

## INDUCTION DE LA PONTE CHEZ LA COQUILLE SAINT-JACQUES : UTILISATION DES NEUROMEDIATEURS

**N. DEVAUCHELLE\*, N. ROBILLARD\*\*, P. MICARELLI\* ET P. GUERRIER\*\*\***

\* IFREMER BREST, DRV-RA, LABORATOIRE PMDC, BP 70, F- 29280 PLOUZANE.

\*\* 34 AVENUE PRAUD, 44300 NANTES,

\*\*\* E.N.S. LYON.

**Résumé :** Les gamètes de coquille St-Jacques sont récoltés de manière empirique dans les écloséries. Les produits sont obtenus dans des délais variables, en quantité et en qualité imprévisibles. L'effet des neuromédiateurs en tant que régulateurs potentiels du phénomène d'émission des gamètes, communément appelé ponte, a été testé. La sérotonine s'est avérée être un excellent régulateur de la spermiation. Un protocole de collecte du sperme a été établi. En revanche l'obtention des ovocytes s'est révélée plus délicate. Elle est possible, mais un protocole standard n'a pu être défini.

### INTRODUCTION

L'émission provoquée des gamètes de bivalves se fait généralement à la suite de chocs thermiques de 5 à 10 °C auxquels sont soumis des individus dont la maturité est jugée adéquate, à la suite d'une observation macroscopique.

Les produits sexuels sont obtenus dans des délais variables, en quantité et en qualité imprévisibles. Ceci constitue un obstacle aux rendements d'élevage larvaire, dans les écloséries, ainsi qu'à toutes les études portant sur les gamètes.

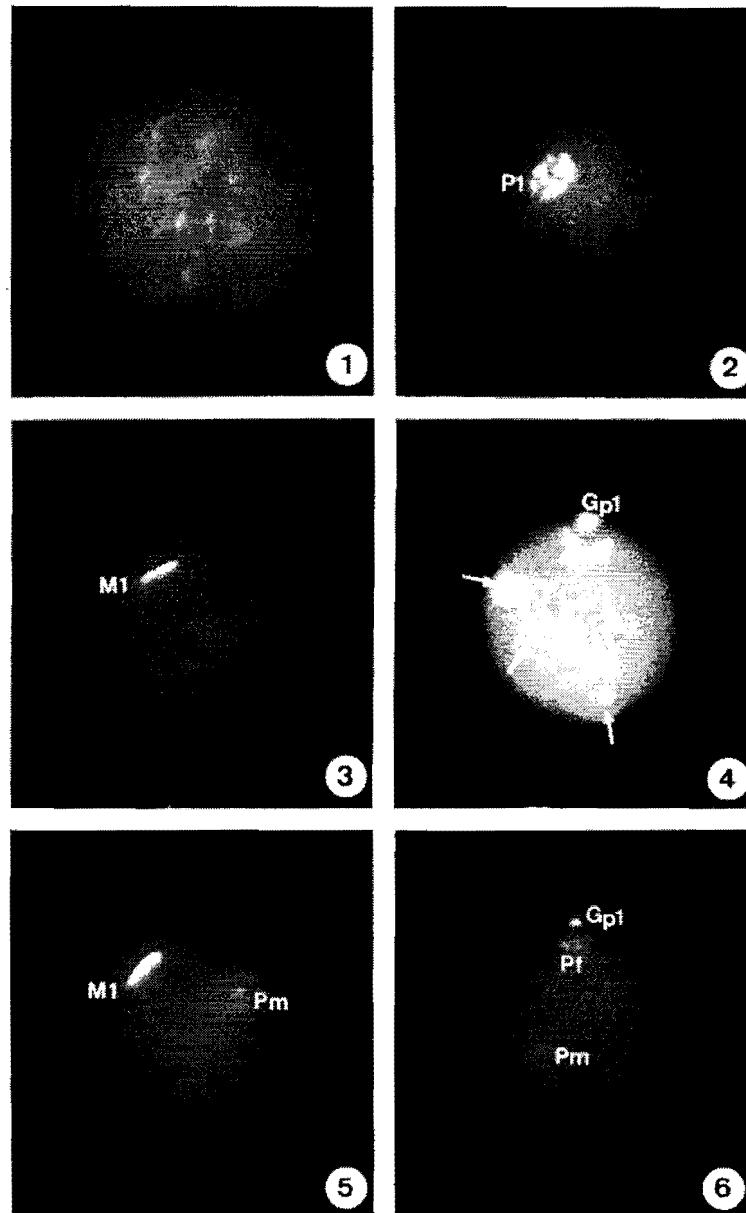
C'est pourquoi, nous avons vérifié si l'usage de neuromédiateurs pouvait permettre de lever cet obstacle. Des traitements d'ovocytes ont tout d'abord été réalisés in vitro pour vérifier leur effet et celui de leurs agonistes sur la reprise de méiose. Puis, l'effet d'injections dans les gonades a été étudié.

Le choix des neuromédiateurs testés a été fait en fonction d'expériences japonaises et françaises. En 1982, Matsutani et Nomura démontraient qu'une injection de sérotonine (5 hydroxytryptamine ou 5-HT) pouvait induire l'émission des gamètes chez *Patinopecten yessoensis*.

En 1994, Widowati démontrait que la maturation ovocytaire de la coquille Saint-Jacques s'effectue en deux étapes : la première étape est le passage du stade de prophase 1 au stade de métaphase 1 ; la deuxième étape est la levée de la métaphase 1. L'ovocyte émis par les voies naturelles est au stade métaphase 1. Il est alors fécondable. La figure 1 récapitule les principales étapes.

En 1993, Jégou démontrait, à partir de suspensions cellulaires de gamètes mises en présence d'extraits de ganglions cérébro-pédiéux et pariéto-viscéraux, que, chez la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*, des substances libérées par le système nerveux ont un effet sur la gamétogenèse.

Enfin, il a été montré que, chez des espèces de bivalves, par exemple *Mytilus edulis* ou *Ruditapes philippinarum*, dont la fécondation ne peut être obtenue qu'avec les ovocytes au stade de Germinal Vesicle Break Down - GVBD- (Krantic *et al.*, 1991, Abdelmajid *et al.*, 1993a et 1993b), la sérotonine peut lever le blocage en prophase 1, induire la GVBD et ainsi



**Figure 1.** Ovocytes et oeufs de *Pecten maximus* en microscopie à épifluorescence après coloration au hoechst 33258, avant et après la reprise de méiose.

- Photo 1** - Ovocyte immature, au stade vésicule germinale : les chromosomes sont décondensés.
- Photo 2** - Ovocyte mature dont la vésicule germinale s'est rompue : les chromosomes sont condensés, le pronucleus femelle (P1) est en prophase de la 1ère division de méiose.
- Photo 3** - Ovocyte mature, dont le pronucleus femelle (M1) est en métaphase de première division de méiose.
- Photo 4** - Polyspermie : plusieurs têtes spermatisques (-->) sont présentes à l'intérieur de l'oeuf. Le pronucleus femelle (Pf) et le premier globule polaire (Gp1) sont visibles.
- Photo 5** - Oeuf dont le pronucleus femelle (M1) est en métaphase 1, et dont le pronucleus mâle (Pm) est décondensé.
- Photo 6** - Oeuf montrant le premier globule polaire (Gp1), le pronucleus femelle (Pf), et le pronucleus mâle (Pm) décondensé.

préparer l'ovocyte à la fécondation. Ce phénomène est décrit comme étant une réponse à des signaux extracellulaires qui déclenchent un enchaînement d'événements aboutissant à une augmentation du calcium intracellulaire et à la rupture de la vésicule germinative (Guerrier *et al.*, 1993, Gobet *et al.*, 1994).

### **L'EFFET DE NEUROMEDIATEURS *IN VITRO***

La décision de rechercher des substances neuromédiatrices utilisables pour standardiser les conditions d'obtention des gamètes de coquille St-Jacques et optimiser les résultats tout en préservant la fertilité de l'espèce date, pour l'*IFREMER*, de 1991. D'abord, des expériences *in vitro* ont été réalisées par P. Guerrier en 1992. La technique de liaison du ligand 5-HT radioactif a été appliquée à des préparations semi purifiées de membranes ovocytaires. Elle a permis de déterminer les caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des récepteurs. L'espèce *Pecten maximus* réagit de manière très originale comparée à d'autres espèces puisqu'elle répond à deux agonistes de la sérotonine, le TFMPP (1-3 trifluorométhylpiperazine) et le 8 OH-DPAT (8 hydroxy-2-di-N-propylamnotetralin hydrobiomide) mais pas à la sérotonine elle-même (Figure 2).

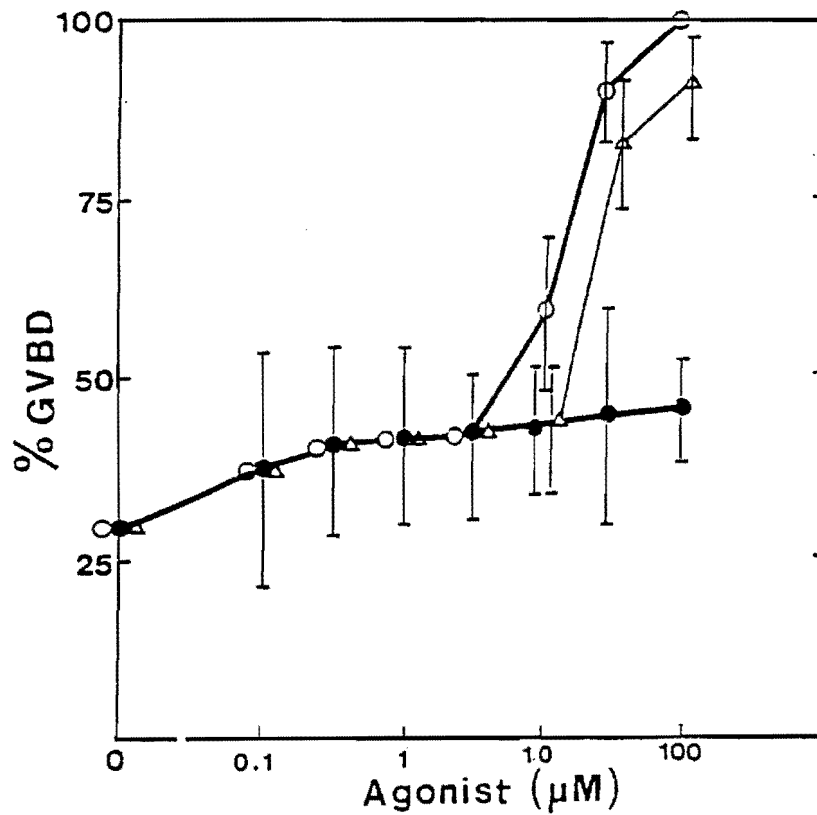
Une étude *in vitro* a été conduite à IFREMER/Brest, pour déterminer l'effet des mêmes effecteurs ainsi que celui de la dopamine et de ses agonistes, la bromocriptine et le quinpirole, sur l'apparition de la GVBD et des blocs métaphasiques. Les résultats montrent que les agonistes de la sérotonine se sont, en fait, révélés bien plus efficaces que les agonistes de la dopamine pour induire la GVBD. Le TFMPP a été particulièrement efficace aux concentrations de  $5 \cdot 10^{-4}$  M et  $10^{-3}$  M en induisant 85 à 99% de GVBD (Micarelli, 1992, Devauchelle *et al.*, 1994). Les blocs métaphasiques ont cependant été observés en très faible proportion (maximum 1%).

Les ovocytes traités au TFMPP ont pu être fécondés. Le taux moyen de fécondation est resté inférieur à 10%. Mais, il est encourageant car il démontre que la reprise de méiose artificiellement induite a une signification biologique. Un bon taux de fécondation étant l'aboutissement de ce type de travail à application aquacole, il devrait, à l'avenir, être arbitre de l'efficacité d'expériences similaires.

### **L'EFFET DES NEUROMEDIATEURS INJECTES DANS LA GONADE DES COQUILLES SAINT-JACQUES**

Les injections ont été pratiquées en deux endroits de la gonade. En tout, 0,4 ml d'une solution saline a été injecté par animal traité. L'effet des traitements a été évalué au nombre d'animaux ayant émis des gamètes, au délai d'émission des gamètes, au nombre des gamètes émis et à leur qualité. A ce titre, des essais de fécondation ont ponctuellement été réalisés et des embryons ont été incubés. Le but était alors de vérifier si nos premiers essais, tout en étant perfectibles, permettaient d'espérer des développements embryonnaires.

Les neuromédiateurs utilisés ont été la sérotonine, la dopamine et leurs agonistes TFMPP, 8 OH-DPAT, le quinpirole et la bromocriptine (Devauchelle *et al.*, 1994).



**Figure 2.** Effet de la sérotonine 5HT (●) et de deux agonistes TFMPP (○) et 8 OH-DPAT (▷) sur le déclenchement de la reprise de méiose des ovocytes de *Pecten maximus* exprimé en % de GVBD.

Les résultats montrent que la sérotonine, à la concentration de  $10^{-3}$  M, est la plus efficace pour induire l'émission des gamètes. L'émission du sperme suit l'injection d'une vingtaine de minutes en moyenne. Dans ce cas, et lorsque les gonades sont macroscopiquement identifiées au stade de maturité 4 (échelle classique de Cochard et Devauchelle, 1993), plus de 80 % des animaux émettent des spermatozoïdes féconds (tableau 1). La qualité du sperme récolté après le traitement à la sérotonine est comparable (et excellente) à celle du sperme récolté après un choc thermique, émis en milieu aqueux (tableau 2 : Faure *et al.*, 1994, Faure, 1996). L'injection des agonistes de la sérotonine, de la dopamine et de ses agonistes n'a pas permis d'induire d'émissions de sperme aux doses testées (Devauchelle *et al.*, 1994).

Pour obtenir des ovocytes, seule la sérotonine s'est révélée active. La sérotonine a été injectée selon deux protocoles différents : d'une part, suivant le protocole « sérotonine » efficace pour la spermiation et, d'autre part, en doubles injections. Le travail de Micarelli et Paesanti (commun. pers.) réalisé en Italie sur *Pecten jacobaeus*, en effet, montré que deux injections de sérotonine espacées de 15 jours permettaient l'émission des ovocytes. Les résultats d'émissions d'ovocytes sont assez imprévisibles. Dans les deux cas, des ovocytes ont été collectés et l'effet de l'injection pourrait dépendre de l'état d'avancement de la gamétogenèse (tableau 3: Doubovick, 1994). Des larves viables ont été obtenues. Cependant, un taux d'anomalies élevé a été observé. Différents facteurs pouvaient être à l'origine de ces anomalies. Aucun lien de cause à effet entre les anomalies et le traitement lui-même n'a été établi.

A titre anecdotique, on notera que d'autres effecteurs, reliés à l'activité reproductrice des vertébrés, ont été testés mais n'ont donné aucune réponse d'émissions d'ovocytes aux doses utilisées. Par exemple, une prostaglandine PGE<sub>2</sub>, la LHRH, l'ocytocine et la mélatonine (Doubovick, 1994).

## CONCLUSION

Les tests réalisés *in vitro* et *in vivo* donnent des résultats contradictoires quant à l'efficacité de la sérotonine comparée à celle de ses agonistes. Ce travail pose donc la question de la limite des applications de tests réalisés *in vivo*.

S'il indique que la sérotonine peut être utilisée de manière courante et efficace pour l'obtention de spermiation, il met en évidence la plus grande difficulté d'obtenir des ovocytes. Ce résultat est en parfait accord avec les données d'immunolocalisation obtenues sur *Placopecten magellanicus* où seuls les mâles émettent des gamètes après traitements à la sérotonine. Le fait de pouvoir utiliser la sérotonine pour récolter des ovocytes mûrs (GVBD) est très positif. Le fait d'obtenir des ovocytes après des délais variables pourrait signifier que les ovocytes sont plus ou moins réceptifs à la sérotonine, et peut-être qu'ils pourraient le devenir plus après un conditionnement au neuromédiateur. L'étude de l'évolution de la constitution membranaire des ovocytes faite sur des biopsies non destructrices pratiquées dans la gonade, à différents pas de temps après qu'une injection de sérotonine ait été pratiquée pourrait aider à comprendre la variabilité des résultats.

La sérotonine pourrait aussi agir suivant d'autres voies que celle de l'action directe sur des récepteurs ovocytaires. On lui connaît, en effet, des effets très diversifiés dans le règne animal, notamment un effet vasoconstricteur qui faciliterait l'expulsion « mécanique » des gamètes.

On notera que chez un autre pectinidé, *Argopecten purpuratus*, l'émission de sperme s'obtient plus facilement que l'émission d'ovocytes en associant PGE<sub>2</sub> et 5HT ou dopamine et eau de

**Tableau 1.** Effets d'injections de sérotonine, de dopamine et de leurs analogues dans la gonade de coquille St-Jacques.

Inducteur	[C] M	Nombre d'animaux testés	Animaux ayant émis du sperme % (N)	Animaux ayant émis des ovocytes % (N)
Sérotonine	$5 \times 10^{-4}$	25	84 (21)	0
	$10^{-3}$	15	87(13)	
Dopamine	$10^{-6}$	5	0	0
	$10^{-5}$	5	0	0
	$10^{-4}$	5	0	0
	$10^{-3}$	5	0	0
TFMPP	$2 \times 10^{-4}$	14	0	0
	$5 \times 10^{-4}$	24	0	0
	$10^{-3}$	10	0	0
	$5 \times 10^{-3}$	10	0	0
8 OH-DPAT	$5 \times 10^{-4}$	15	0	7(1)
	$10^{-3}$	5	0	0
Quinpirole	$10^{-6}$	5	0	0
	$10^{-5}$	5	0	0
	$10^{-4}$	5	0	0
	$10^{-3}$	5	0	0
Bromocriptine	$10^{-4}$	10	0	0
Eau de mer		30	0	0

**Tableau 2.** Effet du mode d'obtention du sperme sur les paramètres physiologiques des spermatozoïdes.

Mode d'obtention	Stimulation thermique		Stimulation chimique à la sérotonine
	Gonopore	Eau de mer	Gonopore
Lieu de prélèvement	Gonopore	Eau de mer	Gonopore
Respiration (nmolO <sub>2</sub> /min par mg prot.	127	/	115
Indice de mobilité (échelle de 1 à 5)	5	5	5
Forme de la trajectoire	homogène circulaire	homogène circulaire	homogène circulaire
Aspect des mouvements	propulsifs	propulsifs	propulsifs
Indice de linéarité	0,7	0,7	0,7
Fréquence flagellaire (Hz)	38	38	38
Vitesse moyenne (µm/sec)	255	230	235
Pouvoir fécondant (%)	29	82	77

**Tableau 3.** Émissions d'ovocytes obtenues après une seule injection de sérotonine

	Stade des gonades des coquilles	Injection	Nombre de coquilles	Nbre de coq. ayant émis du sperme	Nbre de coq. ayant émis des ovocytes
Lot Témoin	4	Eau de Mer	10	1	0
Lot Expérimental	4	Sérotonine ( $10^{-3}$ M)	30	28	21

mer (Martinez, commun. pers.). Ces résultats chiliens n'ont pas été comparés à des résultats témoins, et, la variabilité interindividuelle étant très grande, il est difficile d'interpréter l'effet des associations de neuromédiateurs.

Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, nous avons montré que des traitements à la sérotonine permettent, comme chez *Pecten maximus*, l'obtention de sperme plus facilement que celle des ovocytes. Le délai de spermiation est seulement de 2-3 minutes après l'injection. Des ovocytes peuvent être récoltés après une seule injection de sérotonine. Mais l'étude du rôle que pourraient jouer les neuromédiateurs dans cette espèce apparaît moins important à traiter, dans une optique d'application aquacole. Il est couramment admis que le sperme et les ovocytes d'huître creuse peuvent, en effet, être obtenus par scarification, sans dommage. Les ovocytes récoltés, au stade de prophase 1, sont fécondables. Pour cette espèce, l'intérêt va donc plutôt dans le sens de l'établissement d'une relation de cause à effet entre les critères de maturité des ovocytes ou du sperme et la fécondance ou la fécondabilité des gamètes, après scarification. Toutefois, des programmes de sélection génétique peuvent obliger à utiliser et à conserver vivants, des reproducteurs pendant x années. Dans ce cas, la possibilité de recueillir des ovocytes sans sacrifier l'animal et de manière efficace, serait à privilégier.

## Références

- Abdelmajid H., P. Guerrier, P. Colas, Y. Durocher, I. Gobet, S. Krantic, C. Leclerc-David, M. Moreau, I. Néant, P. Rivailier and M. Tomkowiak, 1993a.** Role of calcium during release of mollusc oocytes from their blocks in meiotic prophase and metaphase, *Biol. Cell.*, **78** : 137-143.
- Abdelmajid H., C. Leclerc-David, M. Moreau, P. Guerrier and A. Ryazanov, 1993b.** Release from the metaphase I block in invertebrate oocytes : possible involvement of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase III, *Int.J.Dev.Biol.* **37** : 279-290.
- Cochard J.C. and N. Devauchelle, 1993.** Spawning, fecundity and larval survival and growth in relation to controlled conditioning in native and translated populations of *Pecten maximus* (L.). Evidence for the existence of separate stocks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **169(1)** : 41-56.
- Devauchelle N., P. Micarelli, P. Guerrier and J. Desilets, 1994.** The neurohormonal induction of the release of oocytes and sperm from *Pecten maximus*. 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., Townsend L.D (Eds), Vol. 1 : 148-158.
- Dobovick N., 1994.** Contribution à l'amélioration de la reproduction de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* L. Mémoire d'Ingénieur des Techniques Agricoles, Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles de Bordeaux, 63 p.
- Faure C., N. Devauchelle, J.P. Girard and J. Cosson, 1994.** 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., Townsend LD (Eds), Vol. 1 : 28-37.
- Faure C., 1996.** Paramètres physiologiques de l'émission et de l'activation des gamètes mâles de deux Mollusques Bivalves ; la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg). Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest. 254 p.

- Gobet I., Y. Durocher, C. Leclerc, M. Moreau and P. Guerrier, 1994.** Reception and transduction of the serotonin signal responsible for meiosis reinitiation in oocytes of Japanese clam *Ruditapes philippinarum*, *Dev.Biol.* **164** : 540-549.
- Guerrier P., 1992.** Reproduction des mollusques bivalves d'aquaculture nouvelle. Compte rendu final -contrat d'incitation *IFREMER*, exercice 91 - 11 p.
- Guerrier P., C. Leclerc-David and M. Moreau, 1993.** Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalve mollusc, *Ruditapes philippinarum*, *Dev.Biol.* **159** : 474-484.
- Jegou F., 1993.** Neuroendocrinologie de la reproduction de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* : Recherche de substances agissant sur la gamétogenèse. *Thèse de docteur vétérinaire*, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 93 p.
- Krantic S., F. Dube, R. Quirion and P. Guerrier, 1991.** Pharmacology of the Serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes, *Developmental Biology*, **146** : 491-498.
- Matsutani T. and T. Nomura, 1982.** Induction of spawning by serotonin in the scallop, *Pactinopecten yessoensis* (JAY), *Marine Biology Letters*, **3** : 352-358.
- Micarelli P., 1992.** Induction de la maturation des ovocytes de coquille St-Jacques (*Pecten maximus*) et déclenchement de la ponte par des neurotransmetteurs : Sérotonine-like, Dopamine-like et Prostaglandine PGE<sub>2</sub>. Rapport de D.E.A. d'Océanologie Biologique et Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale, 31 p.
- Widowati I., 1994.** Gonadogenèse et relation trophique intestin-gonade chez *Pecten maximus* (mollusque bivalve). Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest. 152 p.



## DISCUSSIONS

### ONTROLE ARTIFICIEL DE LA REPRODUCTION

rapporteur Yamama NACIRI

La séance a commencé par un exposé de **Nicole DEVAUCHELLE** portant sur les problèmes méthodologiques que pose, lorsqu'on ne recourt pas au sacrifice des animaux, l'estimation individuelle des stades physiologiques. Plusieurs techniques ont été présentées (ouverture, biopsie...) et comparées (micro et macro analyses, biopsie).

**Catherine VERCELLI** a poursuivi par la présentation d'une expérience portant sur l'étude de l'évolution de la gamétogenèse d'huîtres plates *Ostrea edulis* maintenues au froid pendant 8 mois. Les résultats montrent que la gamétogenèse s'est effectuée tout au long de la période de suivi malgré les conditions de faible température (autour de 7-8°C) et d'alimentation réduite. Des maturations ont pu être obtenues tous au long du suivi, le nombre de larves baissant néanmoins au court du temps.

**André GERARD** a posé le problème de la reproduction des mollusques dans le cadre des besoins exprimés par l'équipe de génétique sur les huîtres creuses *Crassostrea gigas* et plates *Ostrea edulis*. Il a en particulier souligné la difficulté du passage à un contrôle individuel de la maturation lorsque seules des techniques de ponte en masse ont été mises au point.

**Clara MASSAPINA** a fait une synthèse des facteurs influençant la qualité des larves de *Crassostrea angulata* : influence prépondérante des femelles, qualité du conditionnement, période de ponte, technique d'induction de ponte...

**Jean BARRET** a parlé de température et de photopériode en tant que facteurs externes influençant la maturation des géniteurs. Il a souligné l'importance de la photopériode qui serait un déclencheur/inhibiteur de la gamétogenèse et qui, dans certaines conditions, pourrait avoir davantage d'importance que la température.

**Jean-François SAMAIN** a présenté des résultats concernant *Pecten maximus* et intégrant les stades allant du stockage de réserves à la formation des oeufs. Sa conclusion portait sur l'importance des aspects qualitatifs (qualité de la nourriture) pour augmenter la vitesse de maturation, améliorer la qualité des gamètes et donc optimiser la survie et la croissance larvaire.

**Nadia ROBILLARD** a parlé de l'influence des neuromédiateurs sur *Pecten maximus*, et en particulier de la sérotonine. Ce produit permet d'obtenir des émissions de sperme mais rarement des émissions d'ovocytes à moins de renouveler l'injection 15 jours après. Les problèmes qui se posent pour l'utilisation de neuromédiateurs tiennent principalement à l'évaluation du stade physiologique des animaux au moment de l'injection et à la connaissance précise des mécanismes hormonaux impliqués.