

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA MATURATION OVOCYTAIRE CHEZ *PECTEN MAXIMUS* ET *CRASSOSTREA GIGAS* (MOLLUSCA, BIVALVIA)

WIDOWATI I.¹, COCHARD J.C.², DORANGE G.¹ et LE PENNEC M.¹.

¹ Laboratoire de Biologie Marine, Faculté des Sciences, U.B.O., 29287 BREST Cédex

² Laboratoire PMDC, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 PLOUZANE

RESUME : La fécondation *in vitro* des ovocytes prélevés par scarification de la gonade de géniteurs matures s'est jusqu'à présent révélée impossible chez *Pecten maximus*, contrairement à ce qui est généralement constaté en écloserie pour *Crassostrea gigas*. Pour tenter d'expliquer cette différence, les évènements qui se déroulent entre le début de la stimulation de ponte et la fécondation ont été étudiés expérimentalement chez ces deux espèces. Des essais de fécondation et d'élevage larvaire (48h) ont été réalisés sur des ovocytes prélevés par scarification de la gonade, par ponction dans les voies génitales (*P.maximus*) et enfin sur les ovocytes émis. Les gamètes femelles des divers lots ont été systématiquement observés sur coupe semi-fines. Chez *P.maximus* l'aspect de la vésicule germinale des ovocytes en cours d'expulsion de la glande génitale a également été examiné sur coupes sériées d'une gonade fixée en tout début de ponte. Il apparaît que chez *P.maximus* les ovocytes prélevés *in situ* ne sont fécondables et viables que lorsqu'ils proviennent d'individus ayant commencé à pondre. L'histologie révèle que la maturation ovocytaire (rupture de la vésicule germinale) se produit dans les acini immédiatement avant le début de l'expulsion des premiers ovocytes dans le milieu. Ce phénomène a lieu au même moment chez *C.gigas* mais, pour cette espèce, la maturation des ovocytes prélevés par scarification peut être déclenchée *in vitro* par le sperme lui-même.

Mots clés : *Pecten maximus*, *Crassostrea gigas*, maturation ovocytaire

EXPERIMENTAL STUDY OF OOCYTIC MATURATION IN *PECTEN MAXIMUS* AND *CRASSOSTREA GIGAS* (MOLLUSCA, BIVALVIA)

ABSTRACT : To date, it has been impossible to fertilize the oocytes of ripe *Pecten maximus* obtained by gonad stripping as it is routinely done in hatchery with *Crassostrea gigas*. The events occurring between artificial induction of spawning and normal fertilization were studied experimentally in order to explain this difference. Fertilization and rearing trials were performed on oocytes obtained from the gonads of both species by scarification, by aspiration from genital ducts (of *P.maximus* only) and after spawning. Every batch of oocytes was fixed for histological study. Serial sections of the gonad of a fixed spawning *P.maximus* were made to reveal modifications of the nucleus of the oocytes during their expulsion. In *P.maximus* the stripped oocytes can be fertilized and are viable only when spawning is initiated. Histological sections show that germinal vesicle breakdown occurs at this very moment. The same was observed in *C.gigas* but it appears that in this species sperm can also induce the oocyte maturation of stripped oocytes.

Keywords : *Pecten maximus*, *Crassostrea gigas*, oocytic maturation

INTRODUCTION

Le procédé classiquement utilisé en éclosérie pour induire le déclenchement des émissions gamétiques est la stimulation des reproducteurs par chocs thermiques, d'amplitude variable selon les espèces (Le Pennec, 1981).

Dans un but de simplification des techniques et de gain de temps, d'autres méthodes d'obtention des gamètes ont été utilisées en éclosérie. Tel est le cas du prélèvement direct par scarification de la gonade pratiqué en routine pour l'huître *Crassostrea gigas* (Langdon, 1983).

Contrairement à ce qui est généralement constaté chez *C. gigas*, il s'est avéré jusqu'à présent impossible chez la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*, de féconder les ovocytes prélevés directement dans la gonade d'individus sexuellement matures que ces derniers aient été stimulés ou non (Cochard, données non publiées).

Chez les Bivalves, les ovocytes sont, comme pour la plupart des espèces, bloqués soit en prophase I de la méiose soit en métaphase I jusqu'à l'émission et la fécondation (Longo, 1983; Lucas, 1984; Giese et Kanatani, 1984). Une liste des bivalves appartenant à chacune de ces catégories a été dressée par Longo (1983). Mais les données de la littérature apparaissent souvent contradictoires. C'est notamment le cas pour *Crassostrea virginica*, dont les ovocytes seraient émis au stade prophase I selon Galtsoff (1964), Raven (1966), Costello et Henley (1971) et après la reprise de méiose selon Longwell et Stiles (1968). Le stade prophase I est caractérisé par la présence d'un volumineux noyau, la vésicule germinale. La rupture de cette vésicule germinale, en réponse à divers stimuli, est le marqueur cytologique de la maturation ovocytaire. Après la rupture de la vésicule germinale et la reprise de méiose, les ovocytes subissent généralement un deuxième blocage en métaphase I, stade auquel ils deviennent fécondables (Longo, 1983).

Afin de mieux comprendre les événements qui se déroulent entre le début de la stimulation de ponte et la fécondation, chez la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* et l'huître *Crassostrea gigas*, une étude expérimentale a été menée en éclosérie. Des élevages larvaires et des observations histologiques ont été effectués à partir d'ovocytes prélevés dans des conditions différentes, dans la gonade, les voies génitales et le milieu extérieur.

MATERIEL ET METHODES

Les huîtres proviennent du bassin de Marennes-Oléron ou de l'Aber Benoît et les coquilles Saint-Jacques de la Rade de Brest. Ces animaux ont été conditionnés en éclosérie. Les reproducteurs ont été débarrassés de leur épifaune par un brossage rapide puis des chocs thermiques ont été effectués. Pour l'huître, la température de l'eau a été rapidement augmentée de 20 °C à 30 °C puis abaissée à 20 °C au bout de 30 minutes en cas d'absence d'émission gamétique. Les chocs thermiques se sont poursuivis jusqu'à l'expulsion des gamètes. Pour la coquille Saint-Jacques, les températures minimale et maximale ont été respectivement de 17 °C et 24 °C. Dès les premières émissions, les géniteurs ont été abondamment rincés par de l'eau de mer filtrée à 1 µm puis isolés dans des béciers où ils ont continué à émettre leurs gamètes. Les ovocytes émis par chaque géniteur ont été échantillonnés après passage au travers d'un tamis de 80 µm qui retient les fèces. Le sperme émis par plusieurs individus a aussi été recueilli.

La scarification de la gonade a été effectuée par incision légère du tégument. Les ovocytes ont été récupérés par lavage de la glande génitale avec de l'eau de mer filtrée à 1 μm . Ils ont ensuite été tamisés à 80 μm . Des huîtres mâles ont également été scarifiées pour réaliser un mélange de sperme.

Afin de suivre l'évolution des ovocytes dans la gonade de *C. gigas* entre le début de la stimulation de ponte et l'émission, une centaine d'huîtres a été mise en expérimentation. Au temps $t=0$, des ovocytes ont été prélevés chez 5 individus. Des prélèvements ont aussi été effectués systématiquement sur 5 individus, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes et 2 heures après le début des stimulations. Les ovocytes des différents géniteurs ont été mélangés dans chaque cas.

Pour la coquille Saint-Jacques, comme pour l'huître, des gamètes femelles ont aussi été prélevés par scarification de la gonade. Par ailleurs, des ponctions à la seringue ont été réalisées chez des individus en début de ponte dans les voies génitales, les gonoductes et les reins, qui sont aisément repérables par la présence d'ovocytes colorés. Les ovocytes émis ont aussi été étudiés.

Dans tous les cas les ovocytes ont été fécondés par addition d'un mélange de sperme de plusieurs mâles selon la méthode décrite par Gruffydd et Beaumont (1970). La fécondation des ovocytes a été vérifiée par observation des globules polaires. Les oeufs ont été mis en élevage selon leur abondance dans des béciers de 2 l ou dans des bacs cylindro-coniques de 150 l ou de 450 l remplis d'eau de mer filtrée à 1 μm . Dans les bacs, un bullage a été assuré en permanence. La densité des embryons était de 30 000 par litre (Calabrese et Davis, 1970). Les larves atteignent le stade véligère ou larve D au bout d'environ 24 heures à 25 °C pour les huîtres (Fujita, 1929) et de 48 heures à 18 °C pour les coquilles Saint-Jacques (Le Pennec, 1974).

L'analyse des données a été faite sur les taux d'éclosion de géniteurs stimulés et non stimulés pour *C. gigas*. Les comparaisons statistiques (test t) ont été effectuées sur les transformés arcsinus des données (Scherrer, 1984; Steel et Torrie, 1980) après vérification de la normalité (Scherrer, 1984). La même transformation arcsinus a été appliquée aux données concernant *P. maximus* avant une analyse de variance à un critère de classification (Scherrer, 1984). Une régression linéaire simple a été utilisée sur les taux d'éclosion d'ovocytes prélevés par scarification de géniteurs stimulés de *C. gigas* pendant des temps variables (Scherrer, 1984).

Les ovocytes des divers lots ont été fixés au glutaraldéhyde 2,5 % en tampon cacodylate 0,2 M (pH 7,3) dont l'osmolarité est de 1100 mOsm, postfixés au tétr oxyde d'osmium 1 % dans ce même tampon puis inclus en résine de Spurr (Spurr, 1969). Des coupes semi-fines de 1 μm d'épaisseur ont été confectionnées et colorées au bleu de toluidine.

Enfin, la gonade d'une coquille Saint-Jacques en tout début de ponte et celle d'un individu stimulé mais n'ayant pas pondu ont été fixées au Bouin. Elles ont été incluses dans la paraffine et débitées en coupes sériées qui ont été colorées par le trichrome de Masson (Gabe, 1968).

LEGENDE DE LA PLANCHE 1

Crassostrea gigas

Photo 1 : Coupe semi-fine colorée au bleu de toluidine d'ovocytes prélevés dans la gonade avant stimulation thermique. La vésicule germinale (↓) est visible.

Photo 2 : Coupe semi-fine d'ovocytes prélevés dans la gonade après 2 heures de stimulations thermiques d'un géniteur n'ayant pas pondu : présence de la vésicule germinale (↓).

Photo 3 : Coupe semi-fine d'ovocytes émis : rupture de la vésicule germinale.

Pecten maximus

Photo 4 : Vésicule germinale rompue . Fuseaux de division (↓) dans un ovocyte présent dans un rein. Des spermatozoïdes (↓↓) sont visibles autour de l'ovocyte.

Photo 5 : Coupe en paraffine de la gonade d'une coquille en début de ponte. Absence de vésicule germinale dans tous les ovocytes du centre de l'acinus (↓). Présence de cette vésicule dans les ovocytes plus jeunes de la périphérie(↓↓).

Photo 6 : Vésicule germinale rompue, fuseaux de division (↓) dans deux ovocytes du centre d'un acinus gonadique.

Photo 7 : Coupe en paraffine d'une gonade de coquille stimulée mais n'ayant pas pondu. La vésicule germinale (↓) est visible dans tous les ovocytes.

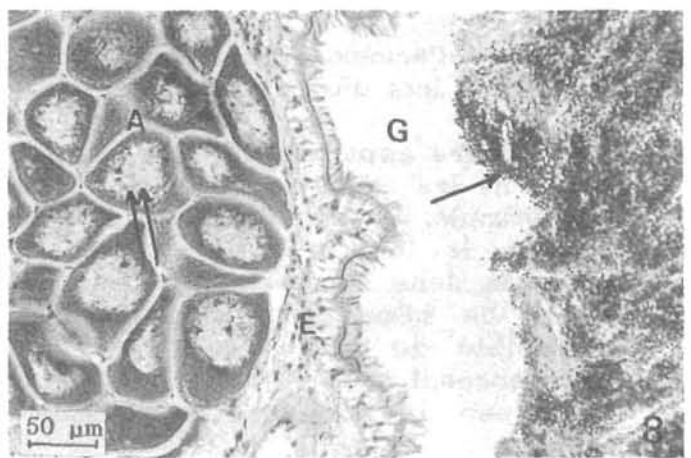
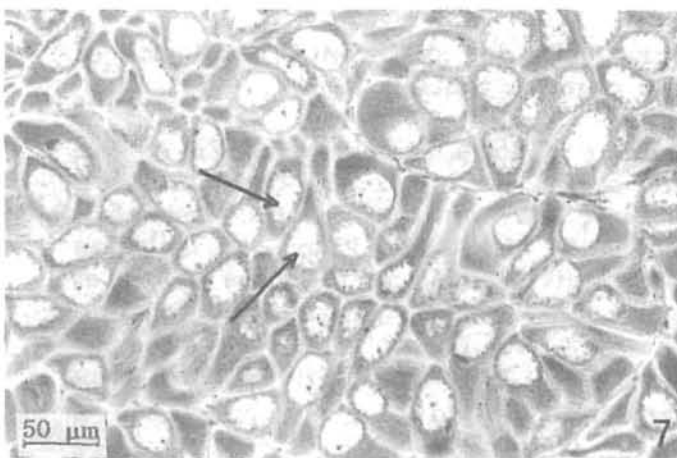
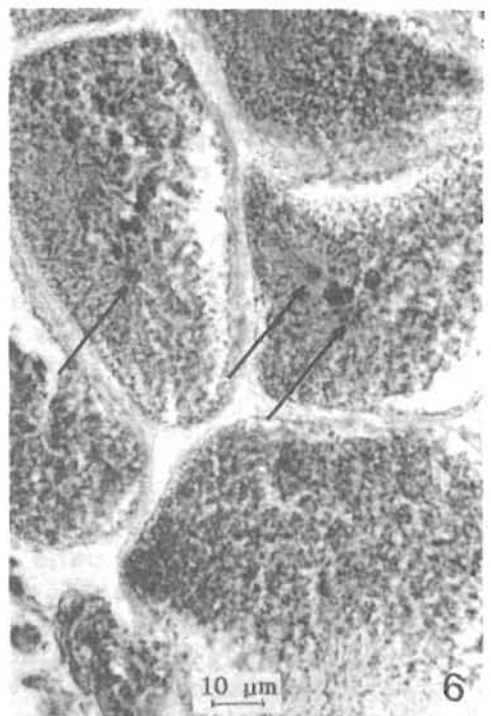
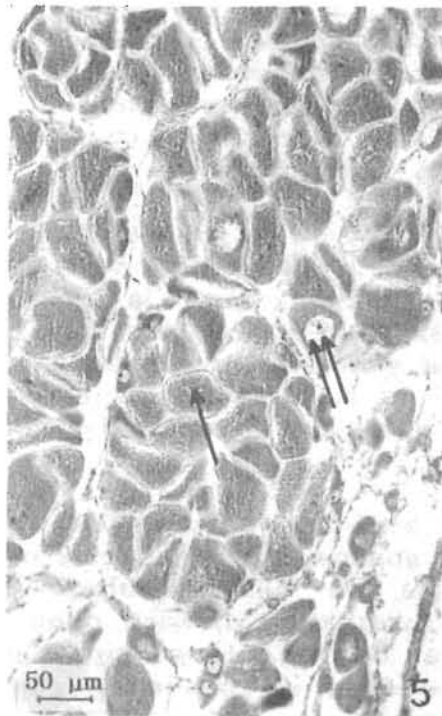
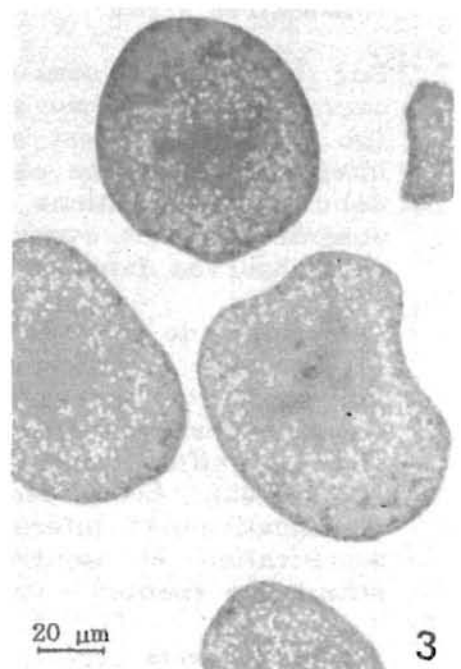
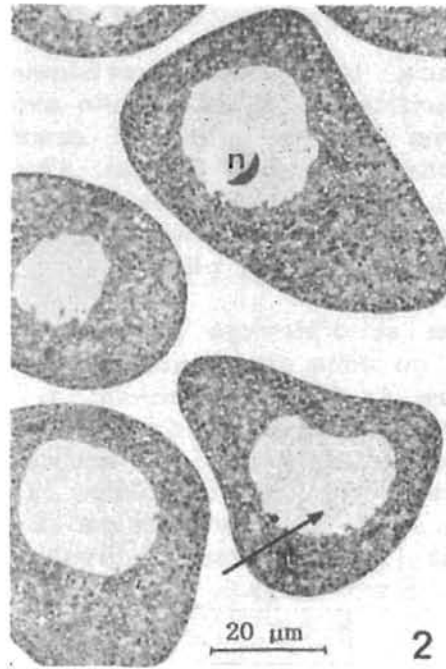
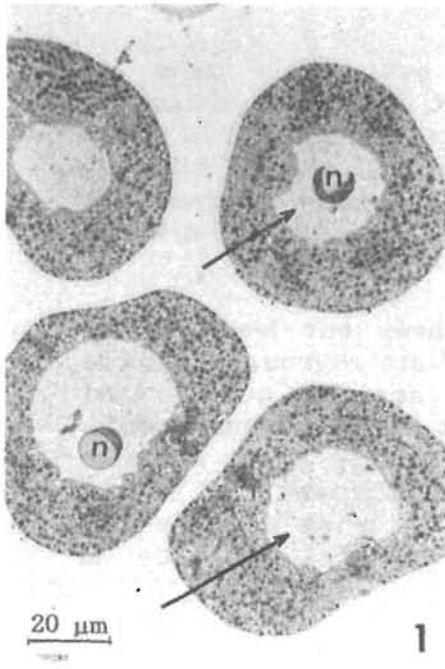
Photo 8 : Coupe en paraffine de gonade d'une coquille en début d'émission de spermatozoïdes (↓). La vésicule germinale (↓↓) est visible dans tous les ovocytes présents dans les acini gonadiques.

A : acinus

E : épithélium cilié du gonoducte

G : gonoducte

n : nucleole



RESULTATS

Crassostrea gigas

Sur les coupes semi-fines, la vésicule germinale est visible dans les ovocytes prélevés par scarification de la gonade avant stimulation thermique (pl. 1, ph. 1). C'est aussi le cas pour les gamètes femelles prélevés à intervalles de temps réguliers (15 min, 30 min, 45 min, 2 heures) après le début des stimulations (pl. 1, ph. 2). En revanche, la vésicule germinale est absente dans les ovocytes fixés après émission et des fuseaux de division sont observés dans les gamètes (pl. 1, ph. 3).

Les essais de fécondation et d'élevage larvaire réalisés sur les ovocytes prélevés par scarification ou émis ont donné les résultats regroupés dans le tableau 1 et l'histogramme 1. Dans le tableau 1, il apparaît que le taux d'éclosion est d'environ 87 % lorsque les ovocytes ont été normalement émis. Il est significativement plus faible après scarification : 59 % en moyenne ($\alpha = 0,05$). Les résultats de l'histogramme 1 confirment la valeur significativement inférieure du taux d'éclosion des ovocytes obtenus par scarification et montrent que ce taux n'évolue pas au cours de la stimulation (pente = - 0,01, $r = - 0,11$).

Pecten maximus

Sur les coupes de gonade de la coquille Saint-Jacques stimulée mais n'ayant pas pondue, la vésicule germinale est présente dans tous les ovocytes (pl. 1, ph. 7), y compris dans ceux d'apparence mature du centre des acini (pl.1, ph. 7). Des spermatozoïdes sont pourtant en cours d'émission et remplissent les conduits évacuateurs (pl. 1, ph. 8).

L'observation des coupes sériées de la gonade de *P. maximus* fixée en début de ponte montre en revanche la disparition de la vésicule germinale et la présence de fuseaux de division dans la quasi-totalité des ovocytes présents dans les voies génitales: gonoductes et reins (pl. 1, ph. 4). Il en est de même pour certains ovocytes encore présents au centre des acini femelles (pl. 1, ph. 5 et 6) ou situés à proximité des conduits évacuateurs. Le noyau est cependant visible dans les gamètes immatures de la périphérie des acini (pl. 1, ph. 5).

L'observation des coupes semi-fines d'ovocytes prélevés, après émission dans l'eau de mer, dans la gonade, les gonoductes et les reins de géniteurs en début de ponte, donne les mêmes résultats : absence de vésicule germinale et présence de fuseaux de division dans la plupart des gamètes femelles des différents lots. La vésicule germinale est en revanche visible dans les ovocytes prélevés dans la gonade de géniteurs non stimulés ou stimulés mais n'ayant pas pondue.

Les taux d'éclosion obtenus à deux jours pour les différents géniteurs et les divers lots d'ovocytes sont regroupés dans le tableau 2.

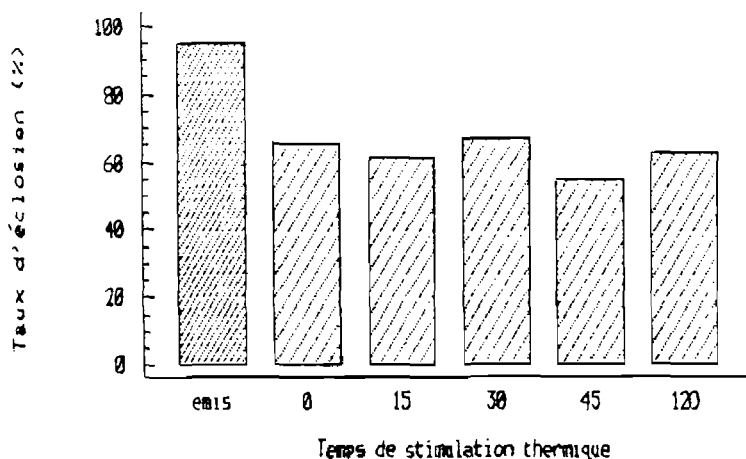
Les valeurs apparaissent très variables pour chaque prélèvement. En ce qui concerne les ovocytes obtenus par scarification de la gonade d'un individu non stimulé, le taux d'éclosion est nul. Pour les animaux ayant commencé à pondre, le taux d'éclosion varie entre 0 % et 82 %. Pour les gamètes prélevés dans les voies génitales de ces individus, il varie entre 0,7 % et 62 %. De même pour les ovocytes émis, on constate aussi une grande variabilité du taux d'éclosion : entre 4 % et 70 %. Mais, malgré ces différences, il peut être retenu que des larves D ont été obtenues pour tous les types de prélèvements réalisés chez les individus ayant commencé à pondre.

No.	Géniteurs non stimulés Ovocytes prélevés par scarification de la gonade	Géniteurs stimulés Ovocytes émis
1	-	96,0
2	-	100,0
3	-	81,0
4	-	53,5
5	-	92,0
6	-	100,0
7	62,0	-
8	64,5	-
9	60,0	-
10	66,0	-
11	27,0	-
12	27,0	-
Moyenne	59,4	87,1
Ecart type	15,5	16,3

Tableau 1. Taux d'éclosion pour *Crassostrea gigas* (%). Géniteurs stimulés et non stimulés. Les transformées arcsinus des valeurs obtenues comparées par le test t diffèrent significativement au seuil de 95%.

No.	Ovocytes prélevés 'in situ'			Ovocytes émis
	Gonade	Gonoducte	Rein	
1	0	-	-	-
2	0	-	62,0	27,5
3	0	-	-	53,0
4	1,5	6,5	13,0	4,0
5	0	-	-	25,5
6	81,5	0,7	56,5	69,5
7 (lot)	19,5	39,5	4,5	58,5

Tableau 2. Taux d'éclosion pour *Pecten maximus* (%). Géniteurs non stimulés (1) et stimulés (2 à 7). Données transformées (arcsinus) comparées par analyse de variance. Les valeurs ne diffèrent pas significativement au seuil de 95%.



Histogramme 1. Evolution du taux d'éclosion au cours de la stimulation thermique. Comparaison avec les ovocytes émis. Le taux d'éclosion n'évolue pas significativement au cours du temps au seuil de 95% (pente = 0,01 ; r = 0,11).

DISCUSSION

Les expériences réalisées au cours de ce travail confirment que chez *C. gigas* il n'est pas nécessaire d'induire la ponte chez des individus matures pour réaliser avec succès des fécondations.

L'étude histologique révèle que les gamètes femelles de *C. gigas* prélevés par scarification de la gonade avant ou pendant la stimulation thermique possèdent encore leur vésicule germinale. Cette dernière s'est en revanche rompue dans les ovocytes émis conformément à l'observation de Longwell et Stiles (1968) chez *C. virginica*. Cependant, les résultats des élevages larvaires effectués à l'aide d'ovocytes obtenus par scarification montrent que la fécondation peut avoir lieu chez *C. gigas* quelque soit l'état de la vésicule germinale, comme c'est le cas chez *Crassostrea echinata* (Wada, 1968), *Spisula sachalinensis* et *Macra sulcatoria* (Ginsburg, 1974).

Il semble que la rupture de la vésicule germinale de *C. gigas* se produise dans les acini immédiatement avant le début de l'expulsion des premiers ovocytes dans le milieu. Cette donnée devra être confirmée par l'examen histologique d'une huître fixée en début de ponte, dès l'émission des premiers ovocytes.

Le sperme de *C. gigas* est capable de lever le blocage de méiose. Une étude expérimentale s'avère nécessaire pour déterminer le mécanisme de reprise de méiose.

En ce qui concerne *P. maximus*, les résultats des expériences réalisées en éclosérie, corrélés aux données histologiques, montrent qu'au cours des pontes induites, les ovocytes de ce bivalve ne sont pas émis bloqués au stade prophase I comme l'indiquaient Gruffydd et Beaumont (1970). La rupture de la vésicule germinale et l'apparition des fuseaux de division indiquant la fin de la prophase et la reprise de méiose, se produisent en effet dans les ovocytes encore présents dans la gonade et pas seulement après la ponte comme le pensaient Raven (1966) et Gruffydd et Beaumont (1970). Ces observations sont conformes à celles de Mason (1958), dont les explications, non basées sur l'expérience, ne paraissent cependant pas satisfaisantes : cet auteur émet en effet l'hypothèse qu'au cours de la ponte, l'eau de mer remonterait les voies génitales vers les acini et que le contact avec l'eau serait à l'origine de la reprise de méiose. Cette explication est à l'évidence insuffisante : aucune reprise de méiose n'est en effet constatée sur les ovocytes prélevés par scarification sur des géniteurs non stimulés et mis au contact de l'eau de mer. Mais la maturation ovocytaire se produit seulement au moment précis, donc juste avant l'apparition des premiers ovocytes dans le milieu. Ceci est en accord avec Longo (1983), puisque dans les coquilles Saint-Jacques émettant des spermatozoïdes, la vésicule germinale est encore visible.

Les ovocytes de *P. maximus*, sont donc fécondables dès la rupture de la vésicule germinale puisque des larves ont pu être obtenues en éclosérie à partir des lots d'ovocytes prélevés *in situ* par scarification de la gonade ou par ponction dans les gonoductes et les reins. Cependant les résultats apparaissent hautement variables. La variabilité interindividuelle considérable du taux d'éclosion habituellement constatée chez *P. maximus* (Le Pennec et al, 1990, sous presse) se retrouve ici pour les ovocytes émis. Une autre source de variation explique les résultats négatifs de certains des prélèvements effectués dans la gonade des coquilles en cours de ponte: la vidange de la glande génitale est très rapide et si le prélèvement est

tardif, il ne subsiste dans les acini que des ovocytes immatures qui n'étaient pas destinés à être émis. Enfin, dans les gonoductes et les reins les écarts particulièrement importants et les différences constatées avec les ovocytes émis peuvent s'expliquer par les caractéristiques particulières de l'atrésie ovocytaire chez *P. maximus*. Celle-ci est d'importance variable dans le temps, selon les individus, mais aussi "géographiquement" dans la gonade: il est fréquent d'observer sur les coupes histologiques des acini remplis d'ovocytes atrésiés côtoyant des acini dont les ovocytes ont une apparence normale (Lubet, 1987; Dorange, 1989; Paulet, 1990). Or, les prélèvements ont été effectués à un instant donné de l'émission sur une fraction des ovocytes émis. Il est fort possible que le mécanisme de ponte qui conduit à la vidange de la gonade, acinus par acinus, ou groupe d'acini par groupe acini (Masson, 1958) soit responsable de fluctuations très rapides de la viabilité des ovocytes qui transitent dans les voies génitales ou qui ont été émis dans les conditions expérimentales de ce travail. Habituellement, l'évaluation du taux d'éclosion représente des moyennes calculées sur des pontes totales.

Les manipulations montrent clairement que pour que des fécondations *in vitro* soient possibles chez *P. maximus*, il faut que les géniteurs aient été stimulés et que la ponte soit déjà initiée. Le mécanisme conduisant à la reprise de méiose chez *P. maximus* apparaît différent de celui de *C. gigas* dans la mesure où la levée du blocage de la méiose par le sperme lui même n'est pas possible. Il est clair que l'ovocyte au moment de la ponte reçoit un message, sans doute de type hormonal, qui déclenche la rupture de la vésicule germinale. Les mécanismes par lesquels l'ovocyte répond à ce message diffèrent sensiblement chez les deux espèces puisque la présence de sperme provoque cette rupture chez *C. gigas* mais pas chez *P. maximus*. La coquille Saint-Jacques et l'huître constituent donc deux modèles intéressants pour l'étude comparative des mécanismes de la maturation ovocytaire.

CALABRESE, A., DAVIS, H.C., 1970. Tolerances and requirement of embryos and larvae of bivalve molluscs. Helgol. Meerensunters, 20 : 553-564

COSTELLO, D.P., HENLEY, C., 1971. Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos. Baker Mfg. Co. Printers, New Bedford, Massachusetts.

DORANGE, G., 1989. Les gamètes de *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). Thèse de doctorat d'Université - Université de Bretagne Occidentale. I. 140 p, II. 33 planches.

FUJITA, T., 1929. On the early development of the common Japanese Oyster . Jpn. Zool, 2 : 353 - 358.

GABE, M., 1968. Techniques histologiques. Masson et cie. Paris. 1133 p.

GIESE, A.C., KANATANI, H., 1987. Maturation and spawning. In : Reproduction of marine invertebrate, vol. IX. ed. A.C. GIESE, J.S. PEARSE, V.B. PEARSE. Blackwell scientific publication, California. 251 - 329.

GINSBURG, A.S., 1974. Fertilization of the eggs of bivalve mollusks with different insemination conditions. Ontogenesis 5 : 341 - 348.

- GRUFFYDD, Ll.D., BEAUMONT, A.R., 1970. Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* (Mollusca, Lamellibranchia). Helgol. Meeresunters, 20 : 486 - 497.
- LANGDON, C.J., 1983. New techniques and their application to studies of bivalve nutrition. Proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition : biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition. Louisiana state university, Louisiana. 305 - 320.
- LE PENNEC, M., 1974. Morphogenèse de la coquille de *Pecten maximus* (L) élevée au laboratoire. Cah. Biol. Mar. Tome XV : 475 - 482.
- LE PENNEC, M., 1981. Les méthodes expérimentales induisant la ponte chez les Mollusques Bivalves marins. Haliotis, 11 : 139 - 155.
- LE PENNEC, M., GUEGUEN, F., COCHARD, J.C., PAULET, Y.M., DORANGE, G. 1990. Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* (Mollusque, Bivalve) et les performances des larves en élevage. Haliotis, 20, (sous presse).
- LONGO, F.J., 1983. Meiotic maturation and fertilization. In : The Mollusca, vol. 3. ed. N.H. VERDONK, J.A.M. VAN DEN BIGGELAR, A.S.TOMPA. Academic Press, New York. 49 - 83 p.
- LONGWELL, A.C., STILES, S.S., 1968. Fertilization and completion of meiosis in spawned eggs of the American oyster *Crassostrea virginica* GMELIN. Caryologica, 21 (1) : 65 - 75.
- LUBET, P., BESNARD, J.Y., FAVERIS, R., ROBBINS, I., 1987. Physiologie de la reproduction de la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus* L). Oceanis, 13 (13) : 265 - 290.
- LUCAS, A., 1984. Développement contrôlé des bivalves marins. Haliotis, 14 : 143 - 158.
- MASON, J., 1958. The breeding of the scallop, *Pecten maximus* (L) , in Manx Waters. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 37 : 653 - 671.
- PAULET, Y.M., 1990. Rôle de la reproduction dans le déterminisme du recrutement chez *Pecten maximus* (L) de la Baie de Saint-Brieuc. Thèse de doctorat d'Université. Université de Bretagne Occidentale. 314 p.
- RAVEN, Chr. P., 1958. Morphogenesis: The analysis of molluscan development, Pergamon Press, London. 22 - 57.
- SCHERRER, B. 1984. Biostatistique. Gaëtan Morin Ed., Canada. 388 -392.
- SPURR, A.R., 1969. A low-viscosity epoxy-resin embedding for electron . microscopy. J. Ultrastruc. Res., 26 : 31 - 43.
- STEEL R.G.D & J.H TORRIE. 1980. Principles and procedures of statistics. Mc. Graw- Hill Inc.
- WADA, S.K., 1968. Mollusca: Amphineura, Gastropoda, Scaphopoda, Pelecypoda. In : Invertebrate Embryology. ed. M. KUME, K. DAN. NOLIT Pub. House, Belgrade, Yugoslavia.