

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Discipline : Océanologie Biologique

Présentée et soutenue publiquement par

Caroline FABIOUX

le 10 septembre 2004

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

JURY :

M. Marcel LE PENNEC	<i>Professeur, Université de Bretagne Occidentale</i>	Directeur de thèse
M. Alexis FOSTIER	<i>Directeur de recherche, INRA Rennes</i>	Rapporteur
M. Pascal FAVREL	<i>Professeur, Université de Caen</i>	Rapporteur
Mme Liliane NONNOTTE	<i>Professeur, Université de Bretagne Occidentale</i>	Président du jury
M. Philippe GOULLETQUER	<i>Chargé de recherche, Ifremer</i>	Examineur
M. Jean-Claude COCHARD	<i>Chargé de recherche, Ifremer</i>	Examineur

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE - BREST

Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Discipline : Océanologie Biologique

Présentée et soutenue publiquement par

Caroline FABIoux

le 10 septembre 2004

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

JURY :

M. Marcel LE PENNEC	<i>Professeur, Université de Bretagne Occidentale</i>	Directeur de thèse
M. Alexis FOSTIER	<i>Directeur de recherche, INRA Rennes</i>	Rapporteur
M. Pascal FAVREL	<i>Professeur, Université de Caen</i>	Rapporteur
Mme Liliane NONNOTTE	<i>Professeur, Université de Bretagne Occidentale</i>	Président du jury
M. Philippe GOULLETQUER	<i>Chargé de recherche, Ifremer</i>	Examineur
M. Jean-Claude COCHARD	<i>Chargé de recherche, Ifremer</i>	Examineur

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de cette thèse.

Le Professeur Marcel Le Pennec a assuré la direction de cette thèse et m'a soutenue dans mes démarches, tant scientifiques que pédagogiques, tout au long de ces quatre années ; je le remercie très sincèrement.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur Alexis Fostier et au Professeur Pascal Favrel qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier chaleureusement le Professeur Liliane Nonnotte d'avoir présidé le jury ainsi que Philippe Gouletquer, Marcel Le Pennec et Jean-Claude Cochard pour leur participation à ce jury.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de deux laboratoires associés : le Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR) de l'Université de Bretagne Occidentale et le Laboratoire de Physiologie des Invertébrés (LPI) du centre Ifremer de Brest, ce dernier formant depuis 2003 l'UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins avec le Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines de l'Université de Caen. Je suis reconnaissante aux directeurs respectifs de ces laboratoires, le Professeur Jacques Clavier puis Laurent Memery du LEMAR, Jean-Claude Cochard puis Jean-Louis Nicolas du LPI, ainsi qu'au Professeur Michel Mathieu directeur de l'UMR PE2M, qui m'ont accueillie dans leurs équipes de recherche et m'ont donné les moyens matériels et financiers de réaliser ce travail.

Merci également à Jean-Claude Cochard d'avoir encadré mes premiers pas de thésarde mais aussi pour ce tour de France des laboratoires Ifremer qui fut fort instructif tant au niveau professionnel que culturel.

Je tiens à remercier tout particulièrement un binôme d'encadrement de choc : Arnaud Huvet et Stéphane Pouvreau. Tous deux m'ont soutenue tout au long de ma thèse, ils m'ont donné d'innombrables conseils, m'ont guidée dans l'orientation de mes travaux et m'ont aidée à valoriser mes résultats. Merci à toi Nono de m'avoir enseigné tout ce que tu savais (ou presque...) en bio. mol., pour ton aide au cours de toutes ces longues journées de prélèvements, pour ton soutien dans la rédaction de mes premières publications et pour avoir passé autant de temps et d'énergie à la correction de ce manuscrit. Merci Steph de t'être démené lors de la mise en route de la station expérimentale d'Argenton afin que "tes thésardes" puissent commencer leurs expérimentations au plus tôt, de m'avoir enseigné les rouages de l'histologie, de l'analyse d'images et de la reproduction des bivalves, pour ton aide dans la rédaction des publications et pour la gestion de la partie "relations humaines". Merci à vous deux

pour votre énergie, votre passion, votre motivation et votre joie de vivre, ce fut un vrai bonheur de travailler avec vous. Je vous dois beaucoup.

Merci à Jean-Yves pour ses conseils, sa disponibilité permanente et sa grande rigueur dans le domaine de la biologie moléculaire.

Merci à Jean-François, Jeanne et René pour leurs conseils, leur soutien ainsi que pour la relecture des publications et la correction des communications qu'ils ont assurées en supplément de leur travail.

J'exprime mes sincères remerciements à toute l'équipe de la station expérimentale d'Argenton pour la gestion de la partie expérimentale de ma thèse, les conditionnements de géniteurs, les croisements expérimentaux et les élevages larvaires. Merci à Christian, Pierrick et Stéphane qui ont pris soin de "mes" huîtres. Merci à René et à Christian d'avoir donné naissance à tant de petites larves. Merci à Jean-Paul et à Bertrand pour la création et l'entretien de cette jungle miniature de microalgues qui sert à nourrir quotidiennement tout ce petit monde à deux valves. Merci à vous tous pour votre bonne humeur permanente, pour ces déjeuners animés dans la petite cuisine d'Argenton et pour ces barbecues parfois pluvieux autour du vivier.

Au cours de ma thèse, j'ai été accueillie dans différents laboratoires où je me suis formée à de nouvelles techniques, notamment au Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP) de l'Ifremer de La Tremblade et au Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines de l'Université de Caen. Merci à Frédérique Le Roux du LGP de m'avoir initiée à l'hybridation *in situ*, pour ses conseils avisés, son dynamisme et son accueil. Merci à Christophe Lelong de sa collaboration lors des premiers pas de l'hybridation *in toto* chez *C. gigas*. Merci également à Tristan Renault du LGP et à Philippe Soudant du LEMAR de m'avoir formée en cytométrie en flux, de s'être investis dans ce projet aux résultats alors incertains et pour la relecture de la publication.

Je suis reconnaissante au Professeur Liliane Nonnotte qui m'a guidée dans mes premiers pas d'enseignante pendant mes trois années de monitorat à l'Université de Brest et m'a soutenue pour l'obtention d'un poste d'ATER à mi-temps, ce qui m'a permis de terminer sereinement ma thèse. Merci également à Valérie Stiger, Emmanuelle Plée-Gautier et Stella Roy pour leur aide, leurs conseils et leur accompagnement dans mon apprentissage de l'enseignement, en particulier durant ces fameux TP de biochimie.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble des personnes du LPI pour ces quatre années passées ensemble, ainsi que les autres thésards du labo : Maryse, Yannick et Hélène pour tout ce que nous avons partagé et surtout bon courage à vous pour la fin de cette grande aventure qu'est la thèse...

J'ai débuté la recherche dans le monde peu connu des huîtres lors de mon stage de DEA à la station Ifremer de La Tremblade. Je remercie Pierre Boudry de m'avoir

permis d'entrer dans cet univers scientifique, d'avoir assuré la direction de ce stage et de m'avoir fourni de précieux conseils.

Et parce que la vie ne serait pas aussi belle sans eux, je remercie tous mes amis :

Merci à Aude, Phil, Fab et Damien que j'ai rencontrés au cours du DEA "Océano Bio" et qui, comme moi, sont passionnés par le monde sous-marin. Merci pour tous les moments mémorables passés ensemble à Banyuls, à Roscoff ou ailleurs... en plongée, à la plage, en soirées ou en week-ends. Bonne chance à vous tous pour la suite et à très bientôt au bord d'un des océans du globe !

Merci à mes amis d'ailleurs, si loins et si proches à la fois. Merci Vinie pour ta grande amitié et bonne chance à toi pour ta nouvelle aventure Norvégienne... à très bientôt à Bergen. Muchas gracias Alma, para tu amistad desde hace mas de 10 años, en España, Allemaña y Francia. Merci à toi Pat, québécois iroquois-normand, pour ta présence de l'autre côté de l'Atlantique et j'espère à bientôt sous un autre océan.

Merci à Arnaud, Maryse, Yannick, Maud et Julien pour tous les moments sportifs ou festifs que nous avons partagés... pour les sorties roller (à quand les prochaines 24H du Mans ?), pour les sessions morey à la pal., pour les midis piscine (et sauna !) et après l'effort... pour tous ces petits restos de Brest que nous avons testés. Merci à Steph et Vali pour ces p'tites soirées, toujours bien difficiles à planifier. Merci à Leila... profite bien de ta nouvelle vie de maman et d'enseignante, chez toi, en Tunisie. Merci Maeva pour ta gentillesse et pour ton accueil toujours très chaleureux lors de mes séjours à La Tremblade. Merci à Mirella pour ce mois franco-brésilien très sympa "in english" ou "en español" et j'espère à bientôt à Brest.

Ma curiosité pour l'univers marin s'est éveillée alors que je marchais à peine, au cours de mes explorations des mares bretonnes, à Perros, où j'ai découvert tout un petit monde aquatique dont les figures emblématiques étaient les "bébés crabes", les crevettes, les bigorneaux et les gobies. Quelques années plus tard, j'ai découvert la plongée sous-marine dans les eaux bleu azur de la Corse. C'est là que j'ai compris que ce monde sous-marin, qui me passionnait depuis longtemps déjà, ferait désormais partie de ma vie...

A mes parents à qui je dois cet amour de la mer et qui m'ont toujours soutenue dans tous mes projets,

A Yoann, mon super p'tit frère.

Table des matières

Premier chapitre : Introduction	5
<hr/>	
1. La reproduction.....	7
1.1 Les deux grands modes de reproduction.....	7
1.2 Les cellules germinales, base de la reproduction.....	9
1.3 La gamétogenèse.....	13
2. Le gène <i>vasa</i> , déterminant et marqueur de la lignée germinale.....	22
2.1 Introduction.....	22
2.2 La famille protéique des DEAD-box	23
2.3 Le gène <i>vasa</i> dans le règne animal	24
2.4 Rôle de <i>vasa</i> dans la formation des cellules germinales.....	26
2.5 Rôle de <i>vasa</i> au cours de la gamétogenèse	34
2.6 Quelques fonctions particulières de <i>vasa</i>	36
2.7 Applications pratiques de <i>vasa</i>	37
3. Modèle biologique, l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	38
3.1 L'ostréiculture, histoire et enjeux actuels.....	38
3.2 Données biologiques.....	39
3.3 Reproduction et développement	43
3.4 Maîtrise de la reproduction en éclosion	50
4. Problématique de l'étude.....	52
<hr/>	
Second chapitre : Matériel et méthodes	55
<hr/>	
1. Recherche d'un gène candidat	57
1.1 Construction d'amorces dégénérées.....	57
1.2 Extraction et quantification des ARN totaux.....	58
1.3 Transcription inverse	59
1.4 Amplification par PCR	59
1.5 Purification des produits d'amplification, clonage et séquençage.....	61
1.6 Analyse de séquence.....	62
1.7 Extension de l'ADNc par RACE-PCR.....	63
2. Etude du développement des cellules germinales des huîtres adultes.....	65
2.1 Matériel biologique et plan d'expérience	65
2.2 Analyse du cycle de reproduction.....	71
2.3 Etude du profil d'expression du gène candidat	73
2.4 Etude du cycle cellulaire des cellules germinales.....	81
2.5 Analyses statistiques.....	85
3. Etude du développement des cellules germinales de <i>C. gigas</i> au cours de l'embryogenèse.....	86

3.1 Matériel biologique.....	86
3.2 Extraction des ARN totaux.....	87
3.3 Etude du profil d'expression du gène candidat au cours du développement embryonnaire.....	88
3.4 Analyses statistiques.....	90
<hr/>	
Troisième chapitre : Origine et développement des cellules germinales de <i>Crassostrea gigas</i>	91
<hr/>	
1. <i>Oyvg</i> , premier marqueur de la lignée germinale de <i>C. gigas</i>	92
2. Formation de la lignée germinale de <i>C. gigas</i> au cours de l'ontogenèse	99
3. Etude du cycle cellulaire des cellules germinales mâles.....	106
<hr/>	
Quatrième chapitre : Régulation du cycle de reproduction de <i>Crassostrea gigas</i> par les paramètres température/photopériode	121
<hr/>	
1. Température et photopériode gouvernent la dynamique du cycle de reproduction de <i>C. gigas</i>	122
2. Influence des paramètres température / photopériode sur l'expression du gène <i>Oyvg</i>	149
2.1 Introduction.....	149
2.2 Résultats.....	149
2.3 Discussion.....	151
<hr/>	
Cinquième chapitre : Discussion générale, Conclusion et perspectives	159
<hr/>	
1. Discussion générale.....	160
1.1 Le gène <i>Oyvg</i> , hélicase de l'ARN et "RNA binding-protein"	160
1.2 Origine et développement de la lignée germinale de <i>C. gigas</i>	161
1.3 Régulation du développement de la lignée germinale	169
1.4 Applications pour la reproduction contrôlée de <i>C. gigas</i> en éclosérie.....	173
2. Conclusion et perspectives	175
<hr/>	
Bibliographie	179
<hr/>	
Liste des figures et tableau	195
<hr/>	
Liste des abréviations	198
<hr/>	

Premier chapitre :

Introduction

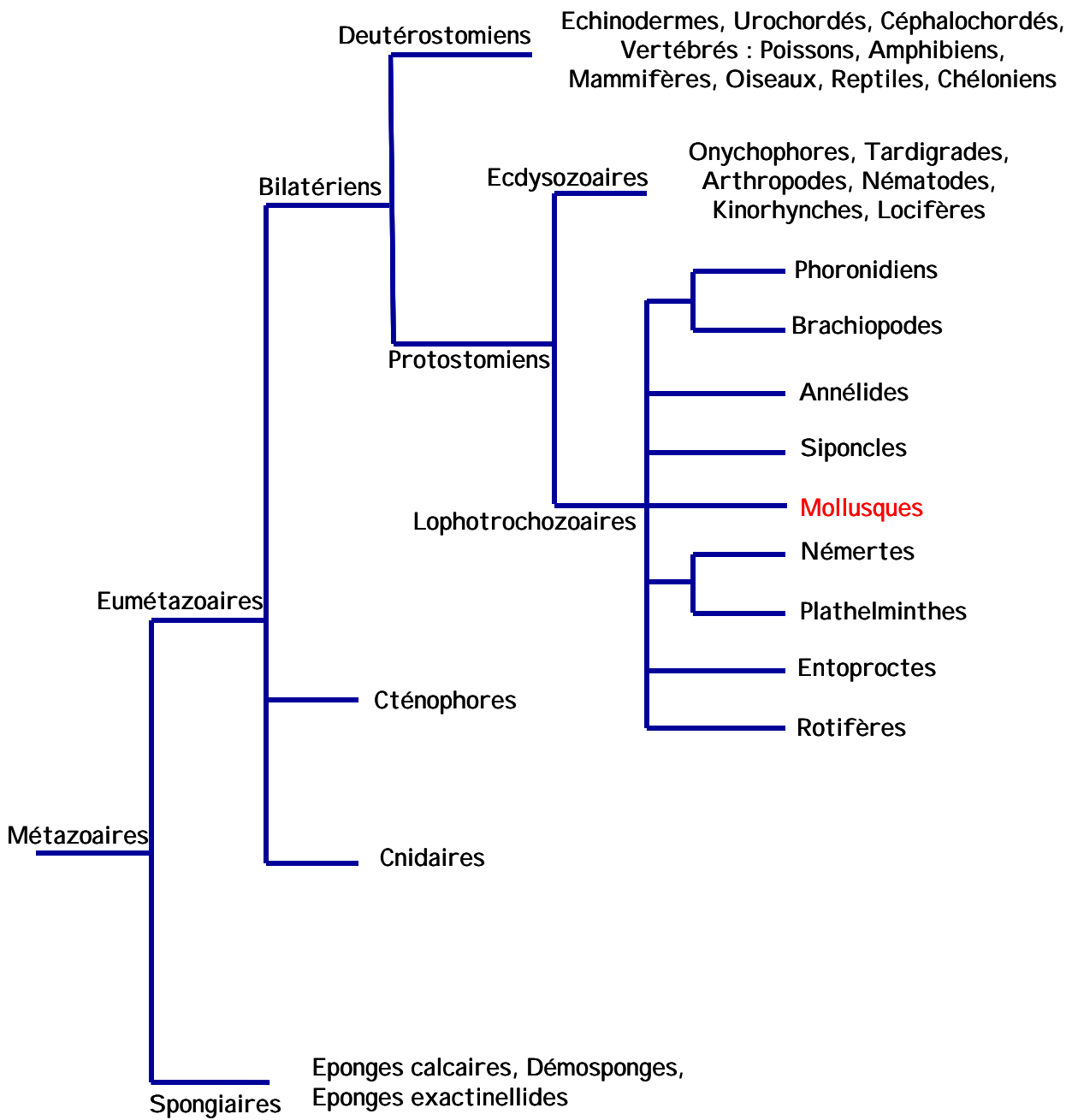


Figure 1 : Classification phylogénétique des Métazoaires simplifiée d'après Le Cointre et Le Guyader (2001).

1. La reproduction

1.1 Les deux grands modes de reproduction

La reproduction est un phénomène universel qui assure la pérennité des espèces en transmettant l'information génétique d'une génération à l'autre. Les animaux et les végétaux se reproduisent par reproduction asexuée ou par reproduction sexuée (Campbell et Reece, 2004).

On parle de reproduction asexuée lorsqu'un individu unique crée des descendants qui lui sont génétiquement identiques. Dans ce cas, le germe est un fragment pluricellulaire qui s'isole physiologiquement et morphologiquement de l'animal souche sans intervention de cellules reproductrices spécialisées, par scissiparité, bourgeonnement, sporulation ou multiplication végétative. Ce mode de reproduction est général chez les protozoaires et commun à beaucoup de végétaux. Par contre, la reproduction asexuée est moins répandue dans le reste du règne animal. Elle se manifeste chez des animaux dont l'organisation est simple, comme chez les spongiaires et les cnidaires tels que les hydres, chez les métazoaires protostomiens notamment dans le groupe des annélides ou encore parfois chez les deutérostomiens tels que les astérides (échinodermes) et chez de rares chordés comme les tuniciers. La figure 1 présente les principaux embranchements du règne animal.

La reproduction sexuée est de règle dans le reste du règne animal dans les embranchements dits supérieurs des invertébrés, les mollusques et les arthropodes et chez les vertébrés. Quand la reproduction est sexuée, deux individus engendrent des descendants dont le patrimoine génétique provient d'une combinaison de celui des deux parents. En effet, le germe à partir duquel s'édifie le nouvel être est formé par la fusion de deux cellules reproductrices sexuées, les cellules germinales ou gamètes. Les mécanismes fondamentaux de la reproduction sexuée ont été très conservés au cours de l'évolution de par leur importance dans la survie des espèces. La reproduction sexuée peut être divisée en trois grandes étapes fondamentales que sont (1) la différenciation des cellules germinales, (2) la gamétogenèse et (3) la fécondation.

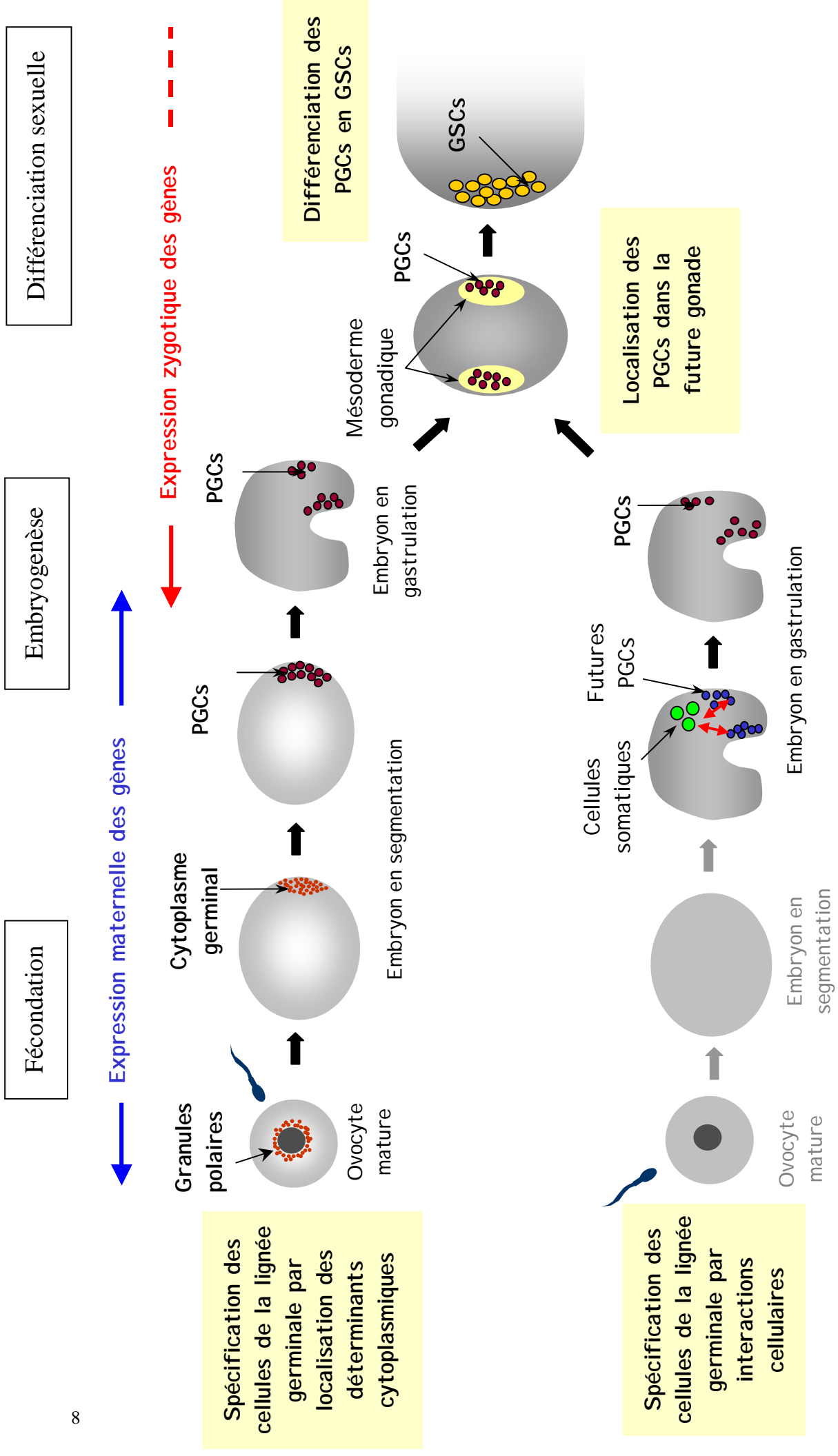


Figure 2 : Formation des cellules germinales primordiales à partir de déterminants cytoplasmiques (en haut) comme par exemple chez *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *zebrafish* ou *Xenopus* ou par des interactions cellulaires (en bas) comme chez les mammifères. PGCs : cellules germinales primordiales, GSCs : cellules germinales souches

1.2 Les cellules germinales, base de la reproduction

Chez les organismes qui se reproduisent par reproduction sexuée, l'information génétique est transmise d'une génération à l'autre grâce aux cellules germinales. Ces cellules constituent un type cellulaire unique à la fois très spécialisé (pour la transmission de l'information génétique) et totipotent (un organisme complet peut être régénéré à partir de l'information contenue dans ces cellules). La totipotence de ces cellules serait contrôlée, par des facteurs présents dans leur cytoplasme (ARNm et protéines) et par leur environnement cellulaire (Wylie, 1999). Ces cellules se séparent des cellules somatiques au cours du développement embryonnaire sous la forme de cellules germinales primordiales ou PGCs (primordial germ cells) (Wylie, 1999). Les PGCs se différencient ensuite en cellules germinales souches ou GSCs (germinal stem cells) qui, elles-mêmes, vont former les cellules germinales lors de la différenciation sexuelle de l'organisme.

1.2.1 Les cellules germinales primordiales

Chez la majorité des organismes invertébrés et vertébrés (arthropodes, poissons, amphibiens, oiseaux), les PGCs se distinguent des autres cellules embryonnaires grâce aux structures cytoplasmiques caractéristiques qu'elles contiennent, appelées granules germinaux ou granules polaires (Figure 2). Les granules germinaux, localisées dans la région périnucléaire, apparaissent en microscopie électronique comme des structures denses, granuleuses, riches en ARNm et en protéines, et associées à des mitochondries (Saffman et Lasko, 1999). Des études fonctionnelles ont permis de mettre en évidence que ces granules germinaux contenaient les déterminants de la lignée germinale, ARNm et protéines indispensables à la formation des cellules germinales. Ces granules germinaux ont été décrits chez plus de 80 espèces animales réparties au moins dans 8 phylums dont les nématodes, les insectes, les mollusques, les amphibiens et les poissons. Les déterminants germinaux sont d'origine maternelle, ils sont synthétisés et localisés dans le cytoplasme des ovocytes au cours de la gamétogenèse et seules les cellules embryonnaires qui en héritent deviennent des cellules germinales (Saffman et Lasko, 1999; Wylie, 1999) (Figure 2). Ainsi, si le cytoplasme germinale (région cytoplasmique contenant les granules germinaux) est transplanté dans une autre partie de l'embryon, les cellules qui se seraient normalement développées en cellules somatiques se différencient en cellules germinales (Wylie, 1999; Yoshizaki *et al.*, 2002).

Les PGCs des mammifères constituent un cas à part, car même si des structures cytoplasmiques morphologiquement proches des granules germinaux y ont été observées, elles ne contiennent pas de déterminants germinaux. Les PGCs des mammifères sont spécifiées plus tardivement au cours de l'embryogenèse que dans les autres phylums, au moment de la gastrulation (Chiquoine, 1954; Tam et Zhou, 1996; Saffman et Lasko, 1999) (Figure 2). Chez les mammifères, la spécification des PGCs est épigénétique, elle ne dépend pas de facteurs maternels mais de signaux extérieurs produits par l'environnement cellulaire, tel que des molécules de signalisation comme BMP4 (bone morphogenetic protein 4), et du positionnement des cellules dans une région définie de l'embryon, comme l'épiblaste de la souris (Saffman et Lasko, 1999; Mc Laren, 2003). Ainsi chez les mammifères, toutes les cellules embryonnaires peuvent potentiellement devenir des cellules germinales. Notons enfin que les PGCs des mammifères se distinguent des autres cellules grâce à une forte activité phosphatase alcaline (Wylie, 1999).

Alors que les mécanismes de formation des PGCs semblent très conservés au cours de l'évolution, la localisation des premières PGCs dans l'embryon est très variable d'une espèce à l'autre (Wylie, 1999). En effet, chez la mouche du vinaigre, la drosophile, (*Drosophila melanogaster*) et chez le nématode *Caenorhabditis elegans* les PGCs apparaissent au pôle postérieur de la blastula (Williamson et Lehman, 1996; Wylie, 1999) ; chez le xénope (*Xenopus laevis*) elles apparaissent dans l'endoderme ; chez le poisson zèbre ou zebrafish (*Danio rerio*) elles se forment en quatre points, le long des plans de clivage des embryons de 4 cellules (Raz, 2003) ; chez le poulet (*Gallus gallus*) et la souris (*Mus musculus*) elles sont formées au niveau de l'épiblaste (ectoderme embryonnaire) (Ginsburg, 1997; Mc Laren, 2003). Cette localisation dépend de l'emplacement du cytoplasme germinal ou de l'environnement cellulaire dans l'embryon, en fonction du mode de spécification des PGCs. Par contre, la localisation des PGCs est indépendante de l'emplacement des trois feuillettes cellulaires primaires des animaux triploblastiques (ectoderme, mésoderme et endoderme), ce qui indiquerait que l'apparition des cellules germinales s'est faite plus tôt, au cours de l'évolution des espèces, que l'apparition des trois feuillettes cellulaires. Cette hypothèse est confortée par l'existence des cellules germinales chez les animaux diploblastiques tels que l'hydre (Wylie, 1999).

Quel que soit leur site de formation dans l'embryon, les PGCs apparaissent en dehors de l'emplacement de la future zone gonadique, ce qui nécessite des processus complexes de migration dans l'embryon depuis leur emplacement initial jusqu'aux ébauches gonadiques (Figure 2), excepté chez quelques espèces comme *Caenorhabditis* (Saffman et Lasko, 1999).

La migration des PGCs est contrôlée par leur environnement *i.e.* par l'expression de gènes et par des interactions avec les cellules somatiques (Moore *et al.*, 1998; Wylie, 1999). Les PGCs migrent généralement passivement au cours de la gastrulation en suivant les mouvements des différents feuilletts embryonnaires puis entament ensuite une migration active jusqu'au mésoderme gonadique où elles envahissent les ébauches gonadiques (Gomperts *et al.*, 1994). Chez le poulet, les PGCs migrent via le système circulatoire en formation avant d'entamer une migration active dans les tissus embryonnaires (Ginsburg, 1997). Pendant leur phase de migration, chez la drosophile et la souris notamment, les PGCs développent des pseudopodes (prolongements cytoplasmiques), prennent une forme amiboïde et s'agrègent entre elles (Williamson et Lehman, 1996; Mc Laren, 2003). Ces changements de forme et l'agrégation cellulaire jouent un rôle important dans la migration active des cellules. Pendant leur migration, les PGCs, formées initialement en nombre réduit, se multiplient mais une partie d'entre elles est perdue au cours de la migration. Le nombre des PGCs arrivant au niveau des ébauches gonadiques varie en fonction des espèces (Warrior, 1994; Saffman et Lasko, 1999). Ainsi chez la drosophile, 30-40 PGCs sont formées et environ 15 arrivent à la gonade. Chez le zebrafish, les 4 PGCs initialement formées se divisent pour former 25 à 50 PGCs (Yoshizaki *et al.*, 2002; Raz, 2003). Après leur arrivée dans les ébauches gonadiques, les PGCs changent de forme et des études réalisées *in vitro* indiquent qu'elles perdent leur capacité à bouger (Wylie, 1999). Chez *Caenorhabditis*, les PGCs ne migrent pas, elles sont formées directement à l'emplacement de la future gonade à partir d'une cellule unique appelée P4. Les PGCs prolifèrent continuellement pendant le stade larvaire et adulte, pour former environ 1000 cellules germinales par gonade (Saffman et Lasko, 1999).

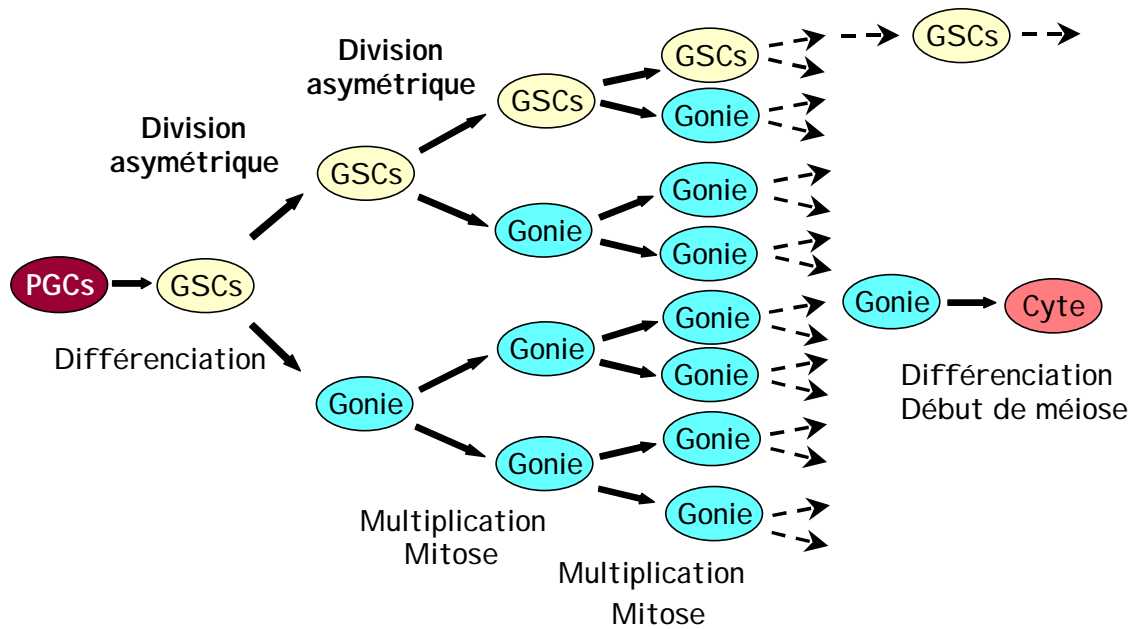
1.2.2 Les cellules germinales souches

Après leur établissement dans la gonade, les PGCs se différencient en cellules germinales souches ou GSCs (germinal stem cells). Les GSCs ont une très grande capacité mitotique et elles forment une population cellulaire capable d'auto-renouvellement qui sert de source à la production de gamètes durant la vie sexuelle active des organismes (Lin, 1997). Les mécanismes de différenciation de ces cellules sont encore très mal connus voir inconnus.

Les GSCs ont été décrites chez de très nombreux eucaryotes (Lin, 1997) diploblastiques (hydriaires) ou triploblastiques invertébrés (nématodes, mollusques) et vertébrés (amphibiens, poissons, reptiles et mammifères). Une exception à cette règle est l'absence de cellules souches capables de se renouveler dans les ovaires des mammifères.

Cellules germinales souches stéréotypiques, asymétriques

Exemple : Drosophile, Souris (mâles)



Cellules germinales souches populationnelles

Exemple : *Caenorhabditis*, hydre

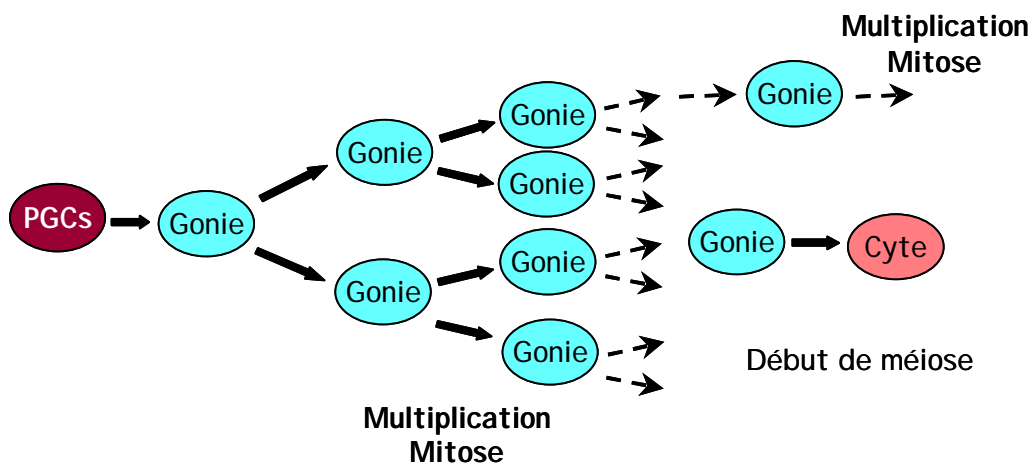


Figure 3 : Les deux types de cellules germinales souches (GSCs), stéréotypiques et populationnelles.

En effet, chez les mammifères femelles, les ovogonies se multiplient et débutent leur méiose (jusqu'à la prophase) pendant l'embryogenèse. Ainsi, un stock fini d'ovocytes I est présent à la naissance et sera utilisé au cours de la vie de l'organisme (Mc Laren, 1984).

Il existe deux grands types de GSCs (Figure 3). Le premier type de cellules germinales souches est dit "stéréotypique" (Figure 3). Les cellules se renouvellent par division asymétrique comme chez la drosophile ou chez les mâles des mammifères et des oiseaux (Brown et King, 1962; Bellvé *et al.*, 1977; Jones et Lin, 1993). Une cellule souche se divise pour donner une cellule souche fille et une cellule germinale différenciée, la gonie. La gonie subit alors un nombre de mitoses spécifique de l'espèce et les gonies filles se différencient pour donner les cellules germinales qui entrent en méiose (Lin, 1997). Le second type de GSCs est dit "populationnel" comme chez *Caenorhabditis* ou l'hydre (*Hydra sp.*) (Figure 3). Dans ce cas, les GSCs ne sont pas des cellules souches au sens strict, ce sont des cellules germinales déjà différenciées qui ont une activité mitotique, ce sont des gonies. Ces gonies se divisent en gonies filles puis certaines se différencient et entrent en méiose. La population de cellules souches est maintenue grâce à un équilibre entre division et différenciation de ces gonies (Hirsh *et al.*, 1976; Nishimiya-Fujisawa et Sugiyama, 1993).

Chez de nombreux organismes et notamment chez les mollusques bivalves, les mécanismes qui permettent le renouvellement de la population de cellules germinales sont inconnus.

La multiplication et la différenciation des GSCs sont contrôlées par des signaux extracellulaires comme la sécrétion d'hormones et des interactions entre GSCs ou avec les cellules environnantes (Lin, 1997). Ces signaux extracellulaires peuvent alors influencer l'expression différentielle de gènes, les mécanismes du cycle cellulaire ou l'organisation du cytosquelette des GSCs impliqués dans leur formation et leur multiplication. Lorsque l'organisme atteint sa maturité sexuelle, les GSCs se différencient en gonies.

1.3 La gamétogenèse

La gamétogenèse est l'ensemble des processus qui conduisent à la formation des gamètes haploïdes, ovules (ovocytes) ou spermatozoïdes à partir des gonies, ovogonies ou spermatogonies (diploïdes). La gamétogenèse comprend deux étapes distinctes : une phase de multiplication mitotique des gonies et une phase de méiose (Alberts *et al.*, 1986). Les différentes étapes de la gamétogenèse sont régulées, en intensité et en durée, par des

mécanismes complexes faisant intervenir des paramètres environnementaux et des facteurs internes.

1.3.1 Le déroulement de la gamétogenèse

1.3.1.1 La spermatogenèse

Au début de la spermatogenèse, les spermatogonies (diploïdes) subissent un nombre défini de mitoses. Chez les vertébrés, ce nombre de divisions peut varier de 4 à 14 (Alberts *et al.*, 1986; Gilbert, 1996). Après cette prolifération, les spermatogonies se différencient en spermatocytes primaires ou spermatocytes I et entrent en prophase I de méiose (Figure 4). L'ADN se réplique pour aboutir au dédoublement des chromosomes en deux chromatides. Les chromosomes homologues s'apparient sur toute leur longueur. Les spermatocytes I sont des cellules tétraploïdes. La division se poursuit pour donner des spermatocytes secondaires ou II (diploïdes). Chaque cellule contient des chromosomes constitués de deux chromatides sœurs. Les deux spermatocytes II subissent la seconde division de méiose pour donner quatre spermatides possédant chacune un nombre haploïde de chromosomes. Les spermatides subissent alors des transformations morphologiques (compaction du noyau...) au cours desquelles ils se différencient en spermatozoïdes matures (Alberts *et al.*, 1986; Gilbert, 1996; Hess, 1999).

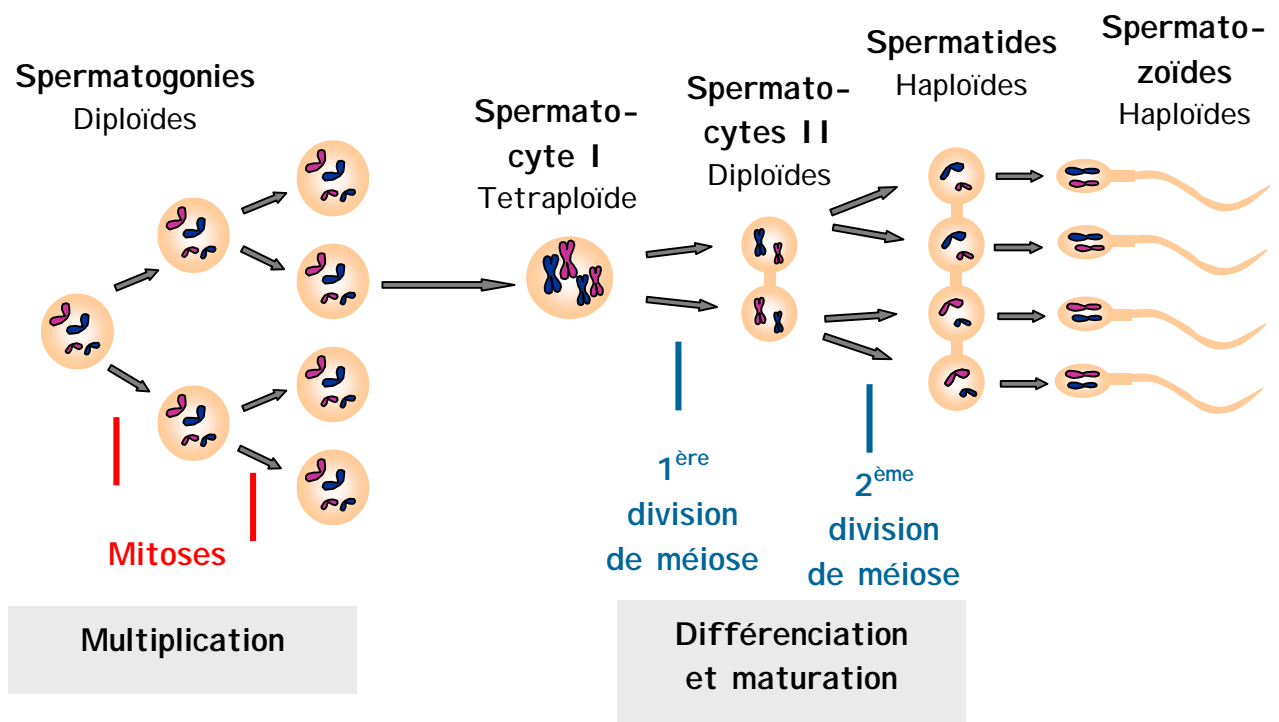


Figure 4 : Les différentes étapes de la spermatogenèse des mollusques.

La spermatogenèse possède une particularité intéressante : la division cytoplasmique des cellules germinales mâles est incomplète pendant la mitose et la méiose, de sorte que toutes les cellules filles restent reliées par des ponts cytoplasmiques qui persistent jusqu'à la différenciation des spermatides. Ceci permet d'expliquer que tous les spermatozoïdes mûrs sont produits de façon synchrone en toute région des tubes séminifères (Figure 4) (Callard et Callard, 1998).

1.3.1.2 L'ovogenèse

Les grandes étapes de l'ovogenèse sont les mêmes que celles de la spermatogenèse. Après une période de multiplication par mitose, les ovogonies (diploïdes) se différencient en ovocytes primaires ou ovocytes I, qui commencent la première division méiotique (Alberts *et al.*, 1986; Gilbert, 1996) (Figure 5). Une fois la réplication de l'ADN effectuée et les chromosomes homologues appariés, la prophase est bloquée pour une période qui varie de quelques jours ou quelques semaines, comme chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, à plusieurs années, comme chez les humains. La vitellogenèse, correspondant à la phase de maturation des ovocytes, débute à la maturité sexuelle de l'organisme. A la reprise de la méiose, les chromosomes se condensent à nouveau, l'enveloppe nucléaire disparaît et les chromosomes répliqués sont répartis entre deux noyaux-fils, dont chacun contient la moitié du nombre initial de chromosomes. Le cytoplasme se divise alors de façon asymétrique pour produire un ovocyte volumineux contenant tous les éléments nécessaires au développement et un globule polaire de petite taille. La seconde division de méiose se produit alors, en général lors de la fécondation. Les deux chromatides sœurs de chaque chromosome se séparent et le cytoplasme de l'ovocyte se divise de nouveau de façon inégale pour donner l'ovocyte mature et un second globule polaire qui possèdent tous deux un nombre haploïde de chromosomes. Les deux globules polaires dégèrent tandis que l'ovocyte est prêt pour la fécondation (Lessman, 1998; Picton et Gosden, 1999).

Alors que les spermatozoïdes ont pour fonction principale de transmettre le matériel génétique à l'œuf lors de la fécondation, l'ovocyte, lui, doit en plus être capable de supporter le développement de l'embryon. Pour cela, il doit accumuler une grande quantité de matériel (ARNm, protéines, vitellus) au cours de la vitellogenèse. Cette croissance rapide de l'ovocyte est possible grâce à un ensemble de mécanismes moléculaires particuliers (Alberts *et al.*, 1986; Gilbert, 1996). Le premier est le maintien d'un jeu diploïde de chromosomes dans l'ovocyte jusqu'à la fin de la maturation, ce qui lui permet de disposer d'une plus grande

quantité d'ADN pour les synthèses d'ARN qu'une cellule somatique en division (Alberts *et al.*, 1986). De plus, dans certains ovocytes, les transcrits des gènes sont produits en plus grand nombre permettant une plus grande accumulation de produits des gènes comme chez le xénope (Alberts *et al.*, 1986). La croissance de l'ovocyte est aussi dépendante de l'activité synthétique d'autres cellules et en particulier des cellules auxiliaires (nourricières ou folliculaires) de l'ovocyte. Chez certains invertébrés et notamment chez les insectes, la division asymétrique des cellules souches aboutit à la formation d'un ovocyte et de plusieurs cellules nourricières. Elles entourent l'ovocyte et communiquent avec lui grâce à des ponts cytoplasmiques qui permettent le passage de macromolécules telles que les ARNm, les ribosomes et les protéines, synthétisées par les cellules nourricières. Chez les vertébrés, les cellules auxiliaires sont des cellules folliculaires qui sont reliées à l'ovocyte par des jonctions communicantes permettant le transfert de petites molécules, précurseurs des macromolécules (Alberts *et al.*, 1986; Gilbert, 1996).

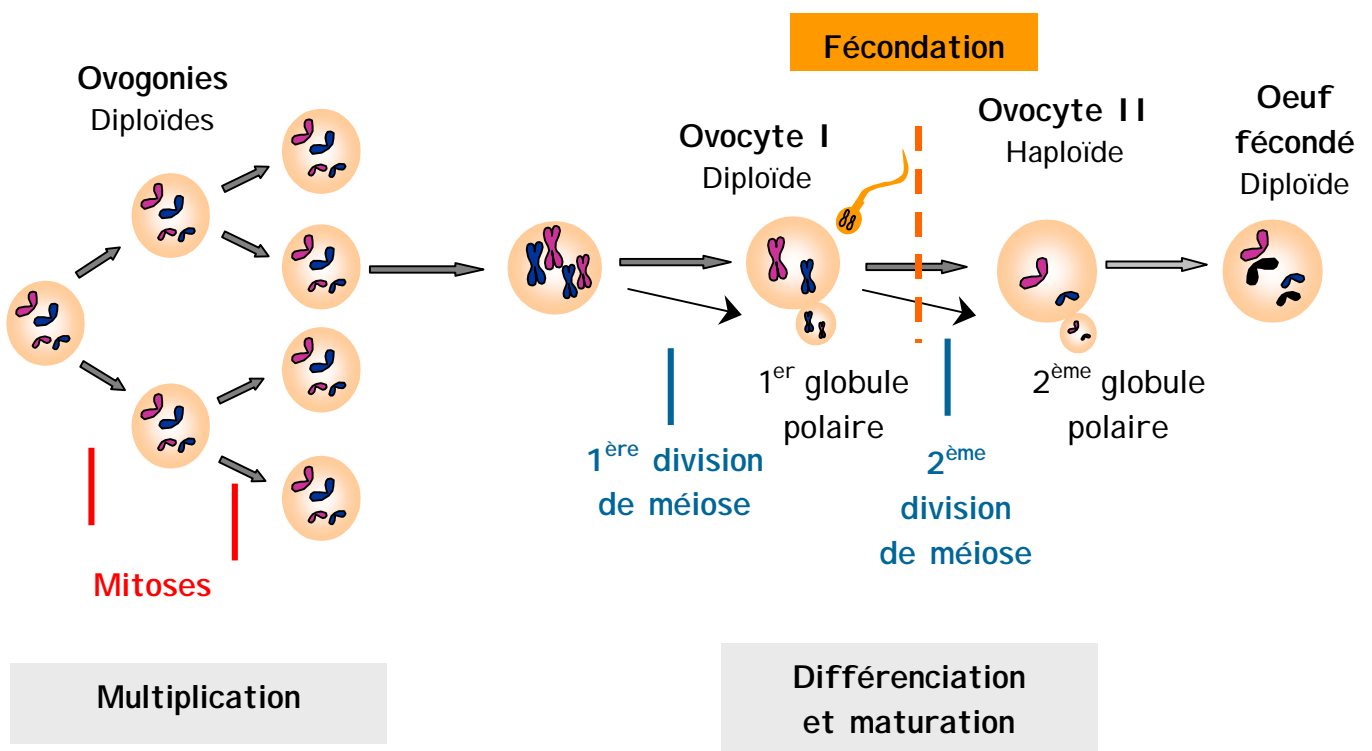


Figure 5 : Les différentes étapes de l'ovogenèse des mollusques.

Lorsque l'ovocyte et le spermatozoïde matures se rencontrent, il y a fécondation. L'œuf commence alors son programme de développement et les noyaux des deux gamètes fusionnent pour achever le processus de reproduction sexuée et former un nouvel individu diploïde (Figure 6).

1.3.2 Rythmicité de la gamétogenèse

Trois grands modes de gamétogenèse se différencient en fonction de leur rythme synchrone, synchrone par groupe ou asynchrone.

Le premier type, le moins répandu, concerne les animaux qui ne se reproduisent qu'une seule fois dans leur vie et meurent après cette reproduction. C'est le cas des lamproies (*Lampetra sp.*) ou des saumons atlantiques (*Salmo salar*) (Lessman, 1998). Chez ces espèces, toutes les cellules germinales souches se divisent et se différencient en une seule fois, et toutes les cellules germinales qui en sont issues partent en gamétogenèse simultanément pour ne former qu'une seule population de gamètes. Un seul stade gamétogénétique est présent dans la gonade à un instant donné, la gamétogenèse est dite synchrone (Lessman, 1998).

Le second type de gamétogenèse est dit synchrone par groupe. Plusieurs populations de cellules germinales, généralement séparées physiquement, sont visibles en même temps dans la gonade. Le développement est synchrone au sein d'une même population *i.e.* toutes les cellules d'une même population sont au même stade de gamétogenèse, alors que les différentes populations sont à des stades de développement différents, comme chez la truite (*Onchorynchus mykiss*), la roussette (*Scyliorhinus canicula*) ou le xénope (Lessman, 1998).

Le dernier type de gamétogenèse, le plus répandu, est dit asynchrone. Chez les animaux qui peuvent se reproduire toute l'année (certains mammifères) ou sur une longue période de l'année, comme certaines espèces tropicales (zebrafish, xénope, huître perlière (*Pinctada margaritifera*)) ou encore chez des animaux des grands fonds marins qui ne perçoivent pas ou peu les signaux saisonniers, la gamétogenèse (mâle et femelle) est asynchrone et continue, *i.e.* les cellules souches se multiplient et se différencient en permanence et partent en gamétogenèse par vagues. Différents stades de cellules germinales sont alors présents simultanément dans la gonade. La gamétogenèse est également asynchrone, mais limitée à une période de l'année, chez la majorité des animaux qui se reproduisent de façon saisonnière, comme les tortues, les lézards, certains poissons comme le carassin (*Carassius auratus*), certains mollusques comme l'huître creuse (*Crassostrea sp.*) (Mc Laren, 1984; Kennedy *et al.*, 1996; Lessman, 1998; Hess, 1999). La gamétogenèse asynchrone (continue ou saisonnière) est centripète dans les tubules gonadiques ; les gonies sont situées du côté basal de la gonade et les cellules sont repoussées vers le centre des tubules au fil de la maturation, les gamètes matures se trouvant au centre, près du canal excréteur par lequel ils seront évacués (Alberts *et al.*, 1986).

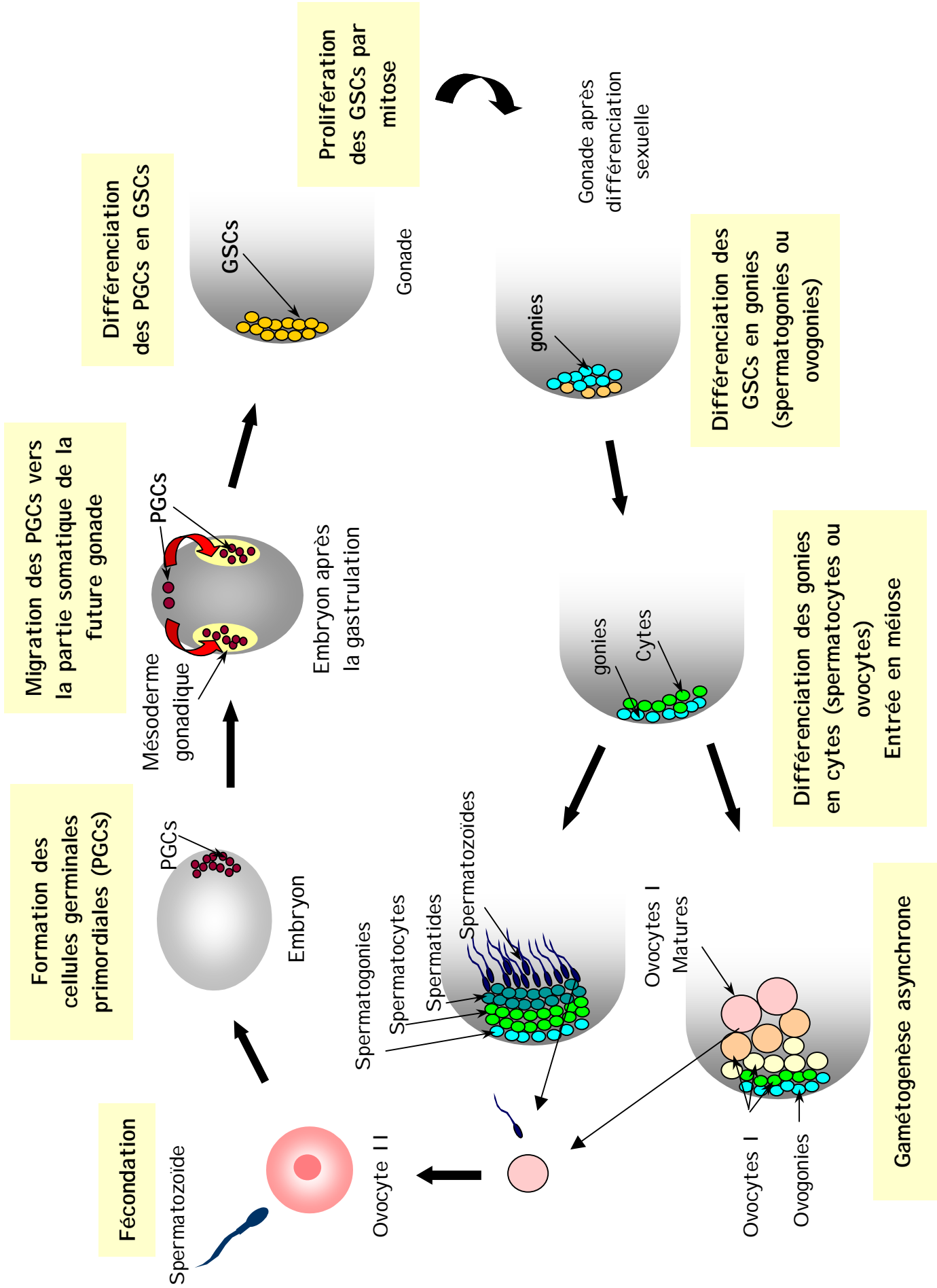


Figure 6 : Développement des cellules germinales, de la fécondation à la maturité sexuelle. PGCs : cellules germinales primordiales, GSCs : cellules germinales souches.

1.3.3 La régulation de la gamétogenèse

Les différentes étapes de la gamétogenèse (initiation, vitellogenèse...) ainsi que la quantité et la qualité des gamètes produits sont contrôlées par un ensemble de facteurs externes, biotiques ou abiotiques, et internes tels que la sécrétion d'hormones ou des interactions cellulaires. Les mécanismes de régulation impliquent souvent des cascades de réactions où les facteurs externes et internes sont en interaction (Dawson, 1999; Goodman, 1999; Nash, 1999; Pearse, 1999; Saber et Saleuddin, 1999).

1.3.3.1 Les facteurs externes

Les facteurs externes jouent un rôle important dans la rythmicité de la gamétogenèse. Dans les environnements stables (température, humidité, photopériode...) comme en milieu tropical, la gamétogenèse est généralement continue. A l'inverse, dans des régions où les saisons sont marquées, la gamétogenèse est régulée de telle sorte que les naissances s'effectuent à la saison la plus favorable pour la survie des jeunes. L'initiation de la gamétogenèse peut être stimulée par des photopériodes de jours courts comme chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Pearse *et al.*, 1986). A l'inverse, chez la jument (*Equus sp.*) et chez les poissons comme le medaka (*Oryzias latipes*) ou le carassin, l'ovogenèse est stimulée par l'augmentation de la photopériode au printemps (Guillaume et Palmer, 1992; Khan et Thomas, 1999). L'ovogenèse et plus particulièrement la maturation des ovocytes, peut être stimulée par des températures élevées notamment chez différentes espèces de mollusques tels que les escargots (*Helix sp.*), les huîtres ou les moules (*Mytilus sp.*) (Lubet, 1981; Griffond *et al.*, 1992; Chavez-Villalba *et al.*, 2002b). D'autres facteurs, tels que la pluviométrie ou la quantité de nourriture disponible, peuvent agir sur la gamétogenèse. Par exemple, chez les amphibiens qui retournent à l'eau pour se reproduire, la pluie est un facteur qui stimule l'ovogenèse. Des études ont montré qu'une nourriture abondante augmentait la fécondité (le nombre de gamètes produits) de différentes espèces de mollusques bivalves telles que l'huître creuse *Crassostrea gigas*, le pétoncle *Argopecten ventricosus* ou la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* (Muranaka et Lannan, 1984; Janzel et Villalaz, 1994; Borcharding, 1995).

1.3.3.2 Les facteurs internes

La régulation de la gamétogenèse par les facteurs internes implique des mécanismes très complexes. Chez de nombreux organismes, la régulation endocrine de la gamétogenèse pourrait être résumée, de manière non exhaustive, par le schéma suivant : les stimuli extérieurs perçus par les organes sensoriels sont intégrés au niveau du système nerveux central et activent le système neuroendocrinien qui sécrète des neurohormones. Ces dernières vont à leur tour agir sur des systèmes périphériques et déclencher la sécrétion d'autres hormones qui agissent sur le système reproducteur. Chez les vertébrés, le principal système de régulation de la gamétogenèse est l'axe hypothalamus - glande hypophyse - gonade. La production de GnRH (gonadolibérine) par l'hypothalamus est stimulée par les facteurs externes, comme l'allongement de la photopériode chez certains mammifères. La GnRH agit ensuite sur l'hypophyse qui sécrète des gonadotropines telles que la LH (hormone luteinisante) ou la FSH (hormone folliculostimulante) chez les tétrapodes ou leurs homologues GTH-I (hormone gonadotrope) et GTH-II chez les poissons (Kawauchi, 1989; Ying et Zhang, 1998). Les gonadotropines agissent ensuite sur les gonades mâles ou femelles et activent la production de plusieurs hormones stéroïdes dont la testostérone chez les mâles, qui stimule la spermatogenèse, et l'œstradiol et la progestérone chez les femelles, qui stimulent l'ovogenèse (Zirkin, 1999). La GnRH peut également avoir un effet paracrine sur la gonade où elle stimule la production d'hormones stéroïdes, la multiplication des spermatogonies chez les mâles (Hsueh et Schaeffer, 1985) et le développement des ovaires chez les femelles (Knecht *et al.*, 1985). Dans les autres embranchements du règne animal, le rôle des hormones dans le contrôle de la gamétogenèse a également été mis en évidence. Chez les insectes, deux hormones majeures ont été décrites : l'ecdysone synthétisée par la glande prothoracique et l'hormone juvénile (JH) synthétisée par le *corpus allantum* (Davey, 1999). Ces deux hormones, dont la synthèse est stimulée par des neuropeptides, contrôlent aussi bien le développement que la reproduction, et notamment la production de vitellogénine par le corps gras. Le développement de l'ovaire est également contrôlé par des ecdystéroïdes sécrétés par les ovaires sous l'effet d'une stimulation par des hormones produites par le cerveau. Chez d'autres invertébrés comme les mollusques, la régulation de la gamétogenèse implique également des hormones et des neurohormones (Lubet et Mathieu, 1982; Mathieu *et al.*, 1994). Chez les mollusques, les hormones sont généralement synthétisées par des cellules neurosécrétrices localisées dans le tissu nerveux (ganglions cérébroïdes, ganglions viscéraux ou corps dorsaux) et elles agissent directement sur les tissus cibles (Joosse et Geraerts, 1983).

Ainsi, chez *Mytilus edulis*, de nombreuses cellules neurosécrétrices, regroupées en 4 types a1, a2, a3 et a4, ont été mises en évidence dans le système nerveux comprenant 3 ganglions (Illanes-Bucher et Lubet, 1980). Le type a1 interviendrait dans le contrôle de la reproduction. De plus, les ganglions cérébroïdes stimulent les mitoses goniales, grâce au facteur GMSF (gonial mitosis stimulating factor), la méiose prévitellogénique, la vitellogenèse ou encore la ponte, déclenchée par la sérotonine (Mathieu *et al.*, 1988; Mathieu *et al.*, 1994). Pazos et Mathieu (1999) indiquent que des peptides GnRH-like présents dans le système nerveux central de la moule *M. edulis* participeraient aux processus de reproduction. En effet, des extraits de GnRH exercent, *in vitro*, un effet mitogène sur des cellules goniales de *M. edulis* et de *C. gigas* et des récepteurs aux peptides GnRH ou GnRH-like ont été mis en évidence chez ces deux espèces (Pazos et Mathieu, 1999). Cependant, le système de régulation interne reste très peu connu chez *C. gigas*.

2. Le gène *vasa*, déterminant et marqueur de la lignée germinale

Cette partie fait la synthèse des études réalisées jusqu'à présent sur le gène *vasa* chez les différents organismes où il a été caractérisé en mettant en évidence les mécanismes de fonctionnement du gène dans le développement de la lignée germinale.

2.1 Introduction

Nous avons vu dans la partie précédente que les cellules germinales assuraient le transfert de l'information génétique d'une génération à l'autre. Elles sont différenciées des cellules somatiques au cours du développement embryonnaire et apparaissent sous la forme d'un petit nombre de cellules germinales primordiales, les PGCs (primordial germ cells) (Wylie, 1999). Les PGCs sont formées hors de la future gonade et migrent vers celle-ci à partir de la gastrulation (Saffman et Lasko, 1999). Puis, les PGCs se différencient en cellules germinales souches, les GSCs, qui deviennent des ovogonies ou des spermatogonies lors de la différenciation sexuelle des individus (Wylie, 1999). Les cellules germinales entrent alors dans les processus complexes de l'ovogenèse ou de la spermatogenèse comprenant une phase de prolifération mitotique et une phase de division méiotique, pour aboutir à la formation des gamètes.

La différenciation et la formation des PGCs sont contrôlées par des mécanismes moléculaires complexes impliquant les produits de tout un ensemble de gènes, dont *vasa*, *nanos*, *mago*, *nashi*, *bruno*, *boule* ou *staufen* (Saffman et Lasko, 1999). Des orthologues de chacun de ces gènes ("gènes orthologues" signifie : gènes ayant la même fonction dans des espèces différentes), généralement caractérisés chez la drosophile, ont été mis en évidence chez plusieurs espèces dont le xénope (*Xenopus laevis*), le zebrafish (*Danio rerio*), *Caenorhabditis* (*Caenorhabditis elegans*), la souris (*Mus musculus*) ou encore l'homme (*Homo sapiens*). L'un des déterminants majeurs de la lignée germinale est le gène *vasa* caractérisé chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Hay *et al.*, 1988; Lasko et Ashburner, 1988). Ce gène a été très conservé au cours de l'évolution et de nombreux

orthologues ont été caractérisés dans tout le règne animal depuis les invertébrés diploblastiques jusqu'aux vertébrés mammifères. Nous pouvons citer par exemple le gène *Cnvas* chez *Hydra magnipapillata*, *Povas-1* chez *Ephydatia fluviatilis*, *Ci-DEAD1* chez *Ciona intestinalis*, *glh-1* chez *Caenorhabditis elegans*, *Bmvlg* chez *Bombyx mori*, *vas* chez *Danio rerio*, *Xvlg-1* chez *Xenopus laevis*, *Cvh* chez *Gallus gallus*, *Mvh* chez *Mus musculus*, *vasa* chez *Homo sapiens* (Roussel et Bennett, 1993; Komiya *et al.*, 1994; Gruidl *et al.*, 1996; Ikenishi *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997; Nakao, 1999; Castrillon *et al.*, 2000; Fujimura et Takamura, 2000; Toyooka *et al.*, 2000; Tsunekawa *et al.*, 2000; Mochizuki *et al.*, 2001). Chez tous ces organismes, *vasa* est spécifiquement exprimé dans les cellules germinales et il est essentiel à leur formation. Quelques exceptions seront développées dans le paragraphe 2.6. Son expression spécifique dans les cellules germinales, son rôle dans leur développement et sa forte conservation au cours de l'évolution, font de *vasa* un marqueur de choix pour l'étude de la lignée germinale.

2.2 La famille protéique des DEAD-box

Vasa est un membre de la famille protéique des DEAD-box (Linder *et al.*, 1989). Le regroupement des protéines dans cette famille est basé sur leur homologie pour la séquence Asp-Glu-Ala-Asp (D-E-A-D) (Schmid et Linder, 1992). Le gène servant de référence à la famille protéique des DEAD-box est le facteur d'initiation de la traduction "eIF-4A" des mammifères (Pause et Sonenberg, 1992). C'est à partir de ce gène que les fonctions biochimiques des protéines DEAD-box ont été étudiées. Toutes ces protéines ont en commun huit séquences consensus, dont le motif D-E-A-D qui a donné son nom à la famille (Figure 7).

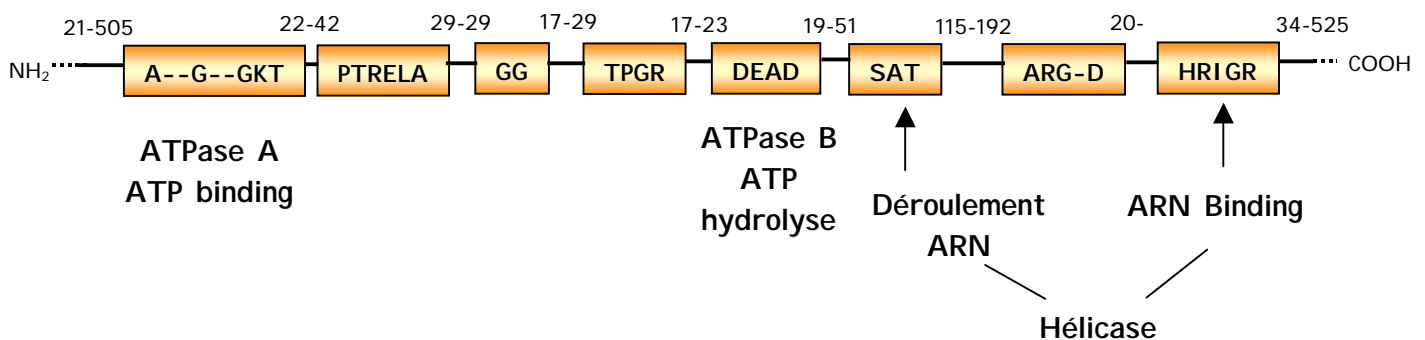


Figure 7 : Schéma des séquences consensus des DEAD-box protéines d'après Schmid et Linder (1992). Les chiffres indiquent le nombre d'acides aminés qui séparent les différentes séquences consensus des protéines de la famille des DEAD-box. Les fonctions biochimiques connues sont indiquées en gras sous les séquences. Binding = liaison et transport.

Les DEAD-box protéines ont un rôle supposé d'hélicase de l'ARN ATP-dépendante ce qui signifie qu'elles déroulent les structures secondaires des molécules d'ARN. La fonction d'hydrolyse et/ou de transport de l'ATP leur est conférée par les motifs conservés ATPase-A (AXXGXGKT) et ATPase-B (DEAD) (Linder *et al.*, 1989) et la fonction d'hélicase est due aux motifs SAT et HRIGR. Les hélicases permettent de dérouler les structures secondaires des ARN, condition *sine qua non* à leur traduction ; elles jouent un rôle essentiel dans la vie des cellules, interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'épissage de l'ARN, l'assemblage des ribosomes, l'initiation de la traduction, l'embryogenèse, la croissance et la division cellulaire (Linder *et al.*, 1989; Schmid et Linder, 1992). La famille protéique des DEAD-box comprend plusieurs groupes de protéines tels que eIF-4A de la souris impliqué dans l'initiation de la traduction, p68 de l'homme participant à la croissance et à la division cellulaire, PL10 de la souris intervenant dans la spermatogenèse ou encore VASA de la drosophile impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle de gènes responsables de la formation et la différenciation des cellules germinales (Schmid et Linder, 1992). Les protéines VASA ont, en plus de leur fonction d'hélicase, une fonction de liaison à l'ARN *i.e.* de "RNA-binding protein". Leur région N-terminale est riche en glycine et très hydrophile, comme pour de nombreuses protéines fixatrices d'ARN ("RNA-binding proteins") (Ghisolfi *et al.*, 1992). De même, leur région C-terminale est riche en résidus acides, glutamate ou aspartate, propriété retrouvée chez plusieurs protéines transporteuses d'acides nucléiques simple brin (Hay *et al.*, 1988). L'activité de liaison à l'ARN permet d'agir sur ces molécules en facilitant ou en bloquant les interactions avec des facteurs de trans-régulation ou encore de fournir des signaux de localisation pour le transport des ARNm dans des régions déterminées des cellules où ils pourront être transcrits (Siomi et Dreyfuss, 1997).

2.3 Le gène *vasa* dans le règne animal

2.3.1 Origine du gène *vasa*

Selon Leroy *et al.* (1989), l'ancêtre du gène *vasa* dériverait d'un ancien homologue du gène PL10 actuel. Le gène PL10 est un membre des DEAD-box protéines intervenant dans la différenciation cellulaire de la lignée germinale mâle. *Vasa* n'aurait acquis sa spécificité dans les cellules germinales mâles et femelles qu'après la duplication de son ancêtre commun avec

PL10. Cette séparation aurait eu lieu avant l'apparition des éponges (diploblastiques) mais après la divergence des champignons et des plantes. En effet, aucun orthologue du gène *vasa* n'a été identifié ni chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (génome entier) ni chez la plante *Arabidopsis thaliana*. Cependant, aucune autre étude n'a été réalisée ni chez les champignons ni chez les plantes (Mochizuki *et al.*, 2001).

2.3.2 Structure du gène

La structure complète du gène *vasa* n'a été déterminée que pour deux organismes. Chez la drosophile, *vasa* est formée de 7 exons et 6 introns (5 petits de 53, 58, 57, 63 et 70 pb et 1 grand de 3,5 Kb) (Hay *et al.*, 1988). Chez le zebrafish, le gène *vasa* s'étend sur 25 Kb et comprend 27 exons qui varient entre 27 et 729 pb (Krovel et Olsen, 2002).

Différentes régions régulatrices du gène ont pu être mises en évidence. Chez la drosophile, il a été démontré qu'une région régulatrice de 40 pb située dans la zone promotrice de *vasa* entre les positions -57 et -96 pb du gène contrôle l'expression spécifique de *vasa* dans les cellules germinales pendant l'ovogenèse et dans le cytoplasme germinal durant l'embryogenèse. Ceci suggère que des mécanismes cellulaires similaires régissent l'expression de *vasa* dans les cellules germinales aux stades adulte et embryonnaire (Sano *et al.*, 2002). De même, un élément de localisation de la région 3'UTR des séquences des gènes *vasa* du zebrafish et du xénope contrôlent la localisation des ARNm de *vasa* dans les granules polaires. Cet élément a été perdu au cours de l'évolution des téléostéens. Ainsi, chez le medaka ou la truite, apparus plus tardivement que le zebrafish au cours de l'évolution, les ARNm de *vasa* n'apparaissent pas localisés dans les granules (Knaut *et al.*, 2000).

Chez la drosophile, un épissage alternatif de *vasa* aboutit à la formation de trois formes de transcrits, la forme majeure de 2 Kb et deux formes mineures de 4 Kb et 2 Kb environ. La forme majeure et la forme mineure de 4 Kb sont particulièrement abondantes chez les femelles adultes et les jeunes embryons de 0 à 3 heures après fécondation alors que la troisième forme est plus intensément exprimée dans les embryons de 6 à 24 heures (Lasko et Ashburner, 1990). Chez le poisson tilapia (*Oreochromis niloticus*), l'épissage alternatif donne deux formes d'ARNm de *vasa* (*vas* et *vas-s*). *Vas-s* est une forme raccourcie de *vas* dans sa région 5'. L'expression des deux formes est dépendante du sexe et du stade de développement des poissons. La forme *vas-s* domine dans les ovaires alors que *vas* est prédominante dans les testicules et dans les PGCs localisées, l'expression de *vas-s* est dominante (Kobayashi *et al.*, 2002).

2.4 Rôle de *vasa* dans la formation des cellules germinales

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, chez la majorité des organismes étudiés, les PGCs sont différenciées dès les premiers stades embryonnaires par la localisation de déterminants maternels (ARNm et protéines) dans le cytoplasme germinal de l'embryon. Chez ces espèces, *vasa* apparaît être l'un des déterminants de la lignée germinale. Il existe d'autres systèmes de différenciation des cellules germinales qui mettent en jeu des interactions cellulaires ou la localisation des futures PGCs dans une zone définie de l'embryon (mammifères). Dans ce cas, *vasa* semble n'avoir qu'un rôle mineur dans la mise en place des cellules germinales (Wylie, 1999).

2.4.1 *Vasa* déterminant de la lignée germinale

La stratégie de détermination de la lignée germinale est espèce-dépendante. Suivant les organismes, ce sont soit les protéines VASA soit les transcrits de *vasa* qui assurent la fonction de déterminants de la lignée germinale. Ainsi, lorsque la protéine VASA (d'origine maternelle) est le déterminant de la lignée germinale, elle est localisée spécifiquement dans le cytoplasme germinal dès le début du développement alors que les transcrits maternels *vasa* sont répartis de façon homogène dans tout l'embryon. Il faut attendre la formation des PGCs à la gastrulation et le début de l'expression zygotique des gènes pour observer la localisation spécifique des transcrits dans les cellules germinales. Le phénomène est inversé lorsque ce sont les transcrits de *vasa* qui sont les déterminants de la lignée germinale : les transcrits maternels sont localisés dès le début du développement embryonnaire où les PGCs seront formées alors que les protéines VASA sont réparties dans tout l'embryon (Raz, 2000).

Dans les deux cas, *vasa* est systématiquement associé au cytoplasme polaire des embryons et il apparaît être essentiel à la spécification de la lignée germinale. Ainsi, chez la drosophile, les embryons issus d'une femelle homozygote mutant pour *vasa* ne produisent pas la protéine VASA et ne forment pas de cellules germinales (Hay *et al.*, 1988; Lasko et Ashburner, 1988).

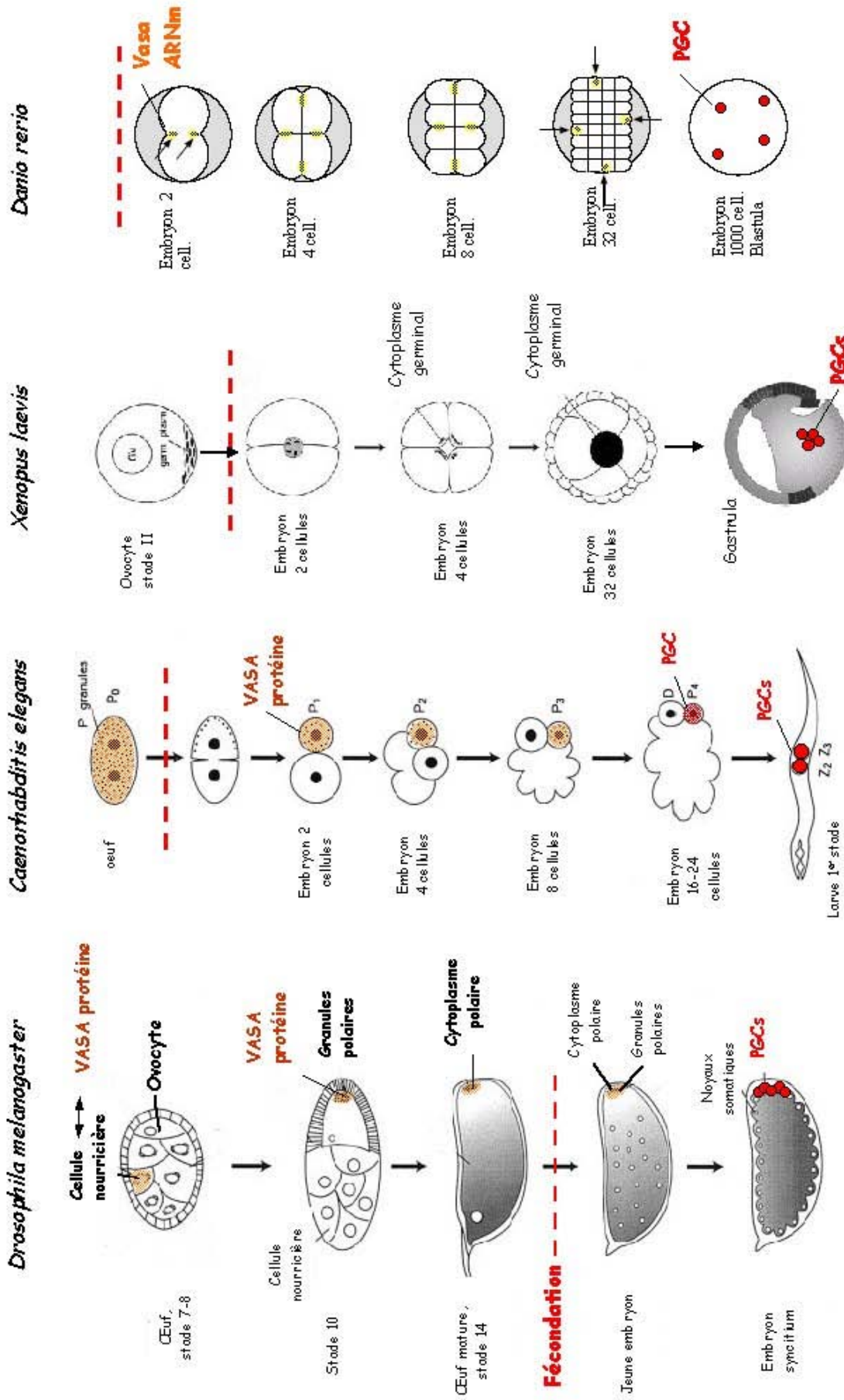
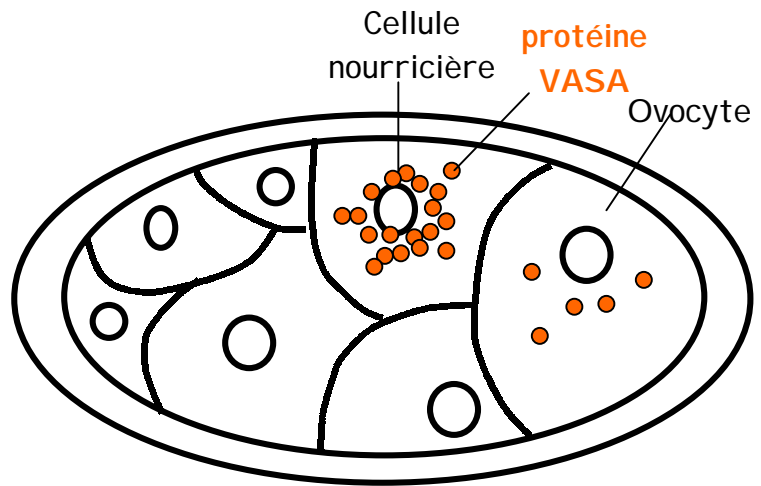


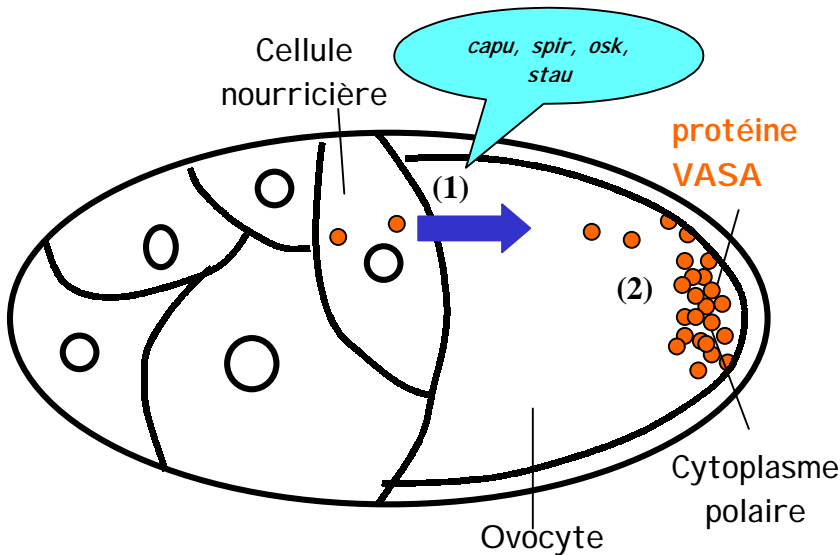
Figure 8 : Localisation des ARNm (jaune) et des protéines (orange) de *vasa*, et des PGCs (rouge) au cours du développement embryonnaire de *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Xenopus* et *Danio*, d'après Saffman et Lasko (1999), Yoon et al. (1997).

Début de l'ovogenèse

Localisation de VASA dans la région périnucléaire des cellules nourricières



Seconde moitié de l'ovogenèse, ovocyte stade 10



(1) Transfert de VASA des cellules nourricières à l'ovocyte et
(2) localisation de VASA dans la région postérieure de l'ovocyte. Assemblage des granules polaires au pôle postérieur de l'ovocyte

Jeune embryon, après fécondation

(1) Interaction VASA-OSKAR = 1ère étape de l'assemblage des granules polaires
(2) VASA agit en tant que ARN binding-protéine sur les ARNm *nanos* pour permettre (3) leur traduction et (4) leur localisation dans les granules polaires au niveau du cytoplasme polaire

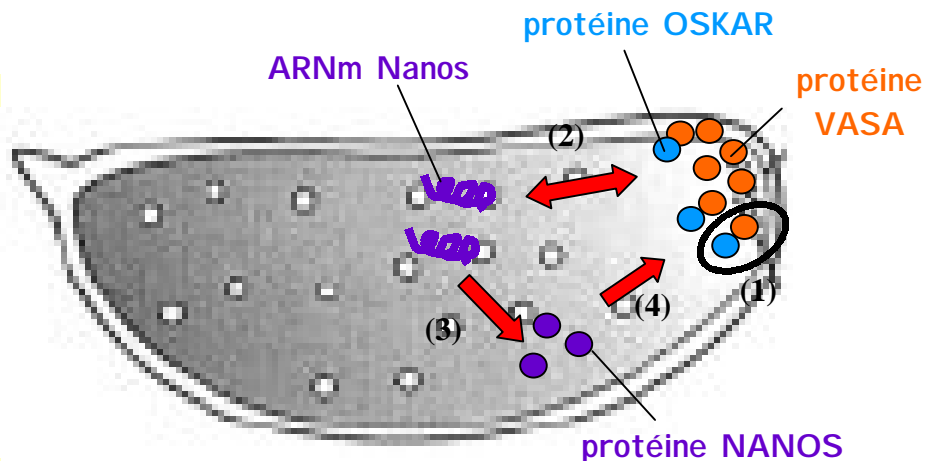


Figure 9 : Localisation et action de VASA dans l'ovocyte et dans le jeune embryon de drosophile.

2.4.1.1 La protéine VASA : déterminant de la lignée germinale

La protéine VASA assure la fonction de déterminant de la lignée germinale chez la majorité des espèces étudiées (Figure 8). Chez la drosophile, la protéine VASA d'origine maternelle est localisée, dès les premiers stades du développement, dans le cytoplasme polaire (terme désignant le cytoplasme germinal chez la drosophile) dans la partie postérieure des embryons (Hay *et al.*, 1988; Lasko et Ashburner, 1988; Hay *et al.*, 1990; Liang *et al.*, 1994) puis dans les cellules polaires (nom désignant les PGCs) lors de leur formation (Hay *et al.*, 1988). Les ARNm maternels de *vasa*, eux ne sont pas localisés et ils sont rapidement dégradés. Les transcrits zygotiques de *vasa*, détectés à partir de la gastrulation, sont alors spécifiquement exprimés dans les PGCs (Van Doren *et al.*, 1998). Des études fonctionnelles réalisées chez la drosophile ont montré que l'assemblage du cytoplasme polaire, faisait intervenir directement ou indirectement une douzaine de gènes maternels dont les gènes *cappuccino*, *spire*, *tudor*, *oskar*, *staufer*, *vasa*, *valois* (Mahowald, 1968; Illmensee et Mahowald, 1974; Okada *et al.*, 1974). C'est la localisation des produits de ces gènes (ARNm ou protéines) au niveau du cytoplasme polaire qui en fait des déterminants de la lignée germinale. VASA intervient à un niveau intermédiaire dans la cascade de réactions aboutissant à la formation du cytoplasme polaire. Le recrutement de VASA au niveau du cytoplasme polaire nécessite une interaction avec la protéine OSKAR. Après sa localisation, la protéine VASA, en interaction avec OSKAR, permet la localisation des autres composants des granules polaires en agissant sur les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle des gènes (Figure 9) (Hay *et al.*, 1988; Lasko et Ashburner, 1988; 1990; Liang *et al.*, 1994). Ainsi, la traduction des ARNm *nanos* est indispensable à leur localisation dans le cytoplasme polaire, or elle est bloquée par l'action d'un élément de contrôle (TCE = translational control element) dans la région 3'UTR du gène. VASA agit en tant qu'hélicase de l'ARN sur cette zone pour lever cette inhibition et permettre la traduction du gène *nanos* puis la localisation de sa protéine (Figure 9).

Chez *Caenorhabditis*, la protéine GLH-1 (germ line helicase-1), orthologue de *vasa*, est également un déterminant de la lignée germinale et elle est spécifiquement localisée dans les granules P, équivalent au cytoplasme germinal. Pendant la première division embryonnaire, GLH-1 et les granules P ségrègent de façon asymétrique dans la cellule fondatrice P4 de la lignée germinale (Roussel et Bennett, 1993; Gruidl *et al.*, 1996; Kuznicki *et al.*, 2000). A l'inverse, les ARNm *glh-1* sont exprimés dans toutes les cellules des jeunes

embryons (Figure 8). Chez le xénope, la protéine XVLG-1 (*Xenopus vasa-like gene-1*) interviendrait dans la traduction d'ARNm essentiels à la détermination des cellules germinales (Ikenishi et Tanaka, 1997; Ikenishi et Tanaka, 2000). Ceci a été démontré grâce à l'analyse d'une protéine XVLG-1 dont l'activité a été perturbée par l'injection *in vivo* d'un anticorps anti-XVLG-1 (Ikenishi et Tanaka, 1997).

2.4.1.2 Les ARNm *vasa* : déterminants de la lignée germinale

Lorsque la protéine VASA n'est pas un déterminant de la lignée germinale, ce sont les ARNm qui assurent cette fonction. Les ARN maternels du gène *vasa* du zebrafish sont localisés précisément le long des deux premiers plans de clivage des blastomères de l'embryon (Yoon *et al.*, 1997; Krovel et Olsen, 2002) puis ils se condensent dans 4 blastomères au stade 32 cellules et restent ainsi localisés par le jeu de divisions cellulaires asymétriques où seule une cellule fille hérite des ARNm de *vasa* (Figure 8). Ces agrégats d'ARNm forment des granules denses correspondant au cytoplasme germinal (Knaut *et al.*, 2000). Au stade 1000 cellules, les 4 groupes se condensent et sont incorporés aux PGCs en formation (Yoon *et al.*, 1997). Une ablation des 4 zones de cytoplasme contenant les transcrits *vasa* empêchent la formation des PGCs (Hashimoto *et al.*, 2004). L'expression très localisée des ARNm de *vasa* le long du plan de clivage chez le zebrafish est une situation très particulière qui n'est retrouvée que chez peu d'espèces comme par exemple le carassin (*Carassius auratus*) (Otani *et al.*, 2002). A l'inverse, la protéine VASA est largement répartie dans tout l'embryon du zebrafish au début de son développement. Il faut attendre la gastrulation et la formation des PGCs pour que VASA soit localisée spécifiquement dans les cellules germinales (Knaut *et al.*, 2000). Des mécanismes post-transcriptionnels de dégradation-protection agissent sur les ARNm et les protéines de *vasa* du zebrafish permettant leur maintien dans les PGCs et leur dégradation dans les cellules somatiques (Wolke *et al.*, 2002). Avant la formation des PGCs, la régulation se fait par l'enrichissement de quatre agrégats de cytoplasme germinal en ARNm maternels, comme décrit ci-dessus. Après le début de l'expression zygotique, les ARNm et protéines *vasa* sont maintenus dans les PGCs et sont spécifiquement dégradés dans le soma (Wolke *et al.*, 2002).

2.4.2 Autres mécanismes de détermination de la lignée germinale

La protéine MVH (murine *vasa* homologue), utilisée comme marqueur des cellules germinales chez la souris, est détectée uniquement après la gastrulation dans quelques cellules au niveau des crêtes génitales (Fujiwara *et al.*, 1994; Toyooka *et al.*, 2000). Pourtant, les premières cellules présentant une forte activité phosphatase alcaline, caractéristique des cellules germinales des mammifères, sont observées dès la date 7,25 jours post-coïtum, au moment de la gastrulation. A la date 8 jpc (jours post-coïtum), ces cellules entament une migration vers le mésoderme à l'arrière de l'embryon puis à travers l'endoderme pour coloniser les ébauches génitales à 10.5-11.5 dpc. Considérant que la localisation de *vasa* dans la zone du cytoplasme où vont se former les cellules germinales est essentielle à la différenciation des cellules germinales dans les autres phylums, Toyooka *et al.* (2000) ont supposé que la détermination des cellules germinales chez les mammifères s'effectue après leur migration vers la gonade et qu'elle est contrôlée par des interactions cellulaires avec les cellules somatiques (comme c'est le cas pour la différenciation sexuelle). Chez l'homme, VASA est exprimée dans les PGCs plus tôt que chez la souris puisque la première expression est détectée pendant leur migration (Castrillon *et al.*, 2000). Toutefois, le rôle exact de *vasa* dans la détermination de la lignée germinale chez les mammifères reste inconnu.

Un processus de différenciation des cellules germinales particulier a été mis en évidence chez l'acarien *Tetranychus urticae*. L'analyse de l'expression de *Tu-vasa* (*Tetranychus urticae-vasa*) a permis de mettre en évidence que chez cette espèce, les PGCs ne se différencieraient pas à partir d'un cytoplasme germinal mais à partir d'une population de cellules (exprimant *Tu-vasa*) exclues du blastomère initial de l'embryon. L'expression de *vasa* et la spéciation de ces cellules en cellules germinales pourraient être déclenchées par leur localisation en dehors du blastomère (Dearden *et al.*, 2003).

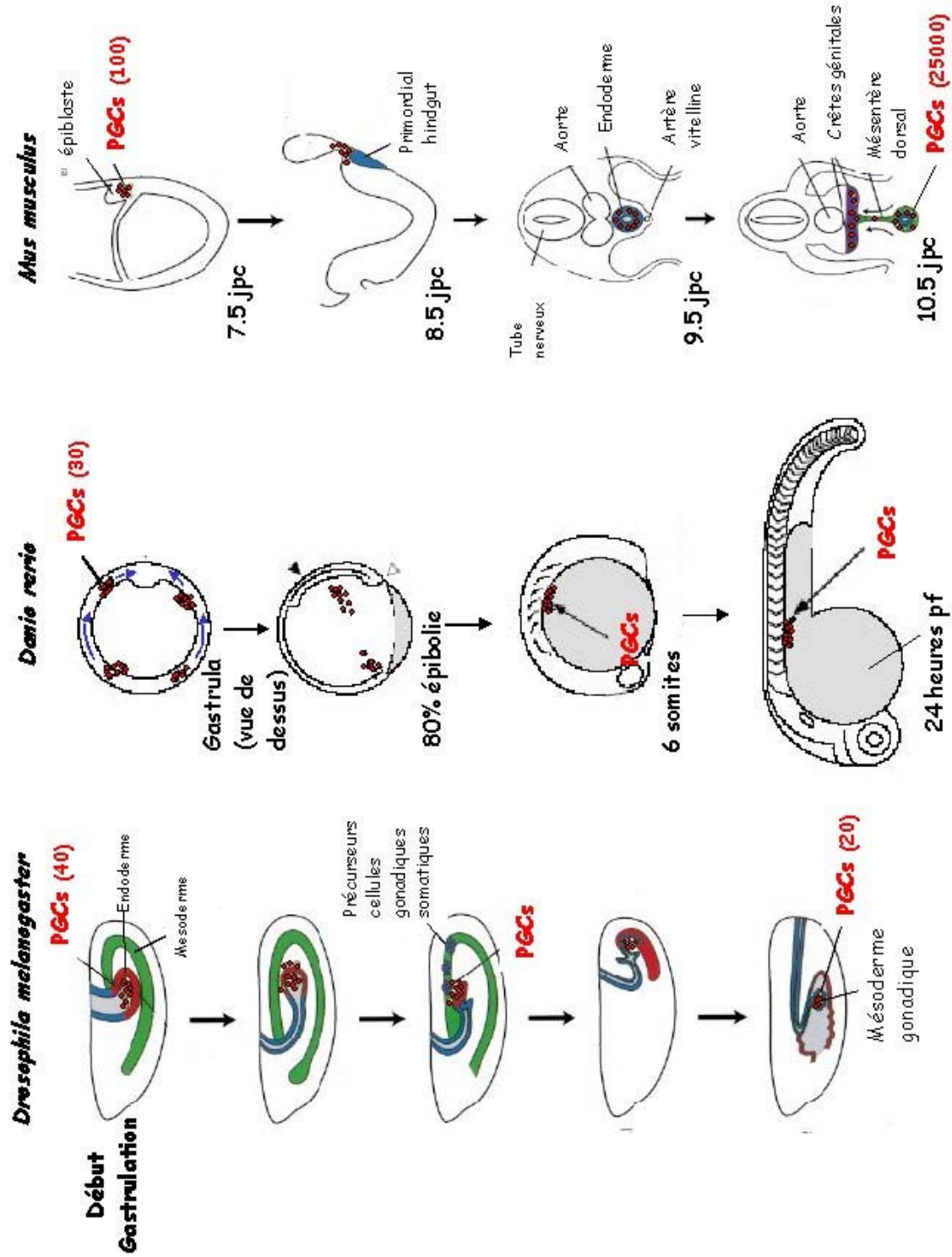


Figure 10 : Migration des PGCs chez différents organismes modèles *Drosophila*, *Danio*, *Mus*. PGCs : cellules germinales primordiales. *Vasa* est exprimé dans toutes les PGCs en migration. D'après Saffman et Lasko (1999); Yonn et al. (1997).

2.4.3 *Vasa* marqueur de la migration des PGCs

L'utilisation de *vasa* comme marqueur des PGCs a permis d'élucider ou de confirmer les voies de migration de ces cellules, ainsi que leur mode de prolifération chez beaucoup d'espèces. Le mode général de migration des PGCs est le suivant : les PGCs s'invaginent d'abord passivement suivant les mouvements morphogénétiques des différentes couches cellulaires au cours de la gastrulation, depuis leur zone de formation vers l'intérieur de l'embryon près de l'intestin en formation. Les PGCs migrent alors activement le long ou au travers des couches cellulaires puis se séparent en deux groupes pour rejoindre les ébauches gonadiques mésodermiques situées bilatéralement par rapport à l'axe du corps de l'animal (Saffman et Lasko, 1999) (Figure 10). Chez le zebrafish, l'analyse des ARNm de *vasa in situ* (Olsen *et al.*, 1997; Weidinger *et al.*, 1999) et de l'expression de la protéine VASA par immunohistochimie (Braat *et al.*, 2000) ont montré que les PGCs, formées en quatre points différents, migrent dans différentes directions pendant la gastrulation pour arriver finalement au même endroit, le long du mésoderme du tronc de l'embryon. Puis elles se séparent en deux groupes répartis bilatéralement par rapport à l'axe du corps et migrent vers les ébauches gonadiques en formation (Weidinger *et al.*, 2002; Raz, 2003) (Figure 10). Une prolifération des PGCs est observée avant ou pendant la migration. En parallèle, une partie des PGCs est perdue au cours de la migration (Wylie, 1999). Ainsi, les 4 PGCs formées initialement se divisent pour donner environ 30 PGCs chez le zebrafish. Des 40 PGCs présentes dans l'embryon de drosophile avant migration, il n'en reste qu'une vingtaine après migration alors que chez la souris, elles passent d'une centaine avant migration à environ 25 000 après leur positionnement dans les crêtes génitales (Saffman et Lasko, 1999; Raz, 2003).

2.5 Rôle de *vasa* au cours de la gamétogenèse

Vasa intervient à deux étapes distinctes durant l'ovogenèse chez la drosophile, alors qu'il n'a pas de fonction particulière pendant la spermatogenèse (Lasko et Ashburner, 1990). Au début de l'ovogenèse, VASA, très exprimée dans les ovocytes et dans les cellules nourricières, est nécessaire à la différenciation et au développement des cellules germinales (Figures 8 et 9). Ainsi, une femelle homozygote mutante pour *vasa* arrête son ovogenèse dans les premiers stades de la vitellogenèse. (Hay *et al.*, 1990; Styhler *et al.*, 1998). Dans la seconde moitié de l'ovogenèse *vasa* est nécessaire à l'assemblage des granules polaires au pôle postérieur de l'ovocyte, précurseurs du cytoplasme germinal. L'assemblage des granules polaires s'effectue d'abord dans les cellules nourricières (Hay *et al.*, 1988) qui transmettent ensuite l'essentiel de leur cytoplasme aux ovocytes grâce à des ponts cytoplasmiques situés dans la partie postérieure des ovocytes. VASA s'accumule alors dans la partie postérieure des ovocytes où les granules polaires seront assemblés. Une fois localisée, VASA a une fonction d'accrochage et de transport des ARNm pour localiser les autres composants des granules polaires dans la partie postérieure de l'ovocyte. Ainsi chez un individu portant un allèle hypomorphique *vasa*^{PD}, pour lequel le gène *vasa* est sous-exprimé, les granules polaires ne sont pas assemblés ou pas localisés (Hay *et al.*, 1990). Tous les composants des granules polaires sont ensuite transmis à l'embryon lors de la fécondation.

Vasa n'intervient pas dans l'ovogenèse des mammifères par contre il est indispensable à leur spermatogenèse et plus particulièrement à la différenciation des spermatocytes (Tanaka *et al.*, 2000). En effet, des mâles de souris mutants pour *mvh* (mouse *vasa* homologue) qui ne synthétisent pas la protéine MVH sont stériles car ils arrêtent la spermatogenèse dans la phase préméiotique alors que des femelles mutantes pour le même gène sont fertiles (Fujiwara *et al.*, 1994; Toyooka *et al.*, 2000). Chez les mammifères, *vasa* aurait la même fonction moléculaire que chez la drosophile, il agirait en tant que régulateur de la traduction de différents ARNm cibles impliqués dans la différenciation des cellules germinales (Tanaka *et al.*, 2000).

En règle générale, l'expression de *vasa* (ARNm et protéine) est maximale au début de la gamétogenèse, dans les gonies (ovogonies ou spermatogonies) et les cytes en début de méiose (ovocytes prévitellogéniques ou spermatocytes). L'expression diminue puis disparaît dans les cellules germinales en maturation (ovocytes en vitellogenèse ou spermatides,

ovocytes matures ou spermatozoïdes). Ce profil d'expression est rencontré chez la majorité des organismes étudiés, comme par exemple chez la drosophile, le criquet (*Schistocerca gregaria*), le planaire (*Dugesia japonica*), l'ascidie (*Ciona intestinalis*), les poissons medaka et tilapia, le xénope ou encore le poulet (Lasko et Ashburner, 1988; Komiya *et al.*, 1994; Shibata *et al.*, 1999; Fujimura et Takamura, 2000; Kobayashi *et al.*, 2000; Shinomiya *et al.*, 2000; Tsunekawa *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2002) et serait à mettre en relation avec la fonction physiologique de *vasa* au début de la gaméto-genèse décrite chez la drosophile (Hay *et al.*, 1990) et présentée ci-dessus. A l'inverse, chez *Caenorhabditis*, les ARN *glh-1* sont détectés spécifiquement dans les cellules de la lignée germinale depuis les premières cellules qui se divisent par mitose jusqu'aux gamètes (Gruidl *et al.*, 1996).

Chez les espèces de vertébrés et d'invertébrés où la différenciation des cellules germinales dépend de facteurs maternels, l'expression de *vasa* qui est absente dans les ovocytes vitellogéniques, reprend dans les ovocytes matures avant la fécondation afin que les produits du gène (protéines et ARNm) soient transmis à l'embryon lors de la fécondation. Les produits de *vasa* synthétisés dans l'ovocyte et parfois transmis par les cellules nourricières, comme chez la drosophile, sont regroupés dans des structures granuleuses dans le cytoplasme périnucléaire de l'ovocyte. Elles correspondent aux précurseurs du cytoplasme germinal des embryons. Ces structures sont appelées granules polaires chez la drosophile, granules P chez *Caenorhabditis* et ont été décrites chez l'hydre comme "une accumulation de transcrits de *vasa* dans l'œuf non fécondé" ou encore comme "des structures granulo-fibreuses associées à des mitochondries dans les ovocytes" chez le poulet (Hay *et al.*, 1988; Gruidl *et al.*, 1996; Tsunekawa *et al.*, 2000; Mochizuki *et al.*, 2001). Chez le zebrafish et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), les transcrits maternels de *vasa* sont détectés dans les œufs fertilisés (Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997; Shinomiya *et al.*, 2000) et sont localisés dans des structures similaires aux granules polaires (Knaut *et al.*, 2000).

Nous avons vu dans la première partie que les ovocytes sont souvent accompagnés de cellules auxiliaires nourricières, en particulier chez les insectes. En raison de leur rôle nourricier pour l'ovocyte (apport, entre autres, des produits du gène *vasa*) et de leur origine cellulaire commune avec ces derniers, les cellules nourricières expriment le gène *vasa* (Hay *et al.*, 1988). Chez le ver à soie (*Bombyx mori*) et l'hydre les orthologues de *vasa* sont également exprimés dans les cellules nourricières au cours de la vitellogenèse (Nakao, 1999; Mochizuki *et al.*, 2001).

2.6 Quelques fonctions particulières de *vasa*

2.6.1 Conservation de la totipotence des cellules

Vasa participerait à la conservation de la totipotence des cellules en inhibant l'expression de gènes conduisant à la différenciation somatique (Raz, 2000). Chez le planaire, organisme capable de régénération, *Djvlg-A* (*Dugesia japonica vasa-like gene A*) est exprimé dans les cellules germinales mais également dans les néoblastes des cellules somatiques totipotentes (Shibata *et al.*, 1999). Les néoblastes contiennent un cytoplasme particulier contenant des corps chromatoides présentant des caractéristiques similaires aux granules germinaux. Quand une cellule totipotente se différencie, les corps chromatoides disparaissent. Parallèlement, au fur et à mesure que la cellule se différencie, l'expression de *Djvlg-A* diminue puis disparaît. Il est fort probable que la protéine DjVlg-A soit un composant des corps chromatoides impliqué dans la régulation de la traduction d'ARNm responsables de la différenciation des cellules somatiques totipotentes (Shibata *et al.*, 1999). Chez l'hydre, *Cnvas-1* (Cnidarian *vasa*) est exprimé dans les cellules souches de la lignée germinale mais aussi dans les cellules souches multipotentes jusqu'à leur différenciation en cellules somatiques (Mochizuki *et al.*, 2001).

2.6.2 La différenciation des cellules somatiques

Quelques cas d'expression de *vasa* dans les cellules somatiques ont été rapportés. Chez le xénope, *Xvlg-1* pourrait être impliqué dans la différenciation des cellules somatiques (Ikenishi *et al.*, 1996; Ikenishi et Tanaka, 1997). En effet, *Xvlg-1* est détecté dans les cellules somatiques des premiers stades embryonnaires. Cependant, l'expression mesurée dans ces cellules est beaucoup plus faible que celle mesurée dans les PGCs et elle disparaît rapidement au cours du développement. La protéine XVLG-1 présente dans les cellules somatiques correspond à une synthèse et à une transmission maternelle alors que XVLG-1 trouvée dans les PGCs correspond à une synthèse *de novo* après la fécondation (à partir d'ARN maternel ou zygotique). Une faible quantité de transcrit *Xvlg-1* a aussi été détectée dans le cerveau et dans le cœur du xénope mais la signification de cette expression reste indéterminée (Yoshizaki *et al.*, 2000).

Vasa intervient également dans les spéciations cellulaires de la segmentation abdominale chez les embryons de drosophile (Hay *et al.*, 1990). *Vasa* est détectée très

furtivement dans les cellules abdominales juste après leur formation et les embryons issus de femelles homozygotes mutantes pour *vasa* présentent des délétions abdominales.

2.7 Applications pratiques de *vasa*

Chez l'homme, l'analyse de l'expression de *vasa* dans des cellules germinales tumorales a permis de mettre en évidence que certains types de cellules germinales tumorales conservent leurs caractéristiques de cellules germinales alors que d'autres résultent de la mauvaise différenciation ou de la perte de l'identité des cellules germinales. Le premier type de cellules tumorales continue à exprimer *vasa* alors que les secondes ne l'expriment plus. Par conséquent, *vasa* constitue un excellent biomarqueur des tumeurs des cellules germinales, particulièrement pour les seminoma et dysgerminoma classiques et spermatiques, et peut être utilisé comme outil diagnostique de ce type de tumeur (Chaganti et Houldsworth, 2000; Zeeman *et al.*, 2002).

Chez la truite arc-en-ciel, une construction génomique a été réalisée en fusionnant la région codante de l'ADNc de GFP (green fluorescent protein) à l'ADNc du gène *Rtvlg* (Rainbow trout *vasa*-like gene). La protéine GFP-RTVLG est exprimée spécifiquement dans les PGCs. Cette construction permet de visualiser, de trier et d'isoler les PGCs par la technique de cytométrie en flux (Takeuchi *et al.*, 2002). Cette technique permet d'obtenir des populations de PGCs pures et viables. Ceci constitue un outil essentiel pour établir des lignées cellulaires capables de se différencier en cellules germinales et pour étudier la biochimie et la biologie moléculaire des PGCs chez les poissons. De plus, cette technique d'isolement de PGCs, combinée à la cryopréservation de cellules et aux techniques de transplantations cellulaires, pourrait fournir un outil de préservation des ressources génétiques d'espèces de poissons (Takeuchi *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004).

3. Modèle biologique, l'huître creuse *Crassostrea gigas*

3.1 L'ostréiculture, histoire et enjeux actuels

Les huîtres sont consommées par l'homme depuis la préhistoire. Les études historiques rapportent que les Chinois, les Grecs ou encore les Romains appréciaient leurs vertus et pratiquaient la cueillette de ces bivalves (Neveu et Bretaudeau, 2001). Les romains furent les premiers européens à tenter la culture des huîtres, ils créèrent l'ostréiculture (du latin *Ostrea* signifiant huître). Cependant, le ramassage des huîtres sauvages resta pendant longtemps la seule source d'approvisionnement pour la consommation. Il faut attendre la fin du XIX^e siècle, entre 1860 et 1870, pour voir l'apparition de l'ostréiculture le long des côtes françaises, en Bretagne et dans le bassin d'Arcachon (Figure 11) (Lubet et Mathieu, 1999). Depuis cette époque, la culture des huîtres s'est très largement développée et c'est aujourd'hui la seconde activité aquacole au monde avec une production annuelle de 4,2 millions de tonnes, juste derrière la production d'algues brunes (4,9 millions de tonnes)(FAO, 2003).



Figure 11 : Ramassage des huîtres à Oléron au début du XX^{ème} siècle.

L'huître plate *Ostrea edulis*, seule espèce d'huître endémique des côtes françaises, fut exploitée durant plusieurs siècles. Mais la pêche intensive, cumulée à des épisodes de mortalité provoqués par l'apparition de parasites dans les gisements au cours des années 1920, 1960 et 1970 ont conduit au déclin de l'espèce (Grizel, 1974). En 1968, le navire "Le Morlaisien" transportant des huîtres creuses portugaises *Crassostrea angulata* se réfugia dans l'estuaire de la Gironde au cours d'une tempête et fut obligé de rejeter sa cargaison à la mer. *C. angulata* se répandit rapidement le long des côtes françaises et elle devint l'espèce dominante sur le littoral français (Héral, 1989). Puis en 1971, cette espèce fut à son tour décimée par un Iridovirus provoquant la "maladie des branchies" (Comps, 1978). Pour pallier cette disparition, il fût décidé d'importer en France l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*. Du naissain fut importé du Japon et des huîtres adultes de Colombie Britannique (Canada) (Grizel et Héral, 1991). L'expansion de *C. gigas* fut rapide et très importante le long de tout le littoral français. Aujourd'hui, cette espèce représente plus de 95% de la production française d'huîtres (Données FAO, 1998). Cette production est basée à 80 - 90% sur le captage naturel de naissain dans les deux bassins ostréicoles d'Arcachon et de Marennes-Oléron (Robert et Gérard, 1999).

3.2 Données biologiques

3.2.1 Systématique et répartition

L'embranchement des mollusques est le phylum le plus important du règne animal après celui des arthropodes. Il regroupe des animaux d'une grande diversité morphologique, physiologique et écologique. Il compte 7 classes (solénogrades, caudofovéates, polyplacophores, gastéropodes, céphalopodes, lamellibranches ou bivalves et scaphopodes), plus de 80 familles. La seule classe des bivalves regroupe plus de 6 000 espèces vivantes (Boss, 1971). Les huîtres creuses sont des bivalves, de l'ordre des Eulamellibranches, de la super-famille des Ostréidés, de la famille des Crassostréidés et du genre *Crassostrea*. Une vingtaine d'espèces ont été décrites dans le genre *Crassostrea*, certaines ayant été ou étant exploitées comme *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) l'huître creuse japonaise (Figure 12), *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) l'huître creuse portugaise, *Crassostrea sikamea*

(Amemiya, 1928), *Crassostrea ariakensis* (Fujita, 1913) ou *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) l'huître creuse américaine.

C. gigas est originaire d'Asie mais plusieurs vagues d'importations volontaires ou accidentelles ont disséminé l'espèce dans de nombreuses régions du globe, en Europe (Grizel et Héral, 1991), au Canada, sur la côte ouest des Etats-Unis, en Afrique du sud, en Tasmanie (Thomson, 1952; 1958), en Nouvelle-Zélande et en Russie (Orlenko, 1994).

Elle s'est adaptée dans ces régions notamment grâce à sa forte croissance et à sa grande tolérance aux variations de température (eurytherme), de salinité (euryhaline) et de quantité de nourriture (Coleman, 1986; Smith *et al.*, 1986; Grizel, 1996).

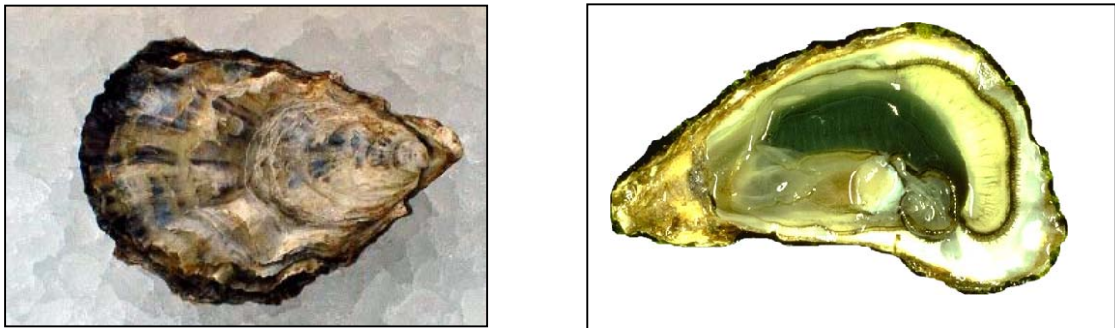


Figure 12 : L'huître creuse *Crassostrea gigas* fermée (photo de gauche) et ouverte, valve droite enlevée (photo de droite).

3.2.2 Ecologie et biologie

Les huîtres occupent deux biotopes différents au cours de leur cycle de développement. Les embryons et les larves sont planctoniques jusqu'à leur fixation. Après la métamorphose, les juvéniles et les adultes sont benthiques. Ils se fixent sur des substrats meubles ou durs dans les zones intertidales et infralittorales ou dans les zones estuariennes.

Les huîtres sont des animaux à corps mou comprimé latéralement et renfermé dans une coquille à deux valves asymétriques articulées autour d'une charnière et maintenues par un muscle adducteur puissant (Figure 13). La valve inférieure (gauche) est creuse tandis que la valve supérieure (droite) est plane (Kennedy *et al.*, 1996). La coquille se compose de trois couches : (1) la couche externe, le périostracum, (2) la couche intermédiaire composée de carbonate de calcium et reposant sur une matrice de conchyoline (protéique) et (3) la couche interne formée de cristaux d'aragonite en empilements horizontaux qui forment la nacre.

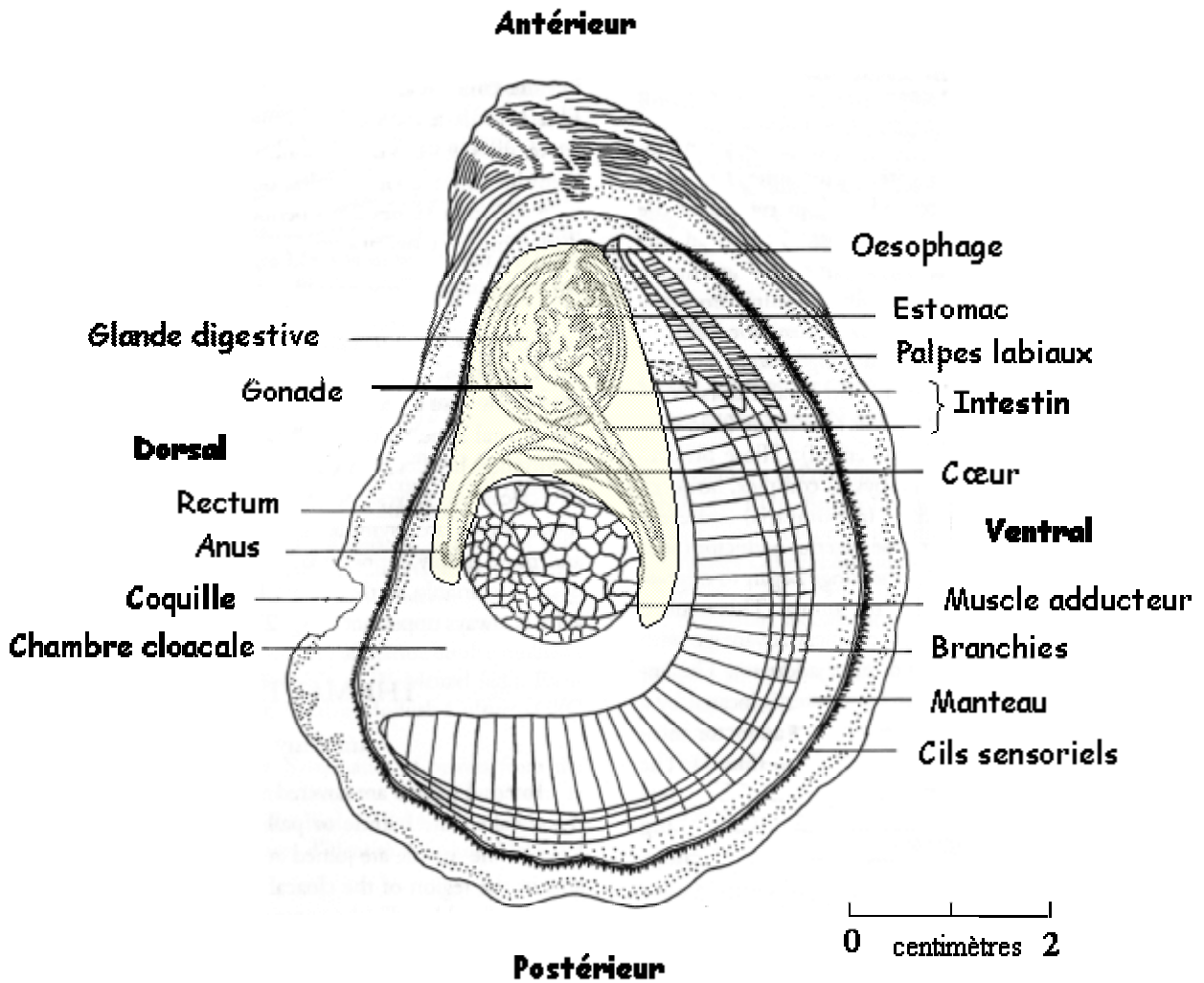


Figure 13: Anatomie générale de l'huître creuse *Crassostrea virginica* dans sa valve gauche. Les axes d'orientation de l'animal sont indiqués en caractères gras. D'après : Galtsoff (1964).

Les parties molles du corps sont enveloppées dans un manteau dont les deux lobes sont soudés dorsalement près de la bouche. Le manteau délimite la cavité palléale. Dans la partie antérieure, il forme un capuchon céphalique qui recouvre les palpes labiaux et la bouche (Kennedy *et al.*, 1996).

La bouche et les palpes labiaux sont les seuls vestiges de la partie céphalique des huîtres. Le système digestif est composé de la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, la glande digestive, le rectum et l'anus. L'estomac forme un long cæcum. Il contient une évagination tubulaire, le stylet cristallin, remplie d'une gelée à forte teneur en enzymes digestives. L'estomac est entouré par une glande digestive volumineuse.

Les branchies lamellaires, suspendues dans la cavité palléale, assurent la double fonction de respiration et de nutrition. Un courant d'eau permanent, créé par les filaments branchiaux ciliés, assure aux branchies un apport continu en oxygène et en particules alimentaires qui sont triées à l'entrée de la cavité palléale. Une huître creuse filtre en moyenne 3.9 L/h/gPS (Bougrier *et al.*, 1995). Les branchies sont recouvertes d'un mucus qui permet à l'animal de retenir les particules alimentaires et de les transporter jusqu'aux palpes labiaux qui eux-mêmes les dirigent vers la bouche (Kennedy *et al.*, 1996).

Le système circulatoire des huîtres est partiellement clos. Il est composé de vaisseaux et de sinus cœlomiques. Le fluide circulant, l'hémolymphe, passe dans ces vaisseaux fermés mais aussi dans les sinus semi-ouverts et dans tous les tissus en dehors des vaisseaux. Le cœur simple, composé d'un ventricule et de deux oreillettes est enfermé dans une cavité péricardique située en avant du muscle adducteur.

Le système nerveux est réduit à quelques ganglions difficilement observables. Le système d'excrétion est constitué d'un rein formé d'une glande tubulaire dans un sinus rénal situé sous le muscle adducteur dans la zone péricardique et sous le manteau (Kennedy *et al.*, 1996).

3.3 Reproduction et développement

3.3.1 Reproduction

L'hermaphrodisme

L'huître creuse japonaise est un hermaphrodite protandre de type alternatif irrégulier (Amemiya, 1929; Galtsoff, 1964; Gérard *et al.*, 1995), ce qui signifie qu'elle est généralement mâle lors de la première saison de reproduction puis que les changements de sexe alternent ensuite de façon irrégulière chez un même individu (Guo *et al.*, 1998; Lango-Reynoso *et al.*, 1999), les changements de sexe se faisant principalement entre deux saisons de reproduction (Amemiya, 1929; Buroker, 1983). Une faible proportion d'individus morphologiquement hermaphrodites, pour lesquels des cellules germinales des deux sexes sont présentes simultanément dans la gonade, est généralement trouvée dans les populations (Amemiya, 1929; Lango-Reynoso, 1999). Le déterminisme du sexe est encore peu connu chez *C. gigas* mais il résulterait de la combinaison de l'expression de facteurs génétiques et de l'effet des facteurs environnementaux (Guo *et al.*, 1998).

Anatomie de la gonade

La gonade de l'huître est un tissu mixte constitué de glandes génitales acineuses paires ramifiées dont les prolongements s'insinuent dans le tissu conjonctif vésiculeux. Elle se développe autour de la glande digestive. Les canaux des acini, les tubules gonadiques, s'anastomosent à leur extrémité pour former le conduit évacuateur ou gonoducte qui débouche dans la cavité palléale (Devauchelle *et al.*, 1998). Au fur et à mesure de leur développement, les deux parties de la gonade fusionnent pour ne former qu'une masse qui occupe une grande partie de la cavité palléale à maturité (Figure 13). Cet organe qui n'est pas permanent, se régénère annuellement à chaque cycle de reproduction et régresse après l'émission des gamètes. Pendant la période de repos sexuel, la gonade devient indiscernable alors que le développement du tissu conjonctif est maximal à ce stade. Il est formé de cellules vésiculeuses qui stockent le glycogène, principale forme de réserve chez l'huître (Berthelin *et al.*, 2000a).

Développement de la gonade

Le premier développement gonadique des huîtres a lieu au cours de la première année de vie des animaux, au stade juvénile. Les premières cellules germinales différenciées, les gonies (ovogonies ou spermatogonies), se développent au niveau de l'épithélium germinal et se divisent intensément par mitose. Ce sont des cellules de petite taille ($\approx 6 \mu\text{m}$ de diamètre) composées d'un gros noyau et d'une fine couche de cytoplasme granuleux (Figure 14) (Kennedy *et al.*, 1996; Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Les gonies se différencient en cytes primaires (ovocytes ou spermatocytes) et entrent en méiose. La gamétogenèse s'effectue de façon centripète dans les tubules gonadiques, depuis l'épithélium germinal jusqu'à la lumière centrale. Les cytes primaires sont donc situés derrière la couche de gonies par rapport à l'épithélium gonadique (Lango-Reynoso, 1999).

Chez les mâles, les spermatocytes primaires poursuivent leur méiose et se différencient successivement en spermatocytes secondaires, en spermatides et en spermatozoïdes (dont le corps mesure $1,5 - 3 \mu\text{m}$ de diamètre). La taille des cellules germinales mâles diminue au fur et à mesure de leur différenciation, leur noyau se condense et le cytoplasme devient quasiment inexistant (Kennedy *et al.*, 1996).

Quand les ovogonies se différencient en ovocytes primaires ($20 - 30 \mu\text{m}$ de diamètre), leur noyau s'agrandit et le cytoplasme devient plus dense et granuleux au fur et à mesure de la vitellogenèse (maturation), traduisant une accumulation des protéines, d'ARNm et de lipides (Kennedy *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2000). Le développement des ovocytes est supporté par les réserves, essentiellement du glycogène, contenues dans les cellules vésiculeuses du tissu conjonctif environnant qui régresse en conséquence et probablement en partie par les cellules auxiliaires des ovocytes (Berthelin *et al.*, 2000b; Matsumoto *et al.*, 2003). Les ovocytes vitellogéniques se détachent de la paroi du tubule et les ovocytes matures ($40 - 50 \mu\text{m}$ de diamètre) sont libres au centre du tubule gonadique (Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Les ovocytes émis lors de la ponte sont bloqués en prophase I de méiose. L'émission dans l'eau de mer, puis la fécondation, déclenchent successivement la reprise de la méiose et la rupture de la vésicule germinative (GVBD), puis l'expulsion du premier globule polaire (Leclerc *et al.*, 2000).

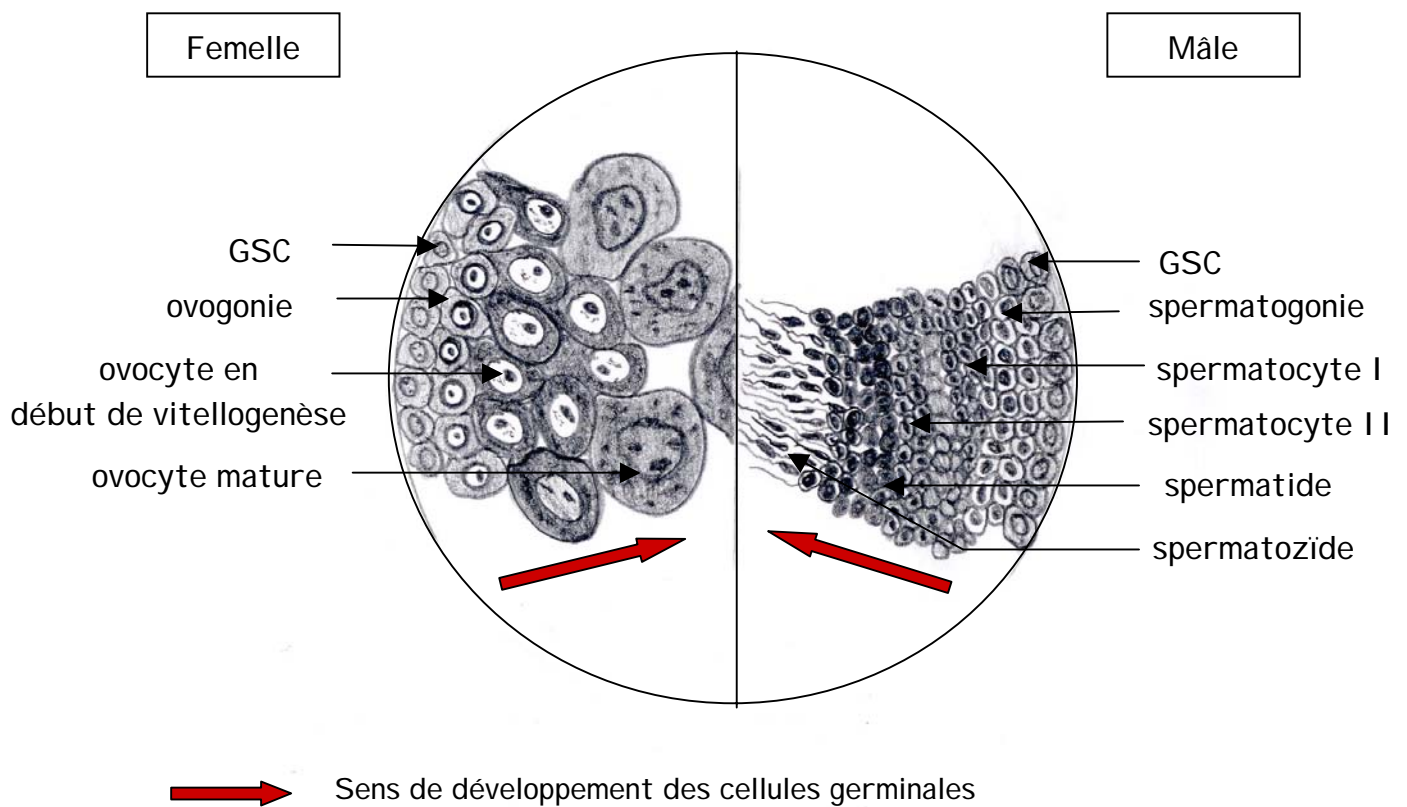


Figure 14 : Organisation des tubules gonadiques mâles et femelles de *Crassostrea gigas* pendant la gamétogenèse. Représentation schématique de la coupe transversale d'un tubule. GSC : cellule germinale souche

Le cycle de reproduction

Le cycle de reproduction de *C. gigas* suit un rythme saisonnier (Figure 15). Le long des côtes françaises, la gamétogenèse se déroule à un rythme très lent durant l'automne et au début de l'hiver (Lubet, 1991), période dite de "repos sexuel". Puis les cellules germinales se développent activement à la fin de l'hiver (Gouletquer, 1997; Lango-Reynoso *et al.*, 1999). Des analyses ultrastructurales ont montré que cette période est une phase de multiplication intense des gonies qui se poursuit jusqu'au début du printemps (Gouletquer, 1997; Lango-Reynoso *et al.*, 2000).

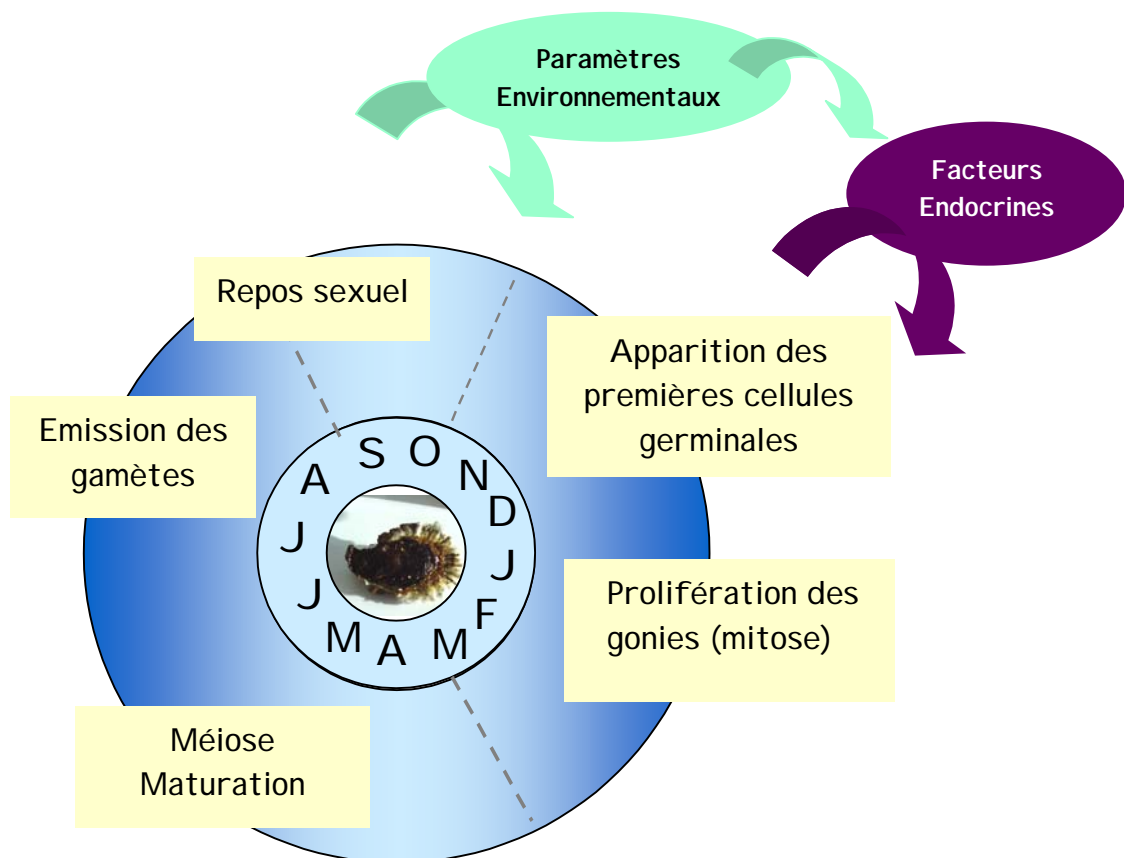


Figure 15 : Chronologie des grandes étapes du cycle de reproduction de *Crassostrea gigas* en milieu tempéré. Les flèches indiquent l'action potentielle des facteurs internes et des paramètres environnementaux sur l'ensemble des étapes de la reproduction. Les lettres dans le disque correspondent aux mois de l'année.

Au printemps, le rythme de développement s'accélère lorsque les gonies entrent en méiose. Le printemps est la période de maturation des cellules germinales, principalement contrôlée par la température et la quantité de nourriture (Deslous-Paoli *et al.*, 1981) (Figure 15). Les gamètes arrivent à maturité à la fin du printemps ou au début de l'été. L'émission des gamètes a lieu, généralement pendant la période estivale, une ou plusieurs fois par an suivant la localisation géographique (Galtsoff, 1930; Gouletquer, 1997; Lango-Reynoso *et al.*, 1999; Chavez-Villalba *et al.*, 2001). Elle intervient souvent en réponse à un signal extérieur, essentiellement des changements de température, un bloom phytoplanctonique ou la présence dans l'eau de gamètes d'individus de la même espèce. L'émission des gamètes est totale dans les régions les plus chaudes de la côte française (Charentes, Méditerranée) alors qu'elle n'est que partielle voire absente dans le nord de la France où la température de l'eau est plus basse (Normandie ou Bretagne nord) (Gouletquer, 1997). Lorsque la ponte est partielle, les ovocytes résiduels de la gonade subissent une phase de régression au cours de laquelle le contenu cellulaire est lysé. L'énergie issue de cette résorption des gamètes pourrait être réinvestie dans le métabolisme de base des bivalves (Beninger et Le Penec, 1991; Steele et Mulcahy, 1999). Les réserves énergétiques de l'huître sont reconstituées à l'automne avant la ré-initiation d'un nouveau cycle de reproduction (Berthelin *et al.*, 2000b) (Figure 15).

Les huîtres ont une fécondité très élevée, plusieurs millions d'ovocytes (50 – 60 millions) sont émis en pleine eau à chaque événement de ponte (Héral, 1989; Gérard, 1998). Elles suivent une stratégie de reproduction dite de type "r" avec un cycle de développement court mais à fort potentiel de reproduction (Lubet, 1976; Takada et Nakajima, 1992). La fécondation de *C. gigas* est externe et le développement, indirect, passe par une phase larvaire planctonique.

Des études ont mis en évidence le rôle important de la température dans la régulation de la gamétogenèse de *C. gigas*, en particulier des températures élevées accélèrent la maturation des cellules germinales et permet l'émission de gamètes (Mann, 1979; Muranaka et Lannan, 1984; Gouletquer, 1997). La salinité et la quantité de nourriture disponible interviennent également sur la régulation de la gamétogenèse mais ils apparaissent plus comme des facteurs favorisant ou défavorisant la gamétogenèse que comme des facteurs essentiels dans sa régulation (Pearse, 1999). Ainsi, des salinités trop faibles (< 20 ppt) altèrent le développement gonadique. Des conditions de nourriture favorables améliorent la fécondité de *C. gigas* (Muranaka et Lannan, 1984; Gouletquer, 1997, Chavez-Villalba *et al.*, 2003a).

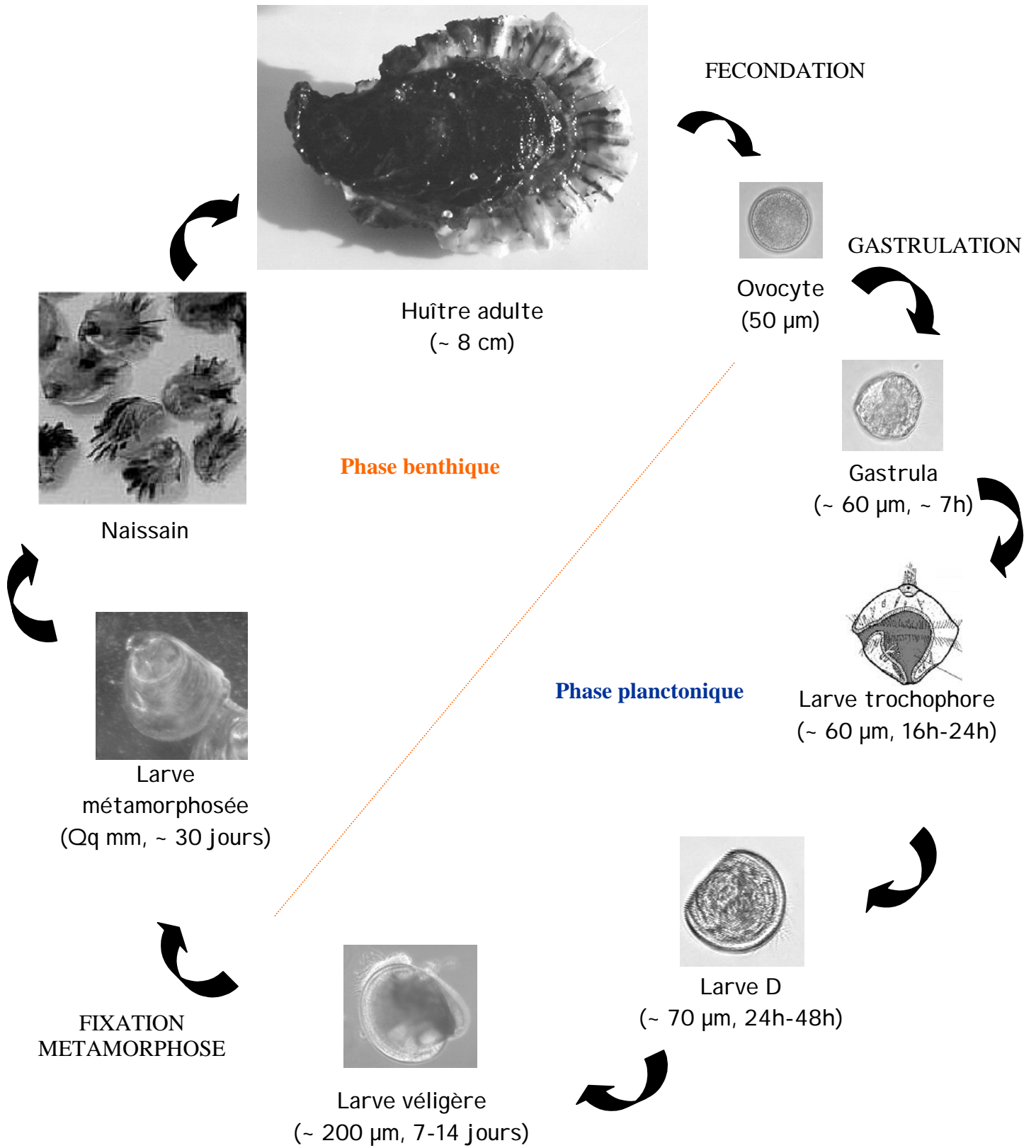


Figure 16 : Cycle de développement de *Crassostrea gigas*.

3.3.2 Développement

Le développement embryonnaire des mollusques (excepté chez les céphalopodes) est de type spiralé. Après la fécondation, l'embryon subit une série de clivages extrêmement réguliers donnant lieu à un arrangement en "spirale" des blastomères (Verdonk et Van den Biggelaar, 1983; Malakhov et Medvedeva, 1985) jusqu'à la formation de la blastula, 5 heures après fécondation à 25 °C chez *C. gigas* (Figure 16). Après la segmentation, la larve blastula subit la gastrulation (7 hpf) par épibolie (recouvrement). Les cellules se réorganisent en trois feuilletts primordiaux (endoderme, mésoderme et ectoderme). Puis, la larve devient nageuse, elle prend alors une forme caractéristique de toupie et acquiert des groupes de cils au niveau apical et en couronne périphérique (16-18 hpf), c'est la larve trochophore. Une première ébauche de coquille se développe et deux valves minéralisées se forment. La larve devient véligère, successivement larve-D (24 – 48 hpf), véligère à umbo ou véligère "early" (7 jours post-fécondation) et larve œillée ou veligère "later" (14 jpf). Le tractus digestif se met en place et devient fonctionnel, la larve commence à se nourrir. Un velum se développe, servant d'organe natatoire, respiratoire et nourricier. Lorsque la véligère est totalement formée (véligère à umbo), le velum peut se rétracter entre les valves grâce à des muscles attachés près de la charnière et les valves se referment grâce au muscle adducteur. Les rudiments de branchies apparaissent au bord de la masse viscérale et un pied se développe ventralement, c'est le stade pédivéligère (Prieur, 1971). Ce pied régressera à la métamorphose. A ce stade, les véligères nagent activement. Elles restent planctoniques pendant deux à quatre semaines puis se fixent par groupe en réponse à un signal chimique émis par des individus déjà fixés. Si les larves ne rencontrent aucun site favorable à leur fixation, elles restent planctoniques (Waller, 1981). Après la fixation, le velum se résorbe. Au cours de la métamorphose, la plupart des tissus et des organes larvaires se réorganisent pour donner la forme juvénile. Ainsi, les tissus du pied et du velum sont phagocytés (Waller, 1981; Burke, 1983), les ganglions nerveux qui étaient différenciés fusionnent et des tissus adultes (cœur, rein, branchies) s'élaborent à partir de tissus indifférenciés même s'ils commencent à se mettre en place avant la métamorphose (Prieur, 1971). A une température moyenne de 25°C, il faut entre 15 et 24 jours pour obtenir un développement larvaire complet, *i.e.* de la fécondation à la fixation (Figure 16).

3.4 Maîtrise de la reproduction en éclosérie

Comme nous l'avons vu dans la partie 3.1. de ce chapitre, l'ostréiculture s'est développée en France depuis la fin du XIX^{ème} siècle. Depuis son introduction le long du littoral français dans les années 1970, *Crassostrea gigas* est devenue l'espèce majoritairement cultivée dans tous les bassins ostréicoles puisqu'elle représente plus de 95% de la production annuelle française. Pourtant, seuls les deux bassins ostréicoles d'Arcachon et de Marennes-Oléron permettent un cycle de reproduction complet aboutissant à un recrutement annuel de naissain suffisant, assurant 85% à 90% de la production française d'huître creuse. (Gouletquer et Héral, 1991; Robert et Gérard, 1999). Dans les autres bassins de production, (Normandie, Bretagne, Vendée), le recrutement de juvéniles est faible et ne permet pas de captage économiquement viable. Les ostréiculteurs de ces bassins sont donc obligés d'importer du naissain ou de faire appel aux écloséries. Actuellement, la production de naissain d'éclosérie est mineure mais elle devient de plus en plus indispensable en raison, d'une part de la fluctuation inter-annuelle de la quantité du naissain issu du captage naturel soumis aux aléas du milieu (mauvaises conditions climatiques, modifications du milieu, pollution...) et, d'autre part, de la demande croissante d'un produit de qualité issu d'éclosérie (Robert et Gérard, 1999). Ce type de production présente plusieurs avantages comme la possibilité de s'affranchir des mauvaises qualités de recrutement, de produire du naissain en dehors de la saison de reproduction grâce au conditionnement des géniteurs ou encore de produire des animaux présentant des caractéristiques particulières (triploïdes, géniteurs sélectionnés...). Toutes les étapes du cycle de vie de *C. gigas*, de la maturation des géniteurs à l'élevage larvaire, peuvent être reproduites en éclosérie, pourtant, l'huître creuse est loin d'être une espèce domestiquée.

La production de mollusques bivalves en éclosérie nurserie comporte quatre points essentiels : le conditionnement des géniteurs, l'élevage larvaire, la production du naissain et la production de phytoplancton nécessaire à chaque phase de l'élevage (Robert et Gérard, 1999). Dans cette partie nous nous intéresserons essentiellement au conditionnement des géniteurs.

Les techniques utilisées actuellement pour la culture des huîtres en éclosérie ont peu évolué par rapport à celles qu'utilisaient les pionniers dans le domaine dans les années 1960 (Loosanoff et Davis, 1963; Walne, 1974). Basiquement, ces techniques consistent à collecter des huîtres à différents stades de reproduction dans la nature et à les placer dans des bacs remplis d'eau de mer enrichie en phytoplancton et dont la température est maintenue à un

niveau élevé ($\approx 20^{\circ}\text{C}$). Le conditionnement thermique des géniteurs permet d'accélérer la maturation gonadique et d'obtenir ainsi des pontes plus précoces qu'en milieu naturel. La nutrition permet, quant à elle, d'assurer une bonne fécondité (nombre d'œufs émis), une bonne fertilité (nombre d'œufs fécondés) et une bonne survie larvaire (Lubet et Mathieu, 1999).

Depuis les années 1990, l'avancée des connaissances en terme de biologie des mollusques a permis une constante amélioration des techniques d'écloserie, en particulier en ce qui concerne l'étape de maturation des géniteurs. Cependant, malgré l'amélioration de ces techniques, elles restent encore empiriques et il subsiste une époque de l'année, de septembre à décembre, durant laquelle les géniteurs de *C. gigas* sont réfractaires au conditionnement. Par conséquent, la production de naissain est quasiment impossible durant cette période (Gérard, 1998). Pour résoudre ce problème et améliorer le conditionnement des géniteurs, il est nécessaire d'acquérir davantage de connaissances sur la reproduction de *C. gigas* et de connaître les raisons qui empêchent le déroulement de la gamétogenèse à cette époque.

4. Problématique de l'étude

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est une espèce d'intérêt majeur pour la conchyliculture nationale et mondiale. Si à l'heure actuelle, sa culture reste majoritairement basée sur du naissain issu du captage en milieu naturel (Gouletquer et Héral, 1991; Robert et Gérard, 1999), la demande de naissain produit en écloserie ne cesse d'augmenter depuis quelques années. L'objectif à atteindre pour satisfaire cette nouvelle demande est d'obtenir un allongement de la saison de reproduction et de produire des élevages fiables (des larves de bonne qualité, de taux de survies élevés...). Pour cela, il est nécessaire de maîtriser chacune des étapes du cycle de reproduction, ce qui implique de comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans la reproduction ainsi que leur régulation par les facteurs internes et les paramètres environnementaux. Les paramètres extérieurs, température, photopériode, nourriture, semblent jouer un rôle majeur dans la régulation de la gamétogenèse des invertébrés marins (Pearse, 1999). Chez *C. gigas*, de nombreuses études ont mis en évidence l'effet de la température et de la nourriture sur la maturation gonadique (Deslous-Paoli *et al.*, 1981; Muranaka et Lannan, 1984; Gouletquer, 1997). Des températures élevées ($\approx 20^{\circ}\text{C}$) accélèrent la maturation des cellules germinales et une nourriture abondante permet d'obtenir une meilleure fécondité (quantité d'ovocytes). Cependant, il a été démontré que les conditions à appliquer en milieu contrôlé pour obtenir la maturation des huîtres dépendaient de l'état physiologique des animaux au début du conditionnement, notamment, du stade de développement des cellules germinales (Muranaka et Lannan, 1984). En particulier, l'automne est une période dite "réfractaire au conditionnement" durant laquelle le conditionnement des géniteurs d'huîtres ou d'autres espèces de bivalves marins (*Ostrea edulis*, *Pecten maximus*), ne permet généralement pas d'obtenir de gamètes viables ou de bons développements larvaires (Cochard et Devauchelle, 1993; Le Pennec, 1997; Le Pennec *et al.*, 1998; Robert et Gérard, 1999). Des études récentes (Chavez-Villalba *et al.*, 2002a) ont montré qu'une période de pré-conditionnement (en écloserie, avant le conditionnement) au froid permettait de lever, en partie, cette inhibition. L'hypothèse qui a été proposée pour expliquer ces observations est que cette "vernalisation" permettrait de renouveler le stock de cellules germinales très réduit, voire absent en automne (Chavez-Villalba *et al.*, 2002a). Cependant, l'origine, les mécanismes de mise en place et la dynamique de développement des premières cellules germinales observées par histologie (les gonies) restent inconnus. La mise en place des cellules germinales au début du cycle de reproduction est un processus essentiel à la reproduction mais paradoxalement,

très peu d'études détaillées traitent de ce sujet. Les analyses macroscopiques et histologiques utilisées pour étudier la gamétogenèse de *C. gigas* permettent de décrire de manière satisfaisante les stades de la gamétogenèse mais ils ne permettent pas de suivre les jeunes cellules germinales de petites tailles et dispersées dans le tissu somatique environnant. Pour comprendre l'origine, la mise en place et la dynamique de développement des cellules germinales chez *C. gigas* il devenait nécessaire de développer des outils permettant de repérer et de suivre les cellules germinales tout en travaillant en conditions contrôlées afin de déterminer l'influence des paramètres environnementaux sur l'initiation de la gamétogenèse de l'huître creuse.

Cette thèse présente l'étude du développement (différenciation, prolifération, maturation) des cellules germinales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, en milieu contrôlé. Les principaux objectifs de ce travail sont (1) de déterminer l'origine et les mécanismes de développement des cellules de la lignée germinale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* et (2) de décrire l'influence des paramètres environnementaux température/photopériode sur le développement de ces cellules germinales.

Cette étude se décompose en trois grands chapitres, qui suivent cette introduction et le chapitre "matériel et méthodes":

- **Un premier chapitre** présente, dans un premier temps, la caractérisation d'un marqueur moléculaire spécifique des cellules germinales de l'huître *C. gigas*, le gène "Oyster vasa-like gene" (*Oyvlg*). Dans une seconde partie, la mise en place et le développement des cellules germinales de *C. gigas* ont été étudiés en analysant le profil d'expression du gène *Oyvlg* au cours du développement embryonnaire et larvaire et au cours d'un cycle de reproduction au stade adulte. Enfin, la dynamique de développement et la quantification des cellules germinales mâles ont été analysées dans la troisième partie, au cours d'un cycle de reproduction, en mesurant la ploïdie des cellules grâce à la mise au point d'une technique de cytométrie en flux.

- **Un second chapitre** traite de l'influence des facteurs environnementaux couplés température/photopériode sur la régulation de la gamétogenèse de *C. gigas*. Le développement de la gonade et des cellules germinales de *C. gigas* a été étudié par des analyses macroscopiques, microscopiques et moléculaires sur des huîtres soumises à trois expérimentations différentes : un cycle annuel "naturel" de température et de photopériode

calqué sur les paramètres moyens mesurés dans la bassin de Marennes-Oléron, un cycle accéléré et un conditionnement hivernal continu.

- Enfin, dans **le dernier chapitre**, les résultats obtenus au cours de cette thèse sont discutés, en portant une attention particulière sur les avancées réalisées dans la connaissance de la reproduction de *C. gigas* grâce à cette étude et sur les applications possibles de ce travail pour la production de bivalves marins en éclosionerie.

Second chapitre :
Matériel et méthodes

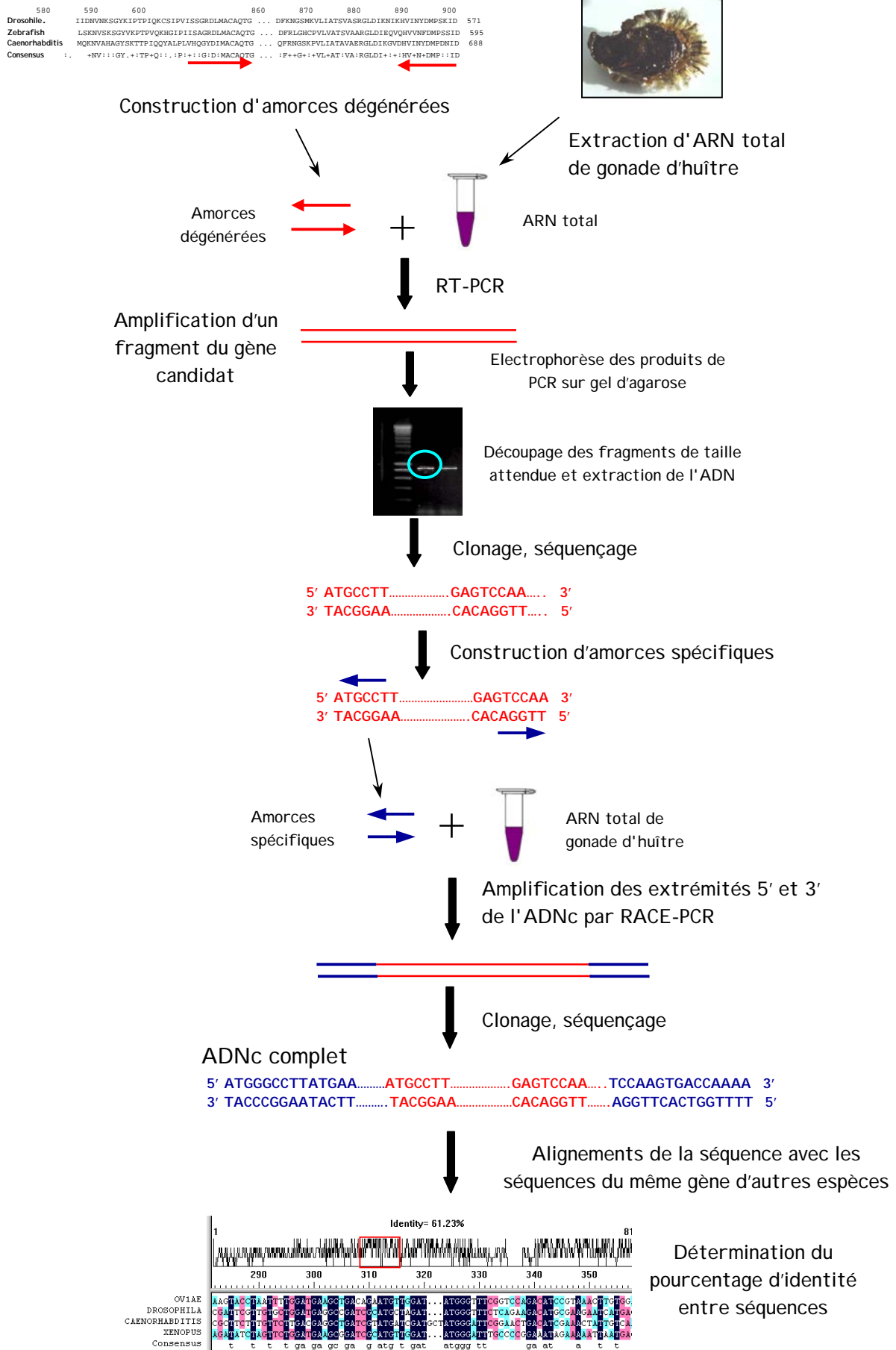


Figure 17 : Les principales étapes de la caractérisation d'un gène candidat.

1. Recherche d'un gène candidat

Afin de caractériser un orthologue du gène *vasa* chez l'huître creuse *C. gigas*, nous avons entrepris la recherche de ce gène candidat par la technique de RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) à partir des séquences protéiques des orthologues du gène *vasa* chez différentes espèces. Après avoir obtenu un fragment de l'ADNc (ADN complémentaire) du gène recherché, nous avons complété les extrémités 5' et 3' de la séquence ADNc en utilisant la technique de RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA ends-PCR) (Figure 17).

1.1 Construction d'amorces dégénérées

Afin d'isoler un orthologue du gène *vasa* chez *C. gigas* nous avons construit un couple d'amorces dégénérées dans les zones les plus conservées des alignements de séquences protéiques de *vasa* de la drosophile (numéro d'accèsion Genbank P09052), et des orthologues de *vasa* de *Caenorhabditis* (P34689), du xénope (AAC03114), du zebrafish (CAA72735) et de la souris (BAA03584). Les amorces que nous avons dessinées sont VAS A (5' ATG GCN TGY GCN CAR ACN GG 3') et VAS E (5' GGC ATR TCR TAR TTD ATN ACR TG 3') (Figure 18).

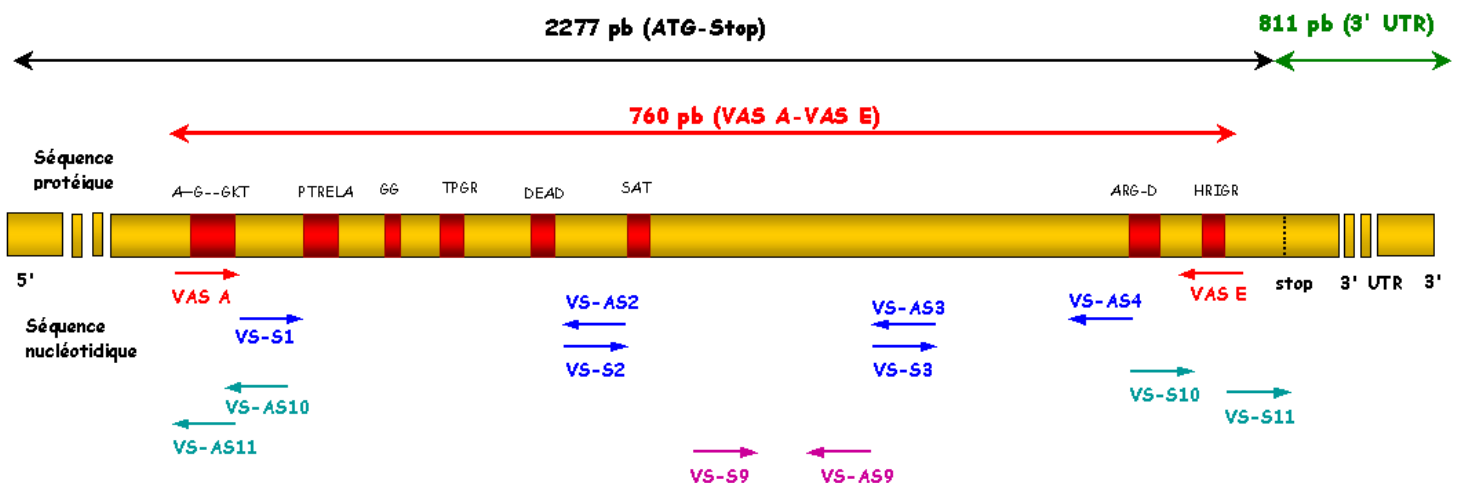


Figure 18 : Positionnement des amorces utilisées le long du gène *Oyvlg* (Oyster *vasa*-like gene) : amorces dégénérées (rouge) et amorces spécifiques utilisées pour l'hybridation *in situ* et l'hybridation *in toto* (bleu), la RACE-PCR (vert) et la PCR en temps réel (rose). Les séquences consensus des protéines de la famille des DEAD-box sont en rouge sur le schéma et le motif protéique correspondant est indiqué au-dessus.

1.2 Extraction et quantification des ARN totaux

Les ARN totaux des échantillons de tissus d'huîtres utilisés pour cette étude ont été extraits individuellement selon la méthode décrite par Chomczynski and Sacchi (1987). 50 mg de tissu ont été lysés par 500 µl de tampon de lyse. Les protéines et l'ADN ont été précipités dans un mélange d'acétate de sodium (0,1 volume), de phénol (1 volume) et de chloroforme/alcool isoamylique (49/1) (0,2 volume), par incubation sur la glace (15 min) et centrifugation (20 min, 10 000 g, 4 °C). Une seconde extraction a été réalisée par ajout de phénol (1/5 volume), chloroforme/alcool isoamylique (49/1) (0,2 volume) suivie d'une centrifugation (20 min, 10 000 g, 4 °C). Les ARN contenus dans la phase aqueuse ont ensuite été précipités par de l'isopropanol froid pendant 1 heure à -20 °C puis centrifugés (20 min, 10 000 g, 4 °C). Les culots ont été repris de nouveau dans un mélange de solution de lyse sans β-mercaptoéthanol (1 volume) et d'isopropanol froid (1 volume) puis reculottés par une centrifugation (20 min, 10 000 g, 4 °C). Les culots ont ensuite été lavés par des bains successifs d'éthanol en concentration croissante. Enfin, les culots d'ARN ont été repris dans 100 µl d'eau ultra-pure RNase free (Qbiogène).

Tous les ARN totaux ont ensuite été traités par 1 unité de DNase /µg d'ARN total (Sigma) pendant 15 min à température ambiante afin d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. La réaction a été stoppée par une incubation de 10 min à 70 °C en présence de solution "stop" (Sigma). Une précipitation des sels a ensuite été réalisée par un mélange d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2) (1/10 volume) et d'éthanol absolu (3 volumes) et une incubation de 15 min à -80 °C. Les ARN ont été culottés par centrifugation (15 min, 7 500 g, 4 °C), lavés à deux reprises par de l'éthanol absolu puis repris dans 100 µl d'eau RNase free (Qbiogène) et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les ARN totaux ont été quantifiés au spectrophotomètre par une mesure à 260 nm. Le facteur de conversion utilisé est 1 unité de Do = 40 µg/ml d'ARN. La pureté des échantillons d'ARN a été estimée par le rapport : Do à 260 nm / Do à 280 nm.

1.3 Transcription inverse

La transcription inverse ou reverse transcription (RT) est une réaction enzymatique de synthèse de l'ADN complémentaire d'un ARN messager (ARNm). Cette réaction se décompose en trois étapes : une phase de synthèse de la séquence ADN complémentaire de la séquence ARN grâce à une enzyme virale reverse-transcriptase (10 min à 25 °C), une phase de polymérisation (20 min à 42 °C), et une phase de dénaturation (5 min à 94 °C) qui permet de conserver le produit de RT sous forme d'ADN simple brin.

La transcription inverse a été réalisée à partir de 2 µg de matrice d'ARN total d'ovocytes d'huîtres, préalablement dénaturée 10 min à 70 °C. La composition du mélange de réaction était la suivante : 1 X de tampon de réaction de l'enzyme, 4 mM DTT, 0,2 mM dNTPs, 25 unités de ribonuclease inhibitor, 0,5 µg oligo(dT)₂₃-anchored primer et 50 unités de M-MLV reverse transcriptase (Sigma) dans un volume total de 50 µl.

1.4 Amplification par PCR

La PCR est une réaction d'amplification en chaîne de l'ADN mise au point par Mullis *et al.* (1986). Elle permet l'amplification exponentielle d'une séquence d'ADN délimitée par les régions d'hybridation de deux amorces. La PCR comprend les étapes suivantes : une dénaturation initiale (95 °C) suivie d'un nombre déterminé de cycles (entre 20 et 40) comprenant [une phase de dénaturation (95 °C), une phase d'hybridation des amorces (entre 45 et 60 °C en fonction de la composition des amorces) et une phase d'élongation du brin d'ADN natif (72 °C)], puis une élongation finale (72 °C) (Figure 19).

Afin d'amplifier un fragment d'ADNc de l'orthologue du gène *vasa* chez *C. gigas*, nous avons réalisé une amplification par PCR avec les amorces dégénérées décrites dans le paragraphe 1.1.. Cette amplification a été réalisée à partir de 1 µg de matrice ADNc de gonade d'huître femelle mature. La composition du mélange de réaction était la suivante : 0,2 µM de chaque amorce dégénérée, 0,2 mM de dNTP, 1 X du tampon de réaction de la Taq polymérase (avec 1,5 mM de MgCl₂), 0,5 unité d'enzyme Taq polymérase (Qbiogène) dans un volume réactionnel total de 20 µl.

Le programme d'amplification était le suivant : dénaturation initiale 2 min à 95 °C; [1 min de dénaturation à 95 °C, 1 min d'hybridation des amorces à 50 °C, 1 min d'élongation à 72 °C] répétés pendant 30 cycles et une élongation finale de 5 min à 72 °C.

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% (w/v) dans du TAE 1 X (0,04 M Tris-acide acétique, 1 mM EDTA pH 8) contenant du bromure d'éthidium (BEt) (1 µl/40 ml de gel), agent intercalent de l'ADN qui permet la visualisation sous UV.

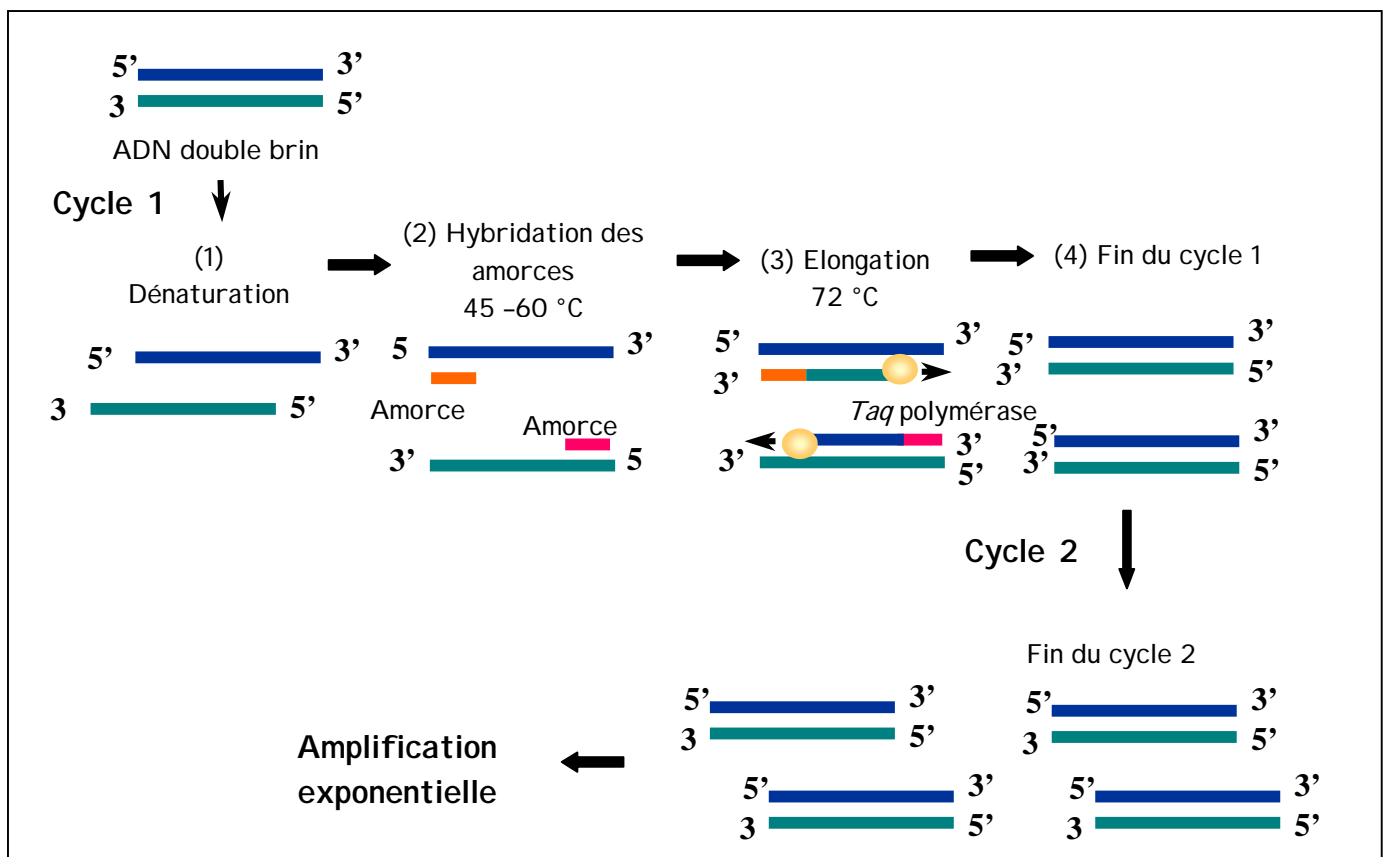


Figure 19 : Les principales étapes de la PCR (Polymerase Chain Reaction)

1.5 Purification des produits d'amplification, clonage et séquençage

Les produits d'amplification obtenus avec les amorces dégénérées et ayant la taille attendue (760 pb), ont été purifiés, clonés puis séquencés afin de vérifier s'ils correspondaient au gène candidat recherché, le gène *vasa*.

1.5.1 Purification des produits d'amplification

Les produits d'amplification de taille attendue, séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, ont été découpés directement sur le gel avec un scalpel puis extraits du gel grâce au kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen).

1.5.2 Clonage

Le clonage moléculaire consiste à introduire un fragment d'ADN dans un vecteur plasmidique lui-même inséré dans une cellule hôte par recombinaison, généralement dans une bactérie. Le fragment d'ADN est alors reproduit en grande quantité lors de la multiplication bactérienne et il peut ensuite être isolé par lyse bactérienne puis digestion enzymatique du plasmide.

Le clonage a été réalisé avec le kit TOPO-TA cloning® kit (Invitrogen). L'ADN purifié (30 ng) a été inséré dans un vecteur "pCR®4-TOPO vector" en présence d'une solution saline (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) et incubé 30 min à température ambiante. Des bactéries compétentes *E. coli* "One shot®TOP10" ont été transformées avec 2 µl du mélange de ligation. Les bactéries ont été mises à incuber pendant 30 min sur la glace puis les parois bactériennes ont été lysées par choc thermique pendant 30 sec à 42 °C. Les bactéries ont ensuite été mises en incubation 1 h à 37 °C dans du SOC (2% tryptone, 0,5% extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM mgSO₄, 20 mM glucose) puis mises en culture sur boîte de pétri LB (Luria-Bertani) agar (1% bacto-tryptone, 0,5% extrait de levure, 0,5% NaCl, 1,5% agar) contenant 50 µg/ml ampicilline et mises en incubation à 37 °C pendant une nuit. Les colonies bactériennes transformées ont été repiquées et remises en culture liquide LB avec de l'ampicilline (50 µg/ml) pendant une nuit à 37 °C.

1.5.3 Préparation plasmidique

L'ADN plasmidique a ensuite été extrait à partir de 3 mL de culture liquide par une technique dérivée de la lyse alcaline. Le culot bactérien, obtenu après centrifugation (10 000 g, 1 min) de la culture liquide, a été repris dans 100 µl de solution I (0,05 M glucose, 0,01 M EDTA, 0,025 M Tris), puis les bactéries ont été lysées par 200 µl de solution II (0,2 M NaOH, 1% SDS) préparée *ex temporane*. Les débris cellulaires ont ensuite été précipités par 150 µl de solution III (3 M acétate de potassium, 2 M acide acétique) pendant 5 min sur la glace. Après centrifugation (10 000 g, 5 min), le surnageant d'ADN plasmidique a été précipité par de l'éthanol 95°. Après une nouvelle centrifugation (10 000 g, 5 min), l'ADN plasmidique a été repris dans 30 µl d'eau ultra-pure (Qbiogène) avec 100 µg/ml de RNase et conservé à - 80°C.

Un volume de 8 µl de préparation plasmidique a été digéré par 1 unité/µl d'enzyme de restriction *EcoRI* (Qbiogène) dans un volume réactionnel total de 20 µl, pendant 2 heures à 37 °C. La digestion enzymatique permet de vérifier que l'insert d'ADN est présent. Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

1.5.4 Séquençage

Le séquençage des clones positifs a été réalisé par un fournisseur de service (Genome Express).

1.6 Analyse de séquence

La séquence ADNc obtenue par amplification avec les amorces dégénérées VAS A et VAS E a été analysée grâce au logiciel GCG (Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA). Le cadre ouvert de lecture ou "Open Reading Frame" (ORF) a été déterminé et la séquence protéique a été déduite de la séquence nucléotidique.

Afin de déterminer si l'ADNc isolé correspondait au gène *vasa*, la séquence protéique déduite a été alignée, en alignements multiples et en alignements 2 à 2, avec les séquences protéiques VASA de différentes espèces et les taux d'identités entre les différentes séquences ont été calculés avec le logiciel DNAMAN (4.11, Lynnon Biosoft).

Une analyse phylogénétique a été réalisée avec la séquence protéique déduite de l'ADNc isolé et différentes séquences protéiques de la famille des DEAD-box (VASA, PL10 et GLH). Les séquences ont été alignées en utilisant le logiciel CLUSTAL W. Un arbre phylogénétique de distance a été construit avec le logiciel PHYLIP en utilisant la méthode UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean). Afin de valider la robustesse statistique de l'arbre phylogénétique, 1000 "bootstraps" ont été calculés pour chacun des nœuds avec un échantillonnage aléatoire des données fixé à 1000.

1.7 Extension de l'ADNc par RACE-PCR

La technique de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), décrite par Frohman *et al.* (1988), permet d'amplifier les extrémités 5' et 3' manquantes des fragments ADNc caractérisés. Les réactions de RACE PCR ont été réalisées avec le kit "SMART RACE cDNA Amplification Kit" (BD Biosciences).

1.7.1 Amplification de l'extrémité 5'

Dans un premier temps, un ADNc a été généré par une réaction de transcription inverse à partir de 1 µg d'ARN total de la gonade d'huître femelle mature. La réaction de transcription inverse a été réalisée avec une amorce polyT (OligodT) (1,7 µM), une amorce "BD SMART IITMA" riche en G dans sa partie 3' (1,7 µM), du DTT (2 mM), des dNTP (1 mM), le tampon de réaction de l'enzyme (1 X) et une enzyme "BD Power Script reverse transcriptase" avec une activité terminal transférase qui ajoute une queue polycitidinée (polyC) à l'extrémité 5' de l'ADNc. La réaction a été effectuée à 42 °C pendant 1 h 30 min. L'amplification de la partie 5' manquante de l'ADNc a ensuite été réalisée en utilisant une amorce antisens spécifique de la séquence connue, VS-AS 10 (5' CTT GTG GTT CCT GGA CCT CGG AGA 3') (Figure 18) et une amorce "Primer Universel A MIX" (UPM) qui reconnaît la queue polyC ajoutée par la reverse transcriptase. La réaction de PCR a été réalisée dans un volume total de 50 µl comprenant 2,5 µl de l'ADNc dilué au 1/10, 1 mM de dNTP, 1 X de tampon de réaction de l'enzyme, 1 X de UPM, 1 µM de VS-AS10 et 1 X de "BD Advantage 2 polymerase Mix". L'amplification suivait le programme suivant : dénaturation 30 sec à 95 °C, hybridation 30 sec à 60 °C et élongation 3 min à 68 °C pendant 30 cycles. Une seconde PCR "nested" a été réalisée dans les mêmes conditions que la

précédente avec 2,5 µl de produit PCR dilué au 1/10 et une amorce antisens spécifique de la séquence connue VS-AS11 (5' TGG ACC TCG GAG AAA CTA CTG CCA CT 3') située plus en 5' que VS-AS10. Les conditions de PCR étaient les mêmes que celles de la première PCR.

1.7.2 Amplification de l'extrémité 3'

La synthèse de l'ADNc en 3' a été réalisée suivant un protocole de transcription inverse classique, *i.e.* sans l'amorce "BD SMART IITMA". Les concentrations des réactifs et les conditions de réaction sont les mêmes que celles décrites pour la synthèse de l'ADNc 5'.

Deux PCR successives ont été réalisées suivant les conditions décrites précédemment avec les amorces sens VS-S10 (5' GGA AGA AGC TCT GCG CGA TTT CAA GA 3') et VS-S11 (5' AGT ATG CCA GGA GCT GGG TAT G 3') situées dans la partie 3' de la région connue (Figure 18).

Les produits de RACE-PCR 5' et 3' ont été clonés puis séquencés suivant les protocoles décrits dans le paragraphe 1.5. de ce chapitre.

2. Etude du développement des cellules germinales des huîtres adultes

2.1 Matériel biologique et plan d'expérience

2.1.1 Conditionnement expérimental

Une population expérimentale d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* a été produite en février 2001 à l'écloserie expérimentale Ifremer de La Tremblade (Charentes-Maritime, France) par croisement de 30 géniteurs (6 mâles et 24 femelles) choisis au hasard, collectés dans le bassin ostréicole de Marennes-Oléron. Cette population expérimentale correspond à la première génération (G1) d'huîtres produites dans le cadre du programme de recherche pluridisciplinaire MOREST (MORTalités ESTivales de *C. gigas*). L'élevage larvaire a été réalisé à l'écloserie de La Tremblade. Le naissain d'environ 2 mm a été pré-grossi à la nurserie de la station Ifremer de Bouin (Vendée, France) puis transféré dans les claires ostréicoles de la station Ifremer de La Tremblade. En février 2002, les huîtres âgées de 12 mois ont été transportées à la station expérimentale Ifremer d'Argenton (Bretagne, France) pour subir, sur un cycle annuel, 3 conditionnements différents (Figure 20).

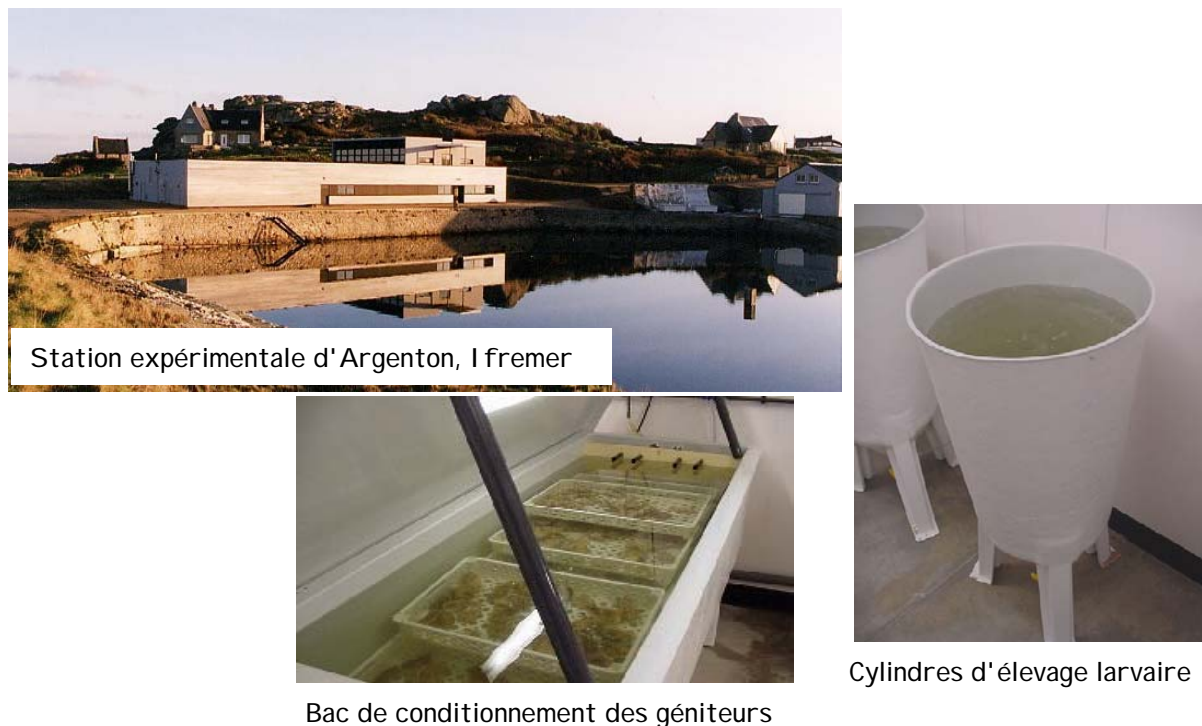


Figure 20 : Structures expérimentales pour le conditionnement de géniteurs de *Crassostrea gigas* et les élevages larvaires.

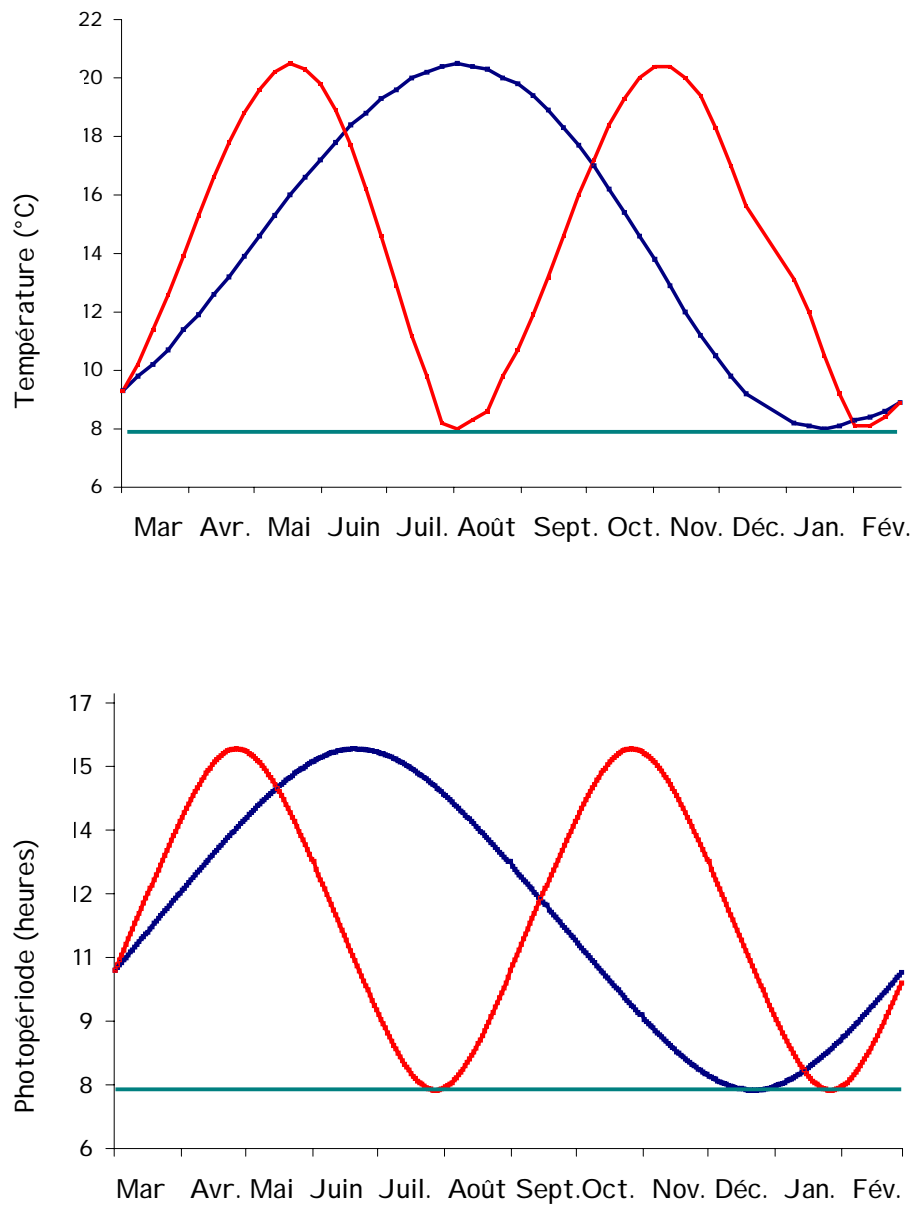


Figure 21 : Températures et photopériodes moyennes appliquées dans les conditionnements expérimentaux naturel (courbe bleue), accéléré (courbe rouge) et hivernal (courbe verte).

La population initiale, constituée de 2 000 huîtres, a été divisée en trois lots, chacun soumis à des conditions de température et de photopériode différentes de manière à observer l'effet couplé de ces paramètres sur le cycle reproducteur de *C. gigas*. Cette expérimentation a été appelée GIGAREPRO 2002.

- Dans le premier conditionnement, appelé cycle naturel et noté NC (Natural Cycle) les paramètres température et photopériode appliqués correspondaient aux cycles naturels enregistrés à Marennes-Oléron (Figure 21). Les valeurs de températures appliquées correspondaient à des valeurs moyennes calculées sur 10 ans et issues de la base RAZLEC (Soletchnik *et al.*, 1998).

- Dans le second conditionnement, appelé cycle accéléré et noté AC (Accelerated Cycle), la vitesse des cycles naturels de température et de photopériode a été multipliée par deux afin de produire artificiellement deux années en une (Figure 21).

- Dans le dernier conditionnement appelé conditionnement hivernal et noté WC (Wintering Conditioning), la température et la photopériode ont été maintenues, respectivement à 8 °C et 8 heures de jour, de manière à obtenir des conditions hivernales toute l'année (Figure 21).

Ces conditionnements ont été réalisés dans des bacs de 600 L remplis d'eau de mer filtrée à 20 µm. Les bacs étaient vidangés et nettoyés tous les deux jours. La salinité moyenne enregistrée était de 34,5 ppt. Les huîtres étaient nourries avec une ration journalière de micro-algues composée par 33% *Chaetoceros calcitrans* et *Skeletonema costatum*, 33% *T-Isochrysis galbana*, 33% *Tetraselmis chui* qui équivalait à un apport journalier de 8% de matière sèche d'algue/g de matière sèche de chair d'huître.

Les consignes de température et de photopériode appliquées dans les conditionnements naturel et accéléré étaient modifiées toutes les semaines afin de suivre les cycles décrits ci-dessus.

Tableau 1 : Liste des échantillonnages effectués entre février 2002 et février 2003 dans les conditionnements naturel (NC), accéléré (AC) et hivernal (WC). Les mois surlignés d'une couleur foncée correspondent aux périodes supposées d'initiation de la gamétogenèse dans les conditionnements naturel (bleu foncé), accéléré (orange) et hivernal (vert).

Mois en NC	Période équivalente en AC	Période équivalente en WC	Numéro de semaine	Conditionnement / Effectif d'échantillonnage
Février			9	20
Mars	Mars	Décembre	11	NC 20
	Avril		13	NC 20 / AC 20 / WC 20
Avril	Mai	Décembre	17	NC 20 / AC 20 / WC 20
	Juin			
Mai	Juillet	Décembre	22	NC 20 / AC 20 / WC 20
	Août			
Juin	Septembre	Décembre	24	AC 20
	Octobre		26	NC 20 / AC 20 / WC 20
Juillet	Novembre	Décembre	28	AC 20
	Décembre		30	NC 20 / AC 20 / WC 20
Août	Janvier	Décembre	33	AC 20
			34	NC 20 / AC 20 / WC 20
			35	AC 20
Septembre	Mars	Décembre	38	NC 20 / AC 20 / WC 20
	Avril			
Octobre	Mai	Décembre	42	NC 15 / AC 15 / WC 15
	Juin			
Novembre	Juillet	Décembre	46	NC 15
			Août	48
Décembre	Septembre	Décembre	51	NC 15 / AC 15 / WC 15
			Octobre	52
Janvier	Novembre	Décembre	3	NC 15 / AC 15
	Décembre		4	NC 15 / AC 15 / WC 15
Février	Janvier	Décembre	6	NC 15 / AC 15
	Février		8	NC 15 / AC 15 / WC 15

2.1.2 Plan d'échantillonnage

Un échantillonnage initial de 20 huîtres, prélevées au hasard, a été réalisé en février 2002 avant la répartition de la population initiale en trois lots.

Entre mars 2002 et février 2003, un échantillonnage mensuel a été réalisé pour chaque conditionnement (Tableau 1). Pour les conditionnements NC et AC, un échantillonnage supplémentaire a été réalisé pendant les mois de conditions hivernales, au moment supposé de la reprise de l'activité des cellules germinales après la période de repos sexuel.

Les effectifs d'échantillonnage étaient de 20 huîtres par prélèvement entre mars 2002 et août 2003 puis ils ont été réduits à 15 individus entre septembre 2002 et février 2003 suite à des mortalités estivales importantes, survenues dans le conditionnement naturel. Au total, 805 individus ont été prélevés. Le taux de mortalités cumulées enregistré entre mai 2002 et octobre 2002 était de 17,2 %. Ces mortalités pourraient être dues à une infection bactérienne. En effet, des analyses réalisées sur des huîtres moribondes ont mis en évidence la présence majoritaire de la bactérie pathogène *Vibrio aestuarianus* dans la charge bactérienne réalisée sur des prélèvements d'hémolymphe. La bactérie a été identifiée par une analyse en PCR-RFLP sur le gène ribosomique 16s utilisé comme marqueur (Lane, 1991).

Pour chaque échantillon prélevé, différents paramètres biométriques ont été mesurés et des prélèvements ont été réalisés pour les analyses en biologie moléculaire (extraction des ARN totaux), en histologie et en cytométrie en flux (Figure 22).

- Une analyse biométrique a été réalisée en NC, AC et WC, afin de suivre la croissance globale des huîtres dans les différentes conditions d'élevage. La hauteur en centimètres (longueur maximale entre la charnière et l'extrémité postérieure de l'huître), la masse totale en grammes avant ouverture et la biomasse de la masse viscérale en grammes (gonade, glande digestive et palpes labiaux) ont été mesurées pour chaque échantillon. Un indice de condition (IC) a été calculé comme le rapport entre la biomasse de masse viscérale et la biomasse totale.

- Pour les huîtres du conditionnement NC, des morceaux de tissus d'environ 50 mg ont été prélevés, avec des outils de dissection stérilisés et traités au DEPC (diethyl pyrocarbonate), pour les 6 organes suivants : branchies, bord de manteau, palpes labiaux, muscle adducteur, gonade, glande digestive. Les morceaux de tissus ont été plongés dans du tampon de lyse (4 M thiocyanate de guanidium, 25 mM citrate de sodium pH 7, 0,5% lauryl

sarcosyl, 0,1 M β -mercaptoéthanol) immédiatement après dissection et conservés dans l'azote liquide pour l'extraction ultérieure des ARN totaux.

- Pour les huîtres des conditionnements AC et WC, un morceau d'environ 50 mg de tissu gonadique a été prélevé pour l'extraction des ARN totaux. Les autres organes n'ont pas été prélevés. Les morceaux de tissus ont été plongés dans du tampon de lyse immédiatement après dissection et conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'extraction des ARN totaux.

- Pour toutes les huîtres prélevées dans le conditionnement NC une coupe transversale de la masse viscérale, d'environ 3 mm d'épaisseur, a été réalisée en avant de la cavité péricardique. La coupe a été placée dans du fixateur de Davidson (10% glycérol, 20% formaldéhyde 37-40%, 30% éthanol 95%, 60% eau de mer filtrée à $0,22\text{ }\mu\text{m}$, 10% acide acétique) (Shaw et Battle, 1957) et conservée à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour les analyses en histologie classique et en hybridation *in situ*.

- Pour toutes les huîtres prélevées en NC, AC et WC, un morceau de tissu gonadique d'environ 100 mg a été prélevé, plongé dans de l'éthanol absolu, broyé mécaniquement avec un piston et conservé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour une analyse en cytométrie en flux.

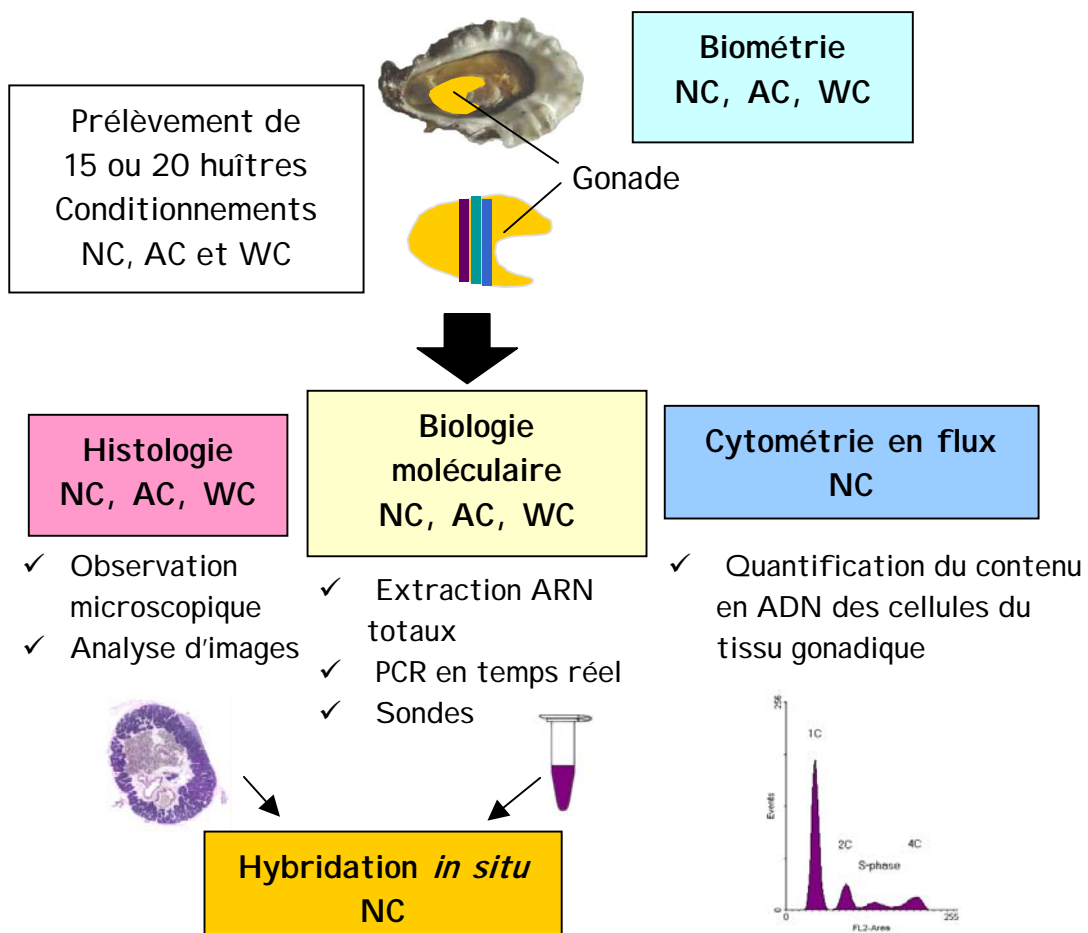


Figure 22 : Représentation schématique des différents prélèvements et analyses réalisés dans les conditionnements naturel (NC), accéléré (AC) et hivernal (WC).

2.2 Analyse du cycle de reproduction

Des suivis de l'état reproducteur des huîtres, du sex-ratio et de la croissance gonadique dans les différentes conditions expérimentales ont été réalisés par histologie qualitative et semi-quantitative. Les 805 individus prélevés dans les trois conditionnements NC, AC et WC ont été traités en histologie et passés en analyse d'images.

2.2.1 Histologie qualitative

Une coupe transversale d'environ 3 mm d'épaisseur a été réalisée en avant de la cavité péricardique puis fixée pendant 48 heures dans du Davidson à 4 °C. La pièce de chair a ensuite été déshydratée dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante et de xylène puis placée dans de la paraffine liquide. Cette étape a été réalisée par un automate CITADEL 2000 (Shandon). L'échantillon a ensuite été placé dans une caissette de plastique et inclus dans de la paraffine liquide, puis placé au réfrigérateur pour favoriser la solidification du bloc. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome puis déposées sur des lames porte-objets en verre. Les coupes ont été colorées par un automate à coloration (SLIDE STAINER HMS 70 de Microm) suivant la méthode utilisant l'hématoxyline de Harris et l'éosine (Martoja et Martoja-Pierson, 1967). Le mélange de ces deux colorants est couramment utilisé en histologie et permet de bien différencier les différents tissus présents sur une coupe histologique (Figure 23). L'éosine est un colorant acide qui colore le cytoplasme en rose et plus particulièrement les structures basiques comme les protéines du cytoplasme, alors que l'hématoxyline est un colorant basique qui colore les noyaux en violet et plus spécialement les structures cellulaires acides comme l'ADN ou l'ARN. Les préparations ont ensuite été montées entre lames et lamelles à l'aide d'une résine d'inclusion de type Eukitt (Kindler GmbH & Co) polymérisant à l'air à température ambiante.

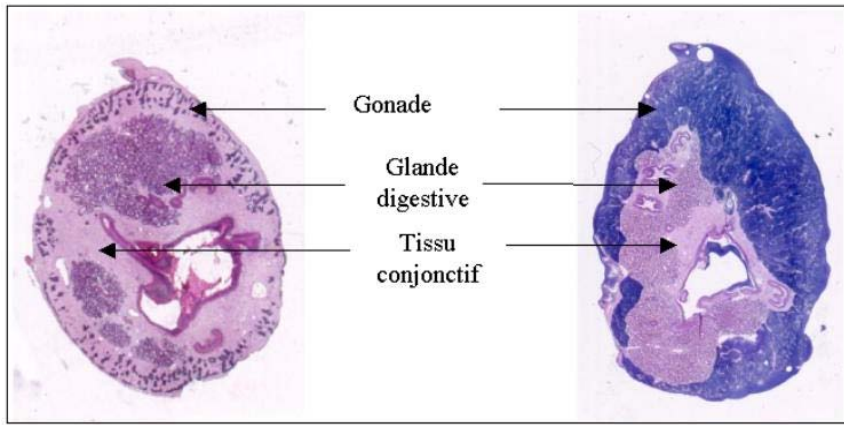
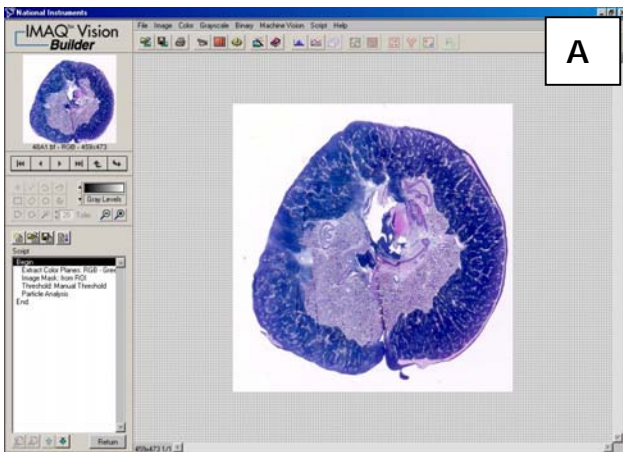
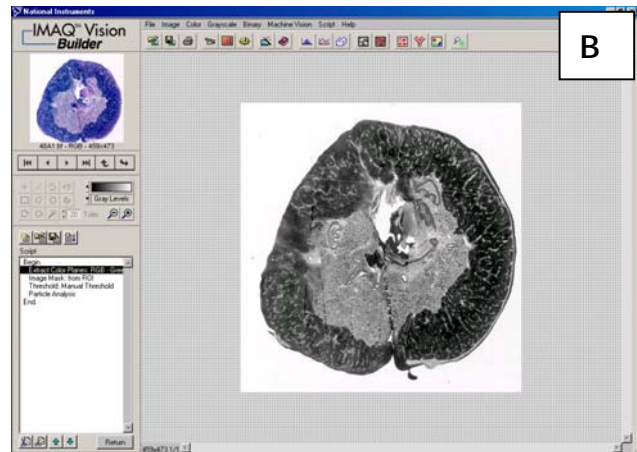


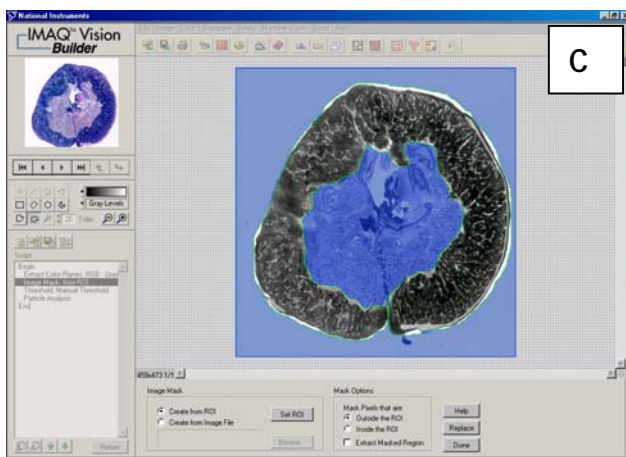
Figure 23 : Coupes histologiques de masse viscérale d'huîtres adultes, colorées à l'hématoxyline-éosine. Les différents tissus sont différenciés par leur coloration.



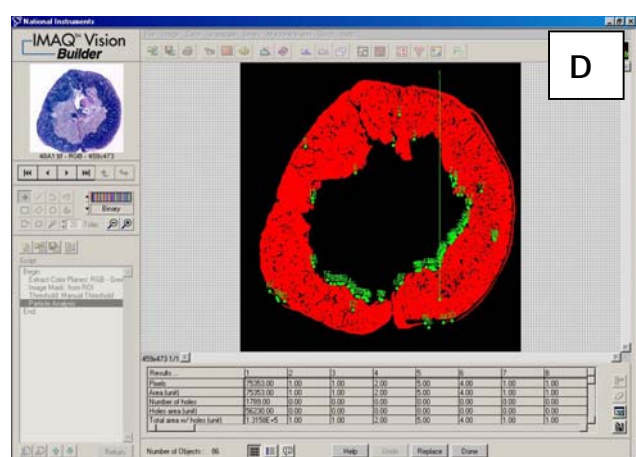
Ouverture du fichier ".tif" contenant l'image scannée d'une coupe histologique de masse viscérale d'huître



Transformation de l'image couleur en image en niveaux de gris



Délimitation manuelle du contour du tissu dont on veut déterminer la surface



Ajustement des niveaux de gris correspondant au tissu sélectionné et calcul automatique de l'aire du tissu en pixels

Figure 24 : Les différentes étapes de l'analyse d'images avec le logiciel IMAQ Vision Builder (National Instrument). Détermination de la surface d'un tissu sur une coupe histologique d'huître.

2.2.2 Histologie semi-quantitative

Chaque coupe histologique a été scannée (scanner HP Scanjet 6300 C) et agrandie à 400% (Figure 24A). La surface totale de la coupe ainsi que la surface de chaque tissu de la masse viscérale (tissu conjonctif, gonade, glande digestive) ont été calculées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (IMAQ vision Builder, National Instrument). Cette analyse, basée sur la coloration différentielle des tissus en histologie, suivait un script défini (Figure 24) : (1) transformation de l'image couleur en une image en niveaux de gris par la fonction "Colour extraction" (Figure 24B), (2) dessin manuel des contours de la surface à déterminer (Figure 24C), (3) détermination de la surface du tissu par ajustement des seuils de niveaux de gris (Figure 24D), (4) calcul automatique de l'aire du tissu en pixels et transfert des données sous le logiciel Excel. Les résultats de surface de chaque tissu sont exprimés en pourcentage de la surface totale de la coupe de masse viscérale.

2.3 Etude du profil d'expression du gène candidat

Le profil d'expression du gène candidat a été analysé par deux techniques, la PCR en temps réel et l'hybridation *in situ*, sur les huîtres prélevées entre février 2002 et février 2003 dans les conditionnements NC, AC et WC.

2.3.1 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux des 409 échantillons de tissu gonadique d'huîtres prélevées en NC, AC et WC et les 120 échantillons des autres tissus prélevés en NC entre février 2002 et février 2003, ont été extraits individuellement selon la méthode de Chomczynski and Sacchi (1987) décrite dans la partie 1.2 de ce chapitre. Les ARN totaux ont ensuite été traités à la DNase et quantifiés par spectrophotométrie selon le protocole décrit dans la partie 1.2.

2.3.2 PCR en temps réel

Principe de la technique

La PCR en temps réel, initialement mise au point par Higuchi *et al.* (1992) est une technique d'amplification de l'ADN qui permet de quantifier et de caractériser l'amplicon formé en temps réel, grâce à l'utilisation d'un marquage fluorescent du produit formé. Elle permet de faire une quantification relative de gènes d'intérêt dans des échantillons donnés par rapport à un gène de référence non régulé (house-keeping gene) ou une quantification absolue (détermination en nombre de copies) par rapport à un standard externe (Poitras et Houde, 2002). La quantité de transcrits d'un gène déterminée par cette technique représente l'expression du gène, les transcrits en cours de synthèse, mais aussi les transcrits déjà formés et stockés dans les cellules. La détection de la quantité d'amplicons peut se faire par des agents se liant à l'ADN double brin, par exemple le SYBR Green que nous avons utilisé dans cette étude (Figure 25) ou par des sondes fluorescentes comme les sondes Taqman ou les "molecular beacons" (Wittwer *et al.*, 1997).

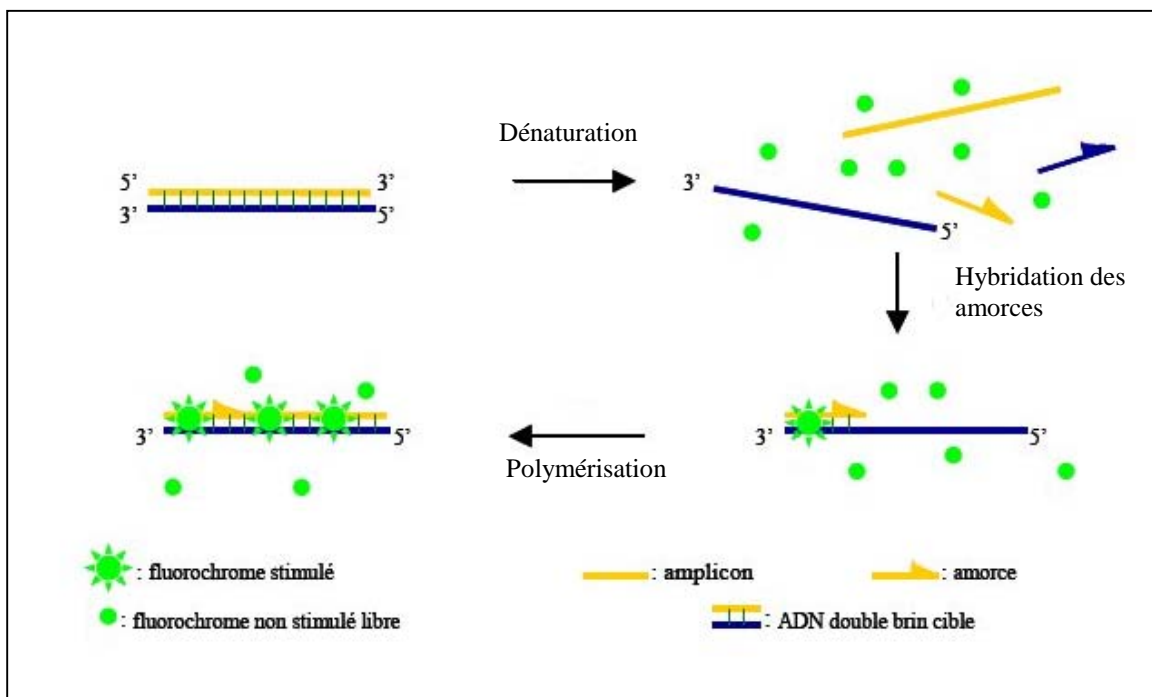


Figure 25 : Mode d'action des fluorochromes de type SYBR Green utilisés en PCR en temps réel, d'après Poitras et Houde (2002).

L'analyse de la quantité d'amplicons formés se fait pendant la phase exponentielle de la PCR. En effet, pendant cette étape, le nombre de copies d'amplicons observé est directement proportionnel au nombre initial de copies. Plus il y a de matrice au départ de la réaction et moins le nombre de cycles nécessaires pour entrer dans la phase exponentielle d'amplification est élevé. Le point où la fluorescence dépasse significativement le bruit de fond, *i.e.* où la phase exponentielle débute, est défini comme le cycle seuil ou Ct (Gibson *et al.*, 1996) (Figure 26A).

Pour chaque couple d'amorces utilisé, l'amplification d'une gamme de dilution d'un échantillon d'ADNc doit être réalisée pour vérifier que l'efficacité ($E = 10^{(-1/\text{pente})}$) de la PCR est comprise entre 99% et 100% et pour déterminer la dilution à laquelle il faut travailler (Figure 26B). La concentration de travail ne doit être ni trop forte pour éviter l'inhibition de la réaction de PCR, ni trop faible pour ne pas être en dessous du seuil de détection. A la fin de la PCR, une courbe de fusion est réalisée entre 95 °C et 70 °C en descendant de 0,5 °C toutes les 10 sec de façon à suivre la renaturation des amplicons à chaque palier de température (Figure 26C). Cette courbe unimodale permet de définir le Tm de l'amplicon (température de fusion), *i.e.* la température à laquelle les deux brins de l'amplicon s'hybrident. Le Tm est spécifique d'un amplicon et renseigne sur sa composition. La courbe de fusion permet également de détecter la présence éventuelle de dimères d'amorces qui peuvent biaiser les résultats de quantification, dans ce cas, la courbe de fusion est bimodale.

Les amorces utilisées pour la PCR en temps réel doivent remplir des conditions précises : les amplicons définis par ces amorces doivent être courts (75-150 bp) ; le nombre de bases G et C doit être supérieur à 50% ; les répétitions de nucléotides doivent être évitées (pas plus de 3 consécutifs) ; les amorces ne doivent pas être complémentaires pour ne pas créer des dimères d'amorces lors de la réaction de PCR ; le Tm des amorces doit se situer autour de 60 °C et il ne doit pas différer de plus de 1 °C entre deux amorces d'un même couple.

Le calcul de la quantité de transcrits d'un gène dans un échantillon utilisée dans cette étude est basé sur la méthode de comparaison des Ct (Livak et Schmittgen, 2001). La quantité relative de l'expression du gène d'intérêt (gène cible) dans un échantillon est normalisée par l'expression d'un gène de référence et relative à un échantillon contrôle qui doit être le même pour toutes les réactions de PCR de façon à pouvoir comparer les résultats des différentes amplifications. La quantité relative de transcrits d'un gène cible dans un échantillon donné est exprimée par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$, où $\Delta Ct = (Ct(\text{échantillon}) - Ct(\text{contrôle}))$ pour le gène cible et pour le gène de référence et $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ gène cible} - \Delta Ct \text{ gène de référence}$. Les quantités relatives de gène cible (rapportées au gène de référence) sont des valeurs sans unité.

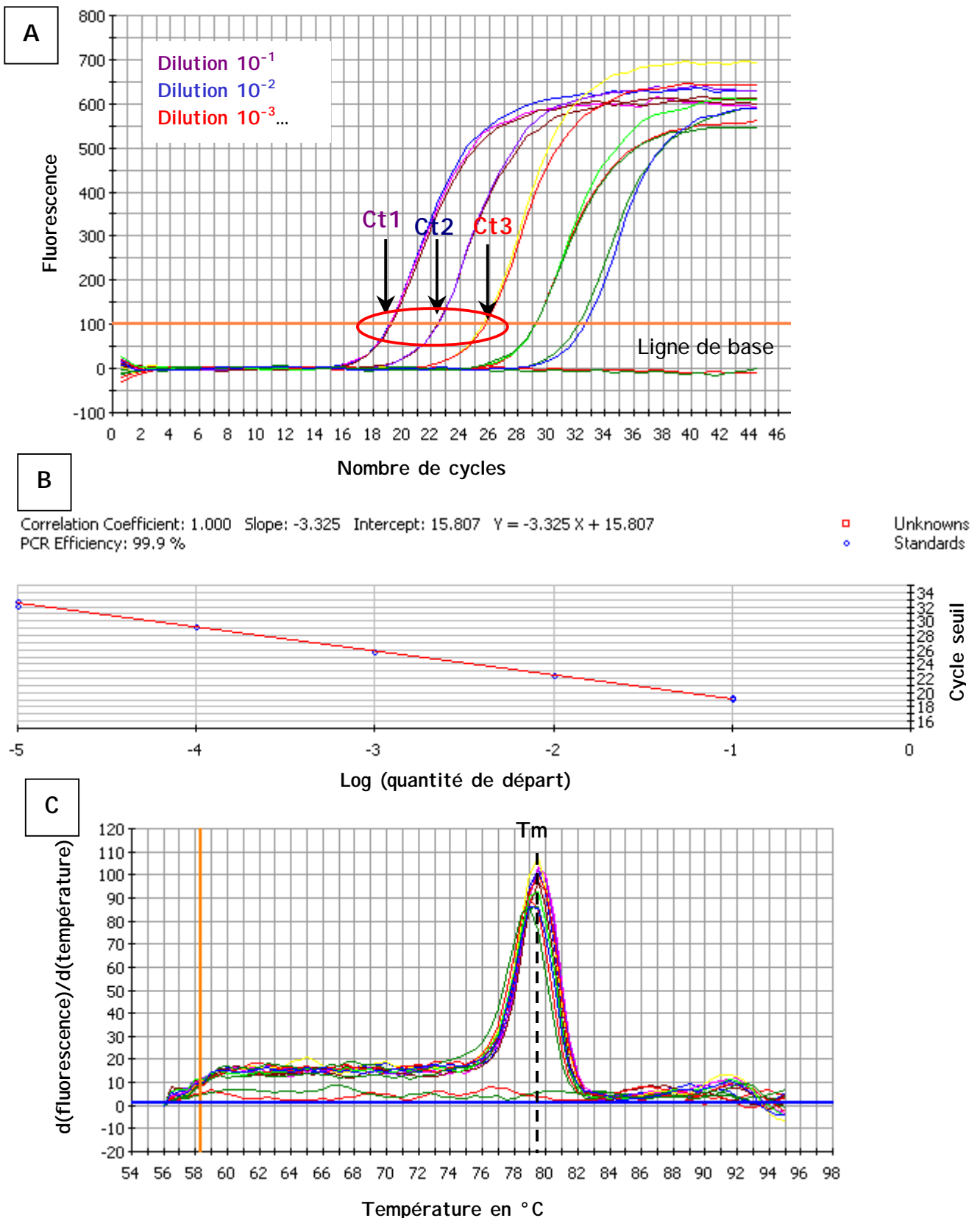


Figure 26 : (A) Courbes d'amplification d'ADNc par PCR en temps réel. Exemple de l'amplification d'une gamme de dilution d'un échantillon. Le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles pour lequel le signal d'émission de fluorescence est significativement plus élevé que la ligne de base (B) droite de régression des cycles seuils de chaque point de gamme, calcul de l'efficacité de la PCR (C) Courbe de fusion. Le pic de la courbe de fusion correspond au T_m de l'amplicon.

Mise au point de la technique pour cette étude

Deux gènes de référence, le facteur d'élongation I (*fElongI*) (numéro d'accension Genbank BQ426516) (Gueguen *et al.*, 2003) et l'actine, ont été testés sur différents échantillons afin de choisir celui dont l'expression est la plus constante dans tous les tissus et à tous les stades de gamétogenèse. L'expression des deux gènes de référence testés, actine et *fElongI*, ne montre pas de différences significatives entre les échantillons, les périodes ou les conditionnements (t-test, $P < 0,05$). Cependant la variabilité de *fElongI* (coefficient de variation = 3,2%) est apparue plus faible sur l'ensemble des analyses que celle de l'actine (7%). Ainsi, les quantités de transcrits du gène *Oyvg* ont été rapportées au gène *fElongI*.

Les amorces utilisées pour amplifier, le gène candidat *Oyvg* et le gène de référence *fElongI*, sont respectivement VS-S9 (5' TCC CCG AGG AGA TTC AGA 3'), VS-AS9 (5' ACG TCA GTG CAA GCA CCA 3') (Figure 18) et qfElong I (5' ACC ACC CTG GTG AGA TCA AG 3'), qrElong I (5' ACG ACG ATC GCA TTT CTC TT 3'). Ces amorces ont été dessinées grâce au logiciel "primer3" disponible sur Internet (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

La gamme de dilution réalisée pour mesurer l'efficacité de PCR comportait les cinq points de dilution suivants : 1/5, 1/10, 1/10², 1/10³, 1/10⁴.

La quantité relative de transcrits du gène candidat (*Oyvg*) a été mesurée dans six tissus : branchies, manteau, muscle adducteur, glande digestive, palpes labiaux et gonade pour 10 échantillons prélevés en mars dans le conditionnement naturel NC.

La quantité relative de transcrits du gène candidat (*Oyvg*) a ensuite été analysée dans le tissu gonadique d'huîtres issues des conditionnements NC, AC et WC et ce pour 5 points de prélèvements entre mars 2002 et février 2003. Douze échantillons ont été analysés pour chacun des 5 points de prélèvements soit 180 échantillons. Les points analysés sont mars, mai, juin, août et octobre pour les conditionnements AC et WC et mars, mai, juin, octobre et janvier pour le conditionnement NC. Le point du mois d'août n'a pas pu être analysé dans le conditionnement NC car les tissus des huîtres étaient dégradés suite à l'infection bactérienne qui s'est répandue dans les bacs de conditionnement à cette époque de l'année.

Les réactions de PCR ont été réalisées en triplicat pour chaque échantillon avec 5 µl d'ADNc (dilué au 1/5) dans un volume total de 15 µl. Le mélange de réaction était composé de : 0,33 µM de chaque amorce, 1,5 µl de fluorescéine et 1 X de "quantitect SYBR Green PCR kit" (Qiagen) comprenant une enzyme *Taq* polymérase, un fluorochrome (SYBR Green),

des dNTPs ainsi que les différents tampons et autres composés nécessaires à la réaction. La fluorescéine permet d'avoir un contrôle interne de la fluorescence. Le programme de PCR était le suivant : activation de la *Taq* polymérase 15 min à 95 °C et 45 cycles comprenant une phase de dénaturation de 30 sec et une phase d'hybridation-élongation de 1 min à 60 °C. Chaque réaction de PCR incluait : (1) un échantillon contrôle commun à toutes les réactions et constitué par l'ADNc d'un échantillon de gonade d'huître prélevée dans le conditionnement naturel en mars, (2) un contrôle négatif d'ARN total traité à la DNase par échantillon qui permet de détecter toute trace de contamination des échantillons par de l'ADN génomique et (3) un blanc (eau) pour détecter les contaminations possibles du mélange réactionnel et les dimères d'amorces.

Dans cette étude, les analyses ont été réalisées avec un appareil Icyler (Biorad). Les résultats d'amplification (courbes d'amplification, valeurs de cycles seuil (Ct), courbes de fusions...) ont été analysés avec le logiciel iCyclerTMIQ, Optical System Software, v. 3.0a. (Biorad).

2.3.3 Hybridation *in situ*

Les techniques d'hybridation *in situ* permettent d'étudier l'expression d'un gène dans différents tissus ou organes d'un organisme à partir de coupes histologiques grâce à l'hybridation spécifique de sondes marquées (ARN ou ADNc) fluorescentes, radioactives ou colorimétriques. Dans cette étude, le patron d'expression du gène candidat a été analysé par hybridation *in situ* sur les lames histologiques réalisées à partir des coupes de masses viscérales des huîtres élevées dans le conditionnement naturel GIGAREPRO 2002. L'analyse a été réalisée sur 5 mâles et 5 femelles pour cinq stades différents du cycle de reproduction, déterminés par observation microscopique, soit 50 individus au total. Les stades de gamétogenèse sélectionnés pour l'étude sont l'initiation de la gamétogenèse (mars), la maturation (avril), à maturité (juillet), après l'émission des gamètes (août) et pendant la période de "repos sexuel" (novembre).

Synthèse des sondes ADNc

Trois fragments ADNc ont été amplifiés par PCR, selon le protocole décrit dans la partie 1.4., avec trois couples d'amorces spécifiques du gène étudié (VS-S1/VS-AS2, VS-S2/VS-AS3, VS-S3/VS-AS4) (Figure 18), à partir d'une matrice ADNc de gonade d'huître

adulte en cours de gamétogenèse. Pour chacun des 3 produits d'amplification, 2 PCR asymétriques ont été réalisées. L'une avec l'amorce sens pour synthétiser la sonde servant de témoin négatif et l'autre avec l'amorce antisens pour synthétiser la sonde positive. Les sondes ont été synthétisées lors de l'amplification par incorporation de nucléotides marqués à la digoxigénine (DIG-dUTP). Ces sondes mitoyennes dans la séquence du gène couvrent des régions de 280 bp, 260 bp et 170 bp, respectivement. L'incorporation des nucléotides DIG-dUTP a été vérifiée par électrophorèse des produits de PCR en gel d'agarose à 1%, les sondes marquées montrant un retard de migration par rapport aux produits de PCR non marqués, dû à l'incorporation des nucléotides marqués à la digoxigénine.

Préparation des lames

Les lames histologiques ont été préparées suivant le protocole décrit dans la partie 2.2.1., sans l'étape de coloration. Le travail a été réalisé en conditions " RNase free". Les coupes ont ensuite été déparaffinées avec du xylène puis de l'éthanol absolu. Après séchage, les tissus ont été perméabilisés par un traitement à la protéinase K (Sigma) (100 µg/mL) dans du TE (50 mM Tris, 10 mM EDTA) pendant 30 min à 37 °C. Puis, les lames ont été déshydratées dans l'éthanol absolu. Pour chaque échantillon, les lames ont été réalisées en duplicat, la première étant hybridée avec la sonde sens (contrôle négatif) et la seconde avec la sonde antisens.

Hybridation

Deux mélanges d'hybridation ont été réalisés, l'un avec les trois sondes sens et l'autre avec les trois sondes antisens. Ces mélanges d'hybridation sont composés de tampon d'hybridation (10% sulfate dextran, 4 X SSC (0,6 M NaCl, 0,06 M Nacitrate, pH 7), 0,25 mg/ml ARNt de levure, 1 X denhardt's solution (Sigma), 50% formamide) et du mélange des trois sondes sens ou antisens (100/5). Pour chaque jeu de lames (sens ou antisens), le mélange d'hybridation a été déposé dans des chambres autocollantes "gene frames" (Abgène) préalablement collées sur les lames histologiques et recouvertes d'une lamelle souple pour éviter l'évaporation. Les lames ont ensuite été placées 5 min sur une plaque chauffante à 95 °C pour dénaturer l'ADN, refroidies 1 min sur la glace puis incubées une nuit à 42 °C. Elles ont ensuite été lavées dans du SSC 2 X à température ambiante puis dans du SSC 0,2 X à 42 °C.

Détection

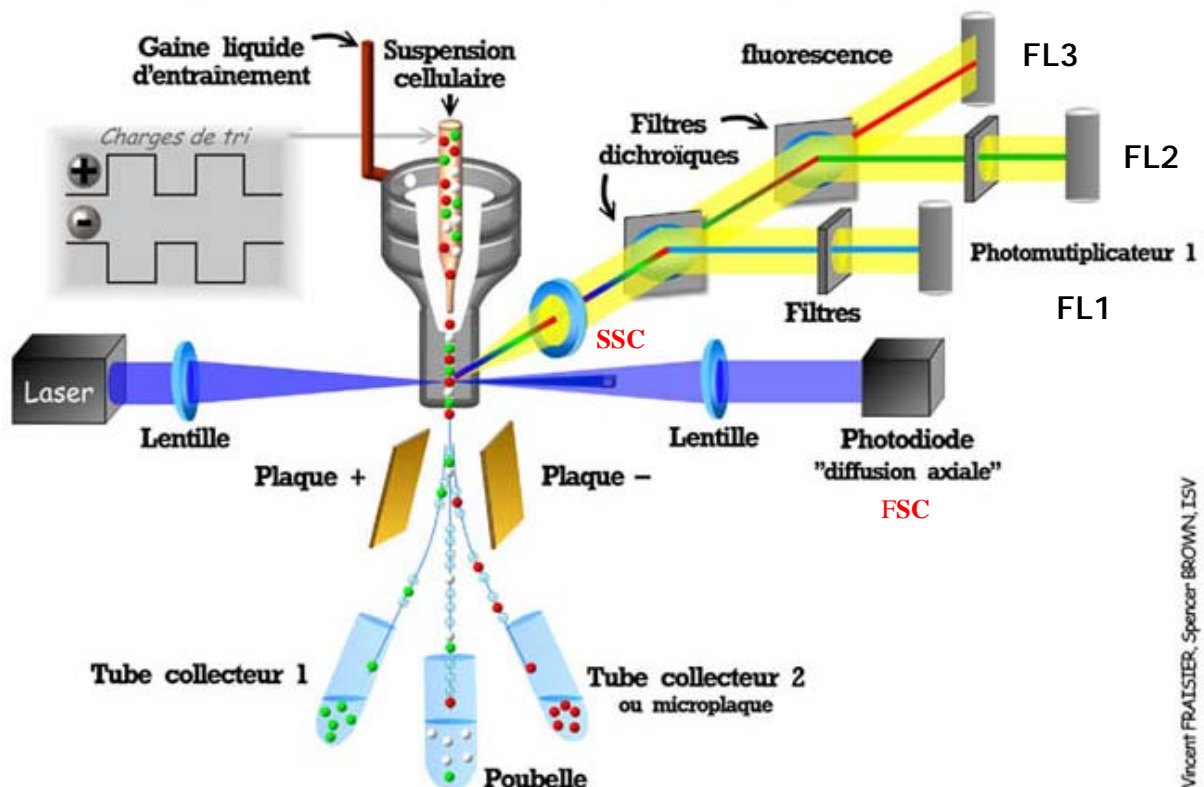
La détection du marquage par les sondes a été faite suivant les instructions fournies dans le kit "DIG nucleic acid detection kit" (Roche). Les lames ont été incubées 1 heure à température ambiante avec la solution d'anticorps anti-digoxigénine dilué au 1/500 (Roche). La révélation a été faite dans l'obscurité pendant 16 heures avec la solution de révélation NBT/BCIP (0,375 mg/ml Nitroblue tetrazolium chloride / 0,188 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate). Les lames ont ensuite été contre-colorées 1 min au Brown de Bismarck Y (BBY) afin de visualiser le marquage, rincées dans l'éthanol 95° et dans le xylène, puis montées entre lame et lamelle.

Les observations ont été faites avec un microscope Leica DMLS au grossissement X 400 ou X 1000 équipé d'un appareil photo Canon Power Shot S40. Les photographies ont ensuite été transformées en fichier ".tif" grâce au logiciel ZoomBrowser EX version 3.2.

2.4 Etude du cycle cellulaire des cellules germinales

2.4.1 Principe de la technique

La cytométrie en flux est une technique d'analyse et de tri *in situ* de constituants cellulaires dans un système de fluide très fin sous pression ou liquide de gaine. Les cellules en suspension sont guidées vers une chambre à quartz où elles vont traverser un faisceau laser de type argon qui émet à une longueur d'onde de 488 nm (Figure 27). Après intersection avec le rayon incident, la cellule diffracte la lumière. L'intensité de la lumière diffractée dans l'axe est proportionnelle à la taille de la cellule (FSC : forward scatter) ; celle diffractée à 90° est représentative de son contenu cytoplasmique (SSC : side scatter). Chaque cellule passant devant le faisceau laser peut aussi émettre de la fluorescence à diverses longueurs d'ondes, qui est mesurée à 90°.



Vincent FRAISIER, Spencer BROWN, ISV

Figure 27 : Représentation schématique d'un cytomètre de flux.

Le FACScalibur (Beckton-Dickinson) utilisé dans cette étude est équipé de trois photomultiplicateurs qui permettent de recueillir des fluorescences émises dans trois gammes de longueur d'onde. La fluorescence rouge ($\lambda > 620$ nm) sur le photomultiplicateur FL3, la fluorescence orange ($565 \text{ nm} < \lambda < 592 \text{ nm}$) sur le photomultiplicateur FL2, la fluorescence verte ($515 \text{ nm} < \lambda < 530 \text{ nm}$) sur le photomultiplicateur FL1. Cette fluorescence peut être naturelle ou résulter de l'incorporation ou de la fixation de sondes spécifiques (fluorochromes, anticorps marqués, plasmide GFP...). Les signaux détectés par le système optique sont amplifiés, convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques (nombre de cellules, intensité de fluorescence, taille des cellules...) (Figure 27). Elles sont analysées grâce à l'unité informatique du cytomètre en flux.

Cette technique permet de faire individuellement et simultanément l'analyse quantitative et qualitative de plusieurs paramètres, selon des critères choisis, sur chaque élément mis en suspension dans le liquide. Ces éléments peuvent être des cellules, des bactéries, mais aussi des constituants sub-cellulaires. Cette technique a des applications dans de nombreux domaines comme l'immunologie (tri et comptage cellulaire, mesure de la phagocytose ou de l'apoptose), la microbiologie (détection de microorganismes) ou encore la recherche animale (mesure de la ploïdie cellulaire, suivi du cycle cellulaire). Le domaine d'analyse qui nous intéresse ici est la séparation des cellules sur la base de leur ploïdie, *i.e.* leur contenu en ADN. En effet, la cytométrie étudie la distribution des cellules dans le cycle cellulaire en distinguant les cellules en mitose ou en phase G2 (tétraploïdes), celles en phase G1 (diploïdes), les cellules en fin de méiose (haploïdes) et les cellules en phase S (avec une quantité intermédiaire en ADN).

Dans cette étude nous avons développé chez *C. gigas*, une technique de cytométrie en flux, classiquement utilisée chez les mammifères, qui permet l'étude du cycle cellulaire des cellules germinales mâles. Cette technique n'est pas applicable aux femelles car les ovocytes restent diploïdes jusqu'à leur émission dans l'eau de mer ce qui empêche de distinguer les différents stades de développement sur la base de la ploïdie des cellules. De plus, ils ont un diamètre trop important pour passer dans les capillaires du cytomètre en flux.

2.4.2 Préparation des cellules

Immédiatement après les prélèvements réalisés dans le conditionnement naturel, les huîtres ont été ouvertes et la masse viscérale a été rincée à l'eau de mer filtrée à $0,22 \mu\text{m}$. Un morceau du tissu gonadique (environ 100 mg) a été prélevé en avant de la région péricardique

puis broyé à l'aide d'un piston dans un tube Eppendorf contenant 800 µl d'eau de mer filtrée.

La solution obtenue est passée sur une soie de 60 µm. La solution est centrifugée 10 min à 500 tours/min. Les cellules contenues dans le surnageant sont ensuite fixées avec de l'éthanol absolu (2/1 v/v) et conservées à - 20 °C jusqu'à utilisation.

Marquage et analyse des cellules

Pour les analyses, cinq points d'échantillonnage du conditionnement naturel NC ont été sélectionnés sur la base du stade de reproduction des huîtres, déterminé par observation microscopique des coupes histologiques des mêmes prélèvements. Les périodes choisies sont l'initiation de la gamétogenèse (mars), le début de la maturation (avril), la phase de maturation (mai), à maturité (juin) et juste avant l'émission des gamètes (juillet). Dix individus ont été analysés par point.

Pour les stades choisis, les solutions de cellules fixées ont été à nouveau filtrées sur une soie de 60 µm et comptées à la cellule de Malassez. Un volume de solution contenant 1 million de cellules a été centrifugé 10 min à 2 000 tours/min. La lyse des cellules a ensuite été effectuée par choc osmotique par une incubation du culot cellulaire dans de l'eau distillée pendant 1 heure à 4 °C. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée 10 min à 2 000 tours/min et le culot a été re-suspendu dans 600 µl de solution de PBS 1 X (2 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, pH 7.2) contenant 50 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma) et incubé à l'obscurité à 37 °C pendant 45 min.

Pour chaque échantillon, 10 000 cellules ont été analysées à un débit de 15 µl/min. La fluorescence rouge-orange émise par les cellules marquées à l'iodure de propidium a été enregistrée par le photomultiplicateur FL2.

Les résultats ont été analysés avec le logiciel WINDMDI (v. 2.8, Joseph Trotter). Quatre graphes permettent d'analyser les résultats (Figure 28): Deux graphes "density-plot" : FSC vs SSC (Figure 28A) qui permet de localiser la population cellulaire et d'analyser la taille et la complexité des cellules ; SSC vs FL2-Height (Figure 28B) qui permet de localiser les populations cellulaires en fonction de leur contenu en ADN ; Un graphe "dot-plot" FL2-Width vs FL2-Area (Figure 28C) qui permet de distinguer facilement les doublets de cellules (deux cellules collées l'une à l'autre). Une fenêtre entourant les cellules bien individualisées et excluant les doublets est créée sur le graphe. Seules les cellules contenues dans la fenêtre seront prises en compte pour l'analyse. Pour un doublet de cellules avec une quantité x d'ADN, l'aire du pic est la même que celle obtenue pour une seule cellule avec une quantité 2x

d'ADN mais la largeur du pic est deux fois plus importante pour le doublet ; le dernier graphe est un histogramme (Figure 28D) qui représente les différentes populations cellulaires, différenciées par leur contenu cellulaire en ADN et le nombre de cellules contenues dans chacune d'elles.

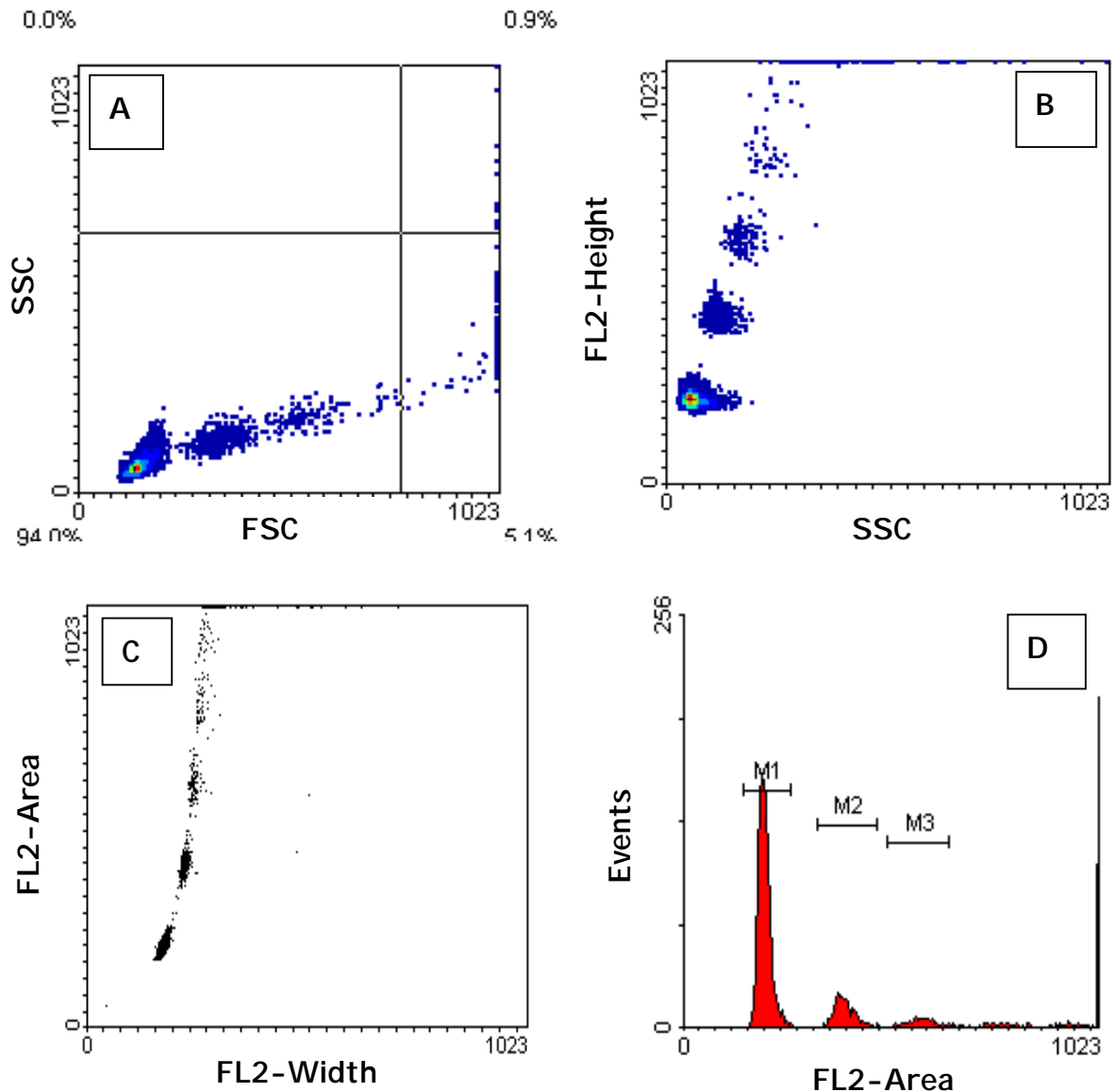


Figure 28 : Graphes d'analyse des résultats de cytométrie en flux. (A) Le cytogramme FSC vs. SSC permet d'analyser la taille et la complexité des cellules, (B) Le cytogramme SSC vs. FL2-Height permet de localiser les populations cellulaires en fonction de leur contenu en ADN (C) Le cytogramme FL2-Width vs. FL2-Area permet de distinguer les doublets de cellules (D) L'histogramme permet de séparer les différentes populations cellulaires en fonction de leur contenu en ADN et indique le nombre d'événements dans chaque population.

2.5 Analyses statistiques

Les surfaces gonadiques (en %), préalablement transformées par la fonction "arcsin $\sqrt{}$ ", les paramètres biométriques (biomasse total en g, longueur de coquille en cm, biomasse de masse viscérale en g) et les indices de conditions des huîtres élevées dans les conditionnements NC, AC et WC, ont été comparés statistiquement entre périodes et entre conditionnements par des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis au seuil de significativité de 5%. Des tests de Chi-deux ont été utilisés pour tester les valeurs de sex ratio.

Les quantités de transcrits *Oyvlg* rapportées aux quantités de transcrits du gène *fElongI*, pour un mois et un conditionnement (NC, AC ou WC) donnés, ont été comparés, entre tissus et entre périodes, par des tests statistiques de Kruskal-Wallis à un seuil de significativité de 5%. Des comparaisons multiples ont été réalisées par des test-*t* de Student pour définir des groupes homogènes, au seuil de significativité de 5%.

Les différences de quantités relatives des gènes *Actine* et *fElongI* ont été comparés entre échantillons et entre périodes par un test-*t* de Student au seuil de significativité de 5% après un ajustement de Bonferroni.

Les proportions des différentes sous-populations de cellules germinales mâles des huîtres du conditionnement NC ont été comparées entre les périodes analysées, par des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis au seuil de significativité de 5%. Tous les calculs ont été réalisés avec le logiciel SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990).

3. Etude du développement des cellules germinales de *C. gigas* au cours de l'embryogenèse

3.1 Matériel biologique

3.1.1 Reproduction et élevage contrôlé

Des huîtres matures collectées sur le site ostréicole de l'Aber-benoit (Bretagne, France) ont été croisées suivant un protocole standard de croisement contrôlé décrit par Huvet *et al.* (2002). Les géniteurs choisis au hasard ont été nettoyés, ouverts et sexés par observation microscopique. Les gamètes ont été récupérés par scarification de la gonade, méthode dite du "stripping". Après filtration sur tamis (maille de 60 μm) pour éliminer les débris, les ovocytes ont été comptés sur cellule de Malassez. Les ovocytes de 6 femelles (50 millions) et les spermatozoïdes de 4 mâles ont été mélangés dans un bécher de 5 L. Après l'apparition du second globule polaire, signe que la fécondation a eu lieu, les œufs ont été tamisés (maille de 20 μm) pour éliminer l'excédent de sperme puis répartis dans des bacs cylindro-coniques de 150 L avec une densité de 40 embryons/L (Figure 20). Les cultures ont été maintenues à 25 °C et oxygénées par un bullage permanent pour éviter la sédimentation des embryons. Après 48 heures, la densité d'élevage des larves D a été ajustée à 5 larves/L dans les mêmes bacs de 150 L. Régulièrement au cours de l'élevage larvaire, les larves ont été collectées par tamisage puis comptées, en trois prélèvements de 100 μl , grâce à une cellule quadrillée placée sous un projecteur de profil. Les densités d'élevage ont été réajustées après chaque dénombrement et diminuées au fur et à mesure du grossissement des larves. Au stade pédivéligère, avant la métamorphose, les larves ont été récupérées de nouveau et placées dans des bacs avec une densité de 2 larves/L pour préparer la fixation. Les premières fixations ont été observées 25 jours post-fécondation.

3.1.2 Echantillonnage

Différents stades de développement, déterminés par observation microscopique, ont été échantillonnés : ovocyte avant fécondation, embryon 4 cellules (1 heure post-fécondation (hpf)), embryon 8 cellules (2 hpf), blastula (3 hpf), morula (5 hpf), gastrula (7 hpf), larve

trochophore (16-18 hpf), larve D (48 hpf), véligère à umbo (7 jours post-fécondation), larve véligère œillée (14 jpf), larve pédivéligère (18 jpf) et post-larve (27 jpf). Les temps de développement indiqués entre parenthèses correspondent à un élevage larvaire à 25 °C.

Deux traitements ont été réalisés sur les prélèvements :

- Un million d'embryons ou de larves de chaque stade ont été récupérés sur tamis (mailles de 20 µm à 100 µm) et transférés dans des tubes Eppendorf. Le surnageant d'eau de mer a été retiré à la pipette après sédimentation des embryons puis 1 ml de tampon d'extraction TRIzol (Gibco BRL) a été ajouté dans chaque tube pour les extractions d'ARN totaux. Les tubes ont ensuite été conservés dans l'azote liquide jusqu'à utilisation.

- Deux millions d'embryons ou de larves de chaque stade ont été récupérés sur tamis et transférés dans des tubes Eppendorf. Le surnageant d'eau de mer a été retiré à la pipette après sédimentation des embryons. Les embryons ont ensuite été fixés pendant 1 heure dans du MEMPFA-T (0,1 M Mops pH 7,4; 2 mM EGTA; 1 mM MgSO₄; 4% paraformaldéhyde; 0,1% Tween 20), déshydratés dans des bains successifs de méthanol/MEMPFA-T (25/75, 50/50, 75/25, 100/0) puis lavés 15 min dans du méthanol, pour les manipulations d'hybridation *in toto*. A ce stade, les échantillons ont été conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

3.2 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux des pools d'embryons et de larves prélevés à chaque stade de développement ont été extraits au TRIzol[®] suivant le protocole fourni par le fabricant (GibcoBRL). Les ARN totaux extraits ont été traités à la DNase et quantifiés selon le protocole décrit dans le paragraphe 1.2.

3.3 Etude du profil d'expression du gène candidat au cours du développement embryonnaire

3.3.1 PCR en temps réel

Le profil d'expression du gène candidat a été étudié par PCR en temps réel à tous les stades de développement échantillonnés, des ovocytes avant fécondation jusqu'aux post-larves.

Les ARN totaux des embryons et des larves ont préalablement été reverse-transcrits en ADNc suivant le protocole décrit dans la partie 1.3.. Le protocole utilisé pour la PCR en temps réel est le même que celui décrit dans la partie 2.4.2.

3.3.2 Hybridation *in toto*

La technique d'hybridation *in toto* permet d'étudier l'expression d'un gène d'intérêt dans un organisme entier de petite taille. Elle est souvent utilisée pour suivre l'ontogenèse d'un gène au cours du développement embryonnaire d'un organisme. Comme la technique d'hybridation *in situ*, l'hybridation *in toto* est basée sur l'hybridation de sondes ADNc ou ARN spécifiques du gène étudié.

Dans cette étude, le patron d'expression du gène candidat a été étudié par hybridation *in toto* au cours du développement embryonnaire et larvaire de *C. gigas* pour tous les stades de développement échantillonnés.

Synthèse des ribosondes

Un fragment de 675 pb du gène candidat a été amplifié par PCR avec des amorces spécifiques VAS-S1 (5' TCC AGG AAC CAC AAG CCC TG 3') et VAS-AS4 (5' CTG GAG CTT TCC CAA GCT TG 3') selon le protocole décrit en 1.4., excepté la température d'hybridation qui était de 52 °C pour cette réaction. Les produits de PCR ont ensuite été clonés dans un vecteur "pCR[®]4-TOPO" selon le protocole décrit dans la partie 1.5. Une partie des plasmides isolés ont été linéarisés par l'enzyme de restriction *Not* I (10 U/μl) et une autre partie par l'enzyme *Pst* I (20 U/μl) à 37 °C pendant une nuit. 10μg de plasmide ont été linéarisés avec chaque enzyme à raison de 5 U/μg de plasmide, dans un volume réactionnel

de 50 μ l. Les plasmides linéarisés avec *Not* I ont servi à la synthèse des sondes antisens et ceux linéarisés avec *Pst* I à la synthèse des sondes sens. La synthèse des ribosondes marquées à la digoxigénine a été effectuée au cours d'une réaction de transcription inverse en utilisant les plasmides comme matrice. Pour la synthèse de la sonde antisens, le mélange réactionnel, d'un volume total de 20 μ l, était composé de 1 μ g de plasmide linéarisé par *Not* I, 1 mM de chaque oligonucléotide ATP, GTP, CTP, 0,65 mM de UTP, 0,35 mM de DIG-11-UTP (Roche), 1 X de tampon de réaction fourni avec la polymérase, 2 unités/ μ l de réaction de RNase inhibitor et 1 unité/ μ l de réaction de T3 polymérase (Roche). La transcription inverse a été réalisée pendant 2 heures à 37 °C. Pour la sonde sens, le plasmide digéré par *Pst* I a été utilisé comme matrice et la transcription inverse a été faite avec la T7 polymérase. Tous les autres paramètres de la réaction étaient identiques à ceux décrits pour la synthèse de la sonde antisens.

Hybridation

Les échantillons, conservés à -20°C dans du méthanol (partie 3.1.2.), ont été progressivement réhydratés dans des bains successifs de méthanol/TBS-T (25/75, 50/50, 75/25, 0/100). Les cellules ont été perméabilisées par un traitement à la protéinase K (Sigma) (50 ng/ml) dans du TBS-T à 37 °C pendant 20 min. Les échantillons ont ensuite été mis à incuber successivement dans 0,1 M de triéthanolamine pH 7-8 (TEA) (Merck), TEA avec 2,5 μ l/ml d'acétique anhydrique et TEA avec 5 μ l/ml d'acétique anhydrique puis lavés dans du TBS-T. Les embryons ont alors été re-fixés 20 min dans du MEMPFA-T, lavés cinq fois dans du TBS-T puis dans un mélange TBS-T/tampon d'hybridation (50/50) (5 X SSC, 50% formamide, 100 μ g/ml d'ARN de torula, 1,5% de tampon de blocage (Roche), 5 mM EDTA, 0,1% Tween 20). Les embryons ont été pré-hybridés dans du tampon d'hybridation à 65 °C pendant 6 heures. Après la pré-hybridation, chaque échantillon a été réparti dans deux tubes, le premier a été hybridé avec la sonde sens et le second avec la sonde antisens. Les sondes sens ou antisens (1/100) ont été ajoutées à une solution fraîche de tampon d'hybridation et l'hybridation a été réalisée à 65 °C pendant une nuit. Les échantillons ont ensuite été lavés successivement 20 min dans des bains de tampon d'hybridation / 2 X SSC en proportions 50/50, 25/75, 0/100 à 65 °C et 30 min dans deux bains de 0,2 X SSC avec 0,3% chaps (Sigma). Deux nouveaux lavages de 10 min ont ensuite été faits dans du MaNaT (100 mM acide maléique, 150 mM NaCl pH 7,5, 0,1% Tween 20) et la réaction a été bloquée par du tampon de blocage (MaNaT avec 0,1% solution de blocage (Roche)) pendant 1 heure. Les

embryons ont ensuite été mis en incubation pendant une heure avec une solution fraîche de tampon de blocage contenant l'anticorps anti-digoxigénine (dilué au 1/5000) couplé à la phosphatase alcaline (100 mM Tris pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) (Roche). Les échantillons ont alors été lavés 2 fois 5 min puis 6 fois 15 min dans du MaNa-T. Les embryons ont été colorés, à l'obscurité, pendant 30 min avec une solution de tampon phosphatase alcaline contenant 1% de polyvinyl alcool (PVA) et 16 µl de NBT/BCIP par ml de tampon (Nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) (Roche). La réaction a été stoppée par deux lavages dans du TBS-T. Les échantillons ont été re-fixés dans du MEMPFA-T pendant 20 min, lavés dans du TBS-T puis dans de l'éthanol 70°.

Pour l'observation, les embryons ont été déshydratés dans du DMP (di-méthoxypropane, Fluka) activé avec du HCl (5 µl pour 10 ml de DMP), lavés dans de l'histosol et montés entre lame et lamelle avec de la résine Canada Balsam (Sigma). Des photographies ont été prises sous un microscope DIAPLAN de Leitz équipé d'objectifs DIC (Nomarski) et d'un appareil photo avec une pellicule Fuji Velvia 50 ASA.

3.4 Analyses statistiques

Les quantités de transcrits *Oyvlg*, mesurées par PCR en temps réel et rapportées aux quantités de transcrits *fElongI* ont été comparées, entre les différents stades de développement embryonnaire de l'huître, par des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis au seuil de significativité de 5%. Les calculs ont été réalisés avec le logiciel SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990).

Troisième chapitre :
Origine et développement des
cellules germinales de
Crassostrea gigas

1. *Oyvlg*, premier marqueur de la lignée germinale de *C. gigas*

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans "Biochemical and Biophysical Research Communications". La partie qui suit est une synthèse des principaux résultats développés dans l'article.

La réussite du conditionnement des géniteurs de *C. gigas* en éclosérie dépend de deux étapes majeures : l'initiation du cycle de reproduction et la maturation des cellules germinales. La maturation gonadique a été très étudiée chez *C. gigas*, dans la nature comme en milieu contrôlé et le déterminisme de ces processus commence à être bien compris. A l'inverse, la phase d'initiation de la gamétogenèse, qui comprend la différenciation et la prolifération des cellules germinales, n'a été que très peu étudiée et reste méconnue chez *C. gigas*.

Lorsque le cycle de reproduction est ré-initié, en hiver, de nombreuses gonies en multiplication sont rapidement observées dans les tubules en développement, par histologie, sans que l'on puisse déterminer leur origine cellulaire (Lubet *et al.*, 1976; Lango-Reynoso, 1999). En effet, l'existence de cellules souches n'a pas pu être mise en évidence avec certitude (Lubet *et al.*, 1976). La difficulté de ces études réside dans la structure de la gonade des huîtres qui est un organe mixte où les premières cellules germinales sont dispersées dans le tissu conjonctif et qui disparaît pendant la période de repos sexuel. Les observations macroscopiques et les analyses histologiques utilisées jusqu'à présent pour étudier le développement de la gonade ne permettent pas de mettre en évidence l'origine de la lignée germinale. Afin de pouvoir déterminer l'origine cellulaire des gonies et de mettre en évidence les mécanismes de renouvellement annuel de la population de cellules germinales, nous avons recherché un marqueur spécifique des cellules germinales de *C. gigas*.

Cette partie présente la caractérisation du premier marqueur moléculaire spécifique des cellules germinales chez les mollusques, le gène *Oyvlg* (Oyster *vasa*-like gene), orthologue du gène *vasa* de la drosophile, et la mise en évidence de l'origine et du développement des cellules de la lignée germinale.

Un fragment d'ADNc d'une longueur de 757 pb a été isolé par la technique de RT-PCR à partir d'une matrice d'ARN total d'ovocytes d'huîtres matures, avec des amorces dégénérées (VAS A et VAS E) construites dans les zones conservées des séquences protéiques *vasa* de

Drosophila melanogaster, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio* et *Mus musculus*. Les extrémités 5' et 3' de l'ADNc ont ensuite été obtenues par la technique de RACE-PCR avec deux jeux d'amorces spécifiques de la partie connue de l'ADNc. La séquence ADNc totale obtenue comprend une phase ouverte de lecture (ORF) de 2 277 pb, un codon stop (TAA) et une région non transcrite à l'extrémité 3' (3' UTR) de 811 pb. La séquence protéique, déduite de la séquence nucléotidique isolée, contient les 8 séquences consensus des protéines de la famille des DEAD-box (Figure 7). Ainsi, la séquence isolée chez *C. gigas* code pour une protéine DEAD-box. Toutes les protéines de cette famille ont une activité d'hélicase de l'ARN et d'hydrolyse de l'ATP (Schmid et Linder, 1992). Les motifs AXXGXGKT et DEAD responsables de l'activité d'hydrolyse de l'ATP et les motifs SAT et HRIGR conférant une fonction de déroulement de l'ARN à la protéine sont présents dans la séquence d'huître. De plus, dans la région C-terminale, 6 des 8 derniers acides aminés sont des résidus acides (glutamate ou aspartate), particularité caractéristique de plusieurs "binding-protéines" des acides nucléiques simple brin (ARN, ADNc) (Hay *et al.*, 1988). Enfin, la région N-terminale de notre séquence protéique est riche en résidus glycine (G) et contient plusieurs répétitions du motif arginine-glycine-glycine (RGG), propriétés particulières de nombreuses binding-protéines de l'ARN (Schmid et Linder, 1992). Parmi les protéines de la famille des DEAD-box, notre séquence protéique présente une plus forte identité de séquence avec les protéines VASA traduite par de forts taux d'identité avec les protéines VASA de la drosophile (45%), du zebrafish (49%), de la souris (50%) et d'une ascidie (59%). L'appartenance de notre protéine au groupe de protéines VASA, plutôt qu'à d'autres groupes de protéines de la famille des DEAD-box tels que le groupe PL10, est confirmée par une analyse phylogénétique par "neighbour-joining" (Figure 29). L'ensemble de ces données permet de conclure que la séquence ADNc isolée chez *C. gigas* correspond à la séquence d'un orthologue du gène *vasa*. Ce gène, dénommé Oyster *vasa*-like gene (*Oyvlg*), est le premier orthologue du gène *vasa* isolé chez les mollusques.

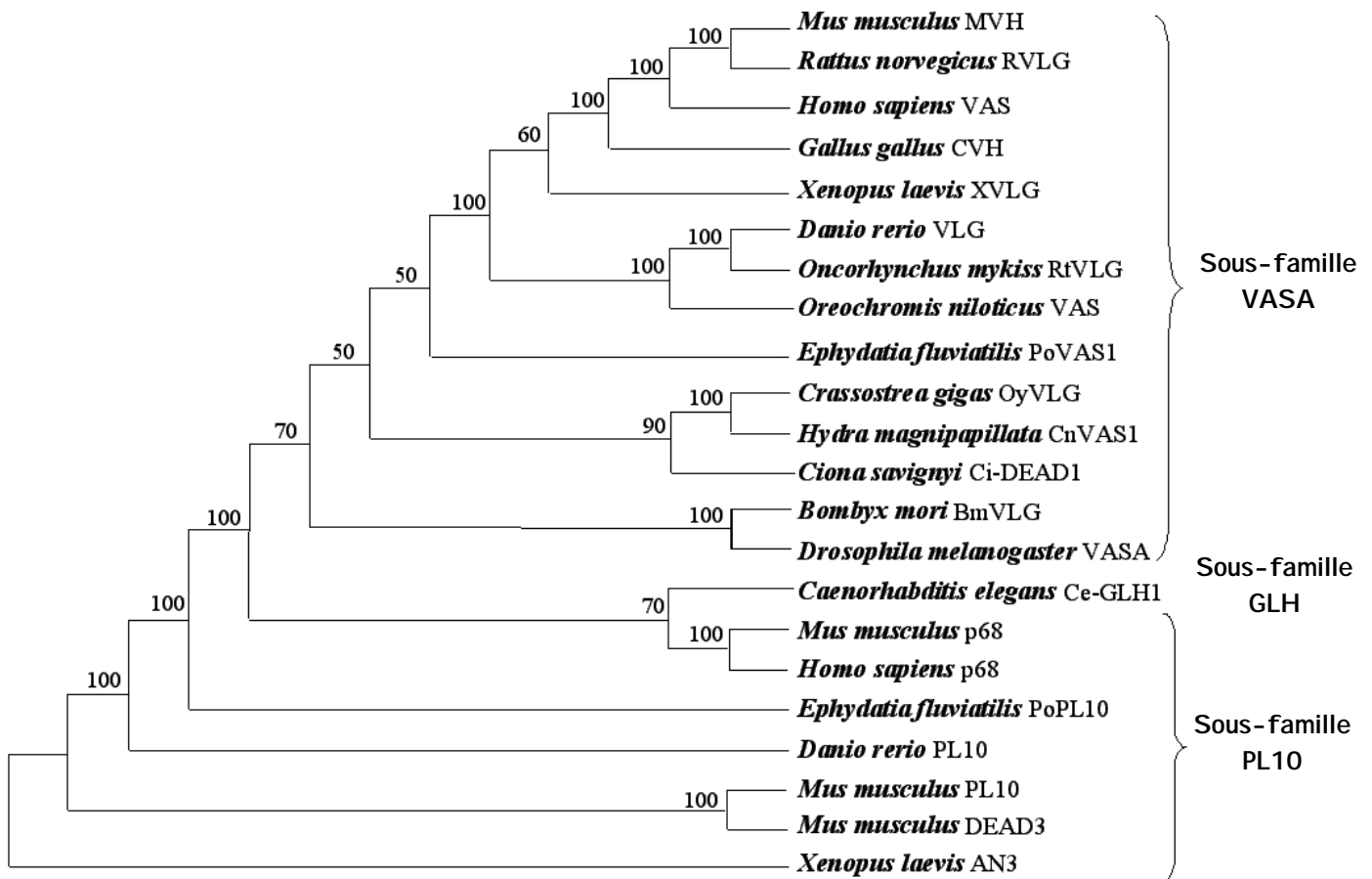


Figure 29 : Représentation graphique de l'analyse phylogénétique des protéines orthologues de VASA et d'autres protéines de la famille des DEAD-box. Les valeurs à chaque nœud représentent le pourcentage donné par l'analyse de "bootstrapping"

Le profil d'expression temporel et spatial du gène *Oyvlg* a été analysé par RT-PCR et par PCR en temps réel sur différents tissus d'huîtres adultes prélevées en mars dans le conditionnement naturel (NC), puis à différents stades du cycle de reproduction par hybridation *in situ* sur de coupes histologiques de masse viscérale (tissu conjonctif, gonade et glande digestive) des huîtres issues du conditionnement NC.

Les analyses de RT-PCR classiques et de PCR en temps réel montrent une expression spécifique du gène *Oyvlg* dans les cellules de la lignée germinale de *C. gigas*. Aucune expression significative n'a été détectée dans les tissus somatiques avec ces deux techniques. Par PCR en temps réel, les quantités relatives de transcrits *Oyvlg* apparaissent 8 à 54 fois supérieures dans le tissu gonadique par rapport à celles mesurées dans la glande digestive et dans le muscle adducteur, respectivement (Figure 30). Ainsi, l'expression semble négligeable dans les tissus somatiques en comparaison de l'expression dans la gonade. L'expression du

gène *Oyvlg* dans les tissus somatiques pourrait résulter d'une contamination de ces tissus par le tissu gonadique lors des prélèvements. Cette hypothèse serait envisageable pour la glande digestive qui est disséquée en dernier et qui est étroitement liée à la gonade mais elle est peu probable pour les autres tissus car ils sont prélevés avant la gonade lors des dissections. Une contamination par la présence de cellules germinales dans l'hémolymphe, fluide circulant baignant tous les organes, a été envisagée mais rapidement écartée car des tests d'amplification du gène *Oyvlg* sur des échantillons d'hémolymphe se sont révélés négatifs. L'explication la plus probable serait une expression illégitime du gène *Oyvlg* dans tous les tissus, autres que la gonade, comme cela a été rapporté par Chelly *et al.* (1989) pour différents gènes dont l'expression était tissu-spécifique. La grande sensibilité de la technique de PCR en temps réel permettrait de mettre cette expression illégitime en évidence alors que la RT-PCR classique ne le permettait pas. Une faible expression du gène *vasa* dans les tissus somatiques adultes a également été rapportée chez le xénope où de faibles quantités de transcrits du gène *Xvlg-1* (xenopus *vasa*-like gene) ont été détectées dans le cœur et le cerveau (Ikenishi et Tanaka, 2000). Cependant, la signification de cette expression n'a pas été déterminée. Le séquençage des produits de PCR obtenus dans les six tissus permettrait d'affirmer ou d'infirmer que les amplicons sont des fragments du gène *Oyvlg*.

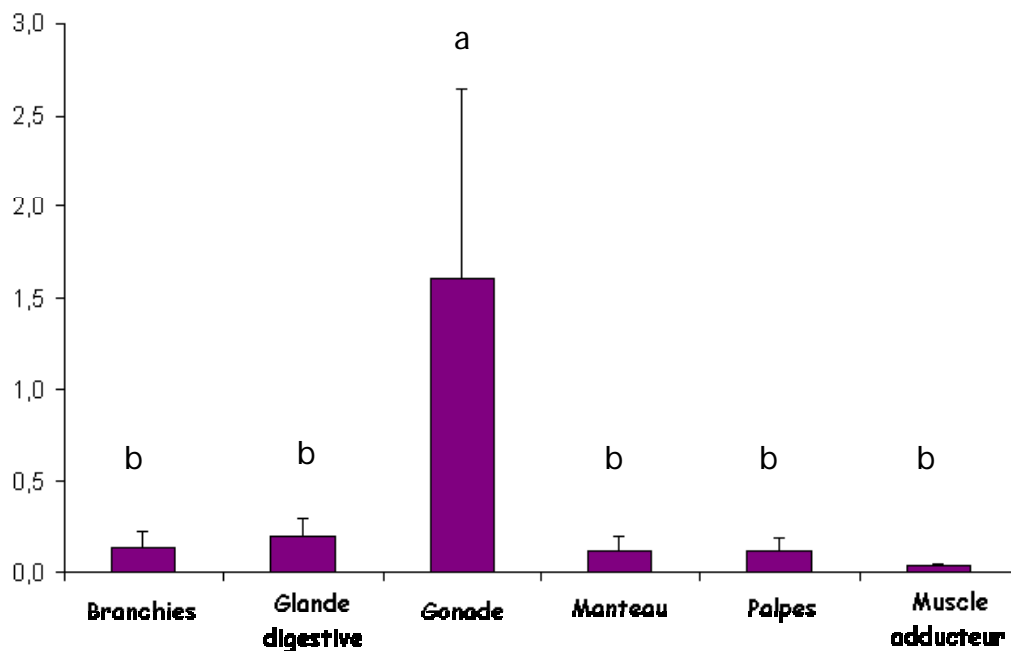


Figure 30 : Quantité relative de transcrits du gène *Oyvlg* au mois de mars dans six tissus d'huîtres issues du conditionnement expérimental naturel (NC). Les barres verticales représentent les écarts-types. Les lettres a et b correspondent aux groupes homogènes déterminés par des test-*t* de Student au seuil de significativité de 5%.

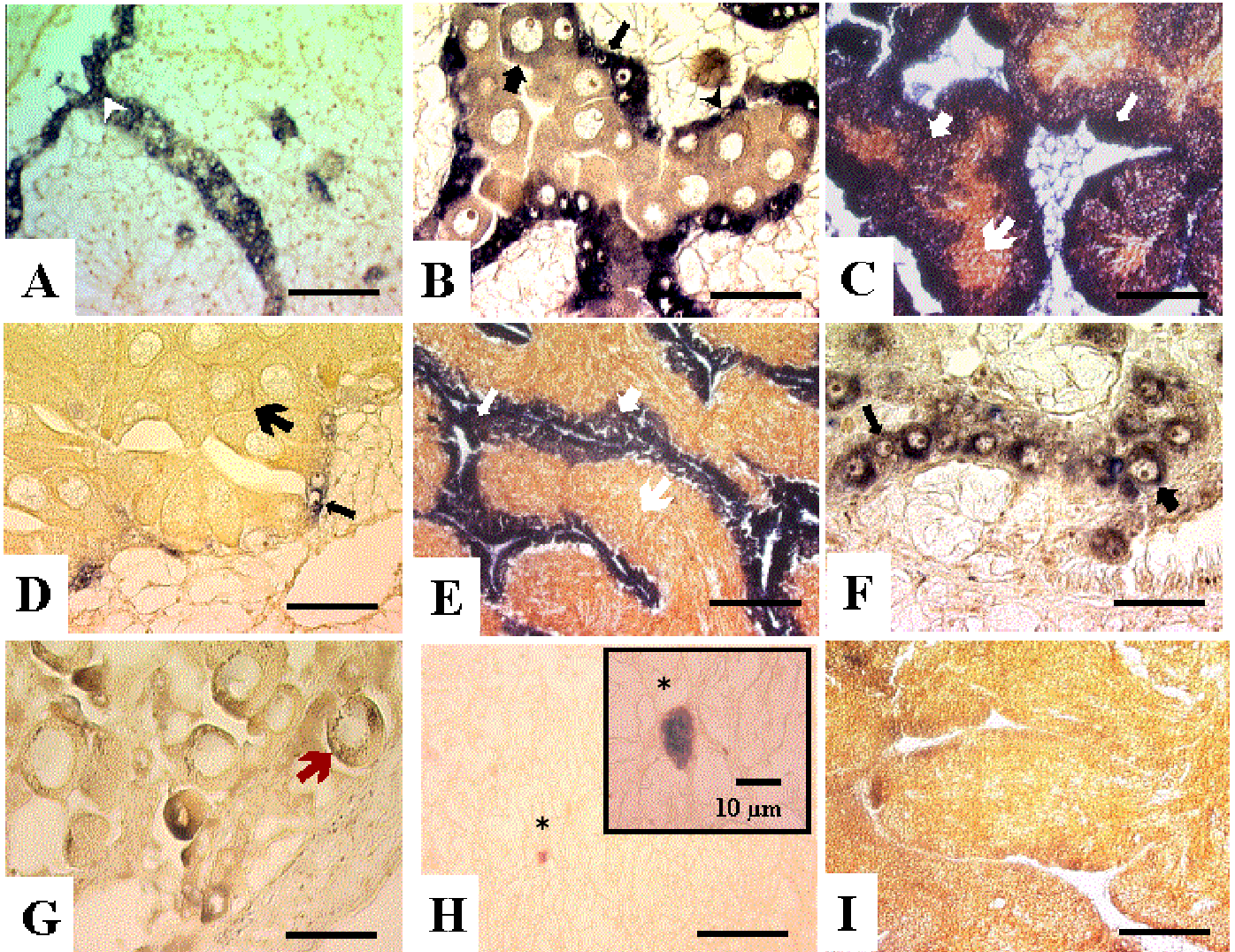


Figure 31 : Localisation des transcrits du gène *Oyvlg* dans le tissu gonadique de *Crassostrea gigas* au cours de la gamétogenèse, par hybridation *in situ*. (A) initiation de la gamétogenèse, sexe indéterminé (février), (B et C) phase de maturation, femelle et mâle, respectivement (avril), (D et E) maturité, femelle et mâle, respectivement (juillet), (F et G) femelle, post-ponte totale et partielle, respectivement (août), (H) phase de repos sexuel (novembre), (I) témoin négatif. La barre d'échelle représente 50 µm. ➤ blanc : cellules germinales souches, ➡ : ovogonies, ➤ noir : ovocytes I, ➤ noir : ovocyte mature, ➤ blanc : cellule auxiliaire, ➡ blanc : spermatogonies, ➤ blanc : spermatocytes, ➤ blanc : spermatozoïdes et spermatozoïdes, ➤ rouge : ovocytes résiduels, * groupe de cellules germinales souches.

Le gène *Oyvlg* apparaît fortement exprimé dans la gonade au début du cycle de reproduction, par hybridation *in situ*, dans les premiers stades de cellules germinales, les ovogonies et les ovocytes I pré-vitellogéniques chez les femelles et les spermatogonies et les spermatocytes I chez les mâles, puis elle diminue avec la maturation des cellules (ovocytes I vitellogéniques et spermatocytes II) pour disparaître dans les gamètes matures (Figure 31).

L'expression est maximale dans des cellules dont la nature est indéterminée et qui sont situées dans de petits groupes de cellules, dispersés dans le tissu conjonctif pendant la période de "repos sexuel" (novembre), puis qui apparaissent en grand nombre au niveau de l'épithélium des tubules gonadiques en formation au début du cycle de reproduction (Février) (Figure 31). Ce profil d'expression semblerait indiquer que ces cellules sont les précurseurs des cellules germinales, elles seraient donc les cellules germinales souches (GSCs) de *C. gigas*. Nous avons vu dans le premier chapitre que chez de nombreux organismes (hydrozoaires, nématodes, amphibiens, oiseaux, poissons et mammifères), les GSCs ont été décrites comme une population de cellules de la lignée germinale capables d'auto-renouvellement et servant à reconstituer le stock de cellules germinales tout au long de la vie sexuelle de l'organisme. Pour les organismes dont la reproduction est saisonnière, comme les huîtres creuses, des groupes de GSCs entrent en division au début de chaque cycle de reproduction (Morrison *et al.*, 1997). Chez *C. gigas*, nous avons observé que durant la période automnale, les GSCs potentielles étaient dispersées dans le tissu conjonctif et que leur nombre augmentait rapidement dès le début de la re-initiation du cycle de reproduction. Ainsi, le renouvellement annuel de la population de cellules germinales chez *C. gigas* à chaque cycle de reproduction résulterait de la prolifération de ces GSCs qui se différencieraient ensuite en gonies. Ces cellules souches ne sont plus observées dans la gonade en maturation. Ces observations indiquent que la prolifération des GSCs chez *C. gigas* serait limitée à la période de début du cycle de reproduction.

Une grande quantité de transcrits du gène *Oyvlg* est observée dans les cellules auxiliaires des ovocytes, chapeautant les ovocytes en vitellogenèse (Figure 31). Ce type de cellules, dénommées cellules auxiliaires, folliculaires ou nourricières, jouent probablement un rôle dans la nutrition des ovocytes chez les bivalves (Pipe, 1987; Dorange et Le Penec, 1989). L'expression de *vasa* dans ce type cellulaire a déjà été observé chez la drosophile où les produits de *vasa* sont présents en grande quantité dans les cellules nourricières (Hay *et al.*, 1988). Chez certains insectes, mollusques et plathelminthes, les cellules folliculaires et les ovocytes sont formés à partir d'un type cellulaire unique, les gonocytes primordiaux qui dérivent des cellules germinales primordiales (PGCs) (Ruohola *et al.*, 1991). De la même

manière, les ovogonies et les cellules auxiliaires de *C. gigas* pourraient avoir la même origine cellulaire et seraient issus de la différenciation des gonocytes primordiaux. Les gonocytes primordiaux seraient les cellules germinales souches (GSCs) que nous avons décrit dans ce paragraphe (Lubet *et al.*, 1976).

Le fort niveau d'expression du gène *Oyvlg* détecté dans les premiers stades de cellules germinales (GSCs, ovogonies et spermatogonies) et la diminution de l'expression dans les stades plus âgés, laisse supposer que ce gène interviendrait dans la mise en place de la lignée germinale chez l'huître creuse, comme cela a été décrit chez la drosophile et *Caenorhabditis* (Hay *et al.*, 1990; Roussel et Bennett, 1993). Des études fonctionnelles d'expression protéique ou de mise sous silence du gène seraient nécessaires pour confirmer le rôle du gène *Oyvlg* dans la mise en place des cellules germinales chez *C. gigas*.

Les résultats de cette étude démontrent que le gène *Oyvlg* constitue le premier marqueur des cellules germinales de *C. gigas*. Sa découverte ouvre d'importantes perspectives pour la compréhension des processus de formation de la lignée germinale chez les bivalves.

Article 1 :

Fabioux, C.; Pouvreau, S.; Le Roux, F.; Huvet, A. (2004). The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **315** : 897-904

2. Formation de la lignée germinale de *C. gigas* au cours de l'ontogenèse

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans "Biochemical and Biophysical Research Communications". Une synthèse des principaux résultats est présentée ci-dessous.

Nous avons mis en évidence dans la première partie de ce chapitre l'existence, chez les huîtres adultes, de cellules germinales souches (GSCs) assurant le renouvellement de la population de cellules germinales à chaque cycle de reproduction. L'origine temporelle et morphologique de ces cellules germinales souches est encore inconnue chez les huîtres. En effet, les cellules germinales des huîtres ne peuvent être identifiées avec certitude qu'à partir du stade juvénile (3-5 mm), lors de la première saison de reproduction. Chez la majorité des espèces animales, les GSCs dérivent des cellules germinales primordiales (PGCs) formées au cours du développement embryonnaire (Lin, 1997; Saffman et Lasko, 1999; Wylie, 1999). Chez les mollusques, l'existence de PGCs a été supposée, sur des bases morphologiques, chez un nombre restreint d'espèces dont les bivalves *Sphaerium japonicum*, *Cyclas cornea* et *Lasaea rubra* (Woods, 1931; Dohmen, 1992). Ces cellules présentaient une structure cytoplasmique granuleuse caractéristique des PGCs.

Afin de déterminer si les GSCs de *C. gigas* ont une origine embryonnaire et de suivre le développement de ces potentielles cellules germinales originelles, nous avons établi le profil d'expression du gène *Oyvlg*, par hybridation *in situ in toto* et par PCR en temps réel au cours du développement embryonnaire et larvaire de *C. gigas*. Les analyses ont été réalisées sur les stades de développement, depuis les ovocytes matures, utilisés pour faire une reproduction contrôlée, jusqu'à la post-larve (27 jours post-fécondation (jpf)), en passant par les stades 4-cellules (1 heure post-fécondation (hpf)), 8-cellules (2 hpf), morula (3 hpf), blastula (5 hpf), gastrula (7 hpf), trochophore (16 hpf), larve D (48 hpf), véligère à umbo (7 jours post-fécondation), véligère œillée (14 jpf) et pédivéligère (18 jpf).

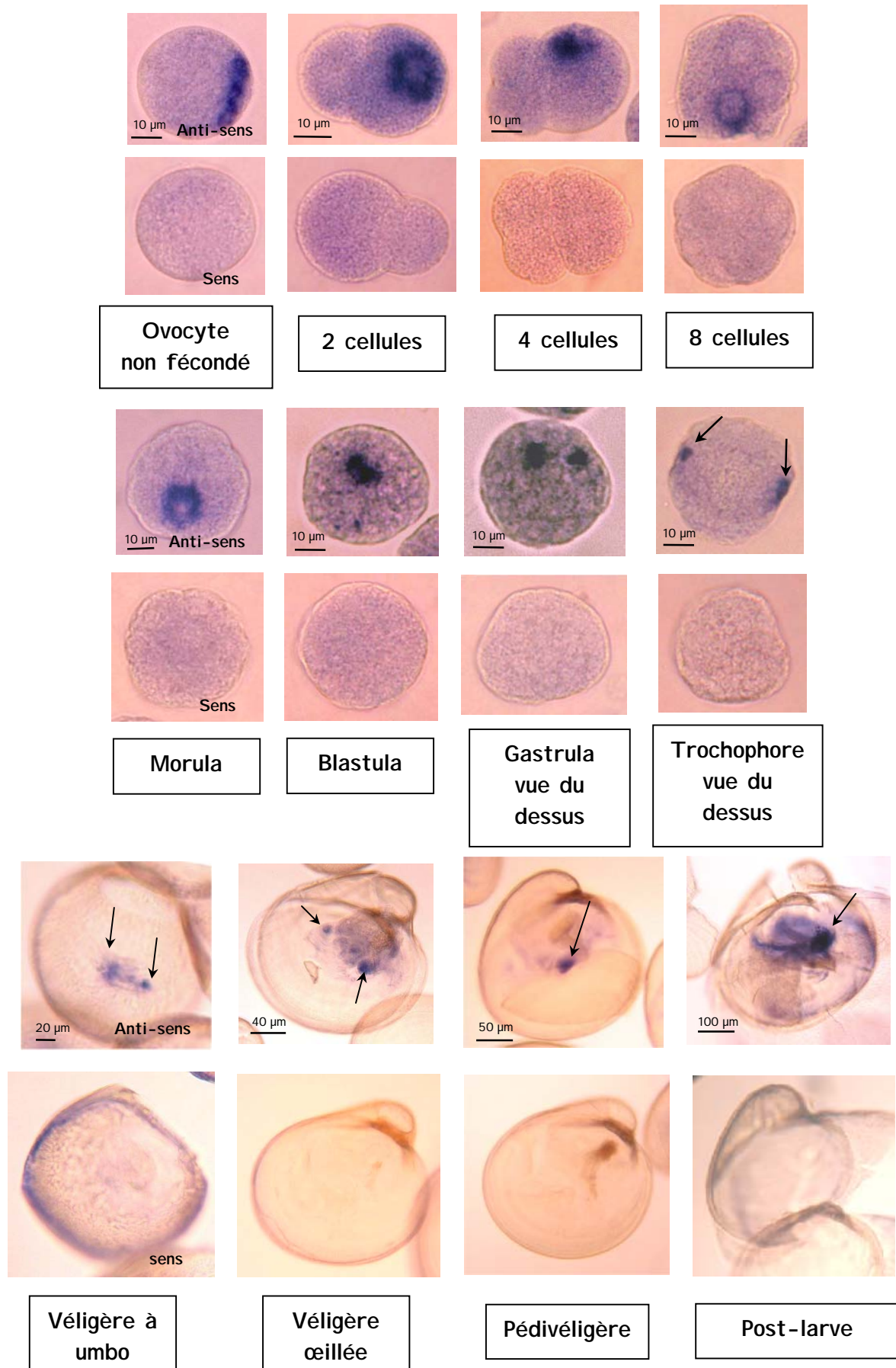


Figure 32 : Expression du gène *Oyvlg* par hybridation *in toto* au cours du développement embryonnaire et larvaire de *Crassostrea gigas*. Les flèches indiquent le signal d'hybridation.

Une grande quantité relative de transcrits du gène *Oyvlg* est détectée dans les ovocytes non fécondés et dans les premiers stades embryonnaires (4 et 8 cellules) par PCR en temps réel. Cette expression décroît rapidement dès le stade morula et la chute de l'expression se poursuit au cours des stades de développement suivants. Chez les mollusques, la transcription du génome de l'embryon débute, en général, au moment de la gastrulation et le développement précoce est supporté par les ARNm issus de la transcription du génome maternel (Collier, 1983). Ainsi, dans les premiers stades du développement, les transcrits *Oyvlg* présents dans l'embryon ont été synthétisés dans les ovocytes matures et transmis maternellement à l'embryon pour assurer son développement précoce avant le début de la transcription zygotique. Ces transcrits pourraient être impliqués dans la différenciation de la lignée germinale de l'huître dès les premiers stades embryonnaires comme chez la drosophile, l'hydre ou le zebrafish (Hay *et al.*, 1988; Knaut *et al.*, 2000; Mochizuki *et al.*, 2001).

L'étude de l'expression du gène *Oyvlg* par hybridation *in toto* a montré que dans les ovocytes, les transcrits *Oyvlg* sont regroupés dans des granules cytoplasmiques denses situés au pôle végétatif (Figure 32). Dans les premiers stades de développement, du stade 2-cellules au stade blastula, le signal d'hybridation est restreint dans un seul des blastomères et se situe dans sa région périnucléaire. Aucun signal d'hybridation n'a été détecté dans le reste des ovocytes et des embryons (Figure 32). Chez de nombreux organismes, tels que la drosophile, *Caenorhabditis* et l'hydre, les produits du gène *vasa* (ARNm ou protéines) ségrègent au début du développement embryonnaire dans une zone cytoplasmique composée de granules denses, riches en ARNm et en protéines, appelée cytoplasme germinal (Hay *et al.*, 1988; Roussel et Bennett, 1993; Mochizuki *et al.*, 2001). Des études ont démontré que les ARNm ou les protéines contenus dans le cytoplasme germinal sont les déterminants de la lignée germinale et que leur localisation dans cette région du cytoplasme est indispensable à la différenciation de la lignée germinale (Eddy, 1975; Lasko et Ashburner, 1990; Saffman et Lasko, 1999). C'est la localisation de ces déterminants dans une région déterminée de l'embryon qui détermine le site de formation des PGCs. Suivant l'organisme considéré, ce sont soit les protéines maternelles VASA comme pour la drosophile et *Caenorhabditis* (Lasko et Ashburner, 1988; Roussel et Bennett, 1993; Shinomiya *et al.*, 2000) soit les transcrits maternels *vasa* comme pour le zebrafish et *Ciona* (Yoon *et al.*, 1997; Fujimura et Takamura, 2000) qui sont localisés dans le cytoplasme germinal dès les premiers stades embryonnaires et qui ont le rôle de déterminants cytoplasmiques de la lignée germinale. Chez *C. gigas*, la ségrégation des transcrits du gène *Oyvlg* dans des granules cytoplasmiques denses au niveau du pôle végétatif des ovocytes, puis dans un unique blastomère des embryons, indique que

cette région cytoplasmique pourrait correspondre à un cytoplasme germinal et que les ARNm du gène *Oyvlg* pourraient être les déterminants de la lignée germinale. L'étude de la localisation de la protéine OYVVG permettrait de confirmer cette hypothèse.

La formation des PGCs a lieu au stade gastrula ou proche de ce stade, chez la grande majorité des organismes (Wylie, 1999). Lorsque la différenciation des PGCs est déterminée par les composants du cytoplasme germinal, les PGCs apparaissent dans la région de l'embryon où se trouve le cytoplasme germinal. Le cytoplasme germinal est alors intégré dans les PGCs. Après leur formation, les PGCs migrent vers les ébauches gonadiques, généralement localisées de part et d'autre de l'axe de symétrie de l'animal, la gonade étant un organe pair chez les animaux présentant une symétrie bilatérale. Chez *C. gigas*, à partir de la gastrulation, le signal d'hybridation, initialement localisé dans un seul blastomère des larves, se scinde en deux groupes symétriques par rapport à l'axe dorso-ventral de la larve (Figure 32). La double localisation du signal a été observée jusqu'à la métamorphose. Cette disposition des transcrits *Oyvlg* dans les larves d'huître correspond à la localisation des "primordium germinaux" décrite par Lubet *et al.* (1976) chez les post-larves de moules. Les primordium germinaux ont été décrits comme deux groupes de cellules symétriques par rapport à la ligne médiane de la larve et localisés entre le rein et la partie postérieure de la glande digestive. D'après la chronologie de formation et de migration des PGCs décrite chez de nombreux organismes et la description des primordium germinaux faite chez la moule, nos résultats indiqueraient que le double signal d'hybridation observé à partir du stade gastrula chez l'huître correspond au marquage des premières cellules germinales primordiales. Leur localisation à partir du stade véligère, de part et d'autre de la masse viscérale en formation, correspondrait à l'emplacement à partir duquel la future gonade va se développer.

En hybridation *in toto*, le signal d'hybridation est détecté pendant tout le développement, y compris dans les derniers stades larvaires. A l'inverse, en PCR en temps réel, la quantité relative de transcrits *Oyvlg* détectée décroît régulièrement au cours du développement pour arriver à un niveau très faible aux stades gastrula et trochophore, puis l'expression détectée devient négligeable dans les stades suivants, de la larve D jusqu'à la métamorphose. Cette apparente contradiction entre les résultats obtenus par les deux techniques pourrait s'expliquer par la diminution de la proportion de cellules exprimant *Oyvlg* au cours du développement, comparé au nombre total de cellules.

Chez les mollusques, le développement embryonnaire est de type spiralé (Wilson, 1892). L'embryon se divise suivant un mode de clivage extrêmement régulier, permettant de suivre un blastomère depuis la première division jusqu'à l'organogenèse et de déterminer, ainsi, l'origine de la plupart des organes (Verdonk et Van den Biggelaar, 1983; Dictus et Damen, 1997). Chez les mollusques *Sphaerium* (Woods, 1931) et *Patella* (Lartillot *et al.*, 2002) des études ont montré que les cellules germinales dérivent du micromère 4d ou mésentoblaste, formé après la sixième division embryonnaire. Le mésentoblaste provient des divisions successives du blastomère D, 1D, 2D et 3D. En se basant sur les données disponibles chez *Sphaerium* et *Patella* et sur les observations faites par hybridation *in toto* dans cette étude, nous avons déterminé la localisation des transcrits *Oyvlg* dans les embryons et les larves de *C. gigas* puis, nous avons proposé un schéma de développement des cellules germinales au cours de son embryogenèse (Figure 33). Au second clivage, les transcrits *Oyvlg* se localisent dans le blastomère D, décrit comme le plus gros des 4 blastomères (A, B, C, D) par Verdonk et Cather (1983). Puis du troisième au sixième clivage, les transcrits *Oyvlg* apparaissent localisés successivement dans les blastomères 1D, 2D, 3D et dans le micromère 4d, comme cela a été décrit chez *Patella*. Au stade gastrula, les transcrits *Oyvlg* se répartissent en deux groupes, qui pourraient correspondre aux cellules Mr et Ml, issues de la division du mésentoblaste 4d et décrites chez *Patella* comme les cellules souches des cellules germinales primordiales (Dictus et Damen, 1997). Dans la suite du développement Mr et Ml se diviseraient pour donner les PGCs. Ces PGCs migreraient ensuite de part et d'autre de la masse viscérale en formation pour parvenir à la localisation observée dans les stades larvaires âgés et post-larvaires (Figure 33). Chez les juvéniles, les PGCs se différencieraient en cellules germinales souches (GSCs), correspondant aux bourgeons mésodermiques germinaux décrits par Tardy (1970) et localisés au niveau de la zone péricardique. Lorsque les juvéniles atteignent la maturité sexuelle, les GSCs entreraient dans une phase de prolifération intense pour former deux groupes de tubules gonadiques qui se développeraient au sein du tissu conjonctif, de la zone péricardique vers la partie antérieure de l'huître. Au fur et à mesure de leur développement, les tubules gonadiques se ramifient et forment un réseau complexe entourant la glande digestive, qui forme la première gonade. Après la ponte, les tubules gonadiques régressent et les cellules germinales qui n'ont pas été évacuées sont résorbées par lyse cellulaire.

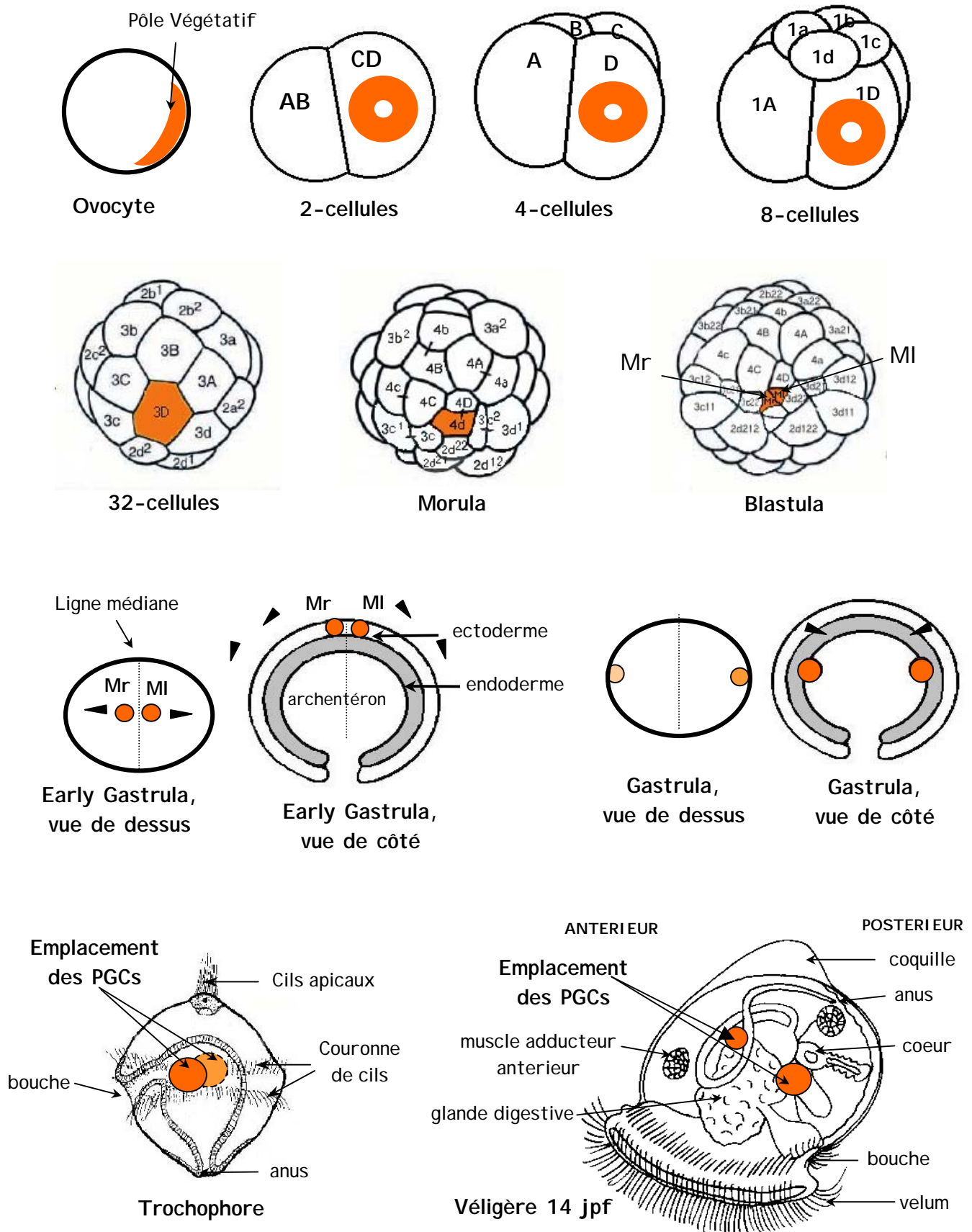


Figure 33 : Schéma synthétique de la formation des cellules de la lignée germinale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* au cours de l'embryogenèse, de l'ovocyte à la métamorphose. Les zones oranges représentent la localisation des déterminants supposés de la lignée germinale jusqu'à la gastrula et les PGCs (cellules germinales primordiales) à partir de la trochophore. Les pointes de flèches représentent le sens de migration des cellules.

Dans la partie précédente, nous avons mis en évidence que, pendant la période de repos sexuel, un petit nombre de GSCs persistent dans les tubules gonadiques restants qui apparaissent dispersés dans le tissu conjonctif. Ces GSCs proliféreront de nouveau lors de l'initiation du cycle de reproduction suivant et de nouveaux tubules gonadiques seront formés à partir de ceux qui n'avaient pas régressés pour constituer la nouvelle gonade.

Article 2 :

Fabioux C, Huvet A, Lelong C, Robert R, Pouvreau S, Daniel J.Y, Mingant C, Le Pennec M. (2004) Oyster *vasa*-like gene as a marker of the germline cells development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **320** : 592-598

3. Etude du cycle cellulaire des cellules germinales mâles

Le travail réalisé dans cette étude a été soumis pour publication à "Marine Biotechnology". Un résumé des résultats de cette étude est présenté ci-dessous.

L'objectif de ce travail était d'étudier la dynamique de développement des différents stades de cellules germinales au cours de la gamétogenèse dans des conditions "naturelles" afin de déterminer, par la suite, l'effet des paramètres environnementaux sur la cinétique de développement de la lignée germinale. Pour cela, il était nécessaire de pouvoir différencier et quantifier chaque stade de cellules germinales. Les techniques d'histologie et de biochimie utilisées classiquement pour étudier la gamétogenèse ne permettent pas de quantifier les différents types de cellules germinales de la gonade de *C. gigas*. Ceci est d'autant plus vrai pour les huîtres mâles pour lesquelles les différents stades spermatogéniques ne sont pas différenciables en histologie, à cause de leur petite taille et de leur grand nombre.

La reconnaissance des stades de cellules germinales en spermatogenèse et leur quantification est couramment pratiquée chez les mammifères, grâce à la cytométrie en flux qui permet de séparer les cellules sur la base de leur ploïdie, grâce à un marquage de l'ADN par un colorant, généralement de l'iodure de propidium ou du bromure d'éthidium (Meistrich *et al.*, 1978; Spanò et Evenson, 1993). Cette technique permet une étude rapide, sensible et quantitative de la différenciation et de la prolifération des cellules de la lignée germinale mâle. Les études réalisées chez les mammifères ont mis en évidence trois groupes principaux de cellules testiculaires : les cellules diploïdes comprenant les spermatogonies mais aussi les cellules somatiques des testicules (cellules de Leydig et de Sertoli), les cellules tétraploïdes représentées par les spermatozoïdes primaires et les cellules haploïdes incluant les spermatides et les spermatozoïdes (Spanò et Evenson, 1993). Cette technique est couramment employée pour réaliser des diagnostics cliniques de pathologies dégénératives ou prolifératives des cellules germinales mâles (Evenson, 1989). Elle a également été utilisée en recherche pour estimer la taille de génome de différentes espèces de bivalves (Rodriguez-Juiz *et al.*, 1996), pour détecter des pathologies comme la néoplasie dans des populations (Gonzales-Tizon *et al.*, 2000) ou encore reconnaître les individus triploïdes des individus diploïdes (Li *et al.*, 2003).

Nous avons développé la technique de cytométrie en flux, utilisée chez les mammifères, pour étudier la spermatogenèse chez *C. gigas*. Cette technique ne peut pas être

employée pour l'étude des cellules germinales femelles car les différents stades de gamétogenèse des ovocytes ne peuvent pas être différenciés sur la base de leur contenu en ADN. En effet, leur ploïdie ne change pas dans la gonade, les ovocytes étant bloqués en prophase I de méiose jusqu'à leur émission dans l'eau de mer.

Les études ont été réalisées, sur des huîtres mâles issues du conditionnement naturel de l'expérimentation GIGAREPRO, à quatre stades du cycle de reproduction déterminés préalablement par histologie : (1) initiation de la gamétogenèse (mars), (2) croissance gonadique (mai), (3) fin de maturation (juin), (4) pré-ponte (juillet).

L'étude du cycle cellulaire par cytométrie n'ayant jamais été utilisée chez les mollusques auparavant, une mise au point de chacune des étapes de préparation des cellules a été nécessaire. Ainsi, différents modes de dissociation et de lyse cellulaire ont été testés : dissociation mécanique, dans du tampon de lyse, dans de l'eau distillée, à différentes températures, avec différents temps d'incubation. Pour chaque étape, différents temps de centrifugation, à différentes vitesses ont été testés. De même, les temps et températures d'incubation dans l'iodure de propidium ont été adaptés au modèle.

Pour chaque échantillon, un cytogramme FL2-Area en fonction de FL2-Width permet de différencier les doublets de cellules (deux cellules agglomérées) à exclure pour l'analyse, des cellules individualisées (Figure 34). Le contenu en ADN des cellules individualisées (isolées dans une fenêtre R1) est analysé sur l'histogramme du nombre d'événements (nombre de cellules comptées) en fonction du paramètre FL2-Area représentant la fluorescence émise par les cellules, proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans les cellules (Figure 34). Les cellules spermatogéniques des huîtres ont pu être classées en quatre sous-populations caractérisées par leur ploïdie. La localisation de la population des cellules haploïdes (1C), le premier pic de l'histogramme, a été déterminée grâce à une suspension cellulaire contrôle ne contenant que des spermatozoïdes d'huîtres (haploïdes) obtenue par "stripping" d'une gonade de mâle mature. Les populations diploïdes (2C) et tétraploïdes (4C) ont été situées sur l'histogramme par rapport au pic haploïde, leur intensité de fluorescence étant respectivement deux fois et quatre fois plus élevée.

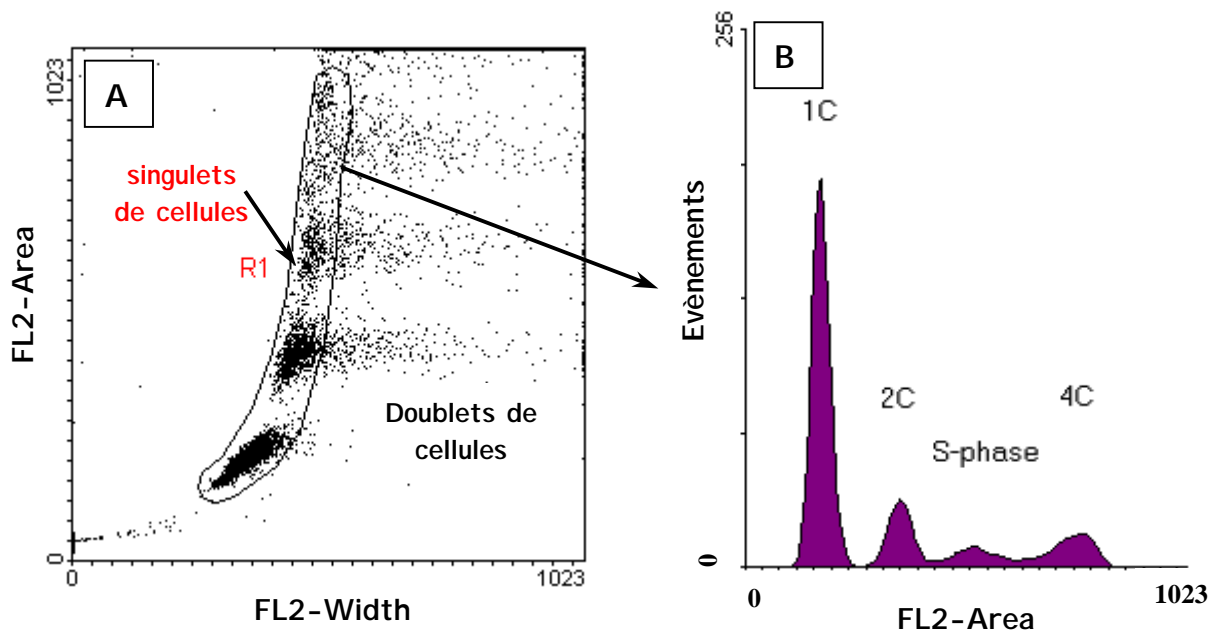


Figure 34 : Distribution des populations cellulaires de gonade d'huître mâle en maturation en fonction de leur contenu en ADN analysées par cytométrie en flux. (A) FL2-Width vs. FL2-Area, permet de séparer les singulets (fenêtre R1) des doublets (à droite de R1), (B) Cytogramme du nombre d'évènements dans chaque population cellulaire.

La population de cellules 1C correspond aux spermatozoïdes et aux spermatides, la population 4C correspond aux spermatocytes primaires et la population 2C correspond aux spermatogonies et aux spermatocytes secondaires. Les cellules en phase-S sont localisées entre les pics 2C et 4C.

Après avoir établi le profil typique d'une population de cellules spermatogéniques d'huîtres en maturation, nous avons analysé les proportions des différentes sous-populations de cellules pour des huîtres aux différents stades de gamétogenèse cités ci-dessus.

La proportion de cellules haploïdes, spermatides et spermatozoïdes, augmente significativement entre mai (proportion moyenne \pm écart-type, $56,6 \pm 3,4$) et juin ($74,3 \pm 1,3$) (test de Kruskal-Wallis, $P < 0,01$) puis se stabilise en juillet ($74,6 \pm 1,4$). A l'inverse, la proportion de cellules en première division de méiose, les cellules 4C et en phase-S, décroît significativement entre mai ($23,5 \pm 2,9$) et juin ($7,8 \pm 1,2$) ($P < 0,01$). Ces résultats traduisent une intense activité méiotique dans la gonade à partir de mai. Ceci est confirmé par l'évolution du rapport 1C:4C (proportion de cellules 1C : proportion de cellules 4C) qui traduit l'intensité des divisions méiotiques et qui augmente significativement entre mai ($4,7 \pm 1,0$) et juin ($30,2$

$\pm 9,2$). L'activité méiotique se poursuit en juillet avec, toutefois, une intensité moindre (1C:4C = $26,1 \pm 6,8$).

La proportion de cellules diploïdes (2C) apparaît constante entre les trois mois analysés (mai : $14,1 \pm 1,1$, juin $13,2 \pm 1,4$, juillet $11,8 \pm 0,8$; $P > 0,05$). De même, le rapport 1C:2C qui traduit la transformation des cellules diploïdes, les spermatogonies, en cellules haploïdes, les spermatides, ne présente pas de différences significatives entre mai ($4,0 \pm 0,5$), juin ($5,7 \pm 0,6$) et juillet ($6,3 \pm 0,5$). Ces résultats indiqueraient qu'une population de spermatogonies se maintient dans la gonade même pour les huîtres matures. La présence de spermatogonies dans les gonades matures d'huîtres mâles avaient été identifiées chez *C. virginica* par Kennedy et Battle (1964) grâce à des colorants d'histologie spécifiques (Unna-Pappenheim, Gomori's pararapaldehyde fuschin et Feulgen) mais de telles observations n'avaient jamais été faites chez *C. gigas*. Toutefois, la population de cellules diploïdes quantifiée par cytométrie en flux pourrait inclure une proportion de cellules somatiques, provenant du tissu conjonctif environnant la gonade et isolées avec les cellules germinales. Cette proportion doit cependant être faible car le tissu conjonctif est très réduit voir inexistant dans la gonade mature. Chez les mammifères, les cellules somatiques présentes dans les testicules (cellules de Sertoli et de Leydig) et isolées avec les cellules germinales sont différenciées de ces dernières par une analyse en cytométrie en flux à deux paramètres. La mesure de la ploïdie des cellules est couplée à une détection des cellules somatiques hybridées avec un anticorps anti-vimentine, une protéine d'adhésion cellulaire absente des cellules germinales (Blottner et Roelants, 1998a; b; Blottner *et al.*, 1999). Des essais d'immunohistochimie ont été réalisés chez l'huître avec un anti-corps anti-vimentine hétérologue (anti-corps de souris) mais le marquage observé était faible et n'était présent que sur une petite partie des cellules somatiques. Par conséquent, cette technique n'a pas été utilisée pour l'étude présentée ici. Des études complémentaires pourraient être envisagées pour différencier les cellules germinales des cellules somatiques dans les suspensions cellulaires d'huîtres en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine OYVLG, caractérisé dans la partie 1 de ce chapitre, couplé à un anticorps secondaire fluorescent, pour marquer les cellules germinales et faire des analyses à deux paramètres en cytométrie en flux. Cette technique permettrait de confirmer ou d'infirmer la présence de spermatogonies chez les huîtres mâles matures.

Les analyses réalisées sur les huîtres au début de la gamétogenèse, en mars, n'ont donné aucun résultat interprétable. Ceci est dû à une mauvaise dissociation des cellules germinales et des cellules du tissu conjonctif qui les entourent, très abondant à ce stade de

gamétogenèse. Pour améliorer la dissociation cellulaire à ce stade, il faudrait tester d'autres techniques de dissociation cellulaire.

Cette étude a montré, pour la première fois, que l'analyse de la ploïdie des cellules par la technique de cytométrie en flux pouvait être utilisée pour quantifier les différentes populations de cellules germinales des huîtres mâles et pouvait permettre de suivre la cinétique de spermatogenèse au cours de la maturation. Cette technique présenterait un grand intérêt pour comprendre la régulation de la spermatogenèse par les facteurs internes et/ou externes et pour connaître l'effet de certains paramètres (température, quantité de nourriture, pollution...) sur la production de gamètes mâles.

Article 3

Fabioux, C., Renault, T., Soudant, P. Flow cytometric analysis of spermatogenic cell proliferation in the gonad of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Soumis à *Marine Biotechnology*.

Flow cytometric analysis of spermatogenic cell proliferation in the gonad of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

C Fabioux^{1,2}, T Renault³, P Soudant²

Address:

¹ UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer, B.P.70, 29280 Plouzané, France

² UMR CNRS 6539, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale, IUEM, 29280 Plouzané, France

³ Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, 17390 La Tremblade, France

*Corresponding author:

Philippe Soudant : Philippe.Soudant@univ-brest.fr, UMR CNRS 6539, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale, IUEM, 29280 Plouzané, France

Phone: + 33 2 98 49 86 23

Abstract

The aim of this study was the analysis of spermatogenic cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* using flow cytometry. Male germ cell sub-populations were identified according DNA content after staining with propidium iodide. Male germ cells were classified into four major groups: spermatogonia (diploid), primary and secondary spermatocytes (cells in S phase, tetraploid) and spermatides and spermatozoids (haploid). Percentages of haploid, diploid and tetraploid cells were determined at different stages of male germ cell maturation, from spring to summer. The haploid cell proportion significantly increased during maturation, from May (56.6%) to July (74.6%). This intense meiotic activity was also translated by the meiotic transformation ratio (haploid/tetraploid ratio) values in May (4.7) and June (30.2). Inversely, diploid population appeared stable from May (14.2%) to July (11.8%), indicating the persistence of spermatogonia in mature oysters. However, the diploid cell population might also include somatic conjunctive cells contained in gonads. Results demonstrated that flow cytometry is suitable to quantify male germ cell transformation in oysters and to assess the influence of environmental cues on oyster gametogenesis.

Introduction

Understanding and control of reproductive processes of the most cultivated bivalve species, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, became essential with the development of hatchery spat production in the recent years. *C. gigas* reproduction follows a seasonal cycle with a succession of physiological and biochemical events in gonads. Oyster gonad is a non permanent organ, consisting in gonadic tubules that develops around the digestive gland each year (Andrews, 1979). First male germ cells, the spermatogonia, appear as small clusters throughout the conjunctive tissue, from the differentiation of germinal stem cells (Fabioux *et al.*, 2004). Stem cells differentiate into spermatogonia with a regular pattern in the first step of the reproductive cycle. Hence, several cohorts of spermatogenic cells are formed in gonadic tubules. After a series of divisions in the developing gonadic tubules, the spermatogonia (diploid cells) give rise to spermatocytes that undergo meiotic divisions to form spermatides (haploid cells) which then mature into spermatozoa (De Rooij, 1983). Germ cells at different developmental stages are concomitantly reported in oyster gonadic tubules during the maturation stage. Techniques currently used to study oyster gametogenesis including histology and biochemistry (Shafee, 1986; Dinamani, 1987; Deslous-Paoli and Heral, 1988; Robinson, 1992; Lango-Reynoso *et al.*, 2000) do not allow differentiating and quantifying spermatogenic cell types. Although the kinetic of gametogenesis and the role of environmental parameters (temperature, photoperiod and food availability), essential in the control of marine invertebrate reproduction (Pearse, 1999), was well documented in oyster female, little is known on spermatogenesis.

Flow cytometry was demonstrated to be a rapid, sensitive and quantitative method to investigate male germline cell differentiation and proliferation (Spanò and Evenson, 1993). Different spermatogenic cell types, stained with a fluorescent DNA probe, can be separated on the basis of their DNA ploidy. DNA content distribution of adult mammal testicular cells is characterized by three main peaks representing haploid (1C), diploid (2C) and tetraploid (4C) cells (Spanò and Evenson, 1993). Spermatids and spermatozooids are recorded as haploid cells. Diploid cells consist of spermatogonia, secondary spermatocytes and testis somatic cells, the Leydig and Sertoli cells (Spanò and Evenson, 1993). Tetraploid cells correspond to primary spermatocytes. Cells in S-phase are located between diploid and tetraploid peaks. Until now, flow cytometry studies of spermatogenesis were mainly performed in mammals (Suresh *et al.*, 1992; Blottner and Roelants, 1998a; Golan *et al.*, 2000). In other phyla including bivalve molluscs, flow cytometry studies dealt with immunology (Allam *et al.*,

2001; Fournier *et al.*, 2001; Renault *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2001; Auffret *et al.*, 2002; Sauvé *et al.*, 2002; Soares-Da-Silva *et al.*, 2002) or cytology (Rodriguez-Juiz *et al.*, 1996), but no study analysed the germline cell cycle.

In the present study, we developed and used a flow cytometry procedure to analyse Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, spermatogenesis based on the DNA content of male germ cells.

Material and methods

Biological material

Oyster larvae were produced in the Ifremer hatchery in La Tremblade (France) from 30 wild broodstocks collected in the Marennes-Oléron Bay. Spat were then reared at the Ifremer station in Bouin (France). One-year-old oysters were then kept at the Ifremer shellfish laboratory in Argenton (France) from February 2002 to March 2003 for the experiment. Oysters were placed in 300-L raceways in 20 µm-filtered seawater and fed with a diet of three algae species with a ratio equal to 8% dry weight algae/dry weight oyster per day and per oyster (33% *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*, 33% *T-Isochrysis galbana*, 33% *Tetraselmis chui*). Temperature and photoperiod conditions applied to the experimental raceways were modelled on mean natural cycles measured at Marennes-Oléron Bay.

Male oysters were collected at different maturation stages, identified by histology (Fabioux *et al.*, 2004) : gametogenesis initiation (March), full gonad maturation (May), at the end of gonad maturation (June) and at the ripeness stage (July). Ten male oysters were sampled in March, May, June and July 2002 and immediately prepared for analysis in the laboratory.

Cell preparation

Oysters were washed with 0.22 µm-filtered seawater and carefully opened. For each oyster, a piece of gonadal tissue (around 100 mg) was sampled. Care was taken to select the same region in all oysters, in front of the pericardic region. Suspension of germ cells was prepared by crushing tissue in filtered seawater (800 µl) and filtered through a 60-µm-nylon mesh. The germ cell suspension was then centrifuged (500 rpm, 10 min, 4 °C) and fixed adding absolute ethanol (2/1 v/v). Fixed cell suspension was conserved at -20 °C until analysis.

Before flow cytometry analysis, fixed cell suspension was filtered on a 60 µm-nylon mesh and counted using a Malassez cell-counter. A volume of cell suspension corresponding to one million of cells was centrifuged (2000 rpm, 10 min, 4 °C). Cellular lysis was carried out by incubating (1h, 4 °C) the cell pellet in distilled water (800 µl) (Smolarz, pers. comm.) Lysed cells were centrifuged (2000 rpm, 10 min, 4 °C). The pellet was resuspended in 600 µl of 1X PBS (2 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, pH 7.2) containing propidium iodide (PI) (Sigma) at 50 µg/ml and then incubated for 45 min at room temperature in the dark. The sample was filtered through a 40 µm-nylon mesh before analysing with the flow cytometer.

In addition, spermatozoid suspension was obtained by stripping the gonad of a ripe male oyster. Spermatozoids were washed with filtered seawater (800 µl) and filtered through a 60 µm-nylon mesh. The spermatozoid suspension was then treated as described above for flow cytometry analysis and was used as a positive control (haploid cells).

Flow cytometry DNA analysis

Flow cytometry analysis was carried out with a FACSCalibur (Beckton-Dickinson) equipped with an air-cooled argon laser emitting at 488 nm wavelength. For each sample, 10,000 events were counted at a flow rate of 15 µl/ml. The propidium iodide (PI) red fluorescence was detected using the FL2 detector (orange-red light, 564-606 nm) and used as discriminatory factor to collect the multiparametric signals from individual cells. In order to distinguish singleton from cell doublet, FL2-Area and FL2-Width of the PI fluorescence were acquired.

Data processing of the flow cytometer list mode files was performed with the software WINDMDI v-2.8 (Joseph Trotter[®]). All data were expressed in mean percentages of cell subpopulations for each range of fluorescence.

Statistical analysis

All data are given in means \pm SD. Proportion of cell subpopulations in different gametogenesis stages were compared using a non-parametric Kruskal-Wallis test for the significance level of $P < 0.05$.

Results and Discussion

Male gonad cells of oysters, stained with propidium iodide, were analysed by flow cytometry (FCM). Doublets were removed by gating (Fig. 1A). After gating events in R1 area, FL2-Area cytogram permitted to measure the DNA content only in individual male gonad cells. Spermatogenic cells were classified in four populations based on DNA content (Fig. 1B). The first fluorescent peak on cytograms corresponded to haploid cells (1C) and was determined using an oyster spermatozoid suspension as a reference. The diploid (2C) and tetraploid (4C) populations were then ascertained on the corresponding fluorescence intensities. They corresponded to the second and the third peaks on cytograms, respectively (Fig. 1B). The 1C population was composed by spermatids and spermatozooids, the 2C population was formed by spermatogonia and secondary spermatocytes and the 4C population by primary spermatocytes. The S-phase corresponded to the cells located between 2C and 4C peaks on cytograms and was composed by pre-leptotene spermatocytes (Fig. 1B).

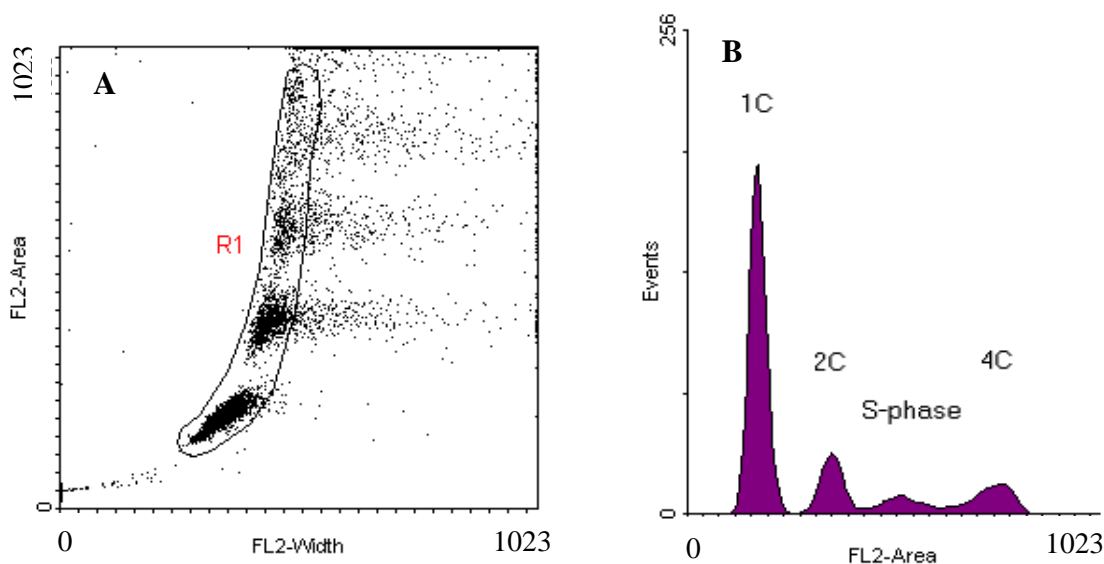


Fig. 1, Article 3: (A) FL2-Area vs FL2-Width dot plot of propidium iodide stained gonadic cell suspension from male oyster during maturation step. Individual cells are delimited by the R1 region. Cell doublets can be seen on the right of the R1 region. (B) FL2-area histogram of propidium iodide stained gonadic cell suspension from male oyster during maturation step representing DNA fluorescence distribution. FL2-A : red fluorescence intensity expressed in arbitrary units.

Percentages of different cell populations were analysed at various stages of oyster gametogenesis : during gonad maturation (May), at the end of gonad maturation (June) and at the ripeness stage before the release of gametes (July).

The percentage of 1C cell population significantly increased from May ($56.6\% \pm 3.4$ SD) to June ($74.3\% \pm 1.3$) ($P < 0.01$) and stabilized in July ($74.6\% \pm 1.4$) (Fig. 2). In contrast, the cumulated 4C and S-phase cell populations (>2C population) decreased from May ($23.5\% \pm 2.9$) to June ($7.8\% \pm 1.2$) ($P < 0.01$). Results suggest that active meiotic divisions were taking place in May since 4C and S-phase populations were composed of first meiotic male germ cells (spermatocytes) and 1C population represented latter stages of spermatogenic cells (spermatides and spermatozooids). The high meiotic activity of germ cells in May and June was also represented by 1C:4C ratio values. This ratio increased significantly from May (4.7 ± 1.0) to June (30.2 ± 9.2) (Fig. 3). A high value reported in July (21.6 ± 6.8) suggests that male germ cells presented a high meiotic activity in ripe oysters.

Percentages of 2C cell population appeared constant in May ($14.2\% \pm 1.1$), June ($13.2\% \pm 1.4$) and July ($11.8\% \pm 0.8$) ($P > 0.05$) (Fig. 2). Similarly, the ratio 1C:2C providing the overall turnover of spermatogonial cells (2C) to spermatids (1C), showed no significant difference between May (4.0 ± 0.5), June (5.7 ± 0.6) and July (6.3 ± 0.5) (Fig. 3). Spermatogonial cells (2C) may be present in gonads during maturation step as well as in ripe gonads. However, the 2C cell population might also include somatic cells from connective tissue. Unlike mammals, male gonad development in oysters does not imply somatic cells such as Leydig cells or Sertoli cells. Germ cells develop between vesicular cells of connective tissue that may contaminate germ cell suspension. Nevertheless, the connective tissue regresses as gonadic tubules develop and it represents less than 10% of the gonadic tissue in May (data not shown). As a consequence, the 2C cell population in maturing oyster gonad could be composed by both spermatogonia and somatic cells. Complementary studies could be performed to assess the proportion of each cell type in the 2C population using dual-parameters flow cytometry with a specific marker of germ cells (Fabioux *et al.*, 2004) or somatic cells (Blottner and Roelants, 1998a; b; Blottner *et al.*, 1999).

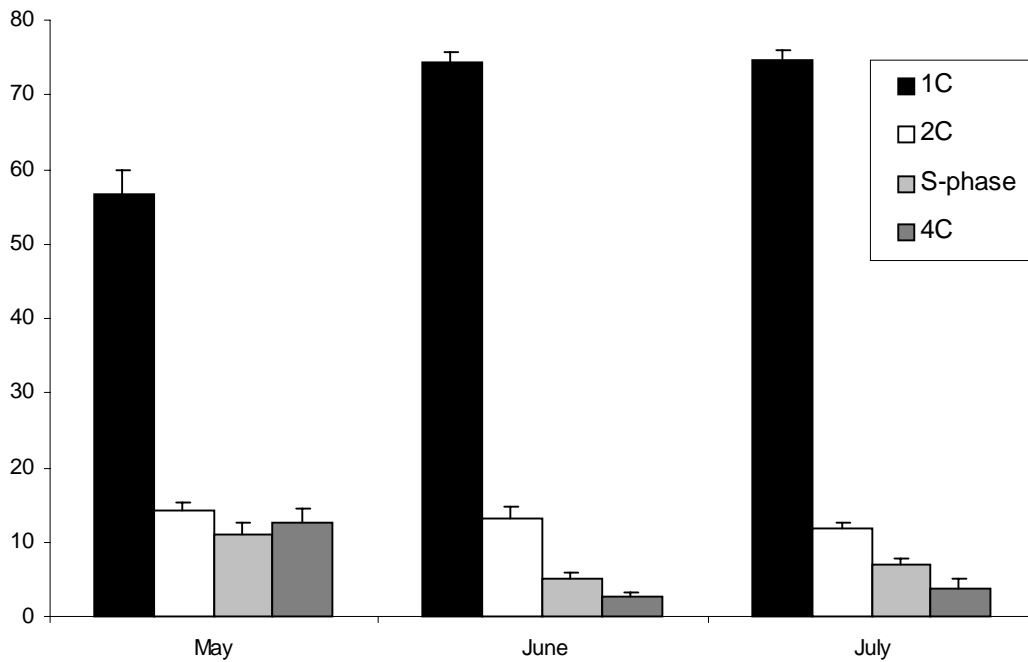


Fig. 2, Article 3: Proportions of gonadic cells (means \pm SD) within haploid (1C), diploid (2C) and tetraploid (4C) DNA content of gonadic cells of in May (n=7), June (n=7) and July (n=7). Cells between 2C and 4C peaks are in S-phase of division. Bars represent SD.

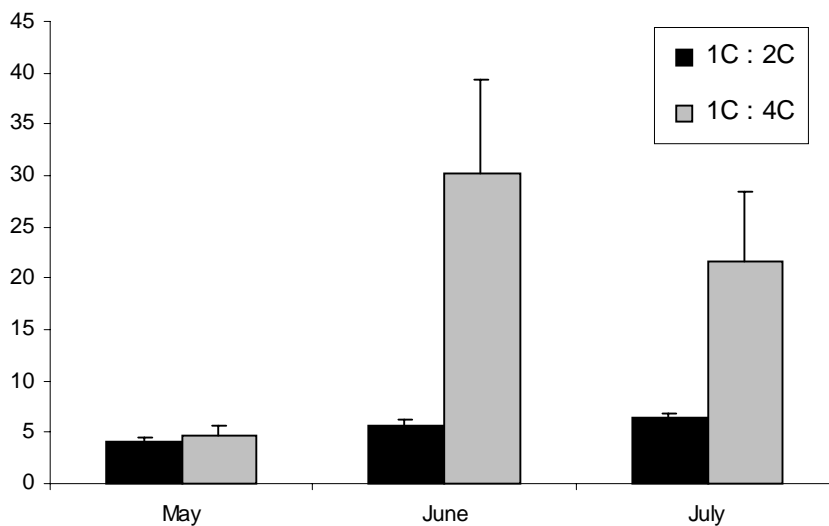


Fig. 3, Article 3: Total germ cell transformation represented by the 1C:2C ratio and meiotic transformation represented by the 1C:4C ratio in male oyster gonad in May, June and July. Bars represent SD.

In ripe oysters (July), the 1C germ cells accounted for 75% and the 2C cells represented 12% of the total analysed cells. These values are similar than those observed in different mammal species (Suresh *et al.*, 1992). Spermatogenesis appear very similar between vertebrates and invertebrates (Callard and Callard, 1998). Small differences in spermatogenesis pattern arise from three main points: (1) the number of spermatogonia divisions, (2) the kinetic of a complete spermatogenic cycle, from spermatogonia to spermatozoa, (3) the reproductive pattern since spermatogenesis is continuous and regular in mammals, continuous but accelerated or slowdown by temperature in poikilotherms such as fishes, broken of during the resting period in seasonal breeders such as oysters (Callard and Callard, 1998). Until now, few was known in the kinetic of spermatogenesis and spermatogonia have never been observed in mature oyster. These spermatogonia could correspond to the last cohorts formed before the arrest of cell proliferation or could indicate that mitosis proceeded during all the reproductive cycle. Further studies will be needed to access spermatogonia developmental pattern.

Flow cytometry analysis was also carried out on samples collected in March in order to determine the cell composition of gonadic tubules at the beginning of the reproductive cycle. However, data were not interpretable (data not shown). This might be due to an insufficient dissociation of connective and gonadic tissues during cell preparation since in March only few germ cells were present in connective tissue (Fabioux *et al.*, 2004).

This study demonstrated for the first time that the analysis of the DNA content by flow cytometry might be applied to determine and quantify different male germ cell types. This technique will be useful to better understand how internal and external factors control the oyster spermatogenesis.

Acknowledgments

The authors are grateful to M. Le Pennec (LEMAR, Brest University, France) and J.C. Cochard (LPI, Ifremer Brest, France) for their support during the course of this work. We also acknowledge M. Auffret (LEMAR, Brest University, France) to place the flow cytometer at our disposal. The authors are indebted to A. Huvet (LPI, Ifremer Brest, France) for his help in oyster sampling. The authors are indebted to all staff of the Argenton for providing and conditioning oysters.

Figure captions:

Fig. 1: (A) FL2-Area vs FL2-Width dot plot of propidium iodide stained gonadic cell suspension from male oyster during maturation step. Individual cells are delimited by the R1 region. Cell doublets can be seen on the right of the R1 region. (B) FL2-area histogram of propidium iodide stained gonadic cell suspension from male oyster during maturation step representing DNA fluorescence distribution. FL2-A : red fluorescence intensity expressed in arbitrary units.

Fig. 2: Proportions of gonadic cells (means \pm SD) within haploid (1C), diploid (2C) and tetraploid (4C) DNA content of gonadic cells of in May (n=7), June (n=7) and July (n=7). Cells between 2C and 4C peaks are in S-phase of division. Bars represent SD.

Fig. 3: Total germ cell transformation represented by the 1C:2C ratio and meiotic transformation represented by the 1C:4C ratio in male oyster gonad in May, June and July. Bars represent SD.

References

- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E. (2001) Haemocytes parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 365-375.
- Andrews, J.D. (1979). Pelecypodia :Oystreidae. In: *Reproduction of Marine Invertebrates (Mollusk : Pelecypods and lesser classes)*, pp. 293-341.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D. (2002) Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mar. Environ. Res.* 54, 585-589.
- Blottner, S., Roelants, H. (1998a) Quantification of somatic and spermatogenic cell proliferation in the testes of ruminants, using a proliferation marker and flow cytometry analysis. *Theriogenology* 49, 1275 -1287.
- Blottner, S., Roelants, H. (1998b) Calculation of spermatogenic transformations based on dual-flow cytometric analysis fo testicular tissue in seasonal breeders. *Andrologia* 30, 331-337.
- Blottner, S., Roelants, H., Wagener, A., U.D., W. (1999) Testicular mitosis, meiosis and apoptosis in mink (*Mustela vison*) during breeding and non-breeding seasons. *Anim .Reprod. Sci.* 57, 237 - 249.
- Callard, G., Callard, I. (1998). Spermatogenesis, in Nonmammals. In: *Encyclopedia of reproduction* (Ed.Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 563-570.
- De Rooij, D.J. (1983). Proliferation and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the mammalian testis. In: *Stem cells : their identification and characterisation* (Ed.Edited by Potten, C.S., Churchill Livingstone, Edinburgh), pp. 89-117.

- Deslous-Paoli, J.M., Heral, M. (1988) Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oleron. *Aquat. Living. Resourc.* 1, 239-249.
- Dinamani, P. (1987) Gametogenic patterns in populations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Northland, New Zealand. *Aquaculture* 64, 65-76.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A. (2004) The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Bioph. Res. Com.* 315, 897-904.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P. (2001) Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytoc activity of hemocytes. 161, 20-211.
- Golan, R., Weissenberg, R., Oschry, Y., Shochat, L., Lewin, L.M. (2000) Spermatogenesis in the Golden Hamster during the first spermatogenic wave : a flow cytometric analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 205-211.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Penec, M. (2000) Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, 183-199.
- Pearse, J.S. (1999). Seasonal reproduction, marine invertebrates. In: *Encyclopedia of reproduction* (Ed. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 352-360.
- Renault, T., Xue, Q.G., Chilmonczyk, S. (2001) Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, hemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish Shellfish Immun.* 11, 269-274.
- Robinson, A. (1992) Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture* 106, 89-97.
- Rodriguez-Juiz, A.M., Torrado, M., Mendez, J. (1996) Genome-size variation in bivalve molluscs determined by flow cytometry. *Mar. Biol.* 126.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Sénécal, L., Goudreau, P., Fournier, M. (2002) Phagocytic activity of marine freshwater bivalves : in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat. Toxicol.* 58, 189-200.
- Shafee, M.S. (1986). Biological adaptation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) in a Moroccan lagoon at Oualida. 5. *African Seminar on Aquaculture.* 227-245
- Soares-Da-Silva, I.M., Ribeiro, J., Valongo, C., Pinto, R., Vilanova, M., Bleher, R., Machado, J. (2002) Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of haemocytes in *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. Phys. A* 132, 541-553.
- Spanò, M., Evenson, D.P. (1993) Flow cytometry analysis for reproductive biology. *Biol. Cell* 78, 53-62.
- Suresh, R., Aravindan, G.R., Moudgal, N.R. (1992) Quantification of spermatogenesis by DNA flow cytometry : comparative study among six species of mammals. *J. Biosciences* 17, 413-419.
- Xue, Q.G., Renault, T., Chilmonczyk, S. (2001) Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the european flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish Shellfish Immun.* 11, 557-567.

Quatrième chapitre :
Régulation du cycle de
reproduction de
Crassostrea gigas
par les paramètres
température/photopériode

1. Température et photopériode gouvernent la dynamique du cycle de reproduction de *C. gigas*

Les résultats de l'étude présentée dans cette partie ont fait l'objet d'un article soumis pour publication dans "Aquaculture". Les résultats majeurs de cette étude sont présentés ci-dessous.

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans la régulation de la gamétogenèse des invertébrés marins (Pearse, 1999). Différentes études indiquent que la maturation gonadique de *C. gigas* est stimulée par des températures élevées de l'eau de mer (≈ 20 °C) et que la nourriture intervient dans le nombre et la qualité des gamètes produits (Muranaka et Lannan, 1984; Dinamani, 1987; Ruiz *et al.*, 1992; Chavez-Villalba *et al.*, 2003a). La manipulation de ces deux facteurs est utilisée depuis longtemps en éclosérie pour accélérer la maturation des huîtres (Robert et Gérard, 1999). A l'inverse, les processus d'initiation de la gamétogenèse et le rôle des facteurs environnementaux dans leur contrôle ne sont pas clairement établis et cette phase de la reproduction ne peut pas être complètement maîtrisée en éclosérie. Dans la nature, en milieu tempéré, la reprise du développement des cellules germinales est observée à la fin de l'automne ou au début de l'hiver, lorsque la température de l'eau est basse (10 – 12 °C) et la durée du jour décroissante (Ruiz *et al.*, 1992; Lango-Reynoso, 1999). Cependant, les facteurs qui contrôlent la reprise et la durée de la prolifération des gonies restent inconnus. Les études en milieu naturel permettent difficilement d'étudier un phénomène aussi fugace que la multiplication des cellules germinales et les expérimentations en milieu contrôlé étaient, jusque là, majoritairement axées sur la maturation des huîtres.

L'objectif de cette étude était de déterminer l'influence des paramètres température et photopériode dans la régulation de la gamétogenèse de *C. gigas* et plus particulièrement dans les processus de renouvellement de la population de cellules germinales à chaque cycle de reproduction ainsi que les processus de prolifération des gonies. Pour cela, nous avons étudié la gamétogenèse des huîtres conditionnées pendant un an (de février 2002 à février 2003) dans les conditions expérimentales de température/photopériode naturelles (NC), accélérées (AC) et hivernales (WC) de l'expérimentation GIGAREPRO. Le cycle naturel (NC) devait permettre de tester la faisabilité des conditionnements expérimentaux de longue durée (1 an)

jamais réalisés jusqu'à présent. Le cycle naturel devait également servir de cycle contrôle du déroulement normal de la gamétogenèse. Le cycle accéléré (AC) avait pour objectif de tester si le seul décalage des paramètres température et photopériode suffisait à réinitier la reproduction "hors-saison" et à obtenir une maturation des huîtres à l'automne, période considérée en éclosérie comme "réfractaire au conditionnement". Enfin, le conditionnement hivernal permanent (WC) devait permettre de tester l'influence des températures basses sur la prolifération des gonies.

Le cycle de reproduction des huîtres dans les trois conditionnements (NC, AC et WC) a été analysé qualitativement par histologie et semi-quantitativement par la mesure de l'occupation gonadique, sur tous les individus prélevés mensuellement (15 ou 20).

La description du développement gonadique faite dans cette étude est basée sur des critères histologiques prenant en compte notamment la taille des cellules germinales et l'aspect des tubules gonadiques, et correspond aux stades du cycle sexuel décrits par Lango-Reynoso (1999). Ainsi, la gamétogenèse peut être séparée en quatre grands stades de développement gonadique :

Stade 1 : l'initiation de la gamétogenèse. Les tubules gonadiques en formation sont peu développés et ils contiennent essentiellement des gonies.

Stade 2 : la croissance et la maturation. Les tubules gonadiques, maintenant bien développés, contiennent des cellules germinales à tous les stades de gamétogenèse, des gonies aux gamètes.

Stade 3 : la maturité. Le tissu conjonctif a complètement disparu, les tubules gonadiques sont à leur développement maximum et ils sont composés presque exclusivement d'ovocytes de grande taille ou de spermatozoïdes.

Stade 4 : la dégénérescence. Les tubules gonadiques régressent et les gamètes résiduels dégènèrent.

L'analyse globale du développement de la gonade par histologie et analyse d'images montre clairement que la gamétogenèse de *C. gigas* est complètement synchronisée par les paramètres couplés température/photopériode dans les conditionnements NC et AC. Les huîtres, élevées expérimentalement dans des conditions naturelles de température et de photopériode ont suivi le même rythme de gamétogenèse que dans la nature, initiation de la gamétogenèse en hiver, maturation au printemps, émission des gamètes en été et dégénérescence de la gonade au début de l'automne (Figure 35 A). Ce conditionnement a donc servi de cycle témoin pour l'analyse des autres conditionnements.

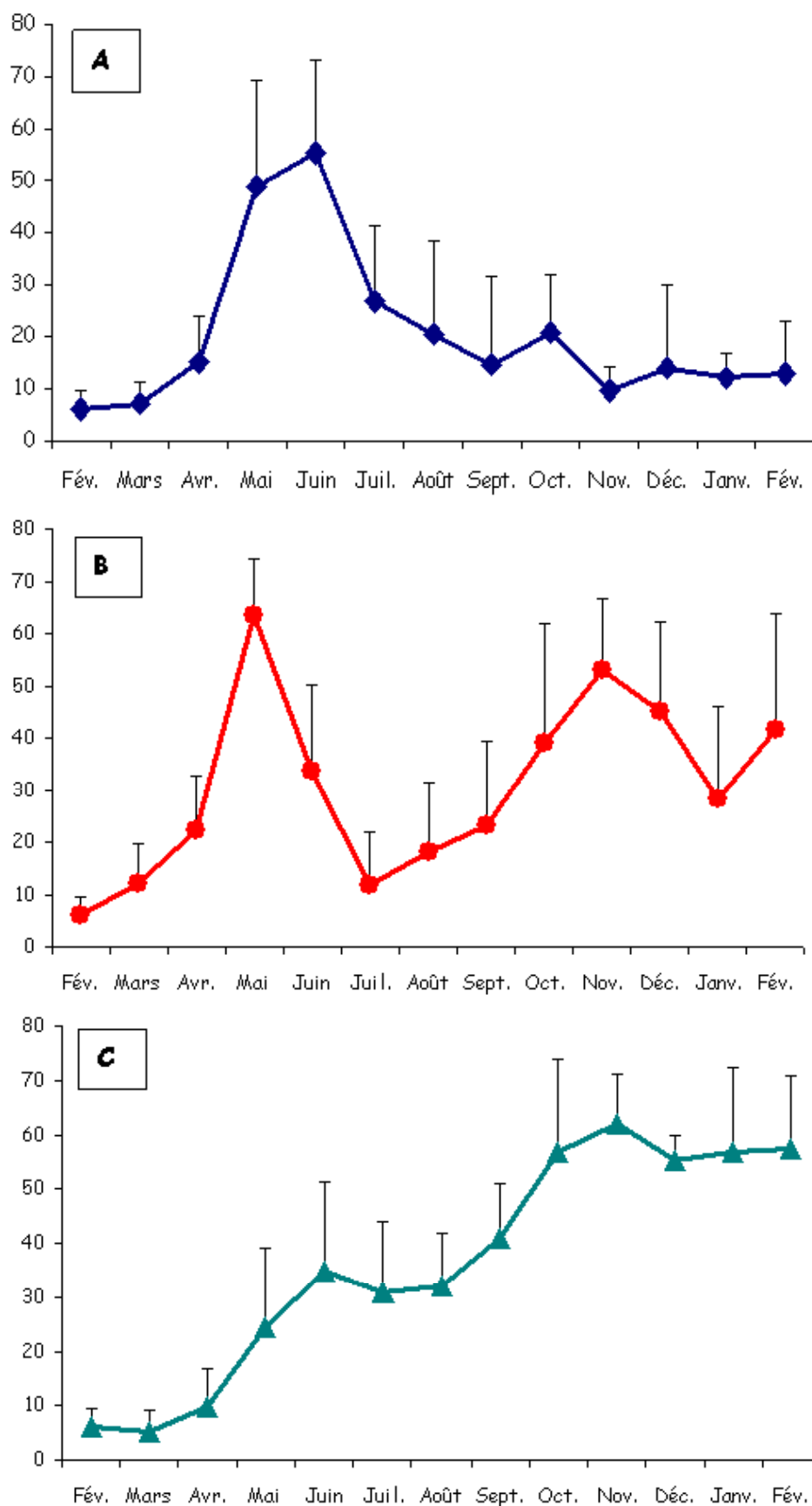


Figure 35 : Surfaces gonadiques des huîtres issues des conditionnements expérimentaux (A) naturel (NC), (B) accéléré (AC) et (C) hivernal (WC). Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport à la surface totale de la masse viscérale.

Les huîtres du conditionnement accéléré ont réalisé deux cycles de gamétogenèse en une année *i.e.* le rythme du cycle de reproduction s'est calqué sur celui des paramètres température et photopériode, avec une ponte spontanée en automne (Figure 35 B). La maturation a été fortement ralentie par les conditions hivernales dans le conditionnement WC et aucune ponte n'a été observée sur la durée du conditionnement (Figure 35 C). Ces expérimentations confirment la grande plasticité physiologique de la reproduction de *C. gigas* déjà constatée en milieu naturel avec sa capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales des régions où elle a été importée (Ruiz *et al.*, 1992).

Au niveau cellulaire, dans les trois conditionnements la prolifération des gonies semblerait être déclenchée et entretenue par les conditions hivernales de température, entre 8 et 12 °C et ce quel que soit l'état physiologique des huîtres (initiation de la reproduction, maturation ou régression). En effet, des mitoses goniales ont été observées toute l'année en conditions hivernales permanentes, même lorsque la gonade était mature (Figure 36) et en conditions accélérées, une reprise de la prolifération des gonies a été observée pendant la phase d'atrésie des gamètes qui suit l'émission (Figure 37). Lango-Reynoso (1999) a supposé que les premières cellules germinales étaient formées grâce à l'énergie issue de l'atrésie des ovocytes. Dans notre étude, ce mécanisme d'atrésie n'apparaît pas nécessaire à la formation de cellules germinales car une prolifération des gonies a été observée en l'absence de résorption ou simultanée avec celle-ci. La résorption ovocytaire pourrait intervenir dans la gamétogenèse en complément de l'énergie apportée par les réserves accumulées pendant l'automne (Berthelin *et al.*, 2000a) et par la nourriture présente. L'arrêt des mitoses semble provoqué par une augmentation de la température dans les conditionnements NC et AC.

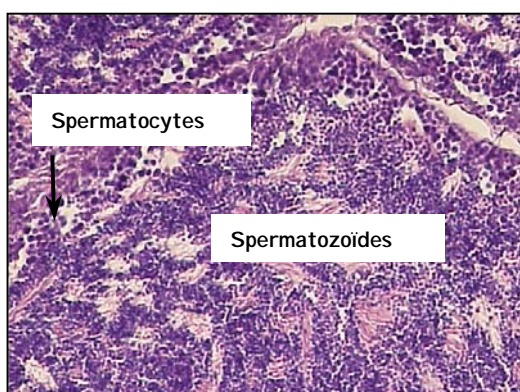


Figure 36 : Tubule gonadique mâle en WC en décembre. De jeunes cellules germinales sont visibles à la périphérie du tubule alors que la lumière du tubule est remplie de spermatozoïdes matures. Traitement en histologie classique. Coloration hématoxyline-éosine. Grossissement X 400.

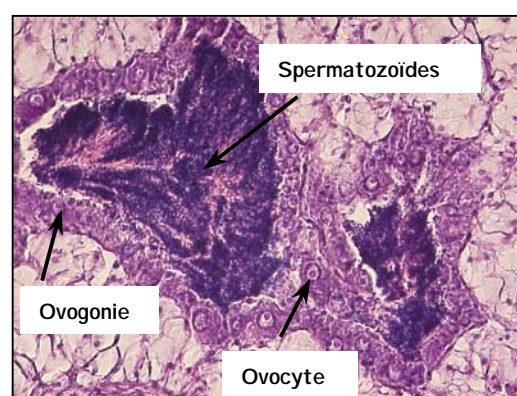


Figure 37 : Tubule gonadique en AC en août. De jeunes ovocytes sont visibles à la périphérie des tubules alors que la lumière des tubules est remplie de spermatozoïdes résiduels. L'animal a subi un changement de sexe, de mâle à femelle, entre le premier et le second cycle de reproduction. G X 400.

La maturité des huîtres, définie sur des critères histologiques, a été obtenue après 4 mois, 3 mois et 8 mois en conditions naturelles, accélérées et hivernales, respectivement. Ces résultats démontrent que la vitesse de maturation des cellules germinales dépend des conditions thermiques et/ou photopériodiques dans lesquelles sont placées les huîtres.

Dans le conditionnement hivernal, les huîtres ont réalisé une gamétogenèse complète à 8-10 °C. Chavez-Villalba *et al.* (2003b) ont également observé, en conditions expérimentales, une initiation de la gamétogenèse et une maturation gonadique de *C. gigas* en conditions thermiques froides, sur des huîtres prélevées dans le milieu naturel en janvier (Baie des Veys et Marennes-Oléron), placées à 10 °C pendant deux mois et nourries *ad libitum*. Pourtant, en milieu naturel, ces températures sont généralement considérées comme trop basses pour permettre la maturation des huîtres. En effet, plusieurs études de suivi du cycle de reproduction des huîtres réalisées dans la nature indiquent que la maturation gonadique n'a lieu qu'au-delà de 16°C (Mann, 1979; Ruiz *et al.*, 1992). De plus, Mann (1979) observait que toute activité gamétogénétique cessait en dessous de 10,5 °C et qu'une température de 12 °C apparaissait être le seuil minimal pour le démarrage de la gamétogenèse. Deux paramètres diffèrent majoritairement entre le milieu naturel et les conditions expérimentales. Ainsi, en conditions expérimentales, les huîtres sont nourries *ad libitum* ce qui leur permettrait de disposer d'une énergie suffisante pour réaliser la gamétogenèse même si elles n'ont pas accumulé de réserves avant le conditionnement. A l'inverse, la quantité de nourriture disponible dans le milieu naturel en période hivernale ne permet pas de réaliser un apport énergétique suffisant pour permettre la gamétogenèse. D'autre part, la maturation des huîtres dans le conditionnement hivernal ne débute que 5 mois après le début du conditionnement. Ainsi, un tel phénomène ne pourrait pas être observé dans la nature, où la température de l'eau ne reste que peu de temps à sa valeur minimale. Il apparaît que les observations réalisées en conditions expérimentales et dans la nature peuvent difficilement être comparées. En conditions expérimentales, il semblerait que lorsque les réserves ou la quantité de nourriture disponibles sont suffisantes pour fournir l'énergie nécessaire à la gamétogenèse et que le stock de cellules germinales est reconstitué, le développement des cellules germinales peut se faire jusqu'à l'obtention de gamètes matures, quelles que soient les conditions de température. Ainsi, notre étude confirme que l'entrée en maturation des cellules germinales de *C. gigas* n'est pas limitée par des conditions thermiques froides. Suivant ce schéma, la température agirait comme déclencheur de la prolifération des gonies (température basse) alors qu'elle n'agirait qu'en tant que catalyseur au cours de la maturation.

Il est intéressant de noter que la seconde maturation des huîtres dans le conditionnement accéléré a eu lieu en automne (septembre – novembre), période généralement réfractaire au conditionnement, et qu'une ponte spontanée a été obtenue fin septembre. Le succès de la maturation automnale dans ces conditions expérimentales provient certainement du fait que les huîtres ont suivi (en accéléré) toutes les étapes préalables, nécessaires à une bonne maturation, à savoir la constitution des réserves et la formation du stock de cellules germinales. Ce phénomène avait déjà été entrevu par Bayne *et al.* (1975) qui indiquaient que la maturation des bivalves ne pouvait être stimulée que sur des animaux ayant constitué un stock de cellules germinales au préalable, *i.e.* pour lesquels les mitoses goniales ont déjà eu lieu.

La température pourrait influencer la détermination du sexe chez *C. gigas*. En effet, un excès d'huîtres mâles a été produit en conditions hivernales alors que le sex-ratio était équilibré dans les conditionnements NC et AC. Le déterminisme du sexe chez les huîtres creuses est encore mal connu mais il serait contrôlé par des facteurs génétiques et secondairement par les facteurs environnementaux (Guo *et al.*, 1998). Les mâles seraient prédominants en conditions "défavorables" alors que les femelles seraient plus nombreuses lorsque les conditions sont favorables (quantité de nourriture importante, température de l'eau élevée...) (Lango-Reynoso, 1999). Toutes les huîtres ayant été nourries avec la même ration algale, non limitante, ce facteur ne peut pas expliquer la différence observée dans les trois conditionnements. La température apparaît alors comme l'un des facteurs qui aurait orienté la détermination du sexe en faveur des mâles.

Les techniques de conditionnement présentées dans cette partie pourraient être appliquées en aquaculture. En effet, en utilisant ces trois méthodes de conditionnement, il est possible d'obtenir des huîtres matures toute l'année, y compris durant la période automnale traditionnellement considérée comme réfractaire au conditionnement. De plus, le conditionnement hivernal permet de disposer d'un stock de gamètes matures fertiles pendant plusieurs mois sans qu'aucun signe de régression (atrésie et résorption) ne soit observé. Des huîtres issues de ce conditionnement ont été utilisées comme géniteurs pour réaliser des croisements et les larves produites présentaient un bon développement et des taux de survie larvaire satisfaisants.

Dans cette étude, l'effet individuel des paramètres température et photopériode n'a pas été testé. Cependant, notons qu'aucun effet de la photopériode n'a jamais été mis en évidence dans la régulation de la gamétogenèse de *C. gigas*.

La surface gonadique, utilisée dans cette étude comme paramètre semi-quantitatif du suivi du cycle de reproduction de *C. gigas*, apparaît être un bon indicateur de l'évolution de la gamétogenèse. Les courbes de surfaces gonadiques en fonction du temps permettent de retranscrire les quatre grandes étapes de la gamétogenèse, initiation, croissance, maturation et régression. Les écarts-types associés aux valeurs de surface gonadique sont faibles au début du conditionnement (février 2002 à avril 2002) puis augmentent pendant les étapes de maturation et de régression. Cette augmentation des écarts-types pendant la maturation résulte de l'hétérogénéité de la cinétique de maturation entre les individus. Pendant, la phase de régression, cela s'explique par l'hétérogénéité des émissions de gamètes, certains individus faisant des émissions totales alors que d'autres n'émettent que partiellement leurs gamètes. De plus, les animaux présentant des gamètes en atresie ré-initient leur cycle de reproduction plus tardivement (Chavez-Villalba, 2001), ce qui contribue à l'augmentation des écarts-types après la ponte. Ce phénomène d'augmentation des écarts-types pendant la maturation des huîtres avait déjà été observé chez les femelles par Lango-Reynoso qui étudiait les populations de taille d'ovocytes dans la gonade (Lango-Reynoso, 1999).

Article 4 :

Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. Accepté dans *Aquaculture*.

Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock

Caroline Fabioux^{1,2}, Arnaud Huvet¹, Pierrick Le Souchu¹, Marcel Le Penec²,
Stéphane Pouvreau¹

Address:

¹ UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer, B.P.70, 29280
Plouzané, France

² UMR CNRS 6539, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Université
de Bretagne Occidentale, IUEM, 29280 Plouzané, France

*Corresponding author:

Stéphane Pouvreau. Email: Stephane.Pouvreau@ifremer.fr

¹ UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer, B.P.70, 29280
Plouzané, France

Phone: +33(0)2 98 22 46 93

Fax: +33(0)2 98 22 46 53

Abstract:

This study examined for the first time the reproductive cycle of *Crassostrea gigas* in controlled conditions during a complete year, with focus on the initiation of gametogenesis. This work analysed also the role of temperature and photoperiod parameters in the regulation of oyster reproduction. Broodstock were maintained in natural (NC), accelerated (AC) and perpetual winter (WC) conditions of temperature and photoperiod, with feeding ad libitum. Qualitative and quantitative analyses of the reproductive pattern were performed by biometric measurement approach, sex ratio determination, histology and gonad filling index evolution. These experimental surroundings led to different strategies for growth and resource allocation. The reproductive cycle, appeared entirely modulated, accelerated or delayed, by temperature and photoperiod parameters. Moreover, both parameters played a key role in gonial mitosis regulation. Gonial proliferation was set off and sustained by winter temperature and/or photoperiod (8 °C/8 hours daylight) whatever physiological state of oysters. Maturation of germ cells appeared to be a function of temperature and could proceed at low temperature, while ripe oysters were obtained at 8 °C in winter conditioning. The three conditioning methods developed in this study, allowed the production of gametes all over the year, including in the autumnal resting period. Moreover, stocks of ripe oysters could be maintained at low temperature during several months to produce spat when desired for aquaculture production.

Key words: oyster, reproduction, gonial mitosis, gonad filling index, regulation, temperature.

Introduction

Since its introduction in France in the 1970's (Grizel and Héral, 1991), the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789) became the major shellfish farmed species. Juveniles supplying this industry were mainly obtained by spat collection from the natural environment in two sites, Marennes-Oléron and Arcachon basins (Robert and Gérard, 1999). The variability of spat recruitment from year to year and the recent increase in the market demand led to develop hatchery spat production (Robert and Gérard, 1999). One of the key-step in hatchery procedure consisted in the broodstock conditioning. It has been clearly showed that the fecundity in oysters could be controlled by manipulating its environment. Indeed, water temperature influenced gonadal development while food enhanced fertility and gametes quality (Loosanoff and Davis, 1963; Lannan *et al.*, 1980; Muranaka and Lannan, 1984; Utting and Millican, 1997). Nevertheless different mechanisms of oyster reproduction remained unclear. The recurrent failure of autumn conditioning has been still problematic to produce spat in hatchery all over the year (Wilson, 1981; Le Pennec *et al.*, 1998; Robert and Gérard, 1999). To fill that gap, it was necessary (1) to obtain a wide overview, on an annual basis, of the oyster reproductive cycle and (2) to understand its regulation by environmental parameters.

In nature, the annual reproductive cycle of *C. gigas* has been widely described (Perdue, 1982; Maurer and Borel, 1986; Dinamani, 1987; Ruiz *et al.*, 1992; Barber, 1996; Steele and Mulcahy, 1999; Berthelin *et al.*, 2000a; Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Chavez-Villalba *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2003). A general pattern of oyster reproduction in relation with environmental parameters might be drawn accordingly. In temperate regions, *C. gigas* exhibited a seasonal reproductive cycle, clearly related to temperature with (1) initiation of gametogenesis usually observed in winter when water temperature was low; (2) active step of gametogenesis (growing stage) in spring when water temperature increased; (3) maturity and spawning in summer, when temperature was above 19°C (Mann, 1979); (4) resorption period in autumn (degenerating stage). Gametogenesis has been also influenced by salinity with negative effects at low values (≤ 30 ppt) (Muranaka and Lannan, 1984). This general pattern could also be modulated by food availability in the surroundings. In eutrophic environment oysters produced more gametes than in poorer environment (Kang *et al.*, 2000). The major drawback in field measurements was that the role of each environmental parameter in reproductive processes could not be assessed. On the other side, studies on the effect of external parameters on *C. gigas* gametogenesis in controlled environment (i.e. broodstock

conditioning) stayed very scarce and reduced in time (Muranaka and Lannan, 1984; See also Robinson, 1992 for *C. gigas kumamoto*; Chavez-Villalba *et al.*, 2002a; Chavez-Villalba *et al.*, 2002b). Moreover, these studies focused mainly on the maturation of germ cells and very few on the initiation of the reproductive cycle whereas it has been a crucial step for the following gametogenesis.

We reported in this study the influence of (1) natural and (2) accelerated temperature and photoperiod cycles and (3) perpetual winter conditions on the main steps of gametogenesis of *C. gigas*, including the initiation of the reproductive cycle, the maturation step and the gamete resorption.

Materials and methods

Biological material

Oysters were hatchery produced in 2001 in the Ifremer hatchery in La Tremblade (France) from 30 wild broodstock collected in the Marennes-Oléron Bay. Spat were then reared at the Ifremer station in Bouin (France). One-year-old oysters were conditioned at the Ifremer shellfish laboratory in Argenton (France) from February 2002 to February 2003, in 300-L raceways with 20 µm-filtered running seawater. Oysters were fed ad libitum with a mixed diet of three micro-algae equal to 8% dry weight algae/dry weight oyster per day and per oyster (33% *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*, 33% *Isochrysis galbana* named *T-iso*, 33% *Tetraselmis chui*). On the whole experimental period, mean salinity was 34.5 ppt while water temperature was controlled every day. Twice a week, raceways were drained, cleaned and dead animals counted and removed. Three experimental conditionings were assayed. In the first one, related to natural conditions (NC), temperature and photoperiod were regulated to follow the mean natural cycles recorded in Marennes-Oléron Bay during the last ten years (Figure 1) (Soletchnik *et al.*, 1998). In the second one, temperature and photoperiod cycles were twice faster than natural cycles (NC) and it was referred to as accelerated conditioning (AC). The third one maintained, during all the experiment, winter conditions, 8 °C and 8 hours daylight and was called winter conditioning (WC).

Twenty oysters were initially collected in February 2002 and randomly sampled every month in each condition (NC, AC, WC) from March 2002 to August 2002. From September 2002 to February 2003, only fifteen oysters per condition were sampled due to significant mortality in spring and summer 2002 in NC batches.

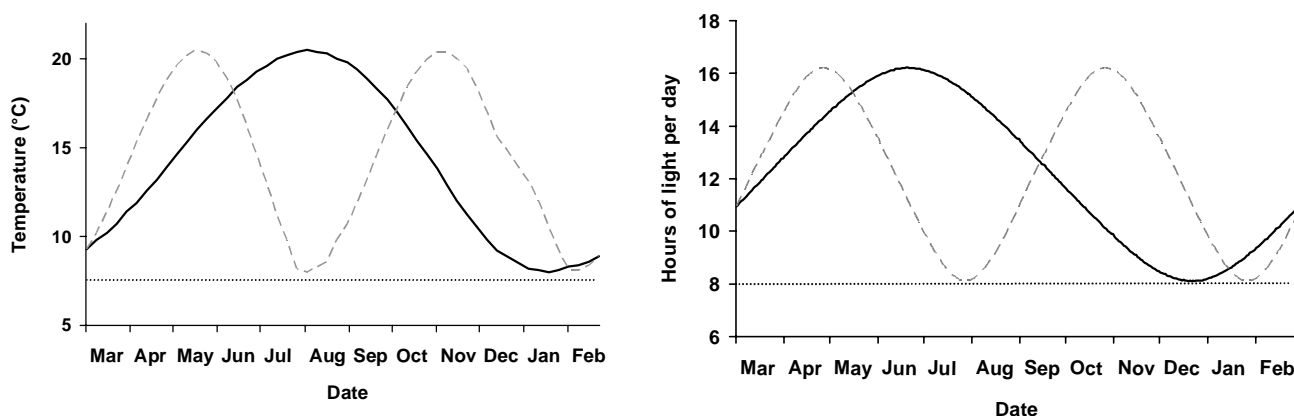


Figure 1, Article 4: Mean monthly values of temperature and photoperiod applied in natural (black line), accelerated (grey dotted line) and wintering (black dotted line) experimental conditions (NC, AC and WC).

Biometry and condition Indices

Total wet weight, shell length and visceral mass (digestive gland, gonad and labial palps) wet weight were achieved as well as the condition index (CI) corresponding to visceral mass wet weight / total wet weight.

Qualitative reproductive analysis

For each sample, adductor muscle, gills and mantle were removed and 3-mm large cross sections of the visceral mass were realised in front of the pericardic region for histological examination and immediately fixed in Davidson's solution (Shaw and Battle, 1957) at 4°C for 48 hours at least. Sections were dehydrated in ascending ethanol solutions, cleared with xylene and embedded in paraffin wax. Five- μ m thick sections were cut, mounted on glass slides, stained with Harry's hematoxylin-Eosin Y (Martoja and Martoja-Pierson, 1967) and coverslipped. Slides were examined under a light microscope to determine the sex and gametogenesis stage according to the reproductive scale reported by Steele and Mulcahy (1999).

Quantitative reproductive analysis

Each slide was scanned with HP Scanjet 6300 C scanner at magnification X400. The gonad area (GA) relative to the whole area of the visceral mass was determined by the image analysis software IMAQ Vision Builder (National Instrument). This analysis, based on specific coloration intensity of different tissues of the histological slides, was performed with the following script: (1) Colour images were transformed in grey level images by means of

"colour extraction" function, (2) the outlines of the histological section were defined by drawing with the "image mask" function, (3) the area of one tissue (gonad, digestive gland or conjunctive tissue) was determined by adjusting the grey level threshold specific of this tissue, (4) the area of the tissue was automatically calculated in pixels (Heffernan and Walker, 1989).

Statistical analysis

Differences between biometric parameters (total weight, shell length and visceral mass weight), condition indices and percentage of gonad area in three conditionings were tested using the non-parametric Kruskal-Wallis analysis at $p < 0.05$. Chi-square statistics were used to test sex ratios against a 1:1 ratio.

Results

Biometric measurements

Total wet weight, shell length and visceral mass increased all over the year (Figure 2). At the end of the experiment (January 2003), mean total weight of oysters from AC was higher ($59.5 \text{ g} \pm 19$) than that of oysters from NC and WC ($47.7 \text{ g} \pm 19$ and $37.2 \text{ g} \pm 13$, respectively) (Figure 2A) with significant differences between WC and AC (Kruskall-Wallis test value = 17.22, $p < 0.05$, $N = 45$). The same pattern was observed for shell length measurements with oysters from AC significantly higher ($9.5 \text{ cm} \pm 1.6$) than those from NC and WC ($7.7 \text{ cm} \pm 1.0$ and $7.2 \text{ cm} \pm 1.1$, respectively) (Kruskall-Wallis test value = 18.86, $p < 0.05$, $N = 45$) (Figure 2B). In contrast, no significant differences were observed for the mean visceral mass weight between different experimental conditions (4.2 ± 1.9 ; 4 ± 1.4 ; 4.8 ± 1.8 , for Nc, AC, WC, respectively) in January 2003 (Figure 2C).

In NC, condition index (CI) increased from February to June, decreased after spawning induced in June and increased again from August to the end of the experiment (Figure 3). In AC, CI slightly increased from February to May, decreased after spawning in May and increased again from July to the end of the experiment (Figure 3). In WC, CI increased regularly all over the year (Figure 3). In January 2003, significant differences were recorded for the condition index of oysters exposed to the different environmental conditions (Kruskall-Wallis test value = 23.66, $p < 0.05$, $N = 45$), with WC oysters exhibiting the highest value (13.2 ± 2.6).

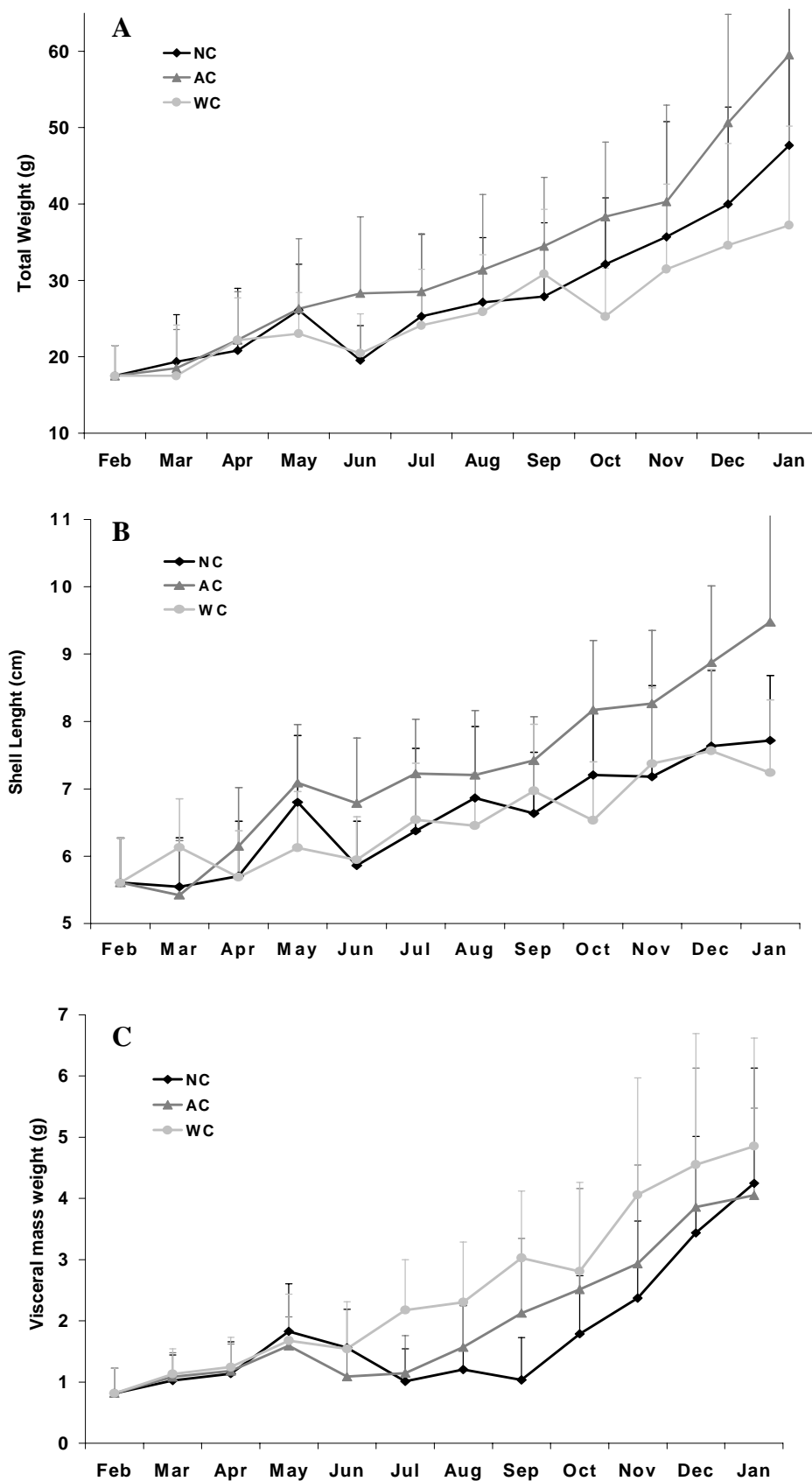


Figure 2, Article 4 : Mean biometric data evolution of *Crassostrea gigas* exposed to natural, accelerated and wintering conditions (NC, AC, WC). (A) Total wet weight; (B) Shell length, (C) Visceral mass wet weight. Bars represent standard deviation.

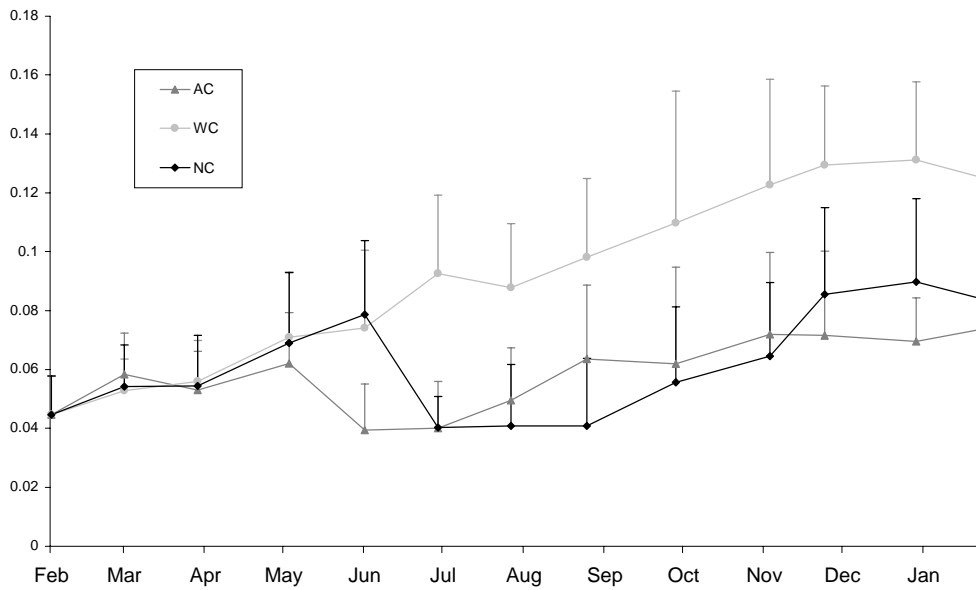


Figure 3, Article 4: Evolution of the condition index (CI) of *Crassostrea gigas* oysters exposed to natural, accelerated and wintering conditions (NC, AC, WC). Bars represent standard deviation.

Sex ratio

Sex ratios (number of female: number of male) changed throughout the year in the three conditions. Nevertheless, when computing all data, sex ratios were 1:1.3 for NC, 1:1 for AC, and 1:1.6 for WC with no significant difference from 1:1 in NC and AC conditions but clearly significant for WC. Three and six hermaphrodites were recorded all over the reproductive cycles in NC and AC, respectively.

The number of undifferentiated animals varied in NC, AC and WC samples. Only one undifferentiated oyster was found in WC, in March. In NC, undifferentiated oysters were found in March (2) and April (1) and in relative abundance (27) from August to January 2003. In AC, undifferentiated oysters were found in March (2) and from July to January 2003 (7).

Reproductive cycle: quantitative analysis

The evolution of gonad area (GA) of oysters exposed to different experimental conditions is reported in figure 4. The initial mean GA value was 6.1%. Under NC, the overall pattern was clearly monomodal with increasing values from March (7.1%) to June (55.3%), then decreasing after spawning until November (9.7%) to remain constant afterwards. Under AC, oyster gonad area increased sharper than in natural cycle and followed a clear binomial pattern. In May, a first maximum value was recorded (63.5%) while the lowest gonad area was detected in July (11.7%).

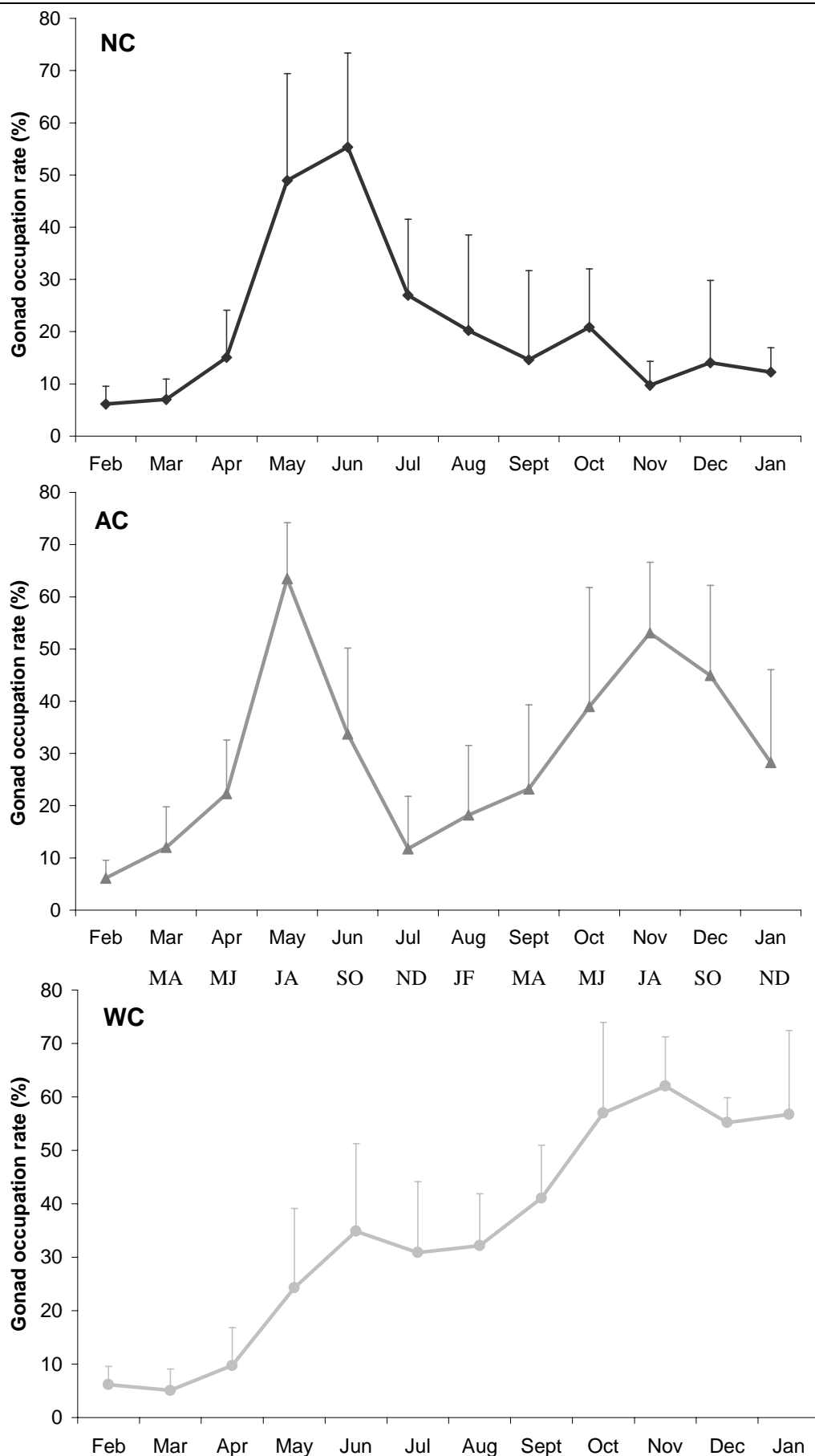


Figure 4, Article 4 : Evolution of the percentage of gonad area (/visceral mass total area) in natural, accelerated and wintering conditions (NC, AC, WC). For AC, bold initial letters under the "date" axis represent the artificial months for oysters obtained with accelerated conditions. Bars represent standard deviation.

In November a second maximum value (53.1%) was noted but Kruskal-Wallis test showed no significant differences between these two peaks ($F=2.34$, $p > 0.05$, $N = 30$). Under winter conditions, the overall pattern was completely different with an increase of gonad area all along the experiment with an optimum value of 62% in November followed by a weak slowing down. Despite these different patterns, no significant differences were observed between maximum values whatever experimental conditions (Kruskal-Wallis test value = 0.72, $p > 0.05$, $N = 57$).

Reproductive cycle: qualitative analysis

The oyster germ cell development in NC, AC and WC was analysed by histology. Five characteristic periods of the reproductive cycle (initiation, maturation, ripeness, after spawning, resorption) were reported in plates 1 and 2. In February 2002, oyster gonads consisted in very small follicles filled with stem cells, widely separated by connective conjunctive tissue. Sex of oysters was undistinguishable at this stage (data not shown).

In April, gonad of females from NC and WC (Plates 1A and 1C) were at the same gametogenic stage: tubule walls contained mainly stem cells and oogonia characterised by compact, large nuclei (6 μm) and a narrow rim of finely granular cytoplasm. Conjunctive connective tissue was abundant. A similar pattern was observed for males from NC and WC (Plates 2A and 2C). Tubules contained mainly stem cells, spermatogonia and young smaller spermatocytes. Connective tissue was also abundant. In April, females and males from AC were at a later developmental stage compared to those observed in NC and WC (Plates 1B and 2B). In females, tubules consisted in vitellogenic oocytes, cells 30-45 μm in diameter with distinct nuclei, attached to tubule walls or free in the lumina (Plate 1B). In males, tubules contained different germ cell stages, spermatocytes, spermatides and spermatozoa, decreasing in size from the outer wall to the centre of the tubule. Spermatozoa possessed flagella and were free in the lumina of the tubules (Plate 2B).

In May, oysters from NC were clearly in maturation stage (Plate 1D). Female tubules were filled with attached oocytes and a large number of free oocytes (Plate 1D). Male tubules were filled with spermatozoa, while germinal epithelia always showed spermatides (Plate 2D). In May, oysters from AC were ripped, female tubules were filled with free mature oocytes and male tubules were filled with spermatozoa (Plates 1E and 2E). In contrast, oysters from the WC at the same period were still at early developing stage (Plates 1F and 2F).

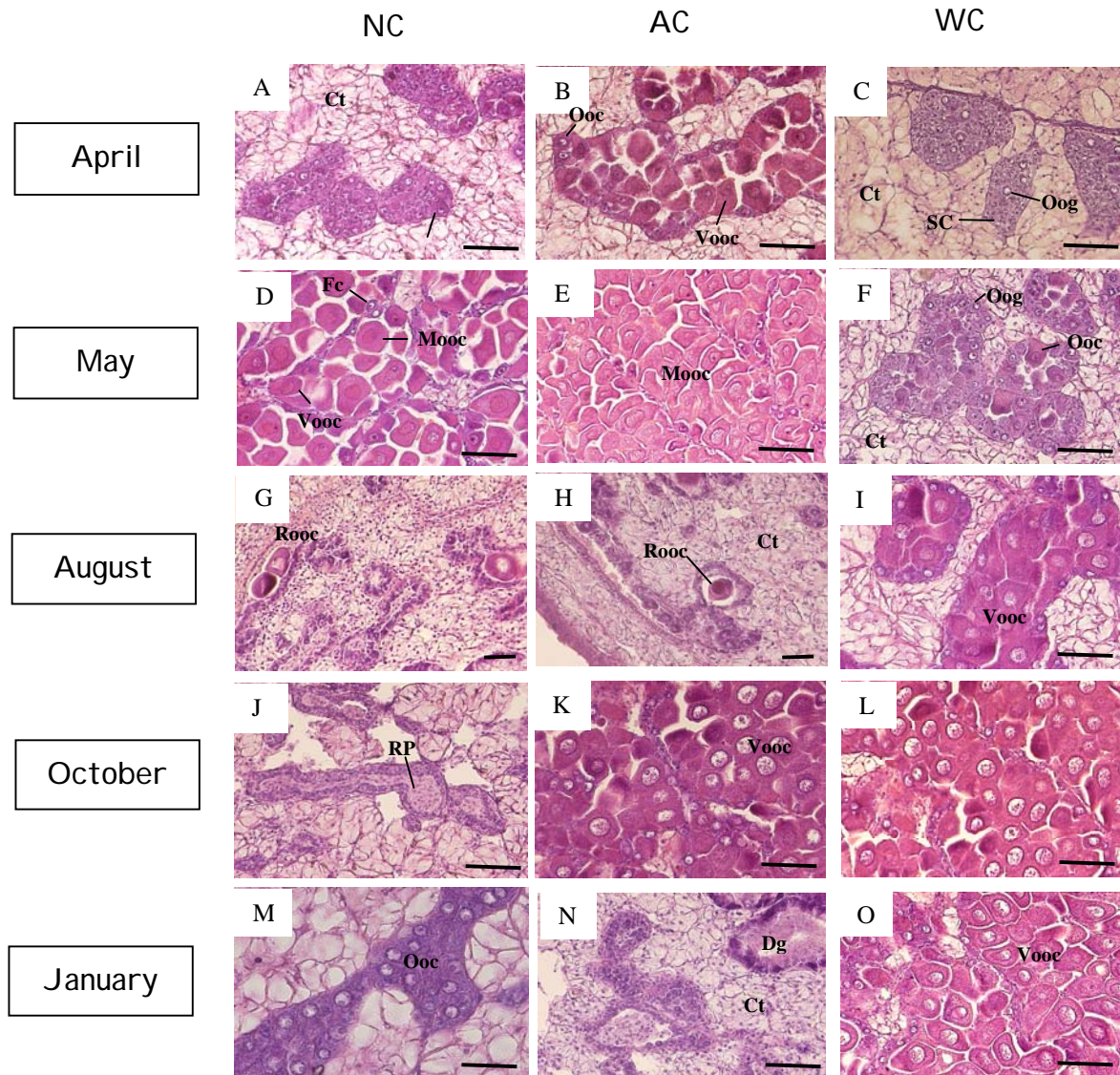


Plate 1, Article 4: Histological description of *C. gigas* female reproductive cycle in natural (NC), accelerated (AC) and wintering conditions (WC). Ct: conjunctive tissue, SC: stem cells, Oog: oogonia, Ooc: young oocyte, Vooc: vitellogenic oocyte, Mooc: mature oocyte, Rooc: residual oocyte, RP: products of resorption, Fc: follicle cells, Dg: digestive gland. Scale bar 50 μ m.

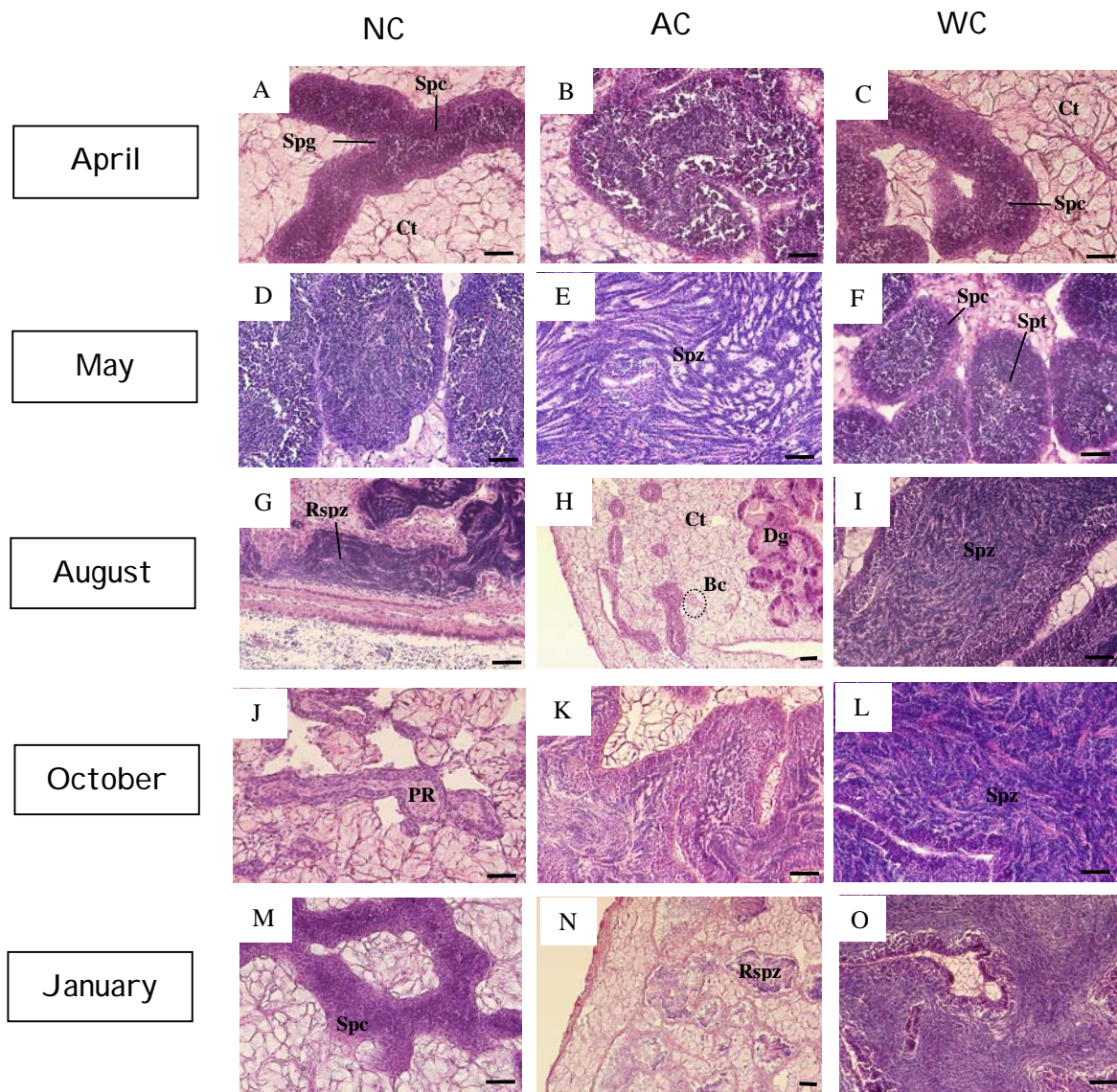


Plate 2, Article 4: Histological description of *C. gigas* male reproductive cycle in natural (NC), accelerated (AC) and wintering conditions (WC). Ct: conjunctive tissue, Spg: spermatogonia, Spc: spermatocytes, Spt: spermatides, Spz: spermatozoa, Rspz: residual spermatozoa, PR: products of resorption, Dg: digestive gland, Bc: blood cells. Scale bar 50 µm.

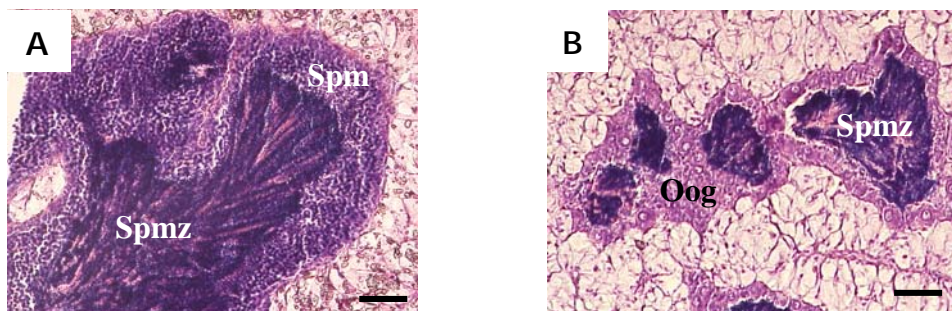


Figure 5, Article 4: Gonadic tubules of oysters, sampled in August, issued from accelerated conditioning (AC) contained two successive generations of germ cells. Residual spermatozoa in lumina of tubules represented old generation of germ cells while the new one, male (A) or female (B), was located on the tubule wall. Spmz: spermatozoa, Spm: spermatogonia and spermatocytes, Oog: oogonia. Scale bar 50 µm.

Female germinal follicles contained some vitellogenic oocytes but most part of cells were oogonia or young oocytes (Plate 1F). In males, first spermatozoa appeared but gonadal tubules mainly consisted in spermatocytes and spermatides (Plate 2F).

In August, oysters from NC were partially or totally spent. In Plate 1G, female was totally spent, only rare oocytes stayed in empty tubules. Conjunctive tissue was disorganised and invaded by blood cells. In Plate 2G, male was partially spent, some spermatozoa remained in discharging tubules. In August, oysters in AC were spent and a new reproductive cycle has been reinitiated yet (Plates 1H and 2H, Figure 5). Plate 2H represented the initiation of the reproductive cycle. Small clusters of stem cells were isolated among conjunctive tissue. In figure 5, lumina of gonadic tubules of AC oysters were filled with residual spermatozoa while tubule walls consisted in spermatogonia and spermatocytes (Figure 5A) or oogonia (Figure 5B). In August, oysters from WC were still in maturation step (Plates 1I and 2I). In females, the follicle size increased and more free oocytes were observed in tubules but oogonia were still observed. Conjunctive tissue remained visible (Plate 1I). In the same way the number of spermatozoa increased in males but spermatocytes and spermatides still remained. Conjunctive tissue was observed between developing tubules (Plate 2I).

In October, oysters from NC were in regression step (Plates 1J and 2J). Conjunctive connective tissue was disorganised and processes of cytolysis were observed both in female and male tubules. At this time, oysters from AC were in maturation as described in May for oysters from NC (Plates 1K and 2K) while oysters from WC were ripe (Plates 1L and 2L). Female tubules were filled with mature oocytes and male tubules with spermatozoa but earlier stage germ cells (oogonia and young oocytes or spermatogonia and spermatocytes) still remained (Plates 1L and 2L).

Lastly, at the end of the experiment (January 2003), oysters from NC were at the initiation step of the reproductive cycle (Plates 1M and 2M). Oysters from AC were spent, totally or partially (Plates 1N and 2N) and oysters from WC were ripe with early stage germ cells still observed in the tubule walls (Plates 1O and 2O).

Discussion

Up to now, studies on the reproduction of *C. gigas* and its regulation by environmental parameters in controlled conditions were restricted in time and mainly focused on studying the maturation step (Muranaka and Lannan, 1984; Robinson, 1992; Chavez-Villalba *et al.*, 2002b). Data on complete reproductive cycle of *C. gigas* were only available in natural environment. These studies were very useful to analyse the environment-dependent strategy

of *C. gigas*, but did not specify the importance of each environmental parameter. For the first time, this study analysed the effect of temperature coupled with photoperiod on reproduction during a complete annual cycle in controlled environment. This long-time conditioning constituted a really new approach. The large scale of this experimental plan prevented us from testing independently the effect of temperature and photoperiod. Nevertheless, several examples in literature indicated that photoperiod has presumably no effect on *C. gigas* reproductive process.

The biometric measurements, performed all along experiment, clearly showed that oysters fed with the same food (in term of quantity and quality) but placed in natural, accelerated or wintering conditions developed different strategies for growth and resource allocation. At the end of the trials, oysters conditioned under accelerated conditions had the highest mean total weight (around 60 g) and shell length (around 9.5 cm) but the lowest condition index. In contrast, oysters conditioned under wintering conditions showed the lowest total weight (around 35 g) and shell length (around 7.2 cm) but the highest condition index. Oysters maintained under natural conditions were in an intermediate position for all parameters. The lack of spawning of oysters in WC explained presumably its high condition index compared to the other conditions whereas its total weight was lower. For oysters in WC, resource allocation would be in favor of gonad growth, as they stayed in running gametogenesis during a large part of the experiment without spawning. At the opposite, oysters from AC, and NC in a lower degree, seemed to be able to invest more in soma growth compared to oysters in WC, as they had reproductive resting period. Compared to other invertebrates or marine animals, priority rules in bivalves energy allocation between somatic growth, gametogenesis and maintenance remain unclear (Ernande *et al.*, 2004) and experimental studies are very scarce (Jokela and Mutikainen, 1995; Stoeckmann and Garton, 2001).

The qualitative and quantitative analysis of reproductive cycle in three environmental conditions demonstrated the high physiological plasticity in *C. gigas* reproductive process (Ernande *et al.*, 2004). Oysters maintained in the laboratory under natural conditions (NC) followed the same reproductive pattern than oysters reared in Marennes-Oléron bay (Deslous-Paoli *et al.*, 1981). In other conditions (accelerated and winter) the reproductive pattern of oysters appeared entirely modulated by temperature and photoperiod parameters. In winter conditions (WC), the reproductive cycle was slowed down; gametogenesis proceeded slowly through initiation to maturation step (December-January). In contrast, under accelerated conditions (AC), oysters performed two complete reproductive cycles in one year. Two

maturation steps occurred during both “artificial springs” (March-May and September-November) and two spawning periods were observed accordingly. Nevertheless, the second spawning event was less efficient and incomplete for many oysters.

In natural cycle, resorption or “atresia” of unspawned gametes was observed in autumn. This process was clearly described in *C. gigas* by Steele and Mulcahy (1999). It has been generally assumed that resorption occurred after a partial spawning event to “clean” the gonad and prepare it for a new cycle. In the accelerated conditions, the delay between spawning in May (corresponding to natural conditions of August) and the beginning of “artificial autumn” in June-July was very short. Regression of unspawned gametes has not been completed while proliferation of stem cells began in July (corresponding to November in nature). These two processes (degeneration and re-initiation) occurred in the same time in the gonad where two generations of germ cells could be simultaneously observed (Figure 5). These observations seemed to indicate that the gamete resorption is not an indispensable step for the reinitiating of a new reproductive cycle.

The kinetic and regulation of gonial mitosis at the initiation of the reproductive cycle remained unknown for a long time in *C. gigas*. The proliferation of gonidia was previously described in natural conditions using a molecular marker specific of oyster germ cells, the oyster *vasa*-like gene (Fabioux *et al.*, 2004). It was shown that the multiplication of gonidia occurred from November to March. In the present study, gonial mitosis appeared to be clearly regulated by temperature and/or photoperiod. Gonidia proliferation was triggered on by low temperatures (8 °C) and/or short daylight photoperiods whatever physiological state of oysters. In fact, gonidia proliferation was triggered by minimal temperature and photoperiod parameters in AC while unspawned gametes have not been yet resorbed (Figure 5). This proliferation of gonidia continued as long as temperature and photoperiod remained low. Gonidia were observed all along the year, including in ripe oysters, in WC. Moreover, gametogenesis initiation was demonstrated to begin under 10 °C unlike data given in previous studies (Mann, 1979). Further studies, using the oyster *vasa*-like gene as a marker to quantify the proliferation of gonidia in NC, AC and WC, would be of great interest to assess the role of temperature and/or photoperiod in the regulation of the number of gonidia mitosis.

Ripeness of oysters was obtained after 4 months, 3 months and 8 months in natural, accelerated and wintering conditions, respectively. These results showed that the maturation of oyster germ cells is a function of temperature as suggested by Muranaka and Lannan (1984). This relation is in agreement with the "day-degrees" notion proposed by Mann (Mann, 1979) except that minimal temperature for oyster gametogenesis would be lower than 8 °C.

Similarly, there is not maturation threshold temperature as supposed by Ruiz *et al.* (1992). We obtained ripe oysters at 8 °C in wintering conditioning while Ruiz *et al.* (1992) indicated that a threshold of 16 °C was required to enhance germ cells maturation.

Autumn has been often described as a critical period for bivalve conditioning (Wilson, 1981; Le Pennec *et al.*, 1998; Robert and Gérard, 1999). Chavez-Villalba *et al.* (2002a) succeeded in producing *C. gigas* mature oocytes in autumn with oysters kept in winter conditions during three months and then conditioned at 19°C for seven weeks. In this study, we showed that *C. gigas* oysters placed in accelerated conditions produced mature oocytes and spawned twice a year included in autumn months, from September to November. The autumn spawning event was less intensive than the summer spawning. This decrease in the intensity of gamete emission was usually observed in nature in case of autumn spawning consecutive to one or both summer spawning events.

A significant excess of male was only recorded in wintering conditions. The Pacific oyster is a protandric hermaphrodite species, but few data were available on sex determination in *C. gigas* (Guo *et al.*, 1998). It is admitted that sex determination in oyster is genetically controlled and secondary influenced by environmental factors despite scarce information on that latter. Male stage is supposed to be predominant when environment is less favorable (Steele and Mulcahy, 1999). Inversely, female stages would be preferentially found in rich environment. Nevertheless, this theory has not been clearly demonstrated (Baghurst and Mitchell, 2002). In our study, the food level could not explain the excess of male in WC since populations were fed with the same food in quantity and quality. Inversely, temperature would be one of the main factors controlling sex determination and constant low water temperature in WC could explain in a large part the excess of males.

In conclusion, we demonstrated in this study that, in condition of optimal food level, temperature and/or photoperiod drive reproductive internal-clock of *C. gigas*, in particular for the regulation of gonial proliferation and germ cells maturation, both essential steps in oyster reproduction. The modification of these environmental parameters led to complete modification of the timing of *C. gigas* gametogenesis.

Using the three methods described in this study (NC, AC and WC), ripe oysters could be obtained throughout the year. The wintering conditions developed in this study could be a new method to obtain a stock of ripe gametes available during several months since they stayed in a ripeness state during at least 5 months (from October to the end of the experiment) without any sign of gamete resorption. Moreover, the fertility of these gametes was confirmed

by experimental crosses realised using stripped gametes of WC oysters. This conditioning technique could also be used to get a high proportion of male in a broodstock.

For hatchery applications, studies on growth, survival rates and metamorphosis of larvae issued from broodstock conditioned in natural, accelerated and wintering conditions would allow to validate these methods to produce spat all over the year.

Acknowledgements

The authors are grateful to all staff of the Ifremer stations of the Argenton, and particularly to J.P. Connan and B. Leroy for micro-algae production, La Tremblade, especially to L. Dégremont for producing oysters, and Bouin for providing and conditioning oysters. We acknowledge R. Robert (UMR PE2M, Ifremer Brest, France) for his helpful comments and for his help in editing the English language of the manuscript. This work was supported by a specific financial grant provided by the Ifremer scientific department as part of the program focusing on the reproduction of *C. gigas*.

References

- Baghurst, B., Mitchell, J., 2002. Sex Specific Growth and Condition of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquacult. Res.* 33, 1253-1263.
- Barber, B.J., 1996. Gametogenesis of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), and Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in disease-endemic lower Chesapeake Bay. *J. Shellfish Res.* 15, 285-290.
- 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., B* 125, 359-369.
- Chavez-Villalba, J., Barret, J., Mingant, C., Cochard, J.C., Le Penec, M., 2002a. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: a new approach. *Aquaculture* 210, 171-186.
- Chavez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J.C., Le Penec, M., 2002b. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214, 115-130.
- Chavez-Villalba, J.E., Mingant, C., Cochard, J.C., Le Penec, M., 2001. Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis* 30, 1-12.
- Deslous-Paoli, J.M., Heral, M., Berthome, J.P., Razet, D., Garnier, J., 1981. Natural reproduction of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oleron basin in 1979 and 1981: Biochemical and energetic aspects. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit. Nantes* 45, 319-327.
- Dinamani, P., 1987. Gametogenic patterns in populations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Northland, New Zealand. *Aquaculture* 64, 65-76.

- Ernande, B., Bourdry, P., Clobert, J., Haure, J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.* 17, 342-356.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A., 2004. The oyster *vasa*-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 315, 897-904.
- Grizel, H., Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. CIEM* 47, 399-403.
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K., 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolution* 52, 394-402.
- Heffernan, P.B., Walker, R.L., 1989. Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. *J. Mollusc. Stud.* 55, 135-137.
- Jokela, J., Mutikainen, P., 1995. Phenotypic plasticity and priority rules for energy allocation in a freshwater clam: A field experiment. *Oecologia* 104, 122-132.
- Kang, C.-K., Park, M.S., Lee, P.-Y., Choi, W.-J., Lee, W.-C., 2000. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. *J. Shellfish Res.* 19, 771-778.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Penec, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, 183-199.
- Lannan, J.E., Robinson, A.K., Breese, W.P., 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: II. Broodstock conditioning to maximise larval survival. *Aquaculture* 21, 337-345.
- Le Penec, M., Robert, R., Avendano, M., 1998. The importance of gonadal development on larval productions in pectinids. *J. Shellfish Res.* 17, 97-101.
- Li, K., Osada, M., Mori, K., 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Sci.* 66, 502-508.
- Loosanoff, V.L., Davis, H.C., 1963. Rearing of bivalve molluscs. *Adv. Mar. Biol.* 1, 1-136.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 59, 95-110.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, Masson et Cie, Paris, 1232 pp.
- Maurer, D., Borel, M., 1986. Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis* 15, 125-134.
- Muranaka, M.S., Lannan, J.E., 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas* : Environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 39, 217-228.
- Perdue, J.A., 1982. Gametogenesis and growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Shellfish Res.* 2, 105-106.
- Ren, J.S., Marsden, I.D., Ross, A.H., Schiel, D.R., 2003. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea*

- gigas*) from the Malborough Sounds, New Zeland. New Zeal. J. Mar. Fresh. Res. 37, 171-182.
- Robert, R., Gérard, A., 1999. Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. Aquat. Living Resour. 12, 121-130.
- Robinson, A., 1992. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. Aquaculture 106, 89-97.
- Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., Garcia-Martin, L.O., Sanchez Lopez, J.L., 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 155, 249-262.
- Shaw, B.L., Battle, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Can. J. Zool. 35, 325-347.
- Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D., Gouletquer, P., 1998. Hydrobiology of the Marennes-Oleron Bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. Hydrobiologia 386.
- Steele, S., Mulcahy, M.F., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 70, 673-686.
- Stoeckmann, A.M., Garton, D.W., 2001. Flexible energy allocation in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in response to different environmental conditions. J. N. Am. Benthol. Soc. 20, 486-500.
- Utting, S.D., Millican, P.F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. Aquaculture 155, 47-56.
- Wilson, J., 1981. Hatchery rearing of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*, Ireland, 32 pp.

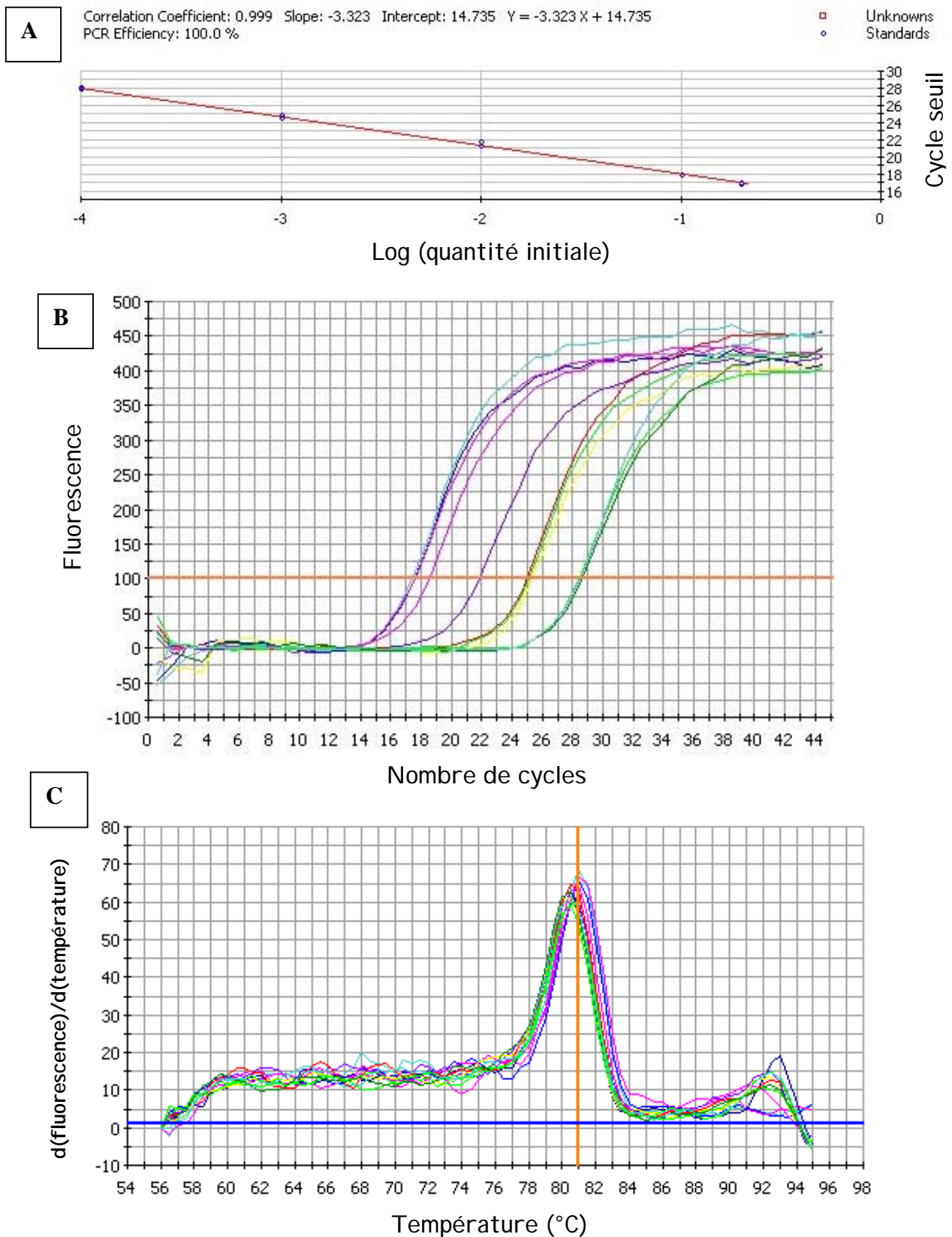


Figure 38 : Analyse des résultats de PCR en temps réel obtenus par amplification du gène *fElong1* pour une gamme de dilution d'un échantillon de gonade d'huître. (A) Droite de régression des cycles seuils (Ct) tracée à partir des cinq points de gamme en triplicat, (B) Courbes d'amplification obtenues avec les mêmes échantillons, (C) Courbes de fusion obtenue avec les mêmes échantillons.

2. Influence des paramètres température / photopériode sur l'expression du gène *Oyvg*

2.1 Introduction

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons mis en évidence que les paramètres couplés température/photopériode influençaient la dynamique de gamétogenèse des huîtres *C. gigas* en milieu contrôlé.

Cette partie a pour objectif de suivre et de quantifier, au niveau moléculaire, le développement des cellules germinales sur les mêmes animaux afin de confirmer l'effet des paramètres température/photopériode observé au niveau cellulaire. Le second objectif est d'estimer la validité du gène *Oyvg* en tant qu'outil de quantification de l'effort de reproduction de *C. gigas*. Pour répondre à ces objectifs, l'expression du gène *Oyvg* a été quantifiée par PCR en temps réel, dans le tissu gonadique des huîtres analysées précédemment en histologie et en analyse d'images. Cinq points d'analyse par conditionnement ont été choisis, d'après l'observation des coupes histologiques, de façon à suivre l'expression du gène *Oyvg* aux différentes étapes de la gamétogenèse (initiation, croissance, maturation, après émission des gamètes). Dix individus ont été analysés dans chaque conditionnement (NC, AC, WC) et pour chaque période, soit 150 individus au total.

2.2 Résultats

Les efficacités de PCR mesurées sont respectivement 100% et 99,6% pour le gène de référence *fElongI* (amorces : qfElongI et qrElongI) (Figure 38) et pour le gène cible *Oyvg* (amorces : VS-S9 et VS-AS9). Les courbes de fusions sont unimodales pour chaque couple d'amorce et aucune amplification des blancs (eau) n'est détectée, indiquant qu'aucun dimère d'amorces ne se forme lors des amplifications. Les températures de fusion (T_m) des amplicons *Oyvg* et *fElongI* sont respectivement de 81,5 °C et de 81 °C. Aucune contamination d'ADN génomique n'a été détectée, les témoins ARNm réalisés pour chaque échantillon ne montrant pas d'amplification.

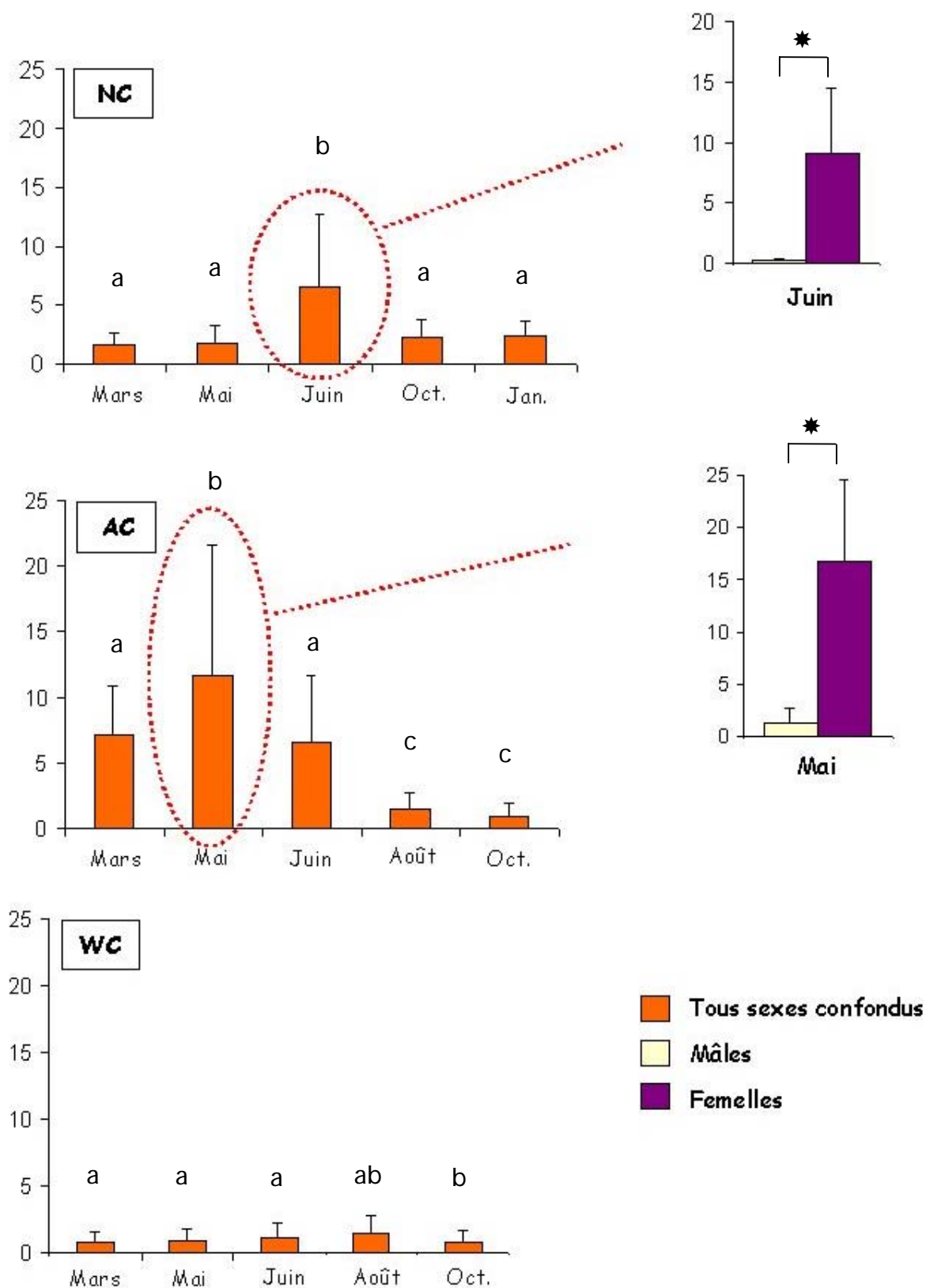


Figure 39 : Quantités relatives de transcrits du gène *Oyvlg*, dans le tissu gonadique des huîtres issues des conditionnements expérimentaux naturel, accéléré et hivernal. Les histogrammes de gauche correspondent aux valeurs tous sexes confondus. Sur les histogrammes de droite, les quantités relatives ont été analysées par sexe lorsqu'elles étaient significativement différentes entre sexes. Les lettres a, b et c correspondent aux groupes homogènes déterminés par des tests-*t* de Student au seuil de significativité de 5%. * indique les différences significatives. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Dans le conditionnement naturel (NC), la quantité relative de transcrits du gène *Oyvlg* apparaît significativement plus importante en juin ($2^{-(\Delta\Delta Ct)} \pm \text{écart-type} = 6,6 \pm 6,1$) que pour les quatre autres périodes analysées ; les valeurs ne variant pas significativement entre mars, mai, octobre et janvier (Figure 39). Dans le conditionnement accéléré (AC), les quantités relatives de transcrits *Oyvlg* mesurées dans le tissu gonadique varient significativement au cours de l'année (Test de Kruskal - Wallis, $P = 0,002$). Les valeurs moyennes mesurées en mars ($7,1 \pm 3,7$), mai ($11,6 \pm 10,0$) et juin ($6,6 \pm 5,0$) sont significativement plus importantes que celles mesurées en août ($1,41 \pm 1,2$) et octobre ($0,9 \pm 0,9$). Dans le conditionnement hivernal (WC), les quantités relatives de transcrits *Oyvlg* sont faibles sur les 5 points d'échantillonnage avec des valeurs moyennes allant de $1,14 \pm 0,9$ à $2,51 \pm 1,4$ (Figure 39). Nous noterons les très fortes valeurs d'écart-types pour l'ensemble des résultats.

Les différences d'expression du gène *Oyvlg* entre mâles et femelles ont été testées pour chacun des points d'échantillonnage dans les trois conditionnements NC, AC et WC. Dans le conditionnement NC, l'expression du gène *Oyvlg* apparaît très forte chez les femelles ($9,09 \pm 5,35$) en juin et presque négligeable chez les mâles ($0,29 \pm 0,04$) ($P = 0,03$) (Figure 39). La quantité relative de transcrits *Oyvlg* est encore plus forte pour les femelles ($16,74 \pm 7,87$) du conditionnement AC en mai, alors qu'elle est très faible chez les mâles ($1,28 \pm 1,44$) ($P = 0,02$) (Figure 39). Dans le conditionnement WC, les quantités relatives de transcrits *Oyvlg* ne présentent pas de différence significative entre mâles et femelles.

Les quantités relatives maximales de transcrits *Oyvlg* mesurées en AC (mai), apparaissent significativement plus élevées que celles mesurées en NC (juin) ($P = 0,02$) et WC (août) ($P = 0,00$).

2.3 Discussion

2.3.1 *Oyvlg*, marqueur quantitatif des cellules germinales en gamétogenèse ?

L'expression du gène *Oyvlg* apparaît faible au début de la gamétogenèse, en mars et elle est maximale en fin de gamétogenèse, dans les huîtres matures, au mois de juin en NC et au mois de mai en AC. Ces résultats sont apparemment en contradiction avec ceux obtenus par hybridation *in situ*, qui montraient une forte expression du gène *Oyvlg* dans les premières cellules germinales, une diminution de l'expression au fur et à mesure de la maturation et

aucun signal dans les gamètes. La différence de résultats, obtenus par ces deux techniques, est due à un biais dans la quantification des transcrits *Oyvlg* par PCR en temps réel. En effet, les prélèvements de tissu gonadique, tissu mixte, contiennent un mélange de cellules germinales et de tissu conjonctif (Figure 40). La gonade de l'huître se développe au sein du tissu conjonctif et les deux types cellulaires sont indissociables lors des dissections. La proportion de cellules de tissu conjonctif dans les prélèvements de tissu gonadique est très importante au début de la gamétogenèse lorsque le nombre de cellules germinales est réduit, puis elle diminue au fur et à mesure du développement de la gonade pour devenir nulle lorsque la gonade est à maturité.

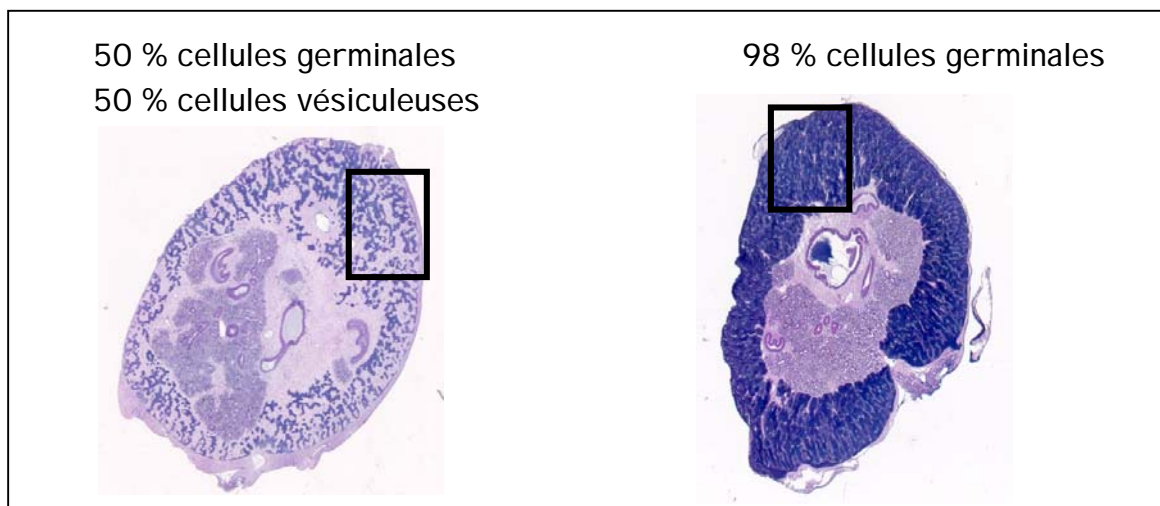


Figure 40 : Coupes histologiques de masse viscérale d'huîtres issues du conditionnement naturel (NC) en avril (croissance gonadique) et en juin (à maturité). Pour chaque zone encadrée (tissu gonadique), les pourcentages de cellules germinales et de cellules vésiculeuses sont indiqués au dessus de la coupe.

En PCR en temps réel, l'expression du gène *Oyvlg* retranscrite par les résultats correspond à une "valeur moyenne" entre l'expression dans les cellules germinales et l'expression nulle dans le tissu conjonctif. Ainsi, l'expression dans les cellules germinales est sous-estimée au début de la gamétogenèse, lorsque la proportion de cellules germinales est faible. Pour éliminer ce biais dans la quantification, il faudrait pondérer la quantité relative de transcrits *Oyvlg* par un facteur représentant la proportion de cellules germinales dans les prélèvements de tissu gonadique.

Dans cette optique, nous avons re-calculé les valeurs d'expression du gène *Oyvlg* en corrigeant les quantités relatives (Qr1), obtenues pour chaque échantillon, par la proportion de la surface gonadique dans la masse viscérale, déterminée par analyse d'images dans la partie précédente. Les quantités relatives de transcrits *Oyvlg* pondérées (Qr2) sont calculées suivant la formule suivante : [$Qr2 = Qr1 \times 100 / \text{Surface gonadique (en \%)}$]. La figure 41 présente les résultats des quantités relatives de transcrits *Oyvlg* pondérées. Le profil d'expression du gène *Oyvlg* observé après pondération, correspond mieux à celui décrit en hybridation *in situ* dans la partie 1 du troisième chapitre. L'expression apparaît maximale en mars dans les trois conditionnements, en période d'initiation du cycle de reproduction. Dans le conditionnement NC, les valeurs de Qr2 apparaissent élevées également en janvier, lors de la ré-initiation d'un nouveau cycle de reproduction. A l'inverse, en période de maturation des huîtres, Qr2 diminue comme cela a été décrit en hybridation *in situ*. La différence d'expression entre les mâles et les femelles au moment de la maturation est toujours observée en NC et AC avec des valeurs beaucoup plus fortes pour les femelles (Figure 41). En WC, la quantité relative de transcrits mesurée reste faible en comparaison de celle mesurée dans les deux autres conditionnements.

Ainsi, les quantités relatives de transcrits *Oyvlg* obtenues après pondération par la surface gonadique semblent apporter une bonne représentation de la quantité de transcrits *Oyvlg* dans les cellules germinales au cours de la gamétogenèse. Cependant, ces résultats ne peuvent pas être validés car la proportionnalité entre la surface gonadique calculée sur une seule coupe histologique par individu et le volume de la gonade n'a pas encore été clairement démontrée. Plusieurs coupes histologiques par individu sont nécessaires pour obtenir cette proportionnalité acceptable (Morvan et Ansell, 1988; Enriquez-Diaz, 2004).

Pour obtenir une valeur précise de la quantité relative de transcrits *Oyvlg* dans les cellules germinales des huîtres, il faudrait utiliser une technique d'isolement cellulaire, tel qu'un gradient de Percoll, pour séparer les cellules germinales des cellules vésiculeuses et faire la quantification sur ces cellules isolées. Dans la suite de cette partie je discuterai donc des résultats obtenus après pondération par la surface gonadique.

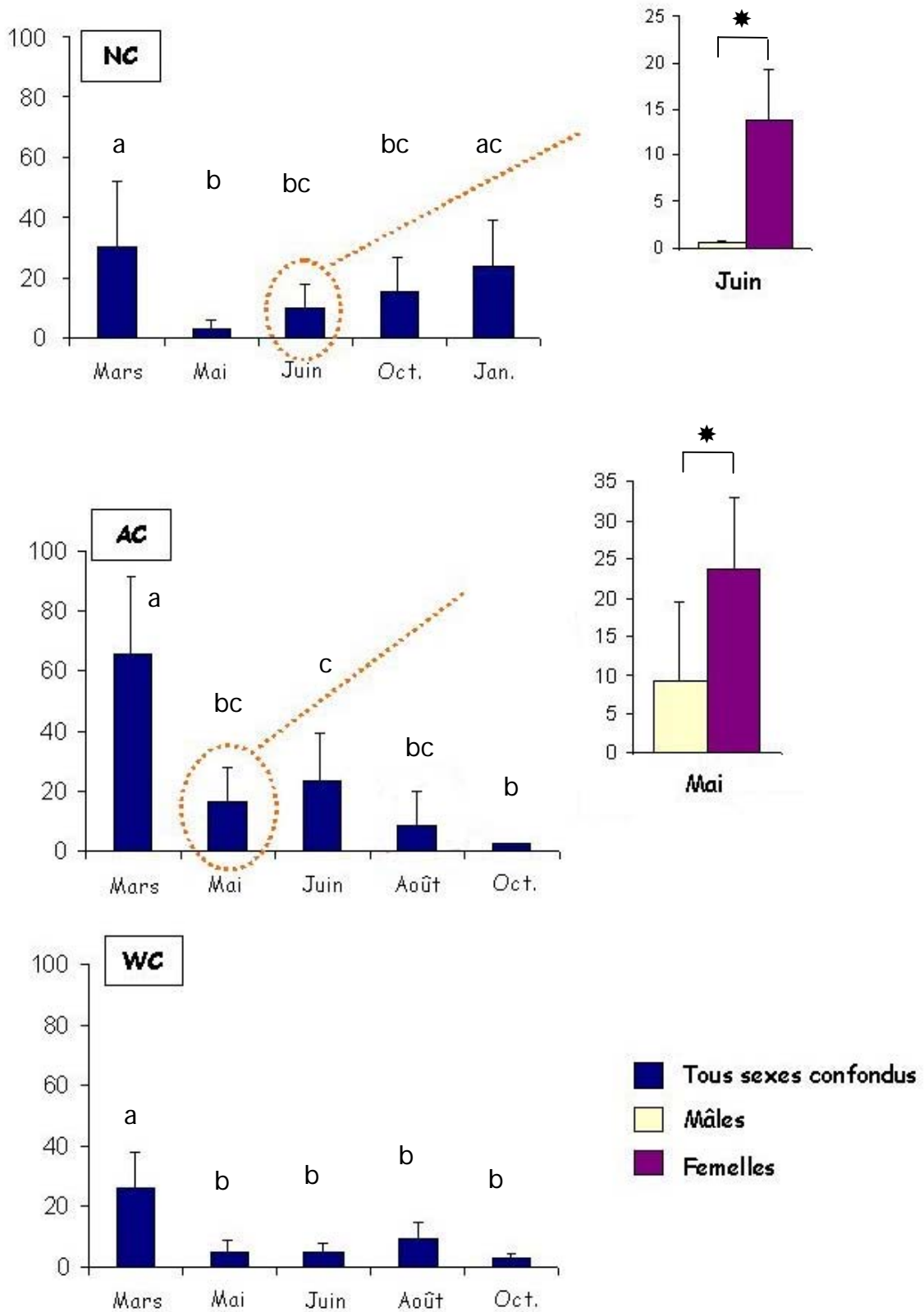


Figure 41 : Quantités relatives de transcrits *Oyvlg*, dans le tissu gonadique des huîtres issues des conditionnements naturel, accéléré et hivernal, pondérées par la valeur individuelle de surface gonadique. Les diagrammes de gauche correspondent aux valeurs tous sexes confondus. Sur les diagrammes de droite, les quantités relatives ont été séparées par sexe lorsqu'elles étaient significativement différentes. Les lettres a, b et c correspondent aux groupes homogènes déterminés par des test-*t* de Student au seuil de significativité de 5%. * indique les différences significatives. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'étude par hybridation *in situ* de l'expression du gène *Oyvlg* dans le tissu gonadique de l'huître au cours d'un cycle de reproduction montre que le gène *Oyvlg* constitue un très bon marqueur "géographique" des cellules germinales de *C. gigas*, en particulier au moment de l'initiation de la gamétogenèse. Dans cette étude, nous avons montré que le gène *Oyvlg* ne constituait pas un bon marqueur pour quantifier le développement des cellules germinales par PCR en temps réel, à cause du biais induit par le mélange de cellules somatiques et de cellules germinales dans les prélèvements, notamment au début du cycle de reproduction, à moins de pouvoir rapporter les résultats à la proportion de cellules germinales dans les échantillons analysés. Ce problème pourrait donc être résolu par un isolement des cellules germinales. Le gène *Oyvlg* pourrait alors être utilisé pour quantifier le développement des cellules germinales. Ce problème n'existe pas pour les huîtres matures car à maturité, le tissu conjonctif a presque totalement disparu et les prélèvements de tissus gonadiques sont alors composés uniquement de cellules germinales. Il serait intéressant de tester si l'expression du gène *Oyvlg* chez les femelles matures est proportionnelle au nombre d'ovocytes. Si tel est le cas, le gène *Oyvlg* constituerait également un excellent marqueur de l'effort de reproduction et il permettrait d'étudier quantitativement l'effet des paramètres environnementaux ou des facteurs internes sur l'effort de reproduction des huîtres

L'expression du gène *Oyvlg* mesurée en mars, au début de la gamétogenèse est importante et elle est identique entre mâles et femelles dans les trois conditionnements. Ces données indiqueraient que le mode de développement (prolifération, cinétique de multiplication...) des cellules germinales au moment de l'initiation de la gamétogenèse est le même pour les mâles et les femelles et que le gène *Oyvlg* aurait un rôle équivalent dans les deux sexes. Le rôle du gène *vasa* dans le développement des cellules germinales au début de la gamétogenèse a été supposé chez plusieurs espèces, notamment chez la drosophile où il est impliqué dans la différenciation et la prolifération de ovogonies (Hay *et al.*, 1990; Styhler *et al.*, 1998). L'expression du gène *Oyvlg*, apparaît également forte en octobre et en janvier, dans le conditionnement NC, au moment de la ré-initiation du cycle de reproduction. Dans le conditionnement AC, une augmentation de la quantité de transcrits *Oyvlg* est également observée pendant la période de ré-initiation des cycles de reproduction (Figure 41). Dans le conditionnement WC, l'expression du gène *Oyvlg* apparaît maximale en mars puis constante au cours de l'année (Figure 41). Cette expression pourrait correspondre à la présence de

jeunes stades de cellules germinales tout au long de l'année. En effet, les analyses histologiques ont mis en évidence la présence de jeunes cellules germinales tout au long de l'année dans le conditionnement WC alors qu'elles disparaissaient rapidement dans les autres conditionnements.

Ainsi, l'expression du gène *Oyvlg* serait maximale avant et pendant la prolifération des gonies. Ces observations pourraient être en relation avec le rôle potentiel du gène *Oyvlg* dans la différenciation des cellules germinales au début du cycle de reproduction. Le gène *Oyvlg* apparaît dans ce cas comme un bon marqueur pour dater l'initiation du cycle de reproduction.

2.3.2 Variabilité individuelle de la cinétique de gamétogenèse et de l'effort de reproduction

Le gène *Oyvlg* apparaît différemment exprimé entre les huîtres mâles et femelles au moment de la maturation gonadique. La quantité relative de transcrits *Oyvlg* augmente fortement dans la gonade des femelles au moment de la vitellogenèse alors qu'elle diminue dans la gonade des mâles à la même époque (Figure 41). Pendant le reste de la gamétogenèse, l'expression est homogène entre mâles et femelles. Ce profil d'expression du gène *vasa* a été observé chez plusieurs espèces, dont la drosophile, une espèce d'ascidie, le tilapia, le xénope et le poulet (Lasko et Ashburner, 1988; Komiya *et al.*, 1994; Fujimura et Takamura, 2000; Kobayashi *et al.*, 2000; Tsunekawa *et al.*, 2000). Des études ont mis en évidence que dans les ovocytes en vitellogenèse de la drosophile, les produits du gène *vasa* étaient nécessaires à l'assemblage des granules polaires, qui sont transmis à l'embryon lors de la fécondation et sont essentiels à la spécification de la lignée germinale (Hay *et al.*, 1988). Chez *C. gigas*, l'augmentation de la quantité relative de transcrits *Oyvlg* au moment de la vitellogenèse, correspondrait à la synthèse d'ARNm et de protéines qui vont être stockés dans le cytoplasme des ovocytes et transmis à l'embryon pour assurer son développement précoce et plus particulièrement la mise en place des cellules germinales, comme cela a été observé au cours du développement embryonnaire (troisième chapitre, partie 2). Par hybridation *in situ*, des transcrits *Oyvlg* avaient été détectés dans le cytoplasme des ovocytes résiduels après une ponte partielle, mais pas durant la vitellogenèse (troisième chapitre, partie 1). Il est possible que la sensibilité de la technique d'hybridation *in situ* ne soit pas suffisante pour détecter cette expression ou que les sondes marquées utilisées ne pénètrent pas bien dans les ovocytes en vitellogenèse.

Cette différence de quantité de transcrits *Oyvlg* chez les mâles et les femelles en fin de gamétogenèse explique en partie les fortes valeurs d'écart-types associées aux quantités relatives de transcrits *Oyvlg* obtenues dans cette étude. En effet, lorsque les calculs sont faits par sexe, les valeurs d'écart-types sont réduites. Cependant, cela n'explique pas les écart-types observés aux autres stades de gamétogenèse ni la totalité de ceux calculés au cours de la maturation. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, une grande part de la variance observée pourrait être due à la variabilité individuelle des huîtres issues d'un même conditionnement, soit au niveau de la cinétique de gamétogenèse, soit au niveau de la quantité de cellules germinales produites, certaines huîtres formant plus de gamètes que d'autres (Chavez Villalba, 2001). Les écart-types élevés observés pour les valeurs moyennes de surfaces gonadiques et pour la biomasse de masse viscérale, proportionnelle pour une large part à la croissance gonadique (Enriquez-Diaz, 2004) semblent renforcer cette idée. Cette variabilité individuelle de cinétique de gamétogenèse ou de production de gamètes provient vraisemblablement de la forte plasticité physiologique des huîtres face à leur environnement mais surtout de la variabilité génétique des stratégies de reproduction chez cette espèce. En effet, les huîtres mises en conditionnement pour cette étude proviennent d'un croisement multiparental de 30 géniteurs. Ces mêmes géniteurs ont été utilisés pour produire 24 familles bi-parentales (Dégremont, 2003) qui ont été suivies pendant un an sur le site de Fort Espagnol (Auray). Or, une forte variabilité dans la stratégie de reproduction a été observée entre les différentes familles (Enriquez-Diaz, 2004), ce qui expliquerait que nos huîtres issues des mêmes géniteurs aient des profils de gamétogenèse hétérogènes.

2.3.3 Effet des facteurs environnementaux sur l'expression du gène *Oyvlg*

Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence que l'intensité d'expression du gène *Oyvlg* varie en fonction des conditionnements dans lesquels les huîtres ont été élevées, *i.e.* des conditions de température et de photopériode. L'expression du gène *Oyvlg* apparaît stimulée dans le conditionnement accéléré avec des facteurs température/photopériode accélérés. A l'inverse, dans le conditionnement hivernal, l'expression du gène *Oyvlg* apparaît réduite, notamment au cours de la vitellogenèse des ovocytes. Les facteurs température/photopériode pourraient donc avoir une influence, directe ou par l'intermédiaire de relais internes, sur l'expression du gène *Oyvlg*, lui-même étant probablement impliqué dans la formation et la différenciation des cellules germinales. Aucune

donnée n'est disponible sur l'influence des facteurs extérieurs sur l'expression de *vasa* chez les autres espèces où il a été caractérisé.

Dans le conditionnement WC, aucune augmentation de la quantité relative de transcrits *Oyvlg* n'est observé au cours de la vitellogenèse chez les femelles, contrairement aux observations faites dans les conditionnements NC et AC. Ceci pourrait être dû à une vitellogenèse inachevée des ovocytes en conditions hivernales, qui n'auraient alors pas accumulé les ARNm et les protéines normalement présents dans les ovocytes matures ou bien à une absence de transcription du gène *Oyvlg* dans les ovocytes en vitellogenèse. Si le gène *Oyvlg* n'est pas ou peu exprimé dans les ovocytes à la fin de la vitellogenèse, les transcrits *Oyvlg* ne seront pas ou peu transmis à l'embryon. Or nous avons montré dans la partie 2 du troisième chapitre que la mise en place des cellules de la lignée germinale de *C. gigas* au cours du développement embryonnaire dépendait probablement des transcrits maternels. De plus, il a été montré que des drosophiles homozygotes mutantes pour un allèle hypomorphique *vasa*^{PD} (*vasa* très faiblement exprimé) ne synthétisaient pas ou peu les granules polaires contenant les déterminants de la lignée germinale, donnant ainsi naissance à des descendants stériles (Hay *et al.*, 1990). Ainsi, il serait très intéressant d'étudier la fécondité des ovocytes d'huîtres issues du conditionnement hivernal ainsi que la fertilité des descendants de ces huîtres afin de déterminer si ce type de conditionnement produit des huîtres stériles ou dont la fertilité est réduite ou bien si l'absence de transcrits *Oyvlg* dans les ovocytes n'a pas de conséquence sur la détermination de la lignée germinale de la descendance.

Cinquième chapitre :
Discussion générale, Conclusion
et perspectives

1. Discussion générale

1.1 Le gène *Oyvlg*, hélicase de l'ARN et "RNA binding-protein"

Au cours de notre étude, nous avons caractérisée le gène *Oyvlg* (**oyster vasa-like gene**). Les comparaisons de séquences et les analyses phylogénétiques ont révélé que ce gène appartient à la famille des DEAD-box protéines. Parmi les différents groupes de cette famille (eIF-4A, PL10, AN3, p68, Prp, *Vasa*...) (Schmid et Linder, 1992), le gène *Oyvlg* se classe dans le groupe des gènes *vasa* avec lesquels il présente les plus forts taux d'identité. Nos analyses mettent en évidence une forte conservation de la structure et de l'expression de ce gène avec les autres orthologues de *vasa*, isolés dans de nombreux phylums aussi divers que les éponges et les mammifères.

La séquence de la protéine **OYVLG** (déduite de la séquence nucléotidique) possède les domaines correspondant à une **double fonction biochimique**, d'une part **d'hélicase** et d'autre part **de liaison "binding-protein"** vis à vis de **l'ARN**. Ces propriétés lui sont conférées respectivement par les motifs protéiques SAT et HRIGR et par la répétition du motif arginine-glycine-glycine dans la région N-terminale (Linder *et al.*, 1989; Ghisolfi *et al.*, 1992). De part ces deux fonctions, OYVLG pourrait intervenir dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes. En effet, toutes les protéines DEAD-box sont des hélicases de l'ARN dont l'activité est dépendante de l'hydrolyse de l'ATP et les protéines VASA ont, par ailleurs, une fonction de liaison à l'ARN. L'ensemble de ces deux propriétés confère aux protéines VASA une fonction dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes en activant ou en réprimant leur traduction.

Le gène *Oyvlg* constitue le **premier marqueur spécifique des cellules germinales caractérisé chez un mollusque**. En effet, les analyses d'hybridation (*in situ* et *in toto*) et de PCR ont mis en évidence une expression spécifique du gène *Oyvlg* dans les cellules de la lignée germinale de *C. gigas* (cellules germinales et cellules dérivées des cellules germinales souches).

Du point de vue de leur fonction biologique, les **ARNm** du gène *Oyvlg* pourraient être des **déterminants de la lignée germinale** chez *C. gigas*. Cette hypothèse est basée sur nos résultats d'expression qui démontent que leur localisation est spécifique dans les cellules

germinales pendant tout le développement, que leur transmission est maternelle et qu'ils ségrègent dans le cytoplasme des embryons à l'endroit où seront formées les PGCs potentielles. Ceci est en adéquation avec les données disponibles chez d'autres espèces et avec la forte conservation des processus de formation des cellules germinales entre les différents embranchements. Un profil d'expression, équivalent à celui que nous avons établi pour l'huître, a été décrit chez le zebrafish où le rôle des ARNm de *vasa* comme déterminants de la lignée germinale a été récemment démontré (Hashimoto *et al.*, 2004).

En considérant le rôle des hélicases et des "binding-proteines" de l'ARN dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes et l'implication probable du gène *Oyvlg* dans la mise en place de la lignée germinale, nous pouvons supposer que le gène *Oyvlg* intervient dans la régulation de la traduction de gènes impliqués dans la différenciation des cellules germinales au stade embryonnaire et dans la gamétogenèse au stade adulte chez *C. gigas*. Cela a été démontré chez la drosophile où une cascade de gènes intervient dans la formation du cytoplasme polaire de l'embryon, indispensable à la différenciation de la lignée germinale (Liang *et al.*, 1994; Rongo et Lehmann, 1996). VASA intervient dans cette chaîne de réaction en levant l'inhibition de la traduction du gène *Nanos*, réprimé par l'action du TCE (élément de contrôle de la traduction), et indispensable à sa localisation dans le cytoplasme polaire (Gavis *et al.*, 1996a; Gavis *et al.*, 1996b). Au stade adulte VASA intervient dans la différenciation et la prolifération des gonies, notamment en permettant la localisation et la traduction du gène *Gurken* dans les ovocytes (Styhler *et al.*, 1998). Toutefois, le rôle strict du gène *Oyvlg* dans la différenciation de la lignée germinale de *C. gigas* reste à démontrer.

1.2 Origine et développement de la lignée germinale de *C. gigas*

Ontogenèse de la lignée germinale de Crassostrea gigas

L'ensemble des expérimentations menées au cours de cette thèse nous a permis de mettre en évidence l'origine et les processus de formation des cellules de la lignée germinale de l'huître *C. gigas*, ignorés jusqu'à présent (Lubet, 1976; Lango-Reynoso, 1999). Nous avons montré que **les cellules de la lignée germinale de *C. gigas* se différencient** des cellules somatiques dès le **développement embryonnaire** (Figure 42).

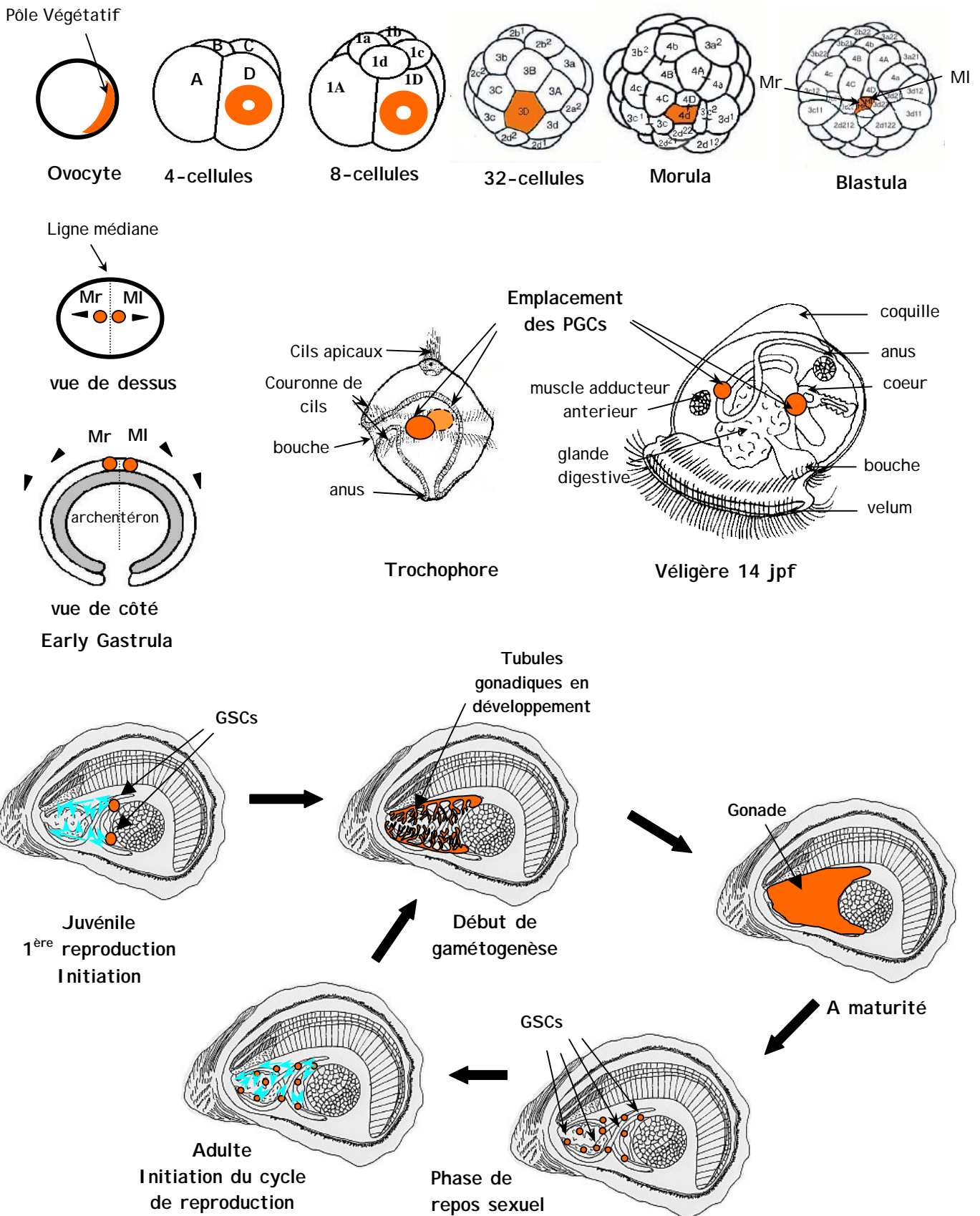


Figure 42 : Développement des cellules germinales de *Crassostrea gigas* du stade embryonnaire au stade adulte. Les zones oranges représentent la localisation des déterminants supposés de la lignée germinale au stade embryonnaire, les PGCs (cellules germinales primordiales) à partir de la trochophore, les GSCs (cellules germinales souches) et les cellules germinales formant la gonade au stade juvénile et adulte. Les points de flèches noires représentent le sens de migration des cellules et les flèches bleues indiquent la prolifération des GSCs.

Leur formation implique des déterminants cytoplasmiques maternels (dont les ARNm du gène *Oyvlg*) regroupés en granules denses au pôle végétatif de l'ovocyte avant la fécondation puis ségrégeant dans une région cytoplasmique spécifique de l'embryon qui correspondrait à un cytoplasme germinal. L'existence d'un cytoplasme germinal avait été postulée chez les mollusques *Crepidula* et *Buccinum* à partir d'observations ultrastructurales de granules denses et de nombreuses mitochondries dans cette région cytoplasmique des oeufs (Dohmen et Verdonk, 1979) mais de telles observations n'avaient jamais été faites chez les huîtres. Ce cytoplasme germinal ségrégerait spécifiquement dans un unique blastomère pendant la segmentation de l'embryon jusqu'au mésentoblaste 4d au sixième clivage (Figure 42). Nous avons pu déterminer l'identité de ces blastomères grâce à la précision de la segmentation spiralée de l'embryon et par une analyse comparée avec les "cartes" de développement établies chez *Patella* et *Sphaerium* (Woods, 1931; Verdonk et Van den Biggelaar, 1983). Ainsi, **les cellules germinales de l'huître auraient une origine mésodermique**. Plusieurs auteurs suggèrent que le mésentoblaste pourrait également contribuer à la formation des muscles rétracteurs chez les larves, et du rein et du cœur au stade adulte chez différentes espèces de mollusques (Verdonk et Van den Biggelaar, 1983). Entre la gastrulation et le stade véligère, les cellules Ml et Mr, issues de la division du mésentoblaste, vont se diviser pour former les PGCs. Au stade véligère à umbo (7 jours post-fécondation), deux groupes de cellules germinales primordiales (PGCs) sont situés de part et d'autre de la glande digestive en formation. La localisation des PGCs dans la larve véligère est apparue différente de celle observée au stade trochophore. Ceci pourrait résulter d'une migration passive des cellules provoquée par la réorganisation qui s'opère dans la larve véligère lors de l'organogenèse. Les deux groupes de PGCs conservent leur localisation jusqu'à la métamorphose, avec toutefois une prédominance du groupe de cellules situé dans la partie postérieure de la larve, près du cœur. Ces PGCs que nous avons décrites chez *C. gigas* semblent correspondre aux "initiales germinales" observées chez *Sphaerium* dès le stade gastrula (Woods, 1931) et au stade post-larve chez *Mytilus* (Lubet, 1959). A la métamorphose, les post-larves subissent une réorganisation de la plupart des organes larvaires pour former l'huître juvénile avec ses organes définitifs (Prieur, 1971). Les PGCs se situeraient alors dans la région péricardique. L'existence de cellules germinales primordiales, supposée au début du XX^{ème} siècle chez quelques espèces de bivalves dont *Cyclas cornea* (Meisenheimer, 1901), *Sphaerium japonicum* (Okada, 1936; 1939), *Lasaea rubra* (Oldfield, 1964) sur des bases morphologiques puis passée sous silence durant plusieurs dizaines d'années, est ici confirmée chez *C. gigas* grâce à l'apport de données moléculaires.

Organogenèse de la gonade de C. gigas au stade juvénile et adulte

Le premier développement gonadique des huîtres s'effectue au cours de leur première année de vie. Tardy (1970) rapporte que chez tous les mollusques, la gonade est formée chez le juvénile à partir de la croissance d'un bourgeon mésodermique. Prieur (1971) précise que la gonade est le dernier organe à apparaître lors de l'organogenèse chez le juvénile, après le rein et le péricarde et que les initiales germinales seraient situées à l'arrière du corps, sur le bord ventral du péricarde. Cette description des bourgeons mésodermiques est en concordance avec l'origine mésodermique des PGCs que nous avons établie dans cette étude et avec leur localisation dans la région péricardique. Ainsi, au stade juvénile de *C. gigas*, le ou les deux groupe(s) de PGCs serai(en)t localisé(s) dans la zone péricardique et se différencierai(en)t en cellules germinales souches (GSCs) avant le premier cycle de reproduction (Figure 42). Les GSCs, décrites comme des cellules capables d'auto-renouvellement (Lin, 1997), serviraient ensuite de source de cellules germinales mâles et femelles durant toute la vie de l'huître. Les GSCs de l'huître seraient de type "stéréotypique" comme chez la drosophile (Lin, 1997). Les GSCs de ce type se divisent asymétriquement pour donner une cellule souche fille et une gonie alors que dans le type "populationnel", les GSCs sont des gonies qui gardent une capacité mitotique. Chez *C. gigas*, nous observons en histologie deux profils cytologiques différents indiquant bien la présence de deux types cellulaires. Les GSCs sont des cellules plus petites que les gonies et leur aspect cytologique est différent : les gonies ont une zone périnucléaire très dense alors que l'aspect granuleux des GSCs est plus homogène (Figure 43).

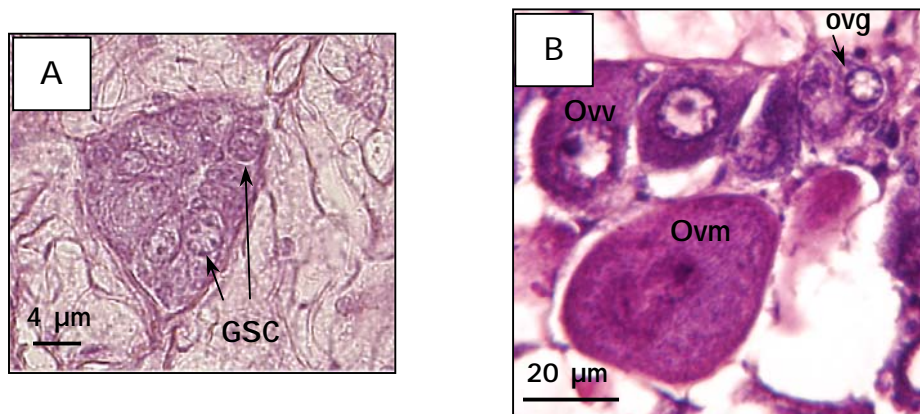


Figure 43 : (A) Cellules germinales souches dans un îlot gonadique en développement, (B) Différents stades de développement de l'ovocyte. GSC : cellule germinale souche, Ovg : ovogonie, Ovv : ovocyte en vitellogenèse, Ovm : ovocyte mature. Traitement en histologie classique. Coloration hématoxyline-éosine.

Au début de la première saison de reproduction de l'huître, les GSCs se multiplieraient activement de part et d'autre du corps et donneraient naissance aux tubules gonadiques. Les descriptions histologiques indiquent que les tubules se ramifient puis s'étendent autour de la glande digestive, depuis la zone péricardique vers la partie antérieure de l'animal et forment la gonade (Lubet, 1976) (Figure 42). Nous avons observé que les GSCs se différencient en gonies qui se multiplient à leur tour et entrent en méiose pour former des gamètes (spermatozoïdes ou ovocytes). Les tubules gonadiques s'agrandissent sous l'effet de l'augmentation du nombre de cellules et de leur croissance et s'organisent en acini ouverts en leur centre pour permettre l'évacuation des gamètes (Prieur, 1971). Les deux systèmes de tubules finissent par fusionner en une seule masse autour de la glande digestive et forment la gonade. Tous les tubules débouchent dans le gonoducte ou canal évacuateur. Les données bibliographiques précisent que lors de la première reproduction, la ponte est généralement partielle et que les gamètes résiduels sont résorbés par phagocytose (Lubet *et al.*, 1976).

Le devenir de la lignée germinale pendant la phase de repos sexuel n'avait jamais été déterminé jusqu'à aujourd'hui. Nous avons démontré que pendant la phase de **repos sexuel, la lignée germinale se maintient sous la forme d'un petit nombre de GSCs** localisées au niveau de l'épithélium des quelques tubules persistants dans le tissu conjonctif et qui apparaissent, en coupe transversale, comme de petits îlots de quelques cellules, dispersés dans le tissu conjonctif.

Au début du second cycle de reproduction, comme pour tous les cycles suivants, les GSCs entrent de nouveau en prolifération et reconstituent les tubules gonadiques à partir des tubules restants, et pas uniquement à partir de la zone péricardique comme lors de la première reproduction (Figure 42). Ainsi, la dynamique de formation de la gonade des huîtres serait différente entre la première reproduction et les suivantes.

Dynamique de la gamétogenèse

La dynamique de reproduction des huîtres, conditionnées sur une année entière en écloserie et soumises à des conditions de température et de photopériode mimant celles du bassin de Marennes-Oléron, a été analysée par histologie classique et semi-quantitative. La mise en évidence des GSCs chez *C. gigas*, nous permet de dater précisément le début d'un cycle de reproduction dès l'initiation de leur prolifération. Auparavant, la majorité des études sur le cycle de reproduction de l'huître confondaient début du cycle de reproduction et début de la gamétogenèse (prolifération des gonies). Dans notre étude, la prolifération des GSCs

commence, de façon très variable entre les individus, 2 à 6 mois après l'émission des gamètes du cycle de reproduction précédent. La période automnale, souvent considérée comme une phase de repos sexuel, apparaît être, en fait, une phase essentielle du cycle de reproduction car elle permet de reconstituer le stock de cellules germinales. La différenciation des GSCs en gonies, marquant le début de la gamétogenèse, a été observée à la fin de l'automne ou au début de l'hiver. La multiplication des gonies s'est effectuée sur une période relativement restreinte de 3 mois environ. Les GSCs semblent avoir une bi-potentialité sexuelle, elles peuvent se différencier en spermatogonies ou en ovogonies. Cette étape est assez synchronisée pour l'ensemble des huîtres contrairement à la prolifération des GSCs. L'une des questions posées au début de cette étude concernait la dynamique de multiplication des premières cellules germinales : était-elle continue sur l'année ou limitée au début du cycle de reproduction ? Nous avons mis en évidence au cours de cette étude que la **prolifération des cellules germinales** est **limitée** à une période plus ou moins longue **au début du cycle de reproduction**, dans des conditions normales, et que le groupe de gonies formé constitue le stock de cellules germinales pour le cycle de reproduction qui débute.

Une accélération de l'activité des cellules germinales est observée au printemps. Les gonies se différencient en cytes (spermatocytes ou ovocytes) puis réalisent leur croissance et leur maturation sur une période d'environ 4 mois dans les conditions naturelles de Marennes-Oléron reproduites ici en éclosérie.

Après la ponte, les gamètes résiduels (non émis) sont résorbés. Dans la gonade femelle, le phénomène de lyse cellulaire des ovocytes par des macrophages est apparu bien visible en histologie (Figure 44).

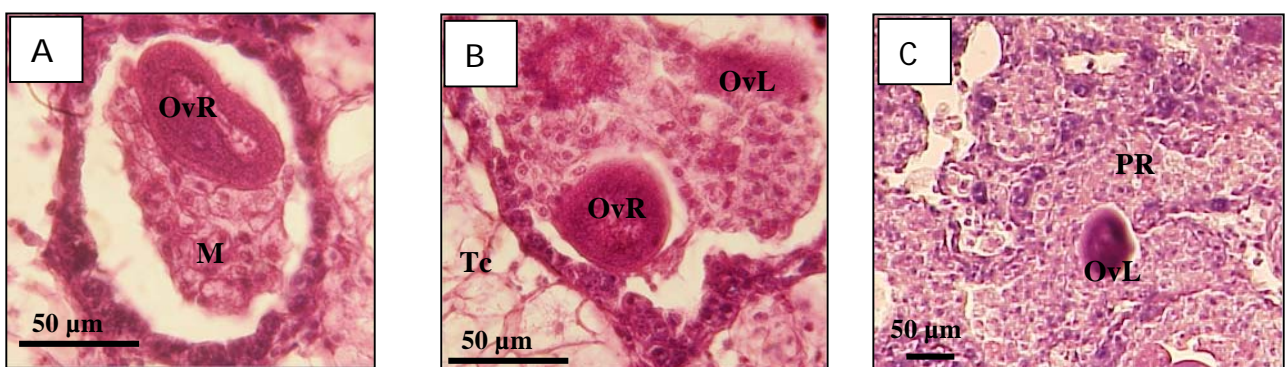


Figure 44 : Les différentes étapes de la résorption d'un ovocyte résiduel après une ponte partielle. (A) début de résorption (B) lyse cellulaire active (C) fin de résorption. OvR : ovocyte résiduel, OvL : Ovocyte en cours de lyse cellulaire, M : macrophage, Tc : tissu conjonctif, PR : produit de résorption. Traitement en histologie classique. Coloration hématoxyline-éosine.

A l'inverse, aucune image de lyse cellulaire n'a pu être observée dans la gonade mâle alors que le nombre de spermatozoïdes résiduels semblait diminuer avec le temps. La résorption des gamètes mâles n'est pas évoquée dans la littérature, seule la lyse des ovocytes y est abordée (Lango-Reynoso, 1999; Steele et Mulcahy, 1999). Les spermatozoïdes pourraient être résorbés par un processus différent de la lyse cellulaire qui reste à déterminer.

La ré-initiation d'un nouveau cycle de reproduction a été observée à l'automne avec la reprise de la prolifération des GSCs. Nous observons une variabilité individuelle importante dans la date de reprise du cycle de reproduction. Il apparaît que la prolifération des GSCs, dans le conditionnement naturel, ne débute qu'après que tous les gamètes résiduels aient été résorbés. Ainsi, plus le nombre de gamètes résiduels est important, plus la reprise du cycle de reproduction est tardive. Lango-Reynoso (1999) a fait des observations similaires en comparant des huîtres de Marennes-Oléron qui émettent tous leurs gamètes et réinitient leur cycle de reproduction plus tôt que les huîtres de l'Anse du Roz qui n'ont pondu que partiellement et doivent résorber les gamètes résiduels.

Cette étude de la dynamique de reproduction met en évidence que la période réelle d'inactivité sexuelle de *C. gigas* est très réduite. L'huître consacre la grande majorité de son cycle de vie à sa reproduction.

En se basant sur nos résultats d'histologie et d'hybridation *in situ* et sur la description des tubules gonadiques de *C. gigas* faite par Lubet (1976), nous pouvons décrire l'organisation fonctionnelle des tubules gonadiques de *C. gigas* suivant trois zones: (1) une zone de prolifération, dans la partie proximale des tubules où les GSCs continuent leur multiplication, (2) une zone intermédiaire où les GSCs se différencient en gonies, et où se déroule la gamétogenèse et (3) la zone d'évacuation où se trouvent les gamètes matures. Dans la zone d'évacuation, proche du gonoducte (canal évacuateur), la paroi des tubules est constituée d'un côté par un épithélium plat et de l'autre par des cellules ciliées qui facilitent l'évacuation des gamètes (Lubet *et al.*, 1976).

Une coupe transversale de tubule gonadique dans la zone intermédiaire met en évidence des cohortes de cellules germinales à différents stades de développement. Elles sont créées par la différenciation asynchrone de la population de GSCs qui se répercute sur toutes les étapes suivantes de la gamétogenèse. Ainsi, lorsque la gonade arrive à maturité, une petite proportion de jeunes cellules persiste dans les tubules gonadiques. Cette stratification de la gonade est surtout visible chez les mâles où tous les stades de développement, des spermatogonies aux spermatozoïdes, sont présents simultanément. La quantification des

stades de cellules germinales mâles par cytométrie montrent qu'environ 20% des cellules germinales totales dans les huîtres mâles matures sont des spermatogonies ou des spermatocytes.

Les types cellulaires dérivés des cellules germinales souches

Les tubules gonadiques de l'huître ne contiennent que trois ou quatre types cellulaires, les cellules souches, les cellules germinales, les cellules auxiliaires chez les femelles, et les cellules épithéliales, ciliées et lisses.

Nous avons mis en évidence l'origine cellulaire commune des gonies et des cellules auxiliaires chez les femelles de *C. gigas*, formées par la différenciation des cellules souches. Chez les bivalves, deux types cellulaires peuvent avoir un rôle dans la nutrition de l'ovocyte au cours de la vitellogenèse, les cellules vésiculeuses du tissu conjonctif qui apportent essentiellement du glycogène (Mathieu et Lubet, 1993; Berthelin *et al.*, 2000b) et les cellules auxiliaires, qui pourraient fournir des protéines, des lipides et d'autres substances à l'ovocyte (Dorange et Le Pennec, 1989; Matsumoto *et al.*, 2003). Au début de la maturation, une grande quantité d'ARNm du gène *Oyvlg*, a été détectée dans les cellules auxiliaires par hybridation *in situ* alors qu'aucun transcrite n'est détecté dans les ovocytes au même stade. Par contre, la quantité de transcrits *Oyvlg* mesurée par PCR en temps réel dans les ovocytes en fin de vitellogenèse est très importante. Le même profil est observé chez la drosophile où la protéine VASA est accumulée dans les cellules nourricières au début de l'ovogenèse puis transmise à l'ovocyte pendant la vitellogenèse par des ponts cytoplasmiques. VASA intervient ensuite dans la formation des granules polaires contenant les déterminants de la lignée germinale qui seront transmis à la descendance (Hay *et al.*, 1988). Ainsi chez *C. gigas*, les **cellules auxiliaires des ovocytes** pourraient **transmettre à l'ovocyte des ARNm et des protéines**, en plus des lipides et des glucides, pour **soutenir le développement embryonnaire précoce** de l'embryon avant l'initiation de la transcription zygotique des gènes.

Nous venons de discuter de l'origine des trois premières catégories de cellules rencontrées dans les tubules gonadiques. L'origine de la dernière catégorie de cellules, les cellules épithéliales est inconnue. Tardy (1970) mentionne que chez les bivalves, toutes les structures de l'appareil génital proviennent du bourgeon mésodermique, à savoir du groupe de GSCs décrit dans cette étude. Lubet (1976) remarque que lors de la restauration de la gonade de la coque *Cerastoderma edule*, de la moule *Mytilus edulis* et de l'huître *Crassostrea gigas*, tout se passe comme si les gonies se différenciaient à partir des cellules épithéliales ciliées des

tubules. Il observe un stade cytologique intermédiaire entre les cellules épithéliales ciliées et les gonies, qui ressemble aux cellules souches et qui donnerait naissance aux gonies (Lubet *et al.*, 1976). L'origine épithéliale des gonies est exclue par notre étude, cependant le stade intermédiaire décrit par Lubet serait en réalité les GSCs et nous pouvons émettre l'hypothèse que les GSCs donnent également naissance aux cellules épithéliales. Toutefois, l'origine de ces cellules n'a pas pu être confirmée au cours de cette étude.

1.3 Régulation du développement de la lignée germinale

De nombreuses études démontrent que les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans la régulation de la reproduction chez les invertébrés marins, notamment la température, la photopériode et la nourriture (Pearse, 1999). Ainsi en milieu tempéré, les rythmes de reproduction des animaux sont souvent synchronisés suivant les variations des paramètres environnementaux (Bayne *et al.*, 1975).

La réponse des huîtres, en terme de physiologie de la reproduction, aux modifications de rythme des paramètres environnementaux couplés température/photopériode, appliqués dans nos conditions contrôlées, est une **synchronisation** presque parfaite de la **dynamique du cycle de reproduction** avec celle des cycles de **température/photopériode**. Ce résultat démontre l'influence majeure des paramètres température/photopériode dans le contrôle de la reproduction de *C. gigas* et met en évidence la très forte plasticité physiologique de *C. gigas* en terme de reproduction.

L'analyse détaillée des résultats obtenus au cours de nos expérimentations nous permet d'établir une corrélation directe entre les différentes étapes du cycle de reproduction de *C. gigas* et les cycles de température ou de photopériode.

Rappelons que l'initiation du cycle de reproduction correspond au début de la prolifération des GSCs et que la gamétogenèse débute avec la formation et la multiplication des gonies.

Régulation de l'initiation du cycle de reproduction

Dans notre étude, que ce soit dans le conditionnement naturel ou accéléré, le début de la prolifération des GSCs coïncide toujours avec des photopériodes décroissantes, inférieures ou égales à 12 heures. Par contre, l'intervalle de température correspondant à cet événement

n'est pas strict et oscille entre 10 °C et 17 °C. L'apparition des GSCs correspond avec la fin de la résorption des gamètes résiduels dans le conditionnement naturel mais pas en conditions accélérées où des GSCs ont été observées avant la fin de la résorption (Figure 37). L'effet de la photopériode sur la reproduction a été démontré chez plusieurs invertébrés marins, comme chez l'oursin *Eucidaris tribuloides*, où les jours courts sont indispensables pour l'initiation du développement gamétique (Clintock et Watts, 1990). Cependant, chez *C. gigas*, aucun effet significatif de la photopériode n'a pu être mis en évidence dans la régulation de la gamétogenèse (Chavez-Villalba *et al.*, 2001) et la température est considérée comme le facteur majeur de régulation (Ruiz *et al.*, 1992; Chavez-Villalba *et al.*, 2002b; Ren *et al.*, 2003). Cependant, les études n'ont jamais abordé la régulation des GSCs qui étaient jusqu'alors très peu connues chez les mollusques et dans notre étude, la diminution de la **photopériode** semblerait être le facteur le **mieux corrélé** à la reprise de la **prolifération des GSCs** chez *C. gigas*. Chez des espèces où elles sont mieux connues, comme chez la souris, la régulation de l'entrée en division, du nombre de divisions et du maintien des GSCs ferait intervenir des signaux extra-cellulaires comme des hormones hypothalamo-hypophysaires ainsi que des interactions locales entre les GSCs et les cellules voisines (Lin, 1997). Cependant, aucune étude n'a été publiée sur la régulation de ces mécanismes par les paramètres environnementaux.

Régulation de la gamétogenèse

Parmi les deux facteurs environnementaux testés au cours de cette étude, la température apparaît être celui qui régule majoritairement les étapes de mitoses goniales, maturation et émission des gamètes.

Nous avons mis en évidence que la formation des gonies (par différenciation des GSCs) et les **mitoses goniales** sont stimulées dans un intervalle restreint de températures, entre **8 °C et 11 °C** (Figure 45). A l'inverse, aucune correspondance n'est établie avec la photopériode, car les mitoses goniales ont été observées aussi bien en photopériode croissante que décroissante. Ces données correspondent aux observations faites en milieu naturel sur la corrélation entre des températures basses et la ré-initiation de la gamétogenèse de *C. gigas* (Muranaka et Lannan, 1984; Ruiz *et al.*, 1992; Gouilletquer, 1997; Lango-Reynoso, 1999; Steele et Mulcahy, 1999).

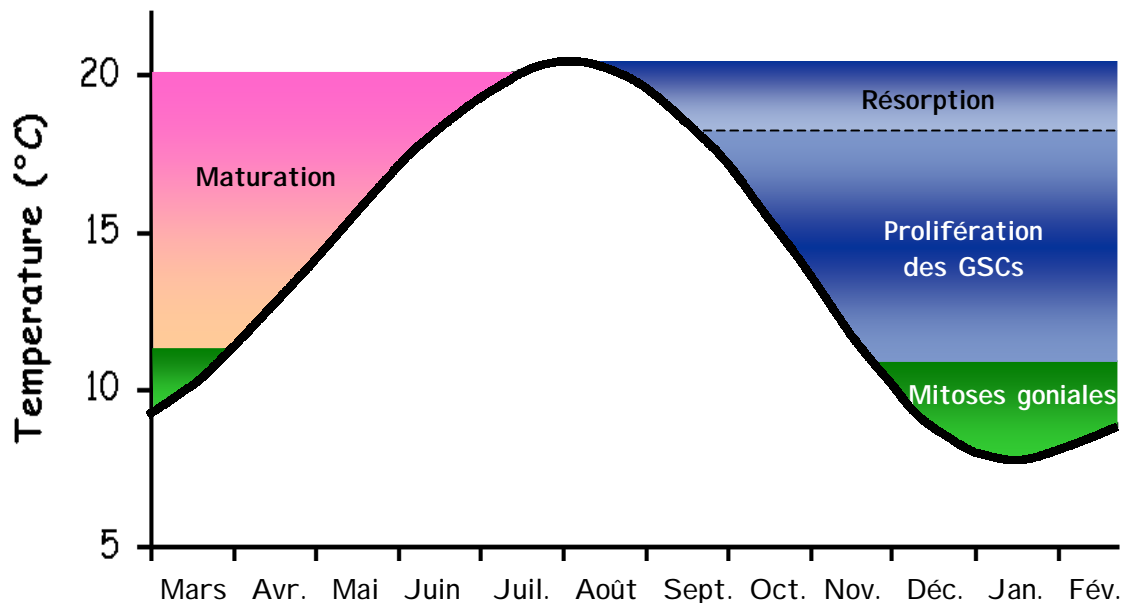


Figure 45 : Corrélation entre le cycle de température de l'eau (cycle annuel moyen de Marennes-Oléron) et les stades de gamétogenèse de *Crassostrea gigas* dans le conditionnement naturel (NC).

Il était séduisant de penser qu'une augmentation de température commandait l'entrée des gonies en méiose. Or, les huîtres du conditionnement hivernal permanent sont entrées en maturation à des températures basses, entre 8 °C et 10 °C. Ainsi, l'entrée des gonies en méiose ne serait pas contrôlée par l'augmentation de température mais ce serait un processus inéluctable ; après un nombre défini de divisions mitotiques, les gonies entreraient en méiose quelles que soient les conditions environnementales, pourvu que les réserves énergétiques ou que la quantité de nourriture disponible soient suffisantes pour fournir l'énergie nécessaire à la gamétogenèse. En effet, les études indiquent que le nombre de mitoses pour chaque gonie est spécifique de l'espèce. Ainsi chez la drosophile, chaque cystoblaste (gonie) se divise 4 fois pour former 16 cellules qui entrent en méiose (Williamson et Lehman, 1996).

Des conditions de température et de photopériode printanières sont apparues comme stimulateurs de l'étape de maturation gonadique dans nos conditions expérimentales. L'accélération de la croissance gonadique au printemps est observée chez de nombreux bivalves des régions tempérées parmi les ostréidés (Sphigel, 1989; Ruiz *et al.*, 1992; Chavez-Villalba *et al.*, 2002b), les mytilidés et les pectinidés (Lubet, 1959). De plus, l'influence des températures élevées sur la cinétique de maturation est bien connue et a été utilisée depuis les premiers temps des conditionnements de bivalves en éclosion (Loosanoff et Davis, 1963).

Ainsi, aux étapes clés de la gamétogenèse, la température apparaît soit comme un facteur déclencheur d'un processus comme l'initiation des mitoses goniales, soit comme un catalyseur dans le cas de la maturation.

Régulation de la synthèse des déterminants cytoplasmiques dans les ovocytes pendant la vitellogenèse

Nous avons mis en évidence que chez *C. gigas*, la formation de la lignée germinale au stade embryonnaire impliquerait des déterminants cytoplasmiques, en particulier les ARNm de *Oyvlg*, transmis maternellement des ovocytes à l'embryon. La mise en place des PGCs serait par conséquent dépendante du bon déroulement de la vitellogenèse des ovocytes en amont et en particulier de l'accumulation des déterminants cytoplasmiques au niveau de son pôle végétatif. Or, dans les conditions hivernales permanentes testées dans notre étude, la quantité de transcrits du gène *Oyvlg* dans les ovocytes vitellogéniques apparaît très réduite par rapport à celle enregistrée en conditions naturelles ou accélérées. Cette diminution de la quantité de transcrits dans les ovocytes pourrait empêcher ou perturber la formation des cellules germinales primordiales chez les embryons. En effet, des études ont mis en évidence que le cytoplasme polaire ne se formait pas chez des drosophiles homozygotes mutantes pour l'allèle hypomorphique *vasa*^{PD} dont le phénotype est une diminution importante de l'expression de *vasa* (Hay *et al.*, 1990). De plus, les descendants de ces drosophiles étaient stériles. Pour vérifier l'impact sur la descendance d'une diminution de la quantité de transcrits *Oyvlg* dans les ovocytes des huîtres, il faudrait analyser leur développement gonadique et tester leur fertilité.

Le maintien d'une température basse et constante pendant une année entière dans le conditionnement hivernal serait à l'origine de la diminution de la quantité de transcrits *Oyvlg* dans les ovocytes. Nous pouvons également nous demander si cette longue période de froid ne provoque pas un ralentissement du métabolisme général ; d'autant que la croissance somatique observée est apparue plus faible dans ce conditionnement que dans ceux reproduisant des cycles annuels, thermiques et photopériodiques, naturel ou accéléré. La diminution de l'activité métabolique est une stratégie de survie adoptée par de nombreuses espèces, notamment par celles qui ont, par exemple, une phase d'hibernation, de diapause ou d'anaérobiose (Storey et Storey, 2004). Cet hypométabolisme se traduit par une régulation des dépenses d'énergie, un arrêt du fonctionnement des canaux à ions et surtout un arrêt de la synthèse des protéines par arrêt de la transcription, de la traduction ou de la dégradation des protéines (Storey et Storey, 2004).

1.4 Applications pour la reproduction contrôlée de *C. gigas* en éclosérie

L'un des objectifs actuels du programme de recherche sur la reproduction de *C. gigas* est de parvenir à maîtriser la reproduction afin de proposer aux éclosiers des protocoles rigoureux permettant d'obtenir des géniteurs mâles et femelles matures tout au long de l'année, y compris pendant la période automnale. Ceci leur permettrait de produire des larves et du naissain en grande quantité et à la demande selon un calendrier maîtrisé. Dans le cadre plus restreint de cette thèse, l'objectif était de comprendre les mécanismes de renouvellement annuel de la population de cellules germinales et l'influence des facteurs environnementaux sur ces processus afin de pouvoir réinitialiser le cycle de reproduction dès que nécessaire en agissant sur les paramètres environnementaux que l'on sait contrôler en éclosérie.

D'une façon générale, le conditionnement des géniteurs en éclosérie est encore très empirique. Wilson (1981) remarquait que le conditionnement automnal d'*Ostrea edulis* était rarement efficace. Chez les Pectinidés, la production de larves en éclosérie est aussi très réduite de juillet à décembre (Le Pennec *et al.*, 1998) et chez *C. gigas* le conditionnement automnal ne permet pas d'obtenir l'émission de gamètes viables (Robert et Gérard, 1999). Il était donc important de réussir à comprendre les raisons des échecs des conditionnements automnaux constatés chez ces espèces de bivalves.

Au cours de notre étude, nous avons obtenu une **maturation** et une **poncte** des huîtres en **automne** grâce à une **manipulation simple des paramètres température/photopériode**. Les huîtres conditionnées pendant un an à partir du mois de mars dans des conditions de température et de photopériode accélérées deux fois, et nourries quotidiennement, effectuent deux cycles de reproduction complets en une année. Le conditionnement automnal apparaît possible si les huîtres ont reconstitué leur **stock de cellules germinales** et leurs réserves avant d'entamer un nouveau cycle de reproduction. Or, les huîtres prélevées dans le milieu naturel à la fin de l'été ou au début de l'automne n'ont pas le temps de reconstituer une population de cellules germinales souches, ce qui expliquerait que le conditionnement des géniteurs à cette période reste infructueux. A l'inverse, l'amélioration des résultats de conditionnements automnaux obtenus suite à un pré-conditionnement au froid (Chavez-Villalba *et al.*, 2002a) s'explique par la reprise des mitoses goniales provoquées par les faibles températures. Ainsi,

pour obtenir des **pontes en automne**, nous préconisons de soumettre les huîtres, dès le printemps, à un **cycle accéléré de température et de photopériode** plutôt qu'à une augmentation simple de température pour atteindre une valeur haute constante.

Le conditionnement hivernal long permet également de produire des géniteurs matures en automne et de constituer et conserver un stock de gamètes matures. En effet, nous avons mis en évidence que des huîtres récupérées dans la nature à la fin de l'hiver et maintenues toute l'année en conditions hivernales, entraînent en maturation et conservaient des gamètes matures pendant plusieurs mois sans ponte ni régression. Des pontes par "stripping" réalisées avec ces animaux montrent que les gamètes produits sont fertiles. Cependant, des études complémentaires seraient à réaliser pour vérifier la qualité des gamètes produits en calculant le taux de larves D et surtout la fertilité des descendants issus de ces huîtres. En effet, comme nous l'avons décrit dans la partie 1.3 de ce chapitre, des taux très bas de transcrits *Oyvlg* sont mesurés dans les ovocytes matures de ces huîtres, transcrits qui seraient nécessaires pour permettre le développement de la lignée germinale chez les descendants.

Si la sous-expression du gène *Oyvlg* dans les femelles matures en conditions froides provoque effectivement la stérilité des descendants comme nous en avons fait l'hypothèse, alors ce type de conditionnement pourrait être utilisé pour produire des individus stériles. Une seconde possibilité serait de bloquer l'expression du gène par injection d'ARN double brin complémentaire du gène *Oyvlg* dans les ovocytes ou dans les embryons aux premiers stades du développement, suivant la technique de "RNA interference" (RNAi) (Tijsterman *et al.*, 2002; Murchison et Hannon, 2004). Ces techniques seraient des alternatives à la production d'huîtres triploïdes. Ces huîtres dites "des quatre saisons" présentent l'avantage de ne jamais être laiteuses car elles ne développent pas de gonade et donc de pouvoir être consommées toute l'année (Allen, 1988; Allen et Downing, 1991). Ces huîtres triploïdes ont d'abord été produites expérimentalement puis commercialement depuis une dizaine d'années (Boudry *et al.*, 1998). Néanmoins, cette hypothèse reste à démontrer soigneusement avant toute conclusion.

2. Conclusion et perspectives

Les objectifs principaux de cette thèse étaient de déterminer l'origine et les mécanismes de renouvellement annuel de la population de cellules germinales chez l'huître *C. gigas* ainsi que d'analyser l'effet des paramètres environnementaux température et photopériode sur l'initiation de la gamétogenèse. Très peu de données étaient disponibles jusque là sur l'organogenèse de la gonade chez *C. gigas*. Les études les plus récentes traitant de ce sujet dataient des années 1970 (Tardy, 1970; Lubet, 1976). Ce domaine de recherche retrouve un regain d'intérêt depuis quelques années avec la nécessité croissante de comprendre les mécanismes de reproduction des bivalves afin de les contrôler dans le cadre de la reproduction en éclosérie.

Cette étude nous a permis d'élucider le "cycle de vie" des cellules germinales de l'huître creuse *C. gigas*, de déterminer leur origine et de lever le mystère de la pérennité de la lignée germinale au fil des cycles de reproduction (Figure 46). Les mécanismes de différenciation et de développement de la lignée germinale sont apparus très conservés chez les bivalves par rapport à ceux déjà décrits dans les autres phylums d'invertébrés mais aussi de vertébrés. L'importance de ces mécanismes pour le maintien des espèces expliquerait un tel niveau de conservation. Cette thèse illustre également l'influence majeure des facteurs environnementaux température/photopériode sur la dynamique de gamétogenèse de *C. gigas*.

L'avancée réalisée au cours de cette thèse dans la connaissance de la physiologie de la reproduction de *C. gigas* a été possible grâce au couplage d'approches qualitatives (observation macroscopique, histologie, hybridation *in situ*), semi-quantitatives (analyse d'images histologiques, PCR) et quantitatives (PCR en temps réel, cytométrie en flux) et à l'expérimentation en milieu contrôlé qui permet de connaître précisément et de modifier l'environnement hydrobiologique des huîtres. La combinaison de nombreuses analyses individuelles au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire a permis de réaliser une étude intégrative des processus complexes impliqués dans le développement des cellules de la lignée germinale.

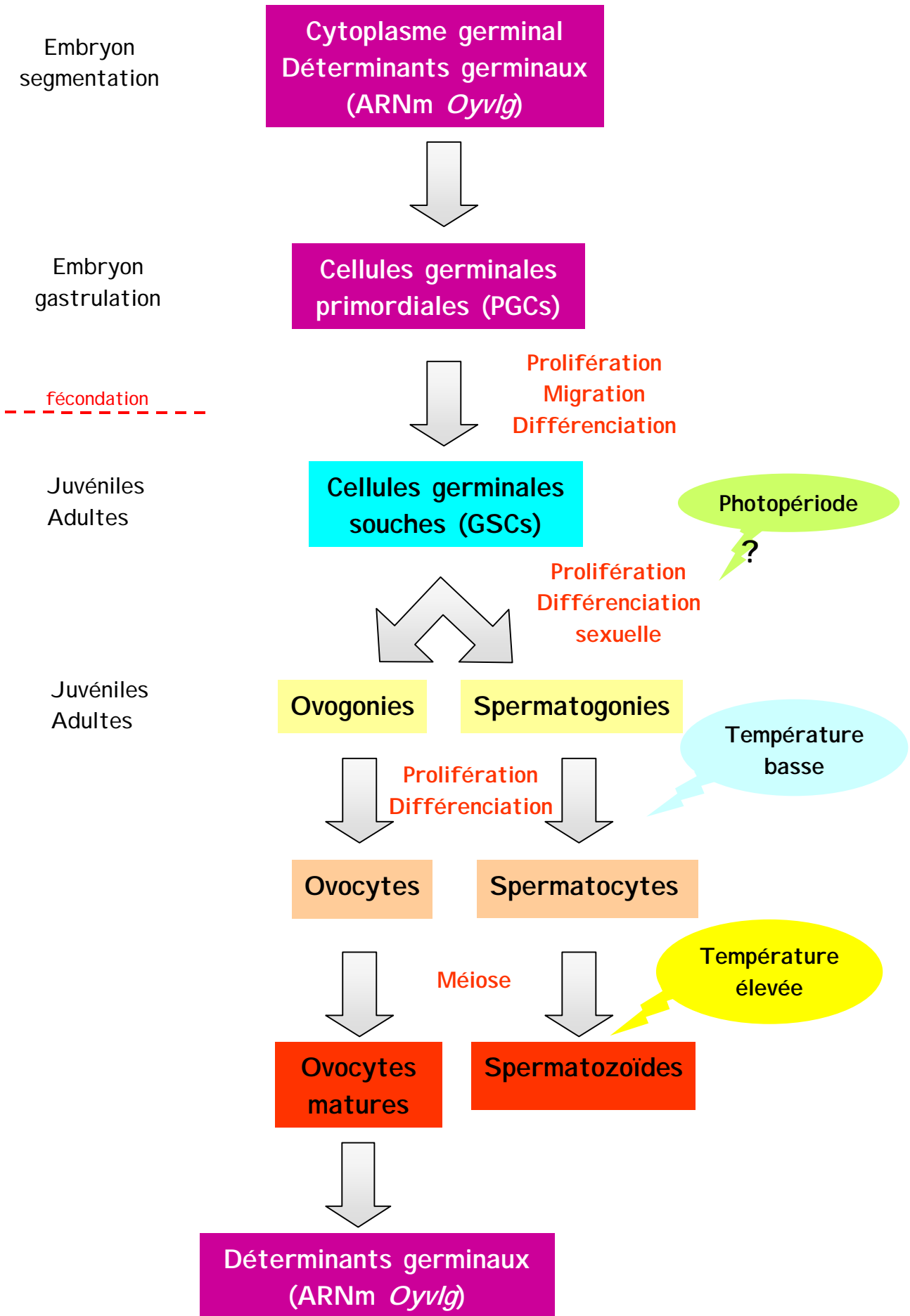


Figure 46 : Schéma général du cycle de vie des cellules germinales chez *Crassostrea gigas*.

Le gène *Oyvlg*, caractérisé dans cette étude est le premier marqueur spécifique des cellules germinales mis au point chez les mollusques. Plus qu'un marqueur, *Oyvlg* serait le premier déterminant de la lignée germinale mis en évidence chez les bivalves. La découverte de ce gène ouvre d'importantes perspectives pour la recherche sur la reproduction des bivalves marins mais aussi pour la reproduction contrôlée en éclosion.

La fonction biologique du gène *Oyvlg* et le rôle de ses ARNm dans la formation des cellules germinales pourraient être confirmés par différents types d'études telles que des études fonctionnelles de mise sous silence de l'expression du gène, par RNAi ou par morpholinos, des expérimentations d'ablation de la zone cytoplasmique contenant les ARNm *Oyvlg* chez les embryons ou encore par l'analyse de la protéine OYVLG.

Ces travaux ont mis en évidence, pour la première fois, l'existence de cellules germinales primordiales chez *C. gigas*, qui seraient déterminées au stade embryonnaire par la localisation cellulaire de déterminants cytoplasmiques, dont les ARNm *Oyvlg*, hérités maternellement par l'embryon. La question du renouvellement annuel de la population de cellules germinales a été résolue par la démonstration de l'existence de cellules germinales souches, issues de la différenciation des cellules germinales primordiales, capables d'auto-renouvellement qui prolifèrent lors de la ré-initiation du cycle de reproduction et se différencient en ovogonies ou en spermatogonies.

Certaines étapes du cycle de vie des cellules germinales chez *C. gigas* restent encore à découvrir ou à confirmer, notamment, le trajet de migration des cellules germinales primordiales au stade larvaire et la régulation de ces mécanismes (migration passive, interactions cellulaires...), les processus de différenciation des cellules germinales primordiales en cellules germinales souches puis des cellules germinales souches en gonies, et le déterminisme de l'orientation sexuelle des cellules souches en ovogonies ou en spermatogonies.

L'huître *Crassostrea gigas* montre une très grande plasticité physiologique de sa reproduction en réponse aux variations des facteurs environnementaux, notamment aux facteurs couplés température/photopériode. La dynamique de reproduction se synchronise exactement sur les cycles des paramètres température/photopériode. La température semble être le facteur prédominant dans la régulation de la plupart des étapes de la gamétogenèse (prolifération des gonies, maturation et ponte). Cependant, nous ne pouvons pas exclure l'effet de la photopériode, notamment pour le déclenchement de la prolifération des cellules

germinales souches. Des expérimentations complémentaires sur les effets de la température et de la photopériode seraient nécessaires pour faire la part entre le rôle spécifique de chacun de ces deux paramètres et leurs interactions.

Cette étude démontre que la réalisation de conditionnements longs avec une modulation adéquate des cycles de température et de photopériode permet d'étendre la saison de reproduction des huîtres en éclosion à l'année entière.

L'action des facteurs environnementaux sur la synchronisation de la reproduction est relayée par des facteurs neuro-endocriniens chez de nombreux organismes (Sastry, 1979; Pearse, 1999). Chez les bivalves, des études réalisées chez la moule *M. edulis* mettent en évidence que des neurohormones sécrétées par les ganglions cérébroïdes agissent sur différentes étapes de la gamétogenèse, telles que les mitoses goniales, la méiose prévitellogénique, la vitellogenèse ou encore la ponte (Mathieu *et al.*, 1988; Mathieu *et al.*, 1994) et qu'il existerait, chez les bivalves, des peptides GnRH-like qui réguleraient le cycle de reproduction (Pazos et Mathieu, 1999). Cependant, les interactions entre les deux systèmes de régulation, environnemental et endocrinien, n'ont jamais été mises en évidence chez les bivalves. Des analyses couplées de l'évolution des neuropeptides, tels un GnRH-like, et du gène *Oyvlg* au cours du cycle de reproduction d'huîtres élevées en conditions contrôlées de température et/ou de photopériode permettraient d'apporter des informations sur l'interaction entre les facteurs neuro-endocriniens et les paramètres environnementaux dans le cadre de la régulation de la reproduction.

Bibliographie

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1986) *Biologie Moléculaire de la Cellule*. Flammarion Médecine Sciences, Paris, 1146 pp.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E. (2001) Haemocytes parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes spp.* clams. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 365-375.
- Allen, S.K. (1988) Triploid oysters ensure year-round supply. *Oceanus* 31, 58-63.
- Allen, S.K., Downing, S.L. (1991) Consumers and "experts" alike prefer the taste of sterile triploid over gravid diploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793). *J. Shellfish. Res.* 10, 19-22.
- Amemiya, I. (1929) On the sex-change of the Japanese common oyster, *Ostrea gigas* Thunberg. *Proc. Imp. Acad. (Tokyo)* 5, 284-286.
- Andrews, J.D. (1979). Pelecypodia: Oystreidae. In: *Reproduction of Marine Invertebrates (Mollusk : Pelecypods and lesser classes)*, pp. 293-341.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D. (2002) Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mar. Environ. Res.* 54, 585-589.
- Baghurst, B., Mitchell, J. (2002) Sex Specific Growth and Condition of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquacult. Res.* 33, 1253-1263.
- Barber, B.J. (1996) Gametogenesis of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), and Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in disease-endemic lower Chesapeake Bay. *J. Shellfish Res.* 15, 285-290.
- Bayne, B.L., Gabbott, P.A., Widdow, J. (1975) Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 55, 675-689.
- Bellvé, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'Brian, D.A., Bhatnagar, Y.M., Dym, M. (1977) Spermatogenic cells of the prepubertal mouse: isolation and morphological characterization. *J. Cell Biol.* 74, 68-85.
- Beninger, P.G., Le Pennec, M. (1991). Reproductive system. In: *Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture* (Ed.Shumway, S.E.), Elsevier Press, Amsterdam, pp. 177-223.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M. (2000a) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comp. Biochem. Physiol.*, B 125, 359-369.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M. (2000b) Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar. Biotechnol.* 2, 136-145.
- Blottner, S., Roelants, H. (1998a) Quantification of somatic and spermatogenic cell proliferation in the testes of ruminants, using a proliferation marker and flow cytometry analysis. *Theriogenology* 49, 1275 -1287.
- Blottner, S., Roelants, H. (1998b) Calculation of spermatogenic transformations based on dual-flow cytometric analysis of testicular tissue in seasonal breeders. *Andrologia* 30, 331-337.
- Blottner, S., Roelants, H., Wagener, A., U.D., W. (1999) Testicular mitosis, meiosis and apoptosis in mink (*Mustela vison*) during breeding and non-breeding seasons. *Anim. Reprod. Sci.* 57, 237 - 249.

- Borcherding, J. (1995) Laboratory experiments on the influence of food availability, temperature and photoperiod on gonad development in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Malacologia* 36, 15-27.
- Boss, K.J. (1971) Critical estimate of the number of recent mollusca. *Occasional paper mollusks. Museum of Comparative Zoology Harvard University* 3, 81-135.
- Boudry, P., Barre, M., Gérard, A. (1998). Genetic improvement and selection in shellfish : A review based in oyster research and production. *International center for Advances Mediterranean agronomic studies*. 34, 61-75
- Bougrier, S., Geairon, P., Deslous-Paoli, J.M., Bacher, C., Jonquieres, G. (1995) Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134, 143-154.
- Braat, A.K., Van de Water, S., Goos, H., Bogerd, J., Zivkovic, D. (2000) Vasa protein expression and localization in the zebrafish. *Mech. Develop.* 95, 271-274.
- Brown, E.H., King, R.C. (1962) Oogonial and spermatogonial differentiation within a mosaic gonad of *Drosophila melanogaster*. *Growth* 26, 53-70.
- Burke, R.D. (1983) The induction of metamorphosis of marine invertebrate larvae : stimulus and response. *Can. J. Zool.* 61, 1701-1719.
- Buroker, N.E. (1983) Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia* 23, 271-279.
- Callard, G., Callard, I. (1998). Spermatogenesis, in Nonmammals. In: *Encyclopedia of reproduction* (Eds. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 563-570.
- Campbell, N.A., Reece, J.B. (2004) *Biologie*. De Boeck Université, Paris, 1482 pp.
- Castrillon, D.H., Quade, B.J., Wang, T.Y., Quigley, C., Crum, C.P. (2000) The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9585-9590.
- Chaganti, R.S., Houldsworth, J. (2000) Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res.* 60, 1475-1482.
- Chang, C.C., Dearden, P., Akam, M. (2002) Germ line development in the Grasshopper *Schistocerca gregaria*: vasa as a marker. *Dev. Biol.* 252, 100-118.
- Chavez-Villalba, J.E. (2001) Conditionnement expérimental de l'huître *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 187 pp.
- Chavez-Villalba, J.E., Mingant, C., Cochard, J-C., Le Pennec, M. (2001) Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis* 30, 1-12.
- Chavez-Villalba, J.E., Barret, J., Mingant, C., Cochard, J-C., Le Pennec, M. (2002a) Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: a new approach. *Aquaculture* 210, 171-186.
- Chavez-Villalba, J.E., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J-C., Le Pennec, M. (2002b) Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214, 115-130.
- Chavez-Villalba, J.E., 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 (2) : 465-474.

- Chavez-Villalba, J.E., Cochard, J-C., Le Pennec, M., Barret, J., Enriquez-Diaz, M., Caceres-Martinez, C. (2003b) Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22 (3) : 721-731.
- Chelly, J., Concordet, J-P., Kaplan, J-C., Khan, A. (1989) Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 2617-2621.
- Chiquoine, A.D. (1954) The identification, origin and migration of the primordial germ cells of the mouse embryo. *Anat. Rec.* 118, 135-146.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single step method of isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Clintock, J.B., Watts, S.A. (1990) The effects of photoperiod on gametogenesis in the tropical sea urchin *Eucidaris tribuloides* (Lamarck) (Echinodermata : Echinoidea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 139, 175-184.
- Cochard, J.C., Devauchelle, N. (1993) Spawning, fecundity and larval survival and growth in relation to controlled conditioning in native and transplanted populations of *Pecten maximus* (L.): evidence for the existence of separate stocks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 169, 41-56.
- Coleman, N. (1986) A review of introductions of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around the world and a discussion of the possible ecological consequences of introducing the species into Victoria, Australia. Marine Resources Management Branch, Fisheries and Wildlife Service, Department of Conservation, Forests and Lands, Queescliff, Victoria, Australia, pp. 39.
- Collier, J.R. (1983) The biochemistry of molluscan development. In: *The Mollusca. Development* (Eds. N.H. Verdonk, J.A.M. Van den Biggelaar, Tompa, A.S.), Academic Press, New York, pp. 253-297.
- Comps, M. (1978) Evolution des recherches et études récentes en pathologie des huîtres. *Oceano. acta* 1, 522-262.
- Davey, K.G. (1998) Insect reproduction, Overview. In: *Encyclopedia of reproduction*, (Eds. Knobil, E., Neil, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 845-852.
- Dawson, A. (1998) Seasonal reproduction, birds. In: *Encyclopedia of reproduction* (Eds. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic Press, San Diego, pp. 321-328.
- De Rooij, D.J. (1983) Proliferation and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the mammalian testis. In: *Stem cells : their identification and characterisation* (Ed. Potten, C.S.), Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 89-117.
- Dearden, P., Grbic, M., Donly, C. (2003) *Vasa* expression and germ-cell specification in the spider mite *Tetranychus urticae*. *Dev. Genes Evol.* 212, 599-603.
- Dégremont, L. (2003) Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, Caen, 333 pp.
- Deslous-Paoli, J.M., Heral, M., Berthome, J.P., Razet, D., Garnier, J. (1981) Natural reproduction of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron basin in 1979 and 1981: Biochemical and energetic aspects. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit. Nantes* 45, 319-327.

- Deslous-Paoli, J.M., Héral, M. (1988) Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat. Living. Resourc.* 1, 239-249.
- Devauchelle, N., Boussaid, B., Le Pennec, G., Salain, G., Dorange, G. (1998) Organization of the genital tract of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* *International congress on invertebrate reproduction and development*.
- Dictus, W.J.A.G., Damen, P. (1997) Cell-lineage and clonal-contribution map of the trochophore larva of *Patella vulgata* (Mollusca). *Mech. Dev.* 62, 213-226.
- Dinamani, P. (1987) Gametogenic patterns in populations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Northland, New Zealand. *Aquaculture* 64, 65-76.
- Dohmen, M.R., Verdonk, N.H. (1979). Cytoplasmic localizations in mosaic eggs. In: Maternal effects in development (Eds. Naewth, D.H., Balls, M.), Cambridge University Press, London, New York, pp. 127-145.
- Dohmen, M.R. (1992) Cell lineage in molluscan development. *Microsc. Res. Tech.* 22, 75-102
- 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.
- Eddy, E.M. (1975) Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.* 43, 229-281.
- Enriquez-Diaz, M. (2004) Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale.
- Ernande, B., Bourdry, P., Clobert, J., Haure, J. (2004) Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.* 17, 342-356.
- Evenson, D.P. (1989) Flow cytometry evaluation of male germ cells. In: *Flow cytometry : Advanced research and clinical applications* (Ed. Yen, A.), CRC Press, Boca raton, pp. 217-246.
- FAO (2003) Aquaculture production : quantities 1950-2001 and Values 1984-2001. Fishstat plus.
- Ford, M.J., Anton, I.A., Lane, D.P. (1988) Nuclear protein with sequence homology to translation initiation factor eIF-4A. *Nature* 332, 736-738.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P. (2001) Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161, 20-211.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998-9002.
- Fujimura, N., Takamura, K. (2000) Characterization of an ascidian DEAD-box gene, Ci-DEAD1 : specific expression in the germ cells and its mRNA localization in the posterior-most blastomeres in early embryos. *Dev. Genes. Evol.* 210, 64-72.
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M., Noce, T. (1994) Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12258-12262.

- Galtsoff, P.S. (1930) The role of chemical stimulation in the spawning reactions of *Ostrea virginica* and *Ostrea gigas*. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*. 16, 555-559.
- Galtsoff, P.S. (1964). The American oyster *Crassostrea virginica*. In: *Fisheries bulletin*, 480 pp.
- Gavis, E.R., Curtis, D., Lehmann, R. (1996a) Identification of cis-acting sequences that control nanos RNA localization. *Dev. Biol.* 176, 36-50.
- Gavis, E.R., Lunsford, L., Bergsten, S.E., Lehmann, R. (1996b) A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of nanos RNA. *Development* 122, 2791-2800.
- Gérard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launay, S., Heurtebise, C., Ledu, C., Phelipot, P. (1995) Controlling gametogenesis in flat and japanese oysters. Relationship between reproduction and genetics, La Reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves Cultivés en France. IFREMER, Plouzane (France), pp. 99-112.
- Gérard, A. (1998) Avancées récentes sur la reproduction des huîtres. *Eur. Aquac. Soc. Spec. Publ.* 26, 115-119.
- Ghisolfi, L., Joseph, G., Amalric, F., Erard, M. (1992) The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *J Biol Chem* 267, 2955-2959.
- Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6, 995-1001.
- Gilbert, S.F. (1996) Biologie du développement. De Boeck Université, Paris, 892 pp.
- Ginsburg, M. (1997) Primordial germ cell development in avians. *Poultry Sci.* 76, 91-95.
- Golan, R., Weissenberg, R., Oschry, Y., Shochat, L., Lewin, L.M. (2000) Spermatogenesis in the Golden Hamster during the first spermatogenic wave : a flow cytometric analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 205-211.
- Gomperts, M., Wylie, C., Heasman, J. (1994). Primordial germ cell migration. *Ciba Foundation symposium* 182, 121-139
- Gonzales-Tizon, A., Martinez-Lage, A., Ausio, J., Mendez, J. (2000) Polyploidy in a natural population of mussel, *Mytilus trossulus*. *Genome* 43, 409-411.
- Goodman, R.L. (1998). Seasonal reproduction. In: *Encyclopedia of reproduction* (Ed. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic Press, San Diego, pp. 341-351.
- Gouletquer, P., Héral, M. (1991). Aquaculture of *Crassostrea gigas* in France. The ecology of *C. gigas* in Australia, New Zealand, France and Washington state. *Oyster ecology workshop* 12-19
- Gouletquer, P. (1997) Natural reproduction cycle of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*, La Reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves Cultivés en France. IFREMER, Nantes.
- Griffond, B., Gomot, P., Gomot, L. (1992) Influence de la température sur le déroulement de l'ovogenèse chez l'escargot *Helix aspersa*. *J. Therm. Biol.* 17, 185-190.
- Grizel, H. (1974) Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *Compt. rend. Acad. Sci.* 279, 783-785.
- Grizel, H., Héral, M. (1991) Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. CIEM* 47, 399-403.

- Grizel, H. (1996) Quelques exemples d'introductions et de transferts de mollusques. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 15, 401-408.
- Gruidl, M.E., Smith, P.A., Kuznicki, K.A., McCrone, J.S., Kirchner, J., Roussell, D.L., Strome, S., Bennett, K.L. (1996) Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13837-13842.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguière, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachère, E., Escoubas, J.M. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, 139-145.
- Guillaume, D., Palmer, E. (1992) Lumière, mélatonine et reproduction chez la jument. *Ann. Zootech.* 41, 263-269.
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K. (1998) Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolution* 52, 394-402.
- Hashimoto, O., Maegawa, S., Nagai, T., Yamaha, E., Suzuki, H., Yasuda, K., Inoue, K. (2004) Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Dev. Biol.* 286, 152-161.
- Hay, B., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1988) A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55, 577-587.
- Hay, B., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1990) Localization of *vasa*, a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Development* 109, 425-433.
- Heffernan, P.B., Walker, R.L. (1989) Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. *J. Mollusc. Stud.* 55, 135-137.
- Héral, M. (1989) L'ostréiculture française traditionnelle Barnabé, G. Lavoisier, Paris.
- Hess, R.A. (1998) Spermatogenesis, overview. In: *Encyclopedia of reproduction*, (Eds Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 539-545.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P., Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413-417.
- Hirsh, D., Oppenheim, D., Klass, M. (1976) Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 49, 200-219.
- Hsueh, A.J., Schaeffer, J.M. (1985) Gonadotropin-releasing hormone as a paracrine hormone and neurotransmitter in extra-pituitary sites. *J Steroid Biochem.* 23, 757-764.
- Huvet, A., Gérard, A., Ledu, C., Phelipot, P., Heurtebise, S., Boudry, P. (2002) Is fertility of hybrids enough to conclude that the two oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species ? *Aquat. Living Resour.* 15, 45-52.
- Huvet, A., Daniel, J.Y., Quéré, C., Dubois, S., Prudence, M., Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Samain, J.F., Moal, J. (2003) Tissue expression of two α -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture* 228, 321-333.

- Ikenishi, K., Tanaka, T., Komiya, T. (1996) Spatio-temporal distribution of the protein of *Xenopus vasa* homologue (*Xenopus vasa*-like gene 1, XVLG1) in embryos. *Dev. Growth Differ.* 38, 527-535.
- Ikenishi, K., Tanaka, T. (1997) Involvement of the protein of *Xenopus vasa* homolog (*Xenopus vasa*-like gene 1, XVLG1) in the differentiation of primordial germ cells. *Dev. Growth Differ.* 39, 625-633.
- Ikenishi, K., Tanaka, T.S. (2000) Spatio-temporal expression of *Xenopus vasa* homolog, XVLG1, in oocytes and embryos: The presence of XVLG1 RNA in somatic cells as well as germline cells. *Dev. Growth. Differ.* 42, 95-103.
- Illanes-Bucher, J., Lubet, P. (1980) Etude de l'activité neurosécrétoire au cours du cycle sexuel annuel de la moule (*Mytilus edulis* L.). *Bull. Soc. Zool. France* 105, 141-151.
- Illmensee, K., Mahowald, A.P. (1974) Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1016-1020.
- Janzel, R., Villalaz, G. (1994) Laboratory study of food concentration and temperature effect on the reproductive cycle of *Argopecten ventricocus*. *J. Shellfish Res.* 13, 513-519.
- Jokela, J., Mutikainen, P. (1995) Phenotypic plasticity and priority rules for energy allocation in a freshwater clam: A field experiment. *Oecologia* 104, 122-132.
- Jones, R.C., Lin, M. (1993) Spermatogenesis in birds. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 15, 233-264.
- Joesse, J., Geraerts, W.P.M. (1983). Endocrinology. In: *The Mollusca* (Ed. Saleuddin, M., Wilbur, K.W.), Academic Press, New York, pp. 318-406.
- Kang, C.K., Park, M.S., Lee, P.Y., Choi, W.J., Lee, W.C. (2000) Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. *J. Shellfish Res.* 19, 771-778.
- Kawauchi, H. (1989) Evolutionary aspects of pituitary hormones. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 62, 139-155.
- Kennedy, A.V., Battle, H.I. (1964) Cyclic changes in the gonad of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 42, 305-321.
- Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (1996) The Eastern oyster *Crassostrea virginica* Maryland Sea Grant College, Maryland, 733 pp.
- Khan, I.A., Thomas, P. (1998). Ovarian cycle, Teleost fish. In: *Encyclopedia of reproduction*, (Eds. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego. 552-564 pp.
- Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H., Nuesslein-Volhard, C. (2000) Zebrafish *vasa* RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell Biol.* 149, 875-888.
- Knecht, M., Ranta, T., Feng, P., Shinohara, O., Catt, K.J. (1985) Gonadotropin-releasing hormone as a modulator of ovarian function. *J. Steroid Biochem.* 23, 771-778.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Nagahama, Y. (2000) Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech. Develop.* 99, 139-142.

- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Nagahama, Y. (2002) Two isoforms of *vasa* homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mech. Develop.* 111, 167-171.
- Kobayashi, T., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Takeuchi, T. (2004) Isolation of highly pure and viable Primordial Germ Cells from Rainbow Trout by GFP-dependent flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 91-100.
- Komiya, T., Itoh, K., Ikenishi, K., Furusawa, M. (1994) Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD Box protein family which is specifically expressed in germ cell of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 162, 354 - 363.
- Krovel, A.V., Olsen, L.C. (2002) Expression of a *vas* : EGFP transgene in primordial germ cells of the Zebrafish. *Mech. Develop.* 116, 141-150.
- Kuznicki, K.A., Smith, P.A., Leung-Chiu, W.M., Estevez, A.O., Scott, H.C., Bennett, K.L. (2000) Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1 ; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*. *Development* 127, 2907-2916.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Eds. Stackebrandt, E., Goodfellow, M.), John Wiley and Sons, Chichester, pp. 177-203.
- Lango-Reynoso, F. (1999) Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 139 pp.
- Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Pennec, M., Hatt, P.-J. (1999) Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest", France. *Invertebr. Reprod. Dev.* 36, 141-144.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Pennec, M. (2000) Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, 183-199.
- Lannan, J.E., Robinson, A.K., Breese, W.P. (1980) Broodstock management of *Crassostrea gigas*: II. Broodstock conditioning to maximise larval survival. *Aquaculture* 21, 337-345.
- Lartillot, N., Lespinet, O., Vervoort, M., Adoutte, A. (2002) Expression pattern of Brachyury in the mollusc *Patella vulgata* suggests a conserved role in the establishment of AP axis bilateria. *Development* 129, 1411-1421.
- Lasko, F., Ashburner, M. (1988) The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eucaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335, 611-617.
- Lasko, F., Ashburner, M. (1990) Posterior localization of *vasa* protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev.* 4, 905-921.
- Le Cointre, G., Le Guyader, G. (2001) Classification phylogénétique du vivant. Belin. 544 pp.
- Le Pennec, M. (1997) Les écloséries de mollusques bivalves: mode d'emploi. *Bull. Aquac. Ass. Can.* 3, 31-37.
- Le Pennec, M., Robert, R., Avendano, M. (1998) The importance of gonadal development on larval productions in pectinids. *J. Shellfish Res.* 17, 97-101.
- Leclerc, C., Guerrier, P., Moreau, M. (2000) Role of dihydropyridine-sensitive calcium channels in meiosis and fertilization in the bivalve molluscs *Ruditapes philippinarum* and *Crassostrea gigas*. *Biol. Cell.* 92, 285-299.

- Leroy, P., Alzari, P., Sasson, D., Wolgemuth, D., Fellous, M. (1989) The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependant RNA helicase. *Cell* 57, 549-559.
- Lessman, C. (1998). Oogenesis in nonmammalian vertebrates. In: *Encyclopedia of Reproduction* (Eds. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 498-508.
- Li, F., Xiang, J., Zhang, X., Zhou, L., Zhang, C., Wu, C. (2003) Gonad development characteristics and sex ratio in triploid Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mar. Biotech.* 5, 528-535.
- Li, K., Osada, M., Mori, K. (2000) Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Sci.* 66, 502-508.
- Liang, L., Diehl-Jones, W., Lasko, P. (1994) Localization of *vasa* protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120, 1201-1211.
- Lin, H. (1997) The Tao of stem cells in the germline. *Annu. Rev. genet.* 31, 455-491.
- Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J., Slonimski, P.P. (1989) Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337, 121-122.
- Livak, K.L., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-Ct method. *Methods* 25, 402-408.
- Loosanoff, V.L., Davis, H.C. (1963) Rearing of bivalve molluscs. *Adv. Mar. Biol.* 1, 1-136.
- Lubet, P. (1959) Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les Pectinidés (Mollusques Bivalves). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. Fr.* 23, 387-548.
- Lubet, P. (1976) Ecophysiologie de la reproduction chez les mollusques lamellibranches. *Haliothis* 7, 49-55.
- Lubet, P., Herlin-Houtteville, P., Matthieu, M. (1976) La lignée germinale des mollusques pélecypodes. Origine et évolution. *Bull. Soc. Zool. France* 101, 22-27.
- Lubet, P. (1981) The action of temperature on the annual reproductive cycle of Lamellibranchs. *Bull. Soc. Zool. France* 106, 283-292.
- Lubet, P., Mathieu, M. (1982) The action of internal factors on gametogenesis in pelecypod molluscs. *Malacologia* 22, 131-136.
- Lubet, P. (1991). Bases biologiques de la culture des mollusques. In: *Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture* (Ed. Barnabé, G.), Lavoisier, Tec&Doc, pp. 99-212.
- Lubet, P., Mathieu, M. (1999) Applications à la conchyliculture des récentes acquisitions sur la biologie des mollusques bivalves. *Année Biol.* 38, 27-50.
- Mahowald, A.P. (1968) Polar granules of *Drosophila*. II. Ultrastructural changes during early embryogenesis. *J. Exp. Zool.* 167, 237-262.
- Malakhov, V.V., Medvedeva, L.A. (1985) Embryonic development of giant oysters. *Sov. J. Mar. Biol.* 11, 39-45.
- Mann, R. (1979) Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 59, 95-110.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M. (1967) Initiation aux techniques de l'histologie animale, (Ed. Masson et Cie), Paris, 1232 pp.

- Mathieu, M., Lenoir, F., Robbins, I. (1988) A gonial mitosis-stimulating factor in cerebral ganglia and hemolymph of the marine mussel *Mytilus edulis* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 72, 257-263.
- Mathieu, M., Lubet, P. (1993) Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves, a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23, 123-129.
- Mathieu, M., Robbins, I., Lubet, P. (1994) The neuroendocrinology of *Mytilus edulis*. *Aquaculture* 94, 213-223.
- Matsumoto, T., Nakamura, A., Mori, K., Kayano, T. (2003) Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zool. Sci.* 20, 37-42.
- Maurer, D., Borel, M. (1986) Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis* 15, 125-134.
- Mc Laren, A. (1984) Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 38, 7-23.
- Mc Laren, A. (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 262, 1-15.
- Meisenheimer, J. (1901) Die Entwicklung von Herz, Pericard, Niere und Genitalzellen bei *Cyclas* im Verhältnis zu den übrigen Mollusken. *Z. Wiss. Zool.* 69, 417-428.
- Meistrich, M.L., Lake, S., Steinmetz, L.L., Gledhill, B.L. (1978) Flow cytometry of DNA in Mouse sperm and testis nuclei. *Mutat. res.* 49, 383-396.
- Mochizuki, K., Nishimiya-Fujisawa, C., Fujisawa, T. (2001) Universal occurrence of the *vasa*-related genes among metazoans and their germline expression in Hydra. *Dev. Genes. Evol.* 211, 299-308.
- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F., Escoubas, J.-M. (2001) Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS letters* 500, 64-70.
- Moore, L.A., Broihier, H.T., Van Doren, M., Lunsford, L.B., Lehman, R. (1998) Identification of genes controlling germ cells migration and embryonic gonad formation in *Drosophila*. *Development* 125, 667-678.
- Morrison, S.J., Shah, N.M., Anderson, D.J. (1997) Regulatory mechanisms in stem cells biology. *Cell* 88, 287-298.
- Morvan, C., Ansell, A.D. (1988) Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Mar. Biol.* 97, 355-364.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : the polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 1, 263-273
- Muranaka, M.S., Lannan, J.E. (1984) Broodstock management of *Crassostrea gigas*: Environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 39, 217-228.
- Murchison, E.P., Hannon, G.J. (2004) miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 223-229.
- Nakao, H. (1999) Isolation and characterization of a Bombyx *vasa*-like gene. *Dev. Genes Evol.* 209, 321-316.

- Nash, J.P. (1999). Seasonal reproduction, Fish. In: *Encyclopedia of reproduction* (Eds. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic Press, San Diego, pp. 329-340.
- Nederbragt, A.J., Van Loon, A.E., Dictus, W.J.A.G. (2002) Expression of *Patella vulgata* orthologs of engrailed and dpp-BMP2/4 in adjacent domains during Molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism. *Dev. Biol.* 246, 341-355.
- Neveu, D., Bretaudeau, J. (2001) Les huîtres Libris, Seyssinet, 103 pp.
- Nishimiya-Fujisawa, C., Sugiyama, T. (1993) Genetic analysis of developmental mechanisms in Hydra. Cloning of interstitial stem cells restricted to the sperm differentiation pathway in *Hydra magnipapillata*. *Develop. Biol.* 157, 1-9.
- Okada, K. (1936) Some notes on *Sphaerium japonicum biwaense* Mori, a freshwater bivalve. IV. Gastrula and fetal larva. *Sci. Rep. Tohoku. Imp. Univ.* 11, 49-68.
- Okada, K. (1939) The development of the primary mesoderm in *Sphaerium japonicum biwaense* Mori. *Sci. Rep. Tohoku. Imp. Univ.* 14, 25-47.
- Okada, M., Kleinman, I.A., Schneiderman, H.A. (1974) Restoration of fertility in sterilized *Drosophila* eggs by transplantation of polar cytoplasm. *Dev. Biol.* 37, 43-54.
- Okuzawa, K., Gen, K., Bruysters, M., Bogerd, J., Gothilf, Y., Zohar, Y., Kagawa, H. (2003) Seasonal variation of the three native gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acids levels in the brain of female red seabream. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130, 324-332.
- Oldfield, E. (1964) The reproduction and development of some members of the Erycinidae and Montacutidae (Mollusca, Eulamellibranchiata). *Proc. Malacol. Soc. London* 36, 79-120.
- Olsen, L.C., Aasland, R., Fjose, A. (1997) A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech. Develop.* 66, 95-105.
- Orlenko, A.N. (1994) Giant oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia, Mytiliformes, Crassostreidae) as an acclimatizable species and stages of its transplantation to the Black Sea. *Zoologiceskij Zurna* 73, 51-54.
- Otani, S., Maegawa, S., Inoue, K., Arai, K., Yamaha, E. (2002) The germ cell lineage identified by *vas*-mRNA during the embryogenesis in Goldfish. *Zool. sci.* 19, 519-526.
- Pause, A., Sonenberg, N. (1992) Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO* 11, 2643-2654.
- Pazos, A.J., Mathieu, M. (1999) Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 112-120.
- Pearse, J.S., Pearse, V.B., Davis, K.K. (1986) Photoperiodic regulation of gametogenesis and growth in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Exp. Zool.* 237, 107-118.
- Pearse, J.S. (1999). Seasonal reproduction, marine invertebrates. In: *Encyclopedia of reproduction* (Ed. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 352-360.
- Perdue, J.A. (1982) Gametogenesis and growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thurnberg). *J. Shellfish Res.* 2, 105-106.
- Picton, H.M., Gosden, R.G. (1999). Oogenesis in mammals. In: *Encyclopedia of reproduction*, (Eds. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 489-497.

- Pipe, R.K. (1987) Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* : An ultrastructural study. *Mar. Biol.* 95, 405-414.
- Poitras, E., Houde, A. (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Biotech.* 2, 2-11.
- Prieur, D. (1971) Recherches bibliographiques sur le développement embryonnaire des mollusques bivalves, Mémoire de DEA d'Océanographie Biologique, Faculté des Sciences de Paris, 33 pp.
- Raz, A. (2000) The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. *Genome Biology* 1, 1-6.
- Raz, E. (2003) Primordial germ-cell development: the Zebrafish. *Nature rev.* 4, 690-700.
- Ren, J.S., Marsden, I.D., Ross, A.H., Schiel, D.R. (2003) Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Malborough Sounds, New Zeland. *New Zeal. J. Mar. Fresh. Res.* 37, 171-182.
- Renault, T., Xue, Q.G., Chilmonczyk, S. (2001) Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, hemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish Shellfish Immun.* 11, 269-274.
- Robert, R., Gérard, A. (1999) Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquat. Living Resour.* 12, 121-130.
- Robinson, A. (1992) Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture* 106, 89-97.
- Rodriguez-Juiz, A.M., Torrado, M., Mendez, J. (1996) Genome-size variation in bivalve molluscs determined by flow cytometry. *Mar. Biol.* 126.
- Rongo, C., Lehmann, R. (1996) Regulated synthesis, transport and assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Trends Genet.* 12, 102-109.
- Roussel, D., Bennett, K.L. (1993) *glh-1*, a germ-line putative RNA helicase from *Caenorhabditis*, has four zinc fingers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9300-9304.
- Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., Garcia-Martin, L.O., Sanchez Lopez, J.L. (1992) Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 155, 249-262.
- Ruohola, H., Bremer, K.A., Baker, D., Swedlow, J.R., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1991) Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in *Drosophila*. *Cell* 66, 433-449.
- Saber, A., Saleuddin, M. (1999). Dorsal bodies in Mollusca. In: *Encyclopedia of reproduction* (Eds. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 910-916.
- Saffman, E.E., Lasko, F. (1999) Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1141-1163.
- Sano, H., Nakamura, A., Kobayashi, S. (2002) Identification of a transcriptional regulatory region for germline-specific expression of *vasa* gene in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.* 112, 129-139.

- Sastry, A.N. (1979). Pelecypoda (excl. Ostreidae). In: *Reproduction in Marine Invertebrates* (Eds. Giese A.C *et al.*), Academic Press, New York, pp. 113-292.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Sénécal, L., Goudreau, P., Fournier, M. (2002) Phagocytic activity of marine freshwater bivalves : in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat. Toxicol.* 58, 189-200.
- Schmid, S.R., Linder, P. (1992) D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol. Microbiol.* 6, 283-292.
- Shafee, M.S. (1986). Biological adaptation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) in a Moroccan lagoon at Oualida. *5th. African Seminar on Aquaculture.* 227-245
- Shaw, B.L., Battle, H.I. (1957) The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35, 325-347.
- Shibata, N., Umesono, Y., Orii, H., Sakurai, T., Watanabe, K., Agata, K. (1999) Expression of *vasa* (*vas*)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Dev. Biol.* 206, 73-87.
- Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Hamaguchi, S. (2000) The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth. Differ.* 42, 317-326.
- Siomi, H., Dreyfuss, G. (1997) RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 7, 345-353.
- Smith, P.J., Ozaki, H., Fujio, Y. (1986) No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Freshwater res.* 20, 569-574.
- Soares-Da-Silva, I.M., Ribeiro, J., Valongo, C., Pinto, R., Vilanova, M., Bleher, R., Machado, J. (2002) Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of haemocytes in *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. Phys. A* 132, 541-553.
- Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D., Gouletquer, P. (1998) Hydrobiology of the Marennes-Oleron Bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. *Hydrobiologia* 386, 1-3.
- Spanò, M., Evenson, D.P. (1993) Flow cytometry analysis for reproductive biology. *Biol. Cell* 78, 53-62.
- Sphigel, M. (1989) Gametogenesis of the European flat oyster (*Ostrea edulis*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in warm sea water in Israel. *Aquaculture* 80, 343-349.
- Steele, S., Mulcahy, M.F. (1999) Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 70, 673-686.
- Stoeckmann, A.M., Garton, D.W. (2001) Flexible energy allocation in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in response to different environmental conditions. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 20, 486-500.
- Storey, K.B., Storey, J.M. (2004) Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79, 207-233.
- Styhler, S., Nakamura, A., Swan, A., Suter, B., Lasko, P. (1998) *vasa* is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development* 125, 1569-1578.

- Suresh, R., Aravindan, G.R., Moudgal, N.R. (1992) Quantification of spermatogenesis by DNA flow cytometry: comparative study among six species of mammals. *J. Biosciences* 17, 413-419.
- Takada, T., Nakajima, H. (1992) An analysis of life history evolution in terms of the density-dependent Lefkovich Matrix model. *Math. Biosci.* 112, 155-176.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Kobayashi, T., Takeuchi, T. (2002) Mass isolation of primordial germ cells from transgenic Rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by *vasa* gene promoter. *Biol. Reprod.* 67, 1087-1092.
- Tam, P., Zhou, S. (1996) The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev. Biol.* 178, 124-132.
- Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., Noce, T. (2000) The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 14, 841-853.
- Tardy, J. (1970) Organogenèse de l'appareil génital chez les Mollusques. *Bull. Soc. Zool. France* 95, 407-427.
- Thomson, J.M. (1952) The acclimatization and growth of the Pacific oyster (*Gryphaea gigas*) in Australia. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 3, 64-73.
- Thomson, J.M. (1958) The naturalization of the Pacific oyster in Australia. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 10, 144-149.
- Tijsterman, M., Ketting, R.F., Plasterk, H.A. (2002) The genetics of RNA silencing. *Annu. Rev. Genet.* 36, 489-519.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Takahashi, Y., Matsui, Y., Satoh, M., Noce, T. (2000) Expression and intracellular localization of mouse VASA-homologue protein during germ cell development. *Mech. Develop.* 93, 139-149.
- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T., Noce, T. (2000) Isolation of Chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127, 2741-2750.
- Utting, S.D., Millican, P.F. (1997) Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155, 47-56.
- Van Doren, M., Williamson, A.L., Lehmann, R. (1998) Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr. Biol.* 8, 243-246.
- Verdonk, N.H., Cather, J.N. (1983). Morphogenetic determination and differentiation. In: *The Mollusca. Development* (Eds. Verdonk N.H., Van den Biggelaar J.A.M, Tompa, A.S.), Academic Press, New York, pp. 215-252.
- Verdonk, N.H., Van den Biggelaar, J.A.M. (1983). Early development and the formation of the germ layers. In: *The Mollusca. Development* (Ed. N.H. Verdonk, J.A.M.V.d.B., Tompa, A.S.), Academic Press, New York, pp. 91-122.
- Vincent, C., Griffond, B., Gomot, L., Bride, J. (1984) Etude *in vitro* de l'influence des corps dorsaux sur l'ovogenèse d'*Helix aspersa* Müller. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54, 230-235.
- Waller, T.R. (1981). Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linné. In: *Contrib. Zool.*, Smithsonian, pp. 70.

- Walne, P.R. (1974) Culture of bivalve molluscs, 50 years experience at Conwy. Fishing news book, 189 pp.
- Warrior, R. (1994) Primordial germ cell migration and the assembly of the Drosophila embryonic gonad. *Dev. Biol.* 166, 180-194.
- Weidinger, G., Wolke, U., Köprunner, M., Klinger, M., Raz, E. (1999) Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. *Development* 126, 5295-5307.
- Weidinger, G., Wolke, U., Köprunner, Thisse, C., Thisse, B., Raz, E. (2002) Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. *Development* 129, 25-36.
- Williamson, A., Lehman, R. (1996) Germ cell development in Drosophila. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12, 365-391.
- Wilson, E.B. (1892) The cell lineage of Nereis. *J. Morphol.* 6, 361-481.
- Wilson, J. (1981) Hatchery rearing of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*, Ireland, 32 pp.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P. (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 130-138.
- Wolke, U., Weidinger, G., Köprunner, M., Raz, E. (2002) Multiple levels of posttranscriptional control lead to germ line-specific gene expression in the Zebrafish. *Curr. Biol.* 12, 289-294.
- Woods, F.H. (1931) History of the germ cells in *Sphaerium striatinum* (Lam.). *J. Morphol.* 51, 545-595.
- Wylie, C. (1999) Germ cells. *Cell* 96, 165-174.
- Xue, Q.G., Renault, T., Chilmonczyk, S. (2001) Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the european flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish Shellfish Immun.* 11, 557-567.
- Ying, S., Zhang, Z. (1998). Ovarian hormones, overview. In: *Encyclopedia of reproduction*, (Eds Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San diego. pp 578-582.
- Yoon, C., Kawakami, K., Hopkins, N. (1997) Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124, 3157-3166.
- Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., Takeuchi, T. (2000a) Cloning and characterization of a vasa-Like gene in Rainbow Trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 364-371.
- Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., Takeuchi, Y., Takeuchi, T. (2000b). Isolation and characterization of rainbow trout vasa-like gene and its application to primordial germ cell's marker *6th. Int. Symp. on the Reproductive Physiology of Fish.* 499 pp
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., Ihara, S., Takeuchi, T. (2002) Primordial germ cells: The blueprint for a piscine life. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 3-12.
- Zeeman, A.M., Stoop, H., Boter, M., Gillis, A.J.M., Castrillon, D.H., Oosterhuis, J.W., looijenga, L.H.J. (2002) VASA is a specific marker for both normal and malignant human germ cells. *Lab. invest.* 82, 159-166.
- Zirkin, B.R. (1999). Hormonal control of spermatogenesis. In: *Encyclopedia of reproduction*, (Eds Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 556-563.

Liste des figures et tableau

Figure 1 :	Classification phylogénétique des Métazoaires simplifiée d'après Le Cointre et Le Guyader (2001).	6
Figure 2 :	Formation des cellules germinales primordiales à partir de déterminants cytoplasmiques comme par exemple chez <i>Drosophila</i> , <i>Caenorhabditis</i> , <i>zebrafish</i> ou <i>Xenopus</i> ou par des interactions cellulaires comme chez les mammifères.	8
Figure 3 :	Les deux types de cellules germinales souches (GSCs), stéréotypiques et populationnelles.	12
Figure 4 :	Les différentes étapes de la spermatogenèse des mollusques.	14
Figure 5 :	Les différentes étapes de l'ovogenèse des mollusques.	16
Figure 6 :	Développement des cellules germinales, de la fécondation à la maturité sexuelle.	18
Figure 7 :	Schéma des séquences consensus des DEAD-box protéines d'après Schmid et Linder (1992).	23
Figure 8 :	Localisation des ARNm et des protéines de <i>vasa</i> , et des PGCs au cours du développement embryonnaire de <i>Drosophila</i> , <i>Caenorhabditis</i> , <i>Xenopus</i> et <i>Danio</i> , d'après Saffman et Lasko (1999); Yoon <i>et al.</i> (1997).	27
Figure 9 :	Localisation et action de VASA dans l'ovocyte et dans le jeune embryon de drosophile.	28
Figure 10 :	Migration des PGCs chez différents organismes modèles <i>Drosophila</i> , <i>Danio</i> , <i>Mus</i> , d'après Saffman et Lasko (1999); Yoon <i>et al.</i> (1997).	32
Figure 11 :	Ramassage des huîtres à Oléron au début du XX ^{ème} siècle.	38
Figure 12 :	L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> fermée et ouverte, valve droite enlevée.	40
Figure 13 :	Anatomie générale de l'huître creuse <i>Crassostrea virginica</i> dans sa valve gauche, d'après : Galtsoff (1964).	41
Figure 14 :	Organisation des tubules gonadiques mâles et femelles de <i>Crassostrea gigas</i> pendant la gamétogenèse.	45
Figure 15 :	Chronologie des grandes étapes du cycle de reproduction de <i>Crassostrea gigas</i> en milieu tempéré.	46
Figure 16 :	Cycle de développement de <i>Crassostrea gigas</i>	48
Figure 17 :	Les principales étapes de la caractérisation d'un gène candidat.	56
Figure 18 :	Positionnement des amorces utilisées le long du gène <i>Oyvlg</i> (Oyster <i>vasa</i> -like gene).	57
Figure 19 :	Les principales étapes de la PCR (Polymerase chain reaction).	60

Figure 20 :	Structures expérimentales pour le conditionnement de géniteurs de <i>Crassostrea gigas</i> et les élevages larvaires.	65
Figure 21 :	Températures et photopériodes moyennes appliquées dans les conditionnements expérimentaux naturel, accéléré et hivernal.	66
Figure 22 :	Représentation schématique des différents prélèvements et analyses réalisés dans les conditionnements naturel (NC), accéléré (AC) et hivernal (WC).	70
Figure 23 :	Coupes histologiques de masse viscérale d'huîtres adultes, colorées à l'hématoxyline-éosine.	72
Figure 24 :	Les différentes étapes de l'analyse d'images avec le logiciel IMAQ Vision Builder (National Instrument). Détermination de la surface d'un tissu sur une coupe histologique d'huître.	72
Figure 25 :	Mode d'action des fluorochromes de type SYBR Green utilisés en PCR en temps réel, d'après Poitras et Houde (2002).	74
Figure 26 :	(A) Courbes d'amplification d'ADNc par PCR en temps réel. Exemple de l'amplification d'une gamme de dilution d'un échantillon. (B) Droite de régression des cycles seuils de chaque point de gamme, calcul de l'efficacité de la PCR (C) Courbe de fusion.	76
Figure 27 :	Représentation schématique d'un cytomètre de flux.	81
Figure 28 :	Graphes d'analyse des résultats de cytométrie en flux.	84
Figure 29 :	Représentation graphique de l'analyse phylogénétique des protéines orthologues de VASA et d'autres protéines de la famille des DEAD-box.	94
Figure 30 :	Quantité relative de transcrits du gène <i>Oyvg</i> au mois de mars dans six tissus d'huîtres issues du conditionnement expérimental naturel (NC).	95
Figure 31 :	Localisation des transcrits du gène <i>Oyvg</i> dans le tissu gonadique de <i>Crassostrea gigas</i> au cours de la gamétogenèse par hybridation <i>in situ</i>	96
Figure 32 :	Expression du gène <i>Oyvg</i> par hybridation <i>in toto</i> au cours du développement embryonnaire et larvaire de <i>Crassostrea gigas</i>	100
Figure 33 :	Schéma synthétique de la formation des cellules de la lignée germinale chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> au cours de l'embryogenèse, de l'ovocyte à la métamorphose.	104
Figure 34 :	Distribution des populations cellulaires de gonade d'huître mâle en maturation en fonction de leur contenu en ADN analysées par cytométrie en flux.	108
Figure 35 :	Surfaces gonadiques des huîtres issues des conditionnements expérimentaux (A) naturel, (B) accéléré et (C) hivernal.	124
Figure 36 :	Tubule gonadique d'une huître mâle issue du conditionnement hivernal (WC) en décembre.	125

Figure 37 :	Tubule gonadique d'une huître issue du conditionnement accéléré (AC) en août.	125
Figure 38 :	Analyse des résultats de PCR en temps réel obtenus par amplification du gène <i>fElongI</i> pour une gamme de dilution d'un échantillon de gonade d'huître.	148
Figure 39 :	Quantités relatives de transcrits du gène <i>Oyvg</i> , dans le tissu gonadique des huîtres issues des conditionnements naturel, accéléré et hivernal.	150
Figure 40 :	Coupes histologiques de masse viscérale d'huîtres issues du conditionnement naturel (NC) en avril (croissance gonadique) et en juin (à maturité).	152
Figure 41 :	Quantités relatives de transcrits du gène <i>Oyvg</i> , dans le tissu gonadique des huîtres issues des conditionnements expérimentaux naturel, accéléré et hivernal, pondérées par la valeur individuelle de surface gonadique.	154
Figure 42 :	Développement des cellules germinales de <i>Crassostrea gigas</i> du stade embryonnaire au stade adulte.	162
Figure 43 :	(A) Cellules germinales souches dans un îlot gonadique en développement, (B) Différents stades de développement de l'ovocyte.	164
Figure 44 :	Les différentes étapes de la résorption d'un ovocyte résiduel après une ponte partielle.	166
Figure 45 :	Corrélation entre le cycle de température de l'eau (cycle annuel moyen de Marennes-Oléron) et les stades de gamétogenèse de <i>Crassostrea gigas</i> dans le conditionnement naturel (NC).	171
Figure 46 :	Schéma général du cycle de vie des cellules germinales chez <i>Crassostrea gigas</i>	176
Tableau 1 :	Liste des échantillonnages effectués entre février 2002 et février 2003 dans les conditionnements naturel (NC), accéléré (AC) et hivernal (WC).	68

Liste des abréviations

1M	1 molaire (1 mole/litre)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
BEt	Bromure d'Ethidium
<i>Bmvlg</i>	<i>Bombyx mori vasa</i> -like gene
<i>Ci-DEAD-1</i>	<i>Ciona intestinalis</i> -DEAD-1
<i>Cnvasa</i>	cnidarian <i>vasa</i>
<i>Cvh</i>	chicken <i>vasa</i> -homologue
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
DIG	digoxigénine
<i>Djvlg-A</i>	<i>Dugesia japonica vasa</i> -like gene-A
DNase	désoxyribonucléase
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
<i>fElong</i>	facteur d'élongation
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GFP	Green-Fluorescent Protein
<i>Glh-1</i>	germ line helicase-1
GMSF	Gonial Mitosis Stimulating Factor
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GSCs	Germinal Stem Cells, cellules germinales souches
GTH	GonadoTropin Hormone
GVBD	Germinal Vesicle Break Down
HIS	Hybridation <i>In Situ</i>
hpf	heure post-fécondation
IP	Iodure de propidium
JH	Juvenile Hormone
Jpf	jour post-fécondation
LH	Luteinizing Hormone
<i>Mvh</i>	Mouse <i>vasa</i> -homologue
ORF	Open Reading Frame

<i>Oyvlg</i>	Oyster <i>vasa</i> -like gene ; suivant les conventions, <i>Oyvlg</i> désigne le gène ou l'ARNm et OYVLG désigne la protéine
pb	paires de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne
PGCs	Primordial Germ Cells, cellules germinales primordiales
RACE-PCR	Rapid Amplification of cDNA Ends, Amplification rapide des extrémités des ADNc
RNAi	RNA interference
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
<i>Tu-vasa</i>	<i>Tetranychus urticae-vasa</i>
UPGMA	Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean
UTR	UnTranslated Region
v/v	volume / volume
w/v	poids / volume
<i>Xvlg 1</i>	Xenopus <i>vasa</i> -like gene

Title

Origin and development of germ cells in *Crassostrea gigas* oyster: relevance for controlled reproduction in hatchery

Abstract

A comprehensive knowledge of *Crassostrea gigas* oyster reproduction processes is essential to optimize controlled reproduction in hatchery. This study aimed to determine the origin and the mechanisms of annual renewal of germ cells, still unknown in oysters, and the influence of temperature and photoperiod parameters on the regulation of the reproductive cycle. We characterized an orthologue of the *vasa* gene, the *Oyvgl* (Oyster *vasa*-like gene), the first germ cell specific marker isolated in molluscs. This marker was used to study *C. gigas* germline development. Oyster germ cells appeared specified during early development from mesentoblast 4d, as primordial germ cells (PGCs) determined by maternal cytoplasmic determinants, including *Oyvgl* mRNA. In adult oysters, the annual renewal of germ cells results from a proliferation of germinal stem cells (GSCs), self-renewing cells, scattered in the conjunctive tissue during the resting period. One-year experimental conditionings were realized to determine temperature and photoperiod parameter effects on oyster gametogenesis. Experimental conditionings consisted in (1) natural temperature and photoperiod conditions corresponding to Marennes-Oléron bay values, (2) accelerated conditions, twice faster than natural cycles and (3) constant wintering conditions adjusted to 8°C and 8 hours day-length. These analyses revealed a high plasticity of *C. gigas* reproduction since the rhythm of the reproductive cycle was entirely modelled by temperature and photoperiod variations. Decreasing photoperiod may regulate GSCs proliferation while low temperature (8°C-11°C) would enhance gonial mitosis and high temperature would accelerate germ cell maturation. As a result, manipulation of temperature and photoperiod conditions allows effective controlled reproduction all over the year.

Key words

Crassostrea, germ cells, gametogenesis, Oyster *vasa*-like gene, regulation, controlled reproduction

Titre

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

Résumé

Le renouvellement annuel de la population de cellules germinales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* est une étape clé de son cycle de reproduction. La compréhension de ces mécanismes est essentielle à la maîtrise de la reproduction contrôlée de *C. gigas*, indispensable pour répondre à une demande croissante des ostréiculteurs, de naissain produit en éclosion. Les objectifs de cette étude étaient de déterminer l'origine et les mécanismes de renouvellement annuel des cellules germinales de *C. gigas* et de comprendre l'influence des facteurs environnementaux sur ces processus. Le gène Oyster *vasa*-like gene (*Oyvlg*), premier marqueur spécifique des cellules germinales découvert chez les bivalves a été caractérisé. Ce gène, exprimé spécifiquement dans les cellules de la lignée germinale, nous a permis de déterminer que les cellules germinales de *C. gigas*, d'origine mésodermique, étaient différenciées dès le stade embryonnaire sous la forme de cellules germinales primordiales (PGCs). Ces PGCs seraient spécifiées par la localisation de déterminants cytoplasmiques transmis maternellement à l'embryon, dans une structure équivalente à un cytoplasme germinale. Les ARNm *Oyvlg* seraient l'un de ces déterminants germinaux. Au stade adulte, la population de cellules germinales apparaît renouvelée annuellement par la prolifération, au début du cycle de reproduction, de cellules germinales souches (GSCs), dispersées en petits groupes dans le tissu conjonctif pendant la période de repos sexuel. La différenciation des GSCs en gonies et la multiplication de ces gonies marque le début de la gamétogenèse. Afin de tester l'effet de la température et de la photopériode sur la gamétogenèse, des huîtres adultes ont été conditionnées expérimentalement pendant un an en éclosion, dans trois conditions de température et de photopériode différentes : (1) conditions dites "naturelles" reproduisant les cycles de température et de photopériode moyens enregistrés à Marennes-Oléron, (2) conditions "accélérées", deux fois plus rapides que les cycles naturels, (3) conditions "hivernales" constantes à 8°C et 8 heures de jour. Ces expérimentations ont mis en évidence une grande plasticité physiologique de la reproduction de *C. gigas*, dont le rythme se synchronise parfaitement sur celui des facteurs température / photopériode. Des photopériodes décroissantes pourraient stimuler la prolifération des cellules germinales souches alors que la température apparaît comme le facteur prédominant dans la régulation des mitoses goniales et de la maturation. Les températures basses (8°C – 11°C) semblent déclencher les mitoses goniales et les températures élevées accélèrent le processus de maturation des cellules germinales. L'utilisation de cycles de température et de photopériode modifiés (accélérés ou hivernaux) permettraient d'obtenir des pontes toute l'année en éclosion, y compris en période automnale généralement considérée comme réfractaire pour le conditionnement.

Mots clés

Crassostrea, cellules germinales, gamétogenèse, Oyster *vasa*-like gene, régulation, reproduction contrôlée.

Title

Origin and development of germ cells in *Crassostrea gigas* oyster: relevance for controlled reproduction in hatchery