte *Megathura crenulata* ont été récoltés en juin 2002 au SMEL (Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral) par stripping de la gonade, et fixés immédiatement après la dissection dans du formol salé à 10%, tamponné à pH 7,2. Les échantillons fixés ont ensuite été conservés à 4°C.

Les ovocytes de femelles adultes *Crassostrea gigas* ont été collectés au printemps 2002, après 6 semaines de conditionnement à l'Écloserie expérimentale d'Argenton (IFREMER). Les gamètes femelles ont été prélevés par stripping (Allen & Bushek, 1992), tamisés, rincés et placés dans de l'eau de mer filtrée. Les ovocytes destinés à la coloration des lipides par l'ORO ont ensuite été fixés selon le protocole décrit pour *M. crenulata*.

### 2- Caractérisation chimique des réserves vitellines de *Megathura crenulata*

Afin de vérifier la nature biochimique des réserves vitellines, deux colorants liposécifiques ont été utilisés: l'ORO (Sigma, C.I. 26125) et le Nile Red (Sigma, Nile Blue A Oxazone - Greenspan *et al.*, 1985; Castell & Mann, 1994; Alonzo & Mayzaud, 1999). Une série de tests préliminaires a été réalisée pour tenter de dégrader l'enveloppe des ovocytes (Tableau 3).

**Tableau 3.** Récapitulatif des tests de dégradation de l'enveloppe ovocytaire réalisés et des résultats obtenus.

Moyen chimique ou mécanique testé	Résultat	Remarques
Soude (NaOH)	-	Néant
Acétone (CH <sub>3</sub> CONH)	-	Néant
Alkyltriméthylammonium bromide (CATB)	-	Disparition progressive de l'enveloppe, mais le colorant dilué dans de l'acétone ne pénètre pas
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	+	Très efficace, permet la pénétration du colorant et la coloration des globules lipidiques
Ultrasonication	-	Inefficace (propriétés mécaniques des mucopolysaccharides)

A la vue de ces résultats, le DMSO a été utilisé comme solvant pour l'ORO et le Nile Red, les temps de coloration retenus étant de 30 min et 90 min, respectivement. Les ovocytes ont été observés au microscope avant et après coloration, en microscopie à fluorescence pour les colorations au Nile Red.

### **3- Mise au point du protocole de coloration à l'ORO des ovocytes de *Crassostrea gigas***

#### *Biométrie des ovocytes*

Les diamètres de 30 ovocytes par femelle ont été mesurés avec un microscope équipé d'un micromètre oculaire, afin de vérifier l'homogénéité des diamètres entre les individus. En effet, une trop grande disparité entre les diamètres peut entraîner des artéfacts lors de la lecture au spectrophotomètre.

#### *Protocole de coloration*

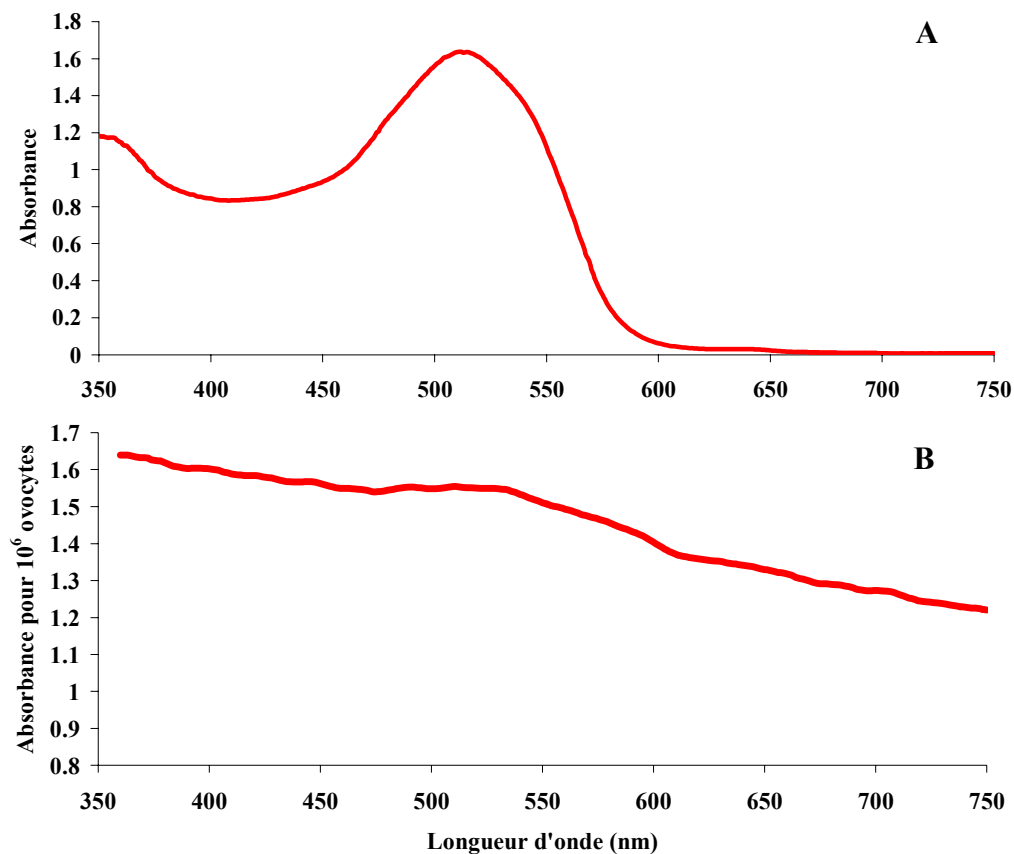
L'objectif de cette phase de tests était de réussir à obtenir des ovocytes colorés en suspension pour réaliser des mesures d'absorbance en spectrophotométrie. L'ORO a été utilisé comme colorant spécifique des lipides (Gallager & Mann, 1981, 1986) et l'acétone a été utilisé comme solvant vecteur (Castell & Mann, 1994). Le spectre d'absorption de l'ORO dans l'acétone est présenté dans la figure 9A.

**Tableau 4.** Protocole de coloration spécifique des lipides des ovocytes de *Crassostrea gigas* à l'ORO.

<b>Etapes</b>	<b>Opérations réalisées</b>	<b>Durée (min)</b>
Coloration	0,5 à 2,5 mL de suspension d'ovocytes + 5 mL d'acétone + 2 mL de mélange ORO/acétone	30
Rinçage (× 4)	Enlever le surnageant Compléter à 10 mL avec de l'eau de mer filtrée ; laisser rincer et sédimenter	20 (× 4)
Préparation de la suspension d'ovocytes	Enlever le surnageant Compléter à 5 mL avec de l'eau de mer filtrée	

Après une phase de tests et après vérification de la linéarité de la relation absorbance vs. concentration en ovocytes, le protocole de coloration suivant a été retenu, les critères étant : la préservation du bon état des ovocytes, la qualité de la coloration obtenue et la reproductibilité des résultats (Tableau 4).

Les mesures d'absorbance ont été réalisées à 524 nm (maximum d'absorbance d'une suspension d'ovocytes colorés par l'ORO; spectre d'absorption présenté dans la figure 9B). De l'eau de mer filtrée (0,45 µm) a été utilisée comme témoin. Pour chaque mesure d'absorbance, la concentration en ovocytes dans l'échantillon a été estimée à l'aide d'un compteur de particules (Coulter Multisizer II). A partir de plusieurs points expérimentaux, les droites de régression ont été tracées.



**Figure 9.** A- Spectre d'absorption de l'ORO dans l'acétone (pic ~ 512 nm). B- Spectre d'absorption d'une suspension d'ovocytes de *Crassostrea gigas* colorés à l'ORO dans de l'eau de mer filtrée (pic ~ 524 nm).

Des essais de coloration des ovocytes au Nile Red ont été également réalisés, en utilisant l'acétone comme solvant et avec un temps de coloration de 15 min. En raison du prix élevé de ce colorant et de la nécessité d'être équipé d'un microscope à fluorescence pour



détecter la coloration des globules lipidiques, l'utilisation du Nile Red n'a pas été poursuivie au-delà de cette phase d'essais.

#### *Dosage des lipides*

Pour estimer les quantités de lipides dans les ovocytes des 10 femelles, des échantillons d'ovocytes ont été collectés dans de l'eau de mer filtrée après le stripping de la gonade, rincés, congelés et stockés à -80°C en l'attente des analyses. Les concentrations en ovocytes ont été estimées avant la congélation par comptage à l'aide du compteur de particules. Les lipides totaux des ovocytes ont ensuite été dosés à l'aide de la méthode de microdosage de Marsh et Weinstein (1966), en utilisant la trioléine comme standard (plutôt que la tripalmitine étant donné la prépondérance des acides gras insaturés dans les ovocytes des Bivalves – Trider & Castell, 1980; Whyte *et al.*, 1990; Marty *et al.*, 1992; Napolitano *et al.*, 1992; Berntsson *et al.*, 1997; Utting & Millican, 1997).

## **C- Résultats**

### **1- *Megathura crenulata***

#### *Structure de la gonade femelle*

L'observation des ovocytes et des fragments de tissu gonadique parfois encore associés aux ovocytes a montré la structure de maillage en trois dimensions du tissu conjonctif, entourant les ovocytes (Fig. 10A à C). Les ovocytes étaient sphériques et de diamètre identique :  $149\mu\text{m} \pm 3 \mu\text{m}$  (intervalle de confiance à 95%). La gangue translucide de mucopolysaccharides acides, dont les limites étaient discernables, a été observée autour de chaque ovocyte (Fig. 10C à E). L'épaisseur de la gangue était homogène (Fig. 10E).

#### *Caractérisation des réserves ovocytaires*

Les résultats des colorations sont présentés dans la figure 11. L'ORO a coloré très intensément les globules cytoplasmiques présents en abondance dans le cytoplasme des ovocytes (Fig. 11A, B). En raison de la taille des ovocytes, l'observation des globules lipidiques colorés a été possible uniquement au niveau des pédoncules ovocytaires reliant l'ovocyte au tissu conjonctif, l'épaisseur de contenu cellulaire étant moindre à ce niveau (Fig. 11B).

Le Nile Red a également coloré les globules lipidiques des ovocytes (Fig. 11C, D), cette coloration n'étant détectable qu'en microscopie à fluorescence. L'emplacement du noyau, non coloré, a été observé sur quelques ovocytes (Fig. 11C).

## **2- *Crassostrea gigas***

### *Résultat des colorations*

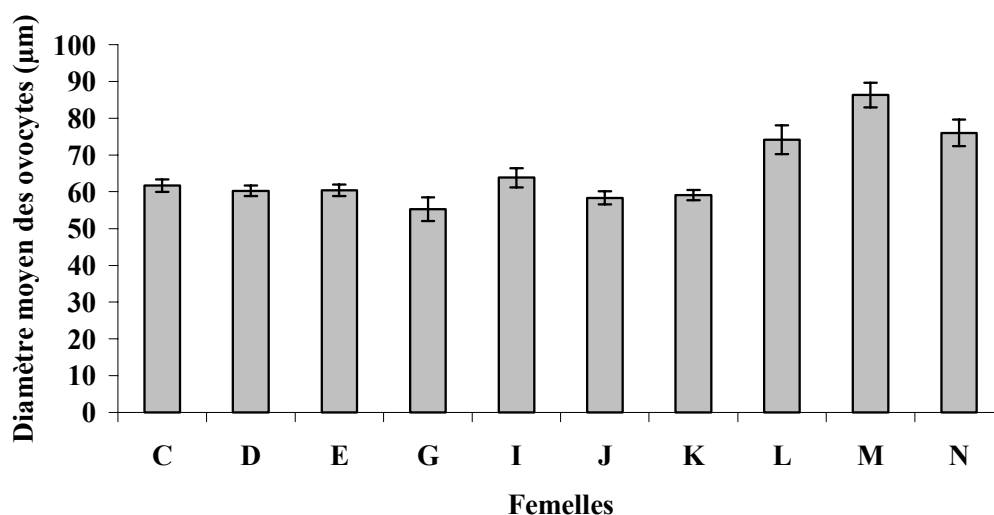
Après le stripping et la fixation, les ovocytes apparaissaient en bon état. L'emplacement du noyau était parfois visible et le cytoplasme semblait contenir de très nombreux globules (Fig. 12A, B).

Après coloration à l'ORO, certaines parties des ovocytes apparaissaient colorées en rouge (Fig. 12C à F). L'ORO étant un colorant spécifique des lipides neutres, ces globules cytoplasmiques étaient donc constitués de lipides. L'emplacement du noyau était très souvent visible (Fig. 12C à F). Certains ovocytes semblaient être plus colorés que d'autres, ce qui laissait supposer que leur contenu en lipides était supérieur (Fig. 12D, E). Cependant, chez une même huître femelle, la coloration des ovocytes est apparue comme étant plutôt homogène (Fig. 12F).

Le Nile Red a également coloré les globules lipidiques des ovocytes (Fig. 12G), ceux-ci étant plus visibles que chez *Megathura crenulata*, en raison de la taille inférieure des ovocytes de *C. gigas*. La différence de couleur de fluorescence observée était probablement due à l'utilisation de solvants différents (DMSO pour *M. crenulata* et acétone pour *C. gigas*).

### *Diamètres des ovocytes*

L'utilisation de la spectrophotométrie pour la réalisation de ces mesures a nécessité de s'affranchir de certaines sources d'erreur possibles. En effet les mesures d'absorbance ont été réalisées sur des suspensions d'ovocytes dans de l'eau de mer filtrée, et non pas sur des solutions. Les mesures des diamètres ovocytaires ont ainsi permis de vérifier que les diamètres des particules en suspension étaient similaires d'un individu à l'autre et que les mesures d'absorbance étaient donc comparables. Les diamètres moyens des ovocytes des femelles testées sont présentés dans la figure 13. A l'exception des femelles L, M et N, les diamètres moyens des ovocytes étaient similaires, et d'environ 67  $\mu\text{m}$ .



**Figure 13.** *Crassostrea gigas*. Diamètres moyens des 10 femelles étudiées.

*Absorbances des ovocytes colorés et teneurs en lipides*

**Tableau 5.** Teneurs en lipides des ovocytes des 10 femelles exprimées en ng d'équivalent trioléine par ovocyte (moyennes  $\pm$  intervalle de confiance à 95% de 3 lectures spectrophotométriques) et valeurs des pentes calculées à partir des absorbances des ovocytes colorés.

Femelles	Teneurs en lipides des ovocytes		Valeurs des pentes
C	$2,07 \pm 8,68.10^{-5}$	MIN	$1,15.10^{-6}$
D	$2,79 \pm 1,10^{-6}$		$1,43.10^{-6}$
E	$2,55 \pm 2,10^{-6}$		$1,18.10^{-6}$
G	-		$1,03.10^{-6}$ MIN
I	$3,37 \pm 3,10^{-6}$		$1,45.10^{-6}$
J	$4,65 \pm 1,10^{-6}$	MAX	$1,07.10^{-6}$
K	$2,65 \pm 4,13.10^{-5}$		$1,57.10^{-6}$ MAX
L	$2,19 \pm 2,39.10^{-5}$		$1,15.10^{-6}$
M	$2,51 \pm 8,44.10^{-5}$		$1,11.10^{-6}$
N	$2,53 \pm 2,86.10^{-5}$		$1,09.10^{-6}$

Les teneurs en lipides des ovocytes, dosées avec la méthode de Marsh et Weinstein (1966) ainsi que les valeurs des pentes calculées à l'issue des lectures spectrophotométriques et des comptages des ovocytes sont présentées dans le tableau 5. Les femelles pour lesquelles les teneurs en lipides des ovocytes étaient les plus fortes ne présentaient pas les valeurs de

pentés les plus fortes. Aucune relation n'a été mise en évidence entre les teneurs en lipides des ovocytes et les valeurs des pentés.

## **D- Discussion et conclusion**

Les résultats obtenus lors de cette étude complémentaire chez *Megathura crenulata* ont permis de vérifier la nature lipidique des réserves ovocytaires, supposée par Beninger *et al.* (2001). Tous les ovocytes observés présentaient également des diamètres équivalents, comme montré par Beninger *et al.* (2001) lors de l'approche stéréologique du cycle reproducteur. Les ovocytes de la femelle étudiée dans cette partie de l'étude, prélevée au mois de juin, présentaient une réponse fortement positive à la coloration à l'ORO. Dans le milieu naturel, les pontes de *M. crenulata* ont lieu en novembre-décembre, mais l'état réel de maturité de la gonade de cette femelle, extraite de son milieu naturel et maintenue au SMEL depuis plusieurs mois, ne peut pas être connu. De plus, Beninger *et al.* (2001) ont observé un profil de gonade mature tout au long du cycle reproducteur. Deux situations sont donc envisageables à l'issue de ces tests de coloration : (1) la gonade est totalement mature, la femelle est prête à pondre, et la très forte réponse aux colorations est due à la présence de grandes quantités de réserves lipidiques, (2) la gonade n'est pas totalement mature, la femelle n'est pas prête à pondre, et la très forte réponse aux colorations témoigne également de la présence de grandes quantités de réserves lipidiques. Dans le premier cas, et si une accumulation progressive de lipides a lieu pendant la maturation des ovocytes, il serait possible de quantifier visuellement l'intensité de la coloration obtenue et donc d'identifier la période de ponte. Dans le deuxième cas, la réponse à la coloration étant déjà très intense, il ne paraît pas envisageable de quantifier visuellement une accumulation supplémentaire de lipides dans les ovocytes. Ainsi cette méthode visuelle de coloration serait utilisable uniquement dans le cas où la maturation de la gonade se ferait par constitution et accumulation progressive de réserves lipidiques dans les ovocytes. En revanche, si la maturation de la gonade se fait par augmentation progressive du nombre d'ovocytes, ceux-ci étant très riches en lipides dès l'ovogenèse et qu'un stockage de ces ovocytes matures est effectué jusqu'au moment de la ponte, cette technique ne peut pas être appliquée. Il serait donc intéressant d'effectuer des colorations d'ovocytes de femelles prélevées dans leur milieu naturel et cela tout au long du cycle reproducteur annuel, afin de dégager les aspects fondamentaux de la

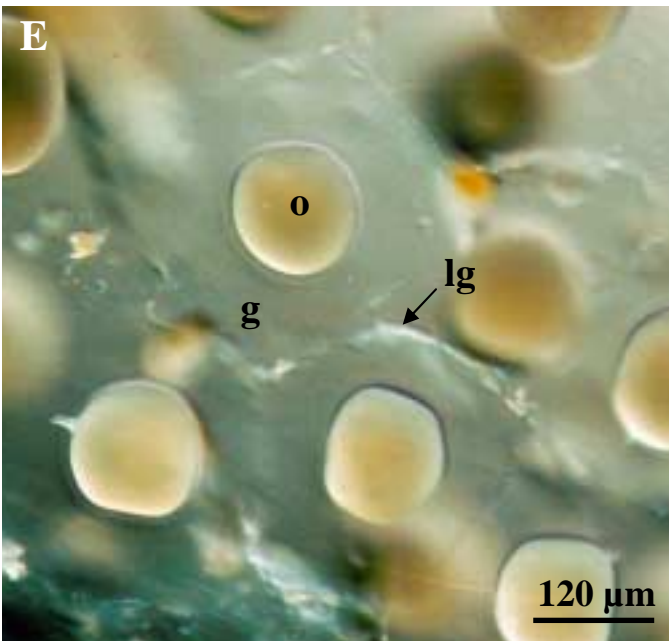
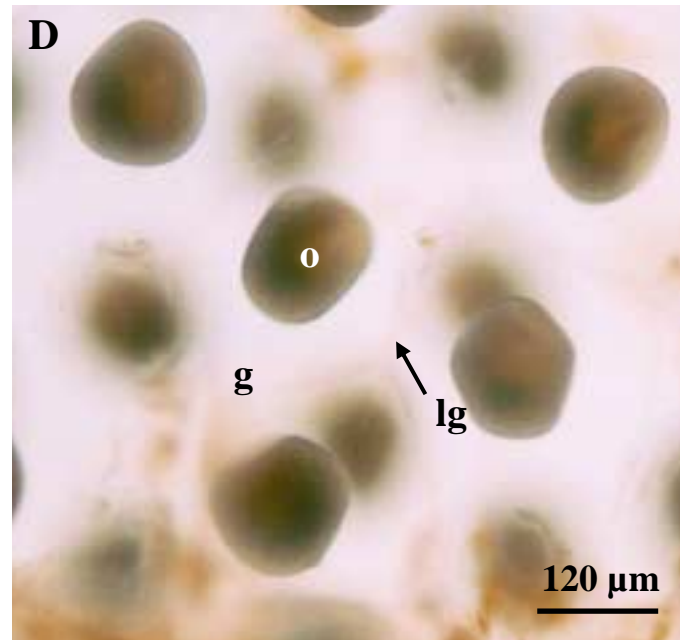
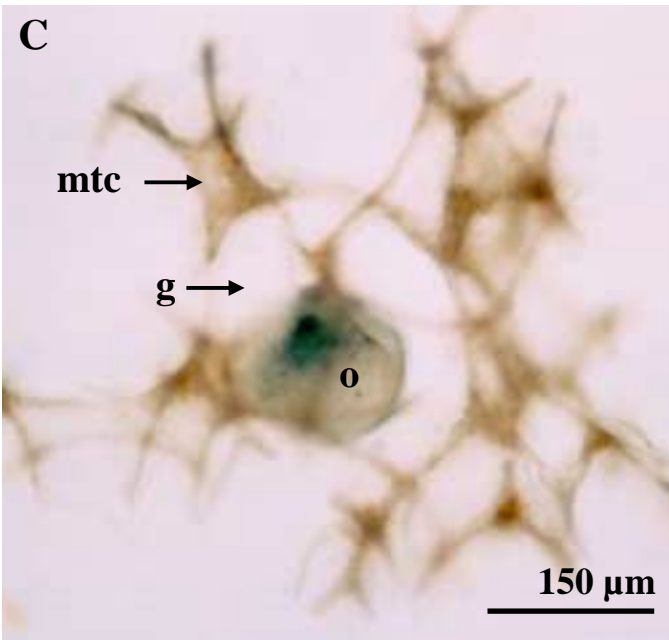
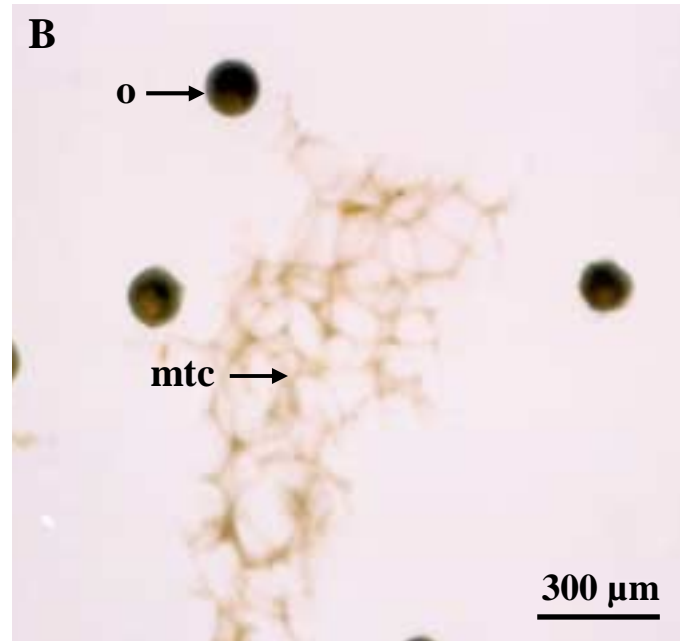
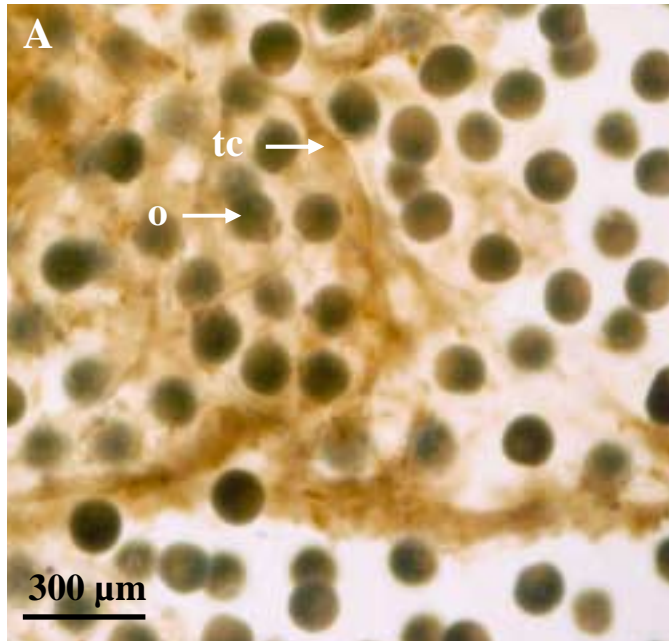
maturation des ovocytes et de la gonade, et d'évaluer l'utilité éventuelle de cette méthode de coloration dans une perspective d'élevage de *M. crenulata*.

Malgré les résultats encourageants obtenus lors de ces essais préliminaires, le projet de recherche sur la reproduction de *M. crenulata*, piloté par l'entreprise pharmaceutique allemande Biosyn par l'intermédiaire du SMEL, n'a pas été poursuivi (les activités de recherche de Biosyn ayant été délocalisées en Californie), et l'échantillonnage de nouveaux individus n'a plus été possible.

Le transfert de cette méthode de coloration chez *Crassostrea gigas* n'a pas permis d'envisager des perspectives intéressantes pour l'utilisation de cette technique en écloserie. En effet, malgré la répliquabilité de la technique et la linéarité de la relation absorbance vs. concentration en ovocytes pour chaque femelle, aucune relation n'a pu être dégagée entre les teneurs en lipides des ovocytes et les mesures d'absorbances. De plus, les teneurs en lipides, mesurées à l'aide de la méthode de Marsh et Weinstein (1966), et les pentes calculées à partir des colorations à l'ORO (Tableau 5) étaient très proches d'une femelle à l'autre. Ainsi les teneurs en lipides mesurées, trop proches, ne peuvent probablement pas être discriminées à l'aide de la technique de coloration à l'ORO. L'utilisation de cette méthode de coloration, appliquée à l'estimation des réserves lipidiques dans les larves de *C. gigas*, a également donné des résultats infructueux (René Robert, 2005, IFREMER Argenton, comm. pers.).

## **E- Remerciements**

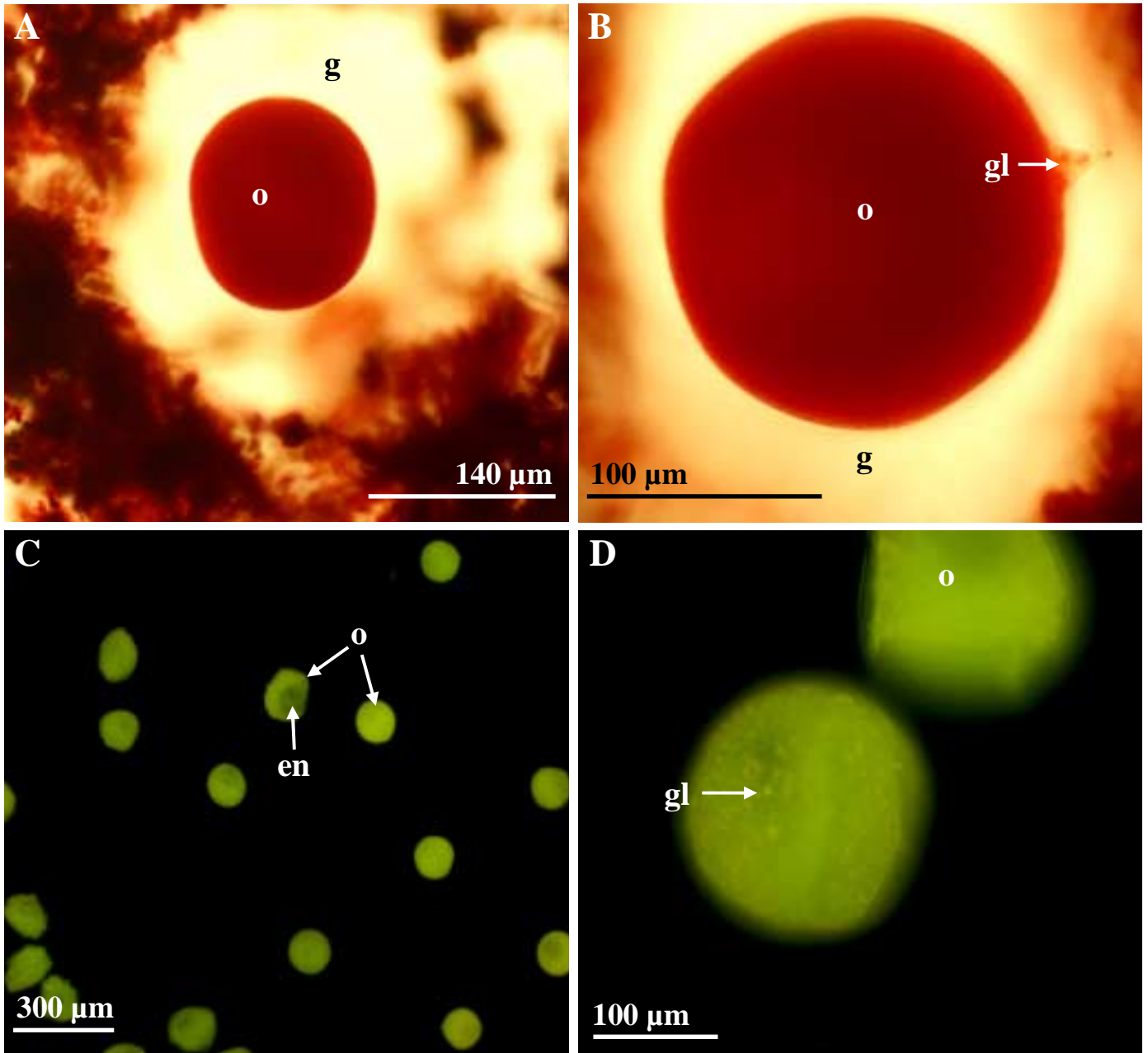
Nous remercions S Pien du Syndicat Mixte pour l'Equipement du Littoral (SMEL) pour sa collaboration, JC Cochard, S Pouvreau et l'Ecloserie expérimentale d'Argenton (IFREMER) pour le conditionnement des géniteurs. Nous remercions également l'IFREMER (Contrat n° 01 2 521376) et le Conseil Régional des Pays de Loire (Contrat n° 01 7570 0) pour le financement de ce projet de recherche.



**Figure 10.** *Megathura crenulata*. Observations réalisées en microscopie photonique. A- Ovocytes et tissu conjonctif associé obtenus par stripping de l'ovaire. B- Ovocytes et fragment de tissu conjonctif. C- Détail d'un ovocyte entouré de tissu conjonctif. D- Ovocytes entourés de leur gangue. E- Ovocytes observés en contraste de phase.

**Liste des abréviations**

- g:** gangue ovocytaire
- lg:** limite de la gangue ovocytaire
- mtc:** maillage de tissu conjonctif
- o:** ovocyte
- tc:** tissu conjonctif



**Figure 11.** *Megathura crenulata*. A- Ovocyte coloré à l'ORO observé en microscopie photonique. B- Ovocyte coloré à l'ORO observé en microscopie photonique. C- Ovocytes colorés au Nile Red observés en microscopie à fluorescence. D- Ovocytes colorés au Nile Red observés en microscopie à fluorescence.

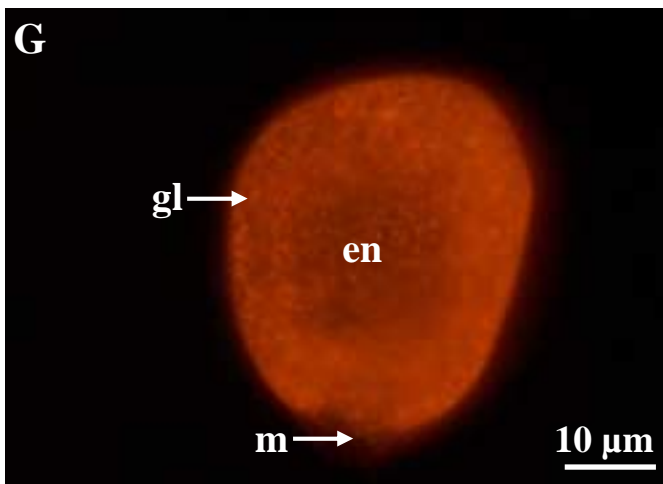
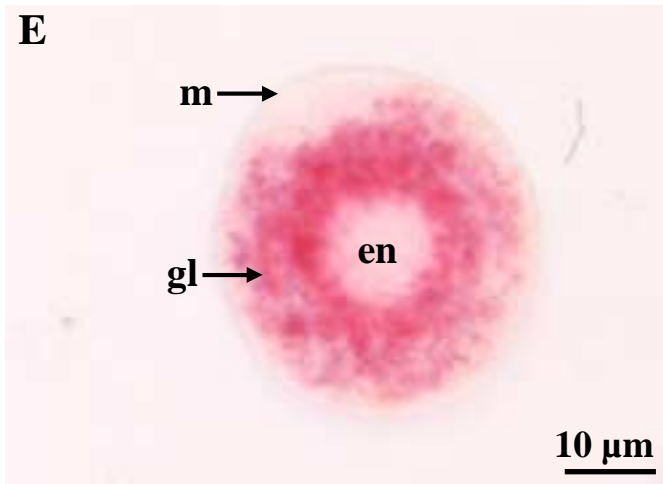
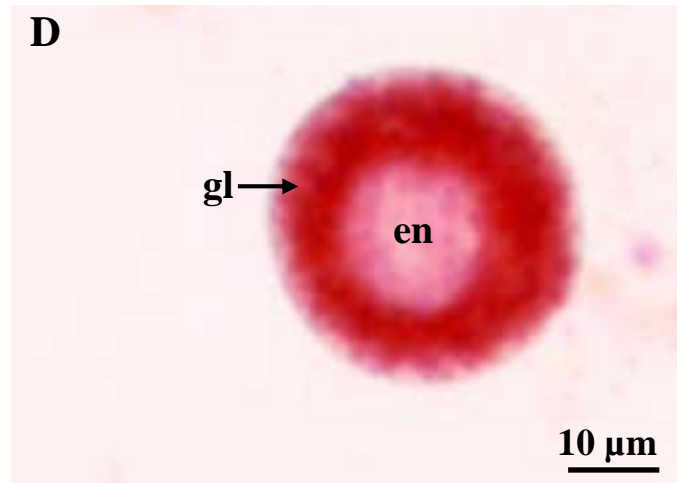
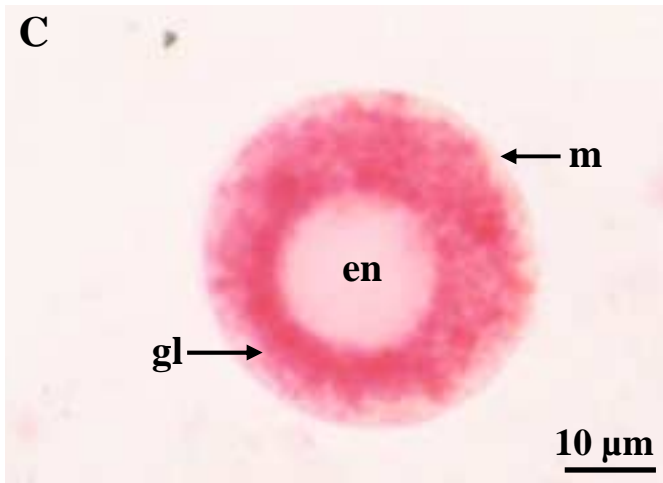
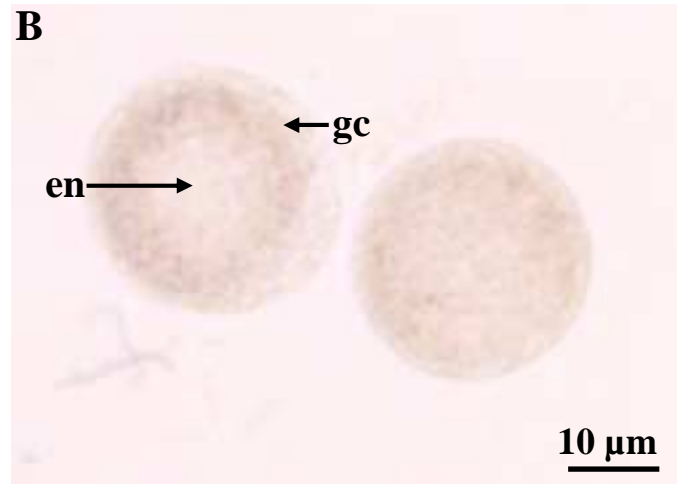
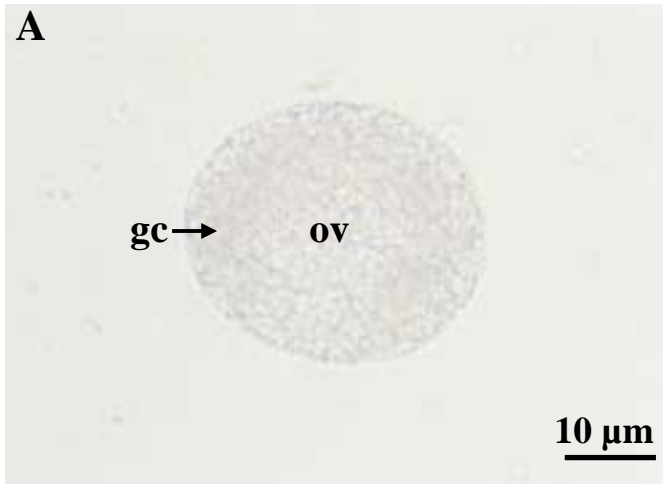
**Liste des abréviations**

**en:** emplacement du noyau

**g:** gangue ovocytaire

**gl:** globules lipidiques colorés

**o:** ovocyte



**Figure 12.** *Crassostrea gigas*. Observations en microscopie optique d'ovocytes fixés. A, B- Ovocytes non colorés. C, D, E, F- Ovocytes colorés à l'ORO selon le protocole établi. G- Ovocyte coloré au Nile Red et observé en microscopie à fluorescence.

**Liste des abréviations**

- en: emplacement du noyau
- gc: globules cytoplasmiques
- gl: globules lipidiques
- m: membrane
- ov: ovocyte



## **Chapitre 2**

**Relation entre reproduction et développement  
des jeunes stades chez l'huître *Crassostrea gigas***

## 2.1 Contexte des travaux

---

Dans ce 2<sup>ème</sup> chapitre, consacré à l'étude de la relation entre reproduction et performance des élevages larvaires et post-larvaires chez *Crassostrea gigas*, la qualité des ovocytes a été abordée en envisageant deux séries de critères pour définir la qualité des ovocytes et non un critère unique (voir partie 1.3). Ce travail a été initié par un certain nombre de travaux antérieurs, contradictoires, réalisés chez *Ostrea edulis* (Berntsson *et al.*, 1997), *Ostrea chilensis* (Wilson *et al.*, 1996) et *C. gigas* (Robinson, 1992a, b; Caers *et al.*, 2002). En effet, les résultats de ces études ne permettaient pas de mettre clairement en évidence l'influence de l'alimentation des géniteurs femelles sur la qualité des ovocytes produits et les performances des élevages larvaires menés ultérieurement. Etant donné l'augmentation du rôle des écloséries dans la production de naissain, permettant de s'affranchir du captage plus aléatoire de naissain dans le milieu naturel, et étant donné le coût élevé de l'alimentation des géniteurs durant leur conditionnement, il paraissait important de déterminer si l'alimentation abondante habituellement fournie aux géniteurs pouvait influencer la qualité des ovocytes produits et la performance subséquente des élevages.

Dans cette partie intitulée "Etude des effets du jeûne lors du conditionnement en éclosérie des géniteurs femelles de *Crassostrea gigas* sur la qualité des ovocytes et les performances larvaires et post-larvaires ultérieures", les résultats infructueux obtenus lors de l'estimation de la qualité des ovocytes à l'aide d'un critère unique (teneur en lipides colorés), ont conduit à une approche multi-critères pour l'évaluation de la qualité des ovocytes. Certains critères correspondant aux propriétés des ovocytes eux-mêmes, ont été définis comme des "prédicteurs", d'autres correspondant aux élevages menés ensuite, comme des "validateurs" de la qualité des ovocytes.

## **2.2 Etude des effets du jeûne lors du conditionnement en éclosion des géniteurs femelles de *Crassostrea gigas* sur la qualité des ovocytes et les performances larvaires et post-larvaires ultérieures**

---

Article publié:

Aquatic Living Resources, Volume 18, Pages 35-43, January-March 2005

**Is oyster broodstock feeding always necessary? A study using oocyte quality predictors and validators in *Crassostrea gigas*.**

**Rozenn CANNUEL & Peter G. BENINGER**

### **A- Abstract**

The effect of providing algal food to female *Crassostrea gigas* broodstock sampled at a favourable time of year was investigated using pre-defined indices of oocyte quality and subsequent larval and post-larval performances. Broodstock were collected in the Aber Benoît estuary (Brittany, France) at the end of April 2002 and were divided into two groups, a starved control (S, 1 µm – filtered seawater) and a fed group (F, *ad libitum* algal mixture of *Isochrysis galbana* clone T-Iso and *Chaetoceros calcitrans*), maintained under these conditions for six weeks prior to fertilizations. For each conditioning type, two batches of larvae and post-larvae were reared from two identified females. Quality criteria were defined in terms of predictors (oocyte lipid contents, mature oocyte diameters, ovarian maturity and presence/absence of atresia) and validators (larval growth, algal consumption and time to settlement, and post-larval growth). Each female was considered as a treatment, and parametric and non-parametric ANOVAs were performed, where appropriate, on predictors and validators between each treatment. In both conditions, a surplus of oocytes was produced in relation to expected market conditions. No effect of the conditioning treatment was detected either on oocyte quality predictors or on subsequent validators. It is likely that winter reserve accumulation is more important than trophic conditioning for successful

gametogenesis in the productive Aber Benoît environment. Given the considerable cost of abundant feeding during the conditioning of broodstock collected at the end of the winter and destined for gamete stripping (the prevalent practice in France), we suggest that feeding be minimal or suppressed altogether when the condition index is favourable.

## **B- Résumé**

L'effet de l'apport de nourriture algale à 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 (Bretagne, France) à la fin avril 2002 et ont été divisés en deux groupes, un groupe témoin non nourri (S, eau de mer filtrée à 1 µm) et un groupe nourri (F, mélange algal *ad libitum* de *Isochrysis galbana* clone T-Iso et *Chaetoceros calcitrans*), maintenus dans ces conditions durant six semaines avant les fécondations. Pour chaque type de conditionnement, deux lots de larves et de post-larves issus de deux femelles distinctes ont été élevés. Les critères de qualité ont été définis en termes de prédicteurs (teneurs en lipides des ovocytes, diamètres des ovocytes mûrs, maturité ovarienne et présence/absence d'atrésie) et de validateurs (croissance larvaire, consommation algale et temps à la métamorphose, puis croissance post-larvaire). Chaque femelle a été considérée comme un traitement, et des analyses de variance, ANOVA, paramétriques et non-paramétriques ont été effectuées, selon les cas, sur les prédicteurs et les validateurs entre chaque traitement. Pour les deux types de conditionnement, un surplus d'ovocytes a été produit, par rapport à la demande potentielle du marché. Aucun effet du régime de conditionnement n'a été détecté, ni sur les prédicteurs de qualité ovocytaire, ni sur les validateurs subséquents. Il semblerait que pour une gamétogenèse réussie, l'accumulation de réserves pendant l'hiver soit plus importante que le conditionnement trophique, dans l'environnement productif de l'Aber Benoît. Etant donné le coût considérable d'une alimentation abondante pendant le conditionnement de géniteurs prélevés à la fin de l'hiver et destinés au "stripping" (la pratique courante en France), nous proposons de réduire, voire même de supprimer l'alimentation pendant le conditionnement lorsque l'indice de condition est favorable.

## C- Introduction

The Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) is one of the most important cultured species, with a high value and strong market demand (Castagna *et al.*, 1996), especially in France, where approximately 150 000 tons are produced every year since 1990, with significant export (Dauvin, 1997). High reliance on wild spat collection in France is a potential weak point in oyster production. The role of hatcheries is thus increasing, with emphasis on the optimization of gamete quality (Massapina *et al.*, 1999, Valdez-Ramirez, 1999).

Oocyte quality is an important factor influencing subsequent larval survival and development (see Mann, 1988 for bivalves in general – Gallagher & Mann, 1986 for *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria* – Dorange *et al.*, 1989; Le Pennec *et al.*, 1990; Devauchelle & Mingant, 1991 for *Pecten maximus*), and developing tools to evaluate oocyte quality is necessary. "Quality", however, is not a well-defined concept, variously characterized by oocyte cytological and ultrastructural aspects (Daniels *et al.*, 1973; Valdez-Ramirez *et al.*, 1999; Valdez-Ramirez *et al.*, 2002), morphological features (Valdez-Ramirez, 1999; Valdez-Ramirez *et al.*, 1999) as well as physical (Gallagher & Mann, 1986), physiological (Valdez-Ramirez *et al.*, 1999) and biochemical aspects (Whyte *et al.*, 1987, 1990; Robinson, 1992a; Ruiz *et al.*, 1992; Valdez-Ramirez, 1999; Valdez-Ramirez *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Caers *et al.*, 2002; Hendriks *et al.*, 2003), notably the lipid content and composition.

Although often employed in aquaculture studies, oocyte quality remains to be effectively and clearly defined. Obviously, those oocyte characteristics which are related to high fertilization success and good larval performance may be used as quality indicators. This functional definition of quality requires the linking of specific oocyte characters to ultimate culture performance indicators. Two different sets of characteristics may thus be proposed to define and quantitatively measure oocyte quality: (1) predictive criteria (predictors), which are oocyte characteristics associated with quality, and (2) validating criteria (validators), which are indices of larval and post-larval performances.

Potential candidates for oocyte predictor status are oocyte diameter (oocytes which remain small do not mature), structural integrity (i.e. no symptoms of atresia – Pipe, 1987; Dorange & Le Pennec, 1989; Le Pennec *et al.*, 1991a), maturity status (pre-vitellogenic, vitellogenic, mature), and biochemical (especially lipid) content and composition. Extensive research has shown larval catabolism of pre-existing oocyte lipid prior to complete exotrophy

(Barlett, 1979; Lucas *et al.*, 1986; Whyte *et al.*, 1987, 1990, 1992; Lee & Heffernan, 1991; Delaunay *et al.*, 1992; Videla *et al.*, 1998; Labarta *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999; García-Esquivel *et al.*, 2001).

Oocyte quality validators obviously include (1) time to metamorphosis and (2) larval growth, both of which have been shown to significantly affect spat growth (Collet *et al.*, 1999). As (3) post-larval growth rate is strongly correlated with larval growth rate (Newkirk *et al.*, 1977), it is also of interest as an oocyte quality validator, all the more so because it is a 'long-range' validator, of particular interest to shellfish farmers. Algal consumption during larval rearing (4) may reasonably be considered to be a quality validator, under the assumption that larvae which feed well are likely to be in good condition.

Oocyte quality predictors and their subsequent validators may be expected to be influenced by broodstock diet, or more generally, by broodstock energetics. Thus some studies show that broodstock diet influences larval growth in *Ostrea edulis* (Berntsson *et al.*, 1997) and in *Ostrea chilensis* (Wilson *et al.*, 1996), and the conventional wisdom is that *C. gigas* broodstock require large amounts of food during hatchery conditioning, and that certain nutritional qualities are required for complete gametogenesis (Robert & Gérard, 1999).

Recently, Caers *et al.* (2002), showed that despite having an influence on oocyte and larval fatty acid compositions (as had been previously reported – Robinson, 1992a; Soudant *et al.*, 1996a, b), there was no impact of *C. gigas* broodstock diet type on either egg size and lipid content, or on larval sizes and performances. Recent studies on several bivalve species, including *C. gigas*, did not detect any effect of lipid-enriched diets on oocyte sizes and lipid contents, but rather showed increased oocyte numbers (Hendriks *et al.*, 2003, Nevejan *et al.*, 2003). Chávez-Villalba *et al.* (2003a, b) went beyond diet type to include a non-fed condition during their *C. gigas* broodstock conditioning, and no effect of female broodstock starvation was observed in some indicators of larval performance (growth, D larval yield). These results seem to contradict a considerable body of earlier work. Wilson *et al.* (1996) observed a significant relation between broodstock starvation and lower growth rates (longer incubation times) and survival, and longer time to metamorphosis and fixation in *Ostrea chilensis*. In addition, Robinson (1992b) detected differences in fecundity and in larval and post-larval performances between oysters subjected to different conditioning diets, including starvation. More recently, Uriarte *et al.* (2004) showed that protein and lipid enrichments in conditioning diets improved larval performances in *C. gigas*. The surprising results of Chávez-Villalba *et al.* (2003a, b) thus require confirmation, not only because they are counter-intuitive, but also because of the considerable resources spent in hatcheries on algal production for conditioning.

In France, as elsewhere, conditioning of *C. gigas* is performed on adults collected from the wild and gametes are stripped (Castagna *et al.*, 1996); hence broodstock cannot be 'recycled' for subsequent conditionings and fertilizations. Furthermore, the results of Caers *et al.* (2002) and Chávez-Villalba *et al.* (2003a, b) require longer-range performance confirmation, since their cultures did not go beyond 7 and 16 days, respectively.

With a view to resolving whether abundant feeding (current practice) or no feeding during conditioning may influence oocyte quality, we therefore tested the effects of two conditioning treatments, abundant feeding and starvation, on a set of clearly-identified *C. gigas* oocyte quality predictors (lipid content, mature oocyte diameters, oocyte maturity, and presence/absence of atresia) and validators (larval growth, algal consumption and time to metamorphosis, and post-larval growth).

## **D- Materials and methods**

### **1- Oyster conditioning**

Sixty adult oysters were collected from the Aber Benoît estuary (48°35 N; 4°37 W, Brittany, France) at the end of April 2002, and transferred to the nearby Argenton experimental hatchery (IFREMER). Oysters were divided into two conditioning groups of 30 individuals each: (1) a conditioning labelled "Fed" (F), in which oysters were abundantly fed with a commonly-used mixture of two micro-algae species, *Isochrysis galbana* (clone T-Iso) and *Chaetoceros calcitrans*, using the protocol of Chávez-Villalba *et al.* (2002), and (2) a conditioning labelled "Starved" (S), in which oysters were maintained without particulate food in running, 1 µm - filtered sea water (FSW), for a period of six weeks prior to gamete stripping. Female oysters were assumed to be at the beginning of their gametogenesis when conditioning began at the end of April (Chávez-Villalba *et al.*, 2001). In order to ascertain that oocyte quality predictors and validators pertained to the same females, two females from each treatment were used for fertilizations, and the resulting four larval cultures were carried out and monitored as detailed below.

## 2- Predictors: Oocyte characteristics

### *Stereology*

Stereology was used to quantify the proportions of each female gamete stage immediately prior to gamete stripping in the two conditions (Weibel *et al.*, 1966; Freere, 1967; Briarty, 1975; Beninger, 1987; Morvan & Ansell, 1988; Mayhew, 2000; Gosling, 2003). In addition to their role as a gamete quality predictor, the stereological counts also furnished a quantitative measurement of the overall state of the gonad in each of the females used for fertilizations, so that it was possible to assess whether or not all females used for gamete stripping were in the same state of readiness. A standard biopsy (approx. 5 mm<sup>3</sup>) of the gonad was performed for each female at the junction of the gills and the labial palps (Morales-Alamo & Mann, 1989) and fixed in aqueous Bouin's solution. After rinsing for a minimum of 10 h and dehydration in an ascending ethanol – Histo-Clear<sup>®</sup> series, the biopsies were embedded in paraffin and sectioned at 7 µm. Sections were stained using a modified Masson's trichrome protocol, with trioxymethylene, acid fuchsin and fast green (Martoja & Martoja-Pierson, 1967; Gabe, 1968) for 1'30", 5" and 1' respectively.

Three female gonad cell categories were identified and counted using a microscope projector and the subsequent volume fractions were calculated: mature oocytes, immature (pedunculate) oocytes and connective tissue. Nine counts were performed for each female, on surfaces of known area, using a 9 × 9 point matrix.

### *Oocyte diameters*

The diameters of thirty mature oocytes from each female were measured from whole stripped gametes (see below). The free oocyte sizes supplied by this procedure (as opposed to diameters obtained from histological sections, which present an unknown amount of bias due to shrinkage), are thus related to cell volume ( $V = 4/3 \pi r^3$ ), and hence to amount of cell content. Due to their irregular shape, pedunculate oocytes were not used for these measurements.

### *Atresia*

Characteristic signs of oocyte atresia (thickened and/or clear cell envelope, irregular shape) were monitored in the histological sections, while performing stereological counts.



### *Lipid content*

To estimate lipid quantities in oocytes for each female, samples of oocytes were collected on 20 µm mesh in FSW after gonad stripping (see below). Oocyte concentrations were estimated using a particle counter (Coulter Multisizer II<sup>®</sup>). The oocytes were then rinsed, frozen and stored at - 80 °C prior to analysis. Oocyte total lipid contents were subsequently quantified using the micro-analytical method of Marsh and Weinstein (1966), with triolein as a standard (rather than tripalmitin, given the preponderance of unsaturated fatty acids in bivalve oocytes – Trider & Castell, 1980; Whyte *et al.*, 1990; Marty *et al.*, 1992; Napolitano *et al.*, 1992; Berntsson *et al.*, 1997; Utting & Millican, 1997). In preliminary trials, there was a very close relationship between absorbance at 375 nm and triolein weight ( $r^2 = 0.9921$ ).

### **3- Fertilizations, larval and post-larval cultures**

Fertilizations, larval and post-larval cultures were conducted at the Argenton experimental hatchery. Two females of similar size per conditioning type were selected (size range 95 - 105 mm, long axis). Oocytes were collected by stripping in FSW (Allen & Bushek, 1992; Castagna *et al.*, 1996). Each oocyte pool was divided into two aliquots: a small portion was fixed in 10 % buffered formalin, pH 7.2 in order to measure oocyte diameters, and the rest was used for fertilization.

Pooled sperm in FSW originating from two males from the F conditioning was used for fertilizing batches of oocytes, to ensure that male broodstock nutritional state did not interfere with fertilization success. Spermatozoa were collected by stripping the male gonad and diluted in 1 l of FSW. The two males were chosen on the basis of spermatozoon mobility under light microscopy.

Oocytes were counted using a profile projector and approximately  $5 \times 10^6$  oocytes for each female were distributed in four fertilization beakers at 21 °C. Oocytes were then fertilized by addition of 50 ml of the spermatozoa pool. Samples were removed and observed during fertilization, to verify the presence of 8 to 10 spermatozoa around each oocyte (Valdez-Ramirez, 1999) and to monitor fertilization (Robert & Gérard, 1999). As the gonads of broodstock females were biopsied for lipid determinations and histological data, it was not possible to obtain total oocyte estimations.

After fertilization, larval cultures were maintained in 150 l tanks of aerated FSW. Larval concentrations were equalized to 300 000 larvae per tank ( $2 \text{ larvae ml}^{-1}$ ) at day 2. All larvae were fed a 1:1:1 mixture of *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* (clone T-Iso) and

*Chaetoceros calcitrans* (PTC diet - Robert & Gérard, 1999; Robert *et al.*, 2001). The rearing tanks were emptied, washed and refilled every 2-3 days. Water temperature was maintained at 22 °C at the beginning of larval culture, gradually raised to 24-25 °C on day 6, and maintained at this temperature until settlement (Robert & Gérard, 1999).

At day 20, eyed larvae were left to metamorphose and fix onto finely-broken oyster shells in rectangular PVC sifters of 140 µm diagonal mesh placed in raceways (density approx. 60 000 larvae per sifter). FSW (5 µm) was distributed continuously in the raceways with PTC diet. At day 34, fixed post-larvae were isolated from free broken oyster shells by sifting (350 µm diagonal mesh) and replaced in 150 µm sifters. Post-larval cultures were stopped at day 38.

#### **4- Validators: Larval and post-larval performances**

##### *Algal consumption*

Algal consumption per larva and per batch was monitored in order to verify condition and feeding aptitude of larvae and also (together with growth data) as a relative index of mortality in the two conditioning treatments, by counting algal concentrations in the rearing tanks after feeding larvae and just before water changes, using the particle counter. In essence, batches with closely similar algal consumptions and larval growths would have similar mortalities. Two counts of 50 µl samples were performed for each batch, summed and expressed as concentration per ml.

##### *Growth*

During larval and post-larval cultures, samplings were performed to estimate larval and post-larval growth in the four batches. Larvae and post-larvae were regularly sampled and fixed in 10 % buffered formalin, pH 7.2. Thirty individual measurements of the longest shell axis were carried out for each larval or post-larval sample, using a compound microscope fitted with an ocular micrometer.

The sampling schedule was the following: days 3, 6, 8, 10, 13, 15, 17 and 20 for larval cultures and days 27, 34 and 38 for post-larval cultures.

##### *Time to metamorphosis*

From day 17, particular attention was paid to the appearance of the larval eyespot, and to larval behaviour and position in the culture containers. At day 20, the majority of the

larvae of all four batches were eyed and showed substrate search ('swimming-crawling') behaviour. Transfer to new culture containers was effected as described above, and as nearly all larvae had disappeared from the water column on day 21, the time to metamorphosis was determined as day 20.

## **5- Statistics**

Since a single female generates considerable oocyte quality data (e.g. mean oocyte diameters, stereological data), as well as an entire larval rearing batch, for statistical purposes each female was considered as a treatment, and one-way ANOVAs were performed on oocyte diameters, stereological counts and shell sizes. Hence, lack of significant difference between females of the same conditioning treatment is to be expected, whereas a significant difference between females of the F and the S condition would denote a difference related to the condition. Normality and heteroscedasticity were verified for each statistical test, and percentage data were arcsine transformed to eliminate bias from variance linkage to the mean. In data sets where non-normality persisted, a non-parametric one-way ANOVA was performed (Sokal & Rohlf, 1995). All statistical treatments were carried out at a significance level of  $\alpha = 0.05$ .

As our experimental design required quality predictors and validators to be measured on the products of the same individual females, and it was not possible to anticipate subsequent larval mortality, the amount of oocytes available for each predictor was voluntarily limited. In order to maximize fertilizations for larval cultures, oocyte lipid content was therefore determined only once for each female, hence obviating statistical comparisons for this characteristic.

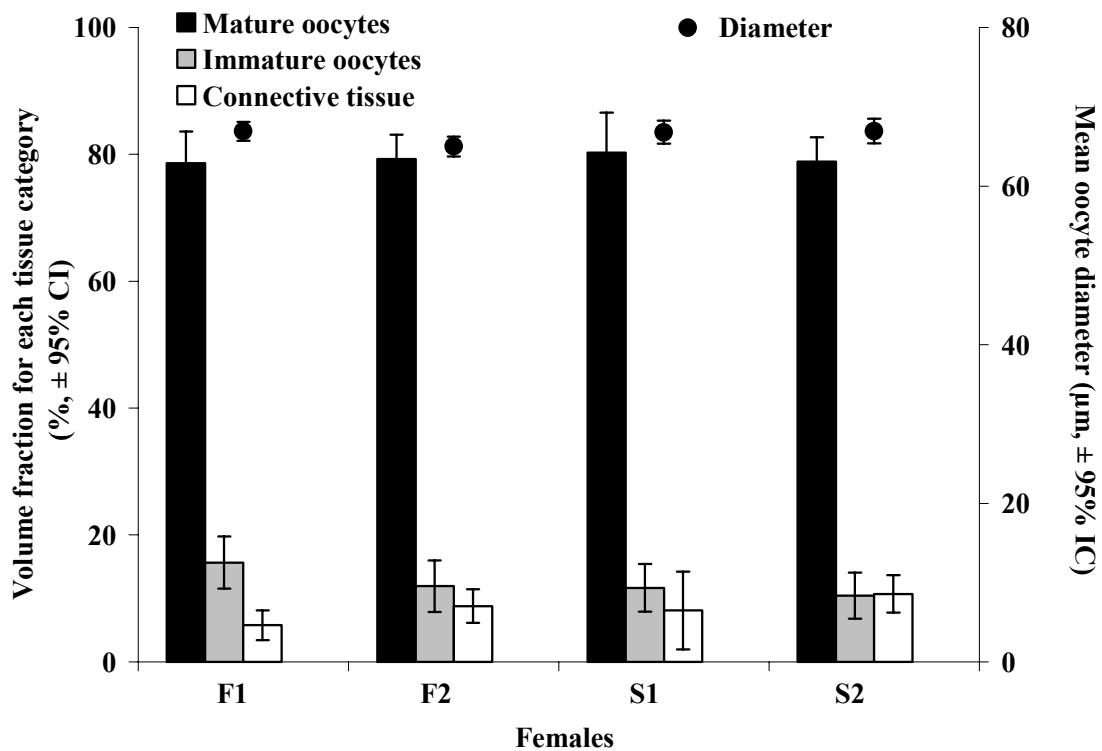
## **E- Results**

### **1- Predictors: Oocyte characteristics**

#### *Stereology and oocyte diameters*

Gonad cell volume fractions of all four females appeared to be homogeneous, as shown in Fig. 14. There were no significant differences between females for mature oocytes ( $p = 0.948$ ), pedunculate oocytes ( $p = 0.278$ ) and connective tissue ( $p = 0.119$ ). The four

females showed identical maturation states: mature oocytes represented the great majority of the tissue volume percentages (78.65 to 80.25 %  $\pm$  3.8 to 6.36 %, means and range of confidence intervals), pedunculate oocytes represented a smaller tissue fraction (10.43 to 15.64 %  $\pm$  3.63 to 4.13 %, means and range of confidence intervals) and connective tissue was also less present (5.76 to 10.70 %  $\pm$  2.32 to 6.15 %, means and range of confidence intervals – see Fig. 15 for illustration). All females therefore presented oocyte populations with similar maturity profiles, regardless of conditioning treatment, and were thus in the same maturation state when fertilization was carried out (Fig. 14 and Fig. 15).



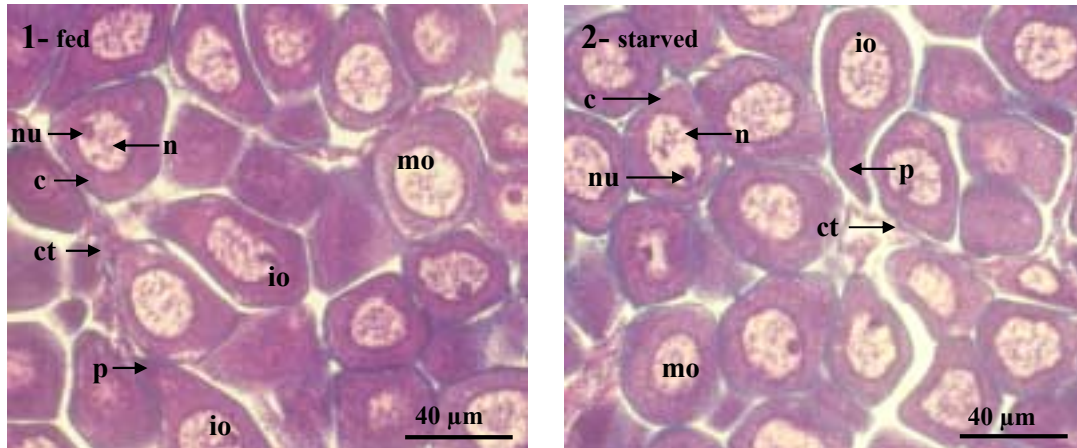
**Figure 14.** Tissue volume fractions of the gonad in the 4 females: Fed F1, F2, and Starved S1, S2; vertical bars are 95% confidence intervals (n = 9). Filled circles: Mean oocyte diameters for the 4 females: F1, F2, S1 and S2; vertical bars are 95% confidence intervals (n = 30).

**Figure 14.** Fractions de volume de tissu de la gonade des 4 femelles: nourries F1, F2, et non nourries S1, S2; les barres verticales sont les intervalles de confiance à 95% (n = 9). Cercles pleins: Diamètres moyens des ovocytes pour les 4 femelles: F1, F2, S1 et S2 ; les barres verticales sont les intervalles de confiance à 95% (n = 30).

Mature oocyte mean diameters are presented for each female in Fig. 14. Values were not significantly different (ANOVA,  $p = 0.152$ ), either between conditioning types or between individuals, and varied only slightly around a mean of 65  $\mu\text{m}$  (65.0 to 66.9  $\mu\text{m}$   $\pm$  1.17 to 1.57  $\mu\text{m}$ , means and range of confidence intervals).

### *Atresia*

No evidence of oocyte atresia was detected in any of the histological sections examined (Fig. 14), and females of both the F and S conditioning treatment showed the same gonad profile: mature oocytes occupying the majority of the sectioned gonad, no atresia observed (Fig. 15).



**Figure 15.** Photomicrographs of histological sections of female gonads of both the 'F-Fed' and 'S-Starved' conditioning treatments: illustration of maturation state and absence of atresia. Modified Masson's trichrome protocol. **1** – Female F2. **2** – Female S2. c: cytoplasm, ct: connective tissue, io: immature (pedunculate) oocytes, mo: mature oocytes, n: nucleus, nu: nucleolus, p: peduncle.

**Figure 15.** Photomicrographies de sections histologiques de gonades de femelles des deux types de conditionnement: nourries F et non nourries S: illustration de l'état de maturité et de l'absence d'atrésie. Modification du protocole trichrome de Masson. **1** – Femelle F2. **2** – Femelle S2. c: cytoplasme, ct: tissu conjonctif, io: ovocytes immatures (pédonculés), mo: ovocytes matures, n: noyau, nu: nucléole, p: pédoncule.

### *Oocyte lipid contents*

Oocyte lipid contents are presented in Table 1 for the four females. The range of values for all four females overlap completely, and the difference between the two values of the F condition is much smaller than the corresponding difference in the S condition. It should be noted that the highest value (22.6 ng oocyte<sup>-1</sup>) was obtained for female S1; conversely, the lowest value was obtained for female S2 (3.9 ng oocyte<sup>-1</sup>) (Table 6).

**Table 6.** Oocyte lipid contents for the two conditioning treatments: Fed (F) and Starved (S) (ng equivalent triolein oocyte<sup>-1</sup>). Values correspond to means of three spectrophotometric readings, dispersion nil.

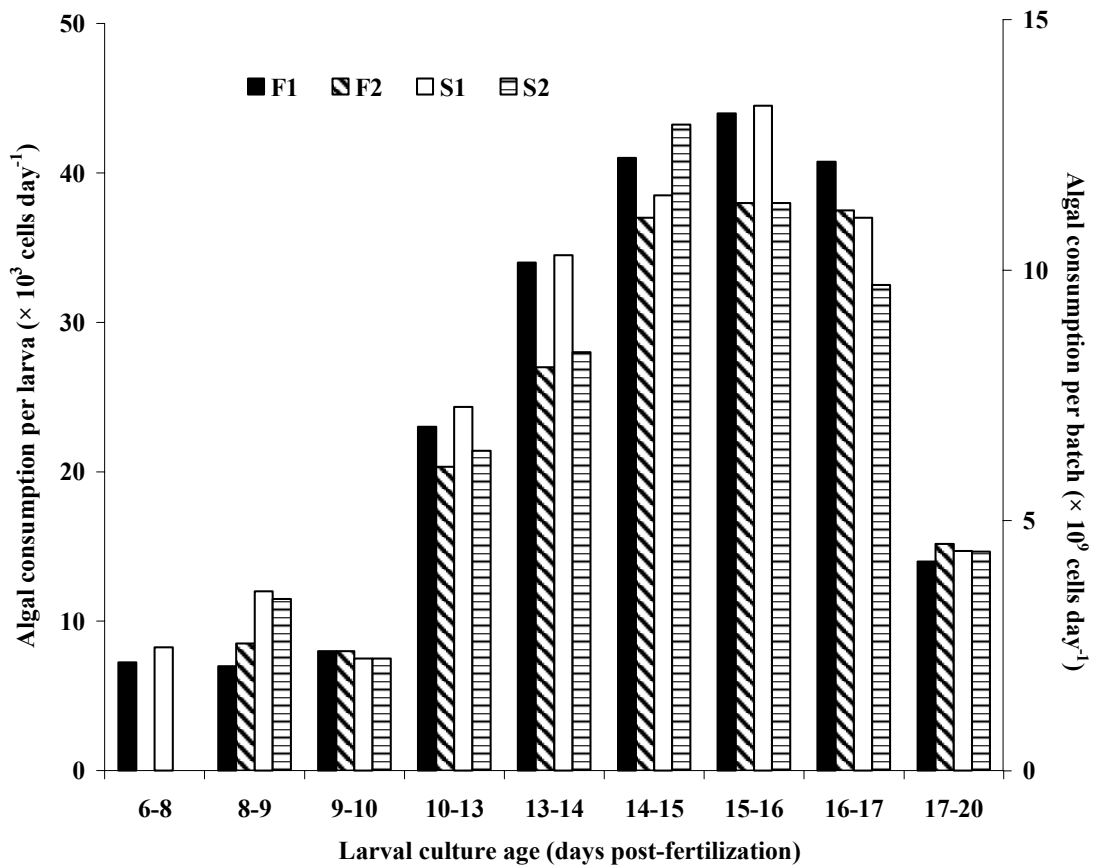
**Tableau 6.** Teneurs en lipides des ovocytes pour les femelles des deux types de conditionnement: nourries (F) et non nourries (S) (ng d'équivalent trioléine ovocyte<sup>-1</sup>). Les valeurs correspondent aux moyennes de trois lectures spectrophotométriques, dispersion nulle.

Treatment	F		S	
Females	F1	F2	S1	S2
Oocyte lipid content	4.7	9.0	22.6	3.9

## 2- Validators: Larval and post-larval performances

### *Algal consumption and mortality*

The daily algal consumptions per larva and per batch throughout the larval phase from day 6 to day 20 are shown in Fig. 16. Algal consumption increased fivefold from day 6 to day 16 ( $2.33 \times 10^9$  cells day<sup>-1</sup> to  $12.35 \times 10^9$  cells day<sup>-1</sup> per batch). From day 16 to day 20 algal consumption decreased 2.5 fold ( $12.35 \times 10^9$  cells day<sup>-1</sup> to  $4.40 \times 10^9$  cells day<sup>-1</sup> per batch), corresponding to the onset of 'swimming-crawling' behaviour just prior to metamorphosis and settlement (Gerdes, 1983) (Fig. 16). Total daily algal consumptions were quite similar in larvae from both conditioning treatments and all four batches throughout the larval phase. Since larval growths were so similar (see below), the close values of the per batch algal consumptions indicate a uniform mortality in all cultures.



**Figure 16.** Algal consumptions per larva ( $\times 10^3$  cells day<sup>-1</sup>) and per batch ( $\times 10^9$  cells day<sup>-1</sup>) from day 6 to day 20 for the four larval batches: F1, F2, S1 and S2. No confidence intervals ( $n = 1$ ).

**Figure 16.** Consommations algales par larve ( $\times 10^3$  cellules jour<sup>-1</sup>) et par batch ( $\times 10^9$  cellules jour<sup>-1</sup>) de J+6 à J+20 pour les 4 élevages larvaires: F1, F2, S1 et S2. Pas d'intervalle de confiance ( $n = 1$ ).

#### *Larval growth and time to metamorphosis*

Mean larval shell sizes did not differ significantly between the two conditioning treatments or among batches ( $p = 0.059$  at day 6;  $p = 0.337$  at day 15;  $p = 0.870$  at day 20). The growth curves of all four larval cultures were remarkably similar in both shape and absolute values from day 0 to day 20 (Fig. 17). Growth was not depressed in larvae produced by S females. For both broodstock conditioning types, growth was interrupted from day 17 to day 20.

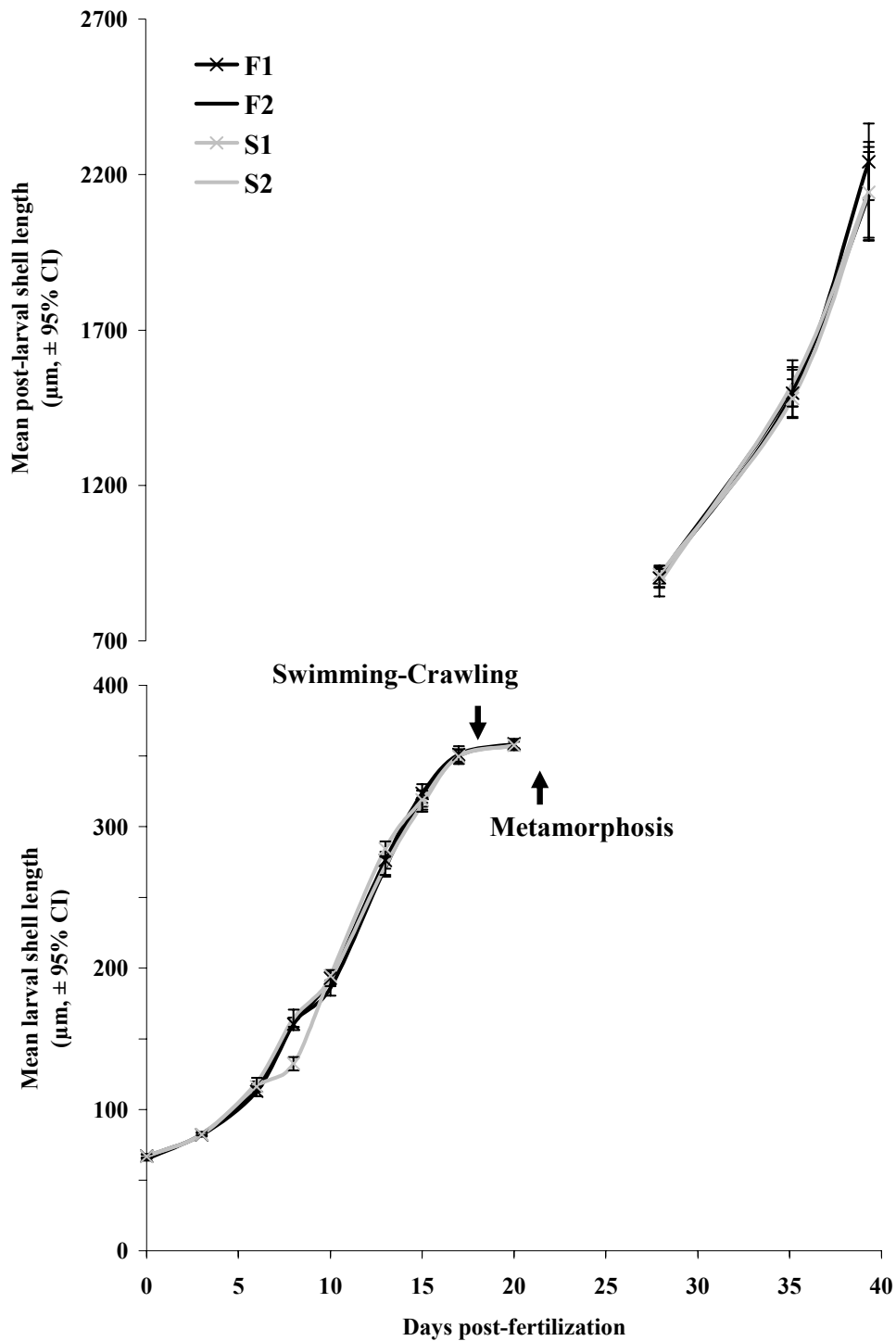
Eyed larvae were allowed to fix and metamorphose at day 20 at an approximate size of 358  $\mu\text{m}$  (Fig. 17), and the mean larval growth rate from day 0 to day 20 was approx. 14.58  $\mu\text{m day}^{-1}$  (Fig. 17).

In light of the decreased growth rates, total algal consumptions, 'swimming-crawling' behaviour, and absence of swimming larvae after day 20, time to metamorphosis was therefore taken to be day 20 (Fig. 17).

### *Post-larval growth*

As was observed for the larval cultures, post-larval growth curves of all batches were similar in form and values for the three sampling dates (27, 34 and 38 days after fertilization, Fig. 17). Mean shell sizes ( $\pm$  CI) were 887 to 914  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  29 to 44  $\mu\text{m}$ , range of confidence intervals) at day 27, 1479 to 1528  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  63 to 76  $\mu\text{m}$ , range of confidence intervals) at day 34 and 2131 to 2241  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  123 to 159  $\mu\text{m}$ , range of confidence intervals) at day 38; there were no significant mean size differences between the cultures at any of the three dates ( $p = 0.749$ ,  $p = 0.768$  and  $p = 0.689$  respectively) (Fig. 17).





**Figure 17.** Mean shell size evolution for larvae and post-larvae generated by the four broodstock females: Fed F1, F2, and Starved S1, S2 during the larval and post-larval cultures. The day 0 size corresponds to mean oocyte diameter. Vertical bars are 95 % confidence intervals (n = 30).

**Figure 17.** Evolution des tailles moyennes des coquilles des larves et post-larves provenant des 4 géniteurs femelles: nourries F1, F2 et non nourries S1, S2 durant les élevages larvaires et post-larvaires. La taille à J0 correspond au diamètre moyen des ovocytes. Les barres verticales sont les intervalles de confiance à 95% (n = 30).

## F- Discussion

The results of the present study show that feeding during broodstock conditioning did not affect oocyte quality or subsequent larval and post-larval performances, based on the set of predictors and validators defined herein. The observations of Chávez-Villalba *et al.* (2003a, b) are thus confirmed and extended to spat cultures up to 38 days. The homogeneous quality of *Crassostrea gigas* oocytes in these two conditions suggests that oocyte quality is primarily dependant on the reserves accumulated by broodstock prior to conditioning.

Adult reserves for oogenesis are chiefly comprised of glycogen, transformed to lipid reserves within oocytes during vitellogenesis (Gabbott, 1975; Bayne *et al.*, 1982; Deslous-Paoli *et al.*, 1982; Beninger & Lucas, 1984; Lubet & Mann, 1987; Ruiz *et al.*, 1992; Pazos *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1996; Berthelin *et al.*, 2000; Heude Berthelin *et al.*, 2003). The lipid content of the *C. gigas* oocytes, although somewhat variable among the individual broodstock females (4 – 22 ng oocyte<sup>-1</sup>), includes the range of values previously reported (7 – 8 ng oocyte<sup>-1</sup> - Caers *et al.*, 2002), and seems to suffice for excellent larval and post-larval performance. Contrary to other bivalves, *C. gigas* oocyte quality and subsequent performance do not appear to be influenced by specific dietary lipid fatty acid supplementation, so this need not be a concern for hatchery operators (Caers *et al.*, 2002; Hendriks *et al.*, 2003; Nevejan *et al.*, 2003).

To what point beyond fertilization oocyte quality affects performance is not certain. The progression from endotrophy to mixotrophy and finally exotrophy has been studied in *Mytilus edulis* by Lucas *et al.* (1986); use of oocyte reserves continued up to day 8 after fertilization. The scant information available for *C. gigas* yields a range of ages for the onset of larval feeding: 24 – 30 h (Lucas & Rangel, 1983), 24 – 48 h (Langdon & Newell, 1996; Newell & Langdon, 1996), 90 µm (approx. 4 days in this study) (Strathmann & Leise, 1979). It is not known up to what age oocyte reserves contribute to larval nutrition, but Gallager *et al.* (1986) found vitellin lipid droplets in larvae of *C. gigas* up to 4 days after the initiation of feeding. In any event, oyster growers are likely to prefer long-range validation of oocyte quality.

It should be noted that the very good larval and post-larval performance of the four broodstock females was obtained after sampling from the Aber Benoît estuary at the beginning of spring, followed by conditioning in the hatchery. Previous studies have shown that for *C. gigas* reared in France, sampling and conditioning at other seasons results in reduced fecundity, especially in winter, where fecundity is reduced to 1/10 - 1/5 that of spring

conditioning (Chávez-Villalba *et al.*, 2002, 2003a, b). Spring conditioning thus appears to be the optimal configuration for *C. gigas*, and this is supported by the observation that broodstock diet type does not influence oocyte diameter, number, or lipid content, larval or post-larval growth when conditioning takes place in spring (Robinson, 1992b; Caers *et al.*, 2002). The Aber Benoît estuary, from which the broodstock of the present study were obtained, is known to be trophically rich for oyster growing (Fleury *et al.*, 2001), allowing accumulation of reserves prior to oocyte vitellogenesis.

The optimal result obtained with spring conditioning is a notable constraint to one of the most important objectives of hatchery production: a regular supply of spat throughout the year. To maintain production levels, it is thus necessary to condition more females for fertilization outside the spring period; this will, of course, entail increased costs.

The results of the present study suggest that previously-stored reserves are used for vitellogenesis in *C. gigas*, as is supposed for bivalves generally (Gabbott, 1975; Bayne, 1976). It is interesting to note, however, that *Loripes lucinalis*, which harbours chemoautotrophic endosymbionts, appears to require near-simultaneous particulate food input during oogenesis (Le Pennec *et al.*, 1995) and that *Pecten maximus* seems to be able to directly transfer metabolites from the digestive system to gametes (Le Pennec *et al.*, 1991a, b; Beninger *et al.*, 2003a).

Although the present study confirms the importance of reserves accumulated prior to conditioning, for oocyte quality, there are indications that under conditions of food limitation, female oyster broodstock maintain a constant oocyte quality but reduce the number of oocytes produced (Bayne, 1976; Chávez-Villalba *et al.*, 2003a). As all four females of the present study produced sufficient oocytes for market conditions, this was not a limiting factor.

It is tempting to conclude that broodstock obtained in spring need not be fed during conditioning, if gametes are to be obtained by stripping, since this will result in a substantial economic saving for the hatchery. This is of course possible if the winter habitat provides enough food for the constitution of abundant reserves, as reflected in the condition index of oysters from the Aber Benoît estuary (Fleury *et al.*, 2001). Condition index (Lucas & Beninger, 1985) monitoring would be a particularly appropriate means of establishing whether or not broodstock are to be fed during conditioning. Furthermore, in the special case of male tetraploid oysters, which are quite fragile (Longwell & Stiles, 1996; Pouvreau, personal communication), used in the increasingly popular production of triploids, it may not be feasible or prudent to monitor condition indices or to suppress feeding during conditioning.

The second major conclusion of the present study is that the selected set of oocyte quality predictors is valid, i.e. confirmed by both short (larval growth and algal consumption) and long-range validators (time to metamorphosis, post-larval growth). In the present study, the excellent performance of larvae and post-larvae indicates the good levels of the quality predictors: the level of algal consumption is equal to or higher than that previously reported to be required for healthy cultures (Robert & Gérard, 1999), growth and time to metamorphosis are consistent with good performance in previous studies (Gerdes, 1983; Robert & Gérard, 1999), and the indirect measure of larval mortality is virtually nil. The usefulness of these predictors will depend on the hatchery context. If broodstock are stripped for gametes (as is current in France and widespread practice for *C. gigas* – Castagna *et al.*, 1996), all of the predictors may be used (although information from histology will only be available within 2-3 days). If broodstock are induced to spawn and saved for future use or if a broodstock selection program is in effect, only oocyte diameter can be used.

## **G- Acknowledgements**

We thank JC Cochard, S Pouvreau, C Mingant and the Ecloserie expérimentale d'Argenton for facilities, acceptance of the research project, and helping in larval and post-larval rearings. We are indebted to S Pouvreau and an anonymous reviewer for pertinent suggestions and criticisms of an earlier version of this manuscript. We also thank the Région des Pays de Loire for the attribution of a PhD grant to RC, and IFREMER for partial operational funding of this work, which is a contribution of the GDR 'Oyster Reproduction' (IFREMER/Contrat Universitaire LBM N°02-2-521518).

## **Chapitre 3**

# **Développement des larves, post-larves et juvéniles de l'huître *Crassostrea gigas***

### 3.1 Contexte des travaux

---

Malgré l'importance économique du groupe des Ostréidés et l'essor de l'activité des écloseries produisant des juvéniles en milieu contrôlé, jusqu'à présent peu d'études se sont intéressées au développement des jeunes stades et celles-ci concernent pour la plupart les stades les plus précoces. Le développement des larves, post-larves et juvéniles de *Crassostrea gigas* a donc été abordé dans ce 3<sup>ème</sup> et dernier chapitre, les travaux étant centrés sur la mise en place des structures palléales impliquées dans l'alimentation suspensivore chez l'huître. Cette étude permettrait ainsi de mieux comprendre les structures et les mécanismes de l'alimentation chez les jeunes stades. Le stade ultime du développement, c'est-à-dire le stade adulte, a également été étudié, afin de disposer du point de référence final de l'ensemble des réorganisations intervenant dans la mise en place des structures dans leur forme finale.

Chez l'huître adulte, trois organes palléaux interviennent dans l'alimentation, à savoir la branchie, de type pseudolamellibranche hétérorhabdique, les palpes labiaux et la surface palléale du manteau. Les organes et les mécanismes de l'alimentation suspensivore ont été largement étudiés chez les huîtres adultes de *C. gigas* et de *Crassostrea virginica* à l'aide de plusieurs techniques telles que l'endoscopie, l'écophysiologie, la microscopie électronique à balayage ou l'histologie. L'ensemble de ces études ont permis de mettre en évidence une sélection pré-ingestive des particules, basée sur la taille et / ou la nature des particules, au niveau de la branchie (Ward *et al.*, 1994, 1998; Cognie *et al.*, 2003) et au niveau des palpes labiaux (Newell & Jordan, 1983; Newell & Langdon, 1996; Cognie, 2001), ainsi qu'une évacuation des pseudofeces sur la surface du manteau (Beninger & Veniot, 1999; Beninger *et al.*, 1999). Le traitement des particules sur la branchie fait intervenir un certain nombre de voies ciliées distinctes. Ainsi, la surface frontale des filaments ordinaires des plis conduit les particules initialement rejetées vers la gouttière ventrale, alors que celle des filaments principaux achemine les particules initialement acceptées vers le sillon dorsal.

Afin d'élucider l'implication des différentes voies ciliées identifiées à la surface frontale des filaments ordinaires (Atkins, 1937a, b, 1938; Ribelin & Collier, 1977), les travaux présentés dans la première partie de ce chapitre, intitulée "Traitement des particules sur les plis branchiaux de l'huître adulte *Crassostrea gigas*: distribution des mucocytes à fine échelle et implications fonctionnelles", ont été consacrés au traitement des particules sur les plis branchiaux de l'huître adulte, utilisant une approche histologique et histochimique.

En ce qui concerne les stades larvaires de l'huître, l'alimentation suspensivore s'effectue *via* le velum, organe impliqué à la fois dans la locomotion et la collecte de particules alimentaires. A la métamorphose, étape du développement à laquelle la larve nageuse se fixe définitivement sur un substrat, une réorganisation rapide et importante des organes palléaux a lieu, avec notamment la régression totale du pied et du velum. Au cours du développement des jeunes stades, l'alimentation suspensivore est ainsi assurée dans un premier temps par le velum, puis par la branchie. Malgré l'importance de la branchie dans l'alimentation, et donc dans la croissance et la survie des individus, aucune étude complète de son développement n'a encore été menée chez *C. gigas*. Les résultats de l'étude présentée dans la deuxième partie de ce chapitre "Acquisition de la capacité de traitement des particules chez les larves et les juvéniles de *Crassostrea gigas*: étude du développement de la branchie", concernent l'ontogénèse de la branchie chez les jeunes stades de *C. gigas*.

A la vue des connaissances acquises lors de l'étude du développement de la branchie, une approche histologique et histochimique du développement de la branchie a également été tentée, de la même façon que chez les adultes, chez les juvéniles de *C. gigas*, pour établir des liens entre les structures et leur fonctionnalité. Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés dans la troisième partie de ce chapitre intitulée "Etude de la distribution des mucocytes sur la surface frontale des filaments branchiaux – Relation avec l'acquisition de la condition hétérorhabdique chez les juvéniles de *Crassostrea gigas*".

Si les fonctions de collecte, capture et transport des particules sont des fonctions essentielles dans l'alimentation suspensivore, la fonction de rejet pré-ingestif des particules en excès et / ou non alimentaires sous forme de pseudofeces est également une fonction très importante, en particulier dans les habitats à forte turbidité qu'occupent généralement les huîtres. Décrites chez *C. gigas* et *C. virginica* (Beninger *et al.*, 1999; Beninger & Veniot, 1999), des voies de rejet ciliées des pseudofeces ont été mises en évidence au niveau de la surface palléale du manteau. Afin d'étudier la mise en place de ces voies de rejet et leur fonctionnalité au cours du développement des jeunes stades, l'évolution de la ciliature de surface palléale du manteau a été suivie au cours du développement, en microscopie à balayage et les résultats obtenus sont présentés dans la quatrième partie de ce chapitre "Acquisition de la capacité de traitement des particules chez les larves, post-larves et juvéniles de *Crassostrea gigas*: ontogénie des voies de rejet des pseudofeces sur le manteau".

Une synthèse des résultats obtenus au cours de ces différentes études fait l'objet de la cinquième partie de ce chapitre, permettant de dégager des étapes apparaissant comme critiques dans le développement des jeunes stades de *C. gigas*, selon la terminologie adoptée dans les études du développement chez les Bivalves (Kingzett, 1993; Beninger *et al.* 1994; Veniot *et al.*, 2003).



## **3.2 Traitement des particules sur les plis branchiaux de l'huître adulte *Crassostrea gigas*: distribution à fine échelle des mucocytes et implications fonctionnelles**

---

Article publié:

Marine Ecology Progress Series, Volume 295, Pages 191-199

**Particle processing on the gill plicae of the oyster *Crassostrea gigas*: fine-scale mucocyte distribution and functional correlates.**

**Peter G. BENINGER, Rozenn CANNUEL & Samuel JAUNET**

### **A- Abstract**

In order to resolve outstanding problems in the understanding of mechanisms of particle processing in the oyster gill, the technique of mucocyte mapping was used to quantify mucocyte types and fine-scale distributions on the frontal ciliated tracts of the ordinary filaments comprising the gill plicae. The frontal tracts were divided into 1 frontal median tract (FMT) and 2 frontal lateral tracts (FLT) per filament, based on relative cilia lengths. Mucocyte counts within each tract were performed on periodic acid Schiff (PAS)–alcian blue-stained histological sections under oil immersion, and densities were recorded per linear  $\mu\text{m}$  ( $l\mu\text{m}$ ) of tract width, after evaluation of artefactual shrinkage for exact dimensions of tracts. Total mucocyte volumes were obtained using mean mucocyte volumes. Two types of mucocytes were most frequently observed: acid mucopolysaccharide (AMPS) containing mucocytes, and mixed (acid + neutral) mucopolysaccharide (MMPS) containing mucocytes. Neutral mucopolysaccharide (NMPS) containing mucocytes were rare. The apical filaments contained over twice the mucocyte densities and total mucocyte volumes, compared to the lateral filaments of the plicae ( $p \leq 0.001$ ), indicating that the apical filaments are the principal particle processing site of the plicae. The lateral filaments may accomplish functions more related to the establishment of the plicae and ensuing consequences (hydrodynamic particle capture, physical separation of the dorsal and ventral gill particle groove functions, and enlargement of filtering area). On the apical filaments, the FMT showed much greater AMPS

containing mucocyte densities and total mucocyte volumes, compared to the FLT. This, together with the respective cilia length differences, indicates that the FMT is the principal particle transport tract. Such a specialization was not observed on the lateral filaments of the plicae, again supporting the conclusion that the apical filaments are the active site of particle processing on the plicae. FLT appear to be uninvolved in particle transport, and probably participate in the establishment and maintenance of the dorsalward current flow in the pallial cavity.

## **B- Résumé**

Afin de résoudre les problèmes persistants dans la compréhension des mécanismes du traitement des particules sur la branchie de l'huître, la cartographie des mucocytes a été utilisée pour quantifier les différents types de mucocytes et mettre en évidence leur distribution sur les voies ciliées frontales des filaments ordinaires formant les plis branchiaux. Trois voies frontales ont été distinguées par filament, une voie médiane frontale (FMT) et deux voies latérales frontales (FLT), en fonction des longueurs relatives des cils. Les comptages de mucocytes au niveau des trois voies ont été effectués sur des coupes histologiques colorées à l'acide périodique Schiff (APS) – bleu alcian, en microscopie optique sous huile à immersion, et les densités de mucocytes ont été enregistrées par  $\mu\text{m}$  linéaire de largeur de voie, après avoir évalué le rétrécissement des voies dû au traitement histologique. Les volumes totaux des mucocytes ont été obtenus à l'aide des volumes moyens des mucocytes. Deux types de mucocytes ont été principalement observés: des mucocytes contenant des mucopolysaccharides acides (AMPS), et des mucocytes contenant des mucopolysaccharides mixtes (acides + neutres) (MMPS). Les mucocytes contenant des mucopolysaccharides neutres (NMPS) ont été observés rarement. Les filaments apicaux ont montré plus de deux fois les densités en mucocytes et les volumes totaux des mucocytes, par rapport aux filaments latéraux des plis ( $p \leq 0.001$ ), indiquant que les filaments apicaux sont les principaux sites de traitement des particules des plis. Les filaments latéraux pourraient accomplir des fonctions plutôt liées à l'établissement des plis et aux conséquences liées à la présence de ces plis (capture hydrodynamique des particules, séparation physique des voies de transport dorsale et ventrale de la branchie et augmentation de la surface de filtration). Sur les filaments apicaux, les FMT ont montré des densités de mucocytes à AMPS et des volumes totaux des mucocytes nettement supérieurs, par rapport aux FLT. Ce résultat, ainsi que les

différences respectives des longueurs des cils de ces voies, indique que la FMT est la principale voie de transport des particules. Cette spécialisation n'a pas été observée pour les filaments latéraux des plis, supportant la conclusion que les filaments apicaux sont les sites actifs de transport des particules sur les plis branchiaux. Les FLT apparaissent comme étant non impliquées dans le transport de particules, et participent probablement à l'établissement et au maintien du courant d'eau dirigé dorsalement dans la cavité palléale.

## C- Introduction

Over the past 15 yr, considerable progress has been made in the understanding of benthic suspension-feeder particle processing mechanisms (reviewed in Riisgård & Larsen, 2000, 2001). In particular, a sustained effort has resulted in an enhanced understanding of these mechanisms in suspension-feeding bivalves, in 3 of the 4 major processing systems: (1) homorhabdic filibranch (Beninger *et al.*, 1991, 1993, 1995a; Nielsen *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 1993; Riisgård *et al.*, 1996; Beninger *et al.*, 1997a; Silverman *et al.*, 1999), (2) heterorhabdic filibranch (Beninger *et al.*, 1992, 1993, 2004; Beninger & St-Jean, 1997a, b; Beninger & Decottignies, 2005), and (3) eulamellibranch (Ward *et al.*, 1993; Silverman *et al.*, 1996; Beninger *et al.*, 1997b). The pseudolamellibranch is the 4<sup>th</sup> and most enigmatic of these systems, despite several energetic research efforts (Ward *et al.*, 1993, 1994, 1998). The pseudolamellibranch system is found in the commercially important family Ostreidae, and is characterized by a deeply plicate, heterorhabdic gill (i.e. composed of 2 filament types: the concave principal filaments at the bases of the plicae, themselves composed of 10 to 12 convex ordinary filaments, Fig. 18Ba). The differences between a heterorhabdic gill (including the pseudolamellibranch gill) and a homorhabdic gill are shown in Fig. 18B.

Bi-directional particle transport has been firmly established on the pseudolamellibranch gill, with particles initially accepted being sent dorsally via the principal filaments, and particles either initially rejected or those too large to enter the principal filament openings sent ventrally to the ventral ciliated groove as shown in Fig. 18A (Ward *et al.*, 1994, 1998; Cognie *et al.*, 2003). The sites of selection are also relatively well documented in the pseudolamellibranch system (Ward *et al.*, 1998; Cognie *et al.*, 2003), as well as the mechanism of pseudofeces evacuation from the pallial cavity (Beninger & Veniot, 1999). However, several fundamental questions remain concerning the functioning of this system:

- (1) Contrary to the situation in the homorhabdic gills (Silverman *et al.*, 1996, 1999), the capture mechanism is unknown. Although latero-frontal cirri (LFC) are present, they are much reduced compared to those of the homorhabdic gills, and conform to the composite rather than the compound type (Beninger & Veniot, 1999; Beninger *et al.*, 1999; P. G. B. unpubl. data). The gill is heterorhabdic, so that in principle, particle capture could be accomplished without LFC, as in the Pectinidae, presumably through hydrodynamic capture (Owen & McCrae, 1976). The first unanswered question is therefore: are particles captured by the small, loosely grouped LFC, or by hydrodynamic means, or both?
  
- (2) The oyster gill is unique in that it is both heterorhabdic, and at the same time it possesses multiple ciliated tracts on the ordinary filaments (Fig. 1C). Two frontal lateral tracts (FLT), with “fine” (simple) cilia, and a frontal median tract (FMT), with “coarse” (composite) cilia, are found on these frontal surfaces (Atkins, 1937a, b, 1938; Ribelin & Collier, 1977; P. G. B. unpubl. data). From early direct observations of dissected material, Atkins (1937a, b) deduced that the FMT cilia beat ventrally, while the FLT cilia beat dorsally; this was later supported by Ribelin and Collier (1977), based on the prevalent angles of the cilia as fixed and observed under scanning electron microscopy (SEM). With the well documented observation that particles on the plicae are always transported to the ventral particle groove (Ward *et al.*, 1994 and Fig. 18A), and the affirmation of the ventral particle groove as an initial rejection site (Ward *et al.*, 1998), the question of the roles of the frontal tracts obviously arises. If bi-directional transport on the ordinary filaments does not occur, what does the presence of a bi-directional beat signify?

Precise knowledge of processing events on the oyster gill ordinary filaments is lacking, due to the inability to distinguish between the 3 frontal tracts other than through optical or electron microscopy on fixed and stained gill fragments (Ribelin & Collier, 1977; Beninger, 2000). Information concerning the function of these 3 tracts must therefore be obtained by indirect methods.

Mucocyte mapping has been shown to be a useful technique to enhance understanding of bivalve particle processing mechanisms (Beninger *et al.*, 1993, 1997b, 2003b; Beninger & Dufour, 1996; Beninger & St-Jean, 1997a, b). It is possible to relate the

type of underlying mucus secretion to the type of transport (mucociliary or hydrodynamic), the type of surface, and the direction of particle transport relative to particle flow (Beninger & St-Jean, 1997a). The 3 oyster ordinary filament frontal ciliated tracts are especially interesting in this regard, because a difference in the underlying mucus secretion types would indicate that the FMT and FLT perform different functions; it would also shed light on the nature of these functions. Mucocyte distribution on such a fine scale has not been attempted to date. The present study therefore uses mucocyte mapping to elucidate the particle processing roles of the ordinary filament frontal ciliated tracts in the pseudolamellibranch system of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

## **D- Materials and methods**

### **1- Specimen sampling and histological processing**

Fourteen adult *Crassostrea gigas* (7.1 to 9.2 cm, longest axis) were sampled from the Baie de Bourgneuf (47°5' S, 2°5' W), and the gills were immediately dissected out and fixed in aqueous Bouin's solution in the field. After 48 h fixation, they were rinsed under flowing water for 24 h, dehydrated, and embedded in paraffin. Transverse 5 µm sections were made in the mid-region of the gill (Fig. 18A) for each specimen, and stained using the following alcian blue–Periodic acid-Schiff (PAS) protocol, as perfected in initial trials: 1% alcian blue pH 2.5 (2 min), 1% periodic acid (2 min), Schiff reagent (15 min) (Merck, activity varies markedly among suppliers), and sodium metabisulfite (3 x 3 min). Controls were subjected to diastase digestion prior to staining. The resulting mucocyte secretion colours were standardized using the Pantone<sup>®</sup> colour coding system (Beninger *et al.*, 1993, 1997b, 2003b; Beninger & Dufour, 1996; Beninger & St-Jean, 1997a, b).

### **2- Estimation of tissue shrinkage and filament width homogeneity**

In order to estimate tissue, and hence ciliated tracts, shrinkage due to fixation and histological processing, 30 apical filament widths for each of 10 adult individuals were measured on both fresh gill tissue and sections processed according to the protocol outlined above (600 measurements in total). This step allowed the establishment of a width correction factor which could be applied to the counted sections, in order to determine the true (i.e.

living) widths of the frontal ciliated tracts. It also allowed the estimation of filament width homogeneity within and between individuals.

### **3- Mucocyte counts**

Mucocyte counts were performed on 30 haphazardly chosen filaments per plical location (apical or lateral filament – Fig. 18B), for each of the 14 oysters, in order to establish their relative abundances on the component filaments of the plicae. This approach was designed to determine whether all filaments of a plica were equally important in particle transport (relative filament activity). Only mucocytes whose openings to the frontal surface could be visually ascertained were typed and counted.

In addition, mucocyte fine distribution was established on the frontal surface of gill ordinary filaments (FMT or FLT, Fig. 18C), after ascertaining that filament width was homogeneous within and between individuals (see above). Each filament section was divided into 3 counting zones, corresponding to the 2 FLT and the 1 FMT; these were easily distinguishable under oil immersion due to the greater length of the cilia of the FMT. It was possible to quantify the relative numbers and types of mucocytes which discharged their secretions onto each of the 3 frontal ciliated tracts (Fig. 18C). The tract widths were uniform: 5  $\mu\text{m}$  for each of the FLT, and 20  $\mu\text{m}$  for the FMT, as previously reported for *Crassostrea virginica* (Ribelin & Collier, 1977).

Mucocyte counts were performed at 1000x under oil immersion, using a digital camera and computer screen. Images were stored using LUCIA G<sup>®</sup> software, pending counts.

In order to evaluate the instantaneous total volumes of mucus contained in mucocytes, 30 mucocytes of each type were measured and converted to volumes. All mucocytes were slightly bent, and after straightening were ellipsoid-shaped; half-length major (x) and half-length minor (y) axes were measured, and the corresponding volumes (V) were calculated ( $V = 4/3 \pi xy^2$ ). Mean volumes were thus calculated for each mucocyte type; these values were multiplied by mucocyte number to obtain the total mucocyte volume. These values were underestimations, since the maximum long and short axes may not always have been in the plane of section. This underestimation should be consistent for all mucocyte types, given the sample size for this determination.

#### **4- Hypotheses and statistical analyses**

The following 2 sets of hypotheses were formulated:

- (1)  $H_0$ : There will be no significant difference in mucocyte types, densities and total volumes between apical and lateral filaments of a plica.  
 $H_1$ : There will be consistent, significant difference in mucocyte types, densities and total volumes between apical and lateral filaments of a plica. The conclusion here would be that the filaments with the largest densities and total volumes of mucocytes are more active in particle processing than those with smaller numbers and total volumes of mucocytes
- (2)  $H_0$ : There will be no significant difference in mucocyte types, densities and total volumes between frontal ciliated tracts of the ordinary filaments.  
 $H_1$ : There will be significant difference in mucocyte types, densities and total volumes between the frontal ciliated tracts of the ordinary filaments. The conclusion here would be that different tracts perform different roles or participate to different degrees in particle processing on the ordinary filaments. The interpretation of this finding could be carried further, based on cilia and mucus types dominant on the particular tracts.

A 2-tailed Student t-test was performed when the mucocyte distribution data was normal and variances homogeneous, and a Mann-Whitney rank sum test was performed when data were non-normal despite all transformations, with  $\alpha = 0.05$ . A 1-way parametric ANOVA was performed on the normally distributed and homoscedastic shrinkage data, with  $\alpha = 0.05$ .

### **E- Results**

#### **1- Tissue shrinkage**

Intra-individual differences in apical filament widths were small (coefficient of variation = 8.6%), and no significant inter-individual differences in apical filaments widths were found ( $p = 0.091$ , general mean  $\pm$  95% confidence interval [CI]:  $53.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ , range 51.5 to  $54.9 \mu\text{m}$ ) in fresh gill tissue, allowing standardization of mucocyte counts within the

30  $\mu\text{m}$  wide (post-histological processing) frontal surface. General mean and standard deviation of shrinkage after fixation and histological processing was  $32 \pm 2.3\%$ .

## 2- Mucocyte types

In longitudinal section, all *Crassostrea gigas* mucocytes were oval-shaped, and hence could be represented as ellipsoids in 3 dimensions (Table 7, Fig. 18C). All mucocytes were situated in the ciliated epithelium, and no sub-epithelial glands were observed. Mixed mucopolysaccharide (MMPS) containing mucocytes were significantly larger than acid mucopolysaccharide (AMPS) containing mucocytes in all sections examined, with mean volumes ( $\pm 95\%$  CI) of  $315.2 (\pm 61.2) \mu\text{m}^3$  and  $174.8 (\pm 26.0) \mu\text{m}^3$  respectively ( $p \leq 0.001$ ).

**Table 7.** *Crassostrea gigas*. Secretion type, visual and Pantone® standard colours, and mean volumes of stained mucocytes in *Crassostrea gigas* gill. AMPS = acid mucopolysaccharides; MMPS = mixed mucopolysaccharides, NMPS = neutral mucopolysaccharides.

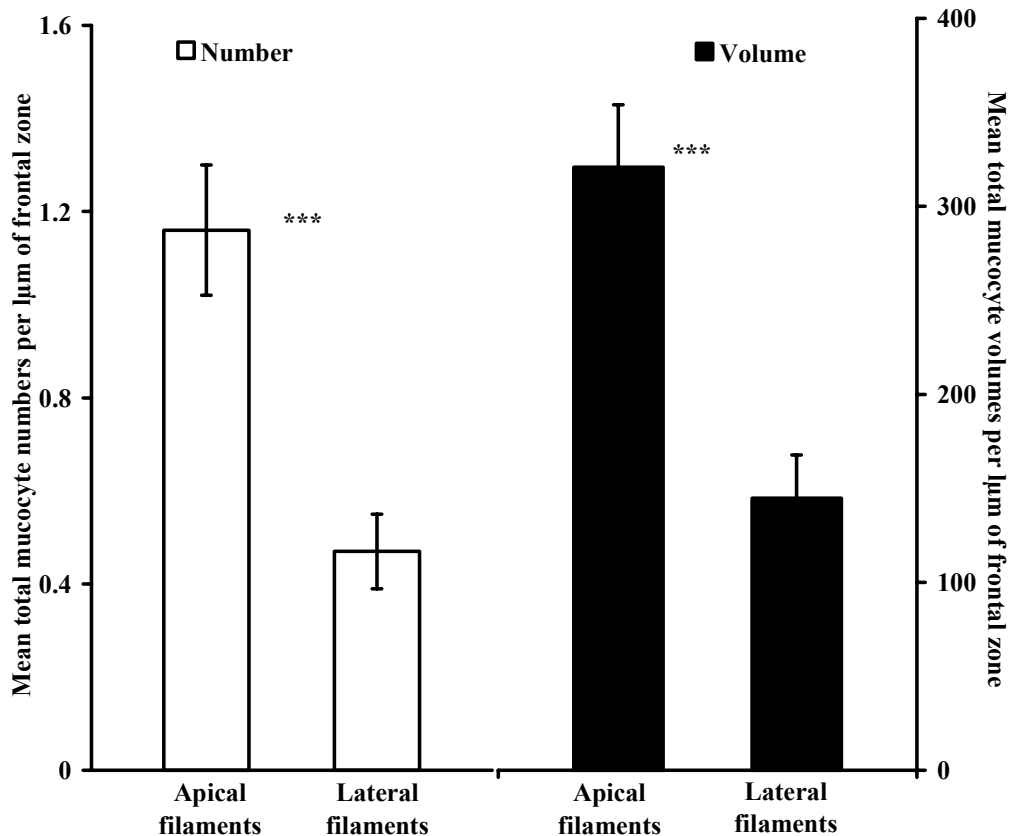
**Tableau 7.** *Crassostrea gigas*. Type de sécrétion, couleur visuelle et couleur standard Pantone®, et volumes moyens des mucocytes colorés de la branchie de *Crassostrea gigas*. AMPS = mucopolysaccharides acides; MMPS = mucopolysaccharides mixtes, NMPS = mucopolysaccharides neutres.

Mucocyte		Pantone® standard	Mean ellipsoid
secretion type	Visual colour	colours	volumes ( $\mu\text{m}^3$ )
AMPS	Sky Blue	2935c	174.8
MMPS	Violet to Indigo	2385c*, 2573c	315.2
NMPS (rare)	Intense Pink	2375c	-

## 3- Relative mucocyte density on the component filaments

A significant difference was observed in total mucocyte densities between the lateral filaments and the apical filaments of the plicae ( $p \leq 0.001$ ). The apical filaments contained the greatest densities of mucocytes, with much smaller densities on the lateral filaments (Fig. 19). In addition, each apical filament presented more than twice the volume of mucus (AMPS + MMPS) compared to the mean value for the lateral filaments ( $p \leq 0.001$ , Fig. 19). Moreover, MMPS containing mucocytes were more abundant, and formed a greater total volume, than the AMPS containing mucocytes in all cases ( $p \leq 0.001$ , Fig. 20B, C).



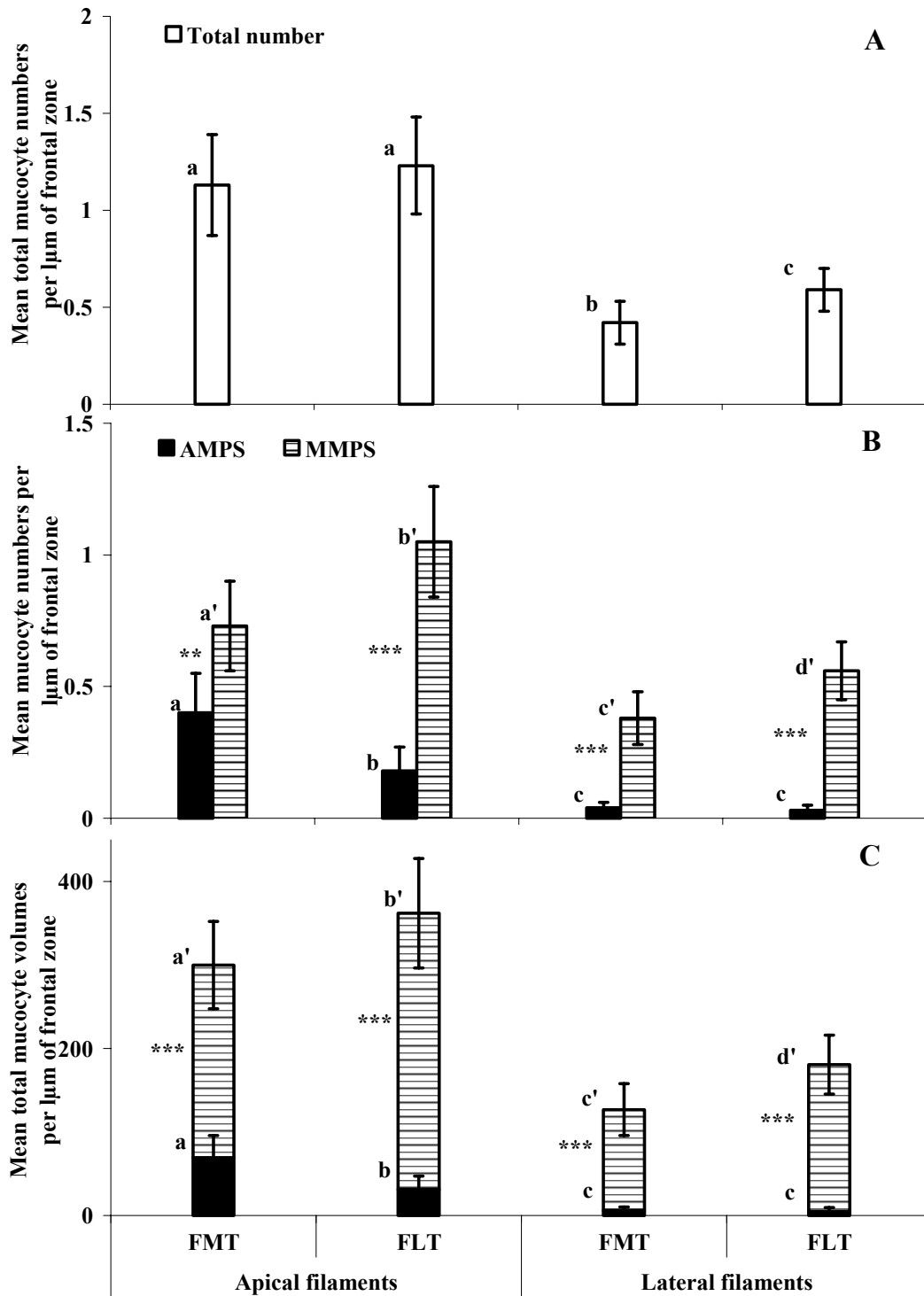


**Figure 19.** *Crassostrea gigas*. Total cumulative (AMPS [acid mucopolysaccharides]+ MMPS [mixed mucopolysaccharides]) mucocyte numbers and total cumulative (AMPS + MMPS) mucocyte volumes ( $\mu\text{m}^3$ ) per linear  $\mu\text{m}$  ( $1\mu\text{m}$ ) of frontal surface of apical and lateral filaments of plicae. Means  $\pm$  95% CI (vertical bars). \*\*\* Values significantly different at  $p \leq 0.001$ .

**Figure 19.** *Crassostrea gigas*. Nombres totaux cumulés (AMPS [mucopolysaccharides acides]+ MMPS [mucopolysaccharides mixtes]) de mucocytes et volumes totaux ( $\mu\text{m}^3$ ) cumulés (AMPS + MMPS) par  $\mu\text{m}$  linéaire ( $1\mu\text{m}$ ) de surface frontale des filaments apicaux et latéraux des plis. Moyennes  $\pm$  95% IC (barres verticales). \*\*\* Valeurs significativement différentes à  $p \leq 0.001$ .

#### 4- Mucocyte distribution within the apical filaments

No significant difference was observed either in total mucocyte densities between the FMT and the FLT on the apical filaments (Fig. 20A,  $p = 0.591$ ), or in the cumulative (AMPS + MMPS) total mucocyte volumes (Fig. 20C,  $p = 0.224$ ). However, within mucocyte types, significant differences in mucocyte densities and total mucocyte volumes were found, depending on the location in the apical filaments. In particular, the FMT contained a more than two-fold larger total volume of AMPS containing mucocytes, compared to the FLT ( $p = 0.022$ , Fig. 20C). AMPS represented 23% of the potential total volume for the FMT, compared to 9% for the combined FLT, a difference of over 2-fold (Table 8). Significant differences were also observed in the densities and the total volumes of MMPS containing mucocytes, between the FMT and the FLT ( $p = 0.027$ ).



**Figure 20.** *Crassostrea gigas*. (A) Total cumulative (AMPS [acid mucopolysaccharides] + MMPS [mixed mucopolysaccharides]) mucocyte numbers per linear  $\mu\text{m}$  ( $\mu\text{m}$ ) of frontal surface in frontal median tract (FMT) and frontal lateral tract (FLT) of apical and lateral filaments of plicae. (B) AMPS and MMPS containing mucocyte numbers per  $\mu\text{m}$  of frontal surface in FMT and FLT of apical and lateral filaments of plicae. (C) Total AMPS and MMPS containing mucocyte volumes ( $\mu\text{m}^3$  per  $\mu\text{m}$  of frontal surface) in FMT and FLT of apical and lateral filaments of plicae. Means  $\pm$  95% CI (vertical bars). Values with the same letter do not differ significantly (p values in text). \*\*\* Values of AMPS and MMPS significantly different at  $p \leq 0.001$ , \*\* values of AMPS and MMPS significantly different at  $p \leq 0.01$ .

**Figure 20.** *Crassostrea gigas*. (A) Nombres totaux cumulés (AMPS [mucopolysaccharides acides] + MMPS [mucopolysaccharides mixtes]) de mucocytes par  $\mu\text{m}$  linéaire ( $1\mu\text{m}$ ) de surface frontale de la voie médiane frontale (FMT) et des voies latérales frontales (FLT) des filaments apicaux et latéraux des plis. (B) Nombres de mucocytes à AMPS et à MMPS par  $\mu\text{m}$  linéaire de surface frontale de la FMT et des FLT des filaments apicaux et latéraux des plis. (C) Volumes totaux des mucocytes à AMPS et à MMPS ( $\mu\text{m}^3$  par  $1\mu\text{m}$  de surface frontale) de la FMT et des FLT des filaments apicaux et latéraux des plis. Moyennes  $\pm$  95% IC (barres verticales). Les valeurs possédant la même lettre de diffèrent pas significativement (valeurs de p dans le texte). \*\*\* Valeurs de AMPS et MMPS significativement différentes à  $p \leq 0.001$ , \*\* valeurs de AMPS et MMPS significativement différentes à  $p \leq 0.01$ .

**Table 8.** *Crassostrea gigas*. Total potential mucus secretion volume of the frontal median tract (FMT) and the 2 frontal lateral tracts (FLT) of apical and lateral filaments ( $\mu\text{m}^3$ ). (AMPS = acid mucopolysaccharides; MMps = mixed mucopolysaccharides)

**Tableau 8.** *Crassostrea gigas*. Volume total potentiel de sécrétion de mucus de la voie médiane frontale (FMT) et des deux voies latérales frontales (FLT) des filaments apicaux et latéraux ( $\mu\text{m}^3$ ). (AMPS = mucopolysaccharides acides; MMPS = mucopolysaccharides mixtes)

	Apical filament		Lateral filament	
	FMT	FLT	FMT	FLT
<b>AMPS</b>	1386.20	312.20	124.80	50.00
<b>MMPS</b>	4616.00	3310.02	2409.40	1756.30
<b>AMPS + MMPS</b>	6002.20	3622.22	2534.20	1806.30
<b><u>AMPS <math>\times</math> 100</u></b>	23%	9%	5%	3%
<b>(AMPS + MMPS)</b>				

### 5- Mucocyte distribution within the lateral filaments

The FMT of the lateral filaments showed significantly lower cumulative densities of mucocytes compared to the FLT ( $p = 0.045$ , Fig. 20A). This difference was due to significant differences in MMPS containing mucocyte densities (Fig. 20B,  $p = 0.007$ ). The total volume of MMPS was also significantly lower on the FLT (Fig. 20C,  $p = 0.007$ ). No significant difference was observed in the AMPS containing mucocyte densities and total mucocyte volumes between the FMT and FLT (Fig. 20B, C,  $p = 0.564$ ). AMPS represented 5% and 3% of the cumulative total mucocyte volume for the FMT and the combined FLT respectively (Table 8, Fig. 20C).

## **F- Discussion**

### **1- Mucocyte types and relative particle processing activity of the filaments**

The present study identified 2 major types of mucocytes on the *Crassostrea gigas* gill: those containing AMPS and those containing MMPS. Neutral mucopolysaccharide (NMPS) containing mucocytes were rare. While the 2 major mucocyte types provide secretions of different viscosity, the mixing which occurs on the frontal surface as a result of the ciliary beat would produce a more viscous mucus on the FMT compared to the FLT. A similar study in *Crassostrea virginica* found only AMPS containing mucocytes and NMPS containing mucocytes, although the exact positions of the mucocytes on the frontal tracts was not recorded (Beninger & Dufour, 1996). The NMPS are less viscous than the MMPS, but in *C. virginica* the numbers of each type were nearly equal, with a slight dominance of AMPS. The resulting mixture would probably display a viscosity similar to that observed on the *C. gigas* frontal surface overall.

The highly significant difference in total mucocyte densities and total mucocyte volumes, between the apical and the lateral plical filaments, leads to the rejection of  $H_0(1)$ , which states there are no significant differences in mucocyte types, densities and total volumes between apical and lateral filaments of a plica, and the acceptance of  $H_1(1)$ , which is in favour of the apical filaments. In the natural state (as opposed to when particles are deposited directly onto dissected gills – Atkins, 1937a), the apical filaments are therefore much more active in particle processing, compared to the lateral filaments. Mucocyte mapping allows this conclusion to be drawn, whereas direct video-endoscopic observations fail to yield the necessary information, due to the proximity of the pseudolamellibranch plicae to each other. This conclusion is further supported by the striking difference in the AMPS / (AMPS + MMPS) percentages: 23 (FMT) vs 9% (combined FLT) for the apical filaments, compared to 5 and 3%, respectively, for the lateral filaments (Table 8). A similar apical filament–lateral filament distributional difference was observed previously in *Crassostrea virginica* (Beninger & Dufour, 1996), as well as in the heterorhabdic filibranchs *Chlamys varia* and *Placopecten magellanicus* (Owen & McCrae, 1976; Beninger *et al.*, 1993).

### **2- Alternative functions of the lateral filaments**

Taken together, the results cited above strongly suggest that in the bivalve heterorhabdic gill, the apical filaments are the principal sites of particle processing on the plicae. The lateral filaments play a secondary role, and we suggest that their main function is

not directly in particle transport, but in the structural formation and maintenance of the plicae and subsequent topography-dependent water currents, which are universal features of the heterorhabdic gill. The plicae themselves perform several very important functions in particle processing. The first of these functions is the strong hydrodynamic component of particle capture, as opposed to direct cirral capture of particles (Owen & McCrae, 1976, latero-frontal cirri being reduced or absent in these bivalves). A second function is the physical separation of the dorsal (initial acceptance) and ventral (rejection: heterorhabdic filibranchs; initial rejection: pseudolamellibranchs) collecting tracts on the gill (Ward *et al.*, 1994). Finally, the plicae allow an increase of filtering and respiration surface area, while conserving overall gill dimensions. The lateral filaments of the plicae, being the ones which give rise to the plical form, may be much more useful in fulfilling these functions than they would be as direct particle processing entities.

It has been suggested that the individual gill filament is the fundamental particle processing unit in bivalves (Ward *et al.*, 1998). The present and previous studies of the heterorhabdic gill (P. G. B., unpubl. data) strongly suggest that not all filaments play an equal, or even similar, role in particle processing. Furthermore, it is very likely that the filaments of the heterorhabdic gill perform cooperative functions, such as hydrodynamic capture and plical maintenance, so that they cannot wholly be considered individually from a functional standpoint.

### **3- Relative mucocyte distributions on the apical filament frontal ciliated tracts**

The quantitative results of the present study are at variance with the qualitative observations of Ribelin & Collier (1977) in *Crassostrea virginica*, who reported that mucocytes were generally restricted to the boundary regions between the FLT and the FMT, and were rarely observed in the fine FLT. In *Crassostrea gigas*, mucocytes were observed throughout the 3 frontal tracts, and in fact there is no significant difference in total density between the FMT and the FLT; however, the total mucocyte volumes were significantly different in the FMT.

The relative mucocyte densities and total mucocyte volumes on the apical filament frontal tracts, reveal a striking difference in the distribution of AMPS; leading to a rejection of  $H_0(2)$  which states that there are no significant differences in mucocyte types, densities and total volumes between frontal ciliated tracts of the ordinary filaments, and acceptance of the corresponding  $H_1(2)$  that there are significant differences in mucocyte types, densities and total volumes between the FMT and the FLT, in favour of AMPS mucocytes on the FMT.

#### **4- Functional correlates: Frontal median tract (FMT)**

AMPS containing mucocytes secrete the most viscous mucopolysaccharides (Grenon & Walker, 1978; Beninger & St-Jean, 1997a), thus based on the AMPS / (AMPS + MMPS) percentages it is evident that the FMT is characterized by a much more viscous secretion than are the FLT. The FMT also presents 2 other differences with respect to the FLT: the cilia are composite (P. G. B., unpubl. data), and they are much longer (15  $\mu\text{m}$  vs 5  $\mu\text{m}$ , respectively – Veniot, 2003). SEM observations of these cilia are consistent with the suggestion that they beat dorsoventrally (Ribelin & Collier, 1977), in which case this tract would be responsible for the dorsoventral particle transport observed on the oyster plicae (Atkins, 1937a, b; Ward *et al.*, 1994). As the prevailing current is ventrodorsal, this counter-current particle transport can only be accomplished if the particles adhere closely to the ciliated epithelium. Beninger and St-Jean (1997a) demonstrated that AMPS or ADMPS (acid-dominant mucopolysaccharides) are universally used by bivalve pallial organs in such circumstances, and the observations of the present study extend this rule to a finer scale: 1 ciliated tract out of 3 contiguous tracts, on a single frontal ciliated surface only 40  $\mu\text{m}$  wide (fresh gill tissue). Although clearance, selection, and endoscopic studies of oyster feeding routinely use small particle sizes (3 to 20  $\mu\text{m}$ ; Ward *et al.*, 1994, 1998; Ropert & Gouilletquer, 2000), their gills are exposed to a very wide range of particle sizes, including large, dominant coastal diatoms (Levinton, 1982; Lakshminarayana, 1983; Barnes & Hughes, 1988; Rincé, 1993). The size range of particles ingested by oysters extends from approx. 5  $\mu\text{m}$  (100% retention, Møhlenberg & Riisgård, 1978; Riisgård, 1988) to an as yet unknown maximum size. *Crassostrea gigas* is at least capable of ingesting large numbers of the 250 x 150  $\mu\text{m}$  diatom *Coscinodiscus perforatus* (Cognie *et al.*, 2003). Given that the frontal ciliated surface of a filament is only 40  $\mu\text{m}$  in width, it is clear that larger particles must be transported by several filaments simultaneously. Although intuitively, this might seem rather problematic, given the presence of 3 ciliated tracts on each filament and the suggestion of opposite beat directions for each tract (Ribelin & Collier, 1977), it should be kept in mind that the FMT composite cilia are 3 times longer than the FLT cilia (see above), such that larger particles can span adjacent apical filaments, and indeed adjacent plicae, and be transported ventrally in a concerted manner. Indeed, video-endoscopic observations show that all large particles, regardless of quality, are transported ventrally on the plicae (Cognie *et al.*, 2003). The observations of the present study are thus consistent with the proposition that the FMT is responsible for the ventralward transport of particles on the oyster gill (Atkins, 1937 a, b; Ribelin & Collier, 1977). This ventralward transport may represent initial qualitative rejection by the oyster gill for particles smaller than

the opening of the principal filament (critical threshold size, CTS). For large particles (>CTS), ventralward transport is indiscriminate, since they cannot enter the dorsally directed tracts of the principal filaments. For such particles, qualitative selection takes place on the labial palps (Cognie *et al.*, 2003). In summary, particles of all sizes may be transported by the FMT of the ordinary filament frontal surface.

### **5- Functional correlates: frontal lateral tracts (FLT)**

While from the foregoing discussion, the role of the FMT now appears evident, that of the FLT is much less obvious. Despite the putative dorsalward beat of these cilia (Atkins, 1937a, b; Ribelin & Collier, 1977), dorsalward particle transport on the FLT does not appear to occur naturally. Indeed, Atkins (1937a) describes dorsalward transport on these tracts as ‘precarious’, being frequently re-directed ventrally on the FMT. Moreover, Atkins (1937a) observation of dorsalward transport on the FLT was only possible in excised gill fragments left for several days. In the video-endoscopic study of Ward *et al.* (1994) particles were never observed moving dorsally for more than short distances, and all particles on the ordinary filaments were ultimately transported to the ventral particle grooves. These observations can most easily be explained by a dorsalward beat of the FLT cilia, whose chief result is water entrainment rather than particle transport; particles may occasionally be entrained in this current, but this is a minor and very unstable consequence. Nonparticipation of the FLT in particle transport appears most probable, and is supported by the results of the present study, which show that the FMT possesses the most viscous mucus, the type most capable of moving particles ventrally counter to the prevailing pallial current. We propose therefore that not only are the apical filaments the only active filaments in particle processing by oysters, but also that the FMT of these filaments are the only significant processing sites.

The FLT of the frontal surface of the ordinary filaments nonetheless satisfy the 2 essential conditions for mucociliary transport: abundant ciliation, and relatively abundant mucocytes. Given the difference in length between the FMT composite cilia and the FLT cilia, and hence the physical separation of their potential treatment surfaces, it is difficult to conceive even the limited role proposed by Ribelin and Collier (1977): that of the initial reception of particles intercepted by the latero-frontal cirri, and their subsequent transfer to the FMT.

Several examples of abundantly ciliated, mucocyte rich epithelia not involved in particle transport have been found in the bivalve pallial cavity: the ciliated tracts beneath the dorsal fold of the *Mytilus edulis* labial palp (Beninger *et al.*, 1995a), and the abfrontal gill

filament surface in the same species (Beninger & Dufour, 2000; Dufour & Beninger, 2001). In both cases, the mucociliary epithelia are vestigial, and appear not to have been subjected to sufficient negative selection to become reduced or disappear. We suggest that the FLT of the frontal surfaces on the ordinary filaments of the oyster constitute another example of such vestigial tracts. Although vestigial with respect to their original anatomical derivation, such surfaces may evolve to assume new functions. In the case of the *M. edulis* gill filament abfrontal surface, it has been argued that the abundant ciliation assists in water pumping; the role, if any, of the abundant mucocytes may be in the reduction of frictional resistance in water passage over the epithelium (Dufour & Beninger, 2001), as has also been suggested for the eulamellibranch gill (Beninger *et al.*, 1997b). Certainly, the dorsalward beat of the FLT cilia on the oyster ordinary filament frontal surfaces could contribute greatly to moving water toward the gill and dorsally, in addition to the activity of the dorsally beating cilia of the principal filaments. The situation from the standpoint of cilia beat, pallial currents, and particle transport would thus be remarkably clear: dorsalward pallial flow is effected by all frontal cilia except the composite cilia of the ordinary filament FMT, which alone are responsible for the ventralward transport of particles on the plicae within a high viscosity mucus, as is the rule in counter-current particle transport on exposed surfaces in bivalves (Beninger & St-Jean, 1997a).

## **G- Conclusions**

The present study demonstrates that mucocyte mapping can be successfully applied on a very fine scale (mapping within 30  $\mu\text{m}$  histologically processed segments, corresponding to 40  $\mu\text{m}$  in living tissue), to elucidate surface functional differences. Taken together, the results of the present study and of the previous studies of the 2 heterorhabdic gill types, the heterorhabdic filibranch (Owen & McCrae, 1976; Beninger *et al.*, 1993) and the pseudolamellibranch (Beninger & Dufour, 1996), show first that the apical filaments greatly dominate in particle processing on the plicae. The major role of the lateral filaments would appear to be the maintenance of the plical form, itself both increasing the filtering surface area and allowing the separation of the dorsal (initial acceptance) and ventral (initial rejection or large particle transport) gill particle tracts, as well as contributing to the dorsalward pallial current via their FLT. Second, within these apical filaments, only the FMT is active in particle processing. Finally, the effectors of the pallial current and of particle transport on the



oyster gill are clarified: the dorsalward pallial current is produced not only by the dorsally beating cilia of the principal filaments, but also by those of the FLT of the ordinary filaments, whereas all particle transport on the plicae is effected by the FMT, principally those of the apical filaments.

## **H- Acknowledgements**

The authors thank Mme O Aumaille for technical assistance in histology. As the subject of this study has no direct economic or medical impact, it is not possible to acknowledge funding from any of the French funding agencies.

**Figure 18.** **A-** *Crassostrea gigas*, right valve and mantle removed, showing gill site for mucocyte counts (rectangle), grey arrows: dorsal particle transport on the principal filaments of gill plicae, black arrows: ventral particle transport on the ordinary filaments of gill plicae, empty arrows: inhalant water currents. A: anterior, D: dorsal, P: posterior, V: ventral (organ orientations), am: adductor muscle, g: gills, m: mantle, p: palps. Redrawn from Cognie (2001). **B-** Diagrammatic comparison of a heterorhabdic (including *C. gigas* pseudolamellibranch) gill and a homorhabdic gill (e.g. *Mytilus* spp.). (a) *C. gigas* transverse section passing through a row of ostia. (b) Transverse section of a homorhabdic filibranch gill. of: ordinary filament, pf: principal filament, fs: frontal surface, as: abfrontal surface, af: apical filament, lf: lateral filament. **C-** Diagram of *C. gigas* ordinary filament transverse section and location of the different ciliated tracts. ac: abfrontal cilia, FLT: frontal lateral tract simple (fine) cilia, FMT: frontal median tract composite (coarse) cilia, lc: lateral cilia, lfc: composite latero-frontal cilia, AMPS: acid mucopolysaccharide containing mucocyte, MMPS: mixed mucopolysaccharide containing mucocyte.

**Figure 18.** **A-** *Crassostrea gigas*, valve droite et manteau ôtés, montrant la zone de comptage des mucocytes sur la branchie (rectangle), flèches grises: transport dorsal des particules sur les filaments principaux des plis branchiaux, flèches noires: transport ventral des particules sur les filaments ordinaires des plis branchiaux, flèches blanches: courants d'eau inhalants. Repris d'après Cognie (2001). **B-** Comparaison schématique d'une branchie hétérorhabdique (comprenant la branchie pseudolamellibranche de *C. gigas*) et d'une branchie homorhabdique (par exemple *Mytilus* spp.). (a) Coupe transversale passant par une rangée d'ostia chez *C. gigas*. (b) Coupe transversale d'une branchie homorhabdique. **C-** Schéma d'une coupe transversale d'un filament ordinaire chez *C. gigas* et localisation des différentes voies ciliées.

### Liste des abréviations

**A:** antérieur

**ac:** cils abfrontaux

**af:** filaments apicaux

**am:** muscle adducteur

**AMPS:** mucocyte contenant des mucopolysaccharides acides

**as:** surface abfrontale

**D:** dorsal

**FLT:** cils simples (fins) des voies latérales frontales

**FMT:** cils groupés (épais) de la voie médiane frontale

**fs:** surface frontale

**g:** branchie

**lc:** cils latéraux

**lf:** filaments latéraux

**lfc:** cils latéro-frontaux composites

**m:** manteau

**MMPS:** mucocyte contenant des mucopolysaccharides mixtes

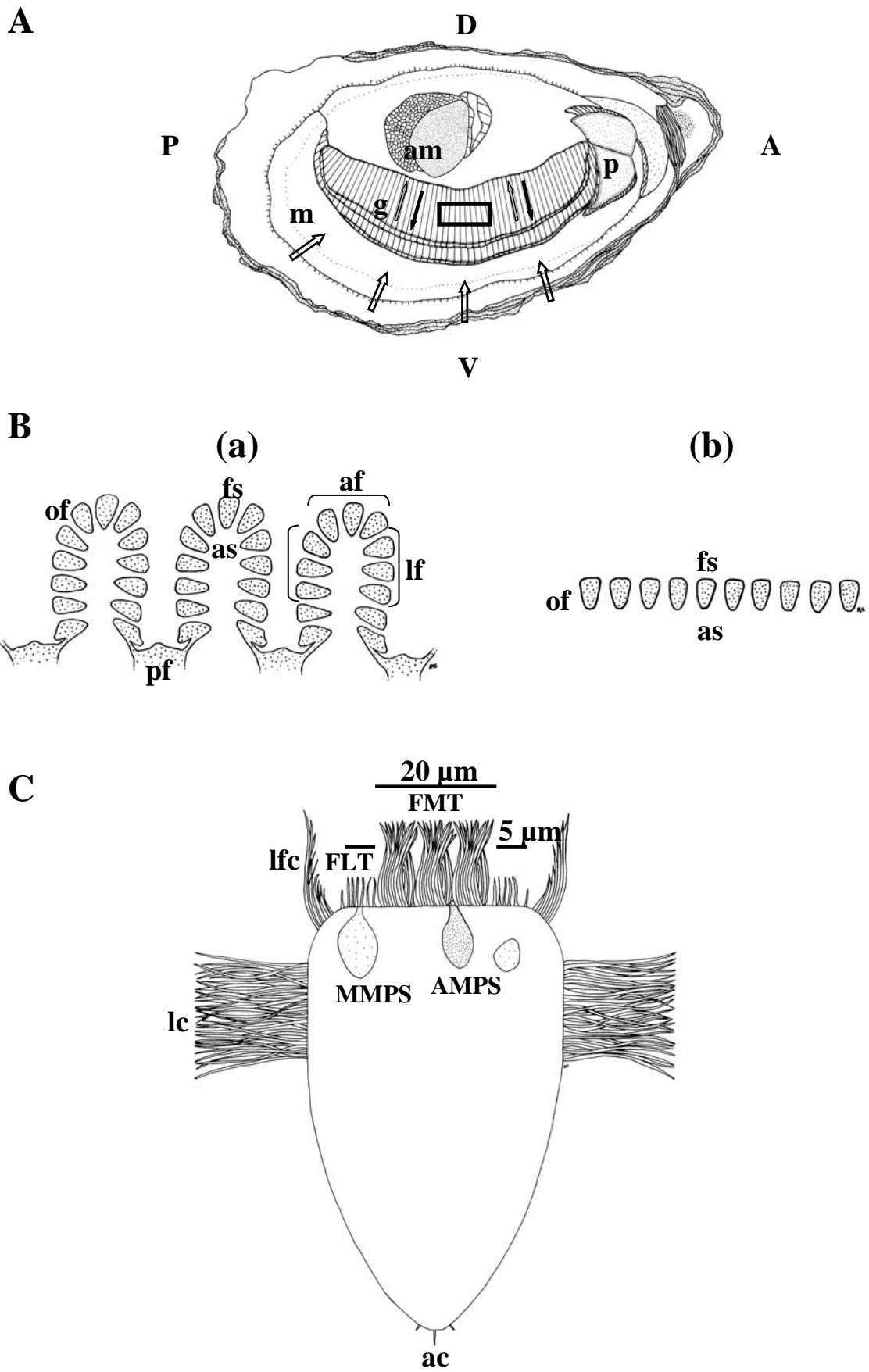
**of:** filament ordinaire

**P:** postérieur

**p:** palpes labiaux

**pf:** filaments principaux

**V:** ventral



**Figure 18.** *Crassostrea gigas*.

### **3.3 Acquisition de la capacité de traitement des particules chez les larves et les juvéniles de *Crassostrea gigas*: étude du développement de la branchie**

---

Article publié:

Marine Biology, DOI 10.1007/s00227-005-0228-6, January 2006

**Gill development, functional and evolutionary implications in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae).**

**Rozenn CANNUEL & Peter G. BENINGER**

#### **A- Abstract**

Development of the *Crassostrea gigas* gill was studied in order to better understand the feeding biology of early life stages, identify potentially critical developmental stages which may influence rearing success or recruitment to wild populations, and shed light on the evolution of the basic bivalve gill types. Larvae and juveniles were reared in an experimental hatchery, and larger specimens were obtained from a commercial hatchery. Specimens were relaxed, fixed, dried, and observed using scanning electron microscopy (SEM). The right and left gills developed symmetrically, via a "cavitation-extension" process from the gill buds. The inner demibranchs developed first (V-stage, 0.29 to 2.70 mm), in a sequential postero-anterior series of homorhabdic filaments. The outer demibranchs developed later (W-stage, from 2.70 mm), also as homorhabdic filaments, synchronously along the gill axis. The principal filaments (PF) developed from the progressive fusion of 3 ordinary filaments (OF), at a size of 7.50 mm, and the consequent plication was accentuated by the formation of extensive tissue junctions. Effective filament number (number of descending and ascending filaments) showed a marked discontinuity at the transition from the V- to the W- stage of the gill. Filament ciliation showed several important changes: establishment of OF ciliation in the homorhabdic condition (2.70 mm), ciliary de-differentiation of the PF in the heterorhabdic condition (7.50 mm), and establishment of a latero-frontal cirri length gradient from the plical

crest to the PF base. Reversal of direction of ciliary beat is also necessary prior to adult functioning of the PF. Three major transitions were identified in *C. gigas* gill development, each potentially important in rearing success or wild population recruitment: (1) transition from velum to gill at settlement, (2) transition from a V- to a W- shaped gill (2.70 mm), and (3) transition from the homorhabdic to the heterorhabdic condition (7.50 mm). Complete gill development was much more prolonged than in species previously studied. The major ontogenetic differences between the *C. gigas* heterorhabdic pseudolamellibranch gill and the pectinid heterorhabdic filibranch gill suggest that the heterorhabdic condition evolved independently in these two bivalve families.

## **B- Résumé**

Le développement de la branchie de *Crassostrea gigas* a été étudié afin de mieux comprendre la biologie de l'alimentation chez les jeunes stades, d'identifier des stades du développement pouvant influencer le succès des élevages ou du recrutement dans les populations naturelles et d'apporter des indications sur l'évolution des types de branchies chez les Bivalves. Les larves et les juvéniles ont été élevés dans une éclosérie expérimentale et les spécimens plus grands ont été fournis par une éclosérie commerciale. Les échantillons ont été anesthésiés, fixés, séchés et observés en microscopie électronique à balayage. Les branchies droite et gauche se mirent en place symétriquement, selon un processus de "cavitation-extension" à partir des bourgeons branchiaux. Les demibranchies internes se développèrent en premier (branchie en forme de V ; de 0,29 à 2,70 mm), selon une séquence postéro-antérieure de filaments homorhabdiques. Les demibranchies externes se différencièrent plus tard (branchie en forme de W ; à partir de 2,70 mm), également constituées de filaments homorhabdiques, de manière synchrone le long de l'axe branchial. Les filaments principaux (PF) se formèrent à partir de la fusion progressive de 3 filaments ordinaires (OF), à partir de 7,50 mm de longueur maximale de coquille, et le plissement en résultant s'accrut avec la mise en place de plusieurs types de jonctions tissulaires. Une discontinuité marquée du nombre de filaments efficaces (nombre de filaments ascendants et descendants) a été mise en évidence lors de la transition entre le stade V et le stade W de la branchie. La ciliature des filaments a présenté plusieurs changements importants: mise en place de la ciliature des OF dans la condition homorhabdique (2,70 mm), dé-différenciation de la ciliature des PF dans la condition hétérorhabdique (7,50 mm) et mise en place d'un

gradient de longueur des cirres latéro-frontaux de la crête des plis vers la base des PF. Trois transitions majeures ont été identifiées au cours du développement de la branchie de *C. gigas*, chacune ayant potentiellement une importance dans le succès des élevages et ou dans le recrutement des populations naturelles : (1) la transition du velum à la branchie lors de la fixation, (2) la transition d'une branchie en forme de V à une branchie en forme de W (2,70 mm) et (3) la transition de la condition homorhabdique à la condition hétérorhabdique (7,50 mm). Le développement complet de la branchie fut bien plus long que celui des espèces précédemment étudiées. Les différences ontogénétiques majeures entre la branchie hétérorhabdique pseudolamellibranche de *C. gigas* et la branchie hétérorhabdique filibranche des Pectinidés suggèrent que la condition hétérorhabdique a évolué indépendamment chez ces deux familles de bivalves.

## C- Introduction

Many benthic marine invertebrates possess two distinct stages in their life cycles: a pelagic larval stage, and a juvenile to adult benthic stage. In natural and cultured populations, the transition from pelagic to benthic life, and concomitant metamorphosis, is often associated with high mortalities (Quayle, 1952; Rumrill, 1990; Roegner, 1991; Baker & Mann, 1994a; Roegner & Mann, 1995; Gosselin & Qian, 1996; Gosselin & Qian, 1997; Gosling, 2003). The process of settlement and subsequent recruitment determine benthic population structure (Gosselin & Qian, 1997; Hunt & Scheibling, 1997), as well as temporal population continuity in their habitats and colonization of new habitats by mean of larval dispersal (Pechenik, 1999). Both abiotic and biotic factors, or interactions of both, may be responsible for high mortalities at settlement, and subsequent poor recruitment. Biotic factors known to affect these processes in benthic marine invertebrates, and in bivalves in particular, include predation (Krantz & Chamberlin, 1978; Ventilla, 1984; Gosselin & Qian, 1997; Masski & Guillou, 1999; Newell *et al.*, 2000), competition for space and/or food (Osman *et al.*, 1989; Zajac *et al.*, 1989; Hunt & Scheibling, 1997), diseases (Ventilla, 1984; Bricelj *et al.*, 1992; Gosselin & Qian, 1997; Gosling, 2003) and energy depletion (Ó Foighil *et al.*, 1990; Whyte *et al.*, 1992; Gosselin & Qian, 1997; Hunt & Scheibling, 1997) can influence settlement success and subsequent juvenile mortality. Another biotic factor which may influence natural mortality is abnormal development (Rumrill, 1990; Gosselin & Qian, 1997; Hunt & Scheibling, 1997) or complications during development (Roegner, 1991). Even normal

development is known to be a potential weak link in the growth and survival of early stages (Ó Foighil *et al.*, 1990; Kingzett, 1993; Baker & Mann, 1994a; Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003).

Successful marine fisheries and culture operations rely in large part on successful settlement, early benthic growth / development, and subsequent recruitment to exploited populations. Oysters are the leading bivalve aquaculture species worldwide, with over 95% of landings from culture operations; of this, approximately one-third is due to a single species, *Crassostrea gigas* (data from Gosling, 2003). Despite the economic importance of this species, very little is known concerning its development, and in particular the development of the primary particle processing structure, the pseudolamellibranch gill. Most of the previous studies have provided summary descriptions of the more obvious developmental events in the genus *Ostrea* (Lacaze-Duthiers, 1856; Jackson, 1888, 1890; Yonge, 1926; Cole, 1937, 1938; Raven, 1958; Walne, 1974). More recently, Waller (1981) documented the formation of a gill epithelial bridge prior to the differentiation of the first gill buds in the veliger of *Ostrea edulis*. A more complete study of gill development has been performed for *Ostrea chilensis* (Chaparro *et al.*, 2001); however, it should be noted that, unlike the genus *Crassostrea*, all members of the genus *Ostrea* brood their larvae on the gills. Moreover, key aspects of its gill development such as principal filament differentiation and ciliation, as well as plication and complete interfilamentar junctions were not reported in this study.

The present work is a detailed account of gill development in the larva, juvenile, and early adult of *C. gigas* with a view to enhancing our understanding of the biotic processes affecting recruitment into natural or cultured populations.

Study of the bivalve gill is proving increasingly useful as a phylogenetic and taxonomic tool (Beninger & Dufour, 2000; Beninger *et al.*, 2003b; Neumann & Kappes, 2003; Dufour *et al.*, in press). A secondary objective of this work is therefore the application of gill development data to the interpretation of the evolutionary affinities of the Ostreidae and the evolutionary trajectories of the major gill types within the Bivalvia.

## **D- Materials and methods**

In view of the prolific synonymy of the different developmental stages from egg to adult, and the extended duration of the sub-adult phase, the following terminology was adopted in the present study: “larva” refers to pelagic stages, while “juvenile” refers to settled benthic stages up to the acquisition of a fully developed “adult” gill.

### **1- Larval and juvenile rearings**

Fertilizations, larval and juvenile cultures of *C. gigas* were conducted at the Argenton experimental hatchery (IFREMER – Finistère, France; for details see Cannuel & Beninger, 2005). Briefly, oocytes and spermatozoa were obtained in April 2002 by gonad stripping of adult oysters previously conditioned during 6 weeks. Larval cultures were performed at an initial density of 30-35 larvae.mL<sup>-1</sup>, in 150 L rearing tanks of aerated 1- $\mu$ m filtered sea water (FSW). At day 2, larval concentrations were reduced to 2 larvae.mL<sup>-1</sup>. Larvae were fed *ad libidum* with a 1:1:1 mixture of *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* (clone T-Iso) and *Chaetoceros calcitrans* (PTC – diet; Robert & Gérard, 1999; Robert *et al.*, 2001). Initial culture temperature was 22°C, gradually raised to 24-25 °C on day 6, and maintained at this temperature to settlement (Robert & Gérard, 1999).

At day 20, when the majority of the larvae presented an eyespot and swimming-crawling behaviour, they were transferred to rectangular PVC sifters of 140  $\mu$ m diagonal mesh placed in raceways and filled with finely crushed oyster shells, at a density of 60 000 larvae per sifter, for settlement, metamorphosis and juvenile rearing. Juveniles were fed continuously with PTC diet in 5- $\mu$ m FSW. Raceways and sifters were washed first one week after settlement and then every 2-3 days. Juvenile rearing was stopped at day 36 (2.70 mm in shell size - Table 9). Specimens were regularly sampled during larval and juvenile rearings (1-3 day intervals).

### **2- Juvenile and adult collection**

*C. gigas* juveniles larger than 2.70 mm were obtained from the Vendée Naissain company (Vendée, France) in September and December 2003, where they were fed with *Skeletonema costatum*. Four stages were studied: 2.85 mm, 7.50 mm, 10.06 mm and 23.83 mm, corresponding to mean shell lengths of four commercial sifter-sizes (Table 9).

Adult *C. gigas* were collected in the field (Baie de Bourgneuf, France, 47°5' S, 2°5' W) in May 2004, narcotized and fixed according to the protocol described below.



### **3- Scanning electron microscopy (SEM) preparation**

Specimens were first narcotized in ascending concentrations of MgCl<sub>2</sub>, up to 7.5% in narcotization beakers (Veniot *et al.*, 2003) to ensure valve unlocking, tissue penetration and then optimal fixation of non-contracted structures. Specimens were then fixed in slightly hyperosmotic 2.5% glutaraldehyde in 0.2M buffered sodium cacodylate for a minimum of 48h and stored at 4°C prior to dehydration (Beninger *et al.*, 1995b). Samples were dehydrated in an ascending ethanol gradient after removal of the fixative with several washes with 0.2M phosphate buffer, pH 7.2. They were then immersed in 100% hexamethyldisilazane (HMDS) for a night (Nation, 1983; Braet *et al.*, 1997; Heraty & Hawks, 1998; Hochberg & Litvaitis, 2000). Samples were removed and excess HMDS was evaporated under a fume hood. Smaller samples (larvae and juveniles up to 7.50 mm) were then mounted on stubs using double-sided adhesive tape, and a fine tungsten needle was used to remove one valve, allowing visualization of internal organs. For larger specimens (7.50 mm to adult size) or detailed observation of organs, soft parts were first removed from the shell and dissected when necessary before mounting on a SEM stub, allowing optimal coating and subsequent visualization. Samples were then sputter-coated with gold and observed with a scanning electron microscope (JEOL 6400).

After preliminary observations encompassing most sampling dates, detailed observations were performed for dates which represented the major developmental events (Table 9).

## **E- Results**

The nomenclature used herein is the standard vocabulary of bivalve gill anatomy, with one exception: we consider the trough-shaped principal filament (PF) to consist of the two lateral walls and the trough bottom, corresponding in fact to the ontogenetic fusion of three ordinary filaments (OF) (see below). The term "transitional filament", used only in literature dealing with the Ostreidae (Galtsoff, 1964; Eble & Scro, 1996), is thus not used here to designate the PF lateral wall. This conforms to the terminology already in use for the PF of the Pectinidae.

Structure dimensions, including ciliary lengths reported in the present work, are those obtained directly from the micrographs; it should be noted that shrinkage due to

specimen preparation is uniform (Gusnard & Kirshner, 1977), and estimated at 15 – 20% in bivalve ciliated epithelia (Beninger *et al.*, 1999).

### **1- Overview of major developmental events**

Major changes in the gill anatomy of *C. gigas* were observed over the wide shell size range explored in this study (0.29 to 92.33 mm). From gill organogenesis initiation to complete adult gill structure, several successive stages were distinguished:

1. Development of the two opposing inner demibranchs (ID) with elongation and addition of new gill filaments from the fused posterior mantle margin (the "budding zone"), in a "cavitation-extension" process (described below), resulting in the simultaneous formation of both ascending and descending filaments of lamellae of the homorhabdic uniplicate V-shaped gills (0.29 – 0.42 mm); this initiation of gill development was followed by progressive onset of gill junctions: first ciliary junctions and then tissue junctions (0.42 – 1.30 mm).
2. Delayed differentiation of the outer demibranchs (OD) and multiplication of OF (2.70 mm), resulting in the doubling of the particle capture-transport and respiratory surface; acquisition of the characteristic W-shaped gills (still homorhabdic and uniplicate), formed by flat lamellae.
3. Differentiation of the PF together with interfilamentar fusion (7.50 mm), corresponding to the acquisition of the heterorhabdic condition (heterorhabdic lightly plicate gill).
4. Enlargement of the PF, gill plication (deeply plicate heterorhabdic gill) with increasing gill fusion complexity, and then acquisition of the typical "adult" gill of *C. gigas* composed of fully plicate lamellae (7.50 – 23.83 mm).

## 2- Detailed chronology of developmental events

### *0.29 mm / 15 days*

Young pediveliger larvae (0.29 mm shell size, 15 days) exhibited ~5 unciliated solid gill buds on each side of the budding zone (Fig. 21A, B, C; Fig. 22), the most recently differentiated gill bud measuring ~15  $\mu\text{m}$ . The right and left gill buds were conjoined by mantle fusion. The velum was fully developed at this stage, and the sparsely ciliated foot extended ventrally between the two valves of the prodissoconch II shell (Fig. 21B).

### *0.33 mm / 20 days*

In 0.33 mm / 20 day (competent for metamorphosis) late pediveliger larvae, ~8-10 gill filament rudiments, arising from the gill buds, were observed on each side of the foot (Fig. 21D) corresponding to the future left and right gill, the most anterior filament measuring ~30  $\mu\text{m}$  in length. Both ascending and descending lamellae of the ID developed simultaneously in a "cavitation-extension" process (Fig. 22). A perforation in the gill filament rudiment was followed by progressive ventralward elongation of the ventralmost region of the filament rudiment, resulting in the simultaneous genesis of the highly-constrained suprabranchial cavity, the infrabranchial cavity, and the ascending and descending filaments – hence the term "cavitation-extension". Lateral (~5  $\mu\text{m}$  long) and ventral cilia (~3-4  $\mu\text{m}$  long) first developed in the anterior gill filaments, while the most posterior (more recently differentiated) filaments arising from the budding zone were unciliated (Fig. 21D). In the two most anterior gill filaments, short frontal cilia (range: 2.5 to 7  $\mu\text{m}$ ) began to develop. The velum was still well developed (not visible on micrographs), and the long foot was abundantly ciliated.

### *0.42 mm / 22 days*

The 0.42 mm / 22 day juveniles underwent metamorphosis, as attested by the totally regressed velum and foot (Fig. 21E). The cavitation-extension process was quite evident (Fig. 21E, Fig. 22), and juveniles at this stage exhibited 10-12 gill filaments (~60  $\mu\text{m}$  long for the anteriormost filament) on both equally-developed left and right gills. This stage also corresponded to the acquisition of abundant gill ciliation (Fig. 21E, Fig. 25A). Except in the 4-5 most recently-developed gill filaments, where ciliation was absent to sparse, the frontal surface of the most anterior gill filaments was covered by several distinct ciliary types. Abundant, simple lateral cilia (~7  $\mu\text{m}$ ) were observed on either side of the frontal surface. On

the frontal surface, a median tract of long, apparently composite cilia ( $\sim 8.5 \mu\text{m}$ ) and two lateral tracts of shorter simple cilia ( $\sim 3.5 \mu\text{m}$ ) developed (Fig. 25A). Although the frontal surfaces of the gill filaments were now abundantly ciliated, in contrast, the abfrontal surfaces were very sparsely ciliated, with a single central row of very short simple cilia ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ; Fig. 25B). The anteriormost gill filaments appeared to be joined at their ventral extremity by ciliary junctions connecting two adjacent filaments (Fig. 21E). No ventral particle groove was observed at this stage, whereas the dorsal groove formed by the gill arch exhibited scattered long simple cilia ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ; Fig. 21E). Labial palp primordia appeared at the anterior gill extremity.

#### *1.30 mm / 29 days*

In 1.30 mm / 29 day juveniles, the first organic gill junctions were observed. Previously joined by ventral ciliary junctions, the gill filament ventral extremities were now fused via  $\sim 10 \mu\text{m}$ -wide tissue junctions, covered ventrally by short simple cilia ( $\sim 5 \mu\text{m}$ ) (Fig. 21G). No ventral particle groove was yet visible. Organic interfilamentar junctions between adjacent filaments of the same gill lamella appeared in some individuals (Fig. 26A), but this was not yet the general case in this size-class. In abfrontal view, organic interlamellar junctions were clearly visible (Fig. 21F); the adjacent interlamellar junctions were separated by  $\sim 5$  gill filaments. The abfrontal surfaces remained poorly ciliated, exhibiting a single row of very small marginal cilia on each side of the filament ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) and a central single row of small simple cilia ( $\sim 3 \mu\text{m}$ ), with an interciliary distance of 2-4  $\mu\text{m}$  (Fig. 25C). Gill ciliation appeared generally more dense than in 0.42 mm juveniles. 20-24 gill filaments  $\sim 120 \mu\text{m}$  in length (mid-gill on an antero-posterior axis) were observed on each demibranch at this stage.

#### *2.70 mm / 36 days*

In 2.70 mm / 36 day juveniles, developing OD were first observed when the filaments of the ID were  $\sim 300 \mu\text{m}$  in length. The OD developed in a radically different manner from that of the ID: all filaments developed simultaneously and synchronously along the gill axis, parallel to the already-developed ID (Fig. 21H, Fig. 22), via the cavitation-extension process described above. Although this marked synchrony was observed within each demibranch, development of the right and left OD was not necessarily synchronous. When the 40-50 gill filaments composing the ID were  $\sim 350 \mu\text{m}$  in length, the filaments of the OD were  $\sim 50 \mu\text{m}$  long. At this stage, two non-terminal interfilamentar junctions joined

adjacent filaments (Fig. 26B); the number of organic junctions increased with gill filament growth. The spaces bounded by the interfilamentar junctions comprised the ostia.

A major change occurring in gill ciliation was the differentiation of latero-frontal cirri on the gill filament frontal surfaces. These consisted of groups of 4-5 apparently composite cilia ( $\sim 8.5 \mu\text{m}$ ) regularly spaced every  $3 \mu\text{m}$  dorso-ventrally, between the simple frontal cilia and the lateral cilia ( $\sim 9 \mu\text{m}$ ) of the gill filaments (Fig. 25D). No ventral particle groove was yet visible (Fig. 21H, Fig. 22, Fig. 26B).

#### *2.85 mm / 10 weeks*

The 2.85 mm / 10 week juveniles exhibited  $\sim 65$  gill filaments,  $\sim 460 \mu\text{m}$  in length for the ID,  $\sim 210 \mu\text{m}$  in length for the OD, with 4-5 and 2 non-terminal interfilamentar junctions in the ID and the OD respectively (Fig. 6C). Ostia closest to the dorsal particle groove were smaller than the others ( $\sim 28$  vs  $68 \mu\text{m}$  – Fig. 26C). The ventral particle groove began to develop in the ID at this stage, the convex ventral bend initially becoming a flat surface (Fig. 22, Fig. 23A, Fig. 26C). It was abundantly ciliated with long, apparently composite, cilia ( $\sim 12$ - $15 \mu\text{m}$ ).

#### *7.50 mm / 13 weeks*

In 7.50 mm / 13 week juveniles, a major event in gill development occurred: the beginning of principal filament (PF) differentiation, conferring a three-dimensional aspect to gill lamellae, which appeared to be slightly plicate in several places (Fig. 23B). Between two plicae, frontal observation showed one enlarged ordinary filament (OF) ( $\sim 20$ - $22 \mu\text{m}$  width) surrounded by two OF ( $\sim 11 \mu\text{m}$  width), progressively fusing and filling the ostia delimited by interfilamentar junctions (Fig. 23C, Fig. 24A, B). This triplet of OF composed the future PF, the enlarged OF constituting the PF base, and the two fused OF constituting the lateral walls of the PF. OF frontal ciliation showed the ciliary types previously described for 2.85 mm juveniles: lateral cilia ( $\sim 9.9 \mu\text{m}$ ), composite ( $\sim 8.1 \mu\text{m}$ ) and simple ( $\sim 3.1 \mu\text{m}$ ) frontal cilia, and latero-frontal cirri (groups of  $\sim 4$ - $6$  cilia  $\sim 7.1 \mu\text{m}$ ) (Fig. 25 E). However, some de-differentiation of frontal ciliation occurred in the PF base, as shown in Figure 23C: composite frontal cilia could no longer be distinguished, and the frontal surface appeared to be covered by simple cilia ( $\sim 7$ - $8 \mu\text{m}$ ). It is probable that PF differentiation occurred at the sites of interlamellar junctions, because these mainly corresponded to the plical troughs (Fig. 26D, E).

The second major event occurring at this developmental stage was the progressive invagination of the ventral particle groove (Fig. 22, Fig. 23B) at the ventral extremity of the

ID. The formation of the OD ventral groove was not contemporaneous with that of the ID; at this stage, the future OD groove became a flat surface, representing the first step in groove formation (Fig. 22). Both ventral particle grooves were abundantly ciliated with groups of apparently composite cilia (~12-20  $\mu\text{m}$ ).

*10.06 mm / 16 weeks*

In 10.06 mm / 16 week juveniles, gill plication continued as shown in Figure 23D. PF bases were now ~24  $\mu\text{m}$  in width at the dorso-ventral midpoint of the gill lamellae, while no larger than an OF at the ventral extremity of gill lamellae (~12  $\mu\text{m}$ ), hence allowing plication (Fig. 23F). OF width remained constant since the preceding developmental stage. Interfilamentar fusion of the 3 filaments comprising each PF seemed to be nearly complete in frontal view (Fig. 23E, Fig. 24C). Gill frontal ciliation increased in density in the OF (Fig. 25F), with lateral cilia (~10  $\mu\text{m}$ ), composite (~8.2  $\mu\text{m}$ ) and simple (~3.1  $\mu\text{m}$ ) frontal cilia, and latero-frontal cirri (~8.1  $\mu\text{m}$ ). Abfrontal ciliation remained very sparse, with abfrontal cilia and marginal cilia (Fig. 25G) as described for 1.30 mm individuals. The PF base frontal ciliation differed clearly from that of OF, with complete de-differentiation of composite and simple frontal cilia (Fig. 25H), and was composed of simple cilia (~8-10  $\mu\text{m}$ ). Latero-frontal cirri were still visible on each side of the PF base frontal surface (Fig. 25H). Small (~40-50  $\mu\text{m}$ ) and very small (~10-20  $\mu\text{m}$ ) ostia bordered the dorsal food groove, while the ostia between the PF and the first OF measured ~40  $\mu\text{m}$ , and the remaining ostia were ~80  $\mu\text{m}$  in length and ~30  $\mu\text{m}$  in width (Fig. 26E). Gill filaments of the ID were joined to each other by 12-14 rows of interfilamentar junctions (Fig. 26E).

*23.83 mm / 22 weeks*

Gill architecture increased in complexity in 23.83 mm / 22 week juveniles. Progressive gill plication was followed by the appearance of intrapical junctions joining the abfrontal surfaces of two adjacent PF (Fig. 26F, G), completing the three-dimensional structure of the gills (Fig. 23G). The ostia between the PF and the first OF measured ~50  $\mu\text{m}$  at this stage.

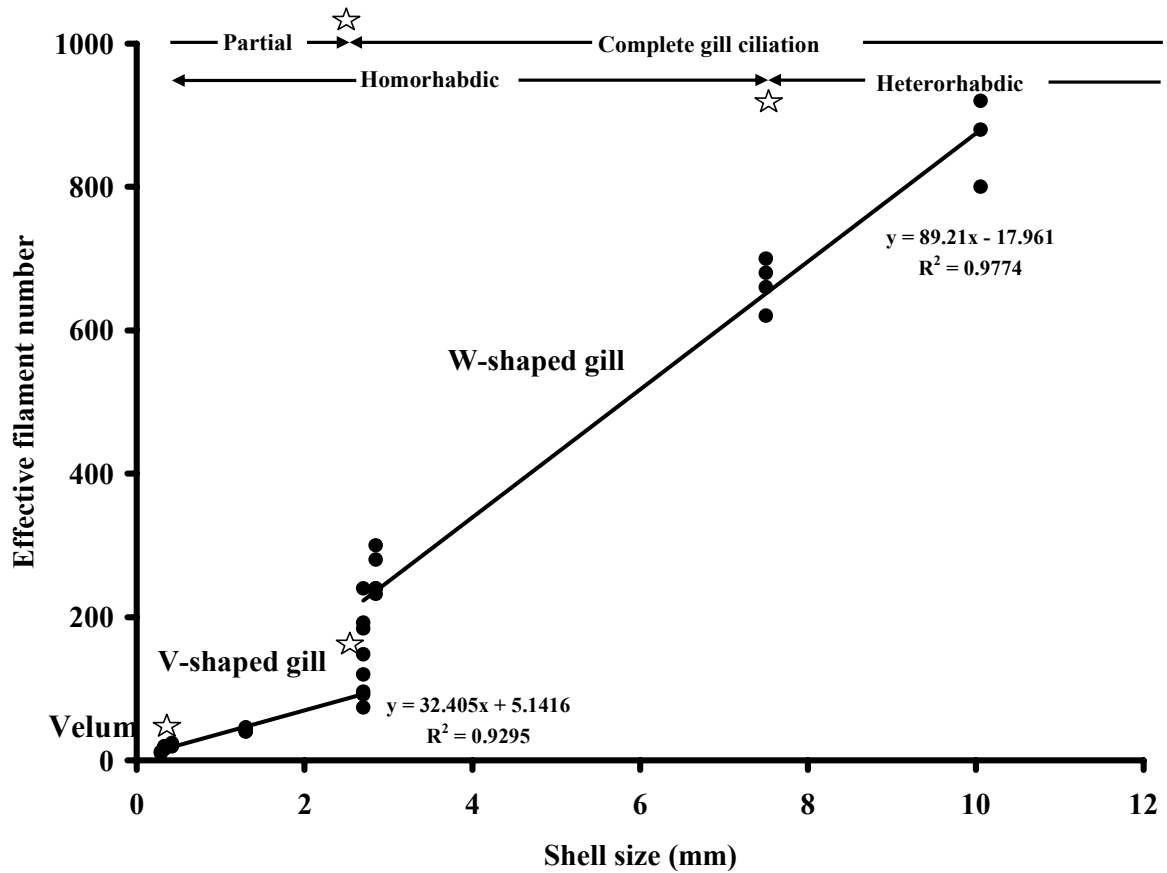
*92.33 mm / adult*

In adult oysters, gill plicae were more pronounced than in 23.83 mm juveniles, preventing frontal observation of the PF in intact dissected gills (Fig. 27A). Intrapical junctions were more developed than hitherto, but no additional complexity in gill junctions

was observed (Fig. 27D). These developments marked the completion of gill ontogeny. OF ciliation was composed of composite (~10-15  $\mu\text{m}$ ) and simple (~5  $\mu\text{m}$ ) frontal cilia, latero-frontal cirri (~9-10  $\mu\text{m}$ ) and lateral cilia (~15  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 27B). PF base frontal ciliation, observed in fractured gills, was made up of long simple frontal cilia (~10-15  $\mu\text{m}$ ), latero-frontal cirri (~17-18  $\mu\text{m}$ ) and lateral cilia (~12-13  $\mu\text{m}$ ). PF lateral wall ciliation was composed of composite (~10-15  $\mu\text{m}$ ) and simple (~5  $\mu\text{m}$ ) frontal cilia, latero-frontal cirri (~13-14  $\mu\text{m}$ ), and lateral cilia (~15  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 27C). PF abfrontal ciliation was composed of groups of irregularly distributed cilia (~5-10  $\mu\text{m}$ ), except at the sites of interlamellar junctions, where tissue fusion obviated the presence of cilia (Fig. 27D).

In contrast to the preceding developmental stages, the gill buds did not directly give rise to elongating filaments. Rather, they first expanded to form a transition zone of conjoined bar-shaped left and right gill rudiments (Fig. 27E, F). Gill elongation in the adult budding zone also differed from that observed in young juveniles. A single gill bar in the transition zone appeared to give rise to both ID and OD simultaneously (Fig. 27E, G), rather than to the ID only, as in the gill buds of young juveniles (see above). Ventral and dorsal groove ciliary tracts differentiated rapidly in the elongating filaments of adults (Fig. 27F), while the gill filament frontal surfaces initially remained unciliated. Frontal cilia then appeared, but because of the compactness of gill filaments, lateral cilia were not observed (Fig. 27G). PF differentiation also occurred rapidly, as evidenced by the two plicae observed in Figure 27E.

### 3- Filament number and shell size



**Figure 28.** *Crassostrea gigas*. Linear regressions of shell size (mm) and effective filament number, and summary of gill major developmental events and associated potential critical stages. ☆ : potential critical stage.

**Figure 28.** *Crassostrea gigas*. Régressions linéaires entre la taille de coquille (mm) et le nombre effectif de filaments ; synthèse des évènements majeurs du développement de la branchie et des stades critiques potentiels associés. ☆ : stade critique potentiel.

Counts of gill filaments on SEM micrographs were related to shell size over the range 0.29 - 10.06 mm (the gills of larger specimens tended to curve out of the plane of sight in the SEM preparations). Since gill development was symmetric, the total number of gill filaments was equal to twice the number of ID for the V-stage, and four times the number of the ID for the W-stage (effective filament number). Separate regressions were therefore carried out for each of these stages. The results show a marked discontinuity at the transition from the V- to the W-stage, at a size of 2.70 mm (Fig. 28).



## F- Discussion

### 1- Initial development, inner and outer demibranch formation

Gill development in *C. gigas* is here shown to be of the papillary type, as reported for a number of taxonomically-diverse genera, possessing all of the four basic gill types: *Mytilus*, *Modiolus*, *Anomia* and *Arca* (homorhabdic filibranch – Rice, 1908; Raven, 1958; Bayne, 1971), *Pecten* and *Placopecten* (heterorhabdic filibranch – Raven, 1958; Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003), *Ostrea edulis* (brooding heterorhabdic pseudolamellibranch – Waller, 1981; Moor, 1983), *Dreissenia* (non-brooding freshwater eulamellibranch – Raven, 1958), and various Unionidae (brooding freshwater eulamellibranch – Raven, 1958). The "cavitation-extension" mode of papillary extension to filaments, and subsequent differentiation to ID and OD, observed in the present study for *C. gigas*, is the first report of such a process in heterorhabdic bivalve gill development. Although they did not examine any heterorhabdic species, Neuman and Kappes (2003) proposed a similar mode of elongation – differentiation to be common to all bivalves. However, all three studies of the heterorhabdic filibranch gill of the Pectinidae show a distinct "elongation – reflection" mode of elongation – differentiation, in which the descending filament of the inner demibranch (ID) first elongated to form a "gill basket" with the corresponding opposite ID, and then reflected abfrontally to form the ascending filament and achieve the 'V' shape of the ID (Kingzett, 1993; Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003). This obviously does not exclude further filament growth, since large adults have longer gill filaments than smaller individuals, and cambial zones are distributed throughout the length of the pectinid gill filaments (Leibson & Movchan, 1975).

In the pseudolamellibranch gill of *C. gigas*, both the descending and the ascending filaments of the ID formed simultaneously by "cavitation-extension", and no temporary gill basket was formed. It is likely that this is a general feature of the Ostreidae; although Chaparro *et al.* (2001) indicated that filament extension occurred via "reflection" in *Ostrea chilensis*, examination of their micrographs suggests that the ID of this species also develops in the "cavitation-extension" manner. This constitutes a major developmental difference between the Pectinidae and the Ostreidae for a fundamental biological character. The evolutionary implications of this will be considered below.

The mode of formation of the outer demibranch (OD) also contrasts markedly with that previously reported in the Pectinidae, in which the OD formed in essentially the same, albeit accelerated, manner as the ID: sequential appearance and elongation of the descending filament, followed by reflection (more rapid for the OD than for the ID) to form the ascending

filament (Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003). In *C. gigas*, the development of the OD differs from that of the ID, and from that of both the ID and the OD in the Pectinidae: the descending and ascending filaments are indeed formed simultaneously by "cavitation-extension", but instead of an antero-posterior sequential appearance of gill papillae, the papillae all appear simultaneously on the gill axis along the length established by the previous development of the ID. Similarly, this contrasts with the report of sequential development of the OD filaments in *Ostrea chilensis* (Chaparro *et al.*, 2001). Within the Ostreidae, then, there appears to be differing modes of gill development, although these differences are not as pronounced as those noted for the Pectinidae and the Ostreidae. Although only one representative of each of the two ostreid genera have been studied to date, it would be interesting to determine whether the difference in OD development constitutes yet another biological distinction between the brooding genus *Ostrea* and the non-brooding genus *Crassostrea*.

OD differentiation in *C. gigas* was delayed in relation to that of the ID, as reported for bivalves in general (Lacaze-Duthiers, 1856; Jackson, 1890; Quayle, 1952; Raven, 1958; Kingzett, 1993; Beninger *et al.*, 1994; Baker & Mann, 1994a; Korniushev, 1996, 1997; Chaparro *et al.*, 2001; Neumann & Kappes, 2003; Veniot *et al.*, 2003). Although in most cases the development of the right and left OD was synchronous, in one individual (out of five observed) there was a time lag between the two, as has been reported previously (Jackson, 1890).

Due to the continuous growth of gills with increasing shell size, the budding zone remains active in adults (Neumann & Kappes, 2003) and appears to attain its final form and functionality after differentiation of the OD. Before development of the OD, a single bud gives rise to the inner demibranch only, whereas after full development of the OD, a single bud becomes bar-shaped and gives rise to both the ID and OD. As suggested by Neumann and Kappes (2003), the simultaneous appearance of OD gill buds along the gill axis appears to occur during a short developmental period (2.70 mm shell size).

## **2- Principal filament differentiation and plica establishment**

The results presented herein document, for the first time, the differentiation of principal filaments (PF) in a heterorhabdic bivalve. As previous studies have either only identified the time of first appearance of the PF (Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003), or ended prior to PF differentiation (Chaparro *et al.*, 2001), it is not possible to discuss this process from a comparative standpoint. However, the process documented here for *C. gigas*

is interesting in itself. The formation of the PF from three ordinary filaments (OF) corresponds well to the observed morphology in the adult: the two lateral walls, both rounded and ciliated, and the trough base, also rounded and ciliated (Beninger & Dufour, 1996). The formation of the PF from OF's also demonstrates convincingly the previously-supposed apomorphic relationship of the heterorhabdic gill to the plesiomorphic homorhabdic filibranch gill (Beninger & Dufour, 2000). Given the relative regularity of PF's (10 – 18 OF per plica, PF walls excluded), the determinism of differentiation is an interesting subject for future research.

PF differentiation in *C. gigas* occurs much later than in the pectinid species studied to date: 7.50 mm, compared to 4 mm in *Pecten maximus*, and 3.3 – 5.0 mm in *Placopecten magellanicus* (Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003). The time lag before appearance of PF in *C. gigas* corresponds to 91 days in the conditions of the present study; for comparison, the previous study of *Ostrea chilensis* was terminated without any sign of the PF after 86 days of development (Chaparro *et al.*, 2001). This may be contrasted with the time lag of 56 – 58 days in *Pecten maximus* (Beninger *et al.*, 1994).

Notwithstanding the slight undulation seen in eulamellibranch gills due to the presence of interlamellar junctions (Ridewood, 1903; Dufour & Beninger, 2001), the deep plication of the pseudolamellibranch oyster gill is a consequence of PF differentiation and formation of interlamellar junctions, interfilamentar and intrapical fusion. The latter characteristic, documented in detail in the present study, is, among the heterorhabdic bivalves, unique to the Ostreidae, and accounts for the extreme degree of plication, compared to the Pectinidae. Commensurate with this extreme degree of plication and interfilamentar – intrapical fusion, is the size at which plication is complete: 7 mm in *Placopecten magellanicus* (Veniot *et al.*, 2003), compared to 23.83 mm in *C. gigas* (present study). Full gill development is thus exceptionally slow in this oyster species, and reflects the amount of development which precedes the final form. From a functional point of view, the gill filament appears to be the basic particle processing unit in homorhabdic juvenile stages, whereas in the heterorhabdic adult stage, the gill plica appears to exert a strong influence on particle processing (Ward *et al.*, 1998; Cognie *et al.*, 2003). This is further supported by the gradient of mucocyte densities within a plica (Beninger & Dufour, 1996; Beninger *et al.*, 2005). This shift in gill functionality must occur gradually during development, as evidenced by the gradual plication of the gill.

### 3- Ciliation

Gill ciliation was absent or very scarce on the filaments of pediveligers, correlating to the lack of gill particle-processing functionality in larval gills. Ciliation became rapidly denser following metamorphosis, with the change from velum to gills as particle collecting structures. All four cilia types (lateral, latero-frontal, simple frontal and composite frontal) were present on the homorhabdic filaments of juveniles at 2.70 mm, and the cilia densities increased with age and size. The differentiation of the PF was accompanied by the de-differentiation of the PF base frontal cilia, which became uniformly simple.

The formation of PF from OF presents an interesting problem for ciliary function. The beat orientation of the *C. gigas* juvenile OF composite frontal cilia, prior to PF differentiation (inferred from consistent SEM micrographs), is ventralward, whereas the PF base uniform simple frontal cilia beat dorsally in the adult heterorhabdic gill. Transient ciliary beat reversal has been observed in some animal species, e.g. the avoidance response of *Paramecium*, the avoidance / feeding response in ctenophores, and the feeding responses of sabellids (Dubois *et al.*, 2005), and appears to be mediated by instantaneous calcium transients on the ciliary membrane (Tamm & Terasaki, 1994). Permanent ciliary beat reversal has not yet been documented in any bivalve gill cilia. The loss of the composite frontal cilia in the PF, which beat ventrally in the juvenile and adult OF, appears to be a precondition for permanent beat reversal, which was not yet evident in the 10.06 mm specimens which had lost their composite cilia.

The observed size gradient for latero-frontal cirri, with shortest latero-frontal cirri on the apical filaments of plicae, longest latero-frontal cirri at the PF base, and intermediate latero-frontal cirri on the PF walls, may indicate an increased role in particle capture toward the PF. It should be remembered that particles present in the PF have undergone an initial particle selection on the heterorhabdic gill (Ward *et al.*, 1998; Beninger *et al.*, 2004), and it is thus interesting to note the increasing size of the latero-frontal cirri, which are associated with particle capture in the homorhabdic gill (Silverman *et al.*, 1996, 1999), toward the PF base.

The abfrontal ciliation of the OF was both sparse and regular throughout gill development, being limited to the two rows of very short simple marginal cilia, and the median row of abfrontal cilia reported here. The role (if any) of these cilia is unknown, but their limited size, number, and distribution precludes any role in water pumping, as has been suggested for the much longer and denser abfrontal ciliation of the homorhabdic filibranch *Mytilus edulis* (Jones *et al.*, 1990, 1992). The abfrontal cilia of the *C. gigas* PF were longer and somewhat more abundant than those of the OF, but present only in isolated clumps. With

the formation of the interlamellar junctions, these became even more sparse, underscoring their vestigial nature (Beninger & Dufour, 2000).

#### **4- Formation of the ventral particle groove**

The presence of a ventral particle groove is another particularity of the adult heterorhabdic pseudolamellibranch gill (the Pectinidae do not possess such a groove). It is seen here to begin to develop quite late in *C. gigas* gill ontogeny (50 days post-settlement). The formation of the ventral particle groove in *C. gigas* corresponds precisely with the onset of PF differentiation and gill plication. That this feature should be so closely associated with the acquisition of the heterorhabdic state in *C. gigas*, whereas it is totally absent in the heterorhabdic filibranchs, constitutes another indication that heterorhabdy is a convergent evolutionary character in the Pectinidae and the Ostreidae, rather than a synapomorphy.

The lack of a true ventral groove in early developmental stages (< 7.50 mm) suggests that adequate gill function is possible in early stages without such a groove (Stasek, 1962); this is supported by the abundant ventral and dorsal tract ciliation, with anteriorward beating of cilia inferred from SEM micrographs (not shown here), as well as the detection of post-settlement feeding in *C. virginica* (Baker & Mann, 1994b).

#### **5- Evolutionary implications**

The fundamental differences in heterorhabdic gill ontogeny between the Ostreidae and the Pectinidae, detailed above, lead to the conclusion that these two heterorhabdic gill types evolved completely independently from the plesiomorphic homorhabdic filibranch condition. Although it has been argued that fine details of bivalve anatomy evolve more quickly than other structures (Beninger & Dufour, 2000), the ontogenetic differences reported here are extremely fundamental, and point to convergent evolution to the heterorhabdic state. This is a particularly interesting perspective, since there are only two basic structural designs of the bivalve gill: homorhabdic and heterorhabdic. From the plesiomorphic homorhabdic filibranch condition, there thus appears to have been three independent evolutionary trajectories to the heterorhabdic filibranch and pseudolamellibranch conditions, underscoring the phylogenetic distance between the Ostreidae and the Pectinidae (Ridewood, 1903; Giribet & Wheeler, 2002).

That the heterorhabdic condition should be independently apomorphic in the Pectinidae and the Ostreidae strongly suggests that, starting with a homorhabdic filibranch condition, there is only one viable basic gill adaptation for particle processing in the high-

turbidity habitats in which these two families evolved: heterorhabdy. The considerable selection capacity of this condition (Ward *et al.*, 1998; Cognie *et al.*, 2003; Beninger *et al.*, 2004) indeed constitutes an adaptive advantage for suspensivory in turbid habitats.

### **6- Ecological and aquacultural implications**

Three periods of major developmental shifts are apparent in *C. gigas* gill ontogeny, summarized in Figure 28. These are: (1) the change from velum to gill as particle collecting structure, at size 0.35 mm; (2) the change from a V- to a W- shaped gill, coinciding with the acquisition of latero-frontal cirri, at 2.70 mm; and (3) the change from the homorhabdic to the heterorhabdic condition, at 7.50 mm. These developmental shifts may be related to the remarkable increase (nearly two orders of magnitude) in grazing rates observed in 1.3 mm and 1.0 cm *Ostrea edulis* (Wilson, 1980). Each of these shifts may be expected to be associated with energetic expenditures or functional shifts (Forbes & Lopez, 1989), potentially generating periods of increased mortality, depending on the severity of environmental conditions. In the hatchery, where food is abundant and most physico-chemical conditions optimal, increased mortalities at these critical stages may only be observed if other negative factors intrude, such as microbial or parasitic infection. It should be noted that the sizes and ages given here for the critical stages are necessarily derived from hatchery rearings, and are likely to vary in relation to field conditions for natural populations or for oysters cultured from natural spatfall. On the applied level, at the very least, the information of the present study may help to interpret the etiology of larval and juvenile *C. gigas* culture problems.

### **G- Acknowledgements**

We thank Jean-Claude Cochard, Stéphane Pouvreau, Christian Mingant and the Ecloserie expérimentale d'Argenton (IFREMER) for facilities, and assistance in larval and juvenile rearings. We are grateful to S Angeri (Vendée Naissain) for providing the larger juvenile specimens, and A Barreau for assistance in scanning electron microscopy. Research funding was provided by the Région des Pays de Loire (PhD stipend to RC), and partial operational funding was provided by IFREMER (Contrat universitaire IFREMER/EMI N° 03-2-2521559).

**Figure 21.** *Crassostrea gigas* - gill ontogeny. **A** – Ventral view of a 0.29 mm / 15 day veliger larva. m: mouth location, rv: right valve, u: umbo, v: velum, rectangle: detail in 1B. **B** – Detail of A. f: foot, gb: gill bud, lg: left gill, arrow: gill bridge. **C** – Detail of B: gill buds on both sides of mantle fusion. lgb: left gill bud, mf: mantle fusion, rgb: right gill bud. **D** – Posterior-ventral view of a 0.33 mm / 20 day pediveliger larva. bz: budding zone, rg: right gill. **E** – Ventral view of a 0.42 mm / 22 day juvenile. pp: labial palp primordia, vcj: ventral ciliary junction. **F** – Abfrontal view of gill of a 1.30 mm / 29 day juvenile. a: gill axis, am: adductor muscle, ilj: interlamellar junction. **G** – Close-up of the ventral extremity of a demibranch of a 1.30 mm juvenile. fs: frontal surface, vb: ventral bend, vtj: ventral tissue junction. **H** – Lateral view of a 2.70 mm / 36 day juvenile, inset: detail of the developing outer demibranch. rid: right inner demibranch, rod: right outer demibranch, ANT-POST: organ orientation.

**Figure 21.** *Crassostrea gigas* - développement de la branchie. **A** – Vue ventrale d’une larve véligère de 0,29 mm / 15 jours. rectangle: détail en 1B. **B** – flèche: pont branchial. **C** – Détail de B: bourgeons branchiaux des deux côtés de la zone de fusion du manteau. **D** – Vue ventrale postérieure d’une larve pédiveligère de 0,33 mm / 20 jours. **E** – Vue ventrale d’un juvénile de 0,42 mm / 22 jours. **F** – Vue abfrontale de la branchie d’un juvénile de 1,30 mm / 29 jours. **G** – Détail de l’extrémité ventrale d’une demibranchie d’un juvénile de 1,30 mm. **H** – Vue latérale d’un juvénile de 2,70 mm / 36 jours, encart: détail de la demibranchie externe en développement.

### **Liste des abréviations**

**a:** axe branchial  
**am:** muscle adducteur  
**ANT-POST:** orientation des organes  
**bz:** zone de bourgeonnement  
**f:** pied  
**fs:** surface frontale  
**gb:** bourgeon branchial  
**ilj:** jonction interlamellaire  
**lg:** branchie gauche  
**lgb:** bourgeon branchial gauche  
**m:** emplacement de la bouche  
**mf:** fusion du manteau  
**pp:** primordia de palpes labiaux  
**rg:** branchie droite  
**rgb:** bourgeon branchial droit  
**rid:** demibranchie interne droite  
**rod:** demibranchie externe droite  
**rv:** valve droite  
**u:** umbo  
**v:** velum  
**vb:** extrémité ventrale  
**vcj:** jonction ciliaire ventrale  
**vtj:** jonction tissulaire ventrale

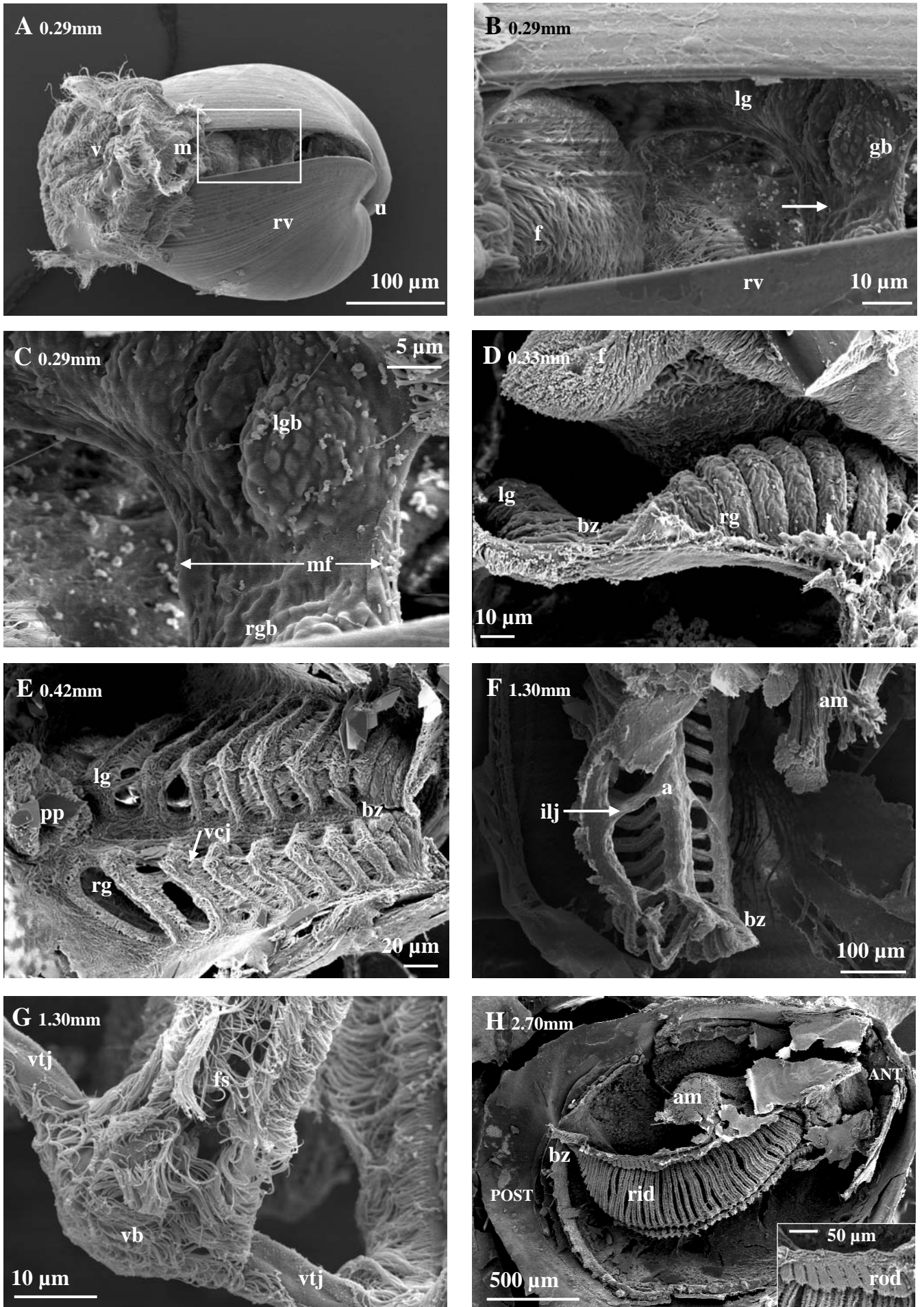
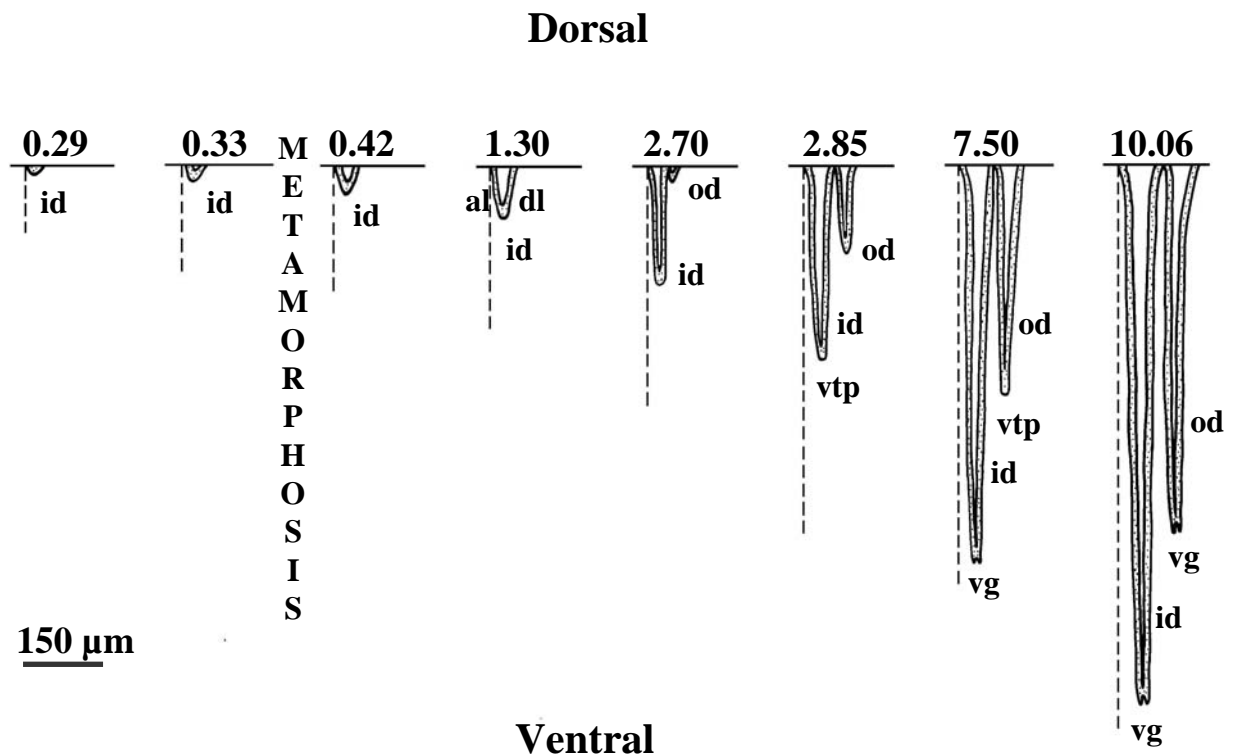


Figure 21. *Crassostrea gigas* – gill ontogeny.





**Figure 22.** *Crassostrea gigas* - diagram of gill ontogeny. Dotted line: antero-posterior axis of symmetry. al: ascending lamella, dl: descending lamella, id: inner demibranch, od: outer demibranch, vg: ventral groove, vtp: ventral tract plate.

**Figure 22.** *Crassostrea gigas* – schéma du développement de la branchie. Pointillés: axe de symétrie antéro-postérieur.

### Liste des abréviations

- al:** lamelle ascendante
- dl:** lamelle descendante
- id:** demibranchie interne
- od:** demibranchie externe
- vg:** gouttière ventrale
- vtp:** voie ventrale plate

**Figure 23.** *Crassostrea gigas* - principal filament differentiation. **A** – Ventral view of a 2.85 mm / 10 week juvenile. bz: budding zone, lid: left inner demibranch, lod: left outer demibranch, lp: labial palps, rid: right inner demibranch, rod: right outer demibranch, ANT-POST: organ orientation. **B** – Lateral view of a 7.50 mm / 13 week juvenile. ma: mantle, vg: ventral groove, arrows: location of principal filament differentiation (plication initiation). **C** – Frontal view of a gill lamella of a 7.50 mm juvenile. iff: interfilamentar fusion, ifj: interfilamentar junction, o: ostium, of: ordinary filament, pf: principal filament (differentiating). **D** – Ventral view of a 10.06 mm / 16 week juvenile. dg: dorsal groove, arrows: location of the differentiating principal filaments. **E** – Frontal view of a gill lamella of a 10.06 mm juvenile. **F** – Frontal view of the ventral extremity of a gill lamella of a 10.06 mm juvenile. p: plica. **G**- Frontal view of gill plicae of a 23.83 mm / 22 week juvenile.

**Figure 23.** *Crassostrea gigas* – différenciation des filaments principaux. **A** – Vue ventrale d’un juvénile de 2,85 mm / 10 semaines. **B** – Vue latérale d’un juvénile de 7,50 mm / 13 semaines. flèches: localisation des filaments principaux en différenciation (initiation du plissement). **C** – Vue frontale d’une lamelle branchiale chez un juvénile de 7,50 mm. **D** – Vue ventrale d’un juvénile de 10,06 mm / 16 semaines. flèches: localisation des filaments principaux en différenciation. **E** – Vue frontale d’une lamelle branchiale chez un juvénile de 10,06 mm. **F** – Vue frontale de l’extrémité ventrale d’une lamelle branchiale chez un juvénile de 10,06 mm. **G**- Vue frontale des plis branchiaux chez un juvénile de 23,83 mm / 22 semaines.

### **Liste des abréviations**

**ANT-POST:** orientation des organes

**bz:** zone de bourgeonnement

**dg:** gouttière dorsale

**iff:** fusion interfilamentaire

**ifj:** jonction interfilamentaire

**lid:** demibranchie interne gauche

**lod:** demibranchie externe gauche

**lp:** palpes labiaux

**o:** ostiole

**of:** filament ordinaire

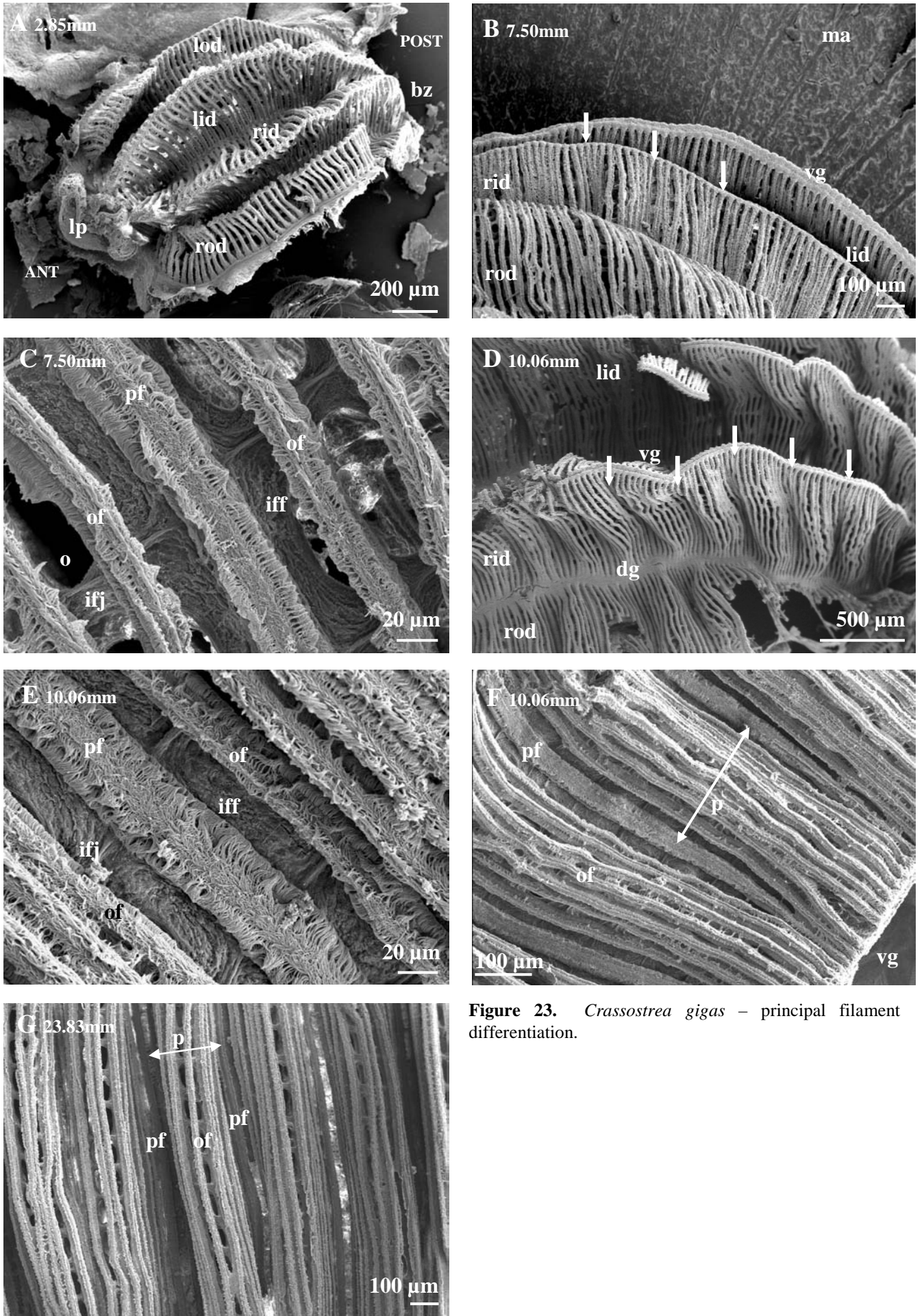
**p:** pli

**pf:** filament principal

**rid:** demibranchie interne droite

**rod:** demibranchie externe droite

**vg:** gouttière ventrale



**Figure 23.** *Crassostrea gigas* – principal filament differentiation.

**Figure 24.** *Crassostrea gigas* - diagram of principal filament differentiation. Frontal views of gill lamellae for each developmental stage. **A** – 2.85 mm / 10 week juvenile. f: filament, ifj: interfilamentar junction, o: ostium, of: ordinary filament. **B** – 7.50 mm / 13 week juvenile. iff: interfilamentar fusion, pf: differentiating principal filament. **C** – 10.06 mm / 16 week juvenile.

**Figure 24.** *Crassostrea gigas* – schéma de la différenciation des filaments principaux. Vues frontales de lamelles branchiales pour chaque stade du développement. **A** – juvénile de 2,85 mm / 10 semaines. **B** – juvénile de 7,50 mm / 13 semaines. **C** – juvénile de 10,06 mm / 16 semaines.

### **Liste des abréviations**

**f:** filament

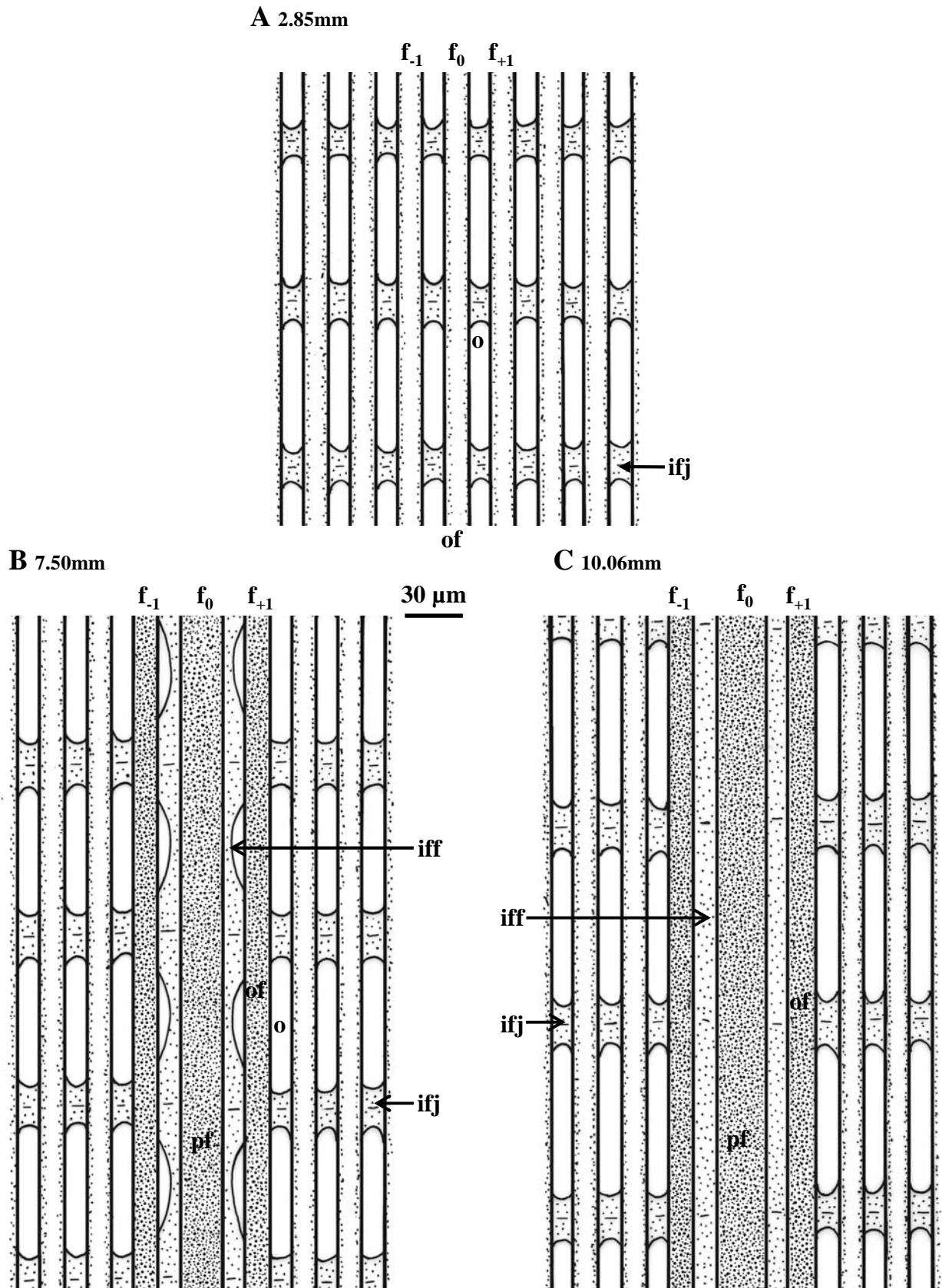
**iff:** fusion interfilamentaire

**ifj:** jonction interfilamentaire

**o:** ostiole

**of:** filament ordinaire

**pf:** principal filament



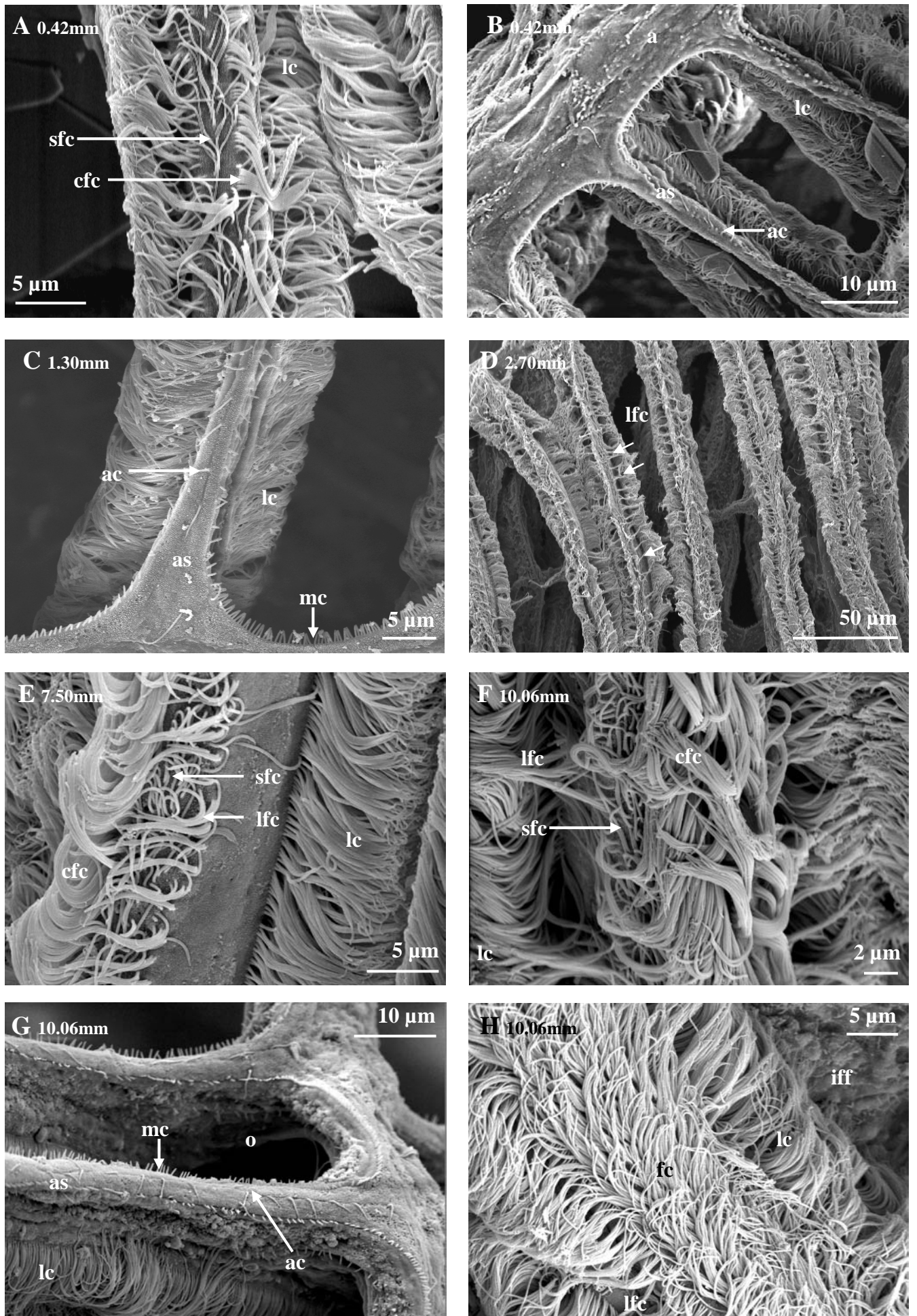
**Figure 24.** *Crassostrea gigas* - diagram of principal filament differentiation.

**Figure 25.** *Crassostrea gigas* – gill ciliation. **A** – Frontal view of a gill filament of a 0.42 mm / 22 day juvenile. cfc: composite frontal cilia, c: lateral cilia, sfc: simple frontal cilia. **B** – Abfrontal view of a gill filament of a 0.42 mm juvenile. a: gill axis, ac: abfrontal cilia, as: abfrontal surface. **C** – Abfrontal view of a gill filament of a 1.30 mm / 29 day juvenile. mc: marginal cilia. **D** – Frontal view of gill filaments of a 2.70 mm / 36 day juvenile. lfc: latero-frontal cirri. **E** – Latero-frontal view of a gill ordinary filament of a 7.50 mm / 13 week juvenile. **F** – Frontal view of a gill ordinary filament of a 10.06 mm / 16 week juvenile. **G** – Latero-abfrontal view of ordinary gill filaments of a 10.06 mm juvenile. o: ostium. **H** – Frontal view of a gill principal filament of a 10.06 mm juvenile. fc: frontal cilia, iff: interfilamentar fusion.

**Figure 25.** *Crassostrea gigas* – ciliature de la branchie. **A** – Vue frontale d'un filament branchial chez un juvénile de 0,42 mm / 22 jours. **B** – Vue abfrontale d'un filament branchial chez un juvénile de 0,42 mm. **C** – Vue abfrontale d'un filament branchial chez un juvénile de 1,30 mm / 29 jours. **D** – Vue frontale de filaments branchiaux d'un juvénile de 2,70 mm / 36 jours. **E** – Vue latéro-frontale d'un filament ordinaire de la branchie d'un juvénile de 7,50 mm / 13 semaines. **F** – Vue frontale d'un filament ordinaire de la branchie d'un juvénile de 10,06 mm / 16 semaines. **G** – Vue latéro-abfrontale de filaments ordinaires de la branchie d'un juvénile de 10,06 mm. **H** – Vue frontale d'un filament principal de la branchie d'un juvénile de 10,06 mm.

### **Liste des abréviations**

**a:** axe branchial  
**ac:** cils abfrontaux  
**as:** surface abfrontale  
**cfc:** cils frontaux composites  
**fc:** cils frontaux  
**iff:** fusion interfilamentaire  
**lc:** cils latéraux  
**lfc:** cils latéro-frontaux  
**mc:** cils marginaux  
**o:** ostiole  
**sfc:** cils frontaux simples



**Figure 25.** *Crassostrea gigas* – gill ciliation.

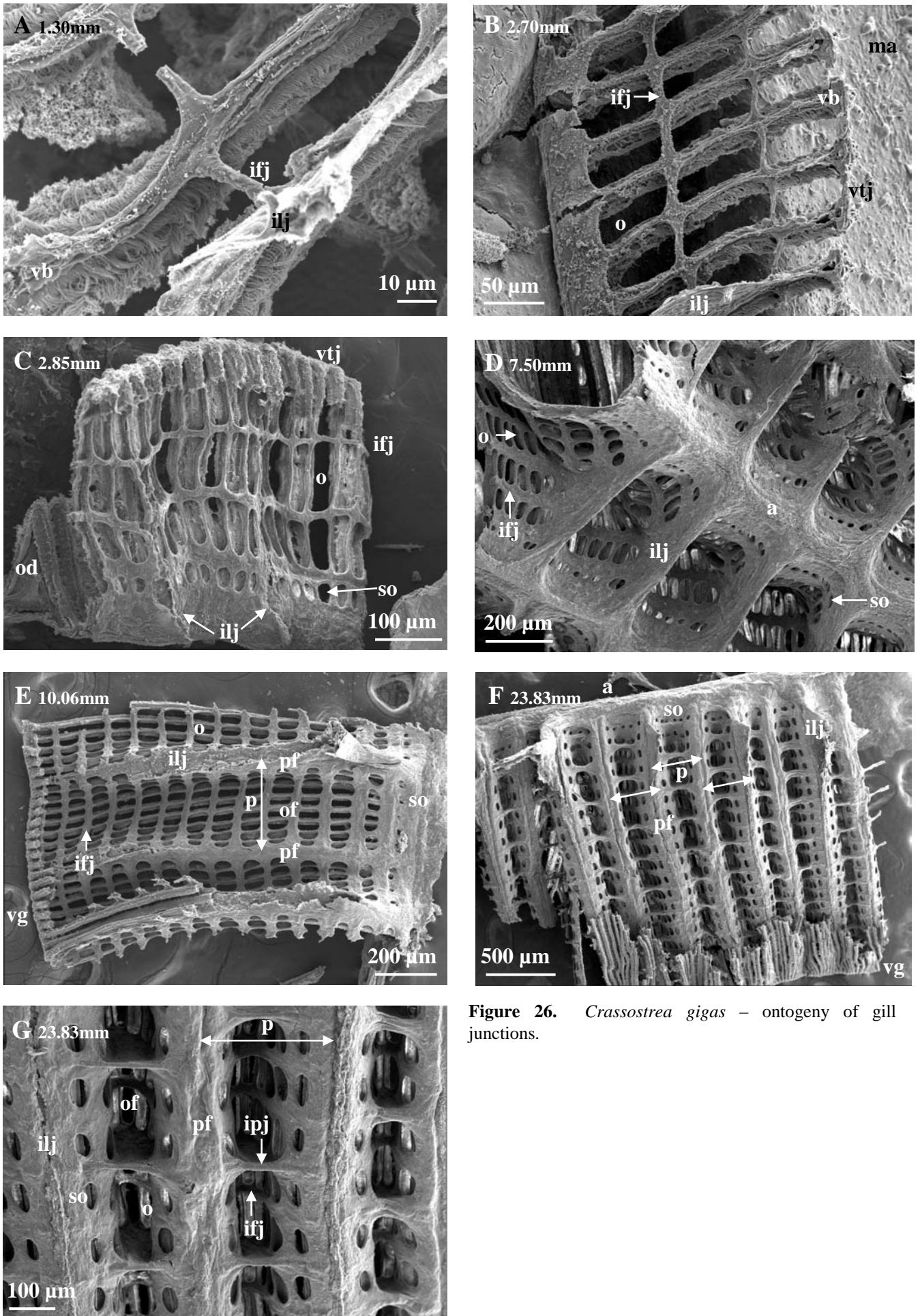
**Figure 26.** *Crassostrea gigas* – ontogeny of gill junctions. **A** – Abfrontal view of gill filaments of a 1.30 mm / 29 day juvenile. ifj: interfilamentar junction (sectioned), ilj: interlamellar junction (sectioned), vb: ventral bend. **B** – Abfrontal view of a gill lamella of a 2.70 mm / 36 day juvenile. ma: mantle, o: ostium, vtj: ventral tissue junction. **C** – Abfrontal view of a gill lamella of a 2.85 mm / 10 week juvenile (interlamellar junctions sectioned). od: outer demibranch, so: small ostium. **D** – Dorsal view of the abfrontal surface of the gills of a dissected 7.50 mm / 13 week juvenile. a: gill axis. **E** – Abfrontal view of a gill lamella of a 10.06 mm / 16 week juvenile (interlamellar junctions sectioned). of: ordinary filament, p: plica, pf: principal filament, vg: ventral groove. **F** – Abfrontal view of a gill lamella of a 23.83 mm / 22 week juvenile (interlamellar junctions sectioned). **G** – Detail of F. ipj: intraplical junction.

**Figure 26.** *Crassostrea gigas* – ontogénie des jonctions branchiales. **A** – Vue abfrontale de filaments branchiaux d'un juvénile de 1,30 mm / 29 jours. **B** – Vue abfrontale d'une lamelle branchiale chez un juvénile de 2,70 mm / 36 jours. **C** – Vue abfrontale d'une lamelle branchiale chez un juvénile de 2,85 mm / 10 semaines (jonctions interlamellaires sectionnées). **D** – Vue dorsale de la surface abfrontale des branchies d'un juvénile de 7,50 mm / 13 semaines. **E** – Vue abfrontale d'une lamelle branchiale chez un juvénile de 10,06 mm / 16 semaines (jonctions interlamellaires sectionnées). **F** – Vue abfrontale d'une lamelle branchiale chez un juvénile de 23,83 mm / 22 semaines (jonctions interlamellaires sectionnées). **G** – Détail de F.

### **Liste des abréviations**

**a:** axe branchial  
**ifj:** jonction interfilamentaire  
**ilj:** jonction interlamellaire  
**ipj:** jonction intra-pli  
**ma:** manteau  
**o:** ostiole  
**od:** demibranchie externe  
**of:** filament ordinaire  
**p:** pli  
**pf:** filament principal  
**so:** petits ostioles  
**vb:** extrémité ventrale  
**vg:** gouttière ventrale  
**vtj:** jonction ventrale tissulaire





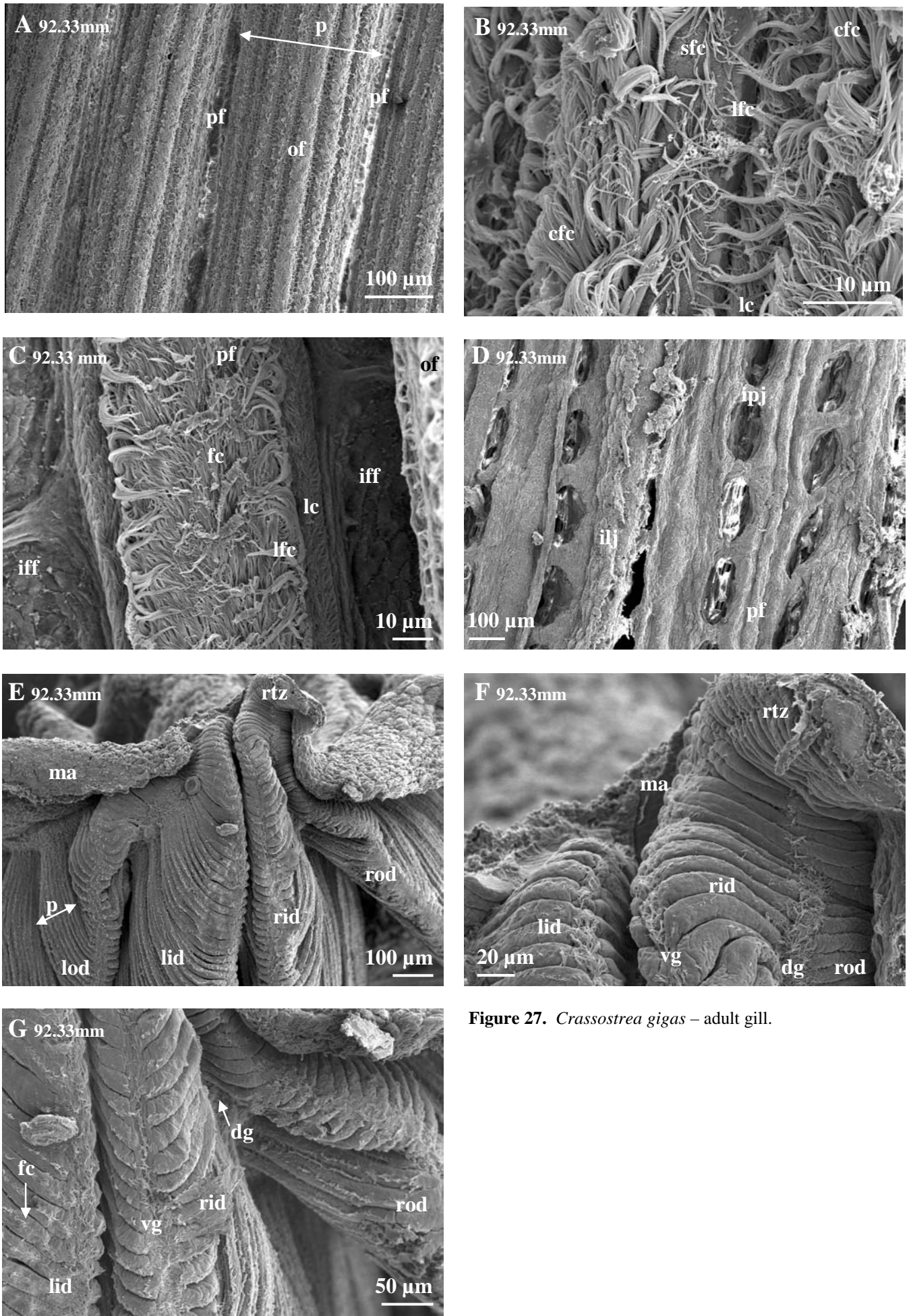
**Figure 26.** *Crassostrea gigas* – ontogeny of gill junctions.

**Figure 27.** *Crassostrea gigas* - adult gill. **A** – Frontal view of gill plicae. of: ordinary filament, p: plica, pf: principal filament. **B** – Latero-frontal view of an ordinary filament. cfc: composite frontal cilia, lc: lateral cilia, lfc: latero-frontal cirri, sfc: simple frontal cilia. **C** – Frontal view of a principal filament. fc: frontal cilia, iff: interfilamentar fusion. **D** – Abfrontal view of a gill lamella (interlamellar junctions sectioned). ilj: interlamellar junction (sectioned), ipj: intraplical junction. **E** – Ventral view of the gill proliferation / differentiation zone. lid: left inner demibranch, lod: left outer demibranch, ma: mantle, p: plica, rid: right inner demibranch, rod: right outer demibranch, rtz: right transition zone. **F** – Detail of the gill proliferation zone presented in E. dg: dorsal groove, vg: ventral groove. **G** – Detail of the differentiation zone of the gill presented in E. fc: frontal cilia.

**Figure 27.** *Crassostrea gigas* – branchie des adultes. **A** – Vue frontale de plis branchiaux. **B** – Vue latéro-frontale d'un filament ordinaire. **C** – Vue frontale d'un filament principal. **D** – Vue abfrontale d'une lamelle branchiale (jonctions interlamellaires sectionnées). **E** – Vue ventrale de la zone de différenciation / prolifération de la branchie. **F** – Détail de la zone de prolifération de la branchie présentée en E. **G** – Détail de la zone de différenciation de la branchie présentée en E.

### **Liste des abréviations**

**cfc:** cils frontaux composites  
**dg:** gouttière dorsale  
**fc:** cils frontaux  
**iff:** fusion interfilamentaire  
**ilj:** jonction interlamellaire  
**ipj:** jonction intra-pli  
**lc:** cils latéraux  
**lfc:** cirres latéro-frontaux  
**lid:** demibranchie interne gauche  
**lod:** demibranchie externe gauche  
**ma:** manteau  
**of:** filament ordinaire  
**p:** pli  
**pf:** filament principal  
**rid:** demibranchie interne droite  
**rod:** demibranchie externe droite  
**rtz:** zone de transition droite  
**sfc:** cils frontaux simples  
**vg:** gouttière ventrale



**Figure 27.** *Crassostrea gigas* – adult gill.

**Table 9.** *Crassostrea gigas*. Summary of the developmental events occurring at identified sizes and ages (in days d or in weeks w), from larva to adult. Reliability of age as a developmental marker decreases throughout development.

**Tableau 9.** *Crassostrea gigas*. Synthèse des évènements du développement en fonction de l'âge (en jours d ou en semaines w) et de la taille des individus, de la larve à l'adulte. La pertinence de l'âge comme marqueur du développement décroît au cours du développement.

Mean shell size (mm)	n	± SD (mm)	Age	Metamorphosis and filament ontogeny	Gill filament ciliation	Gill junctions
0.29	6	0.03	15 d	Velum fully developed Foot sparsely ciliated ~5 unciliated gill buds (ID, inner demibranchs) <u>Behaviour</u> : swimming larvae	Absent	Absent
0.33	7	0.02	20 d	Velum still fully developed Foot abundantly ciliated ~8-10 gill filaments and buds (ID), "cavitation-extension" process <u>Behaviour</u> : substrate search ("swimming-crawling")	Lateral and ventral cilia in the most anterior gill filaments	
0.42	9	0.04	22 d	Velum and foot totally regressed ~10-12 gill filaments (ID) <u>Behaviour</u> : beginning of irreversible fixed condition	Lateral cilia Median coarse and lateral fine frontal cilia	Ventral ciliary junctions
1.30	5	0.13	29 d	~20-24 gill filaments (ID)	Densification of gill ciliation	Inter-filamentar and inter-lamellar junctions
2.70	5	0.57	36 d	~40-50 gill filaments (ID) Rapid development of the outer demibranchs (OD)	Differentiation of latero-frontal cirri	
2.85	3	0.11	10 w	~65 gill filaments Ventral tract plate		
7.50	5	0.50	13 w	~165 gill filaments Beginning of principal filament (PF) differentiation (ID and OD) Formation of the ventral groove	De-differentiation of frontal ciliation in the PF	Inter-filamentar fusion
10.06	30	1.16	16 w	~215 gill filaments Progressive gill plication	Densification of gill ciliation	
23.83	30	2.62	22 w	Increased gill plication		Intraplacial junctions
92.33	3	8.62	-	Gill fully developed		

### **3.4 Etude de la distribution des mucocytes sur la surface frontale des filaments branchiaux – Relation avec l’acquisition de la condition hétérorhabdique chez les juvéniles de *Crassostrea gigas***

---

#### **A- Introduction**

Les résultats présentés dans la 3<sup>ème</sup> partie de ce chapitre (Cannuel & Beninger, 2006) ont montré que le développement complet de la branchie chez les larves, post-larves et juvéniles de *Crassostrea gigas* était particulièrement lent par rapport aux Pectinidés déjà étudiés (*Patinopecten yessoensis* par Kingzett, 1993; *Pecten maximus* par Beninger *et al.*, 1994; *Placopecten magellanicus* par Veniot *et al.*, 2003). En effet, la branchie de l’huître sous sa forme achevée (pseudolamellibranche hétérorhabdique présentant un plissement important) n’a été observée qu’à partir de 2,4 cm de taille de coquille, taille à laquelle les jonctions intra-plis ont été observées (Cannuel & Beninger, 2006). En particulier, l’acquisition de la condition hétérorhabdique, caractéristique des Ostréidés et des Pectinidés, dont l’initiation débute vers 7,5 mm de taille de coquille chez *C. gigas*, se poursuit jusqu’à 2,4 cm de taille de coquille, ce qui correspond à une durée de plus de deux mois dans les conditions d’élevage décrites dans la précédente étude (Cannuel & Beninger, 2006), et à une croissance de coquille de plus de 16 mm. En revanche, si la microscopie électronique à balayage permet d’obtenir des données anatomiques très précises sur la branchie et son développement, elle ne permet pas d’aborder de façon complète la fonctionnalité potentielle des structures décrites, et l’utilisation de techniques complémentaires s’avère alors nécessaire.

L’identification des types de mucocytes et / ou leur cartographie est une technique permettant de caractériser les types de sécrétions produites au niveau des épithéliums ciliés identifiés sur les structures palléales responsables du traitement des particules chez les Bivalves (Beninger *et al.*, 1991; Beninger & St-Jean, 1997a; Beninger *et al.*, 1999 chez plusieurs espèces de Bivalves – Beninger & Dufour, 1996 chez *Crassostrea virginica* – Beninger *et al.*, 1993 chez *P. magellanicus* et *Mytilus edulis* – Beninger & Veniot, 1999 chez *C. gigas* – Beninger *et al.*, 2003 chez *Bathypecten vulcani*). Appliquée à l’étude du traitement des particules sur les plis branchiaux de *C. virginica* et *C. gigas* (Beninger & Dufour, 1996; Beninger *et al.*, 2005), la cartographie des mucocytes a permis de mettre en évidence les caractéristiques fondamentales du traitement des particules au niveau des plis branchiaux. Les résultats présentés dans la partie 3.2 de ce chapitre ont ainsi montré que les filaments

apicaux des plis étaient les principaux sites de traitement des particules sur les plis branchiaux et que seules les voies médianes frontales des filaments ordinaires intervenaient dans le traitement des particules.

A la vue des résultats obtenus dans les deux études précédentes (Cannuel & Beninger, 2006; Beninger *et al.*, 2005; 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> parties de ce chapitre), l'utilisation de la cartographie des mucocytes en tant que technique complémentaire s'imposait dans l'étude du développement de la branchie chez les juvéniles de *C. gigas*. Il paraissait pertinent de documenter la différenciation fonctionnelle des mucocytes au cours du développement de la branchie pour mieux comprendre la mise en place de la fonctionnalité de la branchie. Les types de mucocytes, ainsi que leur abondance et leur distribution relative, ont ainsi été étudiés au niveau de la surface frontale des filaments branchiaux (apicaux, latéraux et principaux) et mis en relation avec l'acquisition progressive de la condition hétérorhabdique chez des juvéniles de 2,9 mm à 2,4 cm de taille de coquille.

## B- Matériels et méthodes

### 1- Echantillonnage des juvéniles et traitement histologique

Les juvéniles de *Crassostrea gigas* ont été fournis par l'entreprise Vendée Naissain (Vendée, France) en septembre et décembre 2003. Quatre stades ont été étudiés, correspondant aux longueurs moyennes de coquille de 4 tailles tamis commerciales: 2,9 mm, 7,5 mm, 1 cm et 2,4 cm (Tableau 10).

**Tableau 10.** Tailles tamis des juvéniles étudiés, longueurs moyennes de coquille ( $\pm$  écart-type ET) et âges (semaines) correspondants.

Taille tamis	Longueur moyenne de coquille correspondante ( $\pm$ ET)	Age (semaines)
« 2 mm »	2,9 $\pm$ 0,1 mm	10
« 4 mm »	7,5 $\pm$ 0,5 mm	13
« 6 mm »	1 $\pm$ 0,1 cm	16
« 10 mm »	2,4 $\pm$ 0,3 cm	22

Après avoir été anesthésiés dans un gradient ascendant de MgCl<sub>2</sub> (Veniot *et al.*, 2003; Cannuel & Beninger, 2006), 15 individus par classe de taille ont été fixés dans du liquide de Bouin aqueux. Après un minimum de 48 heures de fixation, les échantillons ont

été rincés à l'eau courante pendant 24 heures, déshydratés dans un gradient ascendant d'éthanol puis inclus dans de la paraffine. Des sections transversales de 5 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées au niveau de la branchie pour chaque individu, puis colorées selon le protocole acide périodique-Schiff (APS) – bleu alcian suivant, déterminé après une série de tests de coloration : bleu alcian 1% pH 2,5 (1 min), acide périodique 1% (1 min), réactif de Schiff Merck (3 min), et métabisulfite de sodium (3 × 3 min).

## **2- Mesures de la largeur de la surface frontale des filaments branchiaux**

Afin d'estimer la largeur de la surface frontale des filaments ordinaires et des filaments principaux (fonds des filaments principaux), de suivre ses variations au cours du développement de la branchie et de vérifier l'homogénéité des mesures obtenues entre individus, 20 à 30 mesures de la largeur de la surface frontale des deux types de filaments ont été réalisées chez 5 individus pour chaque classe de taille.

## **3- Comptages des mucocytes**

Les comptages des différents types de mucocytes ont été réalisés avec un microscope (grossissement × 200) selon les standards de couleurs Pantone<sup>®</sup> définis par Beninger *et al.* (2005). Les données ont été obtenues pour 30 filaments par situation sur le pli (filament apical, latéral – Fig. 18Ba de Beninger *et al.*, 2005, ou principal), pour 5 individus par classe de taille pour établir leurs abondances relatives sur les filaments formant les plis ou les futurs plis, selon l'approche définie par Beninger *et al.* (2005).

En effet, en raison de la petite taille des juvéniles, il n'a pas été possible de réaliser des comptages de mucocytes sur la totalité des individus inclus et sectionnés, les sections n'étant pas toujours exploitables. Les comptages ont donc été limités à 5 individus par classe de taille. De plus, en raison de la faible largeur de la surface frontale constatée chez les juvéniles, la distribution fine des mucocytes au niveau des trois voies frontales (voies latérales frontales et voie médiane frontale) n'a pas été étudiée.

Pour évaluer les volumes instantanés de mucus contenu dans les mucocytes, 30 mucocytes de chaque type ont été mesurés et convertis en volumes et ce pour les 4 classes de taille étudiées. Les mucocytes étant de forme ellipsoïdale, la plus grande demi-longueur (X) et la plus petite demi-longueur (Y) ont été mesurées et les volumes correspondants ont été calculés ( $V = 4/3 \pi XY^2$ ). Les volumes moyens ont ensuite été calculés pour chaque type de mucocyte, puis multipliés par le nombre de mucocytes pour obtenir le volume total de mucus contenu par les mucocytes. Ces valeurs étaient des sous-estimations, étant donné que les plus

grandes longueur et largeur n'étaient pas forcément situées dans le plan de section. Cette sous-estimation est supposée équivalente pour tous les types de mucocytes.

#### **4- Calcul du volume relatif des AMPS sécrétés au niveau des voies frontales des trois catégories de filaments définies.**

Afin d'estimer le volume relatif des AMPS dans le mélange des sécrétions des mucocytes à AMPS et des mucocytes à MMPS au niveau de la surface frontale des filaments branchiaux, le pourcentage de mucus acide sécrété dans le volume total de mucus a été calculé pour chaque stade et chaque catégorie de filament étudiée, selon la formule donnée par Beninger *et al.* (2005) :

$$\frac{\text{AMPS} \times 100}{(\text{AMPS} + \text{MMPS})}$$

avec AMPS : volume de mucus acide sécrété au niveau de la surface frontale

MMPS : volume de mucus mixte sécrété au niveau de la surface frontale

#### **5- Analyses statistiques**

Des analyses de variance (ANOVA) à un facteur ont été réalisées sur les données normalement distribuées concernant les volumes moyens des mucocytes et les largeurs des filaments branchiaux, avec  $\alpha = 0,05$ .

Des ANOVAs à deux facteurs ont été réalisées sur les données, distribuées normalement ou transformées, concernant les densités et les volumes totaux des mucocytes, avec  $\alpha = 0,05$ .



## C- Résultats

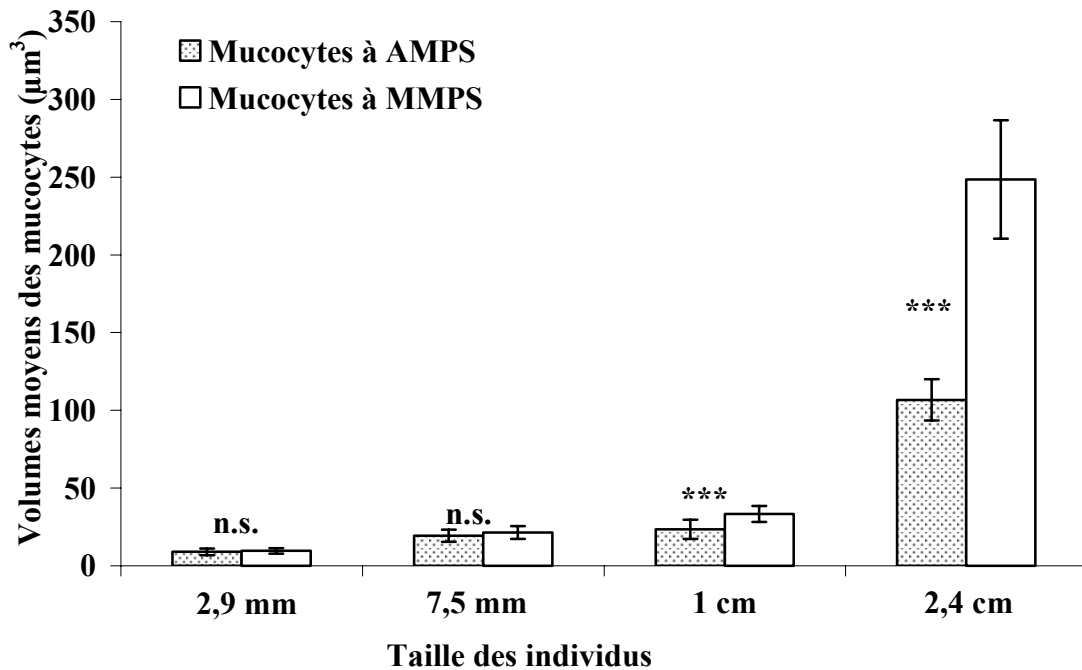
En raison de l'origine ontogénique des filaments principaux, se formant à partir d'un triplet de filaments ordinaires (3<sup>ème</sup> partie de ce chapitre, Cannuel & Beninger, 2006), le "filament ordinaire" tel qu'il est observé chez les juvéniles de 2,9 mm sera considéré comme le point de référence de départ. Il en sera de même pour les filaments apicaux et latéraux des plis, qui seront nommés ainsi, même si, en raison du très faible plissement de la branchie chez les jeunes stades juvéniles (3<sup>ème</sup> partie de ce chapitre; Cannuel & Beninger, 2006), ils n'occupent pas réellement une position apicale ou latérale dans les plis branchiaux en formation.

Trois catégories de filaments ont ainsi été définies pour les comptages des mucocytes : (1) les filaments ordinaires apicaux, (2) les filaments ordinaires latéraux et (3) les bases des filaments principaux.

### 1- Type et volume des mucocytes

Deux types de mucocytes ont été majoritairement rencontrés au cours des comptages : (1) des mucocytes contenant des mucopolysaccharides mixtes (mucocyte à MMPS) et (2) des mucocytes contenant des mucopolysaccharides acides (mucocyte à AMPS). Des mucocytes contenant des mucopolysaccharides neutres (mucocyte à NMPS) ont également été observés, attestant de l'adéquation des temps de coloration appliqués, mais en raison de leur très faible abondance, ils n'ont pas été pris en compte lors des comptages.

Chez les juvéniles de 2,9 mm et de 7,5 mm, aucune différence significative n'a été observée entre le volume moyen des mucocytes à AMPS (9,0 et 19,3  $\mu\text{m}^3$  respectivement) et le volume moyen des mucocytes à MMPS (9,6 et 21,4  $\mu\text{m}^3$  respectivement). Chez les juvéniles de 1 cm et de 2,4 cm, une différence significative a été observée entre les volumes moyens des deux types de mucocytes rencontrés, les mucocytes à AMPS étant plus petits (23,5 et 106,7  $\mu\text{m}^3$  respectivement) que les mucocytes à MMPS (33,3 et 248,5  $\mu\text{m}^3$  respectivement – Fig. 29).



**Figure 29.** Evolution du volume moyen des mucocytes à AMPS (mucopolysaccharides acides) et des mucocytes à MMPS (mucopolysaccharides mixtes)( $\mu\text{m}^3$ ) en fonction de la taille des juvéniles (mm). Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (IC) à 95%. n.s. : non significatif ( $p = 0,648$  pour les individus de 2,9 mm et  $p = 0,472$  pour les individus de 7,5 mm), \*\*\* :  $p \leq 0,001$ .

## 2- Evolution de la largeur de la surface frontale des filaments ordinaires et des filaments principaux.

L'homogénéité de la largeur de la surface frontale a été vérifiée pour les filaments ordinaires et principaux, chez 5 individus par classe de taille. La largeur des surfaces frontales des filaments était homogène, sauf pour un individu de 1 cm qui présentait des filaments principaux légèrement plus larges que les autres (22,56 vs. 20,48  $\mu\text{m}$  - Tableau 11). Les largeurs moyennes ont ainsi pu être utilisées pour le calcul du nombre de mucocytes par  $\mu\text{m}$  de voie frontale et du volume de mucus par  $\mu\text{m}$  de voie frontale, sauf dans le cas précédemment cité.

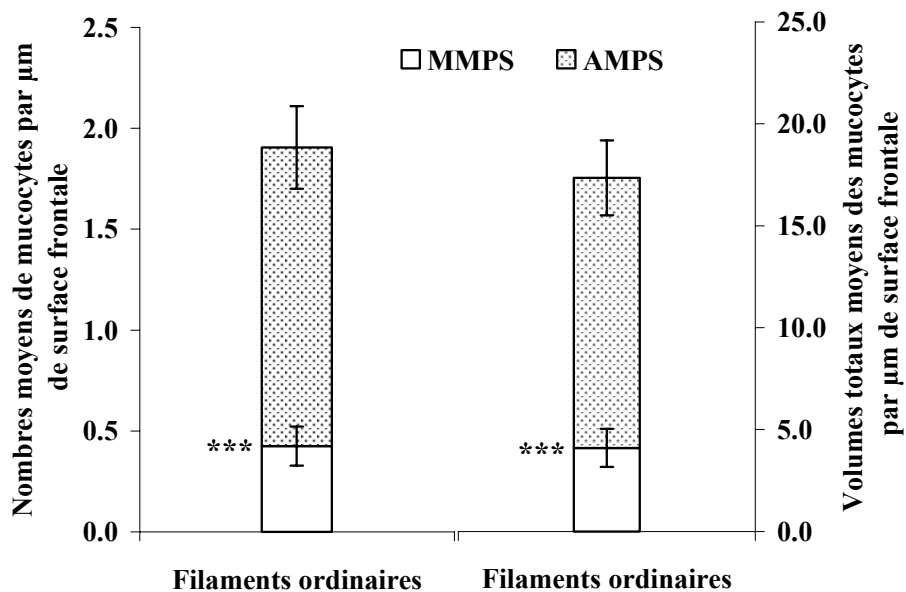
Une augmentation significative de la largeur frontale des filaments ordinaires a été observée au cours du développement de la branchie (Tableau 11) : 9,87  $\mu\text{m}$ , 11,79  $\mu\text{m}$ , 11,87  $\mu\text{m}$  puis 22,59  $\mu\text{m}$  chez les juvéniles de 2,9 mm, 7,5 mm, 1 cm et 2,4 cm respectivement ( $p \leq 0,001$ ).

De même, la largeur frontale des filaments principaux a augmenté de façon significative ( $p \leq 0,001$ ) : 15,74  $\mu\text{m}$ , 20,48  $\mu\text{m}$  puis 46,94  $\mu\text{m}$  chez les juvéniles de 7,5 mm, 1 cm et 2,4 cm respectivement (Tableau 11).

**Tableau 11.** Largeur moyenne des voies frontales de filaments ordinaires et des filaments principaux en fonction de la taille des individus, et IC à 95% (n = 133 à n = 150).

Taille des individus	Largeur moyenne de la voie frontale des filaments ordinaires ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ IC 95%	Différence inter-individuelle	
2,9 mm	9,87 $\pm$ 0,17	non	(p = 0,938)
7,5 mm	11,79 $\pm$ 0,21	non	(p = 0,925)
1 cm	11,87 $\pm$ 0,25	non	(p = 0,093)
2,4 cm	22,59 $\pm$ 0,45	non	(p = 0,589)
<b>Largeur moyenne de la voie frontale des filaments principaux (<math>\mu\text{m}</math>) <math>\pm</math> IC 95%</b>			
2,9 mm	9,87 $\pm$ 0,17	non	(p = 0,938)
7,5 mm	15,74 $\pm$ 0,39	non	(p = 0,180)
1 cm	20,48 $\pm$ 0,48	oui	(p < 0,05) pour un individu
2,4 cm	46,94 $\pm$ 1,10	non	(p = 0,700)

### 3- Evolution des densités et des volumes totaux des mucocytes.



**Figure 30.** Nombres moyens de mucocytes et volumes totaux moyens des mucocytes à AMPS et des mucocytes à MMPS par  $\mu\text{m}$  de surface frontale des filaments ordinaires chez les juvéniles de 2,9 mm. Les barres verticales représentent les IC à 95%. \*\*\* Valeurs de AMPS et de MMPS significativement différentes avec  $p \leq 0,001$ .

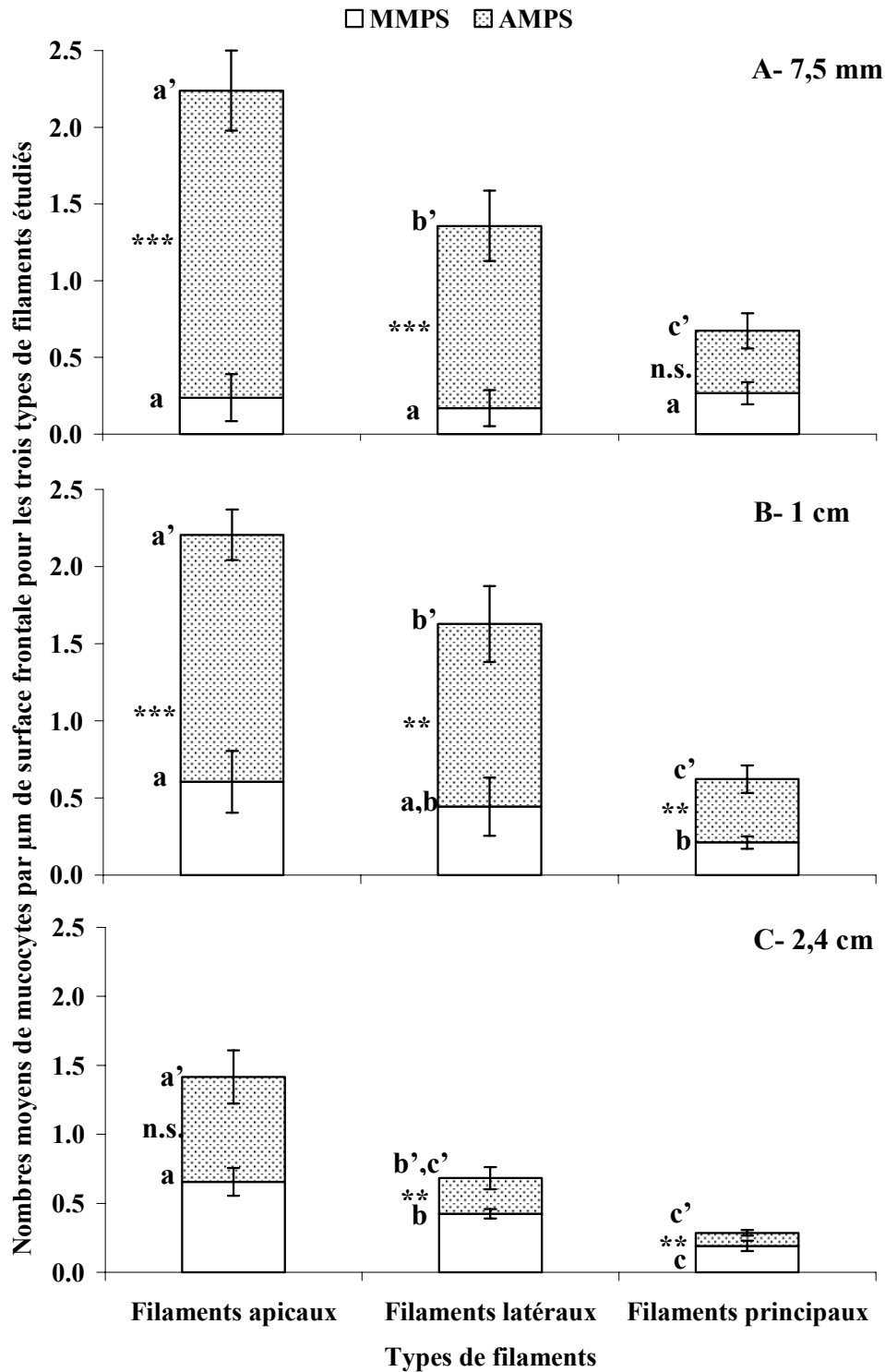
Chez les juvéniles de 2,9 mm, les mucocytes à AMPS (1,48 par  $\mu\text{m}$ ) étaient significativement plus nombreux que les mucocytes à MMPS (0,43 par  $\mu\text{m}$ ) au niveau de la surface frontale des filaments ordinaires (Fig. 30).

Les mucocytes à AMPS et à MMPS présentant des volumes similaires à ce stade (Fig. 29), les volumes moyens des mucocytes présentaient un rapport similaire, avec des volumes totaux de  $13,25 \mu\text{m}^3$  pour les mucocytes à AMPS et de  $4,10 \mu\text{m}^3$  pour les mucocytes à MMPS par  $\mu\text{m}$  de surface frontale (Fig. 30).

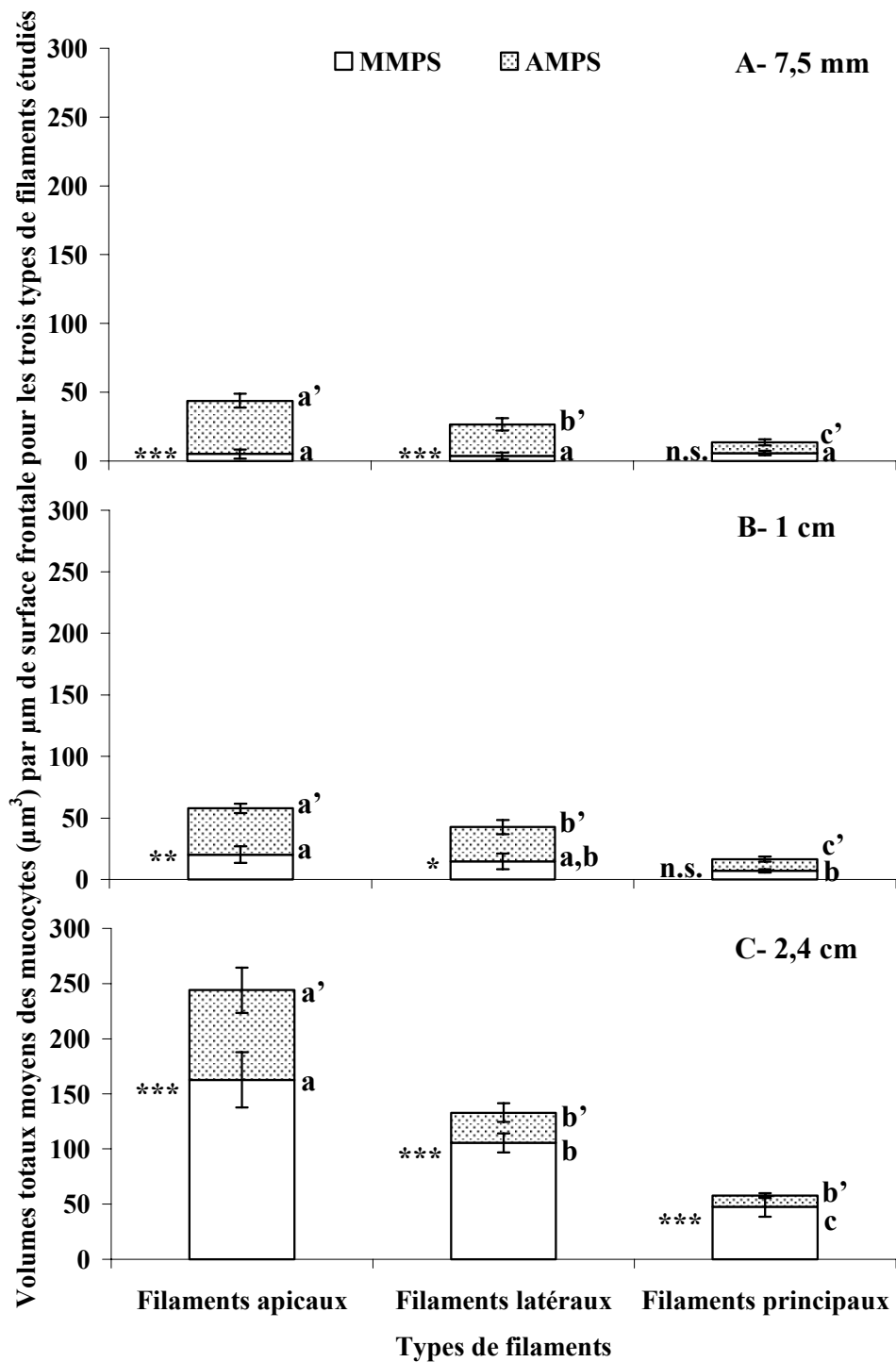
Chez les juvéniles de 7,5 mm, le nombre total de mucocytes au niveau de la surface frontale des filaments apicaux (2,0 par  $\mu\text{m}$ ) était similaire au nombre total de mucocytes comptés sur les filaments ordinaires des juvéniles de 2,9 mm ( $p = 0,054$ ) (Fig. 30 et 31A). En revanche, des nombres de mucocytes significativement inférieurs ont été constatés au niveau de la surface frontale des filaments latéraux (1,36 par  $\mu\text{m}$ ) et principaux (0,68 par  $\mu\text{m}$ ) ( $p = 0,003$  et  $p \leq 0,001$  respectivement, Fig. 30 et 31A).

Aucune différence significative entre les nombres et les volumes totaux des mucocytes à MMPS n'a été observée entre les filaments apicaux, latéraux et principaux des futurs plis (Fig. 30, 31A, 32A). En revanche, une diminution significative du nombre et ainsi des volumes totaux des mucocytes à AMPS a été observée du sommet du pli vers le filament principal (Fig. 30, 31A, 32A). Les filaments apicaux présentaient un volume total cumulé de mucocytes à AMPS et de mucocytes à MMPS plus de 3 fois supérieur à celui des filaments principaux (Fig. 32A).

Par rapport au stade précédent (7,5 mm), les nombres totaux cumulés des mucocytes à AMPS et à MMPS n'étaient pas significativement différents à la surface frontale des filaments apicaux ( $p = 0,804$ ), latéraux ( $p = 0,069$ ) et principaux ( $p = 0,439$ ) des plis chez les juvéniles de 1 cm (Fig. 31A, B). Le nombre de mucocytes à MMPS a augmenté de façon significative au niveau des filaments apicaux ( $p = 0,007$ ) et latéraux ( $p = 0,032$ ). Les nombres de mucocytes à AMPS et de mucocytes à MMPS étaient similaires à ceux observés au stade précédent pour les filaments principaux (Fig. 31A, B).



**Figure 31.** Nombres moyens de mucocytes à AMPS et de mucocytes à MMPS comptés au niveau de la surface frontale des filaments apicaux, latéraux et principaux des plis branchiaux chez les juvéniles de 7,5 mm (A), 1 cm (B) et 2,4 cm (C). Les barres verticales représentent les IC à 95%. Les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes (valeurs de p dans le texte). Valeurs de AMPS et MMPS : \*\*\* significativement différentes avec  $p \leq 0,001$ , \*\* significativement différentes avec  $p \leq 0,01$ , n.s. non significativement différentes avec  $p \geq 0,05$ .



**Figure 32.** Volumes totaux moyens des mucocytes à AMPS et des mucocytes à MMPS comptés au niveau de la surface frontale des filaments apicaux, latéraux et principaux des plis branchiaux chez les juvéniles de 7,5 mm (A), 1 cm (B) et 2,4 cm (C). Les barres verticales représentent les IC à 95%. Les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes (valeurs de p dans le texte). Valeurs de AMPS et de MMPS : \*\*\* significativement différentes avec  $p \leq 0,001$ , \*\* significativement différentes avec  $p \leq 0,01$ , \* significativement différentes avec  $p \leq 0,05$ , n.s. non significativement différentes avec  $p \geq 0,05$ .

Chez les juvéniles de 1 cm, les volumes totaux cumulés des mucocytes à AMPS et des mucocytes à MMPS à la surface frontale des filaments principaux étaient similaires à ceux calculés pour les juvéniles de 7,5 mm ( $p = 0,293$ ), avec des volumes totaux de mucocytes à AMPS et de mucocytes à MMPS identiques ( $p = 0,260$  et  $p = 0,169$  respectivement) (Fig. 32A, B). Pour les filaments apicaux, aucune différence significative n'a été observée pour les volumes totaux cumulés des mucocytes à AMPS et à MMPS entre le stade 7,5 mm et le stade 1 cm, malgré une augmentation significative du volume total des mucocytes à MMPS ( $p \leq 0,001$ ). Pour les filaments latéraux, une augmentation significative des volumes totaux cumulés des mucocytes à AMPS et à MMPS a été observée ( $p = 0,002$ ), due à une augmentation significative ( $p = 0,002$ ) du volume total des mucocytes à MMPS (Fig. 32A, B). Le volume total cumulé des mucocytes au niveau des filaments apicaux était plus de trois fois supérieur à celui observé au niveau des filaments principaux chez les juvéniles de 1 cm, comme constaté chez les juvéniles de 7,5 mm (Fig. 32B).

Les nombres totaux cumulés de mucocytes à AMPS et à MMPS ont diminué de manière significative pour les trois catégories de filaments, entre 1 et 2,4 cm de taille de coquille ( $p \leq 0,001$ ), ce résultat étant dû à une diminution significative du nombre de mucocytes à AMPS à la surface frontale des filaments apicaux, latéraux et principaux des plis ( $p \leq 0,001$ ,  $p \leq 0,001$  et  $p = 0,008$  respectivement - Fig. 31B, C). Le nombre de mucocytes à MMPS est resté stable entre 1 et 2,4 cm de taille de coquille pour les filaments apicaux, les filaments latéraux et les filaments principaux ( $p = 0,635$ ,  $p = 0,976$  et  $p = 0,692$  respectivement - Fig. 31B, C). Les nombres de mucocytes acides et de mucocytes mixtes étaient équivalents à la surface frontale des filaments apicaux ( $p = 0,367$ ), alors que les mucocytes mixtes étaient significativement plus nombreux que les mucocytes acides à la surface frontale des filaments latéraux et principaux des plis ( $p = 0,005$  et  $p = 0,002$  respectivement – Fig. 31B, C).

En termes de volume de mucus, les volumes totaux cumulés des mucocytes à AMPS et des mucocytes à MMPS ont augmenté de manière significative pour les trois catégories de filaments ( $p \leq 0,001$ ), en raison de l'augmentation de la taille des mucocytes entre 1 et 2,4 cm de taille de coquille (Fig. 29, 32B, C). Alors que les volumes totaux des mucocytes à AMPS sont restés équivalents, les volumes totaux des mucocytes à MMPS ont augmenté de manière significative pour les trois catégories de filaments ( $p \leq 0,001$ ). Les volumes totaux des mucocytes à AMPS étaient significativement inférieurs aux volumes totaux des mucocytes à MMPS ( $p \leq 0,001$  pour les trois catégories de filaments – Fig. 32C), contrairement aux trois stades précédemment décrits (Fig. 30, 32A, B). Les filaments apicaux des plis présentaient un

volume total de mucocytes à AMPS significativement supérieur par rapport aux filaments latéraux et principaux ( $p \leq 0,001$  dans les deux cas), qui présentaient des volumes totaux de mucocytes à AMPS similaires ( $p = 0,087$ ). Les volumes totaux de mucocytes à MMPS étaient significativement différents entre les trois catégories de filaments ( $p \leq 0,001$ ), à la faveur des filaments apicaux. Les filaments apicaux présentaient à ce stade plus de 4 fois le volume total cumulé de mucocytes à AMPS et à MMPS par rapport aux filaments principaux; ce rapport étant de 1,8 entre les filaments apicaux et les filaments latéraux (Fig. 32C).

#### **4- Volume relatif des AMPS produits à la surface frontale des filaments ordinaires apicaux et latéraux et des filaments principaux.**

Chez les juvéniles de 2,9 mm, les AMPS représentaient 76% du volume total de mucus potentiellement produit à la surface frontale des filaments (Tableau 12). Chez les juvéniles de 7,5 mm, alors que le pourcentage d'AMPS dans le mucus a diminué à la surface frontale des filaments principaux, de 76 à 57%, celui-ci a légèrement augmenté pour les filaments apicaux (+ 12% d'AMPS) et les filaments latéraux (+ 10% d'AMPS). Chez les juvéniles de 1 cm, le pourcentage d'AMPS potentiellement sécrétés dans le mucus à la surface frontale des filaments principaux est resté identique. En revanche, ce pourcentage a diminué à la surface frontale des filaments apicaux (- 23% d'AMPS) et latéraux (- 20% d'AMPS) et était identique pour ces deux catégories de filaments (66% d'AMPS). Chez les juvéniles de 2,4 cm, le pourcentage d'AMPS potentiellement sécrété dans le mucus a beaucoup diminué à la surface frontale des filaments apicaux, latéraux et principaux des plis, atteignant 33%, 21% et 18% respectivement (Tableau 12).

**Tableau 12.** Pourcentage des AMPS dans le volume total potentiel de mucus sécrété au niveau de la surface frontale des trois catégories de filaments identifiés.

\* Situation du filament sur le pli branchial, excepté chez les juvéniles de 2,9 mm ne présentant que des filaments ordinaires ayant une position identique en raison de l'absence de plis sur la branchie à ce stade.

<b>Taille des individus</b>	<b>Filament apical*</b>	<b>Filament latéral*</b>	<b>Filament principal*</b>
2,9 mm	76 ± 7%	76 ± 7%	76 ± 7%
7,5 mm	88 ± 8%	86 ± 11%	57 ± 12%
1 cm	66 ± 9%	66 ± 12%	57 ± 8%
2,4 cm	33 ± 8%	21 ± 6%	18 ± 7%



## D- Discussion et conclusion

Les types de mucocytes identifiés sur la surface frontale des filaments branchiaux des juvéniles au cours de leur développement étaient les mêmes que ceux mis en évidence chez les adultes dans la 2<sup>ème</sup> partie de ce chapitre (Beninger *et al.*, 2005), à savoir des mucocytes produisant des mucopolysaccharides acides (mucocytes à AMPS) et des mucocytes produisant des mucopolysaccharides mixtes (mucocytes à MMPS). De même, des mucocytes produisant des mucopolysaccharides neutres (mucocytes à NMPS) ont été observés mais en très faible nombre. En revanche, si les types de mucocytes identifiés étaient les mêmes, une augmentation de leur volume a été observée au cours du développement de la branchie, les mucocytes à AMPS passant de 9,0 à 174,8  $\mu\text{m}^3$  et les mucocytes à MMPS passant de 9,6 à 315,2  $\mu\text{m}^3$  (Beninger *et al.*, 2005; présente étude), de 2,9 mm à environ 9 cm de taille de coquille. Cette augmentation du volume des mucocytes s'effectue parallèlement à une augmentation globale de la taille des structures au cours de la croissance des individus, comme le témoigne l'augmentation de la largeur de la surface frontale, qui mesurant moins de 10  $\mu\text{m}$  chez les juvéniles de 2,9 mm, atteint 30  $\mu\text{m}$  chez les adultes, soit le triple.

En terme de volume de mucus, la quantité totale de mucus potentiellement produite par  $\mu\text{m}$  de surface frontale augmente d'un facteur 18 environ pour les filaments apicaux et d'un facteur 8 environ pour les filaments latéraux, de 2,9 mm à la taille adulte (présente étude; Beninger *et al.*, 2005). Les filaments principaux présentaient beaucoup moins de mucocytes que les deux autres catégories de filaments, pour tous les stades étudiés, ce qui est conforme aux observations réalisées chez des huîtres adultes de *Crassostrea virginica* (Beninger & Dufour, 1996). D'une manière générale, cette augmentation du volume de mucus suggère une augmentation de la capacité de capture / transport des particules à la surface frontale des filaments branchiaux, et en particulier à la surface frontale des filaments apicaux des plis (Beninger & Dufour, 1996; Beninger *et al.*, 2005).

De plus, il est important de noter que dès 7,5 mm de taille de coquille, stade auquel les filaments principaux commencent juste à se différencier (3<sup>ème</sup> partie de ce chapitre; Cannuel & Beninger, 2006), une spécialisation des filaments au niveau cellulaire est déjà en train de s'effectuer. A ce stade, la branchie peut encore, d'un point de vue anatomique, être considérée comme étant toujours homorhabdique, le plissement de la branchie étant à peine initié, et les filaments principaux n'étant qu'à peine différenciés (Cannuel & Beninger, 2006). Or d'un point de vue micro-anatomique, les futurs filaments apicaux des plis présentent un volume total potentiel de mucus plus de trois fois supérieur à celui calculé pour les futurs

filaments principaux, ce qui indique que la spécialisation cellulaire des filaments précède la différenciation anatomique de la branchie. Cette spécialisation se traduit par une diminution du nombre total de mucocytes au niveau de la surface frontale des futurs filaments latéraux et principaux, alors que ce nombre reste stable pour les filaments apicaux entre 2,9 et 7,5 mm de taille de coquille. Ceci implique, au niveau fonctionnel, qu'à 7,5 mm de taille de coquille, plus de deux tiers des filaments branchiaux ont une capacité de capture / transport des particules nettement réduite par rapport à celle des futurs filaments apicaux. Malgré leur fonctionnalité structurale, les futurs filaments latéraux ne participent déjà plus pleinement au traitement des particules sur la branchie en développement. Ceci représente ainsi probablement une étape critique dans le développement des juvéniles.

En ce qui concerne la proportion relative des AMPS dans le mucus résultant du mélange des sécrétions des mucocytes à AMPS et des mucocytes à MMPS à la surface frontale des trois catégories de filaments branchiaux, celle-ci diminue de manière générale de 2,9 mm de taille de coquille à la taille adulte. Cette diminution est due à la fois à l'augmentation du volume moyen des mucocytes à MMPS et à une diminution du nombre de mucocytes à AMPS, dont le volume moyen est inférieur à celui des mucocytes à AMPS. A 2,4 cm de taille de coquille, les filaments apicaux des plis présentent des proportions relatives d'AMPS supérieures à celles observées pour les deux autres catégories de filaments, ce qui rejoint les résultats obtenus chez les adultes dans la deuxième partie de ce chapitre (Beninger *et al.*, 2005). La présence d'un mucus plus acide et donc plus visqueux, chez les juvéniles soulève certaines questions concernant le tri pré-ingestif s'effectuant sur les palpes labiaux. En effet le tri des particules englobées dans un mucus plus épais serait plus difficile à réaliser au niveau des palpes labiaux. Il serait ainsi intéressant d'étudier les types de mucocytes et leurs proportions au niveau des palpes labiaux, une fluidification ultérieure du mucus ayant peut-être lieu à ce niveau permettant le tri des particules, comme montré chez *Crassostrea virginica* (Newell & Jordan, 1983), *Mytilus edulis* et *Placopecten megellanicus* (Beninger & St-Jean, 1997b).

Au cours du développement de la branchie, la différence de volume total de mucus potentiellement sécrété observée entre les filaments apicaux et les filaments latéraux des plis indique que les filaments apicaux des plis sont les principaux sites de traitement des particules dès 7,5 mm de taille de coquille, alors que le plissement de la branchie est à peine initié (Cannuel & Beninger, 2006). L'acquisition de la condition hétérorhabdique se fait donc dans un premier temps au niveau cellulaire, avec la spécialisation des trois catégories de filaments branchiaux, et dans un deuxième temps par l'acquisition anatomique de plis branchiaux

profonds et de filaments principaux complètement différenciés. La branchie de l'huître n'atteint ainsi probablement pas sa fonctionnalité finale avant 2,4 cm de taille de coquille, taille à laquelle les plis branchiaux sont relativement profonds et les jonctions intra-plis permettent de maintenir, du côté abfrontal, la forme des plis.

## **E- Remerciements**

Nous remercions Mme O Aumaille pour son aide technique en histologie, ainsi que Mr S Angeri de Vendée Naissain pour les juvéniles d'huître. Nous remercions également IFREMER pour le financement partiel de cette étude (Contrat IFREMER/EMI n° 05-2-20723210).

### **3.5 Acquisition de la capacité de traitement des particules chez les larves, post-larves et juvéniles de *Crassostrea gigas*: ontogénie des voies de rejet des pseudofeces sur le manteau**

---

Article soumis le 22 juin 2005 à la revue Marine Ecology Progress Series, révisé en septembre 2005

#### **Acquisition of particle processing capability in the oyster *Crassostrea gigas*: ontogeny of the mantle pseudofeces rejection tracts.**

**Peter G. BENINGER & Rozenn CANNUEL**

##### **A- Abstract**

Acquisition of effective particle processing by oysters, in their typically turbid habitats, requires an efficient mechanism of pseudofeces rejection, and this function is accomplished by the characteristic mantle rejection tracts. The ontogenetic developments of these tracts were studied using scanning electron microscopy (SEM) for late larval, postlarval, and juvenile *Crassostrea gigas*, using hatchery-reared specimens. Pediveliger larvae presented a marginal mantle rejection tract, which becomes the inner fold of the three mantle folds in postlarval and adult oysters. An ephemeral, secondary marginal ciliary tract was observed in 1.30 mm early postlarvae, absent in later postlarval stages. 2.70 mm specimens presented a 'tractless' mantle surface, constituting a potentially critical stage with respect to pseudofeces rejection and hence particle processing. The organization of the much more complex adult system, consisting of multiple radial tracts and a marginal collecting tract comprised of two contiguous sub-tracts, was not complete before 10.06 mm to 23.83 mm. The complete re-organization of the mantle rejection system suggests that this is a phylogenetically new character in the Ostreidae. Furthermore, it points to an additional potentially critical event in the acquisition of particle processing capability, especially when considered in the light of previous data on gill development in this species, and notably for individuals recruiting in natural habitats.

## **B- Résumé**

L'acquisition de la capacité de traitement des particules chez les huîtres, dans leur habitat turbide, nécessite un système efficace de rejet des pseudofeces, et cette fonction est réalisée par des voies de rejet caractéristiques du manteau. L'ontogénie de ces voies de rejet a été étudiée en microscopie électronique à balayage chez les larves pédivéligères, post-larves et juvéniles de *Crassostrea gigas*, à l'aide de spécimens élevés en éclosérie. Une voie marginale de rejet du manteau a été identifiée chez les larves pédivéligères, devenant ensuite le pli interne des trois plis du bord du manteau chez les post-larves et les huîtres adultes. Une voie ciliée marginale secondaire et éphémère a été observée chez les jeunes post-larves de 1,30 mm, et n'a plus été observée chez les stades post-larvaires ultérieurs. Chez les spécimens de 2,70 mm, aucune voie ciliée n'a été identifiée à la surface du manteau, ce stade constituant un stade potentiellement critique par rapport au rejet des pseudofeces et donc au traitement des particules. Le système de rejet adulte, beaucoup plus complexe, de rejet des pseudofeces, constitué de voies radiales multiples et d'une voie de collecte marginale composée de deux voies contiguës, n'a pas été observé avant 10,06 – 23,83 mm. La ré-organisation complète du système de rejet du manteau au cours du développement suggère qu'il s'agit d'un nouveau caractère phylogénétique des Ostréidés. De plus, cela permet de dégager des stades potentiellement critiques supplémentaires dans l'acquisition de la capacité de traitement des particules, notamment en relation avec les données précédemment acquises sur le développement de la branchie de cette espèce, en particulier pour le recrutement d'individus dans les habitats naturels.

## **C- Introduction**

Suspension-feeders constitute a major component of coastal marine systems, and play important roles in seston dynamics, including the transfer of primary to secondary production, and benthic-pelagic coupling (Cloern, 1982; Officer *et al.*, 1982; Asmus & Asmus, 1993; Dame, 1993; Smaal & Prins, 1993; Gili & Coma, 1998; Riisgård, 1998; Chauvaud *et al.*, 2000; Newell, 2004). Bivalves, especially the most conspicuous species such as oysters, are both ecologically and economically important in nearshore systems, largely due to their suspensivorous feeding mode. While natural populations of oysters have steadily and often precipitously declined in response to anthropogenic activities (MacKenzie,

1996; Jackson *et al.*, 2001), this has been accompanied by an opposite trend of increasing aquacultural production, such that cultured populations now constitute the main oyster biomass in many countries. Oysters are the leading bivalve aquaculture species worldwide, and 95 % of the landings originate with culture operations; approximately one-third of this is due to the increasingly ubiquitous species *Crassostrea gigas* (Gosling, 2003).

The mechanisms involved in oyster suspension-feeding have been investigated using a variety of modern approaches, chiefly centred upon the roles of the gills and labial palps (Newell & Jordan, 1983; Ward *et al.*, 1994, 1998; Beninger & Dufour, 1996; Cognie *et al.*, 2003; Beninger *et al.*, 2005). Ingestion volume control and qualitative selection both produce pseudofeces, and the transport and evacuation of pseudofeces is therefore essential to prevent fouling and unnecessary re-treatment in the suspension-feeding system. The role of the mantle rejection tracts in this regard has been highlighted in adult oysters (Beninger & Veniot, 1999), but it is not known whether the vulnerable postlarval and juvenile stages are equipped to evacuate pseudofeces in this way. While recent advances have been made in the understanding of gill development and its potential impact on particle processing in early life stages (Chaparro *et al.*, 2001; Cannuel & Beninger, 2006), we have no knowledge concerning the development of the equally-important pseudofeces evacuation mechanisms which allow oysters to exploit their typically turbid habitats, both in natural populations and as seed oysters in culture operations. Indeed, the bivalve mantle in general has until recently been poorly-studied with respect to particle processing mechanisms (Beninger *et al.*, 1999; Beninger & Veniot, 1999). In oysters, descriptions of mantle development are typically either absent (Cole, 1938; Galtsoff, 1964; Hickman & Gruffydd, 1971; Moor, 1983) or quite brief, being limited to summary descriptions of cell types and mantle folds (Elston, 1980, 1996). Indeed, in his reference monograph, Galtsoff (1964) states that 'Many phases of larval - metamorphosis, especially of the *Crassostrea* group of oysters, are inadequately known and need to be more critically studied. With advances in the technique of artificial rearing of oyster larvae, this gap in the knowledge of oyster biology may soon be filled'. More than 40 years later, with the recent notable exceptions of Chaparro *et al.* (2001 for *Ostrea chilensis*) and Cannuel and Beninger (2006, for *Crassostrea gigas*) concerning gill development, his prediction is still largely unfulfilled.

In the present study, we document the development of the ciliary mantle tracts in late larval, postlarval and juvenile *Crassostrea gigas*, and relate this to the previously described contemporaneous development of the gills (Cannuel & Beninger, 2006).

## D- Materials and methods

Developmental studies of post-metamorphic bivalves are hampered by a lack of precise terminology with respect to early benthic life stages. The term 'postlarva' could refer to any post-metamorphic individual (no exact upper size or age limit), whereas the term 'juvenile' is restricted to sexually immature individuals. Size or age at sexual maturity are variable, and at any rate impossible to ascertain in specimens which must be anatomically intact for developmental studies. 'Spat' is a common term which is as imprecise as 'postlarva', and conveys no biological information. The results of Cannuel and Beninger (2006) and the present work lead us to adopt the following convention: 'postlarvae' are individuals from settlement to 2.70 mm (inclusive), whereas 'juveniles' are individuals up to a size of 23.83 mm, irrespective of sexual maturity status.

### 1- Larval and postlarval cultures

Fertilizations, larval and postlarval cultures of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) were obtained and reared as previously described (Cannuel & Beninger, 2006). Briefly, oocytes and spermatozoa were obtained in April 2002 by gonad stripping of adult oysters previously conditioned for 6 weeks. Larval cultures were started at an initial density of 30-35 larvae.mL<sup>-1</sup>, in 150 L rearing tanks of aerated 1- $\mu$ m filtered sea water (FSW). At day 2, larval concentrations were reduced to 2 larvae.mL<sup>-1</sup>. Larvae were fed *ad libitum* with a 1:1:1 mixture of *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* (clone T-Iso) and *Chaetoceros calcitrans* (PTC – diet; Robert & Gérard, 1999; Robert *et al.*, 2001). Initial culture temperature was 22°C, gradually raised to 24-25 °C on day 6, and maintained at this temperature to settlement (Robert & Gérard, 1999).

At day 20, the competent larvae were transferred to rectangular PVC sifters of 140  $\mu$ m diagonal mesh placed in raceways and filled with finely crushed oyster shells, at a density of 60 000 larvae per sifter, for settlement, metamorphosis and postlarval rearing. Postlarvae were fed continuously with PTC diet in 5- $\mu$ m FSW. Raceways and sifters were washed first one week after settlement and then every 2-3 days. Postlarval rearing was stopped at day 36 (2.70 mm in shell size - Table 13).

**Table 13.** *Crassostrea gigas*. Age and mean size correspondence, standard deviation (SD), and sample (n) for each sampling. d: days, w: weeks.

**Tableau 13.** *Crassostrea gigas*. Age et taille moyenne correspondante, écart type (SD) et taille de l'échantillon (n) pour chaque stade étudié. d: jours, w: semaines

Age	Mean shell length (mm)	SD	n
15 d	0.29	0.03	6
20 d	0.33	0.02	7
22 d	0.42	0.04	9
29 d	1.30	0.13	5
36 d	2.70	0.57	5
10 w	2.85	0.11	3
13 w	7.50	0.50	5
16 w	10.06	1.16	30
22 w	23.83	2.62	30

## 2- Juvenile collection

*Crassostrea gigas* juveniles (> 2.70 mm) were obtained from the Vendée Naissain company (Vendée, France) in September and December 2003, where they were fed with *Skeletonema costatum*. Four stages were studied: 2.85 mm, 7.50 mm, 10.06 mm and 23.83 mm, corresponding to the mean shell lengths of four commercial sifter-sizes (Table 13).

## 3- Scanning electron microscopy (SEM) preparation

To ensure valve unlocking, tissue penetration and optimal fixation of relaxed structures, specimens were first narcotized in ascending concentrations of MgCl<sub>2</sub>, up to 7.5% in narcotization beakers (Veniot *et al.*, 2003; Cannuel & Beninger, 2006). Specimens were then fixed in slightly hyperosmotic 2.5% glutaraldehyde in 0.2M buffered sodium cacodylate for a minimum of 48h and processed for drying with hexamethyldisilazane (HMDS – Nation, 1983; Braet *et al.*, 1997; Heraty & Hawks, 1998; Hochberg & Litvaitis, 2000; Cannuel & Beninger, 2006). The smaller specimens (larvae, postlarvae and juveniles up to 7.50 mm) were then mounted on stubs using double-sided adhesive tape, and a fine tungsten needle was used to remove one valve, allowing visualization of internal organs. For larger specimens (7.50 mm to 23.83 mm) or detailed observation of organs, soft parts were first removed from the shell before mounting the shell on a SEM stub, allowing optimal coating and subsequent



visualization of the mantle surface. Samples were then sputter-coated with gold and observed with a scanning electron microscope (JEOL 6400).

## **E- Results**

Given the highly-modified anatomy of oysters, compared to most other bivalves, it is important to establish unambiguous anatomical terms at the outset. Although the recommendations of Stasek (1963) regarding axis designation in relation to hinge location are quite satisfactory for the majority of bivalves, in species characterized by extensive rotation of organs accompanying the monomyarian condition, it is much easier to understand axis designations with respect to organ location. We therefore use the term 'anterior' to designate the extremity closest to the mouth, while the term 'ventral' is used to designate the extremity closest to the infrabranial periphery. The terms 'posterior' and 'dorsal' refer to the opposites of these extremities.

In the present study, it is also necessary to distinguish the various pallial ciliary tracts and the developing mantle folds, which may also be ciliated, at the periphery of the mantle. The following terms will be used in the present study:

*Marginal ciliary tract*: a densely-ciliated band, extending antero-posteriorly along the ventral mantle margin. It may be comprised of distinct anterior and posterior segments in the definitive condition.

*Radial ciliary tracts*: densely-ciliated bands extending centrifugally on the mantle infrabranial surface from the gill region to the mantle edge.

*Mantle fold*: any of the folds which appear at the ventral mantle edge. We use the term fold to avoid ambiguity with respect to the right and left pallial lobes. There are three such folds in the adult condition: inner, middle and outer folds. The trough between the middle and the outer folds is the periostracal groove.

*Future inner fold*: the larval marginal ciliary tract, which undergoes folding in the postlarvae to become the inner fold, which is conserved in the adult condition.

*Future middle fold*: the outermost portion of the larval mantle inner fold, which becomes the middle fold after the folding of the larval future inner fold.

*Future outer fold*: the outermost larval mantle fold, which is conserved in the adult condition.

As detailed below and summarized in Fig. 36, four successive stages of mantle ciliation were distinguished in the course of development of *Crassostrea gigas*:

- (1) a single, well-ciliated larval marginal rejection tract in 0.29 to 0.33 mm pediveliger larvae. This tract folds to become the inner mantle fold in postlarvae.
- (2) a new marginal ciliary tract in 1.30 mm postlarvae, situated further inward from the mantle edge in comparison to the larval marginal ciliary tract.
- (3) a transitional phase with randomly-scattered sparse tufts of simple cilia over the entire mantle surface (2.70 mm postlarvae).
- (4) well-ciliated multiple radial rejection tracts and a new marginal collecting tract, consisting of anterior and posterior segments, in juveniles from 2.85 mm in shell size to the adult condition.

Tract dimensions and ciliary lengths reported in the present work were obtained directly from the micrographs; shrinkage due to specimen preparation was assumed to be uniform (Gusnard & Kirschner, 1977), and estimated at 15-20% in bivalve ciliated epithelia (Beninger *et al.*, 1999).

Reporting of bivalve developmental stages is usually done with respect to shell sizes (Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003), since there is a closer correspondence between size and development than between age and development (Veniot *et al.*, 2003). In the present work, developmental stages are therefore given in terms of shell sizes; corresponding ages are presented in Table 13.

### **1- Pediveliger larvae: the marginal rejection tract**

The mantle surface was unciliated in 0.29 mm larvae except on the future inner and middle folds. The cilia were especially well-developed on the future inner fold, constituting the larval marginal ciliary tract, extending posteriorly from the buccal region to mid-circumference (Fig. 33A). Near the mouth, this tract was ~ 4-6  $\mu\text{m}$  in width, and composed of both simple (~ 2-5  $\mu\text{m}$  in length) and apparently grouped (~ 5-8  $\mu\text{m}$  in length) cilia (Fig. 33B). Most posteriorly, the ciliary tract was wider (~ 10  $\mu\text{m}$ ) and abundantly ciliated with grouped cilia (~ 7-12  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 33C). Ventralward beating of these grouped cilia was inferred from cilia orientation on SEM micrographs.

The larval mantle marginal ciliary tract enlarged to ~ 15-18  $\mu\text{m}$  in 0.33 mm pediveliger larvae, consisting of long (~ 7.5-11  $\mu\text{m}$ ) grouped cilia, with short (~ 3-5  $\mu\text{m}$ ) cilia bordering the future middle fold (Fig. 33D-E, 36A). This tract persisted in 0.42 mm early

postlarvae, just after metamorphosis (Fig. 33F). Tufts of simple cilia ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ), situated slightly dorsal and parallel to the persistent larval marginal ciliary tract, were observed, while the remaining mantle surface remained unciliated (Fig. 33F).

## **2- Postlarvae: larval marginal mantle tract evolution to inner mantle fold, appearance of a new marginal ciliary tract**

At the 1.30 mm postlarval stage, half (4 of 8) of the specimens observed presented a new mantle ciliary tract, distinctly different from the previous larval mantle ciliary tract:  $15 \mu\text{m}$  in width, and composed of simple cilia ( $\sim 8\text{-}11 \mu\text{m}$ ) beating posteriorly (Fig. 33G). In the remaining individuals, only widely - spaced tufts of  $\sim 10\text{-}15 \mu\text{m}$  simple cilia were observed in the place of this new ventral marginal tract (Fig. 33H, 36B).

The three-fold condition of the mantle edge was first observed in 1.30 mm postlarvae, the future inner fold region of the larvae becoming the definitive inner fold, and the future middle fold of the larvae becoming the definitive middle fold (Fig. 33G). At this stage, tentacles could be observed on the middle fold, while the developing inner fold retained the abundant ciliation of the larval marginal tract (Fig. 33G,H, 36B).

## **3- Transitional phase**

No trace of the early postlarval marginal ciliary tract, described above, remained in 2.70 mm postlarvae (Fig. 30A). Both infrabranchial and suprabranchial mantle surfaces presented sparse (spacing  $\sim 25\text{-}50 \mu\text{m}$ ) tufts of simple cilia ( $\sim 10\text{-}15 \mu\text{m}$ ) (Fig. 34A,B,C, 36C).

## **4- Juveniles: radial and collecting rejection tracts**

The typical oyster radial mantle rejection tracts (Beninger & Veniot, 1999) were first observed in 2.85 mm juveniles. Each radial tract, situated atop a ridge, was  $\sim 15 \mu\text{m}$  in width, and the inter-tract distances were  $\sim 80\text{-}130 \mu\text{m}$  at the distal extremities (Fig. 34D). Radial tract ciliation was composed of apparently simple, ventrally beating cilia ( $\sim 7\text{-}8 \mu\text{m}$ ) (Fig. 34E). Non-ordered tufts of simple cilia ( $\sim 7\text{-}13 \mu\text{m}$ ) were observed in the inter-ridge spaces.

A marked antero-posterior differentiation of the inner mantle fold became evident, beginning with 2.85 mm individuals: the fold and associated tentacles became smaller toward the anterior extremity ( $\sim 90\text{-}115$  vs  $\sim 30 \mu\text{m}$  in width, Fig. 35A).

In 7.50 mm juveniles, the inter-tract distance increased to  $\sim 160\text{-}280 \mu\text{m}$  (distal extremities). Radial tract width remained constant almost to the distal extremity (Fig. 34F), where they enlarged up to  $90 \mu\text{m}$  in some specimens. Ventrally-beating grouped cilia ( $\sim 8\text{-}14$

$\mu\text{m}$ ) were observed on each radial tract. Inter-ridge spaces were punctuated by the previously-described ciliary tufts (Fig. 34F).

Radial tract widths and cilia lengths remained constant in 10.06 mm juveniles, while inter-ridge spaces, still presenting ciliary tufts, measured  $\sim 180\text{-}340\ \mu\text{m}$  on the mantle ventral margin (Fig. 34G). Radial rejection tracts were much more developed in 23.83 mm juveniles, measuring  $\sim 80\text{-}120\ \mu\text{m}$  in width in the proximal (dorsal) portions and enlarging up to  $\sim 350\text{-}470\ \mu\text{m}$  in the distal (ventral) portions, where they fused and created the posterior marginal collecting tract (Fig. 34H, 36D – see below).

The abundantly ciliated anterior marginal collecting tract was first clearly visible in 2.85 mm juveniles (Fig. 35A). It extended from the buccal region to the anterior third of the mantle circumference, and measured  $\sim 90\text{-}130\ \mu\text{m}$  in width (Fig. 35B, 36D). The tract appeared to be comprised of two parallel sub-tracts, with respect to the cilia beat orientations: a dorsal band ( $\sim 20\text{-}40\ \mu\text{m}$  wide) of dense, apparently grouped, ventrally beating cilia ( $\sim 15\text{-}20\ \mu\text{m}$  in length - Fig. 35D, 36D), and a more distal (ventral) band of apparently grouped, anteriorly beating cilia ( $\sim 10\text{-}15\ \mu\text{m}$  in length - Fig. 35C, 36D). This anterior marginal collecting tract persisted in larger specimens (7.50 mm juveniles - Fig. 35E, F), exhibiting the ciliary types described above.

The labial palps were well developed and markedly ridged at the 2.85 mm stage (Fig. 35G). Their size and location just dorsal to the anterior marginal collecting tract would allow ready deposition of palp pseudofeces on the anterior marginal collecting tract (Fig. 36D).

## **F- Discussion**

### **1- The larval marginal tract**

A larval mantle marginal rejection tract, termed the 'mantle rejection tract', has been reported to extend from the buccal region to the posterior extremity in *Mytilus edulis* larvae, although no supporting micrographs have been presented (Bayne, 1971). Similarly, Carriker (2001) described (without micrographs) such a tract in *Mercenaria mercenaria* larvae. The presence of a larval oyster mantle marginal rejection tract has heretofore either not been reported, or explicitly refuted (Yonge, 1926). The first report of a marginal ciliated band in larval oysters was that of Cranfield (1974), later confirmed by Waller (1981), in *Ostrea edulis*; the possible connection to the process of particle rejection was not explored in these studies. The ventralward beat of the component cilia, observed in the present study, would prevent particles rejected in the buccal region from re-entry into the pallial cavity. The observed rejection of pseudofeces from the posterior extremity of swimming larvae (Yonge, 1926) supported this interpretation.

The larval mantle marginal rejection tract described herein for *Crassostrea gigas* resembles that reported in a variety of adult bivalve species, with respect to location and cilia type (Beninger *et al.*, 1999); the evolutionary significance of this point is dealt with below.

### **2- Shift to adult mantle rejection system**

The adult oyster mantle rejection system is, to date, unique among the Bivalvia studied, due to multiple radial tracts (Beninger & Veniot, 1999) feeding into the marginal collecting tracts. The existence of radial tracts has been known for some time (Yonge, 1926; Elsey, 1935; Eble & Scro, 1996), and the micro-anatomical details have recently been reported (Beninger & Veniot, 1999). The present study documents the shift from the single larval-postlarval marginal rejection tract, through the assumption of a secondary marginal ciliary tract when the larval tract is subsumed in the formation of the juvenile and adult mantle inner fold, penultimately through the tractless stage, to the definitive radial system (Table 2). It is not likely that the ephemeral secondary marginal tract is functional, as at this stage (1.30 mm) the labial palps are not yet functional.

It is thus evident that several re-organizations of the mantle rejection system take place prior to the adoption of the adult system. The final re-organization also corresponds to a reversal of direction of pseudofeces transport along the mantle margin, as pseudofeces in adults are ejected from the anterior region of the mantle.

Although the radial tracts appear relatively soon, at 2.85 mm, the contiguous adult marginal tracts develop successively: the anterior collecting tract at 2.85 mm, and the posterior tract at a size between 10.06 and 23.83 mm. Simultaneously, the mantle folds decrease in size in the anterior region of the oyster, facilitating rejection of pseudofeces from the anterior marginal tract. The complete mantle rejection system is thus not functional before 10.06 mm to 23.83 mm (Table 14).

**Table 14.** *Crassostrea gigas*. Mean shell size, age, and gill and mantle developmental events associated with larval, postlarval, and juvenile critical stages. Gill developmental data from Cannuel & Beninger (2006).

**Tableau 14.** *Crassostrea gigas*. Taille moyenne de coquille, âge et évènements du développement de la branchie et du manteau associés à des stades critiques chez les larves, post-larves et juvéniles. Données sur le développement de la branchie issues de Cannuel & Beninger (2006).

Mean shell size (mm)	Age	Critical events related to gill development	Critical events related to mantle development
0.33	20 d	Shift from velar to gill particle capture	
0.42	22 d		
1.30	29 d		Re-organization of the mantle rejection system Ephemeral marginal tract
2.70	36 d	Rapid development of the outer demibranchs (metabolic cost) Differentiation of latero-frontal cirri	'Tractless' mantle stage
2.85	10 w		Partial radial mantle rejection system functional capability
7.50	13 w	Beginning of principal filament differentiation and gill plication	
10.06	16 w	Near-complete gill plication and fusion	Full radial mantle rejection system functional capability
23.83	22 w		

### 3- Evolutionary implications

The overwhelming majority of bivalve species studied to date possess a single ciliary mantle rejection tract, running antero-posteriorly at various distances from the margin (see Beninger *et al.*, 1999; Beninger & Veniot, 1999 for details and references), probably derived from the larval marginal rejection tract described above, as affirmed for *Mercenaria mercenaria* (Carriker, 2001). The Pectinidae have no rejection tract, in keeping with the

valve-clapping method of pseudofeces expulsion and the lack of a gill ventral particle groove (Beninger *et al.*, 1999). Oysters present several peculiarities in their pallial organs, notably the presence of a heterorhabdic gill in conjunction with grouped latero-frontal cilia and a ventral particle groove. The radial mantle rejection tracts have also only been reported in the Ostreidae, and may assist in the regulation of ingestion volume, by allowing the removal of material from the ventral particle grooves when the stomach is full (Beninger & Veniot, 1999). The observations of the present study, showing that the single larval-postlarval marginal rejection tract does not persist in the adult, but rather gives way, through a secondary marginal tract stage and a tractless stage, to a complete re-organization including the radial tracts and a new marginal tract differentiated into anterior and posterior components, suggests that the definitive system is an evolutionary new character which is structurally unrelated to the more primitive rejection systems. As noted above, the definitive re-organization corresponds to the reversal of direction of pseudofeces transport on the mantle margin; this is a functional and evolutionary peculiarity of the Ostreidae. These characteristics further separate the Ostreidae not only from the homorhabdic, dimyarian bivalves, but also from the other heterorhabdic monomyarian bivalves.

#### **4- Ecological and aquacultural implications**

To date, we have identified two potentially critical stages of gill development in *Crassostrea gigas*, in addition to the shift from velar to gill particle capture at metamorphosis: the transition from a V- to a W- shaped gill at 2.70 mm, and the shift from a flat homorhabdic to a deeply plicate heterorhabdic gill beginning at 7.50 mm (Cannuel & Beninger, 2006 and Table 14). In the present study, we identify another event which severely compromises particle processing ability: the re-organization of the mantle rejection system, beginning at 1.30 mm (Table 14). As this takes place during the V-stage of the gill, and prior to functional capability of the labial palps, it may be concluded that no element of the particle processing system functions efficiently at this stage. In rearing systems where young oysters are fed abundantly and enjoy controlled environmental conditions, this may not be problematic except in the case of unexpected perturbations, such as disease or parasitism. In wild populations however, this may increase mortality of recruiting oysters under more difficult environmental conditions (Moore, 1977; Levinton, 1982; Barillé *et al.*, 1997; Cheney *et al.*, 2000; Soletchnik *et al.*, 2005). With respect to the rejection tracts in particular, particle processing in high turbidities may be problematic during the re-organization of the mantle

rejection system, which lasted from 1.30 mm to juveniles at a size between 10.06 mm and 23.83 mm (Table 14).

Full structural, and presumably functional, capability of the *C. gigas* mantle rejection system occurs at a size between 10.06 and 23.83 mm, which corresponds to the size range at which the heterorhabdic gills achieve significant plication (Cannuel & Beninger, 2006 and Table 14). The deep oyster gill plication is responsible for the separation of initial acceptance and rejection tracts on the gill (Beninger *et al.*, 2005), so the timing of these two developmental events results in a simultaneously, fully functional gill and mantle in individuals at a size between 10.06 mm and 23.83 mm (Table 14). Since the labial palps are structurally functional at 2.85 mm, oysters which have attained full gill and mantle functional capability therefore also possess full labial palp functional capability. Particle processing should hence be facilitated in *C. gigas*, beginning at a size between 10.06 and 23.83 mm. This may be compared with full structural, and presumably functional, capability at ~ 7 mm in *Placopecten magellanicus* (Veniot *et al.*, 2003), despite the significantly higher rearing temperature for *C. gigas* (24-25 °C vs 14 °C for *Placopecten magellanicus*). The extended developmental time for *C. gigas* reflects its more complex gill development, which produces extensive organic gill junctions after initiation of heterorhabdic differentiation (Cannuel & Beninger, 2006).

The developmental events described above should improve our understanding of basic biological aspects likely to influence growth and mortality in post-metamorphic *C. gigas*. Physiological experimentation at the identified stages, while difficult, may provide quantitative information on how pallial organ development influences particle processing in these early life stages.

## **G- Acknowledgements**

We thank JC Cochard, S Pouvreau, C Mingant and the Ecloserie expérimentale d'Argenton (IFREMER) for facilities, and for help with larval and postlarval rearings. In particular, we thank one of the anonymous reviewers for pertinent remarks on a previous version of this manuscript. We are grateful to S Angeri (Vendée Naissain) for providing the juvenile specimens, A Barreau for assistance in scanning electron microscopy, and O Aumaille for technical assistance in histology.



Research funding was provided by the Région des Pays de Loire (PhD stipend to RC), and partial operational funding was provided by IFREMER (Contrat universitaire IFREMER/ EMI N° 03-2-2521559).

**Figure 33.** *Crassostrea gigas* – marginal rejection tract. **A-** Lateral view of a 0.29 mm pediveliger larva. f: foot, ma: mantle, mo: mouth, mrt: marginal rejection tract, o: oesophagus, s: shell (covered by the periostracum), v: velum, B and C: regions shown in detail in the corresponding micrographs. **B-** Detail of A, part of the ciliary tract close to the mouth. **C-** Detail of the ciliary tract presented in A. arrows: mucus balls. **D-** Lateral view of a 0.33 mm pediveliger larva. FOF: future outer fold. **E-** Detail of the ciliary tract presented in D. FIF: future inner fold, FMF: future middle fold, arrows: mucus balls. **F-** Lateral view of the ventral margin of the mantle surface of a 0.42 mm postlarva. ctu: ciliated tuft, p: periostracum (partially removed from the periostracal groove). **G-** Lateral view of the ventral margin of the mantle surface of a 1.30 mm postlarva, showing the new ephemeral marginal tract. IF: inner fold (differentiating), MF: middle fold (with tentacles), OF: outer fold, inset: detail of the ciliary tract. **H-** Lateral view of the ventral margin of the mantle surface of a 1.30 mm postlarva. t: tentacles.

**Figure 33.** *Crassostrea gigas* - voie de rejet marginale. **A-** Vue latérale d'une larve pédivéligère de 0,29 mm. B et C: zones présentées en détail dans les micrographies correspondantes. **B-** Détail de A, portion de la voie ciliée proche de la bouche. **C-** Détail de la voie ciliée présentée en A. flèches: boules de mucus. **D-** Vue latérale d'une larve pédivéligère de 0,33 mm. **E-** Détail de la voie ciliée présentée en D. flèches: boules de mucus. **F-** Vue latérale du bord ventral de la surface du manteau d'une post-larve de 0,42 mm. **G-** Vue latérale du bord ventral de la surface du manteau chez une post-larve de 1,30 mm, montrant la nouvelle voie marginale ciliée éphémère. encart: détail de la voie ciliée. **H-** Vue latérale du bord ventral de la surface du manteau d'une post-larve de 1,30 mm.

### **Liste des abréviations**

**ctu:** touffe de cils

**f:** pied

**FIF:** futur pli interne

**FMF:** futur pli médian

**FOF:** futur pli externe

**IF:** pli interne

**ma:** manteau

**MF:** pli médian

**mo:** bouche

**mrt:** voie de rejet marginale

**o:** œsophage

**OF:** pli externe

**p:** périostracum

**s:** coquille

**t:** tentacule

**v:** velum

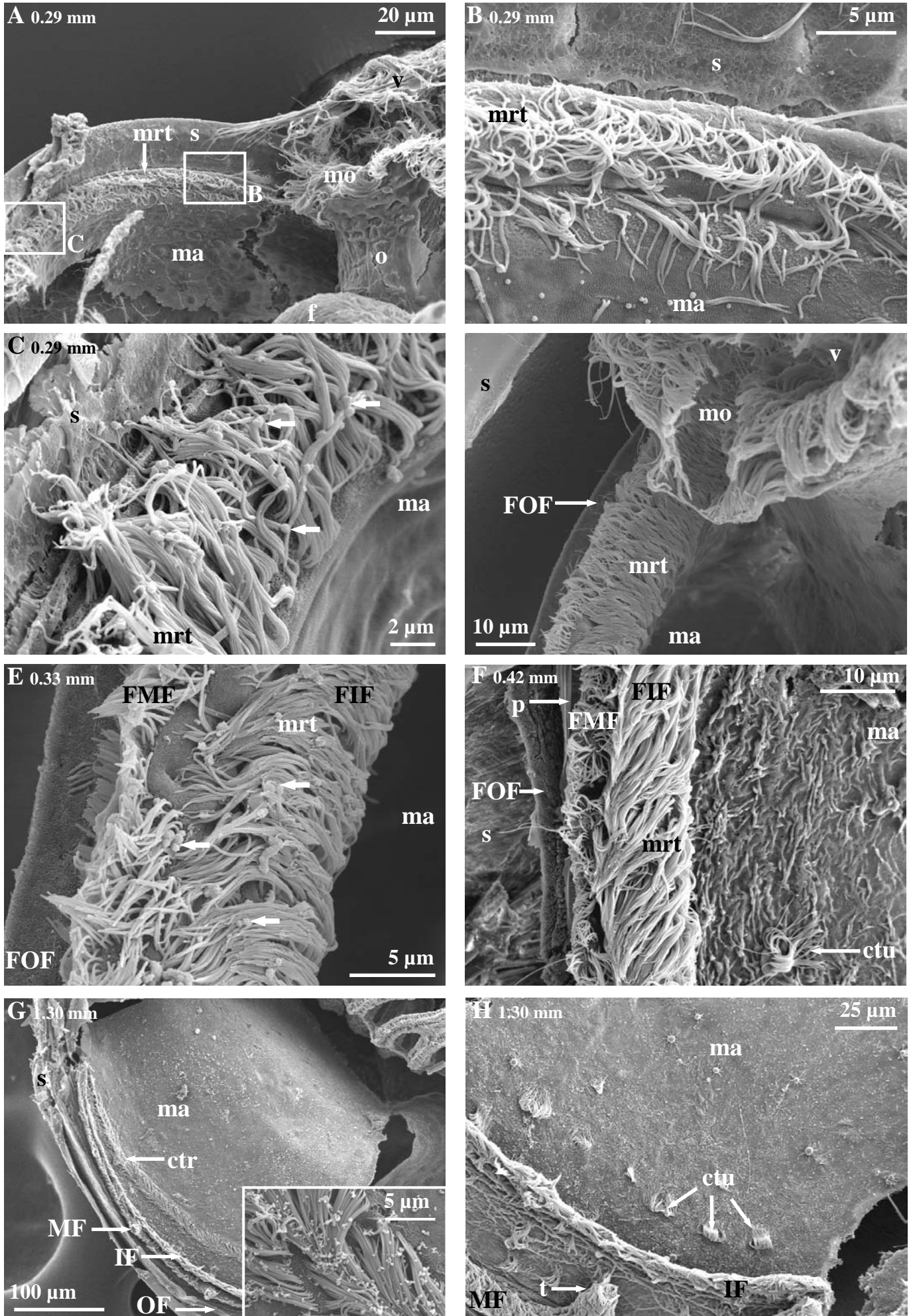


Figure 33. *Crassostrea gigas* – marginal rejection tract.

**Figure 34.** *Crassostrea gigas* - transitional ciliation and radial rejection tracts. **A-** Lateral view of the mantle infrabranchial surface of a 2.70 mm postlarva. ctu: ciliary tufts, g: gill, IF: inner fold, ma: mantle. **B-** Lateral view of the mantle suprabranchial surface of a 2.70 mm postlarva. am: adductor muscle (sectioned), MF: middle fold, p: periostracum, t: tentacle. **C-** Detail of a ciliary tuft present on the mantle surface in 2.70 mm postlarvae. **D-** Lateral view of the mantle infrabranchial surface of a 2.85 mm juvenile. OF: outer fold, rct: radial ciliary tract. **E-** Detail of a radial ciliary tract presented in D. dm: dehydrated mucus masses. **F-** Lateral view of the mantle infrabranchial surface of a 7.50 mm juvenile. inset: detail of a ciliary tract. **G-** Lateral view of the mantle ventral edge of a 10.06 mm juvenile. **H** – Lateral view of the mantle ventral edge of a 23.83 mm juvenile. pct: posterior collecting tract.

**Figure 34.** *Crassostrea gigas* - ciliature de transition et voies radiales de rejet. **A-** Vue latérale de la surface infrabranchiale du manteau d'une post-larve de 2,70 mm. **B-** Vue latérale de la surface suprabranchiale du manteau d'une post-larve de 2,70 mm. **C-** Détail d'une des touffes de cils présentes sur la surface du manteau au stade post-larvaire de 2,70 mm. **D-** Vue latérale de la surface infrabranchiale du manteau d'un juvénile de 2,85 mm. **E-** Détail d'une voie radiale de rejet présentée en D. **F-** Vue latérale de la surface infrabranchiale du manteau d'un juvénile de 7,50 mm. encart: détail d'une voie ciliée. **G-** Vue latérale du bord ventral du manteau d'un juvénile de 10,06 mm. **H** – Vue latérale du bord ventral du manteau d'un juvénile de 23,83 mm.

### **Liste des abréviations**

**am:** muscle adducteur

**ctu:** touffes de cils

**dm:** masses de mucus déshydraté

**g:** branchie

**IF:** pli interne

**ma:** manteau

**MF:** pli médian

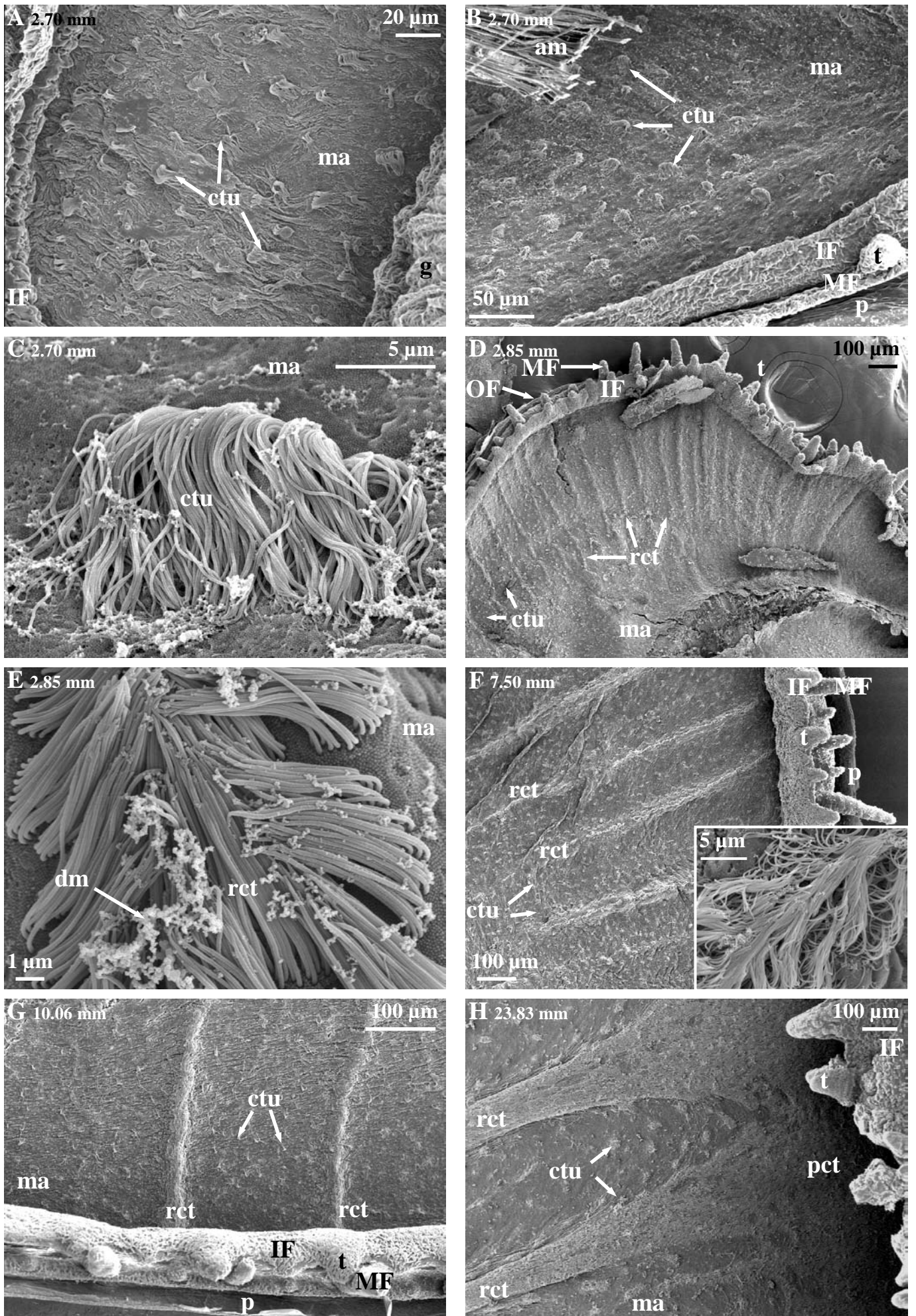
**OF:** pli externe

**p:** periostracum

**pct:** voie postérieure de collecte

**rct:** voie radiale ciliée

**t:** tentacule



**Figure 34.** *Crassostrea gigas* - transitional ciliation and radial rejection tracts.

**Figure 35.** *Crassostrea gigas* - juvenile anterior marginal collecting tract. **A-** Lateral view of the mantle infrabranchial surface of a 2.85 mm juvenile. am: adductor muscle (sectioned), g: gill, IF: inner fold, ma: mantle, MF: middle fold, OF: outer fold, t: tentacle; ANT-POST: organ orientation, B: region of detail in corresponding micrograph. **B-** Detail of A. act: anterior marginal collecting tract, rif: reduced inner fold, C and D: regions of detail in corresponding micrographs. **C-** Detail of B. cc: composite cilia, mv: microvilli. **D-** Detail of B. **E-** Lateral view of the mantle infrabranchial surface of a 7.50 mm juvenile; labial palps removed, gill partially removed. mm: mantle margin, p: periostracum. **F-** Detail of the anterior marginal ciliary tract shown in E. **G-** Ventral view of the labial palps of a 2.85 mm juvenile. ip: inner palp, lg: left gill, op: outer palp, rg: right gill.

**Figure 35.** *Crassostrea gigas* - voie marginale antérieure de collecte des juvéniles. **A-** Vue latérale de la surface infrabranchiale du manteau d'un juvénile de 2,85 mm. **B:** zone de détail présentée dans la micrographie correspondante. **B-** Détail de A. C et D: zones de détail présentées dans les micrographies correspondantes. **C-** Détail de B. **D-** Détail de B. **E-** Vue latérale de la surface infrabranchiale du manteau d'un juvénile de 7,50 mm; palpes labiaux ôtés, branchie partiellement ôtée. **F-** Détail de la voie ciliée marginale antérieure présentée en E. **G-** Vue ventrale des palpes labiaux d'un juvénile de 2,85 mm.

### **Liste des abréviations**

**act:** voie antérieure de collecte

**am:** muscle adducteur

**cc:** cils composites

**g:** branchie

**IF:** pli interne

**ip:** palpe interne

**lg:** branchie gauche

**ma:** manteau

**MF:** pli médian

**mm:** bord du manteau

**mv:** microvillosités

**op:** palpe externe

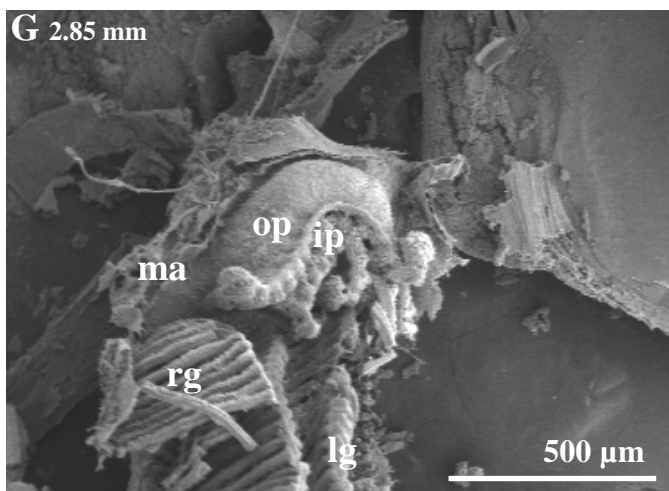
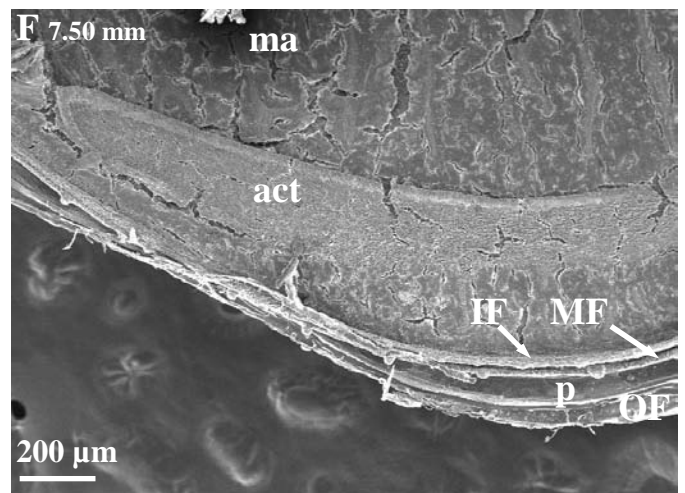
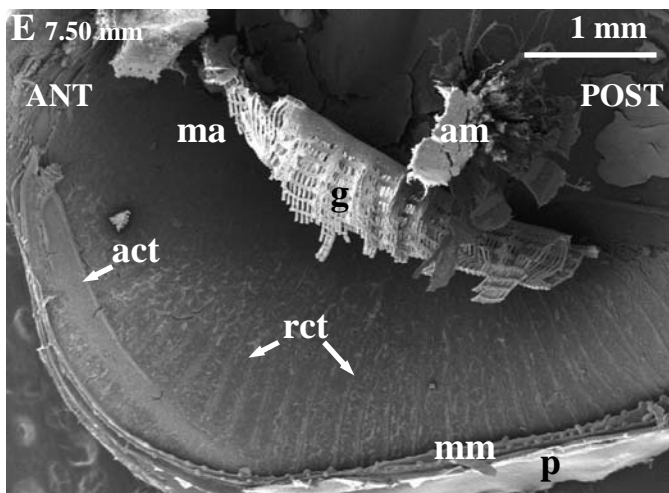
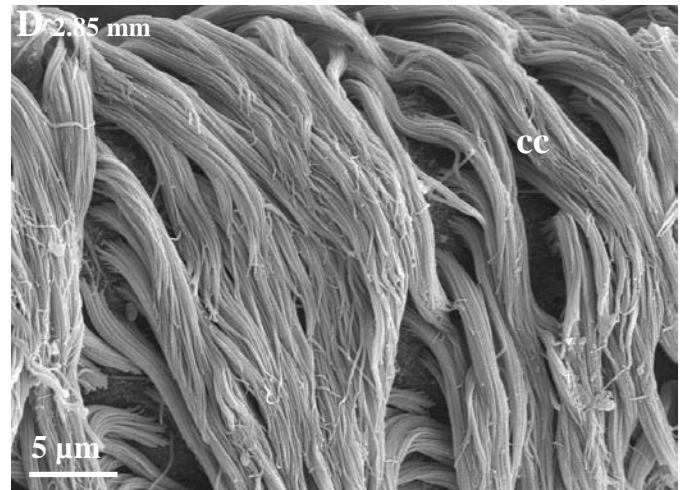
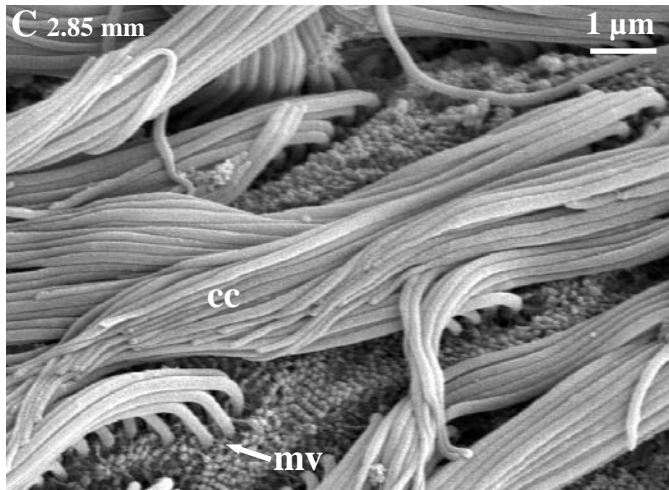
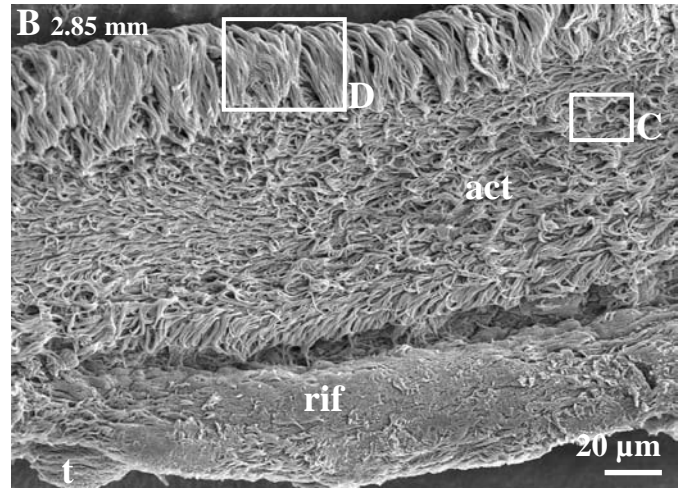
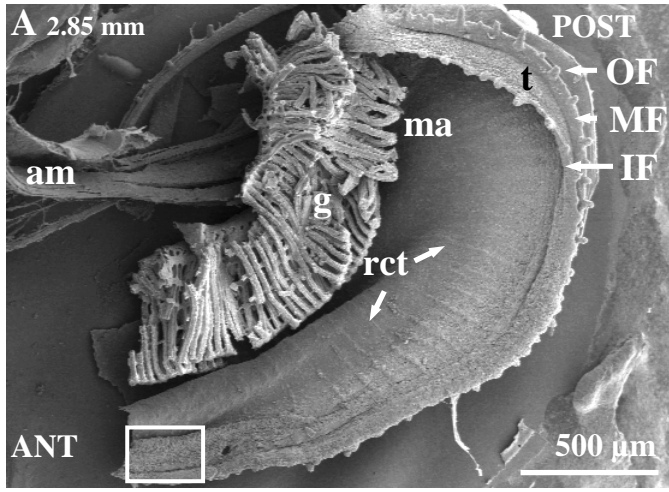
**p:** périostracum

**rg:** branchie droite

**rif:** pli interne réduit

**t:** tentacule

**ANT-POST:** orientation des organes



**Figure 35.** *Crassostrea gigas* – juvenile anterior marginal collecting tract.

**Figure 36.** *Crassostrea gigas* - summary diagram of mantle ciliation throughout development. **A-** Lateral view of a 0.33 mm pediveliger larva and ciliary types observed in the plane of section (dotted line). aam: anterior adductor muscle, cc: composite cilia, f: foot, FIF: future inner fold, FMF: future middle fold, FOF: future outer fold, g: gill, mrt: marginal rejection tract, pam: posterior adductor muscle, pg: periostracal groove, sc: simple cilia, v: velum. **B-** Lateral view of a 1.30 mm postlarva and ciliary types observed in the plane of section (dotted line). am: adductor muscle, ctu: ciliary tufts, IF: inner fold, lpp: labial palp primordia, mct: marginal ciliary tract, MF: inner fold, OF: outer fold. **C-** Lateral view of a 2.70 mm postlarva and ciliary types observed in the plane of section (dotted line). lp: labial palps. **D-** Lateral view of a late juvenile (size between 10.06 and 23.83 mm), ciliary types observed in the planes of section 1 and 2 (dotted lines), and direction or probable direction of particle transport on the mantle surface (arrows and dotted arrow respectively). act: anterior marginal collecting tract, pct: posterior marginal collecting tract, pf: pseudofeces, rct: radial ciliary tract.

**Figure 36.** *Crassostrea gigas* - schéma de synthèse de la ciliature du manteau au cours du développement. **A-** Vue latérale d'une larve pédivéligère de 0,33 mm et types de cils observés dans le plan de section (pointillés). **B-** Vue latérale d'une post-larve de 1,30 mm et types de cils observés dans le plan de section (pointillés). **C-** Vue latérale d'une post-larve de 2,70 mm et types de cils observés dans le plan de section (pointillés). **D-** Vue latérale d'un juvénile de taille comprise entre 10,06 et 23,83 mm, types de cils observés dans les plans de section 1 et 2 (pointillés) et direction ou direction probable du transport des particules à la surface du manteau (flèches ou flèche en pointillés respectivement).

### **Liste des abréviations**

**aam:** muscle adducteur antérieur  
**act:** voie marginale antérieure de collecte  
**am:** muscle adducteur  
**cc:** cils composites  
**ctu:** touffes de cils  
**f:** pied  
**FIF:** futur pli interne  
**FMF:** futur pli médian  
**FOF:** futur pli externe  
**g:** branchie  
**IF:** pli interne  
**lp:** palpes labiaux  
**lpp:** primordia de palpes labiaux  
**mct:** voie ciliée marginale  
**MF:** pli médian  
**mrt:** voie de rejet marginale  
**OF:** pli externe  
**pam:** muscle adducteur postérieur  
**pct:** voie marginale postérieure de collecte  
**pf:** pseudofeces  
**pg:** sillon périostracal  
**rct:** voie radiale ciliée  
**sc:** cils simples  
**v:** velum



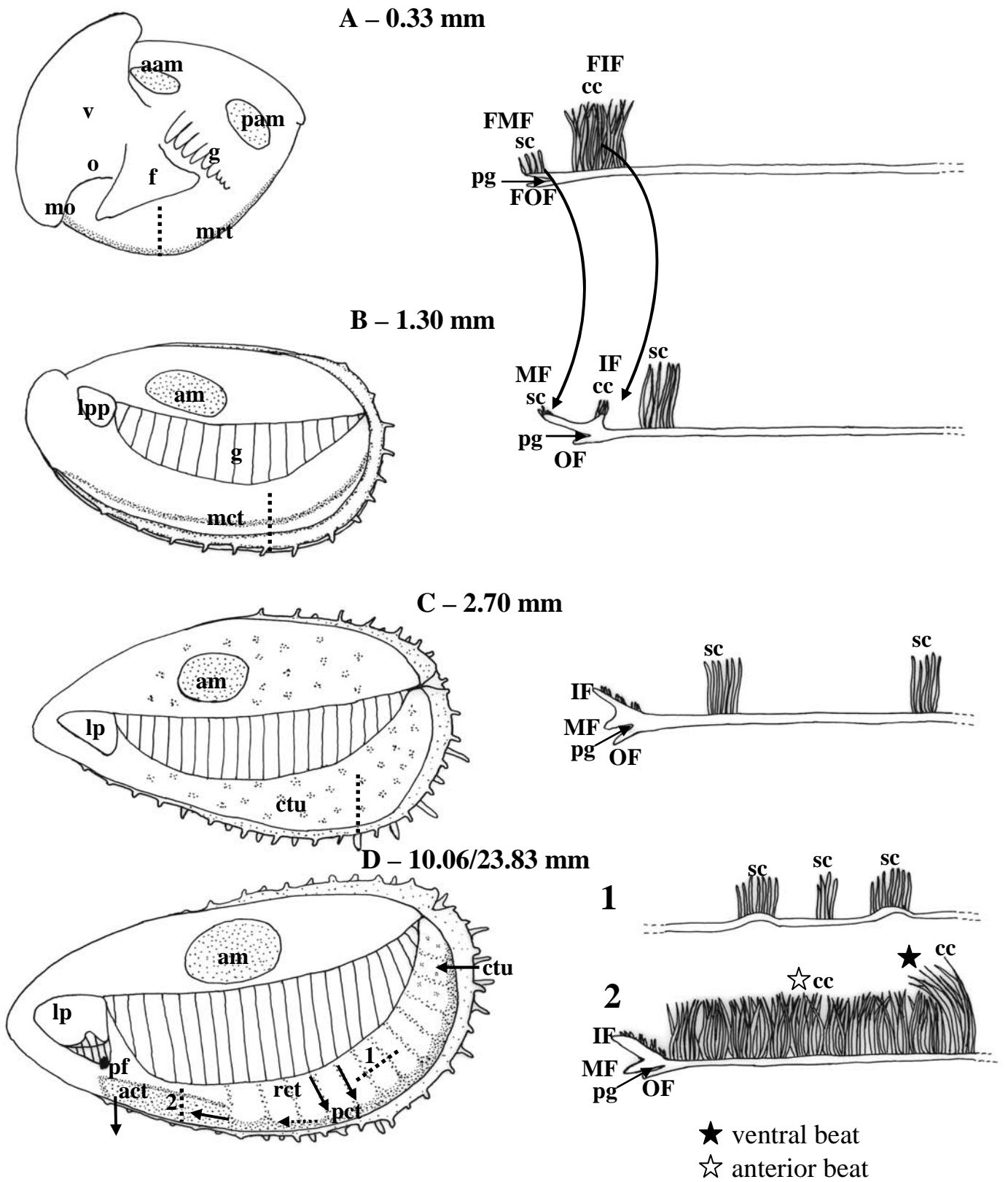


Figure 36. *Crassostrea gigas* - summary diagram of mantle ciliation throughout development.

### 3.6 Synthèse

---

Au cours des quatre études présentées dans ce chapitre, concernant la mise en place des structures palléales impliquées dans le traitement des particules chez *Crassostrea gigas*, les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la lenteur du développement de ces structures par rapport à d'autres Bivalves étudiés jusqu'alors. En effet, le développement complet de la branchie pseudolamellibranche hétérorhabdique n'a pas été observé avant 2,4 cm de taille de coquille (Tableau 15 – partie 3.3), soit avant 22 semaines dans les conditions d'élevage définies. Une différenciation simultanée des lamelles ascendantes et descendantes des demibranches externes et internes a été observée et un processus de "cavitation – extension" a ainsi été décrit, radicalement différent du processus d' "élongation – réflexion" constaté chez les Pectinidés (Kingzett, 1993; Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003), famille de Bivalves possédant également une branchie hétérorhabdique.

Entre 0,29 mm, taille à laquelle les premiers bourgeons de filaments branchiaux ont été observés, et 2,4 cm de taille de coquille, les caractéristiques de la branchie pseudolamellibranche hétérorhabdique de l'huître adulte se sont mis en place progressivement (partie 3.3). Tous les types de cils rencontrés à la surface frontale des filaments ordinaires des adultes (cils latéraux, cils latéro-frontaux, cils frontaux épais et cils frontaux fins) ont ainsi été observés chez les individus dès 2,7 mm (Tableau 15 – partie 3.3). La mise en place des jonctions tissulaires branchiales, caractéristiques des pseudolamellibranches, en revanche, s'est effectuée entre 1,3 mm et 2,4 cm de taille de coquille, avec la formation des jonctions ventrales, des jonctions interfilamentaires et interlamellaires, puis des jonctions intraplis. D'un point de vue architectural, le plissement progressif de la branchie, conférant un aspect tri-dimensionnel aux lamelles branchiales, s'est effectué entre 7,5 mm et 2,4 cm de taille de coquille, avec la différenciation simultanée des filaments principaux (Tableau 15 – partie 3.3).

D'un point de vue fonctionnel, les cils latéraux et les cils frontaux, permettant de créer les courants d'eau à travers la branchie et permettant de capturer / transporter des particules à la surface des filaments branchiaux, ont été les premières structures différenciées, assurant ainsi les bases de l'alimentation suspensivore après la fixation et la métamorphose (Tableau 15 – partie 3.3). Si la capacité d'alimentation suspensivore semble acquise relativement rapidement, dans les 2 jours suivant la métamorphose, en revanche les mécanismes qui la régissent ne cessent d'évoluer jusqu'au développement complet de la branchie. En effet, la branchie étant homorhabdique jusqu'à 7,5 mm de taille de coquille,

aucune sélection des particules basée sur leur taille ne peut avoir lieu sur cet organe. A partir de 7,5 mm de taille de coquille, la différenciation progressive des filaments principaux (partie 3.3), ainsi que la spécialisation fonctionnelle des filaments ordinaires formant les plis (partie 3.4), tend progressivement vers la condition hétérorhabdique observée chez l'adulte (Tableau 15), avec une possibilité de tri des particules basé sur leur taille, commençant entre 1 et 2,4 cm de taille de coquille. Au stade ultime du développement de la branchie, les filaments apicaux des plis branchiaux et les filaments principaux participent essentiellement au traitement des particules, les premiers transportant les particules ventralement, les seconds les transportant dorsalement (parties 3.2 et 3.4). Les filaments latéraux des plis ne jouent alors qu'un rôle mineur dans le traitement des particules et assurent des fonctions alternatives comme l'augmentation de la surface respiratoire et de la surface de filtration, le maintien de la forme structurale des plis et l'isolement des voies de transport ventrale et dorsale (partie 3.2). De plus, il a été montré chez les adultes grâce à l'histochimie et à la cartographie des mucocytes, que seules les voies médianes frontales des filaments apicaux des plis intervenaient dans le transport ventral des particules (partie 3.2), en raison de la longueur des cils frontaux épais de la voie médiane frontale et des cirres latéro-frontaux par rapport à la longueur des cils frontaux fins des voies latérales frontales. Etant donné que les cirres latéro-frontaux sont différenciés dès 2,7 mm et que les cils frontaux fins et les cils frontaux épais ont été observés dès 0,42 mm (Tableau 15 – partie 3.3), les voies latérales frontales interviennent peut-être dans le traitement des particules entre 0,42 et 2,7 mm de taille de coquille, malgré la faible longueur de ces cils (partie 3.3).

En ce qui concerne la surface palléale du manteau, une voie de rejet marginale ciliée a été décrite chez les larves pédivéligères et permettrait le rejet des particules vers l'extérieur de la cavité palléale (Tableau 15 - partie 3.5). Cette voie donne naissance ensuite au pli interne du bord du manteau, alors qu'une nouvelle voie marginale ciliée apparaît chez les post-larves de 1,3 mm pour disparaître ensuite. Une ciliature de transition, composée de touffes éparses de cils simples, lui succède, ne permettant pas le transport de particules à la surface du manteau. La mise en place du système complet de voies de rejet radiales, caractéristiques des Ostréidés, s'effectue ensuite entre 2,9 mm et 1 / 2,4 cm de taille de coquille, donc relativement lentement également, et la pleine fonctionnalité du système de voies de rejet radiales n'est pas acquise avant cette taille. Ce système de voies de rejet radiales, décrit par Beninger & Veniot (1999) chez *C. gigas* et *Crassostrea virginica*, chez des individus de 9 à 30 mm de taille de coquille, s'avère être complété par une voie de collecte

marginale, située sur le bord ventral de la surface infrabrancheiale du manteau (partie 3.5). Cette voie de collecte permettrait le rejet préférentiel des pseudofeces du côté antérieur de l'animal, ceux-ci étant transportés postéro-antérieurement. Ainsi les pseudofeces sont rejetés non pas à contre courant, comme c'est le cas chez *Mytilus edulis*, *Mya arenaria* et *Spisula solidissima* (Beninger *et al.*, 1999), mais dans le sens des courants palléaux, alors qu'ils sont d'abord transportés à contre-courant sur les voies radiales de rejet (Beninger *et al.*, 1999). La partie antérieure de la voie marginale de collecte étant située au niveau des palpes labiaux, le dépôt des pseudofeces formés lors de la sélection pré-ingestive effectuée par les palpes labiaux serait possible directement sur cette voie (partie 3.5). Le système complet de voies de rejet du manteau permet le transport et l'évacuation des pseudofeces issus à la fois de la sélection pré-ingestive réalisée sur la branchie (à partir des stades hétérorhabdiques fonctionnels) et sur les palpes labiaux. La mise en place des tentacules, jouant un rôle de premier "filtre" (Waller 1975; Palmer & Williams, 1980; Beninger, 1991), a également été notée vers 1,3 mm et une différenciation nette, antéro-postérieure, des plis du bord du manteau et de leurs tentacules a été observée dès 2,9 mm, facilitant très probablement l'évacuation des pseudofeces à partir de la voie marginale antérieure de collecte. Peu étudiés au cours de ces différents travaux concernant le développement, les palpes labiaux, dernière structure impliquée dans le traitement des particules chez les huîtres, ont été observés comme étant anatomiquement fonctionnels vers 2,9 mm de taille de coquille (partie 3.5 – Tableau 15). A partir de cette taille, une sélection pré-ingestive peut donc avoir lieu au niveau des palpes labiaux, ce qui représente une étape clé étant donné la forte turbidité des milieux dans lesquels sont généralement rencontrées les huîtres.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces études du développement de *C. gigas* ont permis de suivre l'acquisition de la capacité de traitement des particules chez les jeunes stades. Lors de l'étude anatomique du développement de la branchie (partie 3.3), une terminologie simple avait été adoptée. Ainsi le terme "larve" se référait aux stades pélagiques (jusqu'à environ 0,35 mm de taille de coquille), et le terme "juvénile" qualifiait les stades benthiques fixés jusqu'à l'acquisition d'une branchie complètement développée (jusqu'à environ 2,4 cm de taille de coquille) (partie 3.3). Les données complémentaires sur le développement acquises lors de l'étude de la ciliature du manteau (partie 3.5) ont conduit à adopter une terminologie plus nuancée. En effet, le terme "juvénile" semblait alors inapproprié pour qualifier des individus avec une branchie constituée uniquement des demibranchies internes, sans palpes labiaux réellement développés et avec une ciliature

palléale du manteau désorganisée (parties 3.3 et 3.5). Le terme "post-larve" a ainsi été retenu pour désigner les jeunes stades jusqu'à 2,7 mm de taille de coquille (inclus), alors que le terme "juvénile" a été employé au delà de 2,7 mm et jusqu'à 2,4 cm. Au delà de cette taille, toutes les structures palléales responsables du traitement des particules chez l'huître ont acquis leur pleine fonctionnalité.

Les réorganisations anatomiques et cellulaires observées au cours du développement (Tableau 15), en raison de l'absence de fonctionnalité ou de fonctionnalité partielle des structures palléales impliquées dans le traitement des particules chez *C. gigas*, ont permis de mettre en évidence plusieurs "stades critiques" pour les individus, selon la terminologie habituellement employée dans les études concernant le développement des Bivalves (Kingzett, 1993; Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003). En ce qui concerne le développement de la branchie, trois stades ont été identifiés comme potentiellement critiques:

(1) le changement de structure responsable de l'alimentation suspensivore à la métamorphose, le velum chez les larves et la branchie chez les post-larves

(2) la formation des demibranchies externes conférant une forme en W à la branchie, initialement en forme de V et

(3) la transition d'une branchie homorhabdique plate vers une branchie hétérorhabdique profondément plissée à partir de 7,5 mm (Tableau 15).

Pour la surface palléale du manteau, un stade particulièrement critique a été identifié à partir de 1,3 mm jusqu'à 2,7 mm de taille de coquille, avec la réorganisation du système de rejet des pseudofeces sur le manteau et l'absence totale de fonctionnalité de la surface du manteau dans le transport des particules et donc dans le rejet des pseudofeces. Enfin, les palpes labiaux ne semblent être fonctionnels qu'à partir de 2,9 mm de taille de coquille, aucun tri pré-ingestif des particules ne peut être réalisé à ce niveau. Ainsi le stade 2,7 mm de taille de coquille apparaît comme particulièrement critique pour les post-larves car aucune voie de rejet ne permet d'évacuer les pseudofeces, les palpes labiaux ne sont pas encore fonctionnels, et le coût métabolique engendré par la formation rapide des demibranchies externes est probablement élevé, même si cela permet le doublement de la surface disponible pour la filtration, la respiration et le traitement des particules. Dès 2,9 mm de taille de coquille, la fonctionnalité structurale des palpes labiaux permet une sélection pré-ingestive, alors que ce n'est probablement qu'entre 1 et 2,4 cm de taille de coquille qu'une sélection pré-ingestive est

possible au niveau de la branchie, grâce à la présence de plis branchiaux profonds. Les juvéniles ne présentent des structures palléales complètement développées qu'à 2,4 cm, taille à laquelle la branchie, les palpes labiaux et la surface palléale du manteau ont acquis leur pleine fonctionnalité.

**Tableau 15.** Synthèse du développement des structures palléales responsables de l'alimentation suspensivore chez l'huître adulte *Crassostrea gigas*. DE: demibranchie externe, DI: demibranchie interne, FP: filaments principaux.

Taille	Développement de la branchie	Développement du manteau	Développement des palpes labiaux
0,29 mm	Premiers bourgeons branchiaux (DI)	Voie de rejet marginale larvaire	
0,33 mm	Premiers filaments branchiaux (DI)		
0,42 mm	Cils frontaux et latéraux; alimentation suspensivore assurée par la branchie		Début de formation des palpes labiaux
1,3 mm		Ré-organisation de la ciliature du manteau Voie ciliée marginale éphémère	
2,7 mm	Formation rapide des DE Cirres latéro-frontaux	Ciliature désorganisée (pas de voie de rejet)	
2,9 mm		Système de voies radiales de rejet partiel	Palpes labiaux fonctionnels
7,5 mm	Différenciation des FP Initiation du plissement Spécialisation mucocytaire des filaments branchiaux		
1 cm	Plissement progressif		
2,4 cm	Plissement complet (jonctions intra-plis) Filaments apicaux des plis principalement impliqués dans le transport ventral	Système de voies radiales de rejet complet	

## **Conclusion générale**



L'objectif général des études exposées dans le présent ouvrage était l'amélioration des connaissances fondamentales des caractéristiques de la reproduction, du développement, et de la relation entre reproduction et développement (performances des élevages larvaires et post-larvaires) chez les deux Mollusques étudiés, ceux-ci ayant pour point commun de présenter un intérêt économique lié à leurs bioproductions, définies en terme de biomasse ou de production de substances actives.

Lors de l'étude du cycle reproducteur de *Megathura crenulata* à l'aide de l'histologie et de la stéréologie (partie 1.2), certaines caractéristiques de la reproduction de cet archéogastropode ont été dégagées, notamment la structure des gonades, avec une différenciation centrifuge des gamètes à partir du tissu trabéculaire. Aucun individu hermaphrodite simultané n'ayant été rencontré au cours de l'année de prélèvement, sur les 48 individus prélevés, cette espèce est soit gonochorique, ce qui est cas de la plupart des Prosobranches, soit hermaphrodite successive. La mise en évidence d'un éventuel hermaphrodisme successif nécessiterait en revanche des échantillonnages d'individus beaucoup plus conséquents et à long terme, avec par exemple le suivi dans une population d'individus marqués sur lesquels des biopsies de tissu gonadique permet l'identification du sexe sur plusieurs années.

Cette étude a également montré les limites de l'histologie et de la stéréologie, techniques pourtant habituellement employées pour l'étude des cycles reproducteurs des Mollusques. En effet, tout au long de l'année de prélèvement, les gonades mâles et femelles ont présenté des profils matures. De la même façon, les ovocytes gainés des femelles montraient un diamètre très stable au cours de cette même période. Les résultats obtenus n'ont ainsi pas permis de suivre la maturation des gamètes et d'identifier la période d'imminence de la ponte, ce qui était pourtant un des buts principaux de cette étude, étant donné l'objectif d'élevage de ce Mollusque.

L'histochimie s'est révélée être une technique efficace dans l'identification de la nature chimique de la gangue des ovocytes et a permis de montrer que celle-ci était principalement constituée de mucopolysaccharides acides, composés présentant des propriétés liées à l'écologie de cette espèce (partie 1.2). Les mucopolysaccharides acides apportent ainsi une protection mécanique aux ovocytes puis aux œufs. Très cohésifs, ils empêchent leur dispersion tout en permettant les échanges métaboliques. Ils possèdent des propriétés anti-microbiennes. Enfin, leur forte densité permet de maintenir les masses d'ovocytes près du substrat en compensant la flottabilité due aux grandes quantités de lipides mises en évidence dans leur cytoplasme. Présumée puis confirmée à l'aide de colorations lipo-spécifiques (partie

1.3), la nature lipidique des réserves ovocytaires a également été mise en évidence, permettant d'envisager la possibilité d'utiliser ces techniques alternatives pour poursuivre l'étude du cycle reproducteur des femelles de *M. crenulata*, mais également pour permettre la localisation de la période de ponte, notamment dans le contexte d'élevages.

A l'issue de ces études, plusieurs perspectives sont envisageables. Par exemple le calcul des indices gono-somatiques permettrait très probablement de suivre la gonadogenèse, la maturation et le stockage des gamètes, étant donné que lors des dissections effectuées pour les prélèvements des gonades, des différences visuelles de volume gonadique ont été observées tout au long de la période d'étude (Blin & Pien, SMEL, comm. pers.). Des dosages biochimiques des principaux constituants des tissus (glucides, lipides et protéines) fourniraient également des informations sur la maturation des gamètes, notamment des ovocytes. De plus ces dosages ne nécessitant que peu de matériel tissulaire, les prélèvements pourraient se limiter à des biopsies, n'entraînant pas le sacrifice d'un grand nombre d'individus. Finalement, il serait intéressant d'explorer davantage l'utilisation des colorations lipo-spécifiques sur les ovocytes, les résultats obtenus dans la partie 1.3 ayant montré une application éventuelle dans le cadre d'un élevage, ces expérimentations ne nécessitant également que peu de matériel.

Les études réalisées chez la deuxième espèce de Mollusque, l'huître *Crassostrea gigas*, malgré l'abondance des travaux antérieurs concernant sa biologie, ont également apporté des résultats fondamentaux et originaux. Dans le premier chapitre plus particulièrement consacré à l'aspect "Reproduction" et concernant l'expérimentation de techniques de colorations lipo-spécifiques pour l'évaluation de la qualité des ovocytes, malgré la répliquabilité de la coloration à l'ORO, des résultats infructueux ont été obtenus lors des tentatives de discrimination des ovocytes selon l'intensité de leur coloration et / ou leurs teneurs en lipides (partie 1.3). Ces résultats en plus de ceux obtenus dans le chapitre "Relation entre reproduction et développement chez l'huître *Crassostrea gigas*", et de ceux publiés notamment par Chávez-Villaba *et al.* (2002, 2003a, b) suggèrent que les ovocytes produits par les femelles de *C. gigas* sont toujours de bonne qualité comme l'attestent les performances des élevages larvaires et post-larvaires réalisés ultérieurement. Il semble ainsi qu'il y ait une régulation au niveau de la fécondité des femelles plutôt qu'au niveau de la qualité des ovocytes produits. Ainsi, lors de l'étude des effets du jeûne lors du conditionnement des géniteurs de *C. gigas* les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence un effet négatif de la période de jeûne sur la qualité des ovocytes et les performances ultérieures des élevages (partie 2.2). Etant donné que l'approche individuelle adoptée pour les

expérimentations n'a pas permis d'estimer la fécondité des femelles utilisées, il serait intéressant d'étudier les effets du jeûne sur la fécondité des femelles. Ceci permettrait ainsi de confirmer qu'un apport minimum ou nul de nourriture n'est pas dommageable lorsque les conditionnements sont réalisés en période favorable, et d'économiser le coût important de la production de micro-algues fourrages durant cette période de l'année. Les critères de qualité des ovocytes choisis, définis en termes de "prédicteurs" et de "validateurs" dans le 2<sup>ème</sup> chapitre, ont été considérés comme valides et utilisables pour l'évaluation de la qualité des ovocytes produits par les femelles. En effet, les bons résultats obtenus lors des fécondations et des élevages larvaires et post-larvaires ultérieurs étaient en adéquation avec les "prédicteurs" permettant de présumer de la bonne qualité des ovocytes, à savoir leur taille, leur teneur en lipides et leur degré de maturité. Ces différents critères peuvent ainsi être utilisés dans des programmes de sélection de géniteurs.

Si les écloséries sont relativement performantes et que les conditions zootechniques pour la production de larves, post-larves et juvéniles de *C. gigas* ont été rendues optimales, les connaissances fondamentales du développement des structures palléales responsables de l'alimentation suspensivore chez les jeunes stades de cette espèce demeuraient limitées. Les études présentées dans le 3<sup>ème</sup> chapitre du présent ouvrage ont permis d'améliorer ces connaissances, d'évaluer la fonctionnalité potentielle de ces structures au cours du développement, mais également de dégager un certain nombre de stades apparaissant comme critiques au cours du développement grâce à deux approches complémentaires, anatomique et histologique. Les résultats obtenus ont montré que la capacité complète de traitement des particules n'était pas atteinte avant 2,4 cm de taille de coquille et donc que le développement de la branchie et du manteau était relativement lent chez cette espèce (parties 3.3, 3.5 et 3.6).

L'étude anatomique du développement de la branchie, de la larve à l'adulte, a permis de documenter l'ontogenèse des voies ciliées et les types ciliaires rencontrés sur les filaments branchiaux, la mise en place des différents types de jonctions tissulaires caractéristiques des pseudolamellibranches, ainsi que la formation des filaments principaux, à partir de la fusion d'un triplet de filaments ordinaires, permettant l'acquisition de la condition hétérorhabdique. Par ailleurs, l'étude histologique de la branchie des juvéniles a montré que la spécialisation cellulaire des filaments branchiaux précédait leur fonctionnalité anatomique (partie 3.4). En effet, alors que la branchie peut encore être considérée comme homorhabdique, vers 7,5 mm de taille de coquille, l'hétérogénéité de la distribution des mucocytes sur les filaments branchiaux formant les futurs plis est déjà très marquée, à la faveur des filaments apicaux des plis, localisés au niveau de la crête des plis. De la même façon, cette hétérogénéité de la

distribution des mucocytes a été constatée chez les adultes de *C. gigas* (partie 3.2). Les filaments apicaux apparaissent alors comme les principaux sites de traitement des particules sur les plis branchiaux alors que les filaments latéraux semblent accomplir des fonctions alternatives comme le maintien de la forme des plis, l'augmentation de la surface de filtration / respiration et la séparation des voies de transport dorsales et ventrales des particules. Utilisée pour la première fois à fine échelle (partie 3.2), la cartographie des mucocytes a également permis de mettre en évidence que seule la voie médiane frontale des filaments ordinaires, constituée de cils apparemment composites, était impliquée dans le transport des particules sur les plis branchiaux chez *C. gigas*. Les voies médianes frontales, constituées de cils simples et beaucoup plus courts, participeraient alors à la création des courants palléaux dirigés dorsalement.

L'étude anatomique de la ciliature de la surface palléale du manteau a montré l'existence d'une voie de rejet marginale chez les larves (partie 3.5). Cette voie, persistant chez les jeunes post-larves, donne ensuite naissance au pli interne du bord du manteau. Une nouvelle voie marginale ciliée, n'assurant probablement aucune fonction de rejet, a été observée chez les post-larves de 1,3 mm. La ciliature observée sur le manteau des post-larves de 2,7 mm est constituée de touffes de cils éparses, et aucun système de rejet des pseudofeces n'a été observé à ce stade du développement. De 2,9 mm à 2,4 cm de taille de coquille, le système complet de voies radiales de rejet, caractéristique des huîtres, se met en place progressivement. Les voies radiales de rejet, ainsi que la voie marginale antérieure de collecte des pseudofeces, sont observées dès 2,9 mm de taille de coquille. La voie marginale antérieure de collecte des pseudofeces, située au niveau des palpes labiaux, permettrait alors d'évacuer les pseudofeces déposés par les palpes labiaux du côté antérieur de l'animal. Une voie marginale postérieure de collecte des pseudofeces, contiguë à la voie marginale antérieure, a également été mise en évidence chez des individus de 2,4 cm, formée par l'élargissement et la fusion des voies radiales de rejet vers le bord ventral du manteau. Les pseudofeces résultant du tri pré-ingestif réalisé sur la branchie pourraient ainsi être transportés postéro-antérieurement sur le bord ventral du manteau puis être évacués à l'extérieur de la coquille, du côté antérieur de l'animal.

L'ensemble des résultats obtenus au cours des études portant sur le développement ont permis de mettre en évidence trois stades potentiellement critiques: (1) le changement de structure responsable de l'alimentation suspensivore (le velum chez les larves, puis la branchie après la fixation et la métamorphose) entre 0,33 et 0,42 mm de taille de coquille, (2) la formation des demibranchies externes ainsi que l'absence de système de rejet des

pseudofeces vers 2,7 mm de taille de coquille et (3) l'initiation la condition hétérorhabdique vers 7,5 mm de taille de coquille. Les jeunes stades seraient ainsi plus vulnérables à ces périodes de leur développement, dans le milieu naturel mais également en éclosion / nurserie.

Les données fondamentales collectées lors de l'étude du développement de la branchie et du manteau ont également permis de dégager certaines informations concernant l'évolution de la branchie chez les Bivalves (parties 3.3 et 3.5). En effet les lames branchiales se forment de manière complètement différente chez les Pectinidés et les Ostréidés. Chez les Pectinidés, hétérorhabdiques filibranches, la formation des lames ascendantes et descendantes s'effectue selon un processus d'"élongation-réflexion", la réflexion conduisant à la formation de la lame ascendante (Kingzett, 1993; Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003). Chez les Ostréidés, hétérorhabdiques pseudolamellibranches, les lames ascendantes et descendantes se forment simultanément selon un processus de "cavitation-extension" radicalement différent (Cannuel & Beninger, 2006; partie 3.3; micrographies de Chaparro *et al.*, 2001). Les Pectinidés et les Ostréidés semblent ainsi avoir évolué parallèlement vers la condition hétérorhabdique qui les caractérise à partir de la condition plésiomorphe homorhabdique filibranche. En ce qui concerne le manteau, les voies radiales de rejet des pseudofeces présentes sur la surface palléale du manteau n'ont été observées jusqu'à présent que chez des Ostréidés (Beninger & Veniot, 1999; Beninger *et al.*, 1999). Les Pectinidés ne présentent aucune voie de rejet ciliée à la surface du manteau, évacuant les pseudofeces par claquement des deux valves. La majorité des espèces de Bivalves étudiées possèdent une voie unique de rejet des pseudofeces qui dériverait de la voie de rejet présente au stade larvaire (Carriker, 2001). Dans la partie 3.5 (Beninger & Cannuel, sous presse), il a été montré que cette voie de rejet larvaire devenait le pli interne du bord du manteau et que le système de voies de rejet radiales se mettait en place progressivement ensuite, ce qui suggère que ce système de voies de rejet radiales est un nouveau caractère évolutif caractéristique des Ostréidés.

A la vue des résultats obtenus lors des études présentées dans le présent ouvrage, plusieurs perspectives se dégagent. D'un point de vue évolutif, il serait particulièrement intéressant de documenter la formation des filaments principaux chez les Pectinidés. En effet, dans les précédentes études concernant leur développement (Kingzett, 1993; Beninger *et al.*, 1994; Veniot *et al.*, 2003), l'observation des expansions dorsales respiratoires a permis de détecter leur différenciation sur la branchie, mais leur formation n'a pas été décrite. La branchie des Pectinidés étant filibranche, seules des jonctions ciliaires permettent le maintien de la cohésion de la branchie et il n'existe donc aucune forme de jonction ou de fusion tissulaire sur la branchie. Etant donné que chez *C. gigas*, un filament principal se forme à

partir d'un triplet de filaments ordinaires qui fusionnent, il est probable que la formation d'un filament principal soit très différente chez les Pectinidés. D'une manière générale, il serait également intéressant de documenter le développement de la branchie chez les Autobranches, en étudiant les homorhabdiques filibranches, tels que *Mytilus sp.*, et les eulamellibranches.

D'un point de vue fonctionnel, il serait également pertinent d'étudier l'apparition et l'évolution de la capacité de sélection des particules sur la branchie à l'aide d'expérimentations écophysiologiques en relation avec l'acquisition de la condition hétérorhabdique chez *C. gigas*, car les plis branchiaux, permettant une sélection des particules basée sur leur taille chez les adultes, se forment progressivement entre 7,5 mm et 2,4 cm de taille de coquille. L'étude anatomique et histologique / histochimique de la différenciation des palpes labiaux serait également un axe de recherche intéressant, étant donné que cette structure a été moins étudiée dans le présent ouvrage, en comparaison avec la branchie et la surface palléale du manteau.

# **Bibliographie**

## - A -

- Agreste. 2003. Premier recensement de la conchyliculture. L'huître: perle de l'élevage conchylicole. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Agreste Primeur, N° 126.
- Allen SK, Bushek D. 1992. Large-scale production of triploid oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using "stripped" gametes. *Aquaculture* 103: 241-251.
- Alonzo F, Mayzaud P. 1999. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile Red. *Mar Chem* 67: 289-301.
- Arcos FG, Ibarra AM, Palacios E, Vazquez-Boucard C, Racotta IS. 2003. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. *Aquaculture* 228: 151-165.
- Asmus H, Asmus R M. 1993. Phytoplankton-mussel bed interactions in intertidal ecosystems. In: Dame RF (ed). *Bivalve filter feeders in estuarine and coastal ecosystem processes*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 57-84.
- Atkins D. 1937a. On the ciliary mechanisms and interrelationships of lamellibranchs. Part II. Sorting devices on the gills. *Q J Microsc Sci* 79: 339-373.
- Atkins D. 1937b. On the ciliary mechanisms and interrelationships of lamellibranchs. Part III. Types of lamellibranch gills and their food currents. *Q J Microsc Sci* 79: 375-421.
- Atkins D. 1938. On the ciliary mechanisms and interrelationships of lamellibranchs. Part VII. Latero-frontal cilia of the gill filaments and their phylogenic value. *Q J Microsc Sci* 80: 346-430.
- Auffret M, Duchemin M, Rousseau S, Boutet I, Tanguy A, Moraga D, Marhic A. 2004. Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the "Erika" oil spill. *Aquat Living Res* 17: 297-302.

## - B -

- Baker SM, Mann R. 1994a. Description of metamorphic phases in the oyster *Crassostrea virginica* and effects of hypoxia on metamorphosis. *Mar Ecol Prog Ser* 104: 91-99.
- Baker SM, Mann R. 1994b. Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) and the effects of hypoxia on post-settlement ingestion rates. *J Exp Mar Biol Ecol* 181: 239-253.
- Barber BJ, Blake N. 1991. Reproductive Physiology. In: Shumway SE (ed). *Scallops: biology, ecology, and aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 377-428.



- Barillé L, Prou J, Héral M, Razet D. 1997. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Exp Mar Biol Ecol* 212: 149-172.
- Barlett BR. 1979. Biochemical changes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) during larval development and metamorphosis. *Proc Nat Shellfish Assoc* 69: 202.
- Barnaud A. 2001. Etude de la dynamique du parasite *Marteilia refringens* chez son hôte *Ostrea edulis*. Thèse Nationale Vétérinaire, Nantes.
- Barnes RSK, Hughes RN. 1988. An introduction to marine ecology, 2<sup>nd</sup> edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Bayne BL. 1971. Some morphological changes that occur at the metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis*. In: Crisp DJ (ed). 4<sup>th</sup> European Marine Biology Symposium. Cambridge University Press, London, pp. 259-280.
- Bayne BL. 1976. Aspects of reproduction in Bivalve molluscs. In: Wiley ML (ed). Estuarine processes, Academic Press, New York, pp. 432-448.
- Bayne BL, Bubel A, Gabbott PA, Livingstone DR, Lowe DM, Moore MN. 1982. Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. *Mar Biol Lett* 3: 89-105.
- Beninger PG. 1987. A qualitative and quantitative study of the reproductive cycle of the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, in the Bay of Fundy (New Brunswick, Canada). *Can J Zool* 65: 495-498.
- Beninger PG. 1991. Structures and mechanisms of feeding in scallops: paradigms and paradoxes. In: Shumway SE, Sandifer P (eds). An International Compendium of Scallop Biology and Culture. World Aquaculture Workshops, No. 1. Baton Rouge. LA: The World Aquaculture Society, pp. 331-340.
- Beninger PG. 2000. Limits and constraints: A comment on promises and methods in recent studies of particle capture mechanisms in bivalves. *Limnol Oceanogr* 45: 1196-1199.
- Beninger PG, Decottignies P. 2005. What makes diatoms attractive for suspensivores? The organic casing and associated organic molecules of *Coscinodiscus perforatus* are quality cues for the bivalve *Pecten maximus*. *J Plankton Res* 27: 11-17.
- Beninger PG, Dufour SC. 1996. Mucocyte distribution and relationship to particle transport on the pseudolamellibranch gill of *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae). *Mar Ecol Prog Ser* 137: 133-138.
- Beninger PG, Dufour SC. 2000. Evolutionary trajectories of a redundant feature: lessons from bivalve gill abfrontal cilia and mucocyte distributions. In: Harper EM, Taylor JD, Crame JA (eds). The evolutionary biology of the Bivalvia. Geological Society, London, Special Publications 177: 273-278.
- Beninger PG, Larocque R. 1998. Gonopod tegumental glands: a new accessory sex gland in the Brachyura. *Mar Biol* 132: 435-444.

- Beninger PG, Lucas A. 1984. Seasonal variation in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). *J Exp Mar Biol Ecol* 79: 19-37.
- Beninger PG, St-Jean SD. 1997a. The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: unifying principles. *Mar Biol* 129: 389-397.
- Beninger PG, St-Jean SD. 1997b. Particle processing on the labial palps of *Mytilus edulis* and *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia). *Mar Ecol Prog Ser* 147: 117-127.
- Beninger PG, Veniot A. 1999. The oyster proves the rule: mechanisms of pseudofeces transport and rejection on the mantle of *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *Mar Ecol Prog Ser* 190: 179-188.
- Beninger PG, Le Pennec M, Donval A. 1991. Mode of particle ingestion in five species of suspension-feeding bivalve molluscs. *Mar Biol* 108: 255-261.
- Beninger PG, Ward JE, MacDonald BA, Thompson RJ. 1992. Gill function and particle transport in *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia) as revealed using video endoscopy. *Mar Biol* 114: 281-288.
- Beninger PG, St-Jean SD, Poussart Y, Ward JE. 1993. Gill function and mucocyte distribution in *Placopecten magellanicus* and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia): the role of mucus in particle transport. *Mar Ecol Prog Ser* 98: 275-282.
- Beninger PG, Dwiono SAP, Le Pennec M. 1994. Early development of the gill and implications for feeding in *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *Mar Biol* 119: 405-412.
- Beninger PG, St-Jean SD, Poussart Y. 1995a. Labial palps of the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *Mar Biol* 123: 293-303.
- Beninger PG, Potter TM, St-Jean SD. 1995b. Paddle cilia fixation artefacts in pallial organs of adult *Mytilus edulis* and *Placopecten magellanicus* (Mollusca, Bivalvia). *Can J Zool* 73: 610-614.
- Beninger PG, Lynn JW, Dietz TH, Silverman H. 1997a. Mucociliary transport in living tissue: the two-layer model confirmed in the mussel *Mytilus edulis* L. *Biol Bull* 193: 4-7.
- Beninger PG, Dufour SD, Bourque J. 1997b. Particle processing mechanisms of the eulamellibranch bivalves *Spisula solidissima* and *Mya arenaria*. *Mar Ecol Prog Ser* 150: 157-169.
- Beninger PG, Veniot A, Poussart Y. 1999. Principles of pseudofeces rejection on the bivalve mantle: integration in particle processing. *Mar Ecol Prog Ser* 178: 259-269.
- Beninger PG, Cannuel R, Blin J-L, Pien S, Richard O. 2001. Reproductive characteristics of the archaeogastropod *Megathura crenulata*. *J Shellfish Res* 20: 301-307.

- Beninger PG, Le Pennec G, Le Pennec M. 2003a. Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L.. Biol Bull 205: 83-92.
- Beninger PG, Dufour SC, Decottignies P, Le Pennec M. 2003b. Particle processing mechanisms in the archaic, peri-hydrothermal vent bivalve *Bathypecten vulcani*, inferred from cilia and mucocyte distributions on the gill. Mar Ecol Prog Ser 246: 183-195.
- Beninger PG, Decottignies P, Rincé Y. 2004. Localization of qualitative particle selection sites in the heterorhabdic filibranch *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). Mar Ecol Prog Ser 275: 163-173.
- Beninger PG, Cannuel R, Jaunet S. 2005. Particle processing on the gill plicae of the oyster *Crassostrea gigas*: fine-scale mucocyte distribution and functional correlates. Mar Ecol Prog Ser 295: 191-199.
- Bergé JP, Bourgougnon N, Alban S, Pojer F, Billaudel S, Chermann JC, Robert JM, Franz G. 1999. Antiviral and anticoagulant activities of a water-soluble fraction of the marine diatom *Haslea ostrearia*. Planta Med 65: 604-609.
- Berntsson KM, Jonsson PR, Wängberg SÅ, Carlsson AS. 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Aquaculture 154: 139-153.
- 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). Comp Biochem Physiol 125B: 359-369.
- Bourguet-Kondracki ML, Kornprobst JM. 2005. Marine pharmacology: potentialities in the treatment of infectious diseases, osteoporosis and Alzheimer disease. In: Le Gal Y, Ulber R (eds). Marine Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, Springer Verlag, Heidelberg, 97: 105- 132.
- Braet F, De Zanger R, Wisse E. 1997. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. J Microsc 186: 84-87.
- Briarty LG. 1975. Stereology: methods for quantitative light and electron microscopy. Sci Prog 62: 1-32.
- Bricelj VM, Ford SE, Borrero FJ, Perkins FO, Rivara G, Hillman RE, Elston RA, Chang J. 1992. Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. J Shellfish Res 11: 331-347.

## - C -

- Caers M, Coutteau P, Cure K, Morales V, Gajardo G, Sorgeloos P. 1999. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck). I. Fatty acid composition and lipid content of six organs. *Comp Biochem Physiol* 123B: 89-96.
- Caers M, Utting SD, Coutteau P, Millican PF, Sorgeloos P. 2002. Impact of the supplementation of a docosahexaenoic acid-rich emulsion on the reproductive output of oyster broodstock, *Crassostrea gigas* spat. *Mar Biol* 140: 1157-1166.
- Cannuel R, Beninger PG. 2005. Is oyster broodstock feeding always necessary? A study using oocyte quality predictors and validators in *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Res* 18: 35-43.
- Cannuel R, Beninger PG. 2006. Gill development, functional and evolutionary implications in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae). *Mar Biol*, DOI 10.1007/s00227-005-0228-6.
- Carbonnelle D, Pondaven P, Morançais M, Masse G, Bosch S, Jacquot C, Briand G, Robert JM, Roussakis C. 1999. Antitumor and antiproliferative effects of an aqueous extract from the marine diatom *Haslea ostrearia* (Simonsen) against solid tumors: lung carcinoma (NSCLC-N6), kidney carcinoma (E39) and melanoma (M96) cell lines. *Anticancer Res* 19: 621-624.
- Carriker MR. 2001. Embryogenesis and organogenesis of veligers and early juveniles. In: Kraeuter J, Castagna M (eds). *Biology of the Hard Clam*. Elsevier, New York, pp. 77-115.
- Carriker MR, Gaffney PM. 1996. A catalogue of selected species of living oysters (*Ostreacea*) of the World. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant Book, Maryland, pp. 1-18.
- Castagna M, Gibbons MC, Kurkowski K. 1996. Culture: application. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant Book, Maryland, pp. 675-690.
- Castell LL, Mann R. 1994. Optimal staining of lipids in bivalve larvae with Nile Red. *Aquaculture* 119: 89-100.
- Chaparro OR, Videla JA, Thompson RJ. 2001. Gill morphogenesis in the oyster *Ostrea chilensis*. *Mar Biol* 138: 199-207.
- Chauvaud L, Jean F, Ragueneau O, Thouzeau G. 2000. Long-term variation of the Bay of Brest ecosystem: benthic-pelagic coupling revisited. *Mar Ecol Prog Ser* 200: 35-48.
- Chávez-Villalba J, Mingant C, Cochard J-C, Le Pennec M. 2001. Gamétogenèse chez l'huitre *Crassostrea gigas* de l'Aber Benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis* 30: 1-12.

- Chávez-Villalba J, Pommier J, Andriamiseza J, Pouvreau S, Barret J, Cochard J-C, Le Pennec M. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214: 115-130.
- Chávez-Villalba J, Barret J, Mingant C, Cochard J-C, Le Pennec M. 2003a. Influence of timing of broodstock collection on conditioning, oocyte production, and larval rearing of the oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), at six production sites in France. *J Shellfish Res* 22: 465-474.
- Chávez-Villalba J, Cochard J-C, Le Pennec M, Barret J, Enríquez-Díaz M, Cáceres-Martínez C. 2003b. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *J Shellfish Res* 22: 721-731.
- Cheney DP, Macdonald BF, Elston RA. 2000. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J Shellfish Res* 19: 353-359.
- Chiffolleau JF, Chauvaud L, Amouroux D, Barats A, Dufour A, Pécheyran C, Roux N. 2004. Nickel and vanadium contamination of benthic invertebrates following the "Erika" wreck. *Aquat Living Res* 17: 273-280.
- Cloern JE. 1982. "Does the benthos control phytoplankton biomass in South San Francisco Bay?" *Mar Ecol Prog Ser* 9: 191-202.
- Cochard JC. 1980. Recherches sur les facteurs déterminant la sexualité et la reproduction chez *Haliotis tuberculata* L. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Cognie B. 2001. Alimentation de l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg): étude des mécanismes de sélection des particules et des processus rétroactifs entre le bivalve et les microalgues. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, France.
- Cognie B, Barillé L, Massé G, Beninger PG. 2003. Selection and processing of large suspended algae in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Ecol Prog Ser* 250: 145-152.
- Cole HA. 1937. Metamorphosis of the oyster *Ostrea edulis*. *Nature* 139: 413-414.
- Cole HA. 1938. The fate of the larval organs in the metamorphosis of the oyster *Ostrea edulis*. *J Mar Biol Assoc UK* 22: 469-484.
- Collet B, Boudry P, Thebault A, Heurtebise S, Morand B, Gérard A. 1999. Relationship between pre- and post-metamorphic growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 175: 215-226.
- Cranfield HJ. 1974. Observations on the morphology of the mantle folds of the pediveliger of *Ostrea edulis* L. and their function during settlement. *J Mar Biol Assoc UK* 54: 1-12.
- Croll NA. 1972. Energy utilization of infective *Ancylostoma tubaeforme* larvae. *Parasitology* 64: 355-368.

## - D -

- Dame RF. 1993. The role of bivalve filter feeder material fluxes in estuarine ecosystems. In: Dame RF (ed). Bivalve filter feeders in estuarine and coastal ecosystem processes. Springer-Verlag, Berlin, pp. 245-269.
- Daniel TL. 1981. Fish mucus: *in situ* measurements of polymer drag reduction. Biol Bull 160: 376-382.
- Daniels EW, Longwell AC, McNiff JM, Wolfgang RW. 1973. Ultrastructure of oocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Trans Amer Microsc Soc 92: 337-349.
- Dauvin JC. 1997. Les biocénoses marines et littorales françaises des Côtes atlantiques, Manche et Mer du Nord. Synthèse, menaces et perspectives. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Davies MS, Hawkins SJ. 1998. Mucus from marine Molluscs. Adv Mar Biol 34: 1-72.
- Delaunay F, Marty Y, Moal J, Samain J-F. 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. J Exp Mar Biol Ecol 163: 209-219.
- Deslous-Paoli J-M, Héral M, Berthomé J-P, Razet D, Garnier J. 1982. Reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* Thunberg dans le Bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981: aspects biochimiques et énergétiques. Rev Trav Inst Pech Marit 45: 319-327.
- Devauchelle N, Mingant C. 1991. Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. Aquat Living Res 4: 41-51.
- DeVlaming V, Grossman G, Chapman F. 1982. On the use of gonosomatic index. Comp Biochem Physiol 73A: 31-39.
- Dorange G, Le Pennec M. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St Brieuc. Mar Biol 103: 339-348.
- Dorange G, Paulet Y-M, Le Pennec M, Cochard J-C. 1989. Critères histologiques d'évaluation de la qualité des ovocytes émis par *Pecten maximus*. C R Acad Sci III Sci Vie 309: 113-120.
- Dubois S, Barillé L, Cognie B, Beninger PG. 2005. Particle capture and processing mechanisms in *Sabellaria alveolata* (Polychaeta: Sabellariidae). Mar Ecol Prog Ser 301: 159-171.
- Dufour SC, Beninger PG. 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. Mar Biol 138: 295-309.
- Dufour SC, Steiner G, Beninger PG. sous presse. Phylogenetic analysis of the peri-hydrothermal vent bivalve *Bathypecten vulcani* based on 18S rRNA. Malacologia.

## - E -

- Eble AF, Scro R. 1996. General anatomy. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). The Eastern oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, Maryland, pp. 19-73.
- Elsley CR. 1935. On the structure and function of the mantle and gill of *Ostrea gigas* (Thunberg) and *O. lurida* (Carpenter). Trans R Soc Can 29 Sec V: 131-158 + 5 pl.
- Elston RA. 1980. Functional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval American oyster, *Crassostrea virginica*. Proc Natl Shellfish Assoc 70: 65-93.
- Elston RA. 1996. International trade in live molluscs: perspectives from the Americas. Rev Sci Tech Off Int Epiz 15: 483-490.

## - F -

- FAO. 2005. Total production 1950-2003. Aquaculture production: values 1984-2003. Fishstat Plus 2.30. Food and Agricultural Organisation, United Nations, Rome.
- Faulkner DJ. 1998. Marine natural products. Nat Prod Rep 15: 113-158.
- Faulkner DJ. 2000. Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). Nat Prod Rep 17: 1-6.
- Fleury PG, Goyard E, Mazurié J, Claude S, Bouget J-F, Langlade A, Le Coguic Y. 2001. The assessing of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) rearing performances by the IFREMER/REMORA network: method and first results (1993-98) in Brittany (France). Hydrobiologia 465: 195-208.
- Forbes TL, Lopez GR. 1989. Determination of critical periods in ontogenetic trajectories. Funct Ecol 3: 625-632.
- Freere RH. 1967. Stereologic techniques in microscopy. J R Microsc Soc 87: 25-34.
- Fretter V. 1984. Prosobranchs. In: Tompa AS, Verdonk NH, van den Biggelaar JAM (eds). The Mollusca, vol. 7 : Reproduction. : Academic Press, Orlando, Inc, pp. 1-45.
- Fretter V, Graham A. 1964. Reproduction. In: Wilbur KM, Yonge CM (eds). Physiology of Mollusca, vol. 1. New York, London: Academic Press. pp. 127-164.
- Fuller RW, Cardellina II JH, Jurek J, Scheuer PJ, Alvarado-Lindner B, McGuire M, Gray GN, Rios Steiner J, Clardy J, Menez E, Shoemaker RH, Newman DJ, Snader KM, Boyd MR. 1994. Isolation and structure/activity features of halomon-related antitumor monoterpenes from the red alga *Portieria hornemannii*. J Med Chem 37: 4407-4411.

## - G -

- Gabbott PA. 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: Barnes H (ed). Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium, Aberdeen University Press, Aberdeen, Scotland, pp. 191-211.
- Gabe M. 1968. Techniques histologiques. Paris: Masson & Cie, editors.
- Gallager SM, Mann R. 1981. Use of lipid-specific staining techniques for assaying condition in cultured bivalve larvae. J Shellfish Res 1: 69-73.
- Gallager SM, Mann R. 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. Aquaculture 56: 105-121.
- Gallager SM, Mann R, Sasaki GC. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. Aquaculture 56: 81-103.
- Galtsoff PS. 1964. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. US Fish Wildl Ser Fish Bull 64: 1-480.
- García-Esquivel Z, Bricelj VM, González-Gómez MA. 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J Exp Mar Biol Ecol 263: 77-103.
- Gerdes D. 1983. The Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Part I: Feeding behaviour of larvae and adults. Aquaculture 31: 195-219.
- Gili JM, Coma R. 1998. Benthic suspension feeders: their paramount role in littoral marine food webs. Trends Ecol Evol 13: 316-321.
- Giribet G, Wheeler WC. 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. Invertebr Biol 121: 271-324.
- Gosling E. 2003. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books, Blackwell Science, Malden.
- Gosselin LA, Qian PY. 1996. Early post-settlement mortality of an intertidal barnacle: a critical period for survival. Mar Ecol Prog Ser 135: 69-75.
- Gosselin LA, Qian PY. 1997. Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. Mar Ecol Prog Ser 146: 265-282.
- Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. 1985. Nile red : a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. J Cell Biol 100: 965-973.



Grenon JF, Walker G. 1978. The histology and histochemistry of the pedal glandular system of two limpets, *Patella vulgata* and *Acmaea tessulata* (Gastropoda: Prosobranchia). J Mar Biol Assoc UK 58: 803.

Gusnard D, Kirshner RH. 1977. Cell and organelle shrinkage during preparation for scanning electron microscopy: effects of fixation, dehydration and critical point drying. J Microsc 110: 51-57.

## - H -

Hahn KO. 1989. Survey of the commercially important abalone species in the world. In: Hahn KO (ed). Handbook of culture of abalone and other marine Gastropods. CRC Press, Boca Raton FL, Inc, pp. 3-11.

Harris JR, Markl J. 1999. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. Micron 30: 597-623.

Harris JR, Markl J. 2000. Keyhole limpet hemocyanin: molecular structure of a potent marine immunoactivator. Eur Urol 37: 24-33.

Hellio C, Tsoukatou M, Maréchal JP, Aldred N, Beaupoil C, Clare AS, Vagias C, Roussis V. 2005. Inhibitory effects of mediterranean sponge extracts and metabolites on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite*. Mar Biotechnol 7: 297-305.

Hendriks IE, van Duren LA, Herman PMJ. 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. J Exp Mar Biol Ecol 296: 199-213.

Heraty J, Hawks D. 1998. Hexamethyldisilazane – A chemical alternative for drying insects. Entomol News 109: 369-374.

Heude Berthelin C, Laisney J, Espinosa J, Martin O, Hernandez G, Mathieu M, Kellner K. 2001. Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). Invertebr Reprod Dev 40: 79-86.

Heude Berthelin C, Fievet B, Leclerc G, Germain P, Kellner K, Mathieu M. 2003. *In vivo* and *in vitro* approaches to the analysis of glycogen metabolism in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J Shellfish Res 22: 715-720.

Hickman RW, Gruffydd LLD. 1971. The histology of the larva of *Ostrea edulis* during metamorphosis. In: Crisp DJ (ed). 4<sup>th</sup> European Marine Biology Symposium. Cambridge University Press, London, pp. 281-294.

Hochberg R, Litvaitis MK. 2000. Hexamethyldisilazane for scanning electron microscopy of Gastrotricha. Biotech Histochem 75: 41-44.

Hoyt JW. 1975. Hydrodynamic drag reduction due to fish slimes. In: Wu TVT, Brokaw CJ, Brennan C (eds). Swimming and flying in nature. Plenum Press, New York, pp. 653-673.

Hunt HL, Scheibling RE. 1997. Role of early post-settlement mortality in recruitment of benthic marine invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser* 155: 269-301.

## - I et J -

Ireland CM, Molinski TF, Roll DM, Zabriskie TM, McKee TC, Swersey JC, Foster MP. 1989. Natural products peptides from marine organisms. In: Sheuer PJ (ed). Bioorganic marine chemistry, vol. 3. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-46.

Itoh H, Noda H, Amano H, Zhuaug C, Mizuno T, Itoh H. 1993. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae. *Anticancer Res* 13: 2045-2052.

Jackson RT. 1888. The development of oyster with remarks on allied genera. *Proc Boston Soc Nat Hist* 23: 531-556.

Jackson RT. 1890. Phylogeny of the Pelecypoda. The Aviculidae and their allies. *Mem read Boston Soc Nat Hist* 4: 277-400, pls 23-30.

Jackson JBC, Kirby MX, Berger WH, Bjorndal KA, Botsford LW, Bourque BJ, Bradbury RH, Cooke R, Erlandson J, Estes JA, Hughes TP, Kidwell S, Lange CB, Lenihan HS, Pandolfi JM, Peterson CH, Steneck RS, Tegner MJ, Warner RR. 2001. Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293: 629-638.

Jebreen EJ, Counihan RT, Fielder DR, Degnan BM. 2000. Synchronous oogenesis during the semilunar spawning cycle of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *J Shellfish Res* 19: 845-851.

Jimeno JM. 2002. A clinical armamentarium of marine-derived anti-cancer compounds. *Anticancer Drugs* 13: 15-19.

Jones HD, Richards OG, Hutchinson S. 1990. The role of ctenidial abfrontal cilia in water pumping in *Mytilus edulis* L.. *J Exp Mar Biol Ecol* 143: 15-26.

Jones HD, Richards OG, Southern TA. 1992. Gill dimensions, water pumping rate, and body size in the mussel *Mytilus edulis* L.. *J Exp Mar Biol Ecol* 155: 213-237.

Jonsson PR, Berntsson KM, André C, Wängberg S-Å. 1999. Larval growth and settlement of the European oyster (*Ostrea edulis*) as a function of food quality measured as fatty acid composition. *Mar Biol* 134: 559-570.

## - K -

- Kennedy VS. 1996. Biology of larvae and spat. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). The Eastern oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, Maryland, pp. 371-421.
- Kingzett BC. 1993. Ontogeny of suspension feeding in post-metamorphic Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis* (Jay). Thèse de Master ès Sciences, Université Simon Fraser, Canada.
- Kjørsvik E, Hoehne K, Reitan KI. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 227: 9-20.
- Kobayashi M, Kobayashi J, Ohizumi Y. 1989. Cone shell toxins and the mechanisms of their pharmacological action. In: Sheuer PJ (ed). *Bioorganic marine chemistry*, vol. 3. Springer-Verlag, Berlin, pp. 71-84.
- Korniushin AV. 1996. Growth and development of the outer demibranch in freshwater clams (Mollusca: Bivalvia): a comparative study. *Ann Zool* 46: 111-124.
- Korniushin AV. 1997. Patterns of gill structure and development as taxonomic characters in bivalve Molluscs (Mollusca, Bivalvia). *Ann Zool* 46: 245-254.
- Kornprobst JM. 2005. Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. Lavoisier, Cachan. 1500 pp.
- Krantz GE, Chamberlin JV. 1978. Blue crab predation on cultchless oyster spat. *Proc Natl Shellfish Assoc* 68: 38-41.

## - L -

- Labarta U, Fernandez-Reiriz M J, Pérez-Camacho A. 1999. Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis*. *J Exp Mar Biol Ecol* 238: 225-242.
- Lacaze-Duthiers H. 1856. Mémoire sur le développement des branchies des mollusques acéphales lamellibranches. *Ann Sci Nat B* 5: 5-47.
- Lakshminarayana JSS. 1983. Phytoplankton of the Quoddy region. *Can Spec Publ Fish Aquat Sci* 64:176-192.
- Langdon CJ, Newell RIE. 1996. Digestion and nutrition in larvae and adults. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). The Eastern oyster *Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant Book, Maryland, pp. 231-269.

- Lango-Reynoso F, Devauchelle N, Le Pennec M, Hatt PJ. 1999. Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the 'Rade de Brest', France. *Invertebr Rep Dev* 36: 141-144.
- Lango-Reynoso F, Chávez-Villalba J, Cochard JC, Le Pennec M. 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190: 183-199.
- Le Pennec M, Gueguen F, Cochard J-C, Paulet Y-M, Dorange G. 1990. Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* (Mollusque, Bivalve) et les performances des larves en élevage. *Haliotis* 10: 101-113.
- Le Pennec M, Beninger PG, Dorange G, Paulet YM. 1991a. Trophic sources and patchways to the developing gametes of *Pecten maximus* (Bivalvia : Pectinidae). *J Mar Biol Assoc UK* 71: 451-463.
- Le Pennec M, Dorange G, Beninger PG, Donval A, Widowati I. 1991b. Les relations trophiques anse intestinale gonade chez *Pecten maximus* (Mollusque, Bivalve). *Haliotis* 21: 57-69.
- Le Pennec M, Beninger PG, Herry A. 1995. Feeding and digestive adaptations of bivalve molluscs to sulphide-rich habitats. *Comp Biochem Physiol* 111: 183-189.
- Le Pennec M, Robert R, Avendaño M. 1998. The importance of gonadal development on larval production in Pectinids. *J Shellfish Res* 17: 97-101.
- Lee RF, Heffernan PB. 1991. Lipids and proteins in eggs of Eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)) and Northern quahogs (*Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)). *J Shellfish Res* 10: 203-206.
- Lee YK, Lee JH, Lee HK. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *J Microbiol* 39: 254-264.
- Leibson NL, Movchan OT. 1975. Cambial zones in gills of Bivalvia. *Mar Biol* 31: 175-180.
- Levinton JS. 1982. *Marine Ecology*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Li Q, Osada M, Mori K. 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fish Sci* 66: 502-508.
- Longwell AC, Stiles SS. 1996. Chromosomes, biology and breeding. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant Book, Maryland, pp. 443-465.
- Lu YT, Blake NJ, Torres JJ. 1999. Biochemical utilization during embryo-genesis and metamorphosis in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J Shellfish Res* 18: 425-429.
- Lubet P, Mann R. 1987. Les différentes modalités de la reproduction chez les mollusques bivalves. *Haliotis* 16: 181-195.

- Lucas A, Rangel C. 1983. Detection of the first larval feeding in *Crassostrea gigas*, using the epifluorescence microscope. *Aquaculture* 30: 369-374.
- Lucas A, Beninger PG. 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44: 187-200.
- Lucas A, Chebab-Chalabi L, Aldana Aranda D. 1986. Passage de l'endotrophie à l'exotrophie chez les larves de *Mytilus edulis*. *Oceanol Acta* 9: 97-103.

## - M -

- MacKenzie CL. 1996. Management of natural populations. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). *The Eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, Maryland, pp. 707-719
- Madden T, Tran HT, Beck D, Huie R, Newman RA, Pusztai L, Wright JJ, Abbruzzese JL. 2000. Novel marine-derived anticancer agents: a phase I clinical, pharmacological, and pharmacodynamic study of Dolastatin 10 (NSC 376128) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 6: 1293-1301.
- Mann R. 1988. Field studies of bivalve larvae and their recruitment to the benthos: a commentary. *J Shellfish Res* 7: 7-10.
- Markl J, Lieb B, Gebauer W, Altenhein B, Meissner U, Harris JR. 2001. Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH. *J Cancer Res Clin Oncol* 127: R3-R9.
- Marsh JB, Weinstein DB. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J Lipid Res* 7: 574-576.
- Martoja R, Martoja-Pierson M. 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Paris: Masson & Cie. 345 pp.
- Marty Y, Delaunay F, Moal J, Samain JF. 1992. Changes in the fatty acids composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J Exp Mar Biol Ecol* 163: 221-234.
- Massapina C, Joaquim S, Domitilia M, Devauchelle N. 1999. Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portugese strain) during a spawning period in Algrave, South Portugal. *Aquat Living Res* 12: 327-333.
- Masski H, Guillou J. 1999. The role of biotic interactions in juvenile mortality of the cockle (*Cerastoderma edule* L.): field observations and experiment. *J Shellfish Res* 18: 575-578.
- Mayhew TM. 2000. 3D structure from thin sections: applications of stereology. *Eur Microsc Anal* (November): 17-20.

- Mazorra C, Bruce M, Bell JG, Davie A, Alorend E, Jordan N, Rees J, Papanikos N, Porter M, Bromage N. 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg quality in atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 227: 21-33.
- Møhlenberg F, Riisgård HU. 1978. Efficiency of particle retention in 13 species of suspension feeding bivalves. *Ophelia* 17: 239-246.
- Moor B. 1983. Organogenesis. In: Verdonk NH, van den Biggelaar JAM, Tompa AS (eds). *The Mollusca. Volume 3: Development*. Academic Press, Inc., pp. 123-177.
- Moore PG. 1977. Inorganic particulate suspensions in the sea and their effects on marine animals. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* 15: 225-363.
- Morales-Alamo R, Mann R. 1989. Anatomical features in histological sections of *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) as an aid in measurements of gonad area for reproductive assessment. *J Shellfish Res* 8: 71-82.
- Morvan C, Ansell AD. 1988. Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Mar Biol* 97: 355-364.
- Munro MHG, Luibrand RT, Blunt JW. 1987. The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms. In: Sheuer PJ (ed). *Bioorganic marine chemistry*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, pp. 93-176.

## - N -

- Napolitano GE, MacDonald BA, Thompson RJ, Ackman RG. 1992. Lipid composition of eggs and adductor muscle in giant scallops (*Placopecten magellanicus*) from different habitats. *Mar Biol* 113: 71-76.
- Nation JL. 1983. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technol* 58: 347-351.
- Neumann D, Kappes H. 2003. On the growth of bivalve gills initiated from a lobule-producing budding zone. *Biol Bull* 205: 73-82.
- Nevejan N, Courtens V, Hauva M, Gajardo G, Sorgeloos P. 2003. Effect of lipid emulsions on production and fatty acid composition of eggs of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Mar Biol* 143: 327-338.
- Newell RIE. 2004. Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: a review. *J Shellfish Res* 23: 51-61.
- Newell RIE, Jordan SJ. 1983. Preferential ingestion of organic material by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Ecol Prog Ser* 13: 47-53.

- Newell RIE, Langdon CJ. 1996. Mechanisms and physiology of larval and adult feeding. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). The Eastern oyster *Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant Book, Maryland, pp. 185-229.
- Newell RIE, Alspach GS Jr, Kennedy VS, Jacobs D. 2000. Mortality of newly metamorphosed eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in mesohaline Chesapeake Bay. Mar Biol 136: 665-676.
- Newkirk GF, Haley RE, Waugh DL, Doyle R. 1977. Genetics of larvae and spat growth rate in the oyster *Crassostrea virginica*. Mar Biol 41: 49-52.
- Newman GC. 1967. Reproduction of the south african abalone *Haliotis midae*. Investl Rep Div Sea Fish S Afr 64: 1-24.
- Nielsen NF, Larsen PS, Riisgård HU, Jørgensen CB. 1993. Fluid motion and particle retention in the gill of *Mytilus edulis*: video recordings and numerical modelling. Mar Biol 116: 61-71.

## - O -

- Ó Foighil D, Kingzett B, Ó Foighil G, Bourne N. 1990. Growth and survival of juvenile Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, in nursery culture. J Shellfish Res 9: 135-144.
- Officer CB, Smayda TJ, Mann R. 1982. Benthic filter feeding: A natural eutrophication control. Mar Ecol Prog Ser 9: 203-210.
- Osman RW, Whitlatch RB, Zajac RN. 1989. Effects of resident species on recruitment into a community: larval settlement versus post-settlement mortality in the oyster *Crassostrea virginica*. Mar Ecol Prog Ser 54: 61-73.
- Owen G, McCrae JM. 1976. Further studies on the laterofrontal tracts of bivalves. P Roy Soc Lond Ser B 194: 527-544.

## - P -

- Palmer RE, Williams IG. 1980. Effects of particle concentration on filtration efficiency of the bay scallop *Argopecten irradians* and the oyster *Crassostrea virginica*. Ophelia 19: 163-174.
- Pazos AJ, Roman G, Acosta CP, Abad M, Sanchez JL. 1996a. Stereological studies on the gametogenic cycle of the scallop, *Pecten maximus*, in suspended culture in Ria de Arousa (Galicia, NW Spain). Aquaculture 142: 119-135.

- Pazos AJ, Ruiz C, Garcia-Martin O, Abad M, Sánchez JL. 1996b. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia, N. W. Spain. *Comp Biochem Physiol* 114B: 171-179.
- Pechenik JA. 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrates life cycles. *Mar Ecol Prog Ser* 177: 269-297.
- Pernet F, Tremblay R, Bourget E. 2003a. Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part I: Broodstock conditioning and young larval performance. *J Shellfish Res* 22: 365-375.
- Pernet F, Tremblay R, Bourget E. 2003b. Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part II: Larval growth, competency and settlement. *J Shellfish Res* 22: 377-388.
- Pipe RK. 1987. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Mar Biol* 95: 405-414.
- Purchon RD. 1977. Reproduction. In: Purchon RD (ed). *The biology of Mollusca*, 2nd ed. Oxford: Pergamon Press. pp 269-332.

## - Q et R -

- Quayle DB. 1952. Structure and biology of the larva and spat of *Venerupis pullustra* (Montagu). *Trans R Soc Edin* 62(1): 255-297.
- Raven CP. 1958. *Morphogenesis: the analysis of molluscan development*. Pergamon Press, New York.
- Ribelin BW, Collier A. 1977. Studies on the gill ciliation of the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J Morphol* 151: 439-450.
- Rice EL. 1908. Gill development in *Mytilus*. *Biol Bull* 14: 61-77.
- Ridewood WG. 1903. On the structure of the gills of the Lamellibranchia. *Philos Trans R Soc Lond B* 1905: 147-284.
- Riisgård HU. 1988. Efficiency of particle retention and filtration rate in 6 species of Northeast American bivalves. *Limnol Oceanogr* 45: 1192-1195.
- Riisgård HU. 1998. Filter feeding and plankton dynamics in a Danish fjord: a review of the importance of flow, mixing and density-driven circulation. *J Environ Manage* 53: 195-207.
- Riisgård HU, Larsen PS. 2000. Comparative ecophysiology of active zoobenthic filter feeding, essence of current knowledge. *J Sea Res* 44: 169-193.



- Riisgård HU, Larsen PS. 2001. Minireview: Ciliary filter feeding and bio-fluid dynamics – present understanding and unsolved problems. *Limnol Oceanogr* 46: 882-891.
- Riisgård HU, Larsen PS, Nielsen HF. 1996. Particle capture in the mussel *Mytilus edulis*: the role of the latero-frontal cirri. *Mar Biol* 127: 259-266.
- Rincé Y. 1993. Les Diatomées marines de la région de Basse-Loire: inventaire, distribution spatio-temporelle et devenir expérimental des peuplements naturels d'écosystèmes ostréicoles. Thèse de Doctorat d'état, Université de Nantes, France.
- 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 Res* 12: 121-130.
- Robert R, Parisi G, Rodolfi L, Poli BM, Tredici MR. 2001. Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* 192: 333-346.
- Robinson A. 1992a. Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg): II. Effects on glycogen, lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. *J Shellfish Res* 11: 443-447.
- Robinson A. 1992b. Dietary supplements for reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg): I. Effects on gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis. *J Shellfish Res* 11: 437-441.
- Roegner GC. 1991. Temporal analysis of the relationship between settlers and early recruits of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J Exp Mar Biol Ecol* 151: 57-69.
- Roegner GC, Mann R. 1995. Early recruitment and growth of the American oyster *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae) with respect to tidal zonation and season. *Mar Ecol Prog Ser* 117: 91-101.
- Robert M, Gouletquer P. 2000. Comparative physiological energetics of two suspension feeders: polychaete annelid *Lanice conchilega* (Pallas 1766) and Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1795). *Aquaculture* 181: 171-189.
- Ruiz C, Abad M, Sedano F, Garcia-Martin LO, Sánchez-López JL. 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.
- Rumrill SS. 1990. Natural mortality of marine invertebrate larvae. *Ophelia* 32: 163-198.

## - S -

- Sasikala SL, Subramoniam T. 1987. On the occurrence of acid mucopolysaccharides in the spermatophores of two marine sprawns, *Penaeus indicus* (Milne-Edwards) and *Megapenaeus monoceros* (Fabricius) (Crustacea: Macrura). *J Exp Mar Biol Ecol* 113: 145-153.
- Shepherd SA, Laws HM. 1974. Studies on southern australian abalone (Genus *Haliotis*). Part II: Reproduction of five species. *Aust J mar Freshwat Res* 25: 49-62.
- Shimizu Y. 1993. Microalgal metabolites. *Chem Rev* 93: 1685-1698.
- Silverman H, Lynn JW, Dietz TH. 1996. Particle capture by the gills of *Dreissena polymorpha*: structure and function of latero-frontal cirri. *Biol Bull* 191: 42-54.
- Silverman H, Lynn JW, Beninger PG, Dietz TH. 1999. The role of latero-frontal cirri in particle capture by the gills of *Mytilus edulis*. *Biol Bull* 197: 368-376.
- Smaal AC, Prins TC. 1993. The uptake of organic matter and the release of inorganic nutrients by bivalve mollusc suspension-feeder beds. In: Dame RF (ed). *Bivalve filter feeders in estuarine and coastal ecosystem processes*. Springer-Verlag, Berlin, p 271-298.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*, Third Edition. Freeman, New York.
- Soletchnik P, Lambert C, Costil K. 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J Shellfish Res* 24: 197-207.
- Soudant P, Marty Y, Moal J, Samain J-F. 1996a. Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquac Internat* 4: 191-200.
- Soudant P, Marty Y, Moal J, Robert R, Quéré C, Le Coz J-R, Samain J-F. 1996b. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143: 361-378.
- Stasek CR. 1962. Aspects of ctenidial feeding in immature bivalves. *Veliger* 5: 78-79.
- Stasek CR. 1963. Orientation and form in the bivalved Mollusca. *J Morph* 112: 195-214.
- Strathmann RR, Leise E. 1979. On feeding mechanisms and clearance rates on molluscan veligers. *Biol Bull* 157: 524-535.
- Subramoniam T. 1991. Chemical composition of spermatophores in decapod crustaceans. In: Bauer T, Martin JW (eds). *Crustacean sexual biology*. Columbia University Press, New York, pp 308-321.

Suffness M, Newman DJ, Snader K. 1989. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. In: Sheuer PJ (ed). Bioorganic marine chemistry, vol. 3. Springer-Verlag, Berlin, pp. 131-168.

Swift ML, White D, Ghassemieh MB. 1979. Distribution of neutral lipids in the tissues of the oyster *Crassostrea virginica*. Lipids 15: 129-132.

## - T et U -

Tamm SL, Terasaki M. 1994. Visualization of calcium transients controlling orientation of ciliary beat. J Cell Biol 125: 1127-1135.

Thompson RJ, Newell RIE, Kennedy VS, Mann R. 1996. Reproductive processes and early development. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant Book, Maryland, pp. 335-370.

Trider DJ, Castell JD. 1980. Influence of neutral lipid on seasonal variation of total lipid in oysters, *Crassostrea virginica*. Proc Nat Shellfish Assoc, 70: 112-118.

Tyler A. 1939. Extraction of an egg membrane-lysin from sperm of the giant keyhole limpet (*Megathura crenulata*). Proc Natl Acad Sci USA 25: 317-323.

Uriarte I, Fariás A, Hernandez J, Schäfer C, Sorgeloos P. 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. Aquaculture 230: 349-357.

Utting SD, Millican PF. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. Aquaculture 155: 45-54.

## - V -

Vacca LL. 1985. Laboratory manual of histochemistry. New York: Raven Press.

Valdez-Ramirez ME. 1999. Estimation de la qualité des gamètes femelles et des embryons de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France.

Valdez-Ramirez ME, Le Pennec M, Dorange G, Devauchelle N, Nonnotte G. 1999. Assessment of female gamete quality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Invertebr Reprod Dev 36: 73-78.

Valdez-Ramirez ME, Donval A, Le Pennec M. 2002. Ultrastructural and histochemical criteria for determining normality in mature oocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J Shellfish Res 21: 707-714.

- Veniot A. 2003. Etude de la structure et de l'ultrastructure des cils composites chez quatre espèces de bivalves. Thèse de Master ès Sciences, Université de Moncton, New Brunswick, Canada.
- Veniot A, Bricelj VM, Beninger PG. 2003. Ontogenic changes in gill morphology and potential significance for food acquisition in the scallop *Placopecten magellanicus*. Mar Biol 142: 123-131.
- Ventilla RF. 1984. Recent developments in the Japanese oyster culture industry. Adv Mar Biol 21: 1-57.
- Videla JA, Chaparro OR, Thompson RJ, Concha II. 1998. Role of biochemical energy reserves in the metamorphosis and early development of the oyster *Ostrea chilensis*. Mar Biol 132: 635-640.

## - W -

- Waller TR. 1975. The behaviour and tentacle morphology of pteridiomorphian bivalves: a motion picture study. Bull Am Malacol Union 1975: 7-13.
- Waller T. 1981. Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linné. Smithson Contrib Zool 328: 1-70.
- Walne PR. 1974. Culture of bivalve molluscs: 50 years' experience at Conwy. Fishing News Books, Oxford.
- Ward JE, MacDonald BA, Thompson RJ, Beninger PG. 1993. Mechanisms of suspension feeding in bivalves: resolution of current controversies by means of endoscopy. Limnol Oceanogr 38: 265-272.
- Ward JE, Newell RIE, Thompson RJ, MacDonald BA. 1994. *In vivo* studies of suspension-feeding processes in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Biol Bull 186: 221-240.
- Ward JE, Levinton JS, Shumway SE, Succi T. 1998. Particle sorting in bivalves: *in vivo* determination of the pallial organs of selection. Mar Biol 131: 283-292.
- Webber HH. 1977. Gastropoda: Prosobranchia. In: Giese AC, Pearse JS (eds). Reproduction of marine Invertebrates. Vol IV: Molluscs: Gastropods and Cephalopods. Academic Press, New York, pp. 1-97.
- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. J Cell Biol 30: 23-38.
- Whyte JNC, Bourne N, Hodgson CA. 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. J Exp Mar Biol Ecol 113: 113-124.

- Whyte JNC, Bourne N, Ginther NG. 1990. Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. Mar Biol 106: 239-244.
- Whyte JNC, Bourne N, Ginther NG, Hodgson CA. 1992. Compositional changes in the larva to juvenile development of the scallop *Crassadoma gigantea* (Gray). J Exp Mar Biol Ecol 163: 13-29.
- Wilson JH. 1980. Particle retention and selection by larvae and spat of *Ostrea edulis* in algal suspensions. Mar Biol 57: 135-145.
- Wilson JA, Chaparro OR, Thompson RJ. 1996. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. Aquaculture 139: 63-75.

## - X, Y et Z -

- Yim JH, Son E, Pyo S, Lee HK. 2005. Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity *in vivo*. Mar Biotechnol 7: 331-338.
- Yonge CM. 1926. Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. J Mar Biol Assoc U K 14: 295-386.
- Young JS, DeMartini JD. 1970. The reproductive cycle, gonadal histology, and gametogenesis of the red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson). Calif Fish Game 56: 298-309.
- Zajac RM, Whitlatch RB, Osman RW. 1989. Effects of inter-specific density and food supply on survivorship and growth of newly settled benthos. Mar Ecol Prog Ser 56: 127-132.

## **Bases biologiques de la production de deux Mollusques d'intérêt économique: reproduction chez *Megathura crenulata*, reproduction et développement chez *Crassostrea gigas***

Le cycle reproducteur de *Megathura crenulata* a été documenté et la quantification des réserves ovocytaires par des colorants lipospécifiques a été tentée, sans résultats concluants pour cette espèce, ni pour *Crassostrea gigas*.

L'intérêt d'une alimentation des géniteurs femelles *C. gigas* au printemps est re-évalué, car la performance ultérieure des élevages larvaires et post-larvaires n'a pas été affectée par le jeûne imposé lors du conditionnement.

L'étude du développement des organes impliqués dans le traitement des particules chez *C. gigas* a permis d'identifier des stades critiques associés à l'ontogenèse de chaque organe, ainsi qu'une meilleure compréhension de l'évolution de ces organes si particuliers chez les Ostreidae. L'examen des types ciliaires et la cartographie des mucocytes de la post-larve à l'adulte ont montré que la spécialisation hétérorhabdique précède même la formation anatomique des plis branchiaux caractéristiques de cette condition.

**Mots Clés :** reproduction, développement, *Megathura crenulata*, *Crassostrea gigas*, alimentation, larves post-larves juvéniles, branchie, manteau, mucocytes

## **Biological basis of production two commercially-important molluscs: reproduction in *Megathura crenulata*, reproduction and development in *Crassostrea gigas***

The reproductive cycle of *Megathura crenulata* was documented and quantification of oocyte lipid reserves with lipo-specific stains was explored in both this species and in *Crassostrea gigas*.

The necessity of providing food to female broodstock *C. gigas* in spring was re-evaluated, because subsequent larval and post-larval rearing performance was not affected by broodstock starvation during conditioning.

Developmental study of the organs responsible of particle processing in *C. gigas* allowed the identification of critical stages related to the ontogenesis of each organ, as well as a better understanding of the evolution of these organs, highly-modified in the Ostreidae. Ciliary type identification and mucocyte mapping from post-larval to adult stage showed that the heterorhabdic specialization precedes the anatomic formation of gill plicae specific to this condition.

**Key words :** reproduction, development, *Megathura crenulata*, *Crassostrea gigas*, feeding, larvae postlarvae juveniles, gill, mantle, mucocytes