

VARIATIONS DE LA QUALITÉ DES EMBRYONS DE *Crassostrea gigas* ET DE *Pecten maximus* DUES À LA QUALITÉ DES GAMÈTES.

DEVAUCHELLE N.*, J. COSSON**, G. DORANGE***, N. DOBOVICK*, C.
FAURE*, J.P.GIRARD****, P. MICARELLI*, L. ORSINI*,*, M.E. VALDEZ***,

*Ifremer/centre de Brest, DRV/RA/Mollusques, BP 70, 29280, Plouzané (F)

** URA, 671 du CNRS, Université de Paris 6, Station marine, 06230 Villefranche /mer (F)

***Unité de culture cellulaire, UFR des Sciences et Techniques, Université de Bretagne
Occidentale, 6 Avenue Le Gorgeu, BP 809, 29285, Brest cedex. (F)

****Université de Nice Sophia Antipolis, faculté des Sciences, laboratoire de Physiologie
cellulaire et comparée, Parc Valrose, 06034 Nice cedex (F).

Résumé. La variabilité qualitative des embryons de bivalves produits en écloserie est d'origine endogène ou exogène. La recherche de méthodes adaptées à la réduction de la variabilité et à l'optimisation des résultats d'élevage nous a conduit à étudier les causes possibles des variations de qualité.

Ce papier présente des résultats d'expériences conduites sur les relations entre variations de la qualité des gamètes mâles et fécondation ou développement embryonnaire. La qualité des gamètes femelles est traitée par la présentation de résultats sur les variations de la densité des ovocytes et par une analyse bibliographique.

INTRODUCTION

La production artificielle de Mollusques Bivalves est réalisée à l'échelle industrielle, en France, depuis les années 70-80. Une forte variabilité dans la production a été constatée et pose problème. La qualité des gamètes mâle et femelle est, pour partie, à l'origine des variations de la qualité des embryons produits. Nous avons recherché sur le sperme d'huître creuse et de coquille St-Jacques les relations entre des caractéristiques anatomiques, morphologiques et physiologiques et leur pouvoir fécondant. Les résultats des expériences ont été publiés dans plusieurs documents (Devauchelle et al., 1994a, 1994b, Faure et al., 1992, 1994a, 1994b, Faure, 1996). Ce papier en présente une synthèse. La qualité des ovocytes, elle, a été appréciée chez la coquille St-Jacques par les relations entre les résultats de mesures de densité et les performances d'élevage des ovocytes fécondés. Les études réalisées sur les ovocytes sont moins nombreuses que celles réalisées sur le sperme. C'est pourquoi, en ce qui concerne les ovocytes, ce papier présente principalement les résultats d'une analyse bibliographique, qui indique quels sont les critères et les méthodes de mesure choisis, jusqu'à présent, pour qualifier les ovocytes de bivalves, les ovocytes d'autres espèces animales et d'autres modèles cellulaires que les ovocytes.

Tableau 1 : Indice de mobilité des spermatozoïdes de *Pecten maximus* en fonction du mode d'obtention et du lieu de prélèvement du sperme.

| Mode d'obtention du sperme | Sans stimulation | Stimulation thermique | | | Stimulation chimique | |
|-------------------------------|------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------------|----------------|
| | | Gonade | Gonopore | Eau de mer | Gonade | Gonopore |
| Lieu de prélèvement du sperme | Gonade | Gonade | Gonopore | Eau de mer | Gonade | Gonopore |
| Indice de mobilité | 1,8 ± 0,4 (6) | 2,2 ± 0,3 (6) | 5,0 ± 0 (6) | 5,0 ± 0 (6) | 2,0 ± 0,4 (6) | 5,0 ± 0 (6) |

Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme : moyenne ± erreur standard, le chiffre entre parenthèses indiquant le nombre de lots de sperme. L'échelle de mobilité de 1 à 5 est définie par : 1 = de 0 à moins de 1 % de cellules mobiles; 2 = de 1 à moins de 25 % de cellules mobiles; 3 = de 25 à moins de 50 % de cellules mobiles; 4 = de 50 à moins de 75 % de cellules mobiles; 5 = de 75 à 100 % de cellules mobiles.

Tableau 2 : Vitesse de déplacement des spermatozoïdes de *Pecten maximus* en fonction du mode d'obtention et du lieu de prélèvement du sperme.

| Mode d'obtention du sperme | Sans stimulation | Stimulation thermique | | | Stimulation chimique | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | Gonade | Gonopore | Eau de mer | Gonade | Gonopore |
| Lieu de prélèvement du sperme | Gonade | Gonade | Gonopore | Eau de mer | Gonade | Gonopore |
| Vitesse progressive (VSL) (µm/sec) | 117 ± 7 (3) [20] [23] [24] | 121 ± 10 (3) [18] [21] [22] | 185 ± 9 (3) [19] [21] [23] | 187 ± 8 (3) [21] [23] [24] | 119 ± 7 (3) [19] [22] [25] | 189 ± 7 (3) [16] [26] [28] |
| Vitesse curvilinéaire (VCL) (µm/sec) | 159 ± 13 (3) [20] [23] [24] | 164 ± 12 (3) [18] [21] [22] | 266 ± 9 (3) [19] [21] [23] | 273 ± 8 (3) [21] [23] [24] | 160 ± 7 (3) [19] [22] [25] | 281 ± 7 (3) [16] [26] [28] |
| Vitesse curvilinéaire (VCL) (µm/sec) | 138 ± 7 (3) [20] [23] [24] | 142 ± 9 (3) [18] [21] [22] | 225 ± 8 (3) [19] [21] [23] | 230 ± 7 (3) [21] [23] [24] | 139 ± 6 (3) [19] [22] [25] | 235 ± 6 (3) [16] [26] [28] |

Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme : moyenne ± erreur standard, le chiffre entre parenthèses indique le nombre de lots de sperme, le chiffre entre crochets le nombre de spermatozoïdes dans chaque lot.

IDENTIFICATION DES CAUSES DE LA VARIABILITÉ DES GAMÈTES MÂLES

Généralités

Pecten maximus et *Crassostrea gigas* sont deux invertébrés marins se reproduisant par fécondation externe. Les gamètes sont donc libérés dans le milieu, l'eau de mer, où se produit leur interaction. Si l'ovocyte est une cellule inerte, le spermatozoïde dispose, en revanche, de structures qui lui permettent de se déplacer à la rencontre du gamète femelle ; c'est le processus de nage. La nage débute dès l'émission du spermatozoïde dans le milieu et sa durée est variable selon les espèces. Elle est généralement fonction du capital énergétique dont dispose le gamète mâle. Le déclenchement de la nage, donc du mouvement flagellaire du spermatozoïde résulte du phénomène d'activation mettant en jeu certains éléments physicochimiques du milieu : ions, pH, pression osmotique. Chez de nombreuses espèces, avant d'être actifs lors de l'émission, les spermatozoïdes sont maintenus sous une forme inactive dans les structures urogénitales, leur évitant ainsi une dépense précoce d'énergie. Les étapes d'émission et d'activation des gamètes mâles sont décisives pour la fécondation et le développement embryonnaire. Dans la mesure où l'émission des gamètes ne résulte pas de processus naturels, c'est le cas en éclosérie par exemple, les risques d'augmenter la variabilité des taux de développement sont réels, notamment lorsque les mécanismes d'activation et les signes d'identification de la maturité des gamètes mâles sont inconnus.

Sur le plan anatomique, le spermatozoïde d'huître et de coquille St-Jacques est de type primitif. Il est caractérisé par la présence d'une pièce intermédiaire réduite entourée de 4 mitochondries et est caractérisé par une petite taille (environ 50µm de long). Le spermatozoïde de coquille St Jacques n'a pas de bâtonnet axial, contrairement à celui de l'huître creuse.

Facteurs de contrôle

Le cas de la coquille St-Jacques *Pecten maximus*

- Causes de variabilité

Le mode de collecte du sperme est une des causes de la variabilité de sa qualité. Selon le lieu de prélèvement, il est composé de cellules de la lignée germinale, de spermatozoïdes d'aspect normal, de spermatozoïdes anormaux et de spermatozoïdes altérés. Les proportions varient selon l'origine des échantillons de sperme observés (Figure 1). La respiration (Figure 2), la mobilité (Tableau 1) et le pouvoir fécondant (Figure 3) varient, eux aussi, selon les lieux de prélèvement. On distingue deux catégories de sperme :

* la première catégorie correspond au sperme dont les valeurs de respiration, de mobilité et de pouvoir fécondant sont faibles. Il provient de ponctions pratiquées directement dans les gonades d'animaux, après que ou sans que les reproducteurs aient subi une stimulation d'émission de gamètes (injection de sérotonine ou choc thermique),

* la seconde catégorie correspond au sperme dont les mobilité, respiration et pouvoir fécondant sont élevés. Un tel sperme est prélevé concentré au niveau du gonopore de géniteurs, ayant été soumis à une injection de sérotonine ou ayant subi un choc thermique, ou à du sperme émis dans l'eau de mer à la suite d'un choc thermique.

Si le mode de prélèvement du sperme modifie les capacités énergétiques des spermatozoïdes, donc l'intensité et la puissance de nage (Tableau 2) et le pouvoir fécondant (Figure 3, Tableau 3), en revanche, la forme de la trajectoire reste homogène et circulaire, (Figure 4) et l'aspect des mouvements ou l'indice de linéarité sont de caractéristiques constantes (Tableau 4).

Tableau 3 : Analyse des corrélations entre la respiration, l'indice de mobilité et le pouvoir fécondant de spermatozoïdes de *Crassostrea gigas*.

| | Respiration | Pouvoir fécondant | Indice de mobilité | Vitesse moyenne |
|--------------------|-------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| Respiration | / | - 0,036 | - 0,166 | - 0,172 |
| Pouvoir fécondant | - | / | - 0,165 | - 0,170 |
| Indice de mobilité | - | - | / | 0,137 |
| Vitesse moyenne | - | - | - | / |

Valeurs du coefficient de corrélation (R) pour n=24 n= nombre de lots de sperme; la respiration (en nmol O₂/min/mg protéines) est exprimée selon la formule : log (respiration), le pouvoir fécondant (en %) selon la formule : arcsinus (pouvoir fécondant /100), l'indice de mobilité selon l'échelle de 1 à 5 précédemment décrite et la vitesse moyenne en µm/sec.

Tableau 4 : Forme de la trajectoire, aspect des mouvements et indice de linéarité des spermatozoïdes de *Pecten maximus* en fonction du mode d'obtention et du lieu de prélèvement du sperme.

| Mode d'obtention du sperme | Sans stimulation | Stimulation thermique | | | Stimulation chimique | |
|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | | | | | | |
| Lieu de prélèvement du sperme | Gonade | Gonade | Gonopore | Eau de mer | Gonade | Gonopore |
| Forme de la trajectoire | homogène circulaire |
| Aspect des mouvements | propulsifs | propulsifs | propulsifs | propulsifs | propulsifs | propulsifs |
| Indice de linéarité (IL) | 0,71 ± 0,04 (3) [20] [23] [24] | 0,66 ± 0,02 (3) [18] [21] [22] | 0,69 ± 0,02 (3) [19] [21] [23] | 0,68 ± 0,02 (3) [21] [23] [24] | 0,69 ± 0,03 (3) [19] [22] [25] | 0,67 ± 0,02 (3) [16] [26] [28] |

Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme : moyenne ± erreur standard. Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de lots de sperme, le chiffre entre crochets, le nombre de spermatozoïdes dans chaque lot. L'indice de linéarité, compris entre 0 et 1, est calculé par le rapport vitesse progressive/vitesse curvilinéaire.

La **durée de dilution** des lots de sperme dans l'eau de mer influence la durée de l'aptitude du sperme à féconder les ovocytes. A température ambiante, l'aptitude à féconder est optimale pendant une heure (Figure 5). Si le sperme est collecté concentré, par aspiration dans une seringue au niveau du gonopore et qu'ensuite il est dilué au fur et à mesure des besoins, il garde un pouvoir fécondant optimal pendant au moins 7 heures (6 heures de conservation au frais à 4°C) et 1 heure de dilution dans l'eau de mer (Figure 5).

L'abaissement du pH dans le milieu de dilution permet, par ailleurs, de bloquer la mobilité des spermatozoïdes (Figure 6) et d'en préserver les réserves énergétiques indispensables à la nage précédant la fécondation. Le blocage à pH 5 est réversible dans le cas de blocages de 10 à 15 minutes (Figure 7). L'abaissement du pH entraîne des modifications de la nage, un changement de trajectoire et une diminution de l'indice de linéarité.

Le pH des milieux gonadiques et rénaux est proche de 6,5. Cette valeur est inférieure aux pH de l'hémolymphe et du liquide péricardique proches de 7, lui-même inférieur au pH de l'eau de mer qui avoisine 8.

Si le pH paraît nettement impliqué dans les mécanismes de répression/activation de l'activité des spermatozoïdes, en revanche, **la pression osmotique et la concentration en sodium** ne semblent jouer aucun rôle à ce niveau.

Enfin, chez la coquille St-Jacques, les **variations individuelles** ont de faibles répercussions sur le pouvoir fécondant. Elles ne peuvent être considérées comme une cause de principale variabilité de la qualité des gamètes.

- Solutions pratiques issues de ces résultats

Les conditions d'obtention du sperme jouent un rôle déterminant sur les capacités physiques et physiologiques des spermatozoïdes. Le passage du sperme dans le rein est une étape nécessaire à l'activation des gamètes mâles. Par conséquent, pour disposer de sperme de qualité optimale, il convient de prélever du sperme concentré au niveau du gonopore après stimulation chimique des reproducteurs (voir document Devauchelle et *al.* sur l'induction de la ponte par les neurotransmetteurs, dans ce rapport), de le stocker à 4°C pour réduire les dépenses énergétiques des spermatozoïdes, d'éliminer les lots de sperme dont les spermatozoïdes bougent peu après la minute de dilution dans l'eau de mer, de prendre des précautions quant au ratio spermatozoïdes/ovocyte. Le chiffre de 100 spermatozoïdes par ovocyte est un ratio satisfaisant pour éviter la polyspermie et permettre la fécondation (Figure 8).

La concentration en spermatozoïdes d'un échantillon de sperme est évaluée par comptage sous microscope photonique, par comptage automatisé (logiciel d'analyses d'images) ou par mesure de l'absorption à 480nm .

Le cas de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

- Causes de variabilité

Le mode de prélèvement du sperme : Jusqu'à présent, lorsque le sperme est recueilli par scarification de la gonade, après une stimulation thermique ou chimique (5HT), les spermatozoïdes d'huître creuse paraissent avoir une assez faible mobilité (Figure 9). En moyenne, seulement 25 à 50 % des spermatozoïdes d'un lot de sperme sont mobiles. Leur consommation d'oxygène est faible (Figure 10) comparée à celle de spermatozoïdes de

coquille St-Jacques. Cependant, le pouvoir fécondant est en moyenne plus faible que celui du sperme de la coquille St Jacques, mais non négligeable (Figure 11).

Dans tous les cas, la trajectoire est hétérogène. Les mouvements apparaissent peu propulsifs c'est-à-dire que le déplacement des spermatozoïdes est peu important. Cette trajectoire erratique (Figure 12) diffère très nettement de celle des spermatozoïdes de *Pecten maximus*, qui nous l'avons vu, est homogène et circulaire.

Lorsque le sperme est collecté dès les premières émissions, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les paramètres de mobilité, de respiration et le pouvoir fécondant. Dans ces conditions, il n'a pas été établi que les changements de mode de prélèvement de sperme (scarification, prélèvement au niveau du gonopore ou dans l'eau de mer après chocs thermiques ou injections de sérotonine dans les gonades) induisent des variations nettes de la qualité des spermatozoïdes. Toutefois, la composition des lots de sperme diffère (Tableau 5). Lorsque le sperme est recueilli 10 minutes après les premières émissions, sa mobilité est accrue. Nous avons pu constater au cours de tests réalisés pendant l'été que dans ce cas, son pouvoir fécondant est lui aussi augmenté (Figure 13).

Sur le plan physiologique, chez l'huître creuse, les spermatozoïdes sont féconds en l'absence d'un transit par les voies rénales. Ce n'est pas le cas chez la coquille St Jacques.

Tableau 5: Caractéristiques des spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* en fonction du mode d'obtention et du lieu de prélèvement du sperme.

| Mode d'obtention du sperme | Sans stimulation | Stimulation thermique | | Stimulation chimique | |
|---|---|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--|
| | | Gonade | Gonopore | Gonade | Gonopore |
| Lieu de prélèvement du sperme | Gonade | Gonade | Gonopore | Gonade | Gonopore |
| Cellules jeunes de la lignée germinale mâle | oui: gonies et spermatocytes | oui : spermatocytes et spermatides | oui: quelques spermatocytes | débris cellulaires dans 1 lot | non observées sur les coupes sauf dans 1 lot spermatocytes |
| Spermatozoïdes normaux | selon les lots majoritaires ou minoritaires | oui | oui | minoritaires | majoritaires |
| Spermatozoïdes anormaux | oui | oui, nombreux selon les lots | oui | oui | oui |
| Spermatozoïdes altérés | oui | oui | oui | oui | oui |

Le mode de conservation à court terme des spermatozoïdes a un effet sur la vitalité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Chez l'huître creuse, la mobilité (Figure 14) et le pouvoir fécondant (Figure 15) baissent très rapidement après que les spermatozoïdes aient été dilués dans l'eau de mer. Le stockage du sperme d'huître concentré, au frais (4°C) permet de reculer les opérations de fécondation de quelques heures (3 à 4 heures) sans altérer le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

L'abaissement du pH du milieu de dilution des spermatozoïdes réprime l'activité des spermatozoïdes (Figure 16), mais de manière moins sensible que chez la coquille St-Jacques.

Des modifications dans **la pression osmotique et la concentration en sodium** des milieux de dilution n'ont pas permis d'accentuer le blocage, de la mobilité. Le **potassium** pourrait, en revanche, être impliqué dans les mécanismes d'activation/inactivation des spermatozoïdes.

Chez l'huître, **les variations individuelles** de la qualité du sperme sont très marquées. Elles se traduisent par des pertes plus ou moins rapides de l'aptitude à féconder les ovocytes et par une grande variété des trajectoires des spermatozoïdes. De ce fait, le ratio optimal spermatozoïdes/ovocyte est fluctuant.

- Solutions pratiques issues de ces résultats

Il est conseillé, dans l'état actuel des connaissances, de récolter du sperme concentré au niveau du gonopore, après avoir injecté de la sérotonine (0.2 ml de solution 10⁻³ M) dans la gonade, de le faire 10 minutes environ après les premières émissions. Le ratio spermatozoïdes/ovocyte de 500 (Figure 17) permet d'éviter l'insuffisance de spermatozoïdes féconds et de limiter la polyspermie.

LA VARIABILITÉ DE LA QUALITÉ DES GAMETES FEMELLES

Des expériences réalisées dans de nombreux sites d'élevage ont révélé l'existence d'une forte variabilité de la qualité des ovocytes.

La notion de « normalité ovocytaire » ou de « qualité ovocytaire » qui traduit la compétence des cellules sexuelles femelles à démarrer, après fécondation, un nouveau cycle biologique est une notion floue que nous cherchons à préciser à partir de critères objectifs.

Chez la coquille St-Jacques, nous avons montré que la densité des ovocytes, évaluée à partir des résultats d'une centrifugation sur gradient de percoll, pouvait refléter une valeur biologique de l'ovocyte en termes de taux de survie et de croissance des jeunes larves (Faure, 1990, Faure et al, 1992, Devauchelle et al, 1994a). Lorsque les densités diffèrent de la valeur de 1.041, cela signale la présence d'ovocytes immatures (densité forte) ou surmatures (densités plus faibles) : (Figure 18). L'origine des variations de la densité des cellules peut-être attribuée à des modifications biochimiques, anatomiques, ou morphologiques. La validation du test à l'échelle de l'écloserie n'est pas faite. Elle pourrait être développée en ayant comme objectif, dans un premier temps, d'utiliser le « test » percoll pour éviter de mettre en élevage des lots d'ovocytes de très faible viabilité.

A ce jour, aucun critère de vitalité fiable et simple n'est utilisé en écloserie. Avant d'approfondir la recherche de tels critères, nous avons procédé à une analyse bibliographique qui a été réalisée sans limitation d'espèces. Elle permet de constater que, quelque soient les espèces considérées, peu de relations ont, à ce jour, été établies entre paramètres dits de « qualité » de l'ovocyte et paramètres de survie et/ou de croissance (Tableaux 6 et 7). Les principales conclusions de l'analyse sont les suivantes :

Tableau 6 : Récapitulatif des principaux critères globaux de la qualité des ovocytes, cités dans la littérature

| Critère | Méthode | Modèle | Relation critère- qualité des ovocytes | Référence |
|------------------------------------|---|---|---|---|
| Aspects morphologiques : | | | | |
| * forme | Observation directe (M.P.)* | Bivalves Poissons | (+) variable | Dorange et al. (1989a) Kjorsvik and Lonning (1983), Linhart et al. (1995) |
| * diamètre | Observation directe (M.P.)* | Crustacés Bivalves Echinodermes Poissons Mammifères | variable (+) (-) (-) variable variable | Mashiko (1987) Paulet (1990) Couturier (1992); Cochard & Devauchelle (1993) George et al. (1991) Devauchelle & Coves (1988); Kjorsvik et al. (1990) Testart (1985); Kelly and Hu (1989) |
| * structure | Coupes (M.E.)* | Bivalves Poissons | (+) (+) | Dorange (1989); Paulet et al. (1989); Yemel'yanova (1980); Makeyeva et Mikodina (1977) |
| * espace périvitellin | Observation directe (M.P.)* | Bivalves Poissons | (-) (+) | Girard & Devauchelle (com.pers.) Devauchelle & Coves (1988); Kjorsvik and Lonning (1983) (1984) Dorange et al. (1989a), (1989b) (1989c) |
| * atrésie | Coupes (M.E.)* (M.P.)* | Bivalves Poissons | | Grechenov & Volodin (1982); Chieffi Baccari et al. (1992) Parshard & Guraya (1978) |
| *intégrité des membranes | Bleu Trypan (Exclusion) Histologie classique Coupes (M.E.) | Bivalves Poissons Bivalves | | Dorange, Valdez (com. pers.) Yemel'yanova (1980) Dorange (1989), Paulet (1990) |
| * intégrité des nucléotides | Tranfert d'énergie par fluorescence | Echinodermes | | Hisatoshi et al. (1996) |
| Densité | | | | |
| Régularité des premières divisions | Centrifugation sur gradient de Percoll Observation directe (M.P.) Rapport RNA/DNA | Bivalves Poissons Mammifères | (+) | Faure et al. (1992); Devauchelle et al. (1994a) Kjorsvik (1990) Humeau (1985) Casse et al. (sous presse in Véliger) Whyte et al. (1990) |
| Consommation d'O ₂ | Oxymétrie | Bivalves Poissons | | Tazawa et al. (1985); (1986); Yasum asu et al. (1988) ; Gosh (1983); (1985) |

Plusieurs paramètres ont été testés sur des gamètes et des embryons de bivalves. Loosanoff et Davis (1963) aux USA et Imai (1972), au Japon, évaluaient la qualité par l'état de maturation, surtout apprécié par la forme des gamètes. La proportion de spermatozoïdes/ovocyte nécessaire pour assurer une bonne fécondation et l'effet du stress sur les géniteurs étaient évalués par Gruffydd & Beaumont, 1970; Bayne, 1972; Bayne *et al.*, 1975; Lucas in Bougis *et al.*, 1976. Une approche différente de la conception de la qualité ovocytaire, basée sur les aspects structurels déjà mis en évidence par Coe & Turner (1938) s'est développée grâce à l'utilisation de la microscopie électronique à transmission (Daniels *et al.*, 1973; Gutierrez *et al.*, 1978; Kubo *et al.*, 1979; Lowe *et al.*, 1982). Puis, au cours de la précédente décennie, les études sur la morphologie et les composés biochimiques des cellules sexuelles matures ont été corrélés à leur aptitude au développement (Cochard, 1985; Pipe, 1985, 1987a, 1987b; Besnard, 1988; Lubet *et al.*, 1987; Paulet *et al.*, 1988, 1989; Dorange, 1989; Dorange *et al.*, 1989a; 1989b, 1989c; Gueguen, 1989; Devauchelle et Mingant, 1991; Paulet, 1990; Le Pennec *et al.*, 1990; Faure *et al.*, 1992; Delaunay, 1992; Marty *et al.*, 1992; Seguineau *et al.*, 1993; Delaunay *et al.*, 1993; Faure *et al.*, 1994a, 1994b; Devauchelle *et al.*, 1994a, 1994b; Soudant, 1995; Faure, 1996; Soudant *et al.*, 1996; Gérard *et al.*, dans ce document). Les bivalves étudiés sont principalement *Mytilus edulis* et *Pecten maximus* et plus rarement les ostréidés : *Ostrea edulis*, *Crassostrea virginica* et *Crassostrea gigas*.

Plus récemment, les recherches entreprises pour apprécier la qualité des ovocytes, non chez des Bivalves, mais chez des Echinodés, prennent en compte le pH intracellulaire et la structure moléculaire du contenu des gamètes (Chiba & Chichibu, 1993; Uchiyama *et al.*, 1996).

En raison de la diversité des modèles biologiques étudiés, les résultats des diverses méthodes mises en oeuvre pour évaluer la qualité globale des émissions gamétiques sont extrêmement variables. Les principaux résultats fournis par la littérature, les plus en relation avec notre étude, sont résumés dans les tableaux 6 et 7. Le tableau 8 résume les méthodologies employées dans l'évaluation de la qualité des cellules autres que les ovocytes.

De cet inventaire complexe, il est cependant possible d'identifier des pistes de recherche qui aboutissent à la détermination de la qualité des ovocytes de *Crassostrea gigas*. Ces pistes prennent compte des caractères que nous qualifierons de globaux et spécifiques, ils peuvent être résumés de la manière suivante :

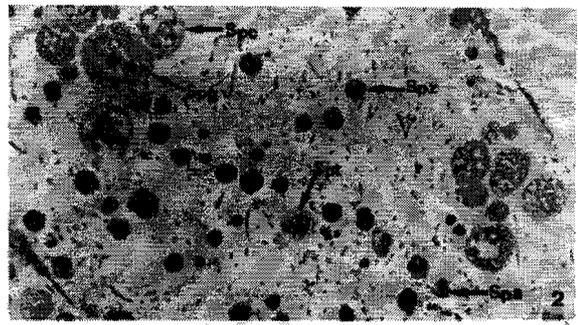
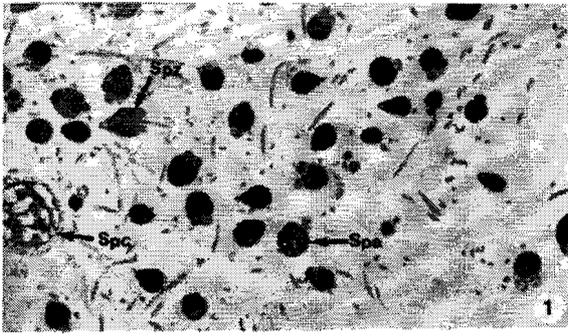
- | | |
|------------------------|---|
| Caractères globaux | <ul style="list-style-type: none"> ● morphologie: aspect dimension, architecture structurale ● densité ● consommation d'oxygène |
| Caractères spécifiques | <ul style="list-style-type: none"> ● capacité énergétique ● pH intracellulaire ● hormones et stéroïdes ● contenu biochimique : lipides, glucides, protides, vitamines ● anomalies associées au génome. |

Tableau 7 : Récapitulatif des principaux critères spécifiques de la qualité des ovocytes

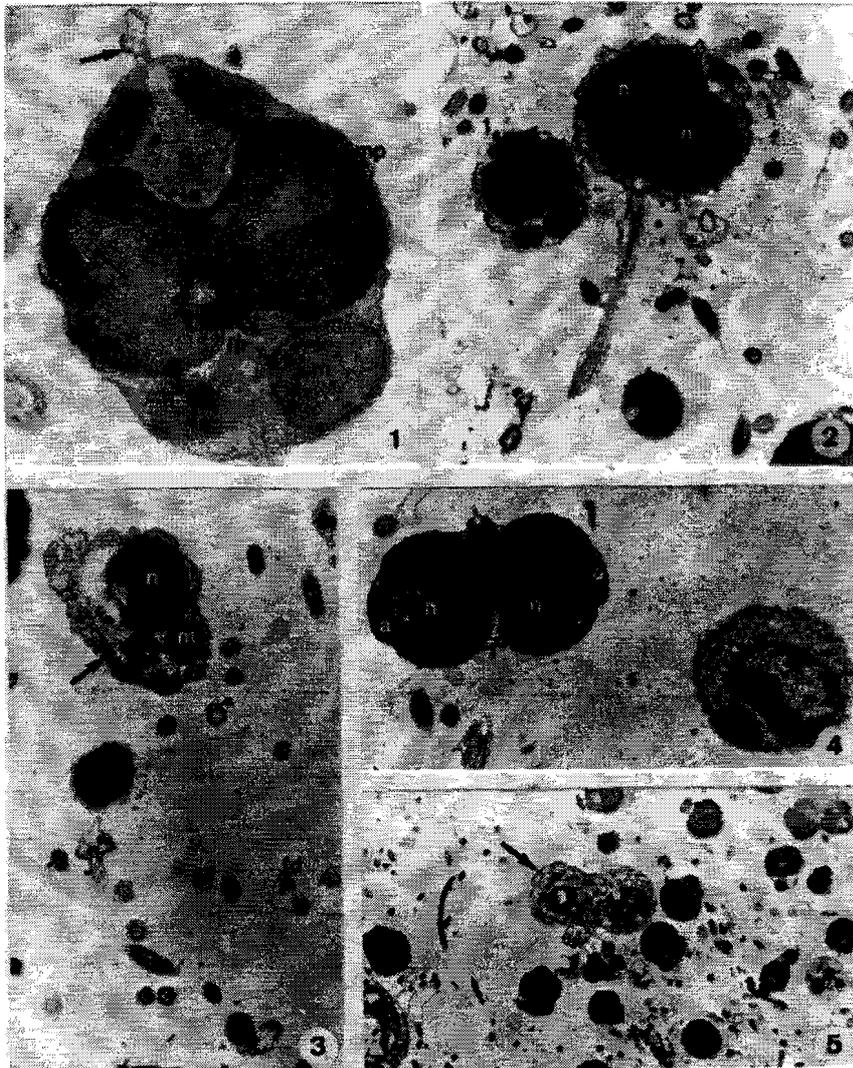
| Critère | Méthode | Modèle | Relation critère- qualité des ovocytes | Référence |
|--|---|--------------------------------------|---|---|
| Capacité énergétique *rapport ATP/ADP | RMN | Bivalves Poissons | | Dorange (com.pers.) Omnès (com.pers.), Chiba & Chichibu (1993) |
| Synthèse de protéines | Rapport RNA/DNA | Bivalves Poissons | | Whyte <i>et al.</i> (1990); Whyte <i>et al.</i> (1991) Buckley (1984); Buckley & Bulow (1987). |
| pH intracellulaire | RMN | Echinodermes Poissons | | Inoue & Yoshioka (1980) Grasdalen & Jorgensen (1985) |
| Osmolarité | Osmomètre | Poissons | (+) | Kjorsvik & Lonning (1983) |
| Reprise de méiose | RMN Test de fécondation Coloration de HOESHST | Amphibiens Poissons Bivalves | | Morril <i>et al.</i> (1993) Yamamoto T. (1961) Devauchelle <i>et al.</i> (1994b) |
| Anomalies de méioses | Coloration HOESHST | | (-) | Devauchelle & Micarelli (1996) |
| Hormones *stéroïdes | Dosage | Poissons Mammifères Amphibiens | | Brown & Bern (1989); Testart (1985), Greenblatt <i>et al.</i> (1989) Akizawa <i>et al.</i> (1994) |
| Critères biochimiques (Protéines, Lipides, Glucides) | RMN | | | |
| | Sur coupes | Bivalves Poissons | | Dorange (1989); Paulet (1990) Le Pennec <i>et al.</i> (1990); Carajaville <i>et al.</i> (1991) Goodall <i>et al.</i> (1987) |
| | Dosage | Bivalves Poissons | (-) | Marty <i>et al.</i> (1992); Ruiz <i>et al.</i> (1992); Delaunay (1992); Delaunay <i>et al.</i> (1993); Massapina & Devauchelle, dans ce document; Soudant <i>et al.</i> (1996); Pazos <i>et al.</i> (1996) Couturier (1992) Devauchelle <i>et al.</i> (1982) |
| Vitamines | Dosage | | (+) | Evans <i>et al.</i> (1996) |
| | | Bivalves Poissons | (+) | Seguineau <i>et al.</i> (1993) Mangor-Jensen <i>et al.</i> (1994) Soliman <i>et al.</i> (1986); Dabrowski and Blom (1993) |
| Anomalies associées au génom | | Bivalves Poissons | | Gérard <i>et al.</i> , dans ce document Longwell (1977); Kjorsvik <i>et al.</i> (1984) |

Tableau 8 : Récapitulatif des critères de qualité étudiés sur d'autres modèles cellulaires que l'ovocyte, dans un objectif de viabilité cellulaire ou des individus

| Critère | Méthode | Modèle | Référence |
|--|--|--|--|
| Apoptose | Immuno marquage Biologie moléculaire Cytométrie de flux | Cellules de L'homme Cellules de L'homme Cellules de L'homme | Ameisnen (1996) Evan <i>et al.</i> (1997) Darzynkiewicz <i>et al.</i> (1997) |
| Morphologie et viabilité | Cytométrie de flux Coloration et analyse d'image Perméabilité de membrane Respiration Mobilité | Hémocytes Fibroblastos et Splenocytes Hémocytes Cellules de mammifères Bivalves (sperme) Bivalves (sperme) | Lanz <i>et al.</i> (1993), Fattorossi <i>et al.</i> (1989) Combrier <i>et al.</i> (1989) Matipragada <i>et al.</i> (1990); Tucker <i>et al.</i> (1994) Cook & Mitchell (1989) Faure <i>et al.</i> (1994a); Devauchelle <i>et al.</i> (1994b); Faure (1996) Faure <i>et al.</i> (1994a); (1994b); Faure (1996) |
| Fonctionnel | Gradient de concentration ionique | Cellules d'animaux mammifères | Hochachka (1986) |
| Intégrité de la membrane | Radiobiologie | Cellules d'animaux mammifères | Herman R. H. (1961) |
| Dislocation de la membrane | Gradient de concentration ionique | Cellules d'animaux mammifères | Jewell <i>et al.</i> (1982) |
| Normalité du développement après induction de stress | Observation directe (M.P.) | Poissons (embryons) | Devauchelle (1978) |
| pH du milieu | | Bivalves (sperme) | Faure (1996) |
| Composition biochimique | Dosage Dosage | Poissons (embryons) Poissons (embryons) | Devauchelle & Coves (1988), Devauchelle (1987) Devauchelle <i>et al.</i> (1987); (1988) |
| Densité | Taux d'humidité Poids | Poissons (embryons) Poissons (embryons) | Devauchelle & Cladas (1982) Devauchelle & Cladas (1982) |

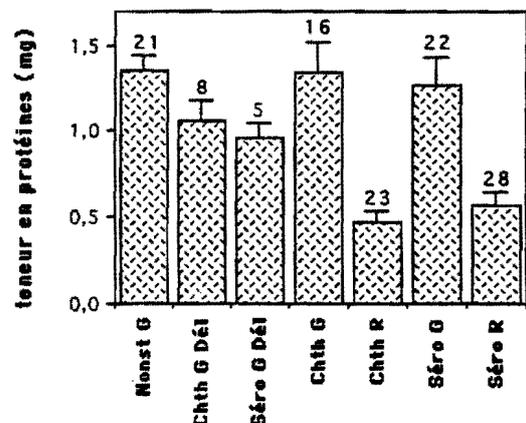
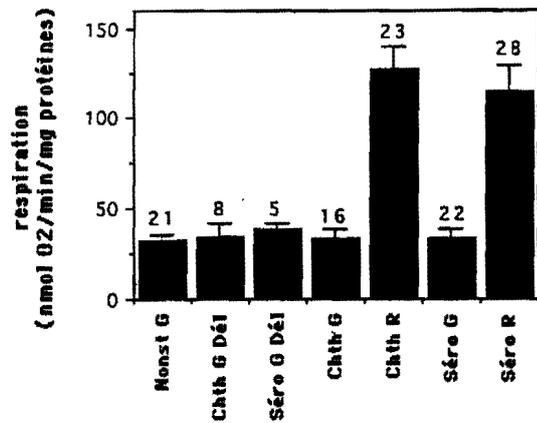


A. Spermatozoïdes anormaux



B. Présence de cellules jeunes de la lignée germinale dans le prélèvement de sperme chez *Pecten maximus* et *Crassostrea gigas* (M.E.T).

Figure 1. Structure et stades des spermatozoïdes observés dans des échantillons de sperme de *C. gigas*.



A. Consommation en oxygène

B. Teneur en protéines

Figure 2. Mesure de la consommation en oxygène et de la teneur en protéines des spermatozoïdes de *Pecten maximus* prélevés dans différentes conditions puis dilués en eau de mer.

Les spermatozoïdes sont prélevés dans la gonade de géniteurs non stimulés (lots Nonst G), dans la gonade de géniteurs au cours de la stimulation thermique (lots Chth G Dél) ou chimique (lots Séro G Dél), dans la gonade (lots Chth G) au gonopore (lots Chth R) de géniteurs stimulés thermiquement et dans la gonade (lots Séro G) ou au gonopore (lots Séro R) de géniteurs stimulés chimiquement au moment de l'émission des gamètes.

Les chiffres reportés au dessus des barres d'erreur standard indiquent le nombre de lots de sperme.

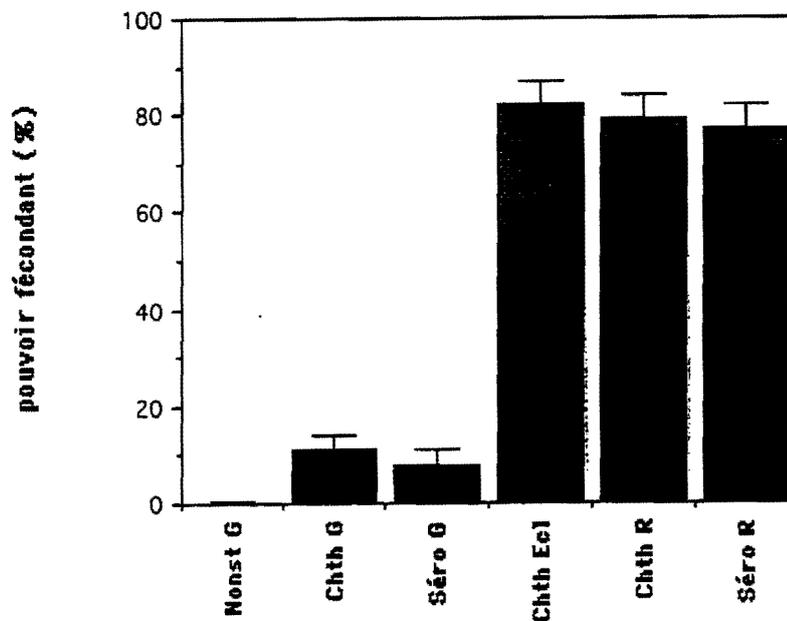


Figure 3. Pouvoir fécondant, en eau de mer naturelle, du sperme de *Pecten maximus* prélevé dans différentes conditions.

Le sperme est prélevé dans la gonade de géniteurs non stimulés (Nonst G); dans la gonade de géniteurs stimulés par chocs thermiques (Chth G) ou par une injection de sérotonine (Séro G); après avoir été émis en eau de mer par des animaux stimulés par chocs thermiques (Chth Ecl); au gonopore de géniteurs stimulés par chocs thermiques (Chth R) ou par une injection de sérotonine (Séro R).

n = nombre de lots de sperme; X = nombre de lots d'ovocytes; les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

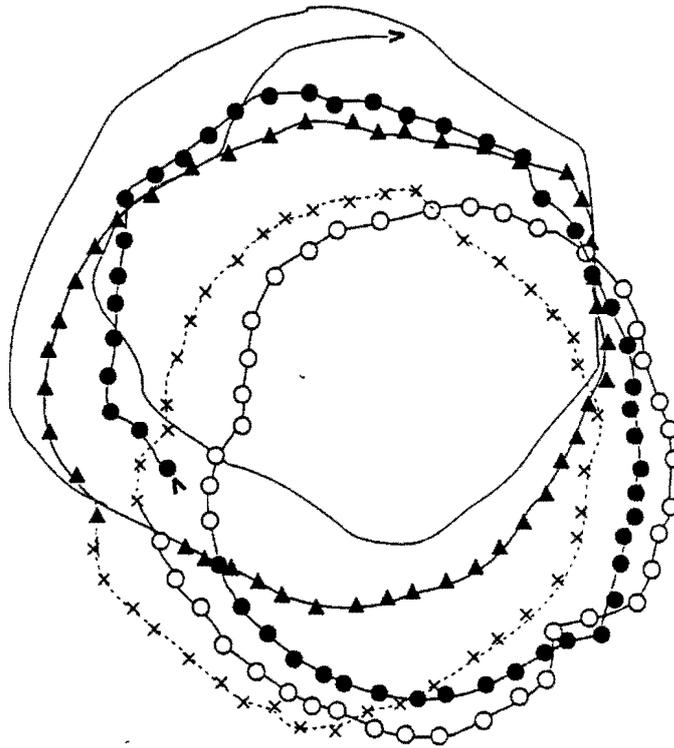


Figure 4. Trajectoire décrite par un spermatozoïde de *Pecten maximus*, en eau de mer.

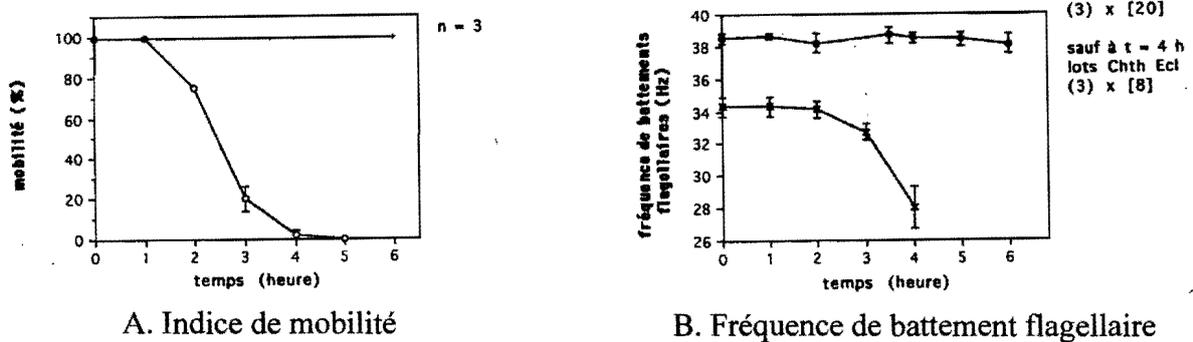


Figure 5. Indice de mobilité et fréquence de battements flagellaires de spermatozoïdes de *Pecten maximus* en fonction du temps pour des gamètes mâles émis en eau de mer par des géniteurs stimulés thermiquement puis conservés à 19°C avant activation (+) et (●); pour des gamètes mâles prélevés au gonopore de géniteurs stimulés chimiquement puis conservés sous forme concentrée à +4° avant activation (○) et (x).

n= nombre de lots de sperme; les barres d'erreurs représentent les erreurs standard; les erreurs standard sont nulles pour la mobilité pour les lots Séro R; le chiffre entre parenthèses indique le nombre de lots de sperme et le chiffre entre crochets le nombre de spermatozoïdes.

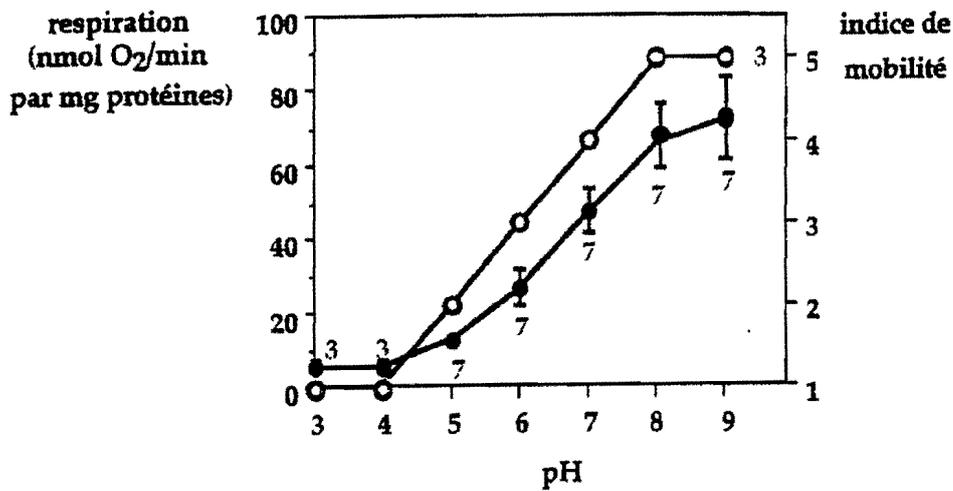


Figure 6. Respiration et indice de mobilité des gamètes mâles : Eau de mer naturelle à pH variable.

Pecten maximus

Effet du pH du milieu de dilution sur la consommation en oxygène (●) et l'indice de mobilité (○) des spermatozoïdes.

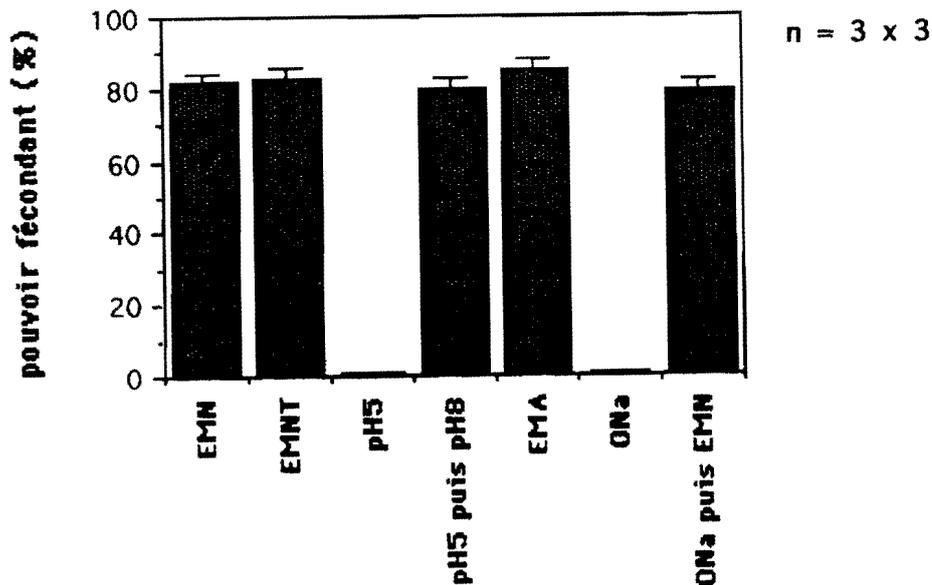


Figure 7. Pouvoir fécondant de spermatozoïdes de *Pecten maximus* dilués dans différents milieux

Les milieux de dilution sont les suivants : eau de mer naturelle (EMN), eau de mer naturelle tamponnée à pH 8 (EMNT), eau de mer naturelle à pH5 (pH5), inactivation en eau de mer naturelle tamponnée à pH 5 puis réactivation par adjonction de 25 mM de tris (pH5 puis pH8), eau de mer artificielle (EMA), eau de mer sans sodium (ONa), inactivation en eau de mer artificielle sans sodium puis réactivation en eau de mer naturelle (ONa puis EMN).

n= nombre de lots de sperme X nombre de lots d'ovocytes; les barres d'erreurs représentent les erreurs standard; ces dernières sont nulles en eau de mer naturelle à pH5 et en eau de mer artificielle sans sodium.

sperme

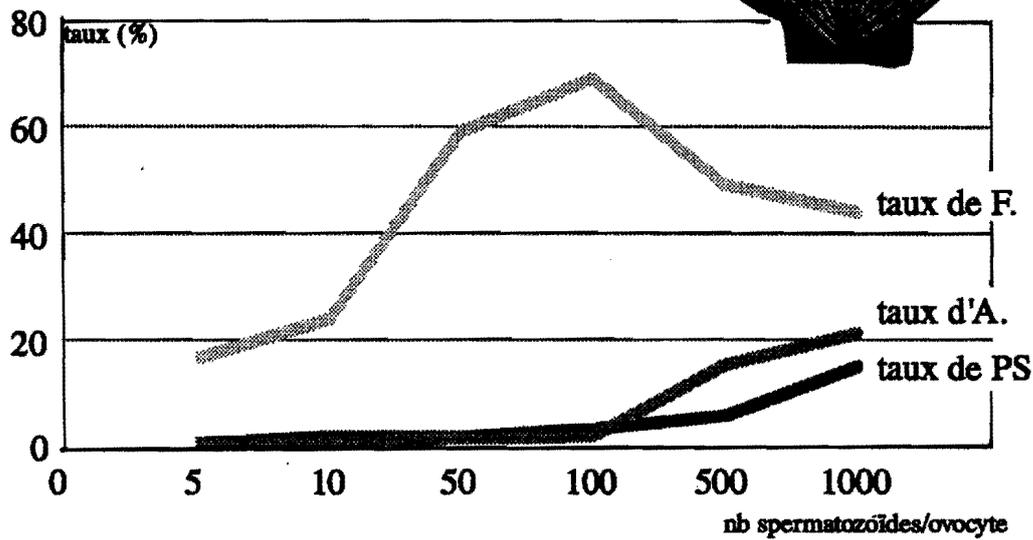
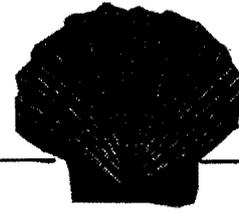


Figure 8. Evolution moyenne des taux de fécondation des ovocytes de coquille St-Jacques, des taux de polyspermie (PS) et du taux d'anomalies de développement (A) observés en fonction du ratio spermatozoïdes/ovocyte.

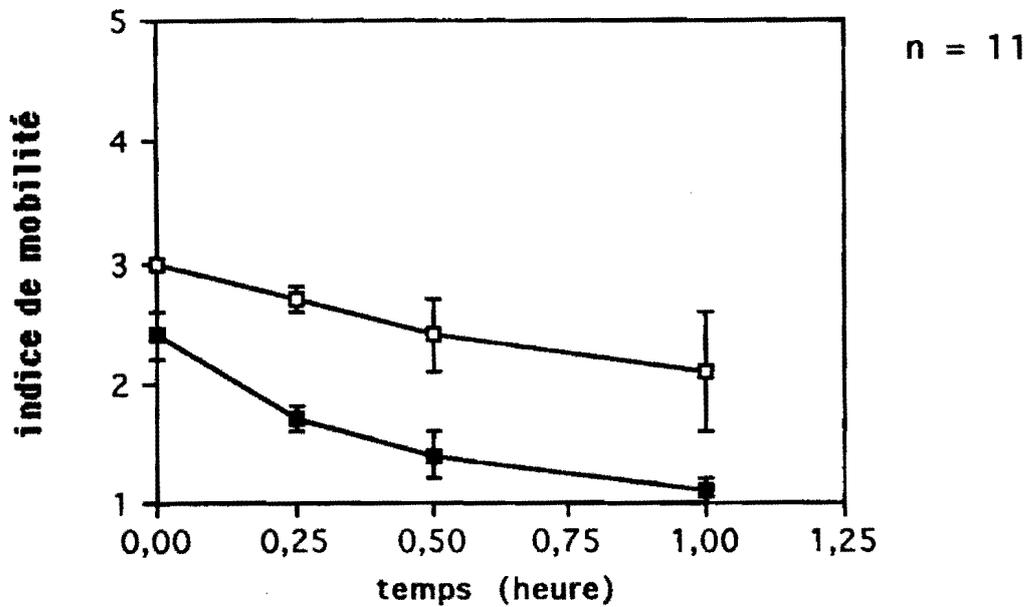


Figure 9. Indice de mobilité, au cours du temps, de spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* dilués en eau de mer (●) ou en eau de mer additionnée de 1 mg/ml de BSA (○).

Les spermatozoïdes sont prélevés dans la gonade de géniteurs non stimulés (lots Nonst G) et sont conservés sous forme concentrée à +4°C avant activation.

n= nombre de lots de sperme; l'échelle de mobilité de 1 à 5 est similaire à celle précédemment décrite ; les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

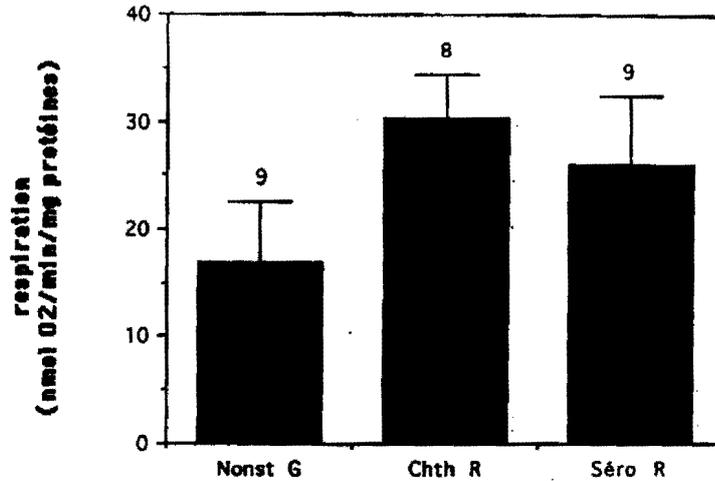


Figure 10. Mesure de la consommation en oxygène du sperme de *Crassostrea gigas* prélevé dans différentes conditions puis dilué en eau de mer naturelle. Le sperme est prélevé dans la gonade de géniteurs non stimulés (Nonst G); au gonopore de géniteurs stimulés par chocs thermiques (Chth R) ou par une injection de sérotonine (Séro R).

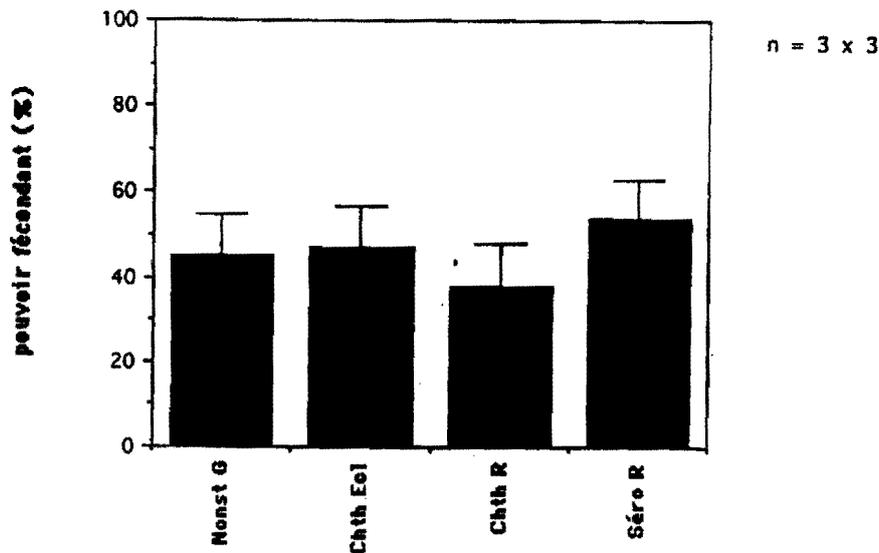


Figure 11. Pouvoir fécondant, en eau de mer naturelle, du sperme de *Crassostrea gigas* prélevé dans différentes conditions. Le sperme est prélevé dans la gonade de géniteurs non stimulés (Nonst G); après avoir été émis en eau de mer par des animaux stimulés par chocs thermiques (Chth R) ou par une injection de sérotonine (Séro R).

n= nombre de lots de sperme; les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

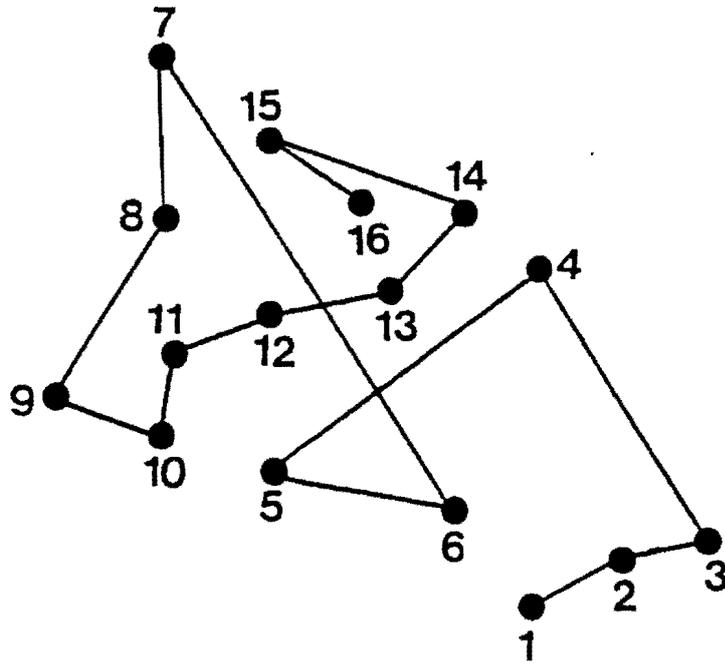


Figure 12. Trajectoire décrite par un spermatozoïde de *Crassostrea gigas*, en eau de mer.

Gradient de qualité du sperme

pH = 8

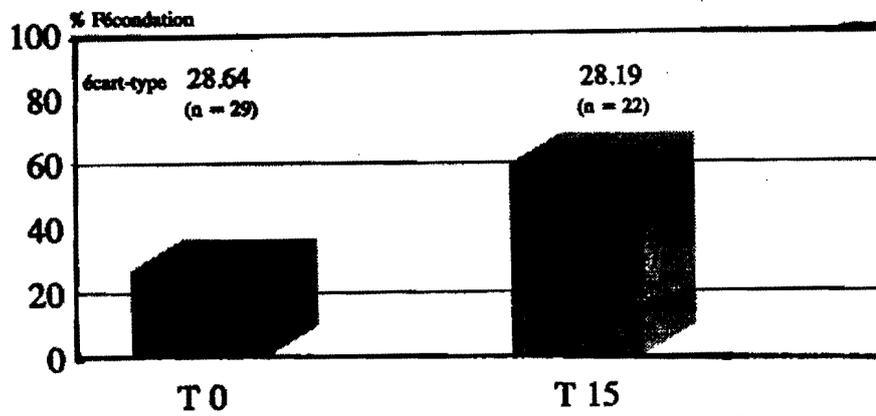


Figure 13. Mesures du pouvoir fécondant (% fécondation) du sperme d'huître creuse recueilli pendant la première minute de l'émission (T0), après 15 minutes d'émission.

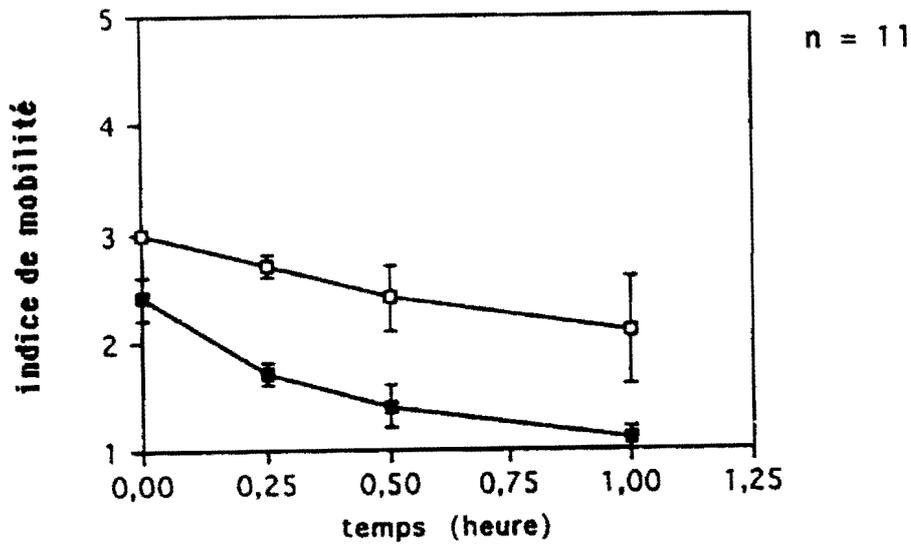


Figure 14. Indice de mobilité au cours du temps de spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* dilués en eau de mer (■) ou en eau de mer additionnée de 1mg/ml de BSA (○).

Les spermatozoïdes sont prélevés dans la gonade de géniteurs non stimulés (lots Nonst G) et sont conservés sous forme concentrés à - 4°C avant activation.

n= nombre de lots de sperme : l'échelle de mobilité de 1 à 5 est similaire à celle précédemment décrite; les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.



sperme

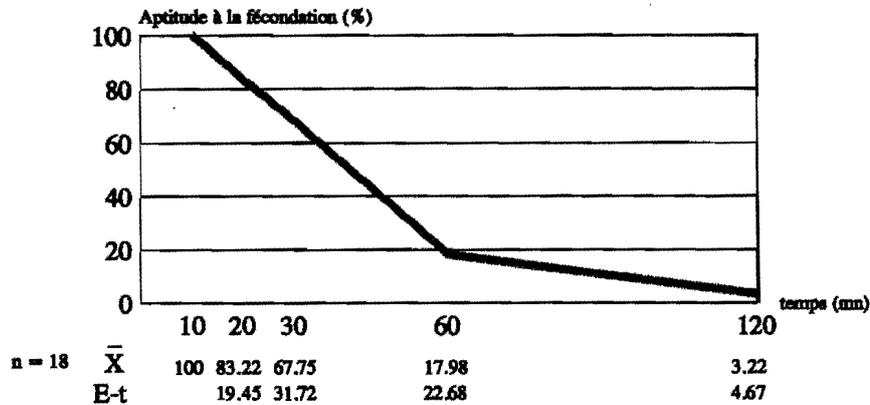


Figure 15. Evolution du pouvoir fécondant (%) du sperme d'huître creuse en fonction du temps.

n = souche d'échantillons analysés \bar{x} = valeur moyenne d'aptitude à la fécondation
E-t = écart type

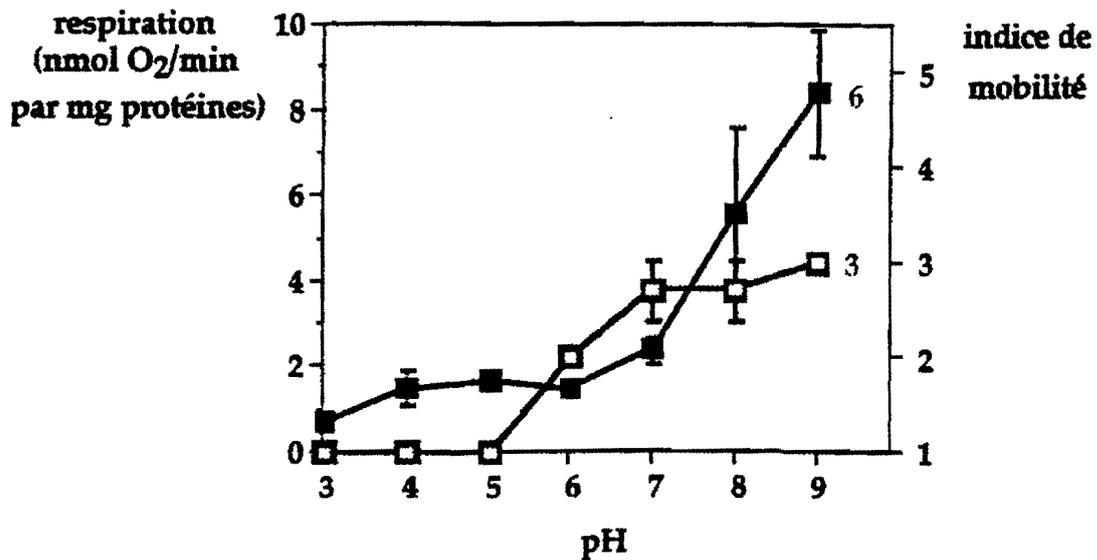


Figure 16. Respiration et indice de mobilité des gamètes mâles : eau de mer naturelle à pH variable

Crassostrea gigas

Effet du pH du milieu de dilution sur la consommation en oxygène (■) et l'indice de mobilité (□) des spermatozoïdes

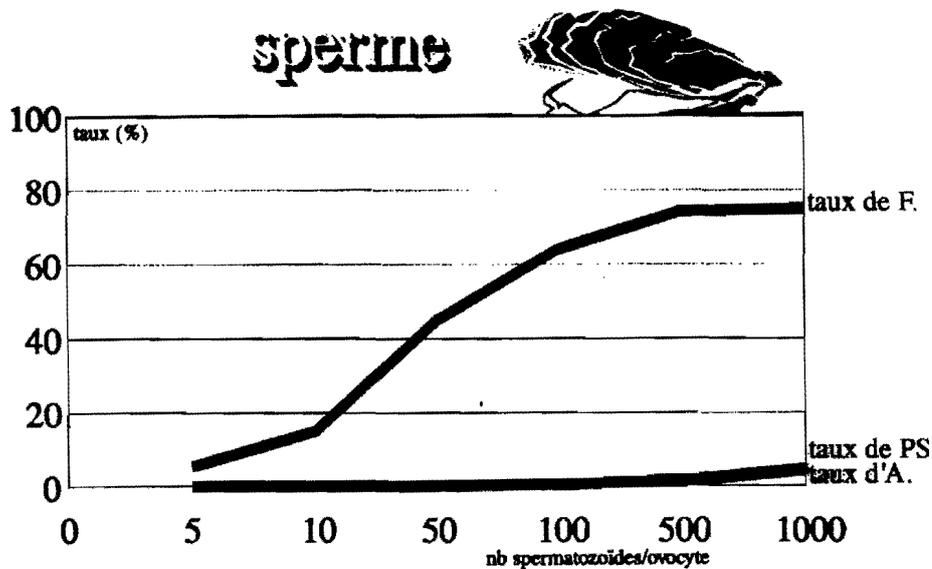
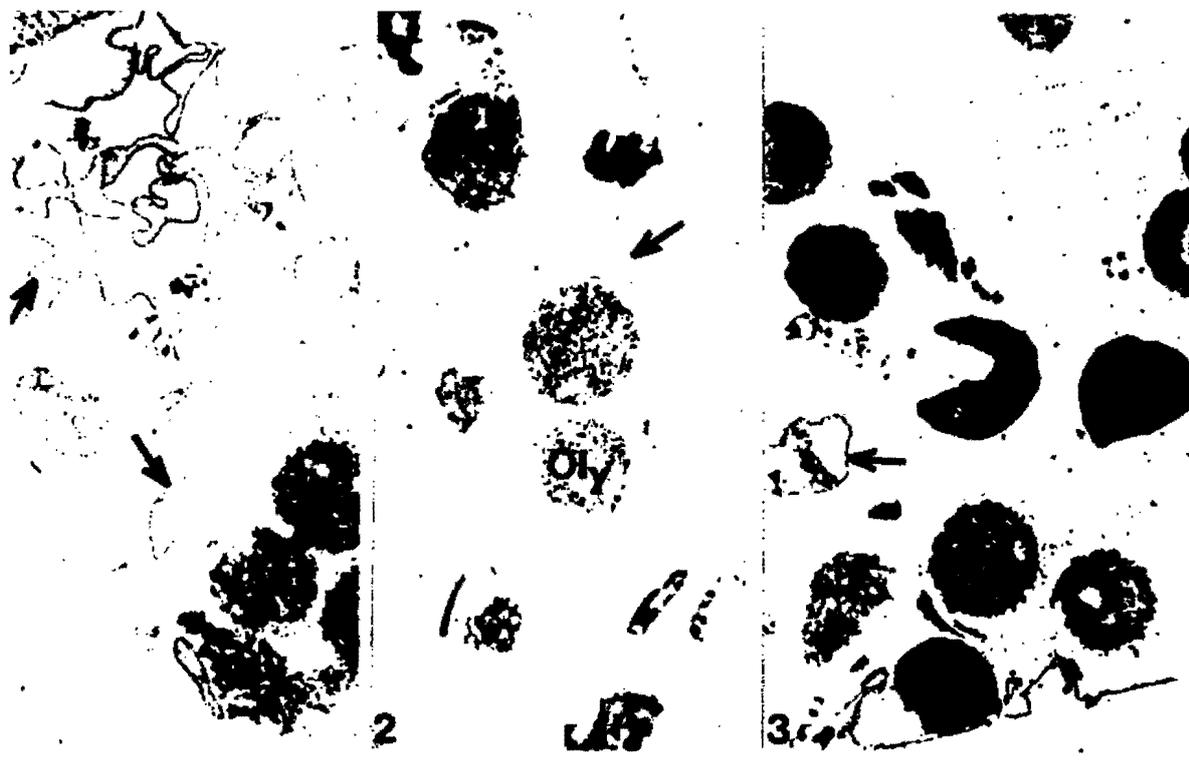


Figure 17. Evolution des taux de fécondation (F) des ovocytes d'huître creuse, des taux de polyspermie (PS) et des taux d'anomalies de développement (A) après fécondation, en fonction du ratio spermatozoïde/ovocyte.



Strate supérieure (densité : 1.018 à 1.025)

Photo 1. Couche P1

(la plus haute dans le cube). On note la présence d'innombrables enveloppes ovocytaires « nues » (↗). Quelques ovocytes très altérés sont aussi présents (Oly).

Photo 2. Couche P2 sous-

jacente. Des enveloppes « nues » sont encore visibles (↗). Mais ce sont essentiellement des ovocytes atrétiques qui sont observés (Oly).

Photo 3. Couche P3

(couche de la strate supérieure la plus profonde). Quelques débris sont encore visibles (↗). Mais, les ovocytes (Oly) sont généralement moins altérés.

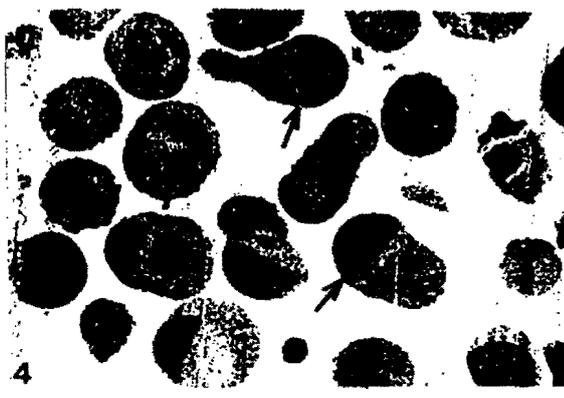


Photo 4. Strate intermédiaire (densité : 1,035 à 1,051). Les oeufs ont un aspect normal, mais leur contenu est polarisé (↗).

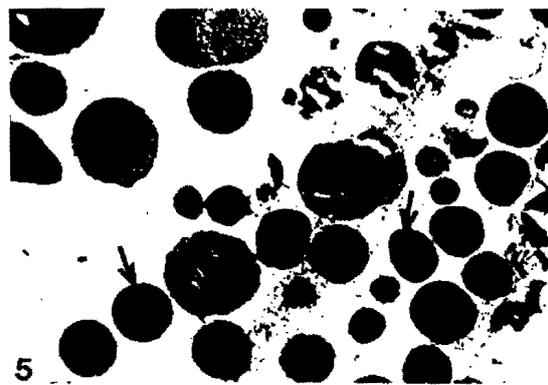


Photo 5 : Strate du fond (densité : 1,050 à 1,075) essentiellement constituée de petits ovocytes rétractés (↗).

Figure 18. Coupes semi-fines (colorées au Bleu de Toluidine) d'ovocytes déposés en strates dans un gradient de Percoll pour une ponte de mauvaise qualité après fécondation, Echelle : 1,2 cm = 50µm.

Références bibliographiques

- Akizawa T., T. Mukai, M. Matsukawa, M. Yoshioka, J.F. Morris and Butler V.P., 1994.** Structures of novel bufadienolides in the eggs of a toad, *Bufo marinus*. *Chem. Pharm. Bull.*, **42** : 754-756.
- Ameinsen J.C., 1996.** Le suicide des cellules. *Pour la science*, **224** : 52-59.
- Bayne B.L., 1972.** Some effects of stress in the adult on the larval development of *Mytilus edulis*. *Nature*, London, **237**, 459.
- Bayne B.L., P.A. Gabbott and Widdows 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
- Besnard J.Y., 1988.** Étude des constituants lipidiques dans la gonade femelle et les larves de *Pecten maximus* L. (Mollusque, Lamellibranche). Thèse Doct. Univ. Université de Caen : 154 p.
- Bougis P. et coll., 1976.** Océanographie biologique appliquée. L'exploitation de la vie marine. Masson. Paris. Vol 1: 1-320.
- Brown C.L. and H.A. Bern, 1989.** Hormones in early development, with special reference to teleost fishes. Scanes and Schreibman, editors. Hormones in development, maturation and senescence of neuroendocrine systems. Academic Press, New York, USA. 289-306.
- Buckley J.L., 1984.** RNA-DNA ratio : an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.* **80** : 291-298.
- Buckley J.L. and F.J. Bulow, 1987.** Techniques for the estimation of RNA, DNA, and protein in fish. *In* : Summerfelt R.C., Hall G.E. (eds) The age and growth of fish. Iowa State University. Press, Ames, Iowa : 345-354.
- Cajaraville M.P., J.A. Marigómez and E. Angulo, 1991.** Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocyte of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Arch. Environ. Toxicol.* **21** : 395-400.
- Casse N., N. Devauchelle, in press.** Embryonic development of *Pecten maximus* (L.), *Veliger*.
- Chiba A. and S. Chichibu, 1993.** Phosphorilation in crayfish (*Procambarus clarkii*) eggs during hatching. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106B**, **2** : 433-436.
- Chieffi Baccari G., S. Minucci, L. Matteo Di and G. Chieffi, 1992.** Ultrastructural investigation of the corpora atretica of the electronic Ray, *Torpedo marmorata*. *Gen. Comp. Endocrin.*, **86** : 72-80.
- Cochard J.C., 1985.** Observation sur la viabilité des oeufs de la coquille St-jacques en rade de Brest. 5th International Pectinid Workshop. La Coruna, Espagne, 1p..
- Cochard J.C. and N. Devauchelle, 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.Expl.Mar.Biol. Ecol.*, **169** : 41-56.
- Coe W.R. and M.J. Turner, 1938.** Development of the gonads and gametes in the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *J. Morphol.*, **62** (1) : 91-111
- Combrier E., P. Métézeau, X. Ronot, H. Gachelin H. and M. Adolphe, 1989.** Flow cytometric assessment of cell viability : a multifaceted analysis. *Cytotechnology* **2** : 27-37.
- Cook J.A. and J.B. Mitchell, 1989.** Review. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal. Biochem.* **179** : 1-7.

- Couturier C., 1992.** Egg size larval viability in sea scallops. *Bull. Aquacul. Canada*, **91-3** : 91-93.
- Dabrowski K. and J.H. Blom, 1993.** Ascorbic acid deposition in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. *Comp. Bioch. Physiol.* **108A**, **1** : 129-135.
- Daniels E.W., A.C. Lonwell, J.M. McNiff and R.W. Wolfgang, 1973.** Ultrastructure of oocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, **92** (3) : 337-349.
- Darzynkiewicz Z., G.J. Xun li, W. Gorczyca, T. Murakami and F. Traganos, 1997.** Cytometry in cell necrobiology : Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27** : 1-20.
- Delaunay F., 1992.** Nutrition lipidique de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.) au cours du développement larvaire. Thèse d' Université de Bretagne Occidentale, Brest, 201 p.
- Delaunay F., Y. Marty, J. Moal and J.F. Samain, 1993.** The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J. Exp. Biol. Ecol.*, **173** : 163-179.
- Devauchelle N., 1978.** Etude expérimentale de la chloration et des chocs mécaniques appliqués à des oeufs et larves de poissons marins. Rapport EDF du contrat n° 75/1746/F, 16 p.
- Devauchelle N., 1987.** Four marine spawners in European hatcheries. Publication MEDRAP/FAO, 48 p.
- Devauchelle N. et Y. Cladas, 1982.** Influence de la taille, du poids et du taux d'humidité des oeufs de trois espèces de poissons marins sur le taux d'éclosion et d'anomalies des larves. CIEM, Copenhague, Danemark, Cté de la Mariculture, F : 19: 14 p. (Communication et publication).
- Devauchelle N. and D. Coves, 1988.** The characteristics of the Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs : description, biochemical composition and hatching performances. *Aquat. Living Resour.*, **1** : 223-230.
- Devauchelle N. and C. Mingant, 1990.** Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.*, **4** : 41-51.
- Devauchelle N. and P. Micarelli, 1996.** Impact et devenir des rejets de station d'épuration dans les eaux littorales. Utilisation de Brotest. Rapport final IFREMER de contrat subvention du Ministère de l'environnement à l'IFREMER, N° 95149 : 19-27.
- Devauchelle N., G. Brichon, F. Lamour and G. Stephan, 1982.** Biochemical composition of ovules and fecund eggs of Sea bass (*Dicentrarchus labrax*), Sole (*Solea vulgaris*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*). In : Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Wageningen, Netherlands, C.J.J. Richter and A.a; Th GOOS (Eds), 155-157.
- Devauchelle N., J.C. Alexandre, N. Le Corre and Y. Letty, 1987.** Spawning of Sole (*Solea solea*) in captivity. *Aquaculture*, **66** : 125-147.
- Devauchelle N., J.C. Alexandre, N. Le Corre and Y. Letty, 1988.** Spawning of tubot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. *Aquaculture*, **69** : 159-184.
- Devauchelle N., G. Dorange and C. Faure, 1994a.** A technique for separating high and low quality embryos of the scallop, *Pecten maximus* (L.) *Aquaculture*, **120** : 341-346.

- Devauchelle N., C. Faure and J.P. Girard, 1994b.** The quality of the sperm of two bivalves : the oyster, *Crassostrea gigas* and the scallop, *Pecten maximus*. Bordeaux Aquaculture, 23-25 mars (communication).
- Dorange G., 1989.** Les gamètes de *Pecten maximus* L. (Mollusca, Bivalvia). Thèse de Doct. d'Uni., Université de Bretagne Occidentale, I. 140 p. II 33pl.
- Dorange G., Y.M. Paulet, M. Le Pennec et J.C. Cochard, 1989a.** Critères histologiques d'évaluation de la qualité des ovocytes émis par *Pecten maximus* (Mollusque, Bivalve). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **309(3)** : 113-120.
- Dorange G., Y.M. Paulet and M. Le Pennec, 1989b.** Etude cytologique de la partie femelle de la gonade de *Pecten maximus* récolté en Baie de St-Brieuc. 1. Caractéristiques ultrastructurales de tissus somatiques. *Haliotis*, **19** : 287-297.
- Dorange G., Y.M. Paulet and M. Le Pennec, 1989c.** Étude cytologique de la partie femelle de la gonade de *Pecten maximus* récolté en Baie de St-Brieuc. 2. Ovogénèse et lyse ovocytaire. *Haliotis*, **19** : 299-314.
- Evan G.I., L. Brow, M. Whyte and E. Harrington, 1997.** *J. Cell Biol.*, **7** : 825-834.
- Evans R.P., C.C. Parrish, J.A. Brown and P.J. Davis, 1996.** Biochemical composition of eggs from repeat and first-time spawning captive Atlantic halibut (*Hyppoglossus hypoglossus*). *Aquaculture*, **139** : 139-149.
- Fattorossi A., R. Nisini, J.G. Pizzolo and R. D'Amelio, 1989.** New, simple flow cytometry technique to discriminate between internalized and membrane-bound particles in Phagocytosis. *Cytometry*, **10** : 320-325.
- Faure C., 1990.** Recherche d'un critère de qualité applicable en éclosion pour les ovocytes et les oeufs de *Pecten maximus*. Rapport de DEA de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, 130 p.
- Faure C., 1996.** Paramètres physiologiques de l'émission et de l'activation des gamètes mâles de deux mollusques bivalves : la coquille St-Jacques *Pecten maximus* (L.) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg). Thèse d'université, Université de Paris 7 : Denis Diderot, 254 p.
- Faure C., N. Devauchelle et G. Dorange, 1992.** La densité, un critère de qualité applicable en éclosion aux embryons de *Pecten maximus* (mollusque bivalve), *Haliotis*, **22** : 21-30.
- Faure C., N. Devauchelle and J.P. Girard, 1994a** Ionic factors affecting motility, respiration and fertilization rate of the sperm of the bivalve *Pecten maximus* (L.). *J. Comp. Physiol. B.*, **164** : 444-450.
- Faure C., N. Devauchelle, J.P. Girard and J. Cosson, 1994b.** The quality of *Pecten maximus* sperm. In : Proceedings of the 9th International Pectinid Workshop, Nanaimo, B.C., Canada. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Science, Bourne N.F., Bunting B.L. and Townsend L.D. (Eds.). Vol. 1 : 28-37.
- George S.B., J.M. Lawrence and L. Fenaux, 1991.** The effect of ration on the quality of eggs of *Ludia clathrata* (Say) (Echinodermata : Asteroidea). *Invert. Reprod. and Develop.* **20**, **3** : 237-242.
- Gérard A., Y. Naciri-Graven, P. Boudry, S. Launay, S. Heurtebise, C. Ledu et P. Phelipot,** dans ce document. Contrôle de la gamétogénèse des huîtres creuses et plates. Relations "reproduction" et "génétique". Rapport Groupe de Travail : La reproduction des Mollusques bivalves d'aquaculture marine ". IFREMER/Nantes, 11 p.
- Goodall J.A., M.F. Capra and A.W. Blackshaw, 1987.** Quantitative histology of the seasonal changes in the gonads of summer whiting, *Sillago cilliata*. *J. Fish Biol.* **30** : 589-595.

- Gosh R.I., 1983.** Chemical composition of ovarian fluid and oocytes in grass carp and common carp. *Gridobiol. Zh.*, **19** (1) : 81-85.
- Gosh R.I., 1985.** Energy metabolism of fish reproductive cells and embryos. Naukova Dumka, Kiev, 147 p.
- Grasdalen H. and L. Jorgensen, 1985.** ³¹P-RMN studies on developing eggs and larvae of plaice. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81B**, **2** : 291-294.
- Grechenov I.G. and M.V. Volodin, 1982.** Experimental study of resorption in the testes of bream, *Abramis brama*, from Rybinsk reservoir. *J. Ichthyology*, **21** (6) : 158-162.
- Greenblatt M., C.L. Brown, M. Lee, S. Dauder and H.A. Bern, 1989.** Changes in thyroid hormone levels in eggs and larvae and in iodide uptake by eggs of coho and chinook salmon *Oncorhynchus kisutch* and *O. tshawytscha*. *Fish Physiol. and Biochem.* **6** : 261-278.
- Gruffydd Li D. and A.R. Beaumont, 1970.** Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* L. (Mollusca, Lamellibranchia). *Helgol. Wiss. Meeres*, **20** : 486-497.
- Gueguen F., 1989.** Contenu lipidique et compétence des ovocytes émis chez *Pecten maximus* L; Rapport de D.E.A., Université de Bretagne Occidentale, Brest, 30p.
- Gutierrez M., J. Perez Crespo and E. Pascual, 1978.** Ultraestructura de ovocytes y espermatozoides del ostión, *Crassostrea angulata* Lmk. de la costa sudatlántica de España. *Inv. Pesq.* **42** (1) : 167-178.
- Herman R.H., 1961.** Radiobiology. A general method for the quantitation of immune cytolysis. *Nature* **4772** : 269-270.
- Hisatochi U., H. Ken'ichi, K. Masaki and T. Kazurari, 1996.** Detection of undergraded oligonucleotides in vivo by fluorescence resonance energy transfer. Nuclease activities in living sea urchin eggs. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, **1** : 380-384.
- Hochachka P.W., 1986.** Defense strategies against hypoxia and hyperthermia. *Science*, **231** : 234-341.
- Humeau C., 1985.** Critères d'évaluation de la qualité des embryons obtenus par la FIV et de leur aptitude à l'implantation. *Ann. Biol. clin.*, **43** : 23-26.
- Imai T., 1972.** Present status and future prospects of invertebrate mariculture in Japan. *Fisheries*, New Series, **5** : 181-185.
- Inoue H. and T. Yoshioka, 1980.** Measurement of intracellular pH in sea eggs by ³¹P NMR. *J. Cell. Physiol.*, **105** : 461-468.
- Jewell S.A., G. Bellomo, H. Thor H. and S. Orreinus, 1982.** Bled formation in hepatocytes during metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science*, **217** : 1257-1258.
- Kelly K. F. and Wei-Shou Hu, 1989.** Cell volume measurement as an estimation of mammalian cell biomass. *Biotech. and Bioengine.*, **36** : 191-197.
- Kjorsvik E. and S. Lonning, 1983.** Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the *Gadus morhua* L. *J. of Fish Biol.*, **23** : 1-12.
- Kjorsvik E., E. Stene and S. Lonning, 1984.** Morphological, physiological and genetical studies of egg quality in cod *Gadus morhua* L.). In "The propagation of Cod *Gadus morhua* L." (E. Dahl, D.S. Danielssen, E. Moksness and P. Solemdal, eds), Flodevigen rapport serie 1, 67-86.
- Kjorsvik E., A. Mangor-Jensen and I. Holmefjord, 1990.** Egg quality in fishes. *Advan. In Mar Biol.*, **26** : 71-92.
- Kubo M., M. Ishikawa and T. Numakunai, 1979.** Ultrastructural studies on early events in fertilization of the bivalve *Laternula limicola*. *Protoplasma*, **100** : 73-83.

- Lanz H., V. Tsutsumi and H. Aréchiga, 1993.** Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. *Develp. Comp. Immun.*, **17** : 389-387.
- Le Pennec M., F. Gueguen, J.C. Cochard, Y.M. Paulet et G. Dorange, 1990.** Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* et les performances des larves en élevage. *Haliotis*, **10** : 101-113.
- Linhart O., S. Kudo R. Billard, V. Slechta and E.V. Mikodina, 1995.** Morphology, composition and fertilization of carp eggs : a review. *Aquaculture*, **129** : 75-93.
- Longwell A.C., 1977.** A genetic look at eggs and oil. *Oceanus*, **20** : 45-58.
- Loosanoff V. L. and H.C. Davis, 1963.** Rearing of bivalve molluscs. *In* : Advances in Marine Biology. Russel F.S. (Ed.) Academic Press, London, Vol. 1 : 1-136.
- Lowe D.M., M.N. Moore and B.L. Bayne, 1982.** Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **62** : 133-145.
- Lubet P, G. Dorange and I. Robbins, 1987.** Cytological investigations on the annual reproductive cycle of the scallop (*Pecten maximus* L.) from the channel. Vth International Pectinid Workshop, Menai Bridge, Wales, U.K.
- Makeyeva A.P. and V. Mikodina Ye, 1977.** The structure of the egg membranes of cyprinids and some data on their chemical nature. *Biol. nauki*, 9 p.
- Mangor-Jensen A., J.C. Holm, G. Rosenlund, O. Lie and E. Sandnes, 1994.** Effects of dietary vitamin C on maturation and egg quality of cod *Gadus morhua* L. *J. of the World Aquacul. Soc.* **25**,1 : 30-40.
- Marty Y., F. Delaunay, J. Moal and J.F. Samain, 1992.** Change in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Ecol.*, **163** : 221-234.
- Mashiko K., 1987.** Relationships between egg size and incubation time among the populations of two freshwater prawns. *Ecol. Res.* **2** : 97-99.
- Massapina C., E. Dores, D. Matias, S. Joaquim et N. Devauchelle, 1997.** Etat actuel des connaissances sur la reproduction artificielle de l'huître *Crassostrea angulata* au Portugal. *In* : La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France, Nantes (France), 14-15 novembre 1995, Groupe de travail, Devauchelle N., Barret J. et G.Salaun coord. IFREMER, rapport interne, DRV 97-11 RA/RST/Brest : 113-125.
- Matipragada S.S., V.M. Huynh and H.B. Fackrell, 1990.** Image analysis of biological systems with microcomputers. *Int. J. Biomed. Comput.*, **26** : 271-281.
- Morril G.A., Doi Kei, J. Erlichman and A.B. Kostellow, 1993.** Cyclic AMP binding to the amphibian oocyte plasma membrane and membrane fluidity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1158** : 146-154.
- Pashard V.R. and S.S.Guraya, 1978.** Morphological and histochemical observations on oocyte in *Centrorhynchus corvi* (Acantocephala). *Parasitology*, **77** : 133-138.
- Paulet Y.M., 1990.** Rôle de la reproduction dans le déterminisme du recrutement chez *Pecten maximus* (L) de la Baie de St-Brieuc. Thèse d'Université de Bretagne Occidentale, Brest, 337 p.
- Paulet Y.M., A. Lucas and A. Gerard, 1988.** Reproduction and larval development in two *Pecten maximus* (L.) populations from Brittany. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **119** : 154-156.
- Paulet Y.M., G. Dorange, J.C. Cochard and M. Le Pennec, 1989.** Quality assessment of spawned oocytes of *Pecten maximus*, 7th International Pectinid Workshop, Portland, Maine, U.S.A.

- Pazos A.J., G. Roman, C.P. Acosta, M. Abad and J.L. Sánchez, 1996.** Influence of the gametogenic cycle on the biochemical composition of the ovary of the great scallop. *Aquac. Intern.* **4** : 201-213.
- Pipe R.K., 1985.** Seasonal cycles and effects of starvation on egg development in *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. (Prog. Ser.)* **24** : 121-128.
- Pipe R.K., 1987a.** Oogenesis in the mussel *Mytilus edulis* : an ultrastructural study. *Mar. Biol.*, **95** : 405-414.
- Pipe R.K., 1987b.** Ultrastructure and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **96** : 519-528.
- Ruiz C., M. Abad, F. Sedano, L.O. García-Martin and J.L. Sánchez López, 1992.** Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspend culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Biol. Ecol.*, **155** : 249-262.
- Seguineau C., A. Laschi-Loquerie, M. Leclercq, J.F. Samain, J. Moal and V. Fayol, 1993.** Vitamin transfer from algal diet to *Pecten maximus* larvae. *J. Mar. Biol.*, **1** : 67-71.
- Soliman A.K., K. Jauncey and R.J. Roberts, 1986.** The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture*, **59** : 197-208.
- Soudant P., 1995.** Les Phospholipides et les sterols des geniteurs et des larves de coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.). Relations avec la nutrition. Thèse d'Université de Bretagne Occidentale, Brest, 294 p.
- Soudant P., Y. Marty, J. Moal and J.F. Samain, 1996.** Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquac. International*, **4** : 191 : 200.
- Tazawa E, A. Fujiwara and I. Yasumasu, 1985.** Change in glycogen level in the oyster eggs during development. *Zool. Scien.* **2** : 349-357.
- Tazawa E., A. Fujiwara, A. Hino, K. Asami and I. Yasumasu, 1986.** Respiration in oyster eggs before and after fertilization. *Zool. Scien.* **3** : 807-816.
- Testart J., 1985.** Critères d'évaluation de la qualité des ovocytes et leur aptitude à la FIV. *Anna. Biol. Chim.* , **43** : 17-21.
- Tucker K.G., S. Chalder, M. Al-Bubeai and C.R. Thomas, 1994.** Measurements of hybridoma cell number, viability and morphology using fully automated image analysis. *Enzyme Microb. Technol.*, **16** : 29-35.
- Uchiyama H., K. Hirano, M. Kashiwasake-Jibu and K. Taira, 1996.** Detection of undegraded oligonucleotides in vivo by fluorescence resonance energy transfer. Nuclease activities in living sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.*, **271** : 380-384.
- Whyte J.N.C., N. Bourne and N.G. Ginthe, 1990.** Biochemical and energy changes during embryogenesis in the scallop *Crassadoma gigantea*. *Mar. Biol.*, **106** : 239-244.
- Whyte J.N.C., N. Bourne and N.G. Ginthe, 1991.** Depletion of nutrient reserves during embryogenesis in the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). *J. Exp. Mar. Ecol.*, **149** : 67-79.
- Yamamoto T., 1961.** Physiology of fertilization in fish eggs. *Int. Rev. Physiol.*, **12** : 361-405.
- Yasumasu I., A. Hino, A. Fujiwara, E. Tazawa, S. Nemoto and K. Asami, 1988.** Fertilization-induced change in the respiration rate in eggs of several marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* **90B**, **1** : 69-75.
- Yemel'yanova N.G., 1980.** Electron-microscopic study on the egg membranes and ovarian follicle in the silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*. *J. Ichthyology*, **19**(2) : 95-104.

