

Critères histologiques d'évaluation de la qualité des ovocytes émis par *Pecten maximus* (Mollusque Bivalve)

Germaine DORANGE, Yves-Marie PAULET, Marcel LE PENNEC et Jean-Claude COCHARD

Résumé — Des études structurales ont été réalisées sur des ovocytes de *Pecten maximus*, lors de leur émission, pour mettre en évidence des caractéristiques renseignant sur leur qualité. Trois types ovocytaires ont été définis : ovocytes d'apparence normale, immatures et surmatures atrétiques. L'examen histologique révèle une forte variabilité des inclusions lipidiques des ovocytes au sein d'une ponte et entre les pontes et l'analyse d'image permet de les quantifier. Un indice de lipides a été défini. Sur 40 pontes examinées, 65% se révèlent homogènes. Les valeurs du taux d'éclosion sont partiellement expliquées par la teneur en lipides des gamètes. La présence de larves anormales au 2^e jour d'élevage peut être associée aux faibles valeurs de l'indice de lipides.

Criteria for quality assessment of spawned oocytes of *Pecten maximus* (Mollusca Bivalvia)

Abstract — Structural studies were conducted on spawned oocytes of *Pecten maximus* in order to reveal some characteristics related to their quality. Depending on their ultrastructural configuration three types of oocytes were considered: oocytes of normal appearance, immature and atretic surmature. Histological examination shows a strong variability in lipid content inside and between spawnings which has been quantified by image analysis. A lipid index was defined. 65% of 40 spawnings can be regarded as homogeneous. Hatching success is partly explained by the quantity of lipids in the gametes. The presence of abnormal larvae after 2 days can be related to the low values of the lipid index.

Abridged English Version — Recent studies conducted on the scallop *Pecten maximus*, in hatchery and in the wild, provide evidence of the importance of the quality of gametes on larval development and recruitment ([1] to [6]). The problem is how to define the condition of the ripe gametes. In order to reveal some characteristics of just spawned oocytes, two methods were used: ultrastructural histology for detailed architecture, and cytochemistry for lipid content which can be quantified by image analysis of semi-thin histological sections.

Adults of *Pecten maximus* were sampled in the Bay of Saint-Brieuc (France) from June through August and transferred to a hatchery for experimentation. Thermic stimulations were applied to get the gametes ([7], [8]). After fertilization [9] the embryonic development was followed till the straight-hinge stage (48 hrs. at 18°C).

Three types of oocytes were defined by TEM observations: oocytes of normal appearance, immature and atretic surmature. Their characteristics, given in the Table I, are illustrated by the Figure 1.

Examination of semi-thin sections, colored with a specific lysochrome, the oil red O, reveal high variability of oocytes lipid content (Fig. 2). This variability concerns the quantity, distribution and size of the lipidic inclusions.

The lipid index varies from 10 to 60 and for 75% of the spawnings this index is between 20 and 45 (Fig. 3 a). The distribution of the dispersion index (variance/mean), indicating the homogeneity of the spawnings, is represented on Figure 3 b. 65% of the spawnings can be qualified as homogeneous since their dispersion values are below 2. The Figure 4 (a, b, c, d) represent the linear adjustment between lipid index and hatching success and abnormality rate 2 days after fertilization. The results reveal that for the spawnings with a low quantity

of abnormal oocytes the hatching success is partially explained by the lipid content and the presence of 2 days abnormal larvae is associated with the low values of the lipid index.

The pedunculated immature oocytes cannot be fertilized as demonstrated by several experimentations.

In apparently normal oocytes, TEM observations reveal that some organelles are damaged corresponding to the beginning of an irreversible lysis ([10], [11]).

The lipid content has been suggested as significant for larval survival and growth ([12] to [17]).

Our results, obtained from various spawnings during the same season, confirm the variability of the oocytes lipid content and provide evidence for a strong relationship between this content and the larval development.

INTRODUCTION. — Des recherches récentes entreprises sur la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*, en baie de Saint-Brieuc, dans le cadre du Programme National du Déterminisme du Recrutement (PNDR), mettent en évidence l'importance de la qualité des gamètes sur le développement larvaire et le recrutement ([1] à [5]).

Les résultats obtenus sur des élevages réalisés en éclosérie, à partir de géniteurs matures provenant du milieu naturel, révèlent une forte variabilité dans le pourcentage de larves viables issues des pontes expérimentales [6]. Ces fluctuations, qui se produisent au cours d'une même saison de ponte, traduisent l'incompétence de certains ovocytes à un développement ultérieur.

Le problème qui se pose concerne la mise en évidence de caractères permettant de définir la qualité des cellules sexuelles émises lors de la reproduction et notamment les ovocytes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Une dizaine de *P. maximus*, âgés de 3 ans, ont été prélevés en baie de Saint-Brieuc une à deux fois par semaine du début juin à la fin août. A l'éclosérie les géniteurs ont été soumis à des stimulations thermiques dans le but de déclencher l'émission des gamètes ([7], [8]). En cas d'émission les ovocytes de chaque individu sont recueillis dans un béccher complété à 5000 ml par de l'eau de mer filtrée. 3 aliquotes de 100 μ l sont alors prélevés pour le dénombrement et l'observation des ovocytes au microscope.

Selon leur apparence les ovocytes sont classés en trois catégories : ovocytes normaux, immatures et atrétiques. Un échantillon d'ovocytes non fécondés est ensuite prélevé dans chaque ponte puis fixé au glutaraldéhyde à 2,5% en vue d'une étude au MET et de l'estimation de la quantité de lipides sur coupes semi-fines.

Le reste des ovocytes émis est fécondé selon la procédure classique [9] et le développement embryonnaire est suivi afin de pouvoir calculer, au bout de 2 jours, le taux d'éclosion qui correspond au pourcentage de larves obtenues par rapport au nombre d'ovocytes fécondés, ainsi que le taux d'anomalies larvaires.

Sur les coupes semi-fines ($e = 1 \mu$ m) les lipides sont mis en évidence par une coloration au rouge à l'huile 0 réalisée pendant 24 h à 37°C. La spécificité de la coloration a été vérifiée sur des témoins après extraction des lipides par un mélange méthanol/chloroforme (v/v) pendant 6 h à 60°C. L'image de la coupe d'un ovocyte ainsi coloré est ensuite numérisée à l'aide d'un analyseur d'images selon une grille de 512 pixels (points images) de côté. Un seuillage ne retenant que les gris les plus forts, qui correspondent aux lipides colorés, est réalisé. Il permet d'obtenir un indice de lipides équivalent à la fraction de

TABLEAU I

Microscopie optique	Ovocytes matures d'apparence normale	Ovocytes immatures	Ovocytes surmatures atrétiques
Microscopie électronique	<p><i>1a-Cytostructure normale</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Enveloppe vitelline épaisse (5-6 μm). – Noyau : contours irréguliers chromatine grenue. – Nombreuses inclusions denses. * granules corticaux (moyennement denses, membrane limitante ondulée, contenu granulaire). * inclusions lipidiques (petites et osmiophiles). * plaquettes vitellines (volumineuses et denses). <p>1a1-Beaucoup d'inclusions lipidiques 1a2-Peu d'inclusions lipidiques</p> <p><i>1b-Cytostructure altérée</i></p> <p>1b1-Nodules anormaux de R.E.G.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Mitochondries altérées. – Noyau : contours très irréguliers. <p>1b2-R.E.G. plus ou moins dilaté</p> <ul style="list-style-type: none"> – Mitochondries altérées. – Noyau : contours très irréguliers. <p>1b3-Enveloppe vitelline altérée.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Altérations de 1b1 et 1b2 possibles. <p>1b4-Enveloppe vitelline rétractée.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Densification de l'ovocyte. <p>1b5-Enveloppe vitelline absente.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Polarisation de certains organites. <p>1b6-Enveloppe vitelline altérée (ou absente).</p> <ul style="list-style-type: none"> – Polyspermie. 	<p><i>Cytostructure équivalente à 1a</i></p>	<p><i>3a-Nécrose essentiellement périphérique</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Enveloppe vitelline décollée. – Membrane plasmique intacte ou rompue. – Noyau altéré (chromatine modifiée, enveloppe dilatée). – Granules corticaux éclatés. <p><i>3b-Nécrose généralisée</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Clarification globale de l'ovocyte. – Rupture de l'enveloppe vitelline et de la membrane plasmique, vidange de l'ovocyte. – Seules inclusions intactes : inclusions lipidiques et plaquettes vitellines.

surface de l'image occupée par ces corps. Cette analyse quantitative est réalisée sur 40 pontes obtenues durant la période de prélèvement et ayant fait l'objet d'un élevage larvaire. Pour chaque ponte l'indice de lipides a été calculé sur 20 ovocytes et trois descripteurs ont été retenus : l'indice moyen de la ponte, le pourcentage d'ovocytes pauvres en réserves (indice < 20) ainsi que le paramètre de dispersion intra-ponte variance/moyenne.

Une analyse de corrélation a été effectuée entre l'indice de lipides (indice de lipides moyen et pourcentage d'ovocytes pauvres en réserves) et les performances de l'élevage (taux d'éclosion et taux d'anomalies larvaires, 2 jours après la ponte). Afin que les anomalies structurales détectées à la ponte (ovocytes immatures ou atrétiques) ne masquent pas l'effet d'une variabilité du contenu lipidique, seules les 14 pontes d'au moins 5 millions d'ovocytes et présentant plus de 50% d'ovocytes normaux ont été considérées dans ce calcul.

RÉSULTATS. — L'observation ultrastructurale permet de différencier 3 types ovocytaires dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau I et illustrées par la figure 1. La nature chimique des inclusions cytoplasmiques a été mise en évidence par Dorange [10].

L'examen des coupes semi-fines colorées au rouge à l'huile 0 révèle une forte variabilité du contenu lipidique des ovocytes émis, y compris dans les cellules de cytostructure normale (fig. 2). Cette variation concerne la quantité, la répartition et la taille des inclusions lipidiques.

L'indice de lipides varie de 10 à 60 et 75% des pontes ont un indice compris entre 20 et 45 (fig. 3 a). 65% des pontes peuvent être qualifiées d'homogènes en raison d'une valeur de l'indice de dispersion inférieur à 2 (fig. 3 b). Les pontes hétérogènes ont un indice variant de 2 à 8.

L'analyse des corrélations, obtenues pour 14 pontes, donne les valeurs suivantes (tableau II).

Dans tous les cas, le coefficient de corrélation est significativement différent de 0 ($P < 0,05$). Les figures 4 (a, b) et 4 (c, d) illustrent la distribution des valeurs observées autour de l'ajustement linéaire calculé.

DISCUSSION. — Les ovocytes pédonculés, qualifiés d'immatures, ne sont pas fécondables, aucun développement ultérieur n'ayant été observé. La structure de ces ovocytes au contenu clair ne semble différer de celle des ovocytes matures que par la variation de l'osmiophilie des inclusions lipidiques et l'irrégularité d'épaisseur de l'enveloppe vitelline.

Chez les ovocytes matures d'apparence normale, certains présentent des lésions élémentaires affectant divers organites. De telles altérations ne sont pas décelables à l'examen direct, car elles ne modifient pas l'aspect morphologique de l'ovocyte. Elles représentent en fait des phases plus ou moins évoluées dans le déroulement d'un processus dégénératif qui aboutit à la nécrose totale de l'ovocyte comme l'ont montré des examens de coupes histologiques de gonades [5]. Des phénomènes de dégénérescence ovocytaires ont déjà été décrits chez certains bivalves, par examen de coupes de gonades ([11], [3], [4], [12], [5]). Cependant, à notre connaissance c'est la première fois qu'une telle étude est réalisée sur des gamètes émis. Les résultats ainsi obtenus apportent des éléments de réponse à certains échecs de la reproduction de *Pecten maximus* tant en éclosure que dans le milieu naturel [1].

Pour les pontes à faible taux d'anomalies ovocytaires le taux d'éclosion est partiellement expliqué par la teneur en lipides des ovocytes émis. De même la présence de larves anormales au deuxième jour d'élevage est associée aux faibles valeurs de l'indice de lipides. La quantité de lipides accumulés dans les ovocytes durant la vitellogenèse a

EXPLICATIONS DES PLANCHES

Planche I

Fig. 1. — Caractéristiques ultrastructurales des trois types ovocytaires (d'après observations au MET). 1 : apparence normale; 1b1 à 1b6 : diverses altérations des structures. 2 : immature. 3 : surmature atrétique.

Fig. 1. — Ultrastructural characteristics of the three oocyte types (after TEM observations). 1: normal appearance; 1b1 to 1b6: various alterations. 2: immature. 3: atretic surmature.

Fig. 2. — Coupes semi-fines d'ovocytes. a : les granulations lipidiques, de couleur sombre, sont homogènes et abondantes. n : zone nucléaire. b : rareté des inclusions lipidiques. c : hétérogénéité des lipides.

Fig. 2. — Semi-thin section of oocytes. a: the dark lipid inclusions are homogeneous and abundant. n: nuclear area. b: scarcity of lipid granules. c: heterogeneity of lipids.

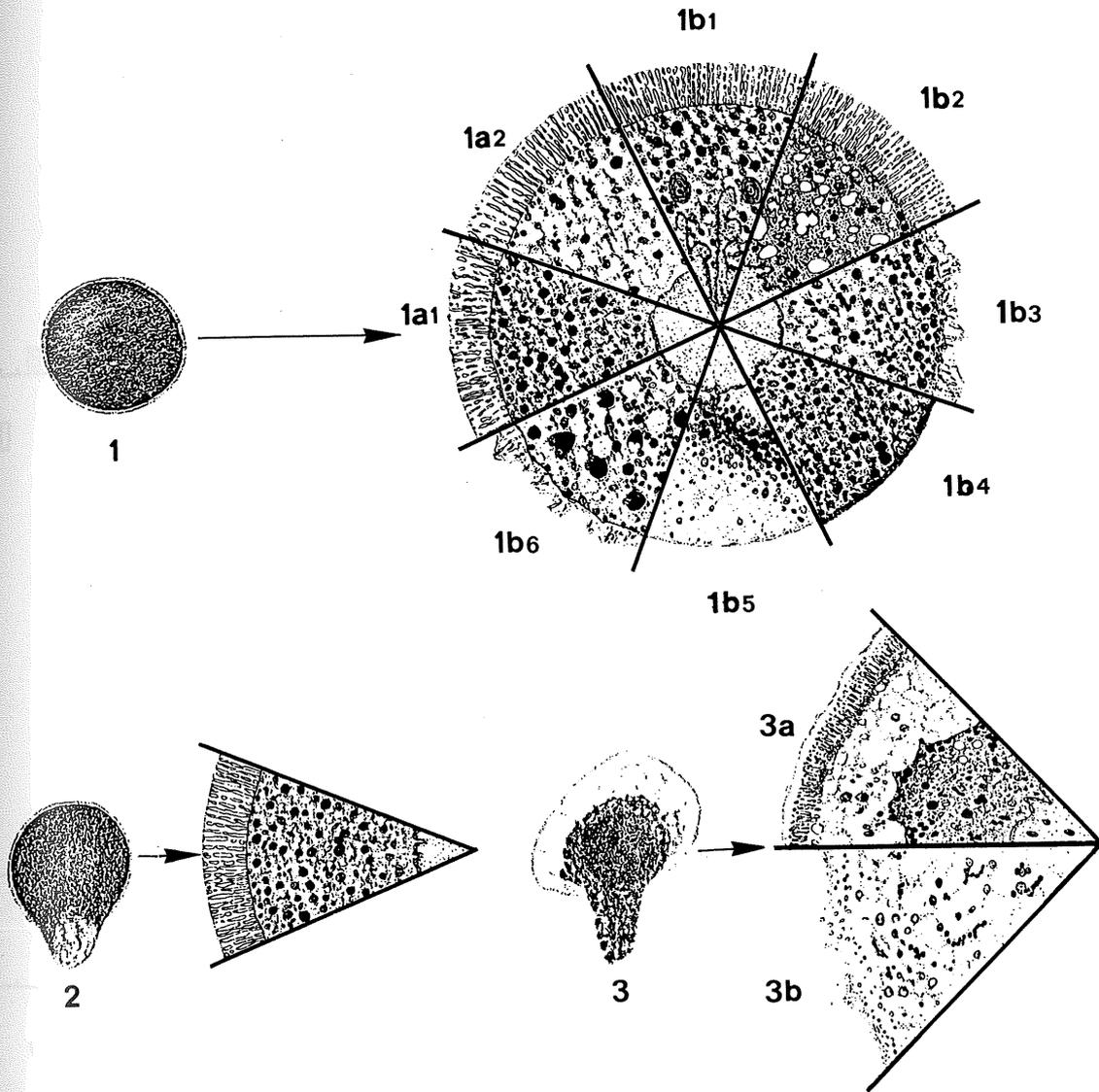


Fig. 1

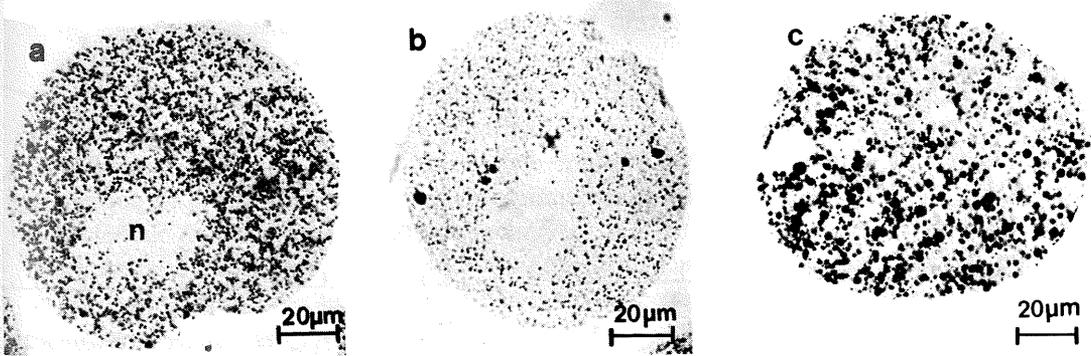


Fig. 2

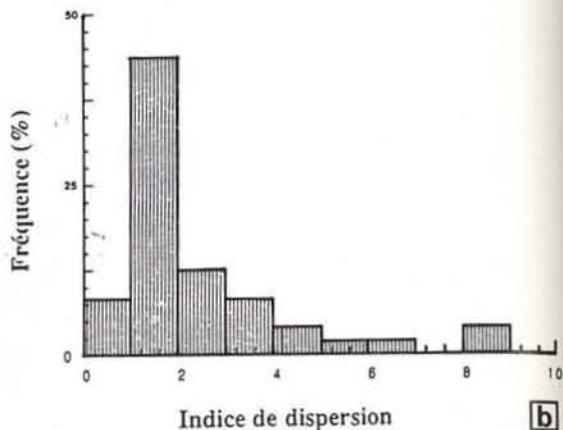
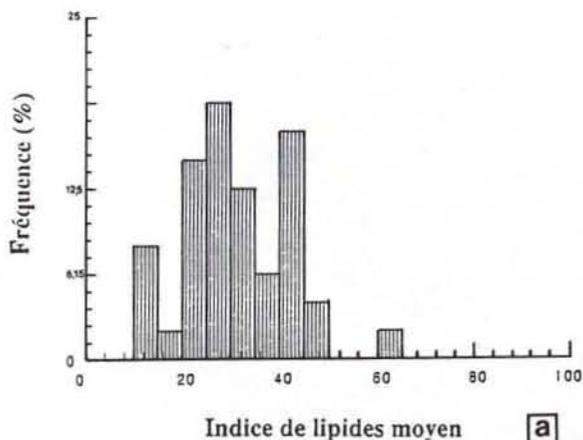


Fig. 3

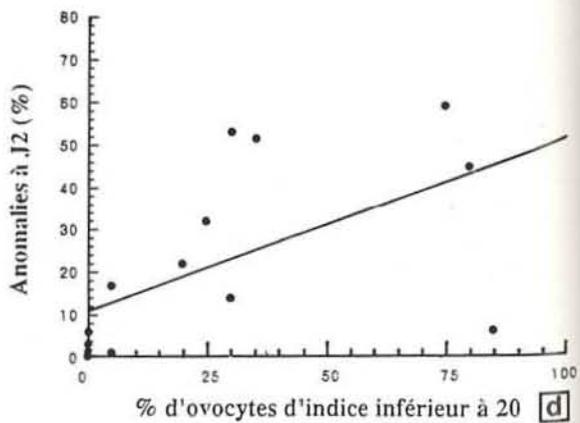
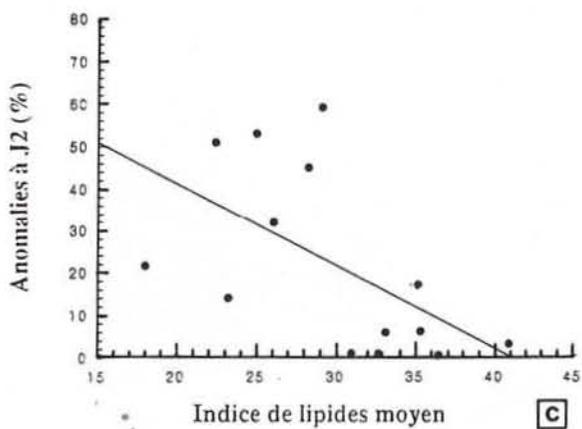
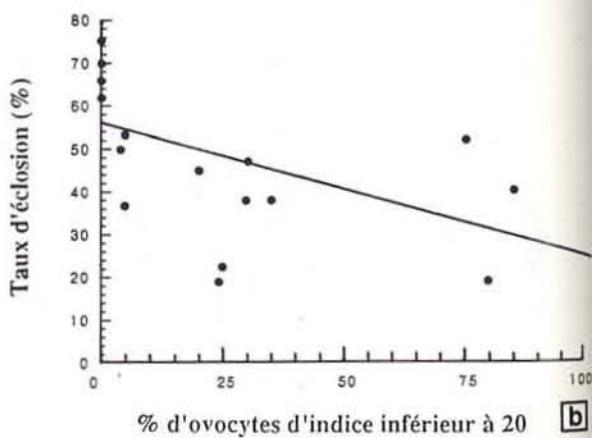
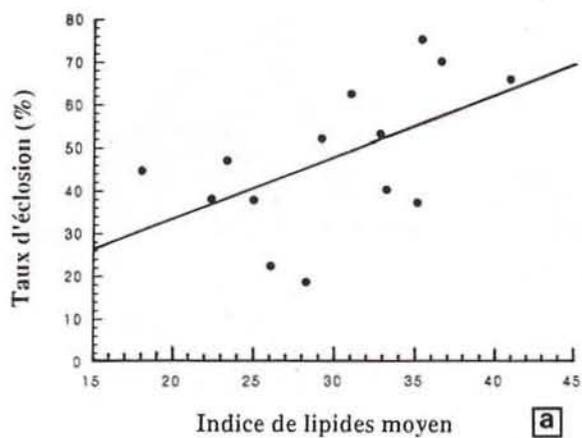


Fig. 4

Planche II

Fig. 3. — Distributions de l'indice de lipides moyen calculé pour chaque ponte (a) et du coefficient de dispersion (variance/moyenne) (b).

Fig. 3. — Distributions of the mean lipid index calculated for each spawning (a) and dispersion index (variance/mean) (b).

Fig. 4. — Droites d'ajustement du taux d'éclosion et du pourcentage de larves anormales 2 jours après la fécondation, avec l'indice de lipides moyen (a, c), et avec la fréquence des ovocytes d'indice inférieur à 20 (b, d).

Fig. 4. — Fitted lines of the linear regressions between the hatching success and the percentage of abnormal larvae 2 days fertilization, and the mean lipid index (a, c), and the frequency of oocytes with and index less than 20 (b, d).

souvent été présentée comme déterminante pour la survie des larves ([13], [14]). Ces lipides sont en effet consommés abondamment durant la phase endotrophe d'organogenèse [15].

Les résultats du présent travail, réalisé à partir d'ovocytes obtenus après stimulation thermique de géniteurs n'ayant subi aucun conditionnement artificiel préalable, sont conformes à ceux obtenus par Bayne et ses collaborateurs ([16], [17]) sur *Mytilus edulis* après maturation contrôlée des géniteurs. En revanche, l'information ovocyte par ovocyte, livrée par l'analyse d'image des coupes semi-fines, est nouvelle. Cette approche de la variabilité de la vitellogenèse, détectée entre différentes pontes, mais également entre les ovocytes issus d'un même géniteur, permet d'entrevoir des conséquences sur la survie aux stades ultérieurs de développement. Cette variabilité pourrait aussi expliquer la différence observée en baie de Saint-Brieuc entre l'intensité de la ponte de *P. maximus* et la quantité de larves.

TABLEAU I

Valeurs du coefficient de corrélation entre l'indice de lipides et les performances de l'élevage au 2^e jour (J2).

Values of the correlation coefficient between lipid index and hatching success (day 2).

	Taux d'éclosion	Anomalies à J2 (%)
Indice de lipides moyen	0,539	-0,572
Fréquence des ovocytes pauvres en réserves (indice < 20)	-0,572	0,574

Les résultats obtenus mériteraient d'être confortés par une analyse d'images sur un plus grand nombre de pontes, qui permettrait sans doute de déterminer un seuil de lipides nécessaires à l'obtention de larves de bonne qualité. Cependant, l'état actuel de la technique ne permet pas encore une discrimination des diverses concentrations lipidiques à l'intérieur des inclusions, mais des recherches sont en cours dans ce sens, dans notre laboratoire. D'autres indices de condition pourraient aussi être recherchés afin d'aboutir à une simplification des techniques et l'élaboration de tests applicables, en routine, dans les écloséries.

Note remise le 20 avril 1989, acceptée après révision le 26 mai 1989.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. BOUCHER, *I.C.E.S. C.M.* 23/Sess. Q, I.R.E.P. Problem, 1985, 10 p.
- [2] J. BOUCHER, *C. R. symposium P.N.D.R.*, Nantes, 1987, p. 43-52.
- [3] P. LUBET, L. ALBERTINI et I. ROBBINS, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 303, série III, 1986, p. 575-580.
- [4] P. LUBET, J. Y. BESNARD, R. FAVERIS et I. ROBBINS, *Océanis*, 13, 3, 1987, p. 265-290.
- [5] G. DORANGE, Y. M. PAULET et M. LE PENNEC, *Haliotis*, 19, 1988 (sous presse).
- [6] Y.-M. PAULET, A. GERARD et A. LUCAS, *Advances in Invertebrate reproduction*, Elsevier Sc. Publ., 1986, p. 535.
- [7] D. BUESTEL, J. C. COCHARD, J. C. DAO et A. GERARD, *Vie Marine*, 4, 1982, p. 24-28.
- [8] Y.-M. PAULET, A. LUCAS et A. GERARD, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 119, 1988, p. 145-156.
- [9] LI. D. GRUFFYDD et A. R. BEAUMONT, *Helgol. Wiss. Meeresunters*, 20, 1970, p. 486-497.
- [10] G. DORANGE, *Thèse d'Université*, Brest, 1989, 158 p.
- [11] L. ALBERTINI, *Thèse de 3^e cycle*, Caen, 1985, 117 p. XV pl.
- [12] R. K. PIPE, *Mar. Biol.*, 1987, p. 405-414.
- [13] B. L. BAYNE, *Nature*, London, 237, 1972, p. 459.
- [14] L. CHEBAB-CHELABI, *Thèse de 3^e cycle*, Brest, 1984, 106 p.
- [15] A. LUCAS, L. CHEBAB-CHELABI et D. ALDANA-ARANDA, *Oceanologica Acta*, 9, 1986, p. 97-103.
- [16] B. L. BAYNE, P. A. GABBOTT et J. WIDDOWS, *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 55, 1975, p. 675-689.
- [17] B. L. BAYNE, D. L. HOLLAND, M. N. MOORE, D. M. LOWE et J. WIDDOWS, *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 58, 1978, p. 825-841.

G. D. : Y.-M. P. et M. L. P. : *Laboratoire de Biologie marine,
Université de Bretagne occidentale, 29287 Brest Cedex ;*

J.-C. C. : *IFREMER, Centre de Brest, B.P. n° 70, 29263 Plouzane.*