

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

JEAN DÉSILETS

CONTRIBUTION À L'AMÉLIORATION DE LA CULTURE DU PÉTONCLE  
GÉANT *PLACOPECTEN MAGELLANICUS*. OPTIMISATION DES  
PARAMÈTRES DE FÉCONDATION ET ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DU  
DÉBUT DU DÉVELOPPEMENT DES EMBRYONS.

MAI 1993

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## RÉSUMÉ

Le but de ce mémoire est de déterminer, chez le pétoncle géant *Placopecten magellanicus*, des conditions optimales de fécondation et de réaliser, par microscopie électronique, une étude ultrastructurale du début du développement des embryons.

La première partie de ce travail traite de l'effet de la température et de la concentration des gamètes sur le pourcentage de fécondation. Nos résultats montrent que, pour optimiser les conditions de fécondation, et assurer un développement normal des embryons, nous devons effectuer les fécondations entre 10 et 15°C en utilisant un ratio spermatozoïdes/ovocyte entre 20 et 50.

Nous avons ensuite effectué des cinétiques de développement des embryons à 10 et 15°C afin de déterminer les conditions expérimentales qui vont permettre d'améliorer la croissance de ce bivalve, par modification du cycle cellulaire. Les résultats indiquent que la cinétique d'apparition des différents stades cellulaires est plus synchrone à 10°C qu'à 15°C et montrent que le traitement affectant le cycle cellulaire devrait être appliqué 65 min. après fécondation.

D'après nos résultats, nous concluons qu'il est possible d'améliorer et d'optimiser, en laboratoire, les conditions de fécondation du pétoncle géant.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, nous avons étudié, par microscopie électronique, la morphologie des gamètes et des premières étapes du développement embryonnaire du pétoncle géant. Selon les résultats obtenus , il n'y a pas de modification corticale après l'entrée du spermatozoïde et les ovocytes du pétoncle géant ne possèdent pas de barrière physique pour se protéger contre les spermatozoïdes surnuméraires. Après la pénétration dans l'ovocyte, le spermatozoïde subit des transformations qui vont mener à la formation du pronucleus mâle et sont caractérisées par: le bris de l'enveloppe nucléaire, la dispersion de la chromatine du noyau spermatique, et la formation d'une enveloppe nucléaire qui entoure le pronucleus. Durant cette période, l'ovocyte, qui était alors bloqué au stade métaphase I, reprend ses divisions mitotiques et on peut observer l'émission du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>e</sup> globule polaire. Morphologiquement, les deux globules polaires sont différents. Les chromosomes qui demeurent au sein de l'embryon se dispersent et forment le pronucleus femelle. Les deux pronuclei (mâle et femelle) vont ensuite migrer l'un vers l'autre et s'associer. L'association des pronuclei est du type *Ascaris*, c'est-à-dire qu'il n'y a pas formation d'un noyau zygotique. Les chromosomes maternels et paternels s'alignent sur la plaque équatoriale du premier appareil mitotique et ce qui met fin au processus de la syngamie.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier personnellement mon directeur de recherche, Claude Gicquaud, pour sa disponibilité, son support, et ses judicieux conseils tout au long de ce travail.

Je voudrais remercier sincèrement mon co-directeur, François Dubé, pour son implication dans ce projet. Ses connaissances sur la biologie du développement des organismes marins et son expérience de recherche ont maintes fois assuré mes pas. Par sa façon de faire et de voir les choses, il fut sans cesse une source d'inspiration et de motivation. Dans une même lancée, je tiens à remercier Louise Dufresne qui m'a aidé à résoudre des problèmes techniques. Merci également à Richard Desrosiers qui, grâce à son sens de l'humour et à son verbe coloré, a changé les longues journées de manipulation en véritable parties de plaisir.

Finalement, merci à mes parents qui m'ont toujours encouragé et supporté dans les moments difficiles et merci également à Marie-Josée Madore qui a aimablement tapé la majeure partie de ce travail.

**TABLE DES MATIÈRES**

RÉSUMÉ .....	i
REMERCIEMENTS .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES FIGURES .....	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 GÉNÉRALITÉS .....	1
1.1.1 L'organisme et son habitat .....	2
1.1.2 Anatomie externe .....	4
1.1.3 Anatomie interne .....	7
1.1.4 Écologie de la reproduction .....	11
1.2 ASPECT ÉCONOMIQUE .....	13
1.3 PROBLÉMATIQUE ET ÉTAT DE LA QUESTION .....	16

**CHAPITRE II**

MATÉRIEL ET MÉTHODES . . . . .	20
2.1 PRÉLÈVEMENT DES GÉNITEURS . . . . .	20
2.2 CONDITIONNEMENT DES GÉNITEURS EN ÉCLOSERIE . . . . .	23
2.3 ÉMISSION DES GAMÈTES EN ÉCLOSERIE . . . . .	28
2.3.1 Méthode du choc thermique . . . . .	28
2.3.2 Méthode hormonale . . . . .	28
2.3.3 Traitement des gamètes . . . . .	29
2.4 COMPTAGE DES GAMÈTES . . . . .	30
2.4.1 Les spermatozoïdes . . . . .	30
2.4.2 Les ovocytes . . . . .	30
2.5 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL . . . . .	31
2.5.1 Effet de la température sur le taux de fécondation . . . . .	31
2.5.2 Effet de la concentration des gamètes sur le taux de fécondation . . . . .	32
2.5.3. Détermination de la cinétique du développement des embryons . . . . .	33

2.6 TRAITEMENT DES GAMÈTES ET DES EMBRYONS POUR LA MICROSCOPIE OPTIQUE .....	34
2.6.1 Technique de fixation .....	34
2.6.2 Technique de coloration de la chromatine .....	35
2.7 TRAITEMENT DES EMBRYONS POUR LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION .....	35
2.7.1 Technique de fixation et de déshydratation .....	35
2.7.2 Technique d'inclusion .....	36
2.7.3 Technique de coupe .....	37
2.7.4 Technique de coloration .....	37
 CHAPITRE III	
RÉSULTATS .....	38
3.1 RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES .....	38
3.1.1 Établissement de la courbe standard de spermatozoïdes ..	38
3.1.2 Effet de la température sur le pourcentage de fécondation ..	41
3.2 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE FÉCONDATION .....	46
3.2.1 Effet de la concentration des gamètes .....	46
3.3 CINÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT DES EMBRYONS .....	53

**CHAPITRE IV**

<b>ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DES GAMÈTES ET DU DÉBUT DU DÉVELOPPEMENT DES EMBRYONS . . . . .</b>	<b>66</b>
<b>4.1 MORPHOLOGIE DES GAMÈTES . . . . .</b>	<b>66</b>
<b>4.1.1 Les spermatozoïdes . . . . .</b>	<b>66</b>
<b>4.1.2 Les ovocytes non fécondés . . . . .</b>	<b>71</b>
<b>4.2 ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX DE LA FÉCONDATION . . . . .</b>	<b>77</b>
<b>4.2.1 Incorporation du spermatozoïde fécondant . . . . .</b>	<b>77</b>
<b>4.2.2 Développement du pronucleus mâle . . . . .</b>	<b>78</b>
<b>4.2.3 Formation du premier globule polaire . . . . .</b>	<b>82</b>
<b>4.2.4 Formation du second globule polaire . . . . .</b>	<b>83</b>
<b>4.2.5 Formation du pronucleus femelle . . . . .</b>	<b>88</b>
<b>4.2.6 Migration et rencontre des pronuclei . . . . .</b>	<b>89</b>

**CHAPITRE V**

<b>DISCUSSION . . . . .</b>	<b>99</b>
<b>5.1 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE FÉCONDATION . . . . .</b>	<b>99</b>
<b>5.1.1 Effet de la température sur le pourcentage de fécondation . . . . .</b>	<b>99</b>
<b>5.1.2 Effet des concentrations de gamètes sur le pourcentage de fécondation . . . . .</b>	<b>100</b>
<b>5.1.3 Cinétique du développement des embryons . . . . .</b>	<b>104</b>

5.2 ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DU DÉBUT DE LA FÉCONDATION . . . . .	105
5.2.1 Ovocyte non fécondé . . . . .	105
5.2.2 Fusion et incorporation du spermatozoïde fécondant . . . . .	106
5.2.3 Absence de réaction corticale et défense contre la polyspermie . . . . .	107
5.2.4 Développement du pronucleus mâle . . . . .	108
5.2.5 Formation du 1 <sup>er</sup> globule polaire . . . . .	111
5.2.6 Formation du 2 <sup>ème</sup> globule polaire . . . . .	112
5.2.7 Formation du pronucleus femelle . . . . .	113
5.2.8 Migration et rencontre des pronuclei . . . . .	114
5.2.9 Association des pronuclei . . . . .	114
CONCLUSION . . . . .	117
BIBLIOGRAPHIE . . . . .	119

**LISTE DES TABLEAUX**

## Tableau 1

Caractéristiques morphologiques des gonades en développement chez  
*Placopecten magellanicus* . . . . . 27

## Tableau 2

Principales dimensions du spermatozoïde de *P. magellanicus* . . . . . 70

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1:	Anatomie externe du pétoncle géant <i>P. magellanicus</i> . . . . .	6
Figure 2:	Anatomie interne du pétoncle géant <i>P. magellanicus</i> . . . . .	9
Figure 3:	Sites de prélèvements des géniteurs . . . . .	22
Figure 4:	Caractéristiques morphologiques des gonades en développement chez <i>Placopecten magellanicus</i> . . . . .	27
Figure 5:	Relation entre la densité optique à 340 nm et la concentration de spermatozoïdes . . . . .	40
Figure 6:	Effet de la température sur le pourcentage de fécondation monospermique et polyspermique . . . . .	43
Figure 7:	Photographie en épifluorescence d'ovocytes non fécondés et d'ovocytes fécondés à différentes températures . . . . .	45

Figure 8:	Effet de la concentration de spermatozoïdes sur le pourcentage de fécondation mono et polyspermique à 10°C et 15°C . . . . .	48
Figure 9:	Effet de la concentration d'ovocytes sur le pourcentage de fécondation mono et polyspermique . . . . .	52
Figure 10:	Stades cellulaires utilisés pour la détermination des cinétiques du développement des embryons (épifluorescence) . . . . .	55
Figure 11:	Cinétique du développement des embryons à 15°C . . . . .	57
Figure 12:	Cinétique du développement des embryons à 10°C . . . . .	59
Figure 13 (I):	Développement embryonnaire du pétoncle géant à 10°C . .	62
Figure 13 (II):	Développement embryonnaire (suite) . . . . .	64
Figure 14:	Morphologie du spermatozoïde . . . . .	69
Figure 15:	Examen du cortex d'ovocytes non fécondés . . . . .	74

Figure 16:	Cortex de l'ovocyte non fécondé et première étape de la fécondation . . . . .	76
Figure 17:	Développement du pronucleus mâle . . . . .	81
Figure 18:	Emission du premier globule polaire . . . . .	85
Figure 19:	Emission du deuxième globule polaire et formation du pronucleus femelle . . . . .	87
Figure 20:	Migration et rencontre des pronuclei . . . . .	91
Figure 21 (I):	Association des pronuclei . . . . .	93
Figure 21 (II):	Association des pronuclei (à fort grossissement) . . . . .	95
Figure 22:	Premiers stades de maturation mitotique . . . . .	98

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION**

#### **1.1 GÉNÉRALITÉS**

Ce travail s'inscrit dans le cadre du programme OPEN (Ocean Production Enhancement Network), centre d'excellence regroupant plusieurs universités du Canada.

Un volet du projet OPEN vise à améliorer la croissance des élevages du pétoncle géant, *Placopecten magellanicus*, par la production de larves triploïdes. Dans un premier temps, nous présenterons une brève description de l'organisme et de son habitat, puis nous exposerons les motifs qui font que l'on s'intéresse de plus en plus à ce mollusque. Nous passerons ensuite en revue l'état des connaissances concernant les modalités de la reproduction et de la fécondation chez ce bivalve. Enfin, nous énumérerons nos perspectives de recherche en vue d'apporter notre contribution à la culture du pétoncle géant.

### 1.1.1 L'organisme et son habitat

Le pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*), appelé aussi pecten d'Amérique, est un mollusque bivalve appartenant à la famille des Pectinidés. Les pétoncles géants vivent dans l'Atlantique Nord-Ouest depuis la pointe nord du golfe du Saint-Laurent jusqu'à la Côte de la Caroline du Nord, aux Etats-Unis (Young-Lai & Aiken, 1986).

Ce bivalve est un filtreur benthique, c'est-à-dire qu'il vit sur le fond. Sur la Basse Côte-Nord, il se trouve à faible profondeur soit entre 5 et 15 mètres. Dans la baie de Port-au-Port à Terre-Neuve, on le retrouve à des profondeurs variant entre 8 et 30 mètres. Aux îles-de-la-Madeleine, il vit entre 20 et 40 mètres de profondeur.

Le pétoncle géant peut vivre sur divers types de fond mais il préfère le gravier ferme, les coquillages ou les rochers. Le pétoncle est généralement sédentaire et reste posé sur son côté plat.

Selon des études menées par Dickie & Medcof (1963), la température optimale pour le pétoncle se situerait vers 10°-15°C et sa température létale entre 20 et 23,5°C. Cette limite supérieure de tolérance à la température pourrait expliquer la

présence du pétoncle géant à des plus grandes profondeurs dans la partie sud de sa distribution, la température des eaux de surface devenant trop élevée en été.

On dit également de cette espèce qu'elle est sténohaline, c'est-à-dire qu'elle supporte très mal les variations de salinité.

Comme la plupart des autres mollusques bivalves, le pétoncle est un organisme qui se nourrit de plantes et d'animaux microscopiques présents dans l'eau qu'il retient par un système complexe de filtration formé surtout par les branchies.

La croissance du pétoncle, comme pour les autres mollusques bivalves, se fait par accumulation de coquille année après année. Le taux de croissance est estimé en mesurant la distance entre les anneaux de la coquille. La croissance varie d'une région à l'autre et d'une année à l'autre, en fonction de la quantité de nourriture disponible, de la température de l'eau et de plusieurs autres facteurs (Young-Lai & Aiken, 1986).

En hiver, la croissance est ralentie et c'est à ce moment que se forment les anneaux qui permettent de déterminer l'âge. La taille commerciale qui est de 10 cm (4 po.) est atteinte en 4 1/2 ans dans la baie de Fundy et en Basse Côte-Nord.

Généralement, si la prédation n'est pas excessive, le pétoncle peut vivre assez longtemps car on trouve souvent, dans les régions faiblement exploitées, des pétoncles âgés de plus de 20 ans.

Durant sa vie larvaire, le pétoncle géant peut être victime d'une pléiade de prédateurs. Les larves microscopiques, se déplaçant librement dans l'eau, constituent une proie facile pour les animaux de plus grandes tailles qui filtrent l'eau pour se nourrir. Elles sont, de plus, très sensibles aux conditions du milieu comme la température, les courants et la concentration en oxygène. Les pétoncles sont attaqués par les étoiles de mer, les bigorneaux perceurs, les crustacés et les poissons comme la morue, la plie et le poisson loup. Les pétoncles les plus âgés sont souvent la proie des vers perceurs et des éponges, qui criblent leur coquille de trous.

### 1.1.2 Anatomie externe

Les parties molles du pétoncle géant sont protégées par deux valves ou coquilles; toutes deux sont rondes, de diamètre presque égal et reliées par une petite charnière droite (figure 1). La valve inférieure est plutôt plate, lisse et de couleur blanche ou crème, alors que la valve supérieure est creuse et habituellement plus foncée avec des teintes rougeâtres.

Figure 1

Anatomie externe du pétoncle géant *Placopecten magellanicus*.

Représentation photographique des 2 valves ou coquilles de l'animal. Anneau de croissance (▼). Echelle: 5 cm.

VI: valve inférieure

VS: valve supérieure

VI



VS

### 1.1.3 Anatomie interne

Entre les valves, se trouvent les parties molles de l'animal, qui composent environ 40% de son poids total. Le gros muscle blanc, appelé muscle adducteur, sert à ouvrir et fermer les coquilles. Ce muscle, communément appelé la "noix", constitue la chair, seule partie habituellement consommée et commercialisée en Amérique du Nord (figure 2).

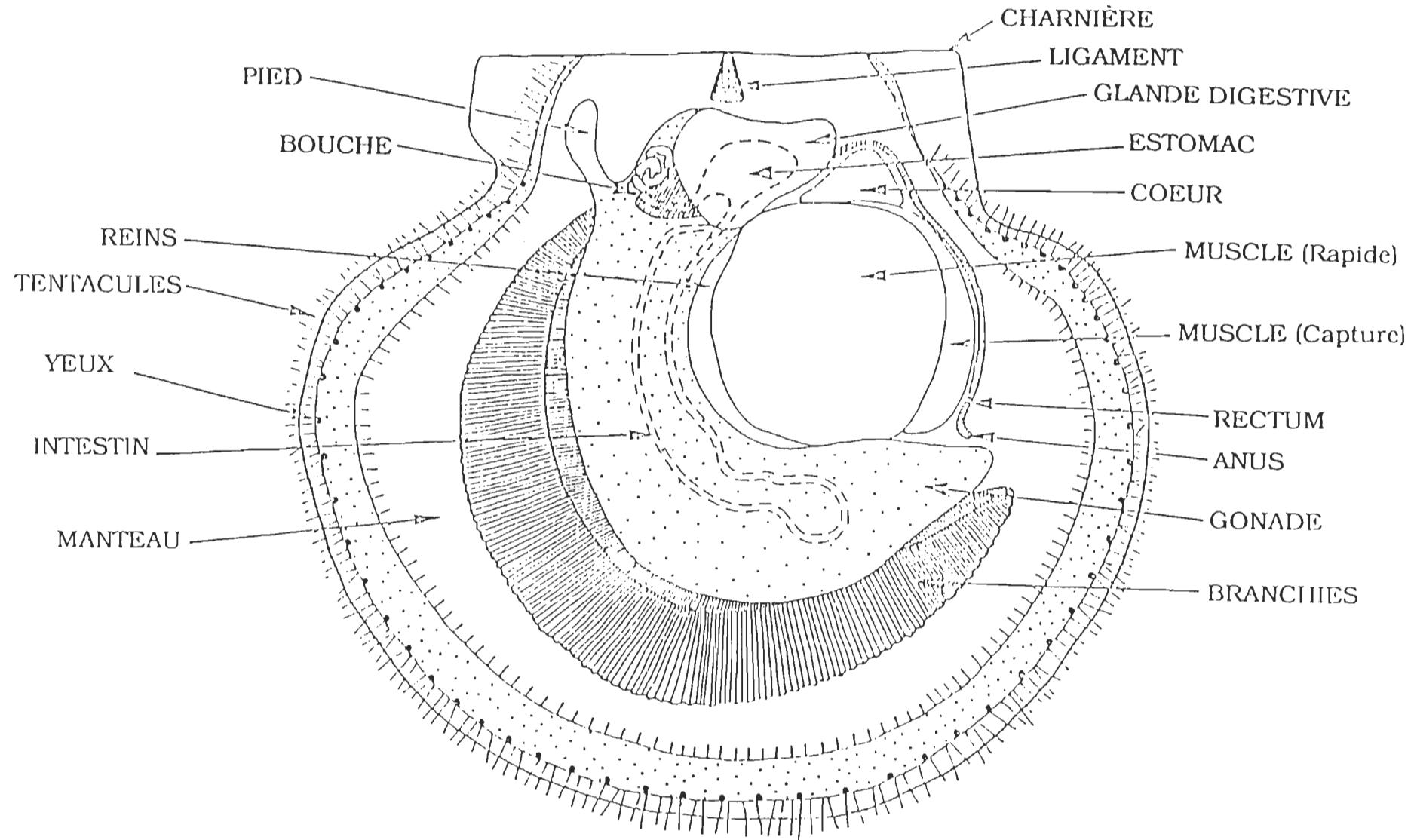
Chez le pétoncle, comme chez tous les mollusques, le manteau est la partie la plus externe qui entoure le reste des parties molles. Sa principale fonction est de sécréter la coquille afin de réparer des bris ou des cassures. Il a également pour fonction de supporter les yeux et les tentacules sensoriels. En bordure des coquilles, on peut apercevoir les yeux dont le nombre est d'environ une centaine.

La respiration est assurée par les branchies, formées de longs filaments minces pourvus de cils. En plus de la respiration, les branchies, au nombre de deux, jouent un rôle essentiel dans la nutrition. Le battement des cils crée un mouvement d'eau continual à l'intérieur des coquilles entraînant ainsi la nourriture vers la bouche.

Figure 2

Anatomie interne du pétoncle géant *Placoplecten magellanicus*.

Représentation schématique des structures anatomiques internes tirée de Gaudet (1992).



La nourriture, enrobée de mucus sur les branchies, est dirigée vers la bouche située à l'arrière du muscle adducteur près de la charnière. Elle est alors entraînée dans l'estomac, broyée par le stylet cristallin, puis décomposée par des enzymes digestifs. L'estomac est entouré par une petite glande noirâtre que l'on nomme parfois hépatopancréas ou foie. Cette glande joue un rôle dans la digestion et dans l'accumulation des réserves de nourriture. Elle agit un peu comme un foie et peut concentrer des substances toxiques (toxines) absorbées par l'animal, pour ensuite les éliminer très lentement. Si les pétoncles vivent dans un milieu où vivent des algues toxiques, ils peuvent contenir des toxines en quantité mortelle pour l'homme (Jamieson & Chandler, 1983).

L'intestin part de l'estomac et passe à l'intérieur de la gonade (glande génitale) puis contourne le muscle et se termine par l'anus.

Finalement, l'organe reproducteur du pétoncle est la gonade communément appelée le "corail". Le pétoncle géant est un être unisexué mais on peut trouver des individus hermaphrodites (Merrill & Burch, 1960).

Durant la saison estivale, les glandes génitales parviennent à maturité et prennent un beau rouge corail chez les femelles et une couleur crème chez les mâles.

#### 1.1.4 Écologie de la reproduction

Durant toute l'année, la gonade passe par plusieurs stades avant d'arriver à émettre les produits sexuels mâles et femelles. Il y a une longue période de maturation et c'est surtout à partir du printemps que le développement s'accélère. Le volume de la gonade s'accroît progressivement à partir du printemps et elle prend alors sa couleur, propre au sexe de l'animal. La maturation gonadique dépend des conditions environnementales comme la température et la disponibilité de la nourriture (MacDonald & Thompson, 1985; Sastry, 1963).

Chez le pétoncle géant, la période de reproduction se limite à quelques mois et elle est variable. Elle a lieu entre la fin juin et le début août sur la Basse-Côte-Nord alors qu'elle s'étend de la mi-août au début septembre dans la Baie-des-Chaleurs. Selon Bonardelli & Himmelman (1989), la ponte est l'événement le plus remarquable dans les cycles de reproduction des invertébrés marins et on postule que la plupart des espèces, pour assurer leur succès reproductif, ont évolué vers l'utilisation de signaux environnementaux pour coordonner la ponte et assurer des conditions favorables au développement des larves et des juvéniles.

La fécondation est externe: produits sexuels mâles et femelles (spermatozoïdes et ovocytes) sont relâchés dans le milieu par millions et la fécondation se fait au

hasard des rencontres.

Les ovocytes émis par les femelles n'ont pas complété leur maturation méiotique et sont bloqués au stade métaphase I. Suite à la fécondation, l'ovocyte reprend ses divisions méiotiques pour réduire le nombre de ses chromosomes à 1n (nombre haploïde). Le premier signe externe qui fait état de la réussite de la fécondation est l'apparition des deux globules polaires. Le pronucleus mâle présent dans le cytoplasme de l'ovocyte subit un gonflement et une décondensation partielle de ses chromosomes avant de pouvoir s'apparier à un pronucleus femelle qui a le même nombre de chromosomes (1n). Puis, les deux pronuclei (mâle et femelle) s'apparent et le cycle mitotique s'engage.

Le temps requis pour le développement embryonnaire et larvaire est spécifique à l'espèce et dépend de la température (Bourne et al., 1989). C'est grâce à Culliney (1974) que l'on a pu établir les principales étapes du développement larvaire du pétoncle géant. Cet auteur a montré qu'à 12°C, le stade gastrula apparaît 30 et 40 heures après la fécondation. Puis 4 jours après insémination, on peut observer la forme typique de la coquille en forme de "D": c'est le stade D-véligère. L'organisme se déplace alors librement et peut se nourrir à l'aide de son vélum. Puis, la jeune larve développe un pied (stade pédivéligère) et ce dernier sécrète alors de petits filaments adhésifs appelés byssus.

Vers la fin de la période larvaire ( $\approx$ 40 jours), la larve perd son vélum et migre vers le fond pour se trouver un support et s'y fixer; c'est l'étape de la métamorphose. Nous avons maintenant un jeune naissain (mini-adulte) qui va débuter sa vie sédentaire. La maturité sexuelle peut être atteinte en moins de deux ans et ce à une taille qui varie entre 23 et 35 mm (Naidu, 1970).

## 1.2 ASPECT ÉCONOMIQUE

Le pétoncle géant est l'espèce de mollusques la plus importante sur le plan commercial au Canada. La pêche hauturière, qui s'est développée sur le banc de Georges (au large de la pointe Sud-Ouest de la Nouvelle-Écosse), a connu beaucoup de succès au début des années 60 et à la fin des années 70. A cette époque, les débarquements de pétoncles oscillaient entre 7 et 10 milles tonnes métriques (poids vif) et les revenus générés par cette industrie se chiffraient à plusieurs millions de dollars (Ministère des Pêches et des Océans, 1988).

Depuis les 20 dernières années, les rendements commerciaux associés à la pêche aux pétoncles n'ont cessé de décroître (Pêches et Océans, 1991; Bureau de la statistique du Québec, 1990). On peut penser que ce sont les prélèvements intensifs qui ont provoqué la rupture de l'équilibre naturel des bancs, les adultes n'étant plus assez nombreux pour assurer la régénération des populations. Il faut,

en outre, souligner que la gestion rationnelle des ressources marines est devenue, au fil des ans, un défi de taille. Les pêcheurs possèdent des engins de pêche de plus en plus performants, ce qui entraîne une capture très rapide des quotas de pêche. Et le fait que les quotas de pêche soient atteints rapidement amène les pêcheurs à faire pression afin de les hausser.

Ce phénomène a donc engendré une sur-exploitation de la ressource. La forte croissance mondiale de la demande des produits de la mer, qui ne peut plus être satisfaite exclusivement par la pêche commerciale traditionnelle, couplée à une valeur élevée du pétoncle, font de ce mollusque une espèce à fort potentiel aquicole.

On a entrepris au Québec des travaux de pectiniculture (élevage des pétoncles) en 1980 sur la Basse-Côte-Nord. Bien que ces études aient permis de démontrer la faisabilité biologique et technique de cette méthode d'élevage (Gaudet, 1992), il n'est pas actuellement possible d'atteindre un seuil de rentabilité.

Le facteur clé de la rentabilité en aquaculture est la vitesse de croissance et dans le cas de l'élevage en suspension, il faut compter 4 ans avant d'atteindre la taille commerciale de 10 cm (4 pouces) ce qui est nettement trop long. Cette difficulté pourrait être surmontée par la mise au point de larves triploïdes.

La production d'organismes triploïdes ( $3n$  chromosomes, au lieu d'organismes diploïdes,  $2n$  chromosomes) permet l'obtention d'individus généralement stériles chez lesquels la croissance somatique est favorisée étant donné la canalisation de l'énergie vers des organes autres que ceux impliqués dans la reproduction. Cette procédure d'amélioration de la croissance des élevages est particulièrement bénéfique en aquiculture et elle a été utilisée avec succès, en particulier chez les poissons tels le saumon du Pacifique (saumons coho, rose et chinook), le saumon de l'Atlantique et la truite arc-en-ciel (Benfey, 1989; Arai et al., 1986; Utter et al., 1983). Récemment, il a été démontré que ces techniques peuvent aussi bien s'appliquer aux mollusques tels que le pétoncle noir *Chlamys varia* et l'huitre américaine *Crassostrea virginica* (Baron et al., 1989; Stanley et al., 1984). L'induction de la triploidie peut s'effectuer par des chocs mécaniques ou physiques (traitement par la chaleur, utilisation de fortes pressions ou d'agents chimiques) lesquels interfèrent avec le processus de la division cellulaire (Beaumont & Fairbrother, 1991).

Bref, la production d'individus triploïdes est réalisée de manière à contrer la réduction chromosomique qui intervient normalement au cours de la méiose, les ovocytes retenant ainsi un lot supplémentaire de chromosomes.

### 1.3 PROBLÉMATIQUE ET ÉTAT DE LA QUESTION

Avant même d'entreprendre la production de larves triploïdes, il faut au préalable posséder de solides connaissances sur la biologie du développement de cette espèce. Comme nous l'avons vu, la biologie de l'organisme adulte est bien connu et bien documentée. Cependant, très peu d'études ont été entreprises sur la fécondation et le déroulement des premières étapes du développement du pétoncle géant. Or, l'acquisition de ces connaissances est indispensable puisque c'est au cours des premiers stades de développement que doit se faire l'intervention qui permettra d'obtenir des embryons triploïdes.

Le but général de ce travail est de connaître certains aspects de la biologie du développement du pétoncle géant qui vont permettre la mise au point d'organismes triploïdes. Notre approche expérimentale comprend deux volets. 1) Le premier volet consiste à optimiser les paramètres de fécondation et comprend les trois étapes suivantes:

- 1.1 analyser l'effet de la température sur le pourcentage de fécondation;
- 1.2 déterminer le ratio spermatozoïdes/ovocyte qui va permettre d'optimiser le pourcentage de fécondation;
- 1.3 déterminer le temps précis, après fécondation, où appliquer le traitement inducteur de la triploidie.

En milieu naturel, nous savons que la fécondation s'effectue dans le milieu externe. Par conséquent, la réussite de la fécondation est sous la dépendance directe des conditions physico-chimiques du milieu. La température est d'une importance capitale pour assurer le succès de la fécondation et le développement embryonnaire (Tettelbach & Rhodes, 1981; Kennedy *et al.*, 1974; Calabrese, 1969). Pour accomplir la première étape du premier volet, nous avons comme objectif préliminaire d'analyser l'effet de la température sur le pourcentage de fécondation. De plus, le fait que les mollusques pélécypodes ne possèdent pas une défense totale contre la polyspermie indique qu'il faut porter une attention particulière aux concentrations de gamètes à employer lors des fécondations. Gruffydd & Beaumont (1970) ont montré, chez *Pecten maximus*, qu'il est essentiel de déterminer la concentration optimale d'ovocytes et de spermatozoïdes à utiliser pour produire le plus grand nombre possible de larves normales en écloserie. Nous avons comme objectif d'étudier l'effet de la concentration des gamètes (spermatozoïdes et ovocytes) afin d'optimiser les paramètres de fécondation(volet 1, étape 2).

Par la suite, si nous voulons produire le plus grand nombre de triploïdes, on se doit d'effectuer des cinétiques de développement des embryons. Rappelons que le principe de ces interventions est d'empêcher l'émission d'un des deux globules polaires en inhibant la séparation cytoplasmique entre les deux cellules (cytocinèse). Ces études de cinétiques du développement vont nous permettre de réaliser la

troisième étape du premier volet de ce projet.

2) Enfin, le deuxième volet de ce projet consiste à effectuer une analyse ultrastructurale des gamètes et du début du développement des embryons. Outre le fait que ce genre d'analyse n'a jamais été réalisée sur cette espèce, cette étude est justifiée par le fait qu'elle va nous permettre d'acquérir des renseignements essentiels sur le développement normal des embryons du pétoncle géant. Pour accomplir cette étude, notre objectif est de mettre l'emphase sur les aspects suivants:

- 2.1 la morphologie des gamètes mâles et femelles;
- 2.2 les mécanismes d'interactions des spermatozoïdes et des ovocytes au cours de la fécondation (fixation, pénétration du spermatozoïde fécondant, évolution du pronucleus mâle dans le cytoplasme de l'ovocyte) et finalement;
- 2.3 la morphologie de chacune des étapes de la méiose normale (mouvement des chromosomes, émission des deux globules polaires, formation du pronucleus femelle, migration et association des pronuclei).

Puisque la rétention d'un des globules polaires affecte les conditions de ploïdie, cette étude servira de contrôle dans le cas où l'on comparera les embryons témoins et les embryons triploïdes.

En somme, les résultats qui sont présentés dans ce travail ont pour but d'apporter une certaine contribution à la culture du pétoncle géant en maîtrisant certains aspects de la biologie de la reproduction qui pourrait déboucher sur des opérations d'aquiculture.

## **CHAPITRE II**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **2.1 PRÉLÈVEMENT DES GÉNITEURS**

Tous les pétoncles géants qui ont été utilisés pour mener à bien ces travaux sont issus de trois sites géographiques distincts soient: (1), La Basse Côte-Nord, (2), La Baie des Chaleurs et (3), Les Iles-de-la-Madeleine (figure 3). Les pétoncles sont récoltés tôt au printemps, à 30 m de profondeur, par des plongeurs ou bien à l'aide d'une drague de type commercial généralement employée par les pêcheurs.

Les mollusques sont alors acheminés puis conservés dans des bassins d'eau de mer à température contrôlée à la station aquicole de l'Institut National de la Recherche Scientifique (I.N.R.S.) à Pointe-au-Père.

On détermine le sexe de chaque géniteur en entrouvrant légèrement les valves des pétoncles afin d'observer la coloration des gonades. Après identification du sexe des mollusques, on procède ensuite à un examen macroscopique de la gonade pour évaluer le stade de maturation sexuel.

Figure 3

Sites de prélèvements des géniteurs.

- 1: Basse Côte-Nord
- 2: Baie des Chaleurs
- 3: Iles-de-la-Madeleine



Le tableau 1 résume les différentes caractéristiques qui sont prises en considération lors de l'évaluation du stade de maturation des glandes génitales. Ces stades macroscopiques ont été décrits par Desrosiers (1992, non publié).

## 2.2 CONDITIONNEMENT DES GÉNITEURS EN ÉCLOSERIE

Afin d'obtenir des gamètes (ovocytes et spermatozoïdes), il faut absolument que les mollusques soient parvenus à maturité sexuelle. Ainsi, lorsque l'état des gonades correspond à des stades de maturation très peu avancés, il est possible d'amener des géniteurs à maturité sexuelle en les nourrissant d'algues microscopiques et en contrôlant la température (Devauchelle & Mingant, 1991; Fournier & Marsot, 1985). Les géniteurs sont nourris à partir des algues *Isochrysis galbana* et *Pavlova lutheri* à raison d'environ  $5 \times 10^9$  cellules par jour. On vérifie périodiquement l'état de maturation des glandes sexuelles, et les organismes qui ont atteint le plus haut niveau dans la classification de Desrosiers (tableau 1) sont prêts pour être stimulés pour la ponte (figure 4).

Tableau 1

Caractéristiques morphologiques des gonades en développement chez *Placopecten magellanicus* d'après Desrosiers (non publié).

Stades	Aspect des gonades	Canal alimentaire	Couleur des gonades	Follicules	Gamètes
I Indifférenciées.	Petites, contractées et molles.	Boucle du canal visible.	Translucide, brunâtre ou grisâtre.	La plupart sont vides.	Quasi absents.
II Peu différencierées.	Plus grosses mais molles et angulaires.	Boucle toujours visible.	Testicule faiblement blanchâtre et ovaire orange très pâle.	Petits et dispersés.	Spermatocytes et ovogonies présentes.
III En développement.	Taille: augmentation nette mais gonades molles contenant de l'eau. Artères visibles.	Difficile à voir car les parois s'épaissent.	Testicule blanc. Ovaire orangé.	Clairs, visibles, nombreux et espacés.	Plus de spermatozoïdes dans les follicules. Ovocytes immatures.
IV En maturation.	Plus grosses et plus fermes car elles contiennent peu d'eau. Les extrémités pointent. Aspect granuleux.	Très difficile à voir.	Testicule blanc crème. Ovaire orange.	Denses.	Lumen remplis de spermatozoïdes Ovocytes totalement matures.
V Maturité.	Taille maximale, fermes, sans eau. Surface luisante et uniforme. Artères définies pouvant induire des sillons.	Invisible.	Testicule blanc crème. Ovaire orange vif. Peut être rouge vif.	Étroitement en contact. Couleur intense.	Gamètes matures. Pression induit une entrée de gamètes dans les gonoductes.
Ponte et recouvrement.	Ramollissement des gonades. Extrémités très pointues.	Canal visible.	Couleur moins dense avec des taches grisâtres dues à des follicules vides.	Région vide et translucide. Follicules contenant des phagocytes.	Gamètes matures ou en recouvrement.

Figure 4

Caractéristiques morphologiques des gonades en développement chez *Placopecten magellanicus*.

Les différents stades de développement sont expliqués au tableau 1.

♂: mâle

♀: femelle

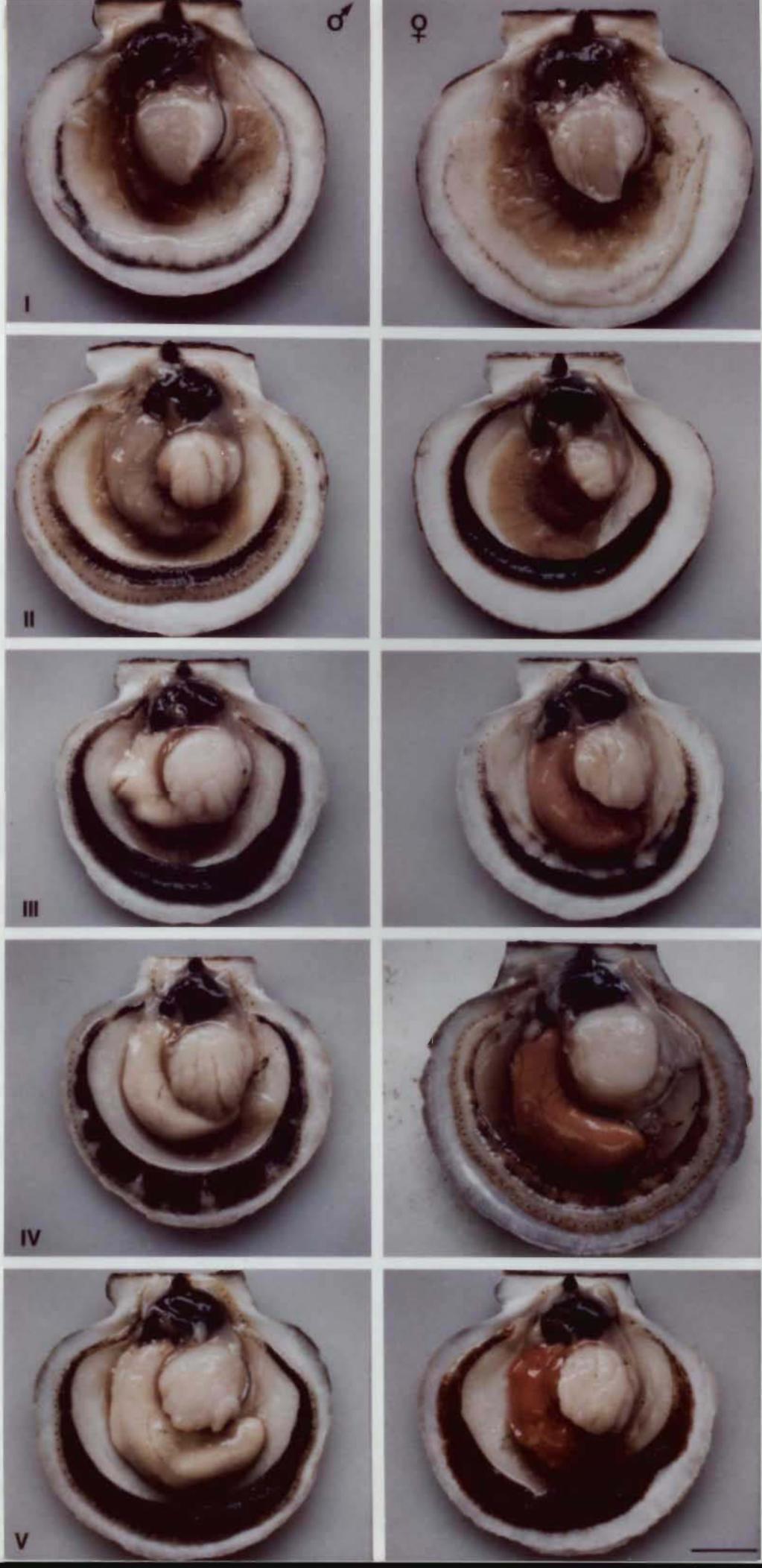
I: stade I

II: stade II

III: stade III

IV: stade IV

V: stade V



## 2.3 ÉMISSION DES GAMÈTES EN ÉCLOSERIE

### 2.3.1 Méthode du choc thermique

Les émissions de gamètes ont été induites selon le protocole faisant appel aux chocs thermiques classiquement utilisés et décrits par Cochard (1983) et par Loosanoff & Davis (1963). Une immersion des pétoncles dans l'eau de mer dont la température est de 5°C plus élevée est généralement suffisante pour qu'ils libèrent leurs gamètes. Habituellement, le sperme est d'abord émis, puis viennent ensuite les ovocytes 1 à 4 h après le début de la stimulation.

### 2.3.2 Méthode hormonale

Si la méthode du choc thermique ne fonctionne pas, il existe de puissants neurotransmetteurs capables d'induire la ponte chez certains *Pectens* (Velez et al., 1984). La sérotonine est très efficace pour obtenir les spermatozoïdes. Une injection intragonadique de 0,4 mL de sérotonine 2mM (5-Hydroxytryptamine ou 5-HT, Compagnie Sigma) permet d'obtenir la semence très rapidement, mais cette substance est relativement peu efficace pour obtenir les ovocytes.

### 2.3.3 Traitement des gamètes

Dès leur émission, les ovocytes sont concentrés par tamisage sélectif sur nitex de 100 µm pour enlever les détritus et débris divers puis sur nitex de 20 µm. Après filtration, les ovocytes sont resuspendus dans de l'eau de mer préalablement irradiée aux ultraviolets, filtrée (1 µm), et tamponnée.

L'eau de mer est tamponnée avec du tampon HEPES 2 mM (acide N'-2-Hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique, Compagnie Sigma) et ajustée à pH 8.0 avec du NaOH ou du HCl 1N. Une fois les ovocytes resuspendus dans l'eau de mer, ils sont immédiatement mis sous agitation.

Le sperme est également tamisé sur nitex de 20 µm et il est conservé sur glace. De cette façon, il garde son pouvoir fécondant.

La salinité de l'eau de mer naturelle recueillie à la station aquicole peut fluctuer légèrement et elle est mesurée à l'aide d'un salinomètre de type "Reicher Ts-meter" (American Optical Corporation, précision:  $\pm 1 \text{ \%}$ ). Elle est ajustée à 26 % par ajout de sels de mer.

## 2.4 COMPTAGE DES GAMÈTES

### 2.4.1 Les spermatozoïdes

La concentration de spermatozoïdes est déterminée par mesure de densité optique. Selon Rothschild (1950), la densité optique d'une suspension de spermatozoïdes est proportionnelle à sa concentration. La courbe standard s'effectue à partir de dilutions du sperme concentré.

Le nombre de cellules par mL de chaque échantillon a été déterminé par comptage direct à l'hémacytomètre. Pour faciliter le comptage des cellules, les suspensions sont diluées et les cellules sont immobilisées par addition de formaldéhyde.

### 2.4.2 Les ovocytes

Le comptage des oeufs se fait en prélevant un échantillon de 10 µl à l'aide d'une pipette automatique et son contenu est étalé sur une lame. Plusieurs comptages sont requis. Comme alternative, on peut aussi utiliser des tubes capillaires calibrés de 10 µl (Compagnie Corning) qui se remplissent par capillarité lorsqu'on les plonge dans une suspension homogène d'ovocytes. On compte

ensuite le contenu du tube capillaire sous une loupe binoculaire. Si le comptage est difficile en raison d'une quantité d'ovocytes trop élevée, on doit diluer la suspension initiale.

## 2.5 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

### 2.5.1 Effet de la température sur le taux de fécondation

Les fécondations sont réalisées en duplicita dans un volume de 40 mL et les concentrations de gamètes utilisées sont respectivement de  $2 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL et de  $5 \times 10^3$  ovocytes/mL.

Les fécondations sont faites dans des bains dont la température est maintenue constante à 5, 10, 15 ou 20°C. Les ovocytes sont maintenus sous agitation constante durant les 5 premières minutes suivant la fécondation, après quoi, ils sont laissés au repos. Soixante minutes après le début de la fécondation, on prélève 1 mL d'échantillon que l'on fixe et colore selon les techniques décrites au point 2.6.1. et 2.6.2. On détermine alors le pourcentage de fécondation (monospermique ou polyspermique) par comptage direct des pronuclei mâles décondensés à l'intérieur des ovocytes.

### 2.5.2 Effet de la concentration des gamètes sur le taux de fécondation

L'effet de la concentration des gamètes sur le pourcentage de fécondation mono et polyspermique est établi en deux étapes. Dans une première étape, on fait varier les concentrations de spermatozoïdes de  $5 \times 10^3$  à  $1 \times 10^6$  spermatozoïdes/mL tout en gardant une concentration d'ovocytes fixe à  $5 \times 10^3$  ovocytes/mL.

Dans une seconde étape, on fait varier la concentration d'ovocytes de  $5 \times 10^2$  à  $4 \times 10^4$  ovocytes/mL avec une concentration de spermatozoïdes fixée à  $2 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL.

Les fécondations sont réalisées dans un volume de 40 mL en agitant de manière constante durant les 5 premières minutes. On cesse alors l'agitation et on permet aux ovocytes de se déposer. Quarante-cinq minutes après la fécondation, on prélève 1 mL que l'on fixe et colore d'après 2.6.1 et 2.6.2. On évalue alors le pourcentage de fécondation (monospermique et polyspermique) selon la méthode décrite en 2.5.1. Ces expériences sont exécutées à 10 et 15°C.

### 2.5.3. Détermination de la cinétique du développement des embryons

Pour déterminer la cinétique du développement des embryons, chaque fécondation est exécutée dans un volume de 100 mL et les suspensions d'ovules sont maintenues sous agitation constante.

Les concentrations de gamètes utilisées sont respectivement de  $2 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL et de  $5 \times 10^3$  ovocytes/mL ce qui donne un ratio de 40 spermatozoïdes/ovocyte. Des prélèvements de 1 mL sont d'abord effectués aux 5 minutes (jusqu'à ce que les 2 globules polaires soient émis), puis aux 10 minutes jusqu'à la 2<sup>ème</sup> division cellulaire (stade 4 cellules). Les aliquots sont fixés et colorés dans des plaques à culture de 24 puits selon les méthodes décrites en 2.6.1 et 2.6.2.

On détermine alors le pourcentage d'embryons ayant atteint les stades de développement suivant: émission du 1<sup>er</sup> globule polaire, émission du 2<sup>ème</sup> globule polaire, stade 2 cellules (1<sup>ère</sup> division), stade 4 cellules (2<sup>ème</sup> division), et ce en fonction du temps après fécondation.

Les observations sont faites à l'aide d'un microscope à fluorescence, ce qui permet de bien visualiser les événements durant les stades de maturation

méiotiques et mitotiques des embryons. La cinétique du développement des embryons est établie à 10°C de même qu'à 15°C. Les données sont issues de l'observation d'une centaine d'embryons par puits.

## 2.6 TRAITEMENT DES GAMÈTES ET DES EMBRYONS POUR LA MICROSCOPIE OPTIQUE

### 2.6.1 Technique de fixation

Les gamètes et les embryons sont fixés, selon Dubé (1988), par la formaldéhyde 6% dans un tampon GA (Tampon Glucamine Acétate composé de: 250 mM N-méthyl glucamine; 250 mM K gluconate; 50 mM HEPES; 10 mM EGTA, ajusté à pH 7,4 avec de l'acide acétique glacial).

La fixation est pratiquée dans des plaques à culture (Corning) de 24 trous à raison d'un volume de 1 mL de fixateur pour un volume de 1 mL de matériel à fixer.

Les embryons sont fixés pendant 30 minutes à la température de la pièce et le fixateur est retiré par aspiration. Les cellules sont ensuite lavées dans le tampon GA de 30 min. à 1 h.

### 2.6.2 Technique de coloration de la chromatine

Le pourcentage de fécondation (monospermie ou polyspermie) est évalué pour toutes les expériences en colorant la chromatine au fluorochrome de Hoechst 33258 (Dubé *et al.*, 1985) et en observant au microscope à fluorescence. Les cellules sont d'abord fixées selon 2.6.1, puis on incube 1 heure dans du tampon GA contenant 0.5 µg/mL de Hoechst 33258. On lave ensuite 2 fois avec le tampon GA et on observe entre lame et lamelle au microscope à épifluorescence (DIAPLAN de Leitz). Les ovocytes fécondés sont alors dénombrés à l'aide d'un compteur manuel.

## 2.7 TRAITEMENT DES EMBRYONS POUR LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION.

### 2.7.1 Technique de fixation et de déshydratation

Les gamètes et les embryons sont fixés selon le protocole de Dufresne *et al.* (1983), avec une solution de glutaraldéhyde 3% préparée dans un tampon cacodylate 0.1 M, pH 7.4, glucose 0.3 M et chlorure de calcium 0.012 M. La fixation est réalisée à température de la pièce pendant une heure.

Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec un tampon cacodylate 0.2 M, pH

7.4, glucose 0.7 M. Elles sont alors post-fixées dans une solution de tétroxide d'osmium 0.5% (acide osmique) préparée dans un tampon cacodylate 0.1 M, pH 7.4, glucose 0.86 M. La post-fixation est faite à 4°C pendant 30 minutes.

Les cellules sont lavées de nouveau 2 fois avec le tampon de lavage: tampon cacodylate 0.2 M, pH 7.4; glucose 0.7 M. Elles sont alors déshydratées à température ambiante par des bains d'éthanol (50%: 1x5 min; 70%: 1x10 min; 80%: 1x15 min; 90%: 1x10 min; 100%: 2x5 min), puis on effectue un dernier lavage dans l'oxyde de propylène pour déshydratation complète.

#### 2.7.2 Technique d'inclusion

Après la déshydratation, les cellules sont imprégnées durant 2 heures dans un mélange 1:1 d'oxyde de propylène et de résine de Spurr (1969). Le mélange est alors retiré et remplacé par de la résine pure, le temps d'infiltration est de 1 à 1.5 heures.

La résine est changée 2 autres fois, puis on procède à l'inclusion dans des blocs (Capsule Beem). Après l'inclusion, la polymérisation des blocs s'effectue une nuit dans une étuve à 70°C.

### 2.7.3 Technique de coupe

Les coupes minces de 60 nm d'épaisseur (couleur or) sont obtenues à l'aide de l'ultramicrotome Reichert-Jung. Elles sont recueillies sur grilles en cuivre de 150 mesh recouvertes de formvar.

### 2.7.4 Technique de coloration

On colore d'abord les coupes avec l'acétate d'uranium 4% dissout dans le méthanol 50% durant 15 minutes, puis on lave dans le méthanol 50% suivi de trois bains d'eau distillée. Après quoi, les coupes sont colorées au citrate de plomb selon Reynolds (1963) pendant 30 min. et lavées avec 7 bains d'eau distillée. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope électronique Philips EM 201.

## **CHAPITRE III**

### **RÉSULTATS**

#### **3.1 RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES**

##### **3.1.1 Établissement de la courbe standard de spermatozoïdes**

Dans le but de déterminer rapidement la concentration de spermatozoïdes dans une suspension de sperme, nous avons mesuré la densité optique de plusieurs dilutions de spermatozoïdes, puis nous avons compté le nombre de cellules/mL à l'aide d'un hémacytomètre. La figure 5 illustre la relation entre la densité optique et la concentration de spermatozoïdes.

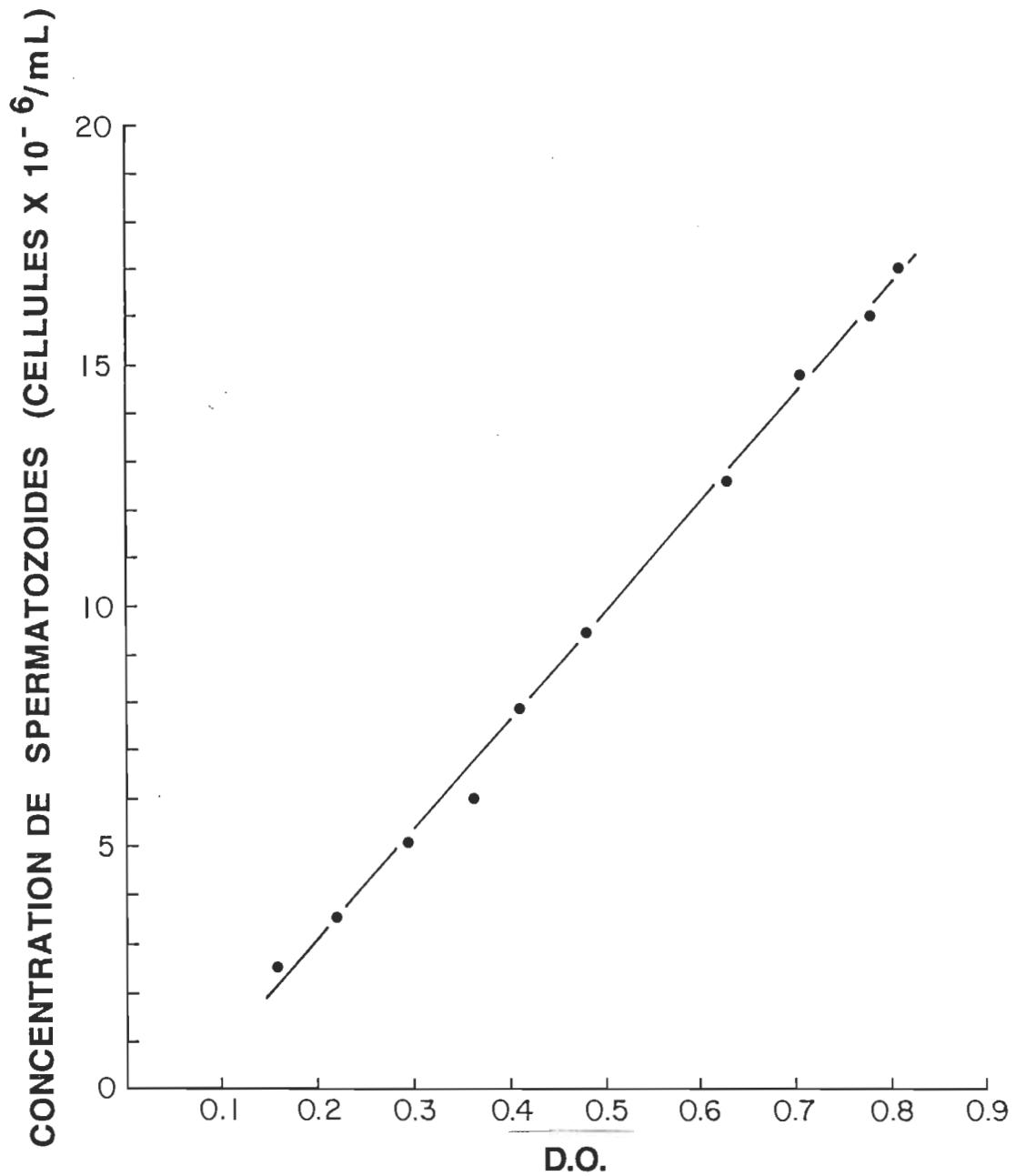
Comme on peut le constater sur la figure, cette relation est linéaire et l'équation de la droite de régression est:

$$Y = (0.23 \times 10^6 X) + (-1.59 \times 10^6)$$

où "Y" est la concentration de spermatozoïdes exprimée en spermatozoïdes/mL, et "X" représente la densité optique mesurée à 340 nm. Le coefficient de corrélation "r" est égal à 0.998.

Figure 5

Relation entre la densité optique à 340 nm et la concentration de spermatozoïdes.



### 3.1.2 Effet de la température sur le pourcentage de fécondation

La figure 6 illustre l'effet de la température sur le pourcentage de fécondation. Rappelons que le ratio spermatozoïdes/ovocyte utilisé pour l'expérimentation était de 40:1. Comme on peut le voir, il est possible de féconder des ovocytes à 5°C. Cependant, ce n'est pas la température optimale car tous les ovocytes ne sont pas fécondés. On obtient en moyenne un pourcentage de fécondation de 68% à 5°C. A 10°C, plus de 98% des ovocytes sont fécondés avec un très faible taux de polyspermie (5%). Cette température est donc adéquate pour faire les fécondations. A 15°C, on atteint également un pourcentage de fécondation élevé (96%), mais le pourcentage d'embryons polyspermiques est sensiblement augmenté (16%). A 20°C, le pourcentage de fécondation est relativement élevé (96%), mais le développement des embryons est complètement anormal. Des aberrations chromosomiques apparaissent à l'intérieur des ovocytes (figure 7d) et le taux de polyspermie est anormalement élevé (plus de 25%). Ces résultats préliminaires permettent de conclure que la meilleure température pour faire les fécondations se situe entre 10°C et 15°C.

### Figure 6

Effet de la température sur le pourcentage de fécondation monospermique et polyspermique.

L'expérience a été faite à 5, 10, 15 et 20°C. Les concentrations de gamètes utilisées sont respectivement de  $5 \times 10^3$  ovocytes/mL et de  $2 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL, lesquelles donnent un ratio spermatozoïdes/ovocyte égal à 40:1. Les embryons sont fixés 60 min. post-insémination puis colorés au Hoechst 33258.

La figure montre le pourcentage d'embryons mono et polyspermique (ovocytes fécondés par 1 spermatozoïde ou plus, ●) ainsi que tous les embryons polyspermiques (ovocytes fécondés par 2 spermatozoïdes ou plus, ○). Le nombre entre parenthèse indique le nombre d'expériences pour chaque point.

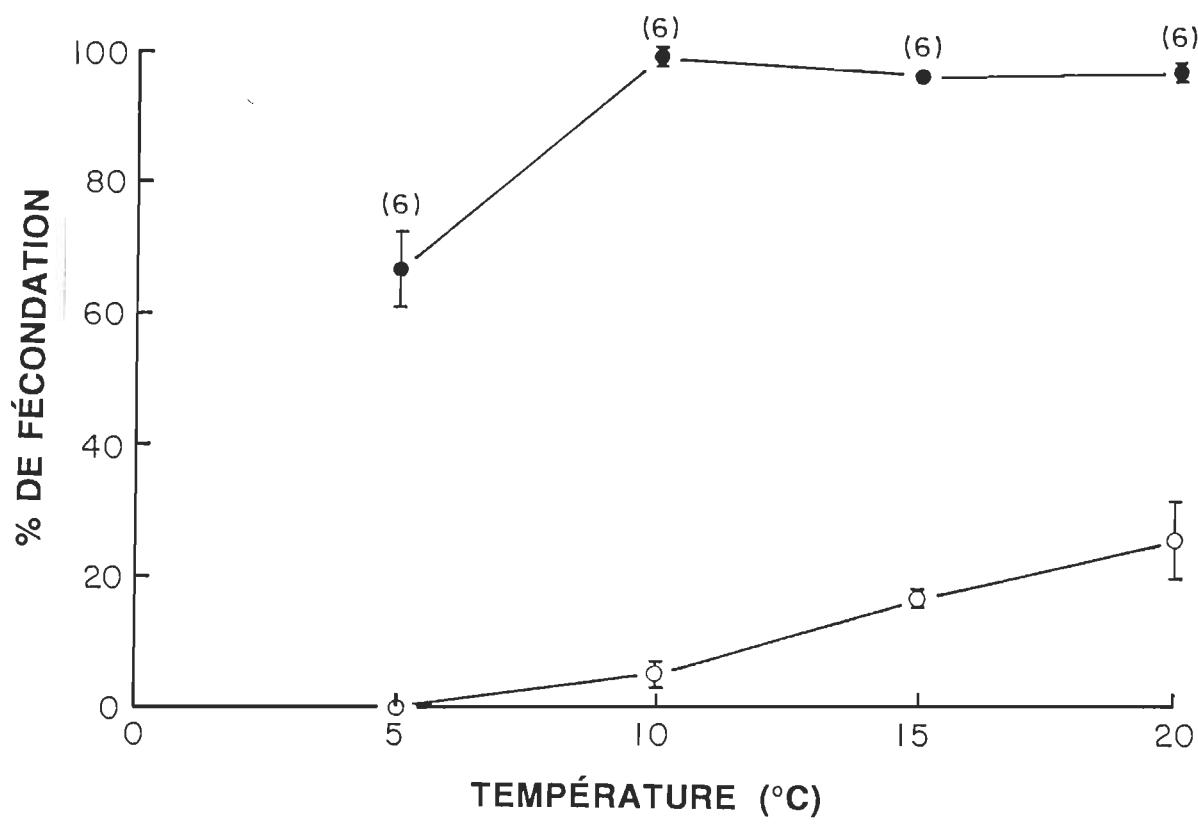


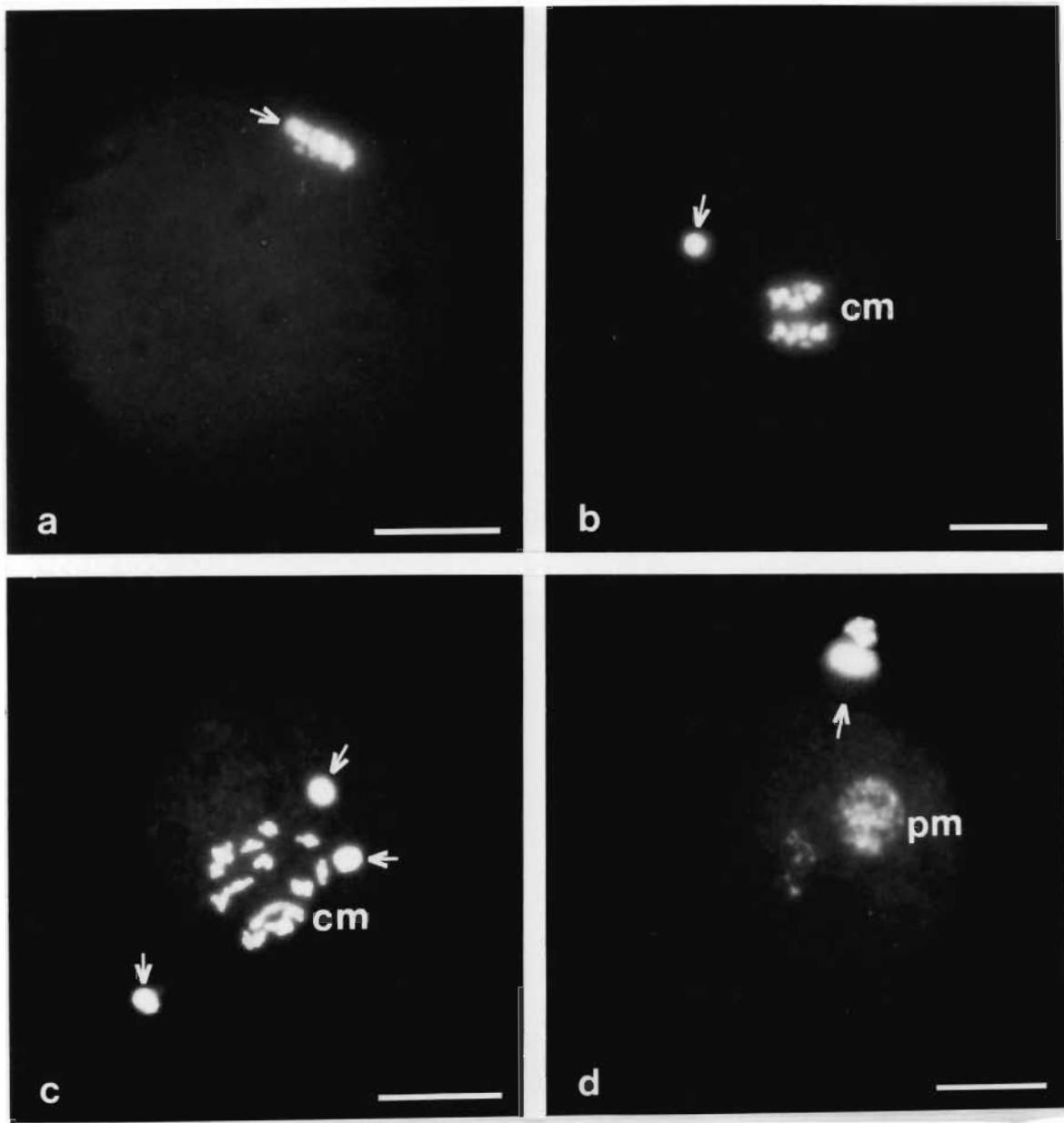
Figure 7

Photographie en épifluorescence d'ovocytes non fécondés et d'ovocytes fécondés à différentes températures.

- a: Ovocyte non fécondé à 10°C. Chromosomes de l'ovocyte au stade métaphase I (→). Échelle: 20 µm.
- b: Ovocyte fécondé par un spermatozoïde (fécondation monospermique), à 15°C, 15 min. après fécondation. Noyau du spermatozoïde (→). Échelle: 15 µm.
- c: Ovocyte fécondé par plusieurs spermatozoïdes (fécondation polyspermique), à 20°C, 15 min. après fécondation. Noyaux des spermatozoïdes (→). Remarquer la disposition aberrante des chromosomes maternels. Échelle: 20 µm.
- d: Ovocyte fécondé à 20°C qui présente des aberrations chromosomiques, 60 min. après fécondation. Toute la chromatine maternelle s'est réfugiée dans une protrusion cytoplasmique (→). La chromatine paternelle s'est dispersée pour former le pronucleus mâle. Échelle: 20 µm.

cm: chromosomes maternels

pm: pronucleus mâle



### 3.2 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE FÉCONDATION

La prochaine étape est de déterminer quelles sont les concentrations de gamètes à utiliser afin d'obtenir un pourcentage de fécondation le plus élevé possible tout en conservant un degré de polyspermie faible.

#### 3.2.1 Effet de la concentration des gamètes

Les figures 8A et 8B montrent les effets de la concentration de spermatozoïdes sur le pourcentage de fécondation monospermique et polyspermique. La concentration d'ovocytes est fixée à  $5 \times 10^3$  ovocytes/mL. Les fécondations sont faites à 10 et 15°C.

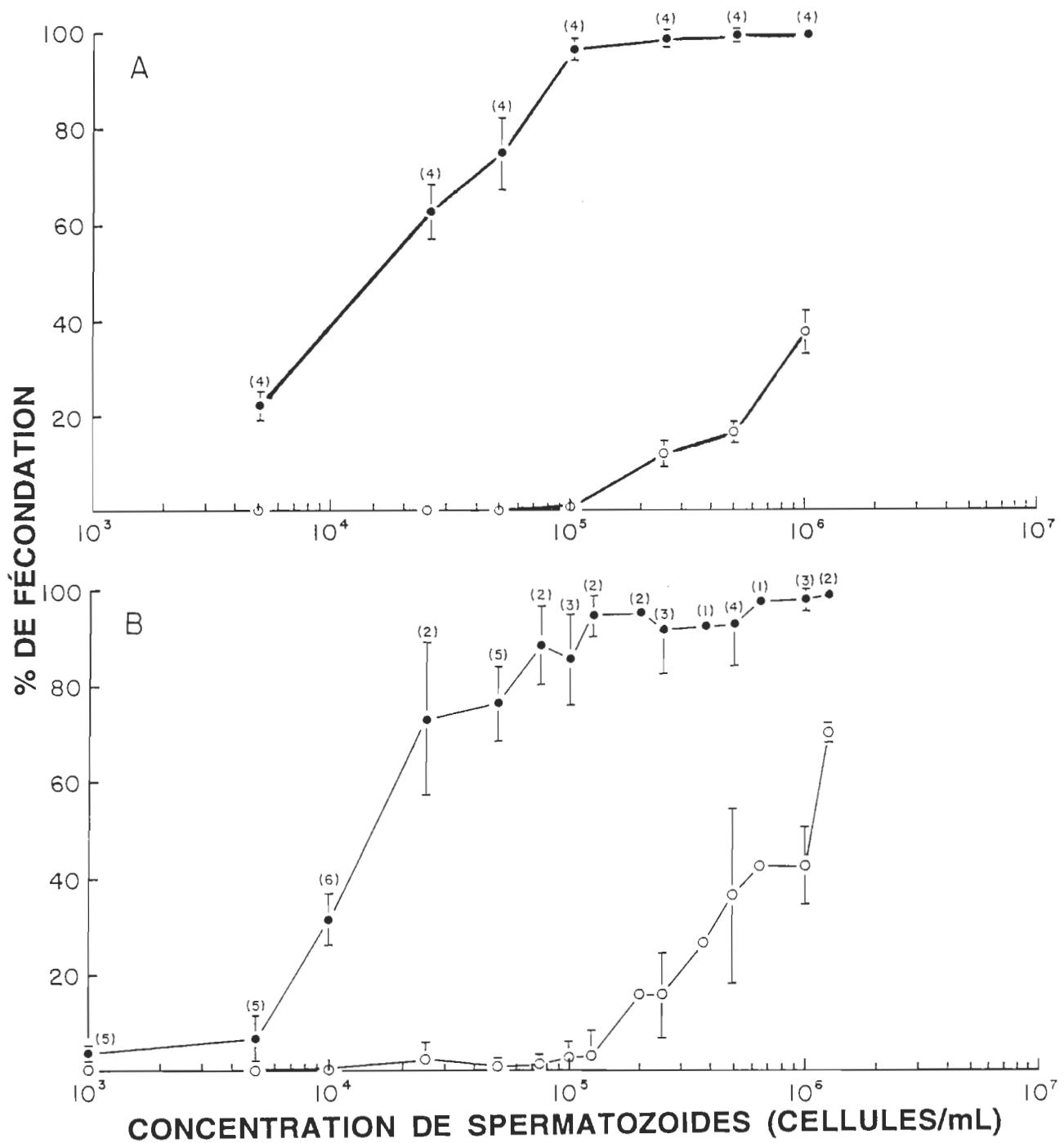
Sur la figure 8B, on peut remarquer qu'il n'y a presque pas d'ovocytes fécondés lorsque l'on insémine avec des concentrations de sperme inférieures à  $5 \times 10^3$  spermatozoïdes/mL. Pour des concentrations allant de  $5 \times 10^3$  à  $1 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL, le pourcentage de fécondation augmente progressivement. Pour des concentrations de spermatozoïdes supérieures à  $2 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL, la proportion d'embryons polyspermiques augmente pour atteindre jusqu'à 70% pour une concentration de  $1 \times 10^6$  spermatozoïdes/mL.

Figure 8A et 8B

Effet de la concentration de spermatozoïdes sur le pourcentage de fécondation monospermique et polyspermique à 10°C et 15°C.

La concentration des suspensions d'ovocytes est de  $5 \times 10^3$  ovocytes/mL. Les fécondations sont réalisées à 10°C (8A) et à 15°C (8B). Les ovocytes sont inséminés avec des concentrations croissantes de spermatozoïdes et les préparations sont fixées 45 min. plus tard. Les ovocytes sont colorés au Hoechst 33258 puis observés au microscope.

Les figures indiquent le pourcentage d'ovocytes fécondés par 1 spermatozoïde ou plus (embryons mono et polyspermiques, ●) ainsi que les ovocytes fécondés par 2 spermatozoïdes ou plus (inclus tous les embryons polyspermiques, ○). Le nombre entre parenthèse indique le nombre d'expériences pour chaque point.



Cette expérience a été répétée à 10°C (figure 8A) et comme l'indique la figure, l'allure de la courbe est sensiblement la même que celle réalisée à 15°C.

La gamme de concentration de spermatozoïdes qui permet d'obtenir un pourcentage de fécondation optimal tout en maintenant une faible proportion d'embryons polyspermiques est très étroite et les valeurs sont visiblement les mêmes qu'à 15°C ( $1 \times 10^5$  à  $2,5 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL).

Cependant, il semble que le pourcentage d'embryons polyspermiques soit plus faible pour des concentrations de sperme inférieures à  $10^6$  spermatozoïdes/mL, ce qui permet d'en déduire que 10°C est une température plus adéquate pour la fécondation.

Ce mollusque semble être particulièrement sensible à la polyspermie et on devra donc apporter une grande attention aux concentrations de gamètes.

Nous avons par la suite analysé l'effet de la concentration d'ovocytes sur le pourcentage de fécondation (figure 9). La concentration de spermatozoïdes est fixée à  $2 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL et l'expérience est réalisée à 15°C. Cette figure nous indique clairement qu'avec de très faibles concentrations d'ovocytes, de  $5 \times 10^2$

à  $1 \times 10^3$  ovocytes/mL, il y a un fort pourcentage de polyspermie tandis qu'avec une forte concentration d'ovocytes, plus de  $1 \times 10^4$  ovocytes/mL, il n'y a qu'un peu plus de la moitié des ovocytes qui sont fécondés.

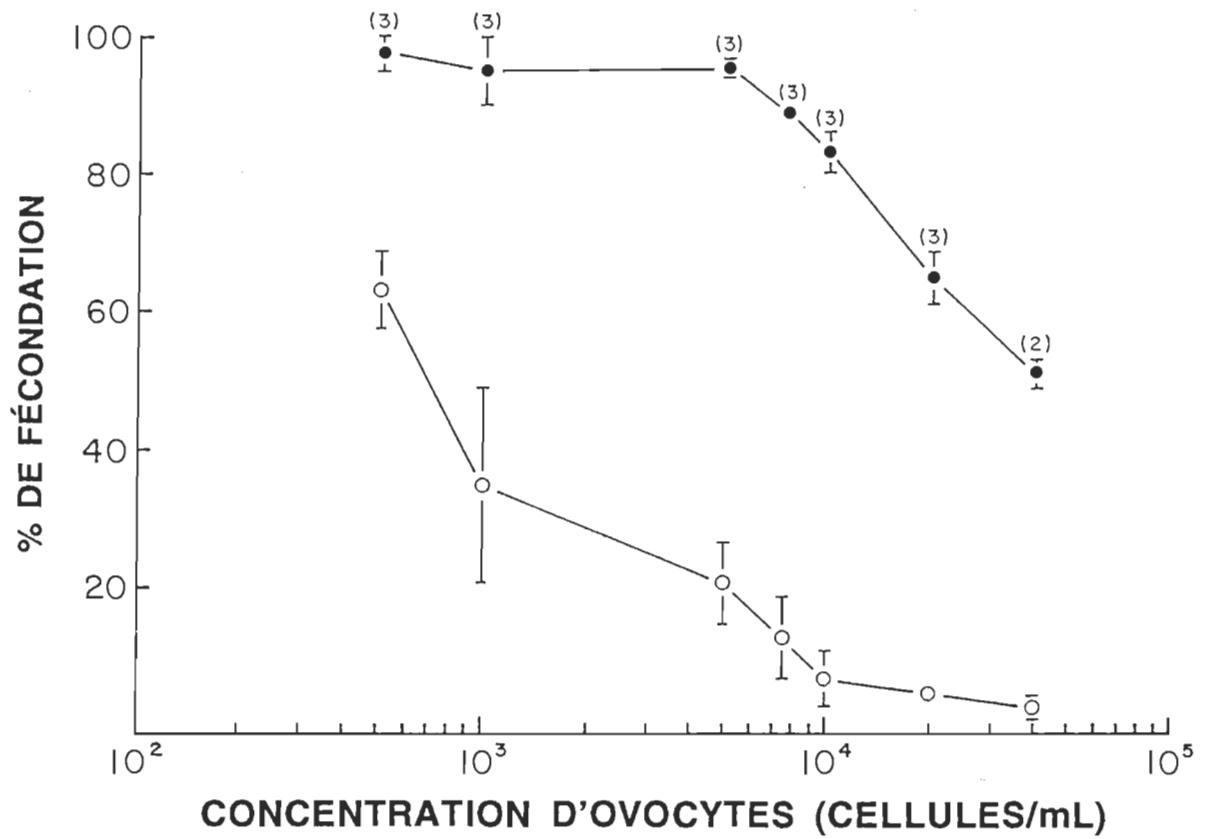
Ces résultats montrent qu'à la fois la concentration de spermatozoïdes et d'ovocytes sont importantes si l'on veut s'assurer d'un pourcentage élevé de fécondation monospermique.

En conclusion, pour obtenir le meilleur pourcentage de fécondation monospermique, il faut employer un ratio spermatozoïdes/ovocyte d'environ **20 à 50:1**

Figure 9

Effet de la concentration d'ovocytes sur le pourcentage de fécondation mono et polyspermique.

La procédure et les symboles de cette figure sont les mêmes qu'à la figure 8B. La concentration de spermatozoïdes est fixée à  $2 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL.



### 3.3 CINÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT DES EMBRYONS

Les résultats des cinétiques de développement des embryons que nous présentons dans cette partie vont nous permettre de conclure si l'on doit féconder à 10°C ou à 15°C pour appliquer le traitement inducteur de la triploïdie. Rappelons que pour optimiser l'induction de la triploïdie, il faut que les embryons soient le plus possible au même stade de développement, c'est-à-dire que le déroulement du développement doit être synchronisé.

Les différents stades qui sont représentés à la figure 10 ont été utilisés pour réaliser les cinétiques du développement des embryons à 15 et 10°C (figures 11 et 12). Comme indiqué à la figure 11, on remarque que 50% des embryons ont émis leur 1<sup>er</sup> globule polaire environ 45 min. après la fécondation, alors que 50% des embryons ont émis leur 2<sup>ème</sup> globule polaire environ 70 min. post-fécondation. Après 145 min., 50% des embryons sont au stade 2 cellules alors que 200 min. après la fécondation, 50% des embryons ont entrepris la 2<sup>ème</sup> division cellulaire (stade 4 cellules). A cette température le développement n'est pas synchronisé, et c'est pourquoi il existe un chevauchement entre la cinétique d'apparition du premier et du deuxième globule polaire. Rappelons que l'induction de la triploïdie doit se faire immédiatement après l'émission du 1<sup>er</sup> globule polaire mais avant l'émission du deuxième globule polaire. Donc, d'après cette cinétique,

Figure 10

Photographie en épifluorescence des stades cellulaires utilisés pour la détermination des cinétiques du développement des embryons.

- a: Émission du 1<sup>er</sup> globule polaire (→). Les chromosomes de l'oeuf sont au stade métaphase II. Échelle: 20 µm.
- b: Émission du 2<sup>ème</sup> globule polaire (→). Les chromosomes maternels se dispersent et forment le pronucleus femelle. Échelle: 20 µm.
- c: 1<sup>ère</sup> division cellulaire. Deux globules polaires (→). Échelle: 20 µm.
- d: 2<sup>ème</sup> division cellulaire. Deux globules polaires (→). Échelle: 20 µm.

cm: chromosomes maternels

pf: pronucleus femelle

pm: pronucleus mâle

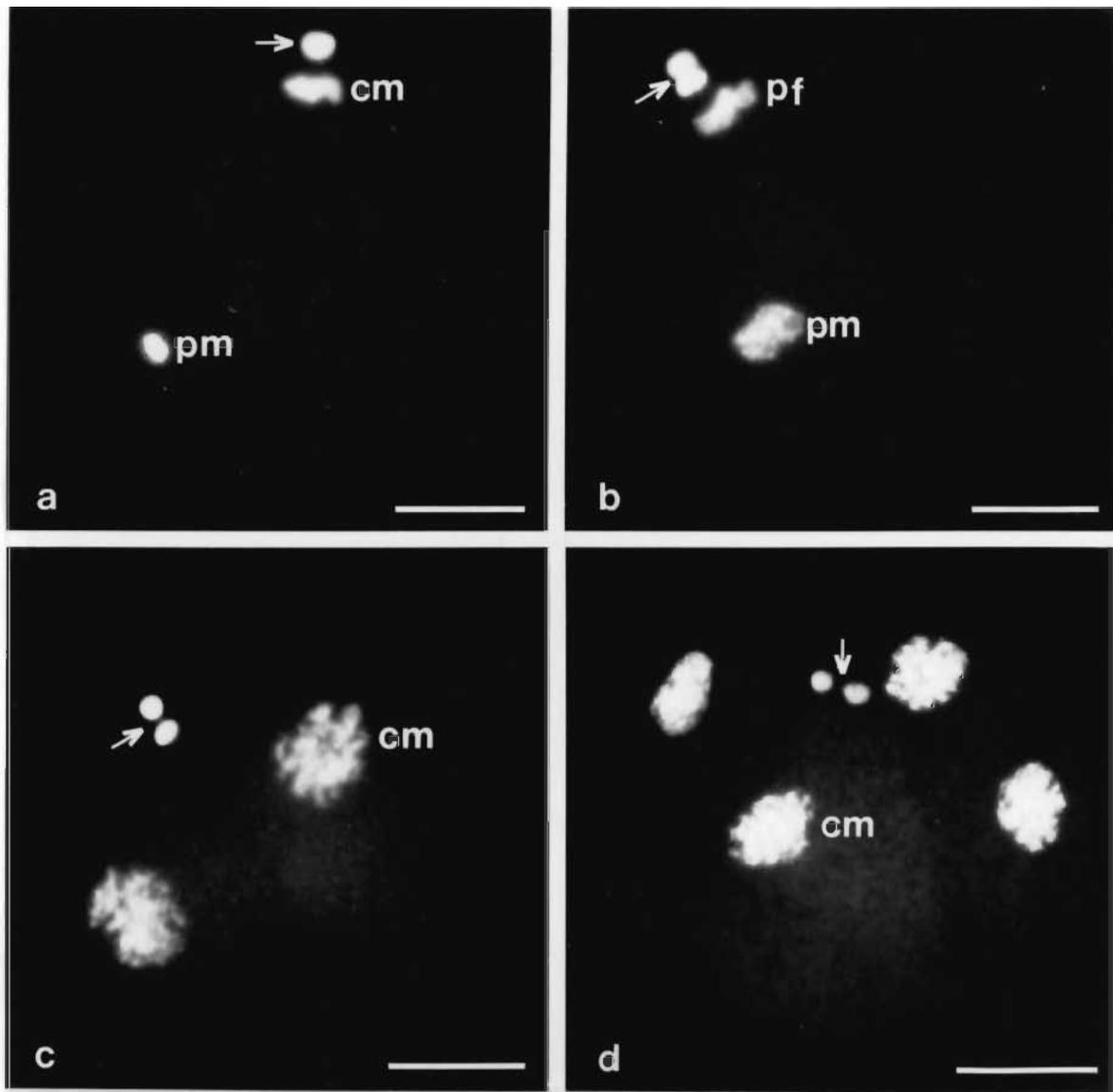


Figure 11

Cinétique du développement des embryons à 15°C.

Les concentrations de gamètes utilisées sont respectivement de  $2 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL et de  $5 \times 10^3$  ovocytes/mL. Les embryons sont fixés jusqu'à la 2<sup>ème</sup> division cellulaire.

Les différents stades requis pour la détermination de la cinétique sont indiqués par les symboles suivants:

- : émission 1<sup>er</sup> globule polaire
- : émission 2<sup>ème</sup> globule polaire
- : 1<sup>ère</sup> division cellulaire
- : 2<sup>ème</sup> division cellulaire

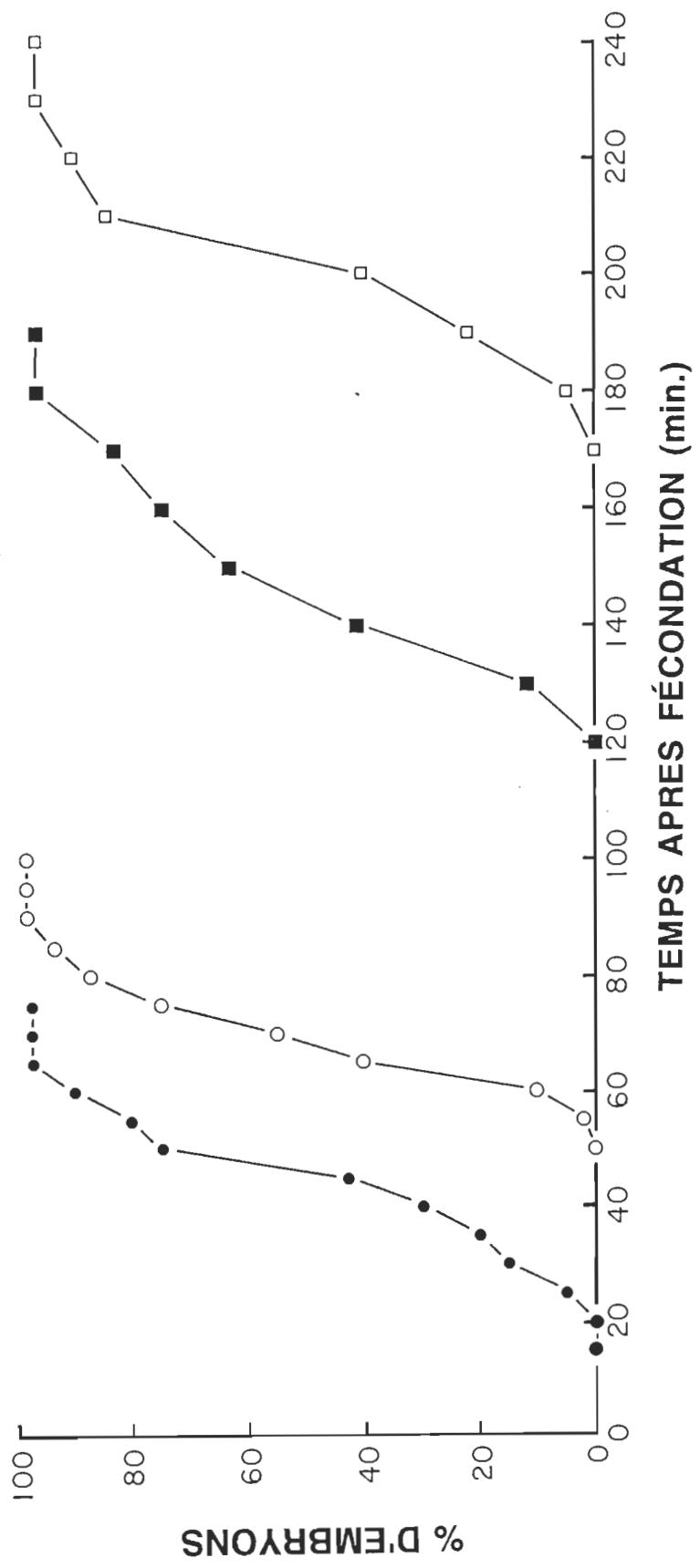


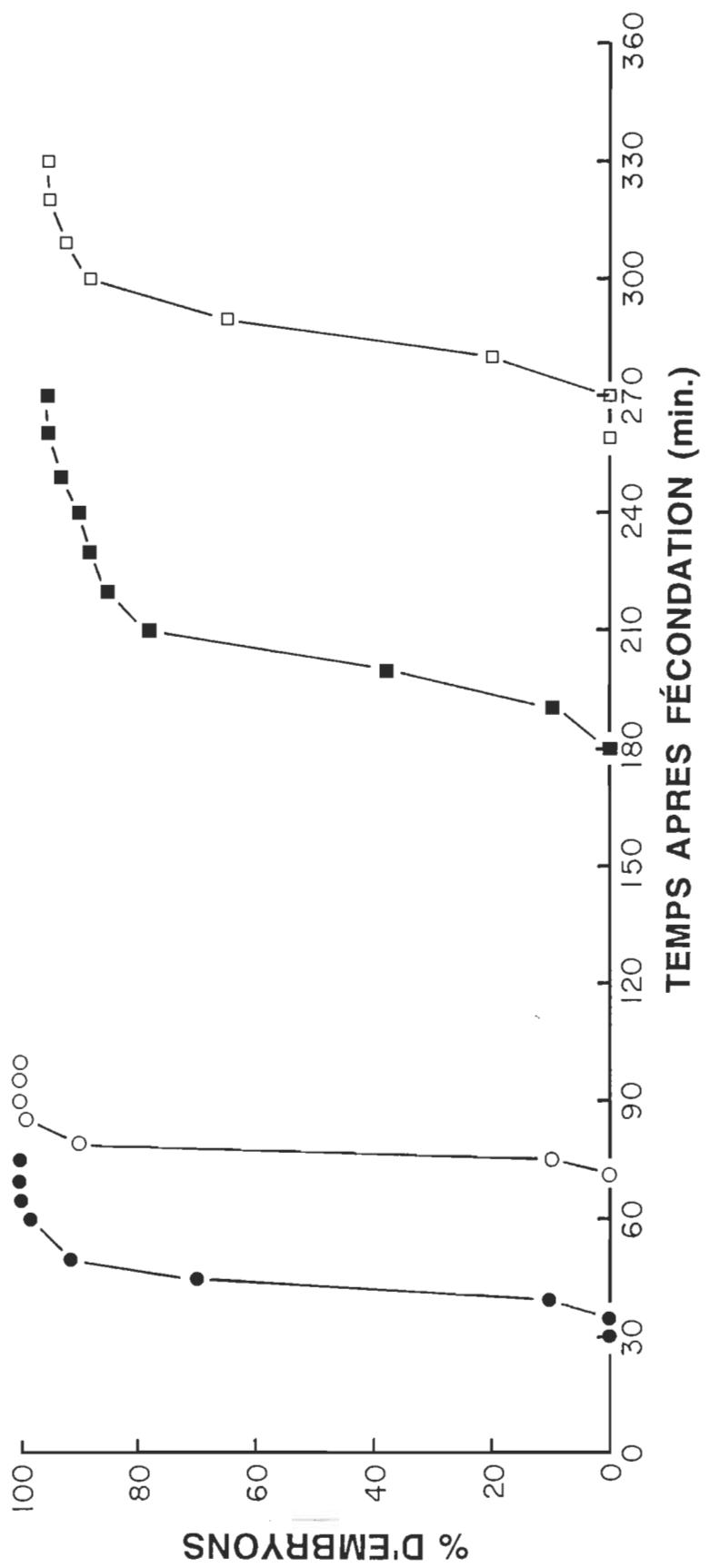
Figure 12

Cinétique du développement des embryons à 10°C.

Les concentrations de gamètes utilisées sont respectivement de  $2 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL et de  $5 \times 10^3$  ovocytes/mL. Les embryons sont fixés jusqu'à la 2<sup>ème</sup> division cellulaire.

Les différents stades utilisés pour la détermination de la cinétique sont indiqués par les symboles suivants:

- : émission 1<sup>er</sup> globule polaire
- : émission 2<sup>ème</sup> globule polaire
- : 1<sup>ère</sup> division cellulaire
- : 2<sup>ème</sup> division cellulaire



il est clair qu'on ne pourra cibler tous les embryons, dû à la non synchronisation du développement, et qu'on ne pourra guère avoir plus de 75% de triploïdes.

Lorsqu'on analyse la cinétique du développement des embryons à 10°C (figure 12), on constate que la pente des courbes qui représentent les cinétiques d'émission du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>ème</sup> globule polaire est beaucoup plus abrupte qu'à 15°C. Ceci implique une bien meilleure synchronisation dans le développement. 65 min. après la fécondation, tous les embryons fécondés sont en métaphase II (figure 10a) et il n'y a donc pas de chevauchement entre l'émission du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>ème</sup> globule polaire. Ces résultats sont excellents car, à 10°C, le traitement qui induira la triploidie permettra de cibler plus de 90% des embryons.

La figure 12 montre également que la mitose est beaucoup plus lente à 10°C qu'à 15°C. A 15°C, la 1<sup>ère</sup> division cellulaire s'amorce autour de 125 min. post-insémination tandis qu'à 10°C, celle-ci débute aux environs de 185 min. Il en est de même pour la 2<sup>ème</sup> division cellulaire; alors qu'à 15°C, on voit apparaître les premiers stades 4 cellules après 175 min. à 10°C, ceux-ci surviennent près de 100 min. plus tard soit à 275 min.. Les figures 13 (I) et 13 (II) montrent le développement embryonnaire à 10°C en microscopie optique.

Figure 13 (I)

Développement embryonnaire du pétoncle géant à 10°C.

- a: Ovocyte non fécondé. Échelle: 20 µm.
- b: Fécondation d'un ovocyte. Spermatozoïde à la surface de l'oeuf (▼). Échelle: 20 µm.
- c: Émission du 1<sup>er</sup> globule polaire (▼), 65 min. après fécondation. Échelle: 20 µm.
- d: Émission du 2<sup>ème</sup> globule polaire (▼), 90 min. après fécondation. Échelle: 20 µm.
- e: Formation du lobe polaire (▼), 120 min. après fécondation. Échelle: 20 µm.
- f: Lobe polaire qui se résorbe, 180 min. après fécondation. Formation du sillon de clivage (▼). Échelle: 20 µm.

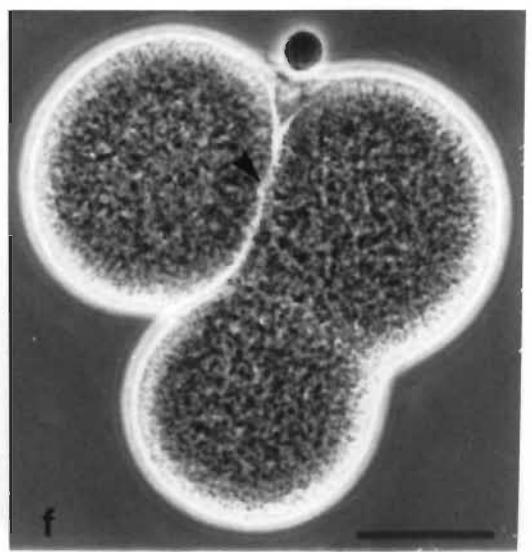
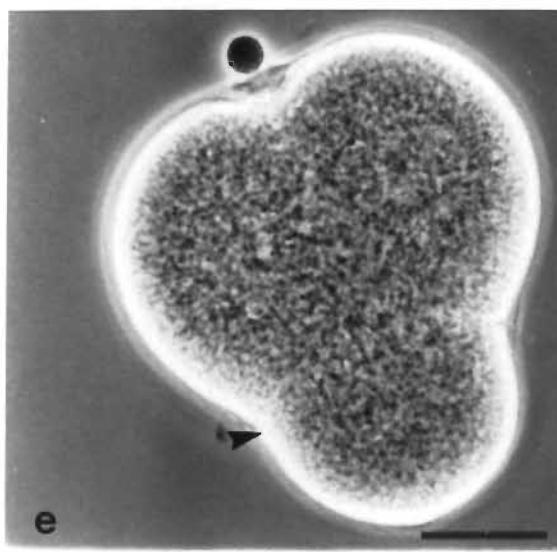
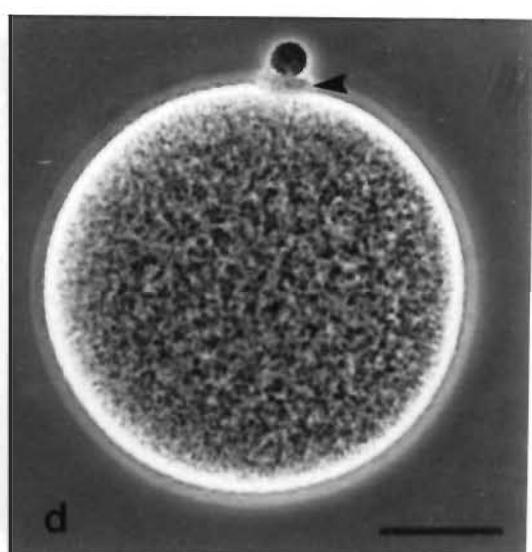
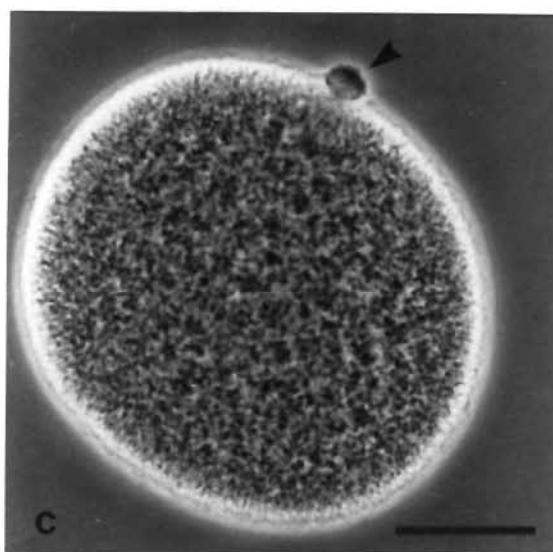
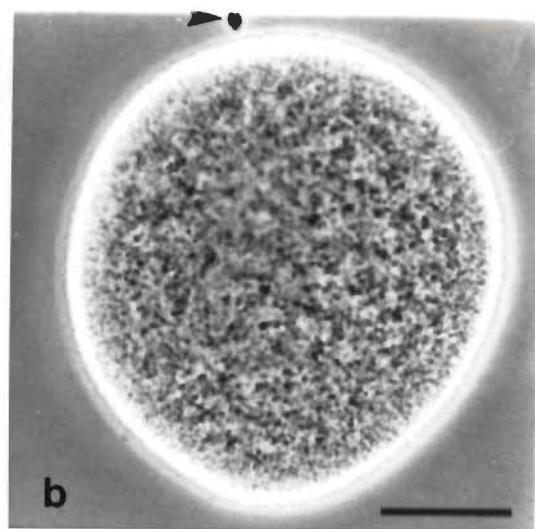
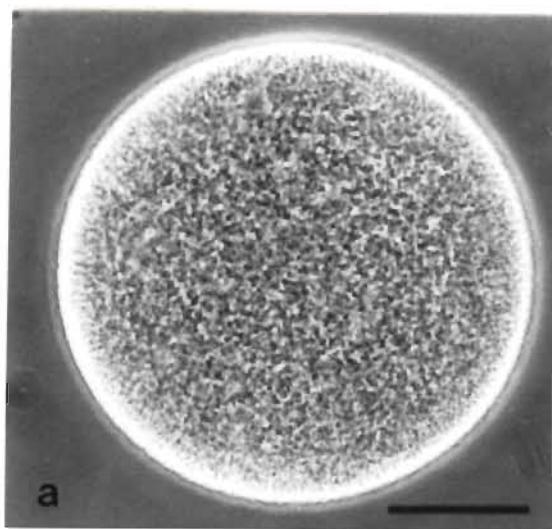


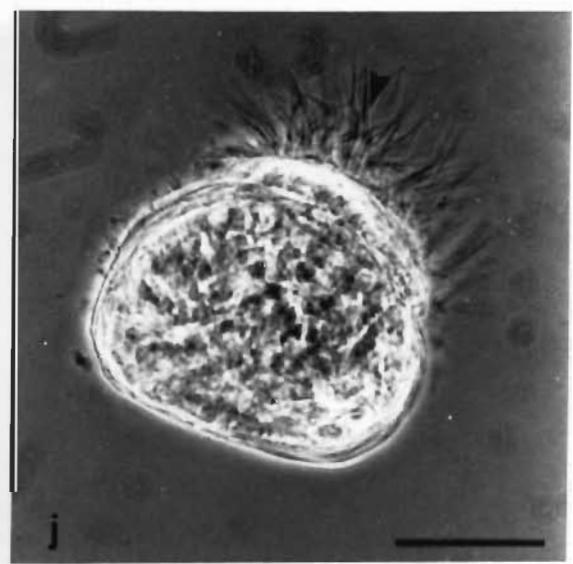
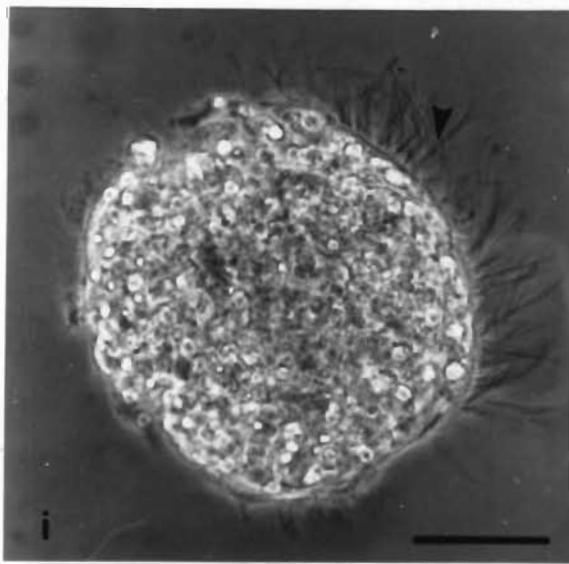
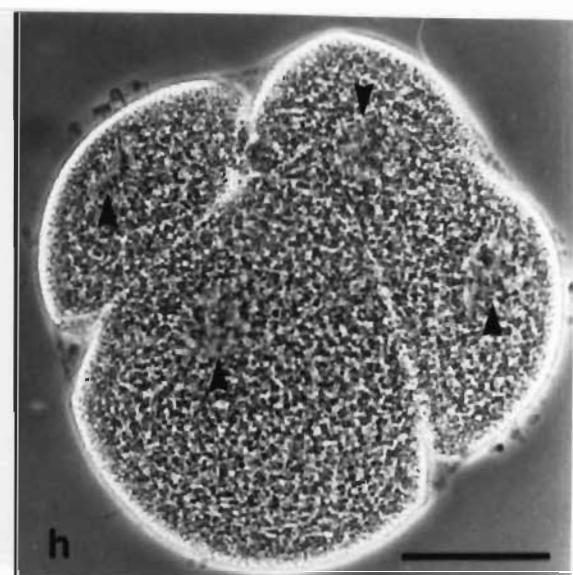
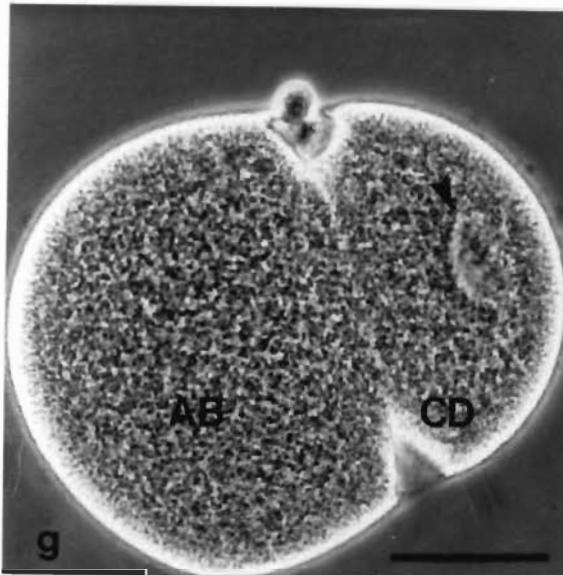
Figure 13 (II)

## Développement embryonnaire (suite)

- g: Stade 2 cellules, 210 min. après fécondation. Chromatine à l'intérieur du petit blastomère (▼). Échelle: 20 µm.
- h: Stade 4 cellules, 300 min. post-fécondation. Chromatine (▼). Échelle: 20 µm.
- i: Jeune gastrula nageante 24 hres après fécondation. Cils (▼). Échelle: 20 µm.
- j: Larve D-véligère 5 jours après fécondation. Vélum (▼). Échelle: 45 µm.

AB: Grand blastomère

CD: Petit blastomère



**En conclusion, si on veut optimiser les conditions de fécondation et obtenir un pourcentage de triploïdes élevé (>90%), on doit: utiliser une suspension d'ovocytes dont la concentration est fixée à 5000 ovocytes/mL inséminée à un ratio d'environ 20-40 spermatozoïdes/ovocyte à 10°C, et appliquer le traitement d'induction de la triploidie 65 min. post-fécondation.**

## CHAPITRE IV

### ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DES GAMÈTES ET DU DÉBUT

### DU DÉVELOPPEMENT DES EMBRYONS

#### 4.1 MORPHOLOGIE DES GAMÈTES

##### 4.1.1 Les spermatozoïdes

Nous avons examiné, par microscopie électronique, les différentes composantes morphologiques du spermatozoïde de *Placoplecten magellanicus* (figure 14). La longueur totale du spermatozoïde est d'environ 55 à 60 µm. La tête, d'aspect piriforme, est munie à son extrémité d'un court acrosome dont la configuration ressemble à un cône (figure 14a). Le noyau du spermatozoïde est très dense aux électrons et a un aspect granulaire. Près du noyau, on distingue deux invaginations: la première est sous-acrosomiale et a 0,3 µm de profondeur, la deuxième invagination est une petite dépression dont la profondeur équivaut à 0,25 µm et elle est située au pôle basal du noyau à proximité de la pièce intermédiaire. On remarque également que les contours nucléaires épousent parfaitement la forme des mitochondries situées dans la zone de la pièce intermédiaire. Au nombre de 4, les mitochondries ont 0,8 µm de diamètre.

Tout près de la fossette basale du noyau, se situe le centriole proximal alors que le centriole distal est presque en position orthogonale par rapport au proximal. Le flagelle, organe de locomotion du spermatozoïde, possède un diamètre de 0,25 µm et présente classiquement les 9 doublets de microtubules périphériques avec un doublet central (figure 14d).

La membrane plasmique qui entoure le spermatozoïde est légèrement décollée ce qui est un artefact de fixation.

A plus fort grossissement, on remarque que l'acrosome est délimité par une membrane ondulée, dense aux électrons, laquelle apparaît plus fine dans la partie apicale que dans la zone évasée et renflée, à proximité du noyau (figure 14b). À l'intérieur de l'invagination sous-acrosomiale, on peut observer la présence d'une substance moyennement dense aux électrons. Cette substance a été identifiée comme étant de l'actine grâce à une coloration des spermatozoïdes à la rhodamine phalloïdine, un colorant spécifique à l'actine (résultat non montré). Une coupe transversale (figure 14c), réalisée dans la partie inférieure, montre que l'acrosome est constitué dans cette zone de 2 anneaux concentriques denses aux électrons. Le tableau 2 résume les principales dimensions des différentes parties du spermatozoïde.

Figure 14

Morphologie du spermatozoïde.

- a: Coupe longitudinale du spermatozoïde. Invaginations nucléaires (→). Échelle: 1,5 µm.
- b: Vue agrandie de l'acrosome. Invagination nucléaire sous-acrosomiale (▼). Échelle: 0,5 µm.
- c: Coupe transversale de l'acrosome. Remarquer les 2 anneaux denses aux électrons. Échelle: 0,5 µm.
- d: Coupe transversale de flagelles montrant les 9 doublets périphériques et 1 doublet central de microtubules (▼). Échelle: 1,0 µm.

A: acrosome

AC: actine

CD: centriole distal

CP: centriole proximal

F: flagelle

M: mitochondrie

MP: membrane plasmique

N : noyau

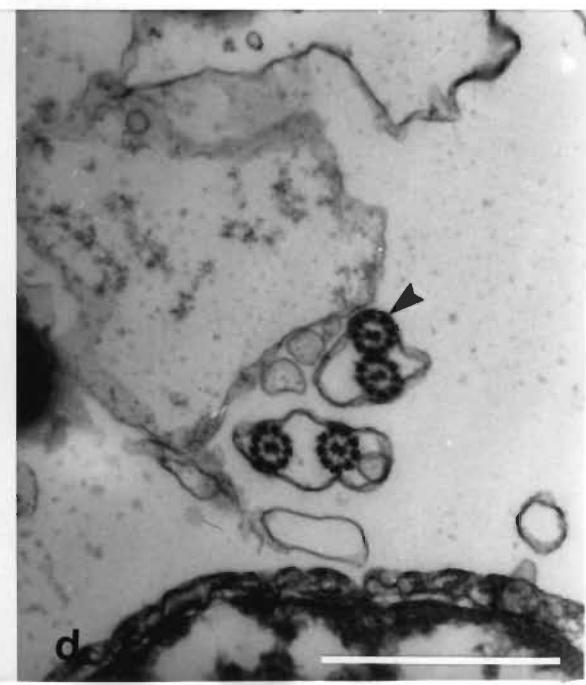
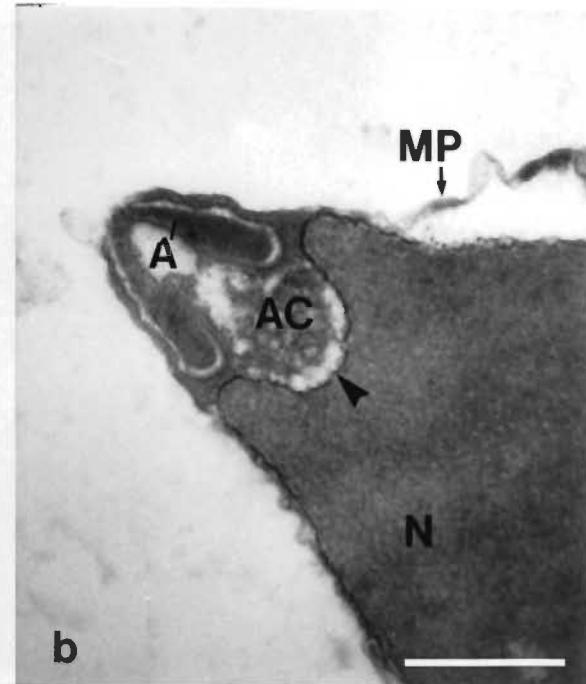
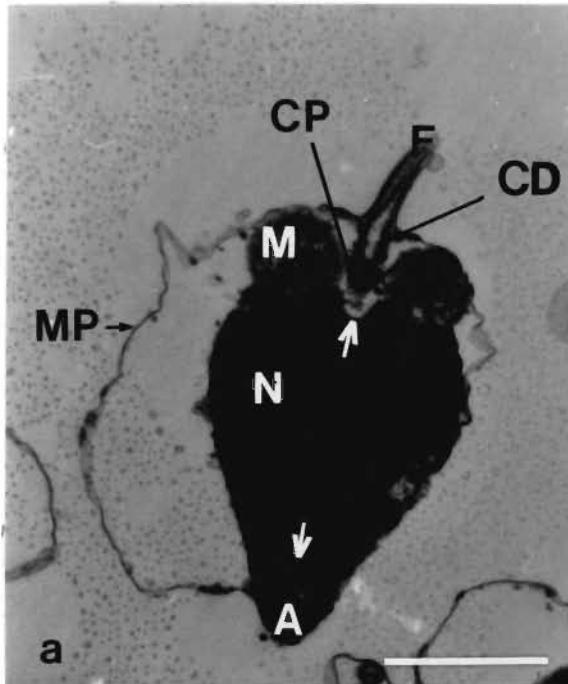


Tableau 2

Principales dimensions du spermatozoïde de *Placopecten magellanicus*.

STRUCTURE	DIMENSION ( $\mu\text{m}$ )
1) <u>Tête</u> (du sommet de l'acrosome à la base de la pièce intermédiaire)	4,30
- hauteur de l'acrosome	0,50
- diamètre maximum du noyau	2,60
- longueur du noyau	3,10
- fossette sous-acrosomiale	0,30
- fossette à la base du noyau	0,25
2) <u>Pièce intermédiaire</u>	
- diamètre des mitochondries	0,80
3) <u>Flagelle</u>	
- longueur totale (microscopie photonique)	55,0
- diamètre	0,25

#### 4.1.2 Les ovocytes non fécondés

Les ovocytes de *Placoplecten magellanicus* ont un diamètre moyen de 68 µm.

La figure 15 illustre le cortex de plusieurs ovocytes non fécondés. Le cytoplasme de la cellule (figure 15a) contient différents organites comme les mitochondries et des inclusions telles que granules corticaux, lipides et plaquettes vitellines. Ces inclusions sont dispersées de manière homogène à travers le cytoplasme de la cellule. A la périphérie du cortex, on peut apercevoir de nombreuses microvillosités lesquelles peuvent présenter quelquefois des ramifications. Les microvillosités ont en moyenne 0,85 µm de longueur et la distance entre elles est approximativement de 0,2 µm. En coupe transversale, figure 15b, elles semblent être pluriformes. Elles émergent au travers d'une couche fibreuse qui entoure l'ovocyte. Cette couche, appelée couche vitelline, est orientée perpendiculairement à l'axe longitudinal des microvillosités.

Directement sous la membrane plasmique, on retrouve de petits granules appelés granules corticaux car ils sont intimement liés au cortex de la cellule. Ces granules ont environ 0,5 µm de diamètre. Généralement, ils contiennent une substance opaque aux électrons et certains d'entre eux ont une structure cristalline (figure 15c).

Les ovocytes non fécondés sont arrêtés en métaphase de première méiose. L'appareil méiotique (figure 15d) consiste en 2 asters localisés à leur pôle respectif. L'aster périphérique est sous-jacent au cortex tandis que l'aster interne se trouve plus profondément vers l'intérieur de la cellule. D'après cette figure, on peut observer qu'il n'y a presque pas d'inclusions cytoplasmiques dans la région où se situe le fuseau méiotique, car ces inclusions sont repoussées vers les régions périphériques.

Au centre de chaque aster, on retrouve une paire de centrioles (figure 16a), orientée à angle l'un par rapport à l'autre, d'où émerge un faisceau de microtubules. A mi-chemin entre les 2 asters, apparaissent les chromosomes, alignés sur la plaque métaphasique. Ils sont composés de matériel réticulaire dense et sont très opaques aux électrons. La figure 16b montre que les chromosomes sont associés aux microtubules qui émanent des 2 pôles du fuseau méiotique.

Figure 15

Examen du cortex d'ovocytes non fécondés.

- a: Le cytoplasme de la cellule contient 3 types d'inclusions: I (granules corticaux), II (lipides), III (plaquettes vitellines). Petit espace périvitellin (▼). Échelle: 1 µm.
- b: Coupe transversale des microvillosités (▼). Les microvillosités sont enveloppées dans une matière fibreuse qui forme la couche vitelline. Échelle: 0,25 µm.
- c: Structure cristalline à l'intérieur d'un granule cortical. Échelle: 0,15 µm.
- d: Appareil méiotique de l'ovocyte. Noter les 2 faisceaux de microtubules (▼) qui émergent des 2 pôles. Échelle: 8 µm.

AM: appareil méiotique

C: cristal

Ch: chromosome

CV: couche vitelline

M: mitochondrie

MV: microvillosités

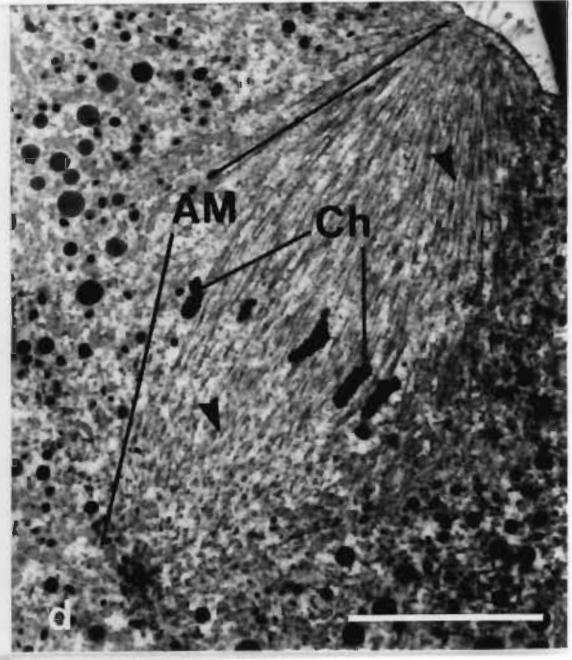
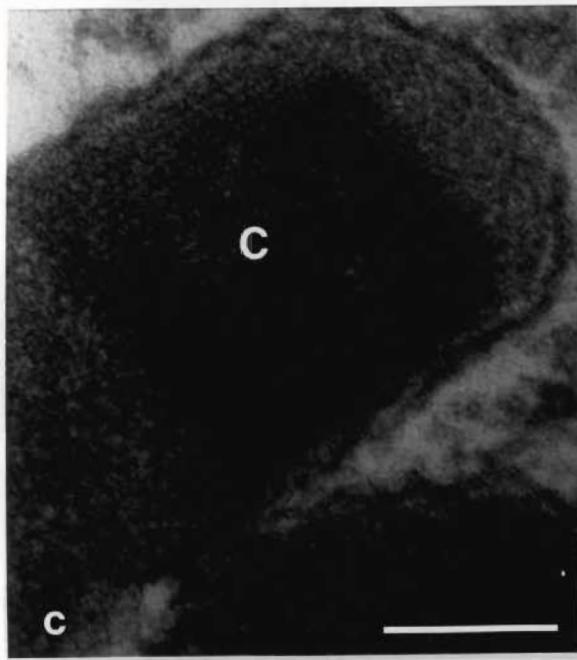
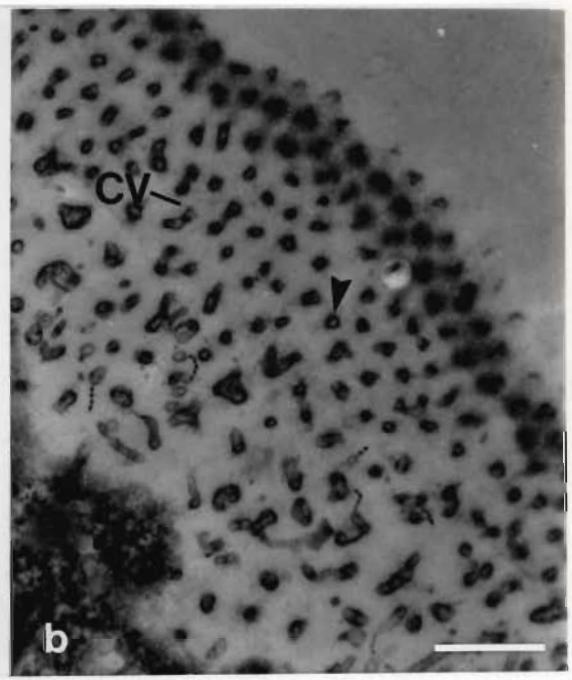
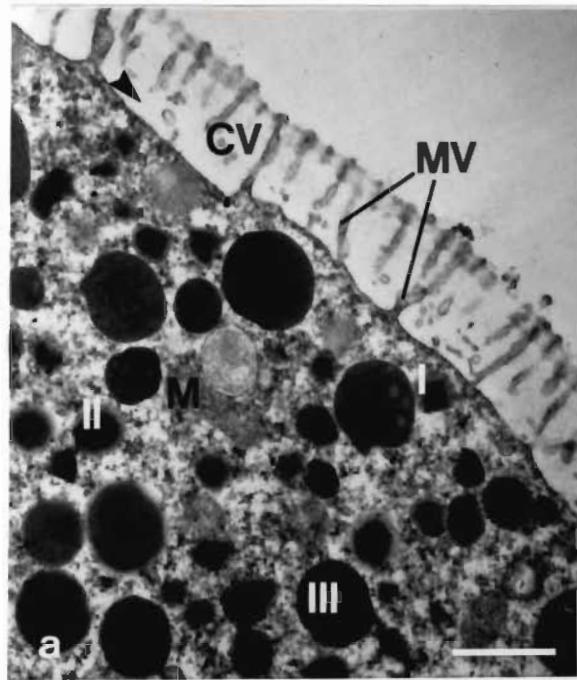


Figure 16

Cortex de l'ovocyte non fécondé et première étape de la fécondation.

- a: Aster périphérique. Échelle: 2 µm.
- b: Association des chromosomes aux microtubules. Échelle: 3,5 µm.
- c: Fusion du spermatozoïde avec l'oeuf, 2 min. après insémination. Perte locale des microvillosités (▼). Échelle: 1 µm.
- d: Incorporation du spermatozoïde fécondant, 5 min. après la fécondation. Dégénérescence de l'enveloppe nucléaire du spermatozoïde (▼). Le cône de fécondation est maintenant résorbé. Échelle: 1 µm.

AP: aster périphérique

C: centriole

CF: cône de fécondation

CFR: cône de fécondation résorbé

Ch: chromosome

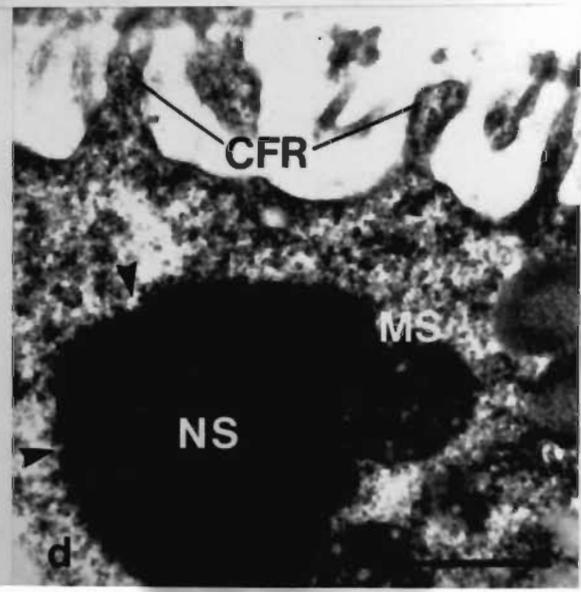
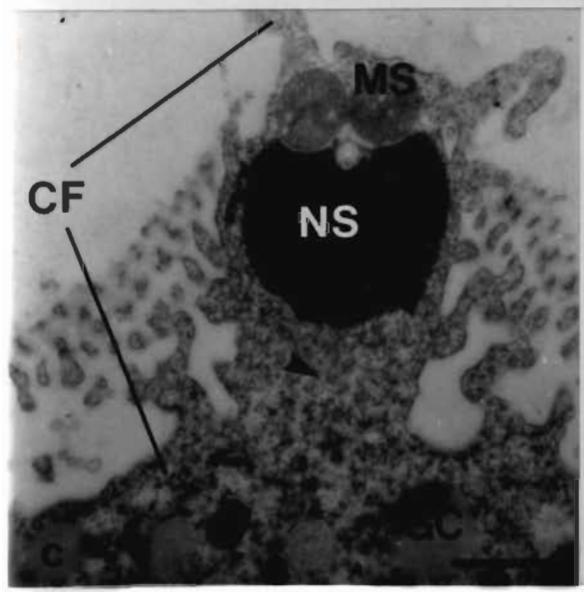
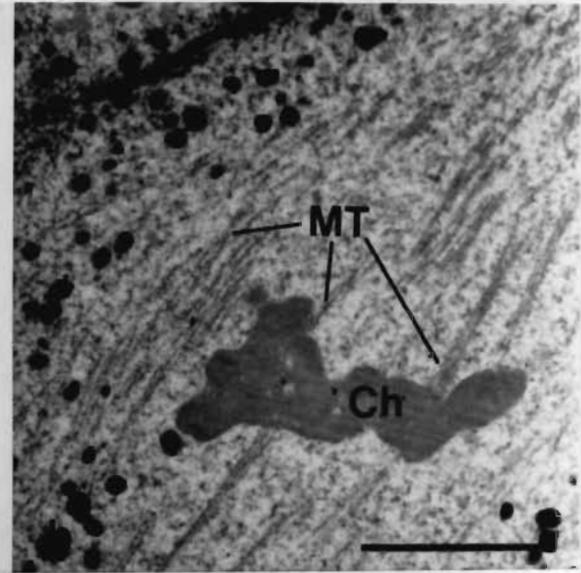
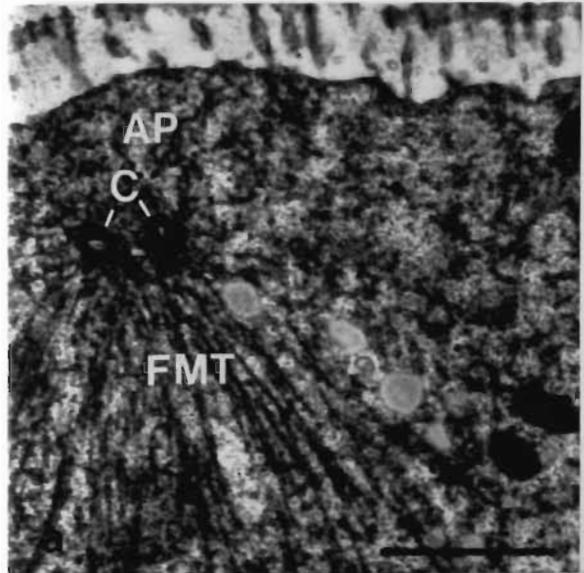
GC: granule cortical

FMT: faisceau de microtubules

MS: mitochondrie spermatique

MT: microtubules

NS: noyau spermatique



## 4.2 ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX DE LA FÉCONDATION

### 4.2.1 Incorporation du spermatozoïde fécondant

La pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte peut s'effectuer n'importe où à sa surface. La fusion des membranes plasmiques des 2 gamètes assure la continuité des éléments protoplasmiques favorisant l'entrée du spermatozoïde (figure 16c). Au site de pénétration du spermatozoïde fécondant, on constate une perte des microvilloosités. Une petite portion de l'enveloppe vitelline disparaît pour laisser place à un soulèvement local du cortex appelé cône d'incorporation ou cône de fécondation. Le cône de fécondation, 3.5 min. post-insémination, mesure approximativement 6 µm de longueur et a un diamètre de 4 µm. Cinq minutes après fécondation, la tête du spermatozoïde est incorporée à l'intérieur de l'oeuf, et dans ce cas-ci, la partie apicale est orientée perpendiculairement au cortex de l'ovocyte. A ce moment, le cône de fécondation n'est plus visible et est complètement réabsorbé (figure 16d).

Suite à la fécondation, il n'y a pas de changement morphologique du cortex qui soit détectable (figure 17a). Les granules corticaux demeurent intacts et ne semblent pas subir de modifications morphologiques. Il n'y a pas formation d'une membrane de fécondation comme chez d'autres organismes tel que l'oursin.

#### 4.2.2 Développement du pronucleus mâle

Quelques minutes après avoir franchi le cône de fécondation, le spermatozoïde subit certaines transformations qui vont conduire ultimement à la formation d'un pronucleus mâle. Ces transformations se résument à 2 événements:

- (1) La réorganisation de la chromatine du spermatozoïde,
- (2) La formation de l'enveloppe nucléaire du pronucleus.

Comme le montre la figure 17b, l'enveloppe nucléaire du spermatozoïde possède la structure classique d'un double feuillet. En certaines régions, on remarque que les feuillets interne et externe fusionnent pour former de petites vésicules. Ce processus entraîne la rupture de l'enveloppe nucléaire et marque le début de la formation du pronucleus mâle. Cette figure nous révèle également que les mitochondries du spermatozoïde possèdent un diamètre qui est environ 2 fois supérieur au diamètre des mitochondries de l'ovocyte.

La membrane nucléaire étant maintenant rompue, la chromatine peut alors se disperser. La dispersion de la chromatine se caractérise par 2 zones distinctes: une zone où la chromatine demeure condensée et opaque aux électrons et une zone plus dispersée et plus dense aux électrons. A un stade plus avancé de la formation

du pronucleus mâle (figure 17c), la chromatine continue de se disperser et prend beaucoup de volume. D'après ce que l'on peut voir sur cette figure, tout porte à croire que la dispersion de la chromatine s'effectue de la périphérie vers le centre du noyau du spermatozoïde.

Simultanément au développement du pronucleus mâle, on observe le développement de l'aster spermatique. En effet, autour de la région où se situent les centrioles (seulement 1 centriole paternel représenté à la figure 17c), on peut observer la mise en place de segments de microtubules. Soixante minutes après fécondation, le pronucleus mâle est bien formé et il possède une membrane nucléaire (figure 17d). De petits amas de chromatine compacte, dense aux électrons, persistent tout au long de la formation du pronucleus mâle.

Immédiatement après la pénétration du spermatozoïde fécondant et pendant la formation du pronucleus mâle, l'ovocyte qui était bloqué en métaphase I reprend ses divisions méiotiques.

Figure 17

Développement du pronucleus mâle.

- a: Cortex d'un ovocyte, 10 min. après fécondation. Noter les similitudes avec le cortex d'un ovocyte non fécondé (figure 15a). II (lipides), III (plaquettes vitellines). Échelle: 1 µm.
- b: Rupture de l'enveloppe nucléaire du spermatozoïde 15 min. après fécondation. Formation de petites vésicules (▼). Zones de dispersion de la chromatine (↓). Échelle: 1 µm.
- c: Stade avancé du pronucleus mâle en formation 30 min. après fécondation. Petits amas de chromatine compacte (▼). Échelle: 2 µm.
- d: Pronucleus mâle formé, 60 min. après fécondation. Petits amas de chromatine compacte (▼). Échelle: 2 µm.

AS: aster spermatique

EN: enveloppe nucléaire

C: centriole

M: mitochondrie

CC: chromatine compacte

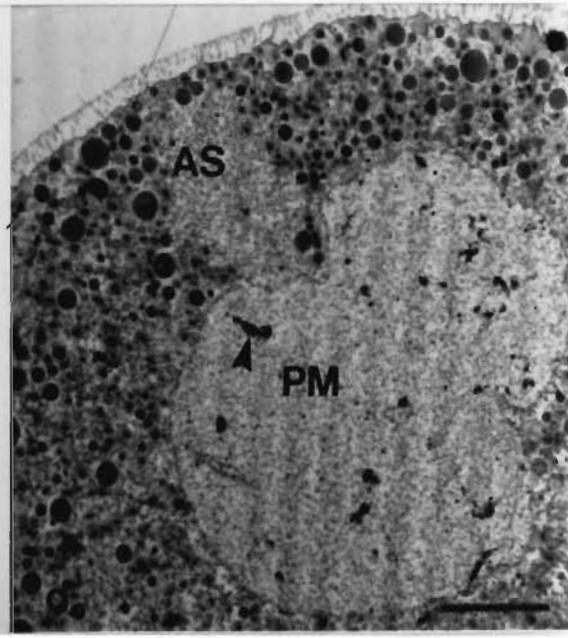
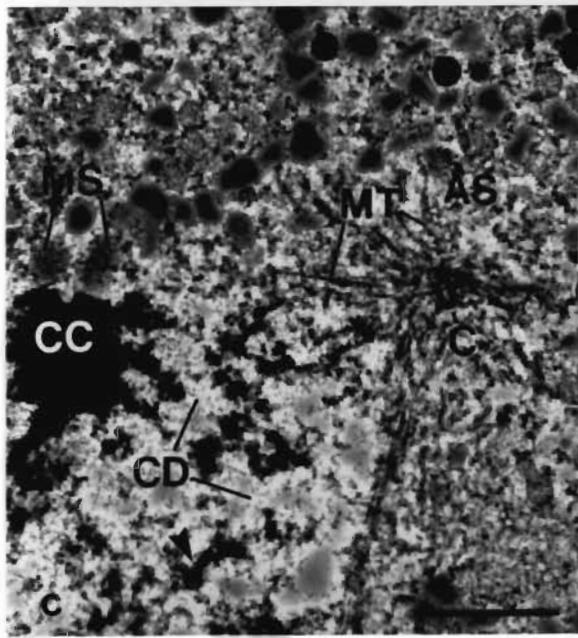
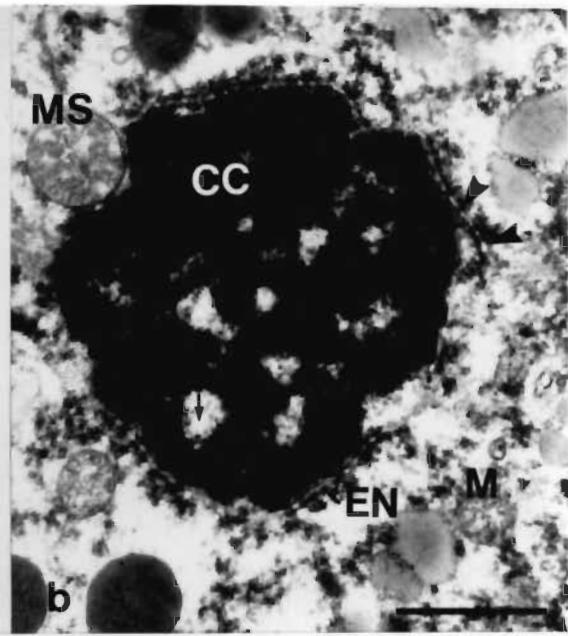
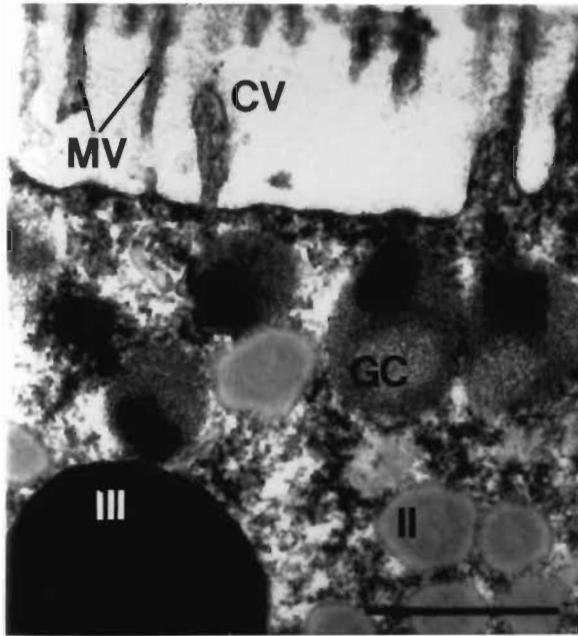
MS: mitochondrie spermatique

CD: chromatine dispersée

MT: microtubules

CV: couche vitelline

PM: pronucleus mâle



#### 4.2.3 Formation du premier globule polaire

Au stade anaphase I, il se produit un allongement du fuseau méiotique et les chromosomes migrent vers leurs pôles respectifs. La série de chromosomes, située près de l'aster périphérique, va alors être entraînée dans une petite excroissance qui se développe au pôle animal de l'ovocyte (figure 18a).

La progression de cette menue saillie conduit ultimement à la formation du premier globule polaire. Lorsque le premier globule polaire est complètement émis (figure 18b), celui-ci est complètement séparé du reste de l'embryon et seul le chorion semble le rattacher à la cellule. La distance qui sépare le premier globule polaire et le jeune embryon est environ de 0,2 µm. D'après nos observations, il semble que la partie distale du globule polaire soit dénudée de microvillosités mais il est possible qu'il s'agisse d'un artefact de préparation.

Le premier globule polaire apparaît comme une mini-cellule puisqu'il contient à peu près les mêmes constituants cellulaires que le zygote, mais en moins grande quantité (figure 18c).

La chromatine se retrouve en une masse compacte, dense aux électrons, et n'est pas entourée d'une membrane nucléaire.

#### 4.2.4 Formation du second globule polaire

Après la formation du premier globule polaire, les chromosomes qui demeurent à l'intérieur de l'embryon s'alignent sur la plaque équatoriale (figure 18b) et la cellule entreprend le second cycle de maturation méiotique.

Le mouvement des chromosomes et l'élongation du fuseau durant l'anaphase II sont des événements similaires à ceux observés au cours de l'anaphase I (figure 18d). Accompagnant le mouvement des chromosomes, on observe le déplacement d'une portion du cytoplasme de la cellule à l'intérieur d'une petite excroissance, laquelle est normalement située sous le premier globule polaire.

La morphologie du second globule polaire est différente de celle du premier globule polaire. D'abord, le contenu du deuxième globule polaire est passablement dépourvu d'inclusion cytoplasmique (figure 19a). La principale différence entre les 2 globules polaires est une nette différence de l'aspect de la chromatine. Au début de la formation du second globule polaire, la chromatine est initialement condensée, puis celle-ci se disperse et il peut y avoir formation d'une membrane nucléaire. Lorsque le deuxième globule polaire est complètement émis, il est, comme le premier globule polaire, complètement séparé du reste du zygote.

Figure 18

Emission du premier globule polaire.

- a: Développement précoce du 1<sup>er</sup> globule polaire, 30 min. après fécondation. (1): excroissance cytoplasmique qui deviendra le 1<sup>er</sup> globule polaire. Échelle: 2 µm.
- b: Émission du 1<sup>er</sup> globule polaire 30 min. après fécondation. Noter la jonction qui sépare le 1<sup>er</sup> globule polaire et l'embryon (▼). Échelle: 5 µm.
- c: Morphologie du 1<sup>er</sup> globule polaire. Inclusions cytoplasmiques (▼). Échelle: 2 µm.
- d: 2<sup>ème</sup> globule polaire en développement. (1): excroissance cytoplasmique qui deviendra le 2<sup>ème</sup> globule polaire. Échelle: 5 µm.

C: chorion

Ch: chromosome

E: embryon

M: mitochondrie

MT: microtubules

PGP: premier globule polaire

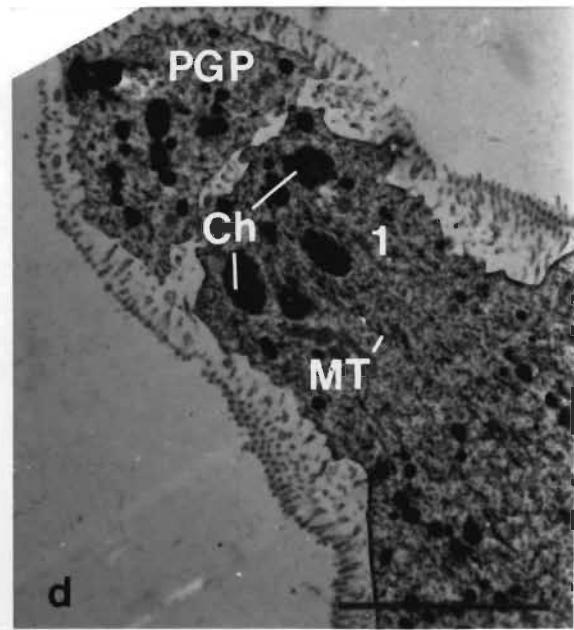
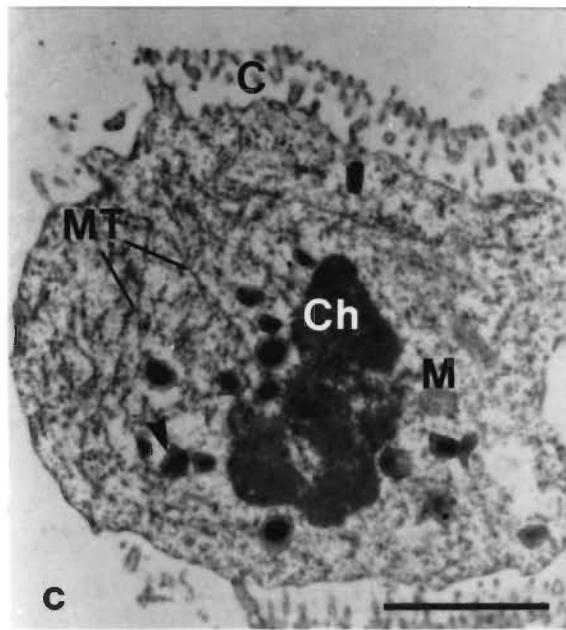
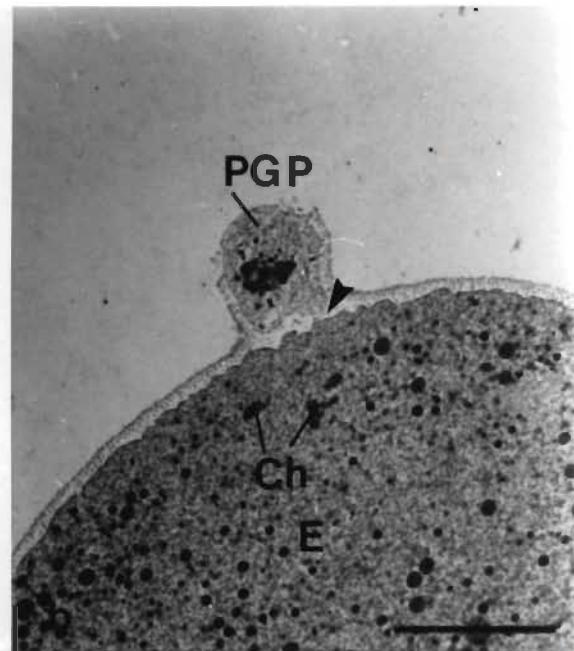
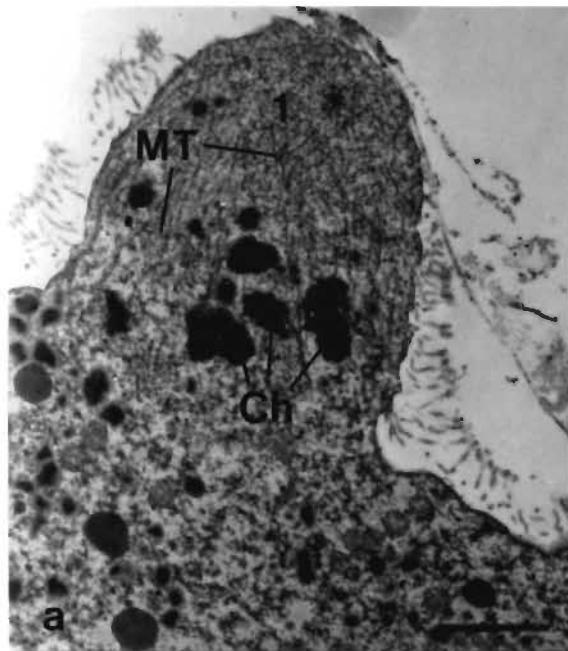


Figure 19

Émission du deuxième globule polaire et formation du pronucleus femelle.

- a: Émission du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>ème</sup> globule polaire 60 min. après fécondation. Contours irréguliers des 2 globules polaires (▼). Échelle: 2 µm.
- b: Développement du pronucleus femelle. Présence d'un centriole à l'intérieur du 1<sup>er</sup> globule polaire (↑). Échelle: 5 µm.
- c: Dispersion de la chromatine maternelle. Eléments membranaires à la périphérie des chromosomes (▼). Échelle: 1 µm.
- d: Pronucleus femelle formé, 75 min. après fécondation. Noter l'apparence similaire au pronucleus mâle (figure 17d). Échelle: 2 µm.

C: chorion

CC: chromatine compacte

CD: chromatine dispersée

Ch: chromosome

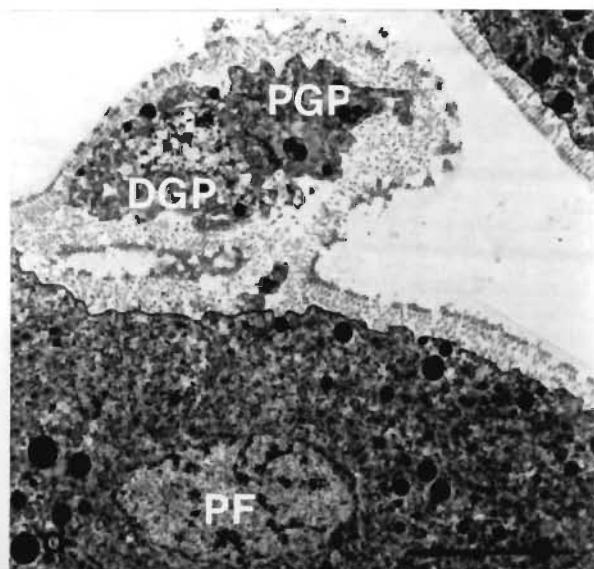
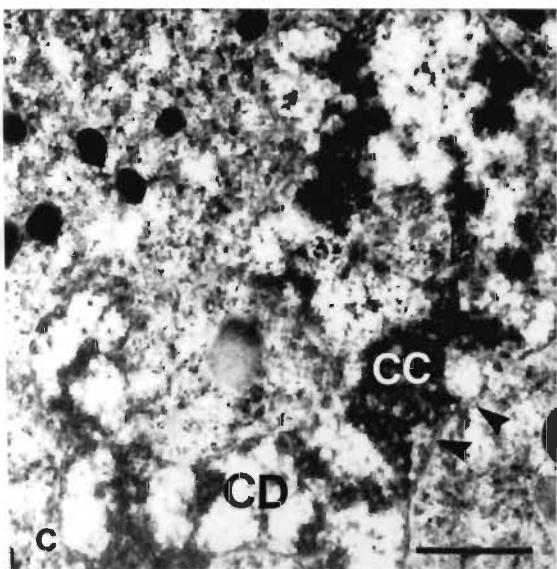
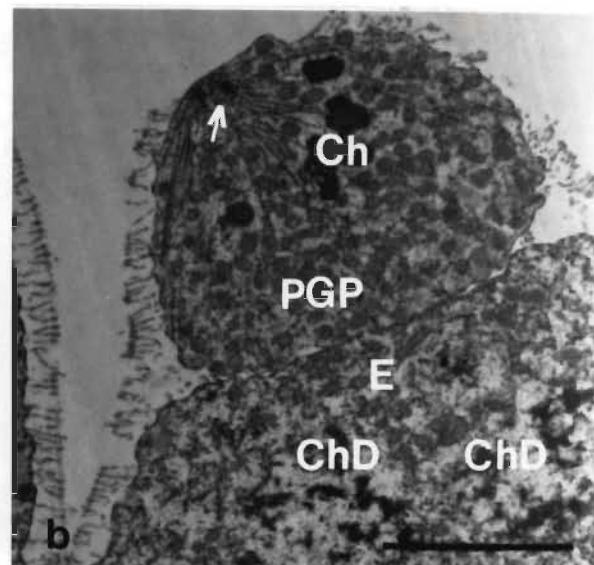
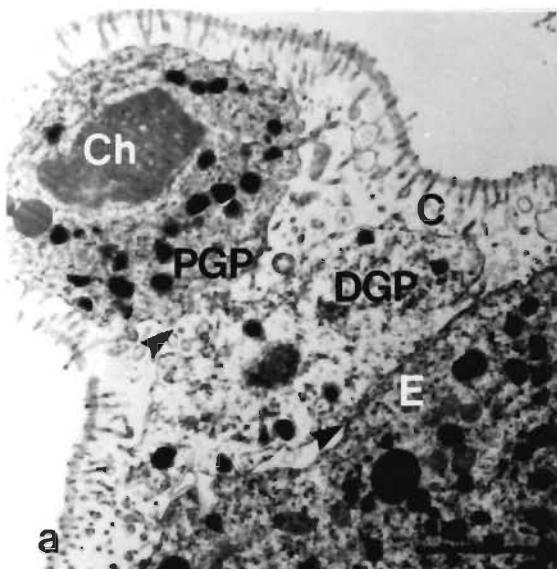
ChD: chromosome dispersé

DGP: deuxième globule polaire

E: embryon

PGP: premier globule polaire

PF: pronucleus femelle



Les surfaces proximales et distales du second globule polaire sont pourvues de contours plutôt irréguliers et elles apparaissent en certaines régions très liées à des structures similaires rencontrées à la surface du premier globule polaire et du zygote. Les surfaces latérales du second globule polaire sont munies de microvillosités et comme dans le cas du premier globule polaire, il apparaît que seul le chorion permet de le retenir attaché à l'embryon.

#### 4.2.5 Formation du pronucleus femelle

Après l'émission des globules polaires, les chromosomes qui demeurent à l'intérieur de l'embryon se dispersent: leur ADN est graduellement transformé en réseau de chromatine, caractéristique du noyau interphasique (figures 19b et 19c).

Des éléments membranaires accompagnent la dispersion des chromosomes et il apparaît que ces éléments entrent dans la formation de l'enveloppe nucléaire du pronucleus femelle puisque ceux-ci délimitent la chromatine en dispersion. Lorsque le pronucleus femelle est bien formé (figure 19d), il possède une membrane nucléaire et on peut apercevoir de petits amas de chromatine condensée et denses aux électrons.

#### 4.2.6 Migration et rencontre des pronuclei

Suite à la formation des pronuclei mâle et femelle, ceux-ci entreprennent de migrer l'un vers l'autre. Le développement de l'aster spermatique, par l'accumulation de segments de microtubules, contribue au déplacement du pronucleus mâle (figure 20a). Les observations montrent qu'il est difficile de différencier le pronucleus mâle du pronucleus femelle (figure 20b); tous deux ont approximativement la même taille et leur contenu est très similaire. Seule la position des pronuclei (pronucleus ♂ et ♀) par rapport au globule polaire (pôle animal) permet clairement d'identifier la nature de ceux-ci.

D'après nos observations, nous avons remarqué que le lieu de rencontre des pronuclei se fait généralement tout près de la région où le pronucleus femelle s'est développé ce qui laisse croire qu'il se déplace très peu comparativement à son homologue mâle. A la fin de la migration des pronuclei, ceux-ci se juxtaposent l'un à l'autre et on peut observer une région où les enveloppes nucléaires des pronuclei deviennent intimement associées (figures 20c et 20d).

Figure 20

Migration et rencontre des pronuclei

- a: Évolution de l'aster spermatique, 75 min. après fécondation. Échelle: 5 µm.
- b: Migration des pronuclei, 90 min. après fécondation. Échelle: 5 µm.
- c: Rencontre des pronuclei, 90 min. après fécondation. Noter l'étroite association des enveloppes nucléaires des pronucléi. Échelle: 2 µm.
- d: Association des enveloppes nucléaires des pronuclei vu à fort grossissement, 90 min. après fécondation. Échelle: 1 µm.

AS: aster spermatique

DGP: deuxième globule polaire

EN: enveloppe nucléaire

MT: microtubules

PF: pronucleus femelle

PM: pronucleus mâle

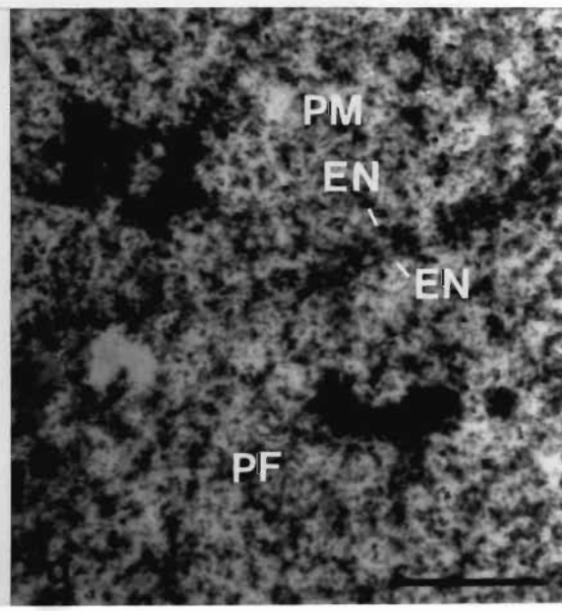
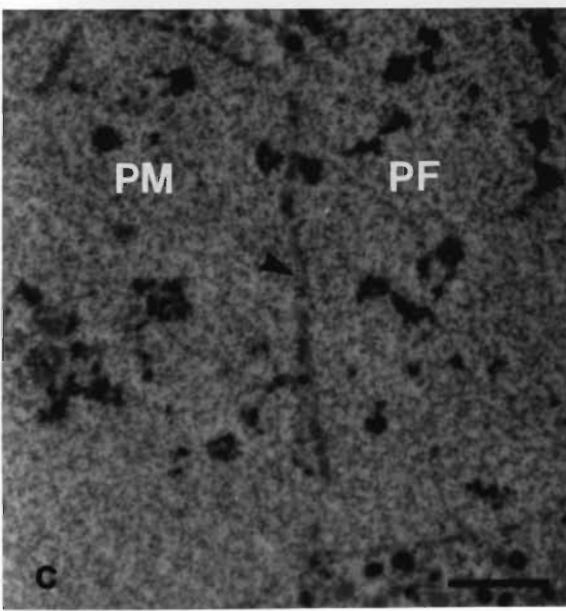
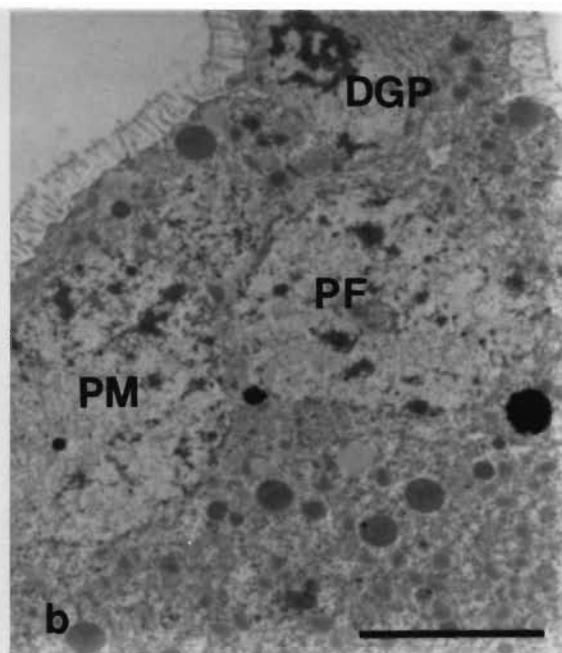
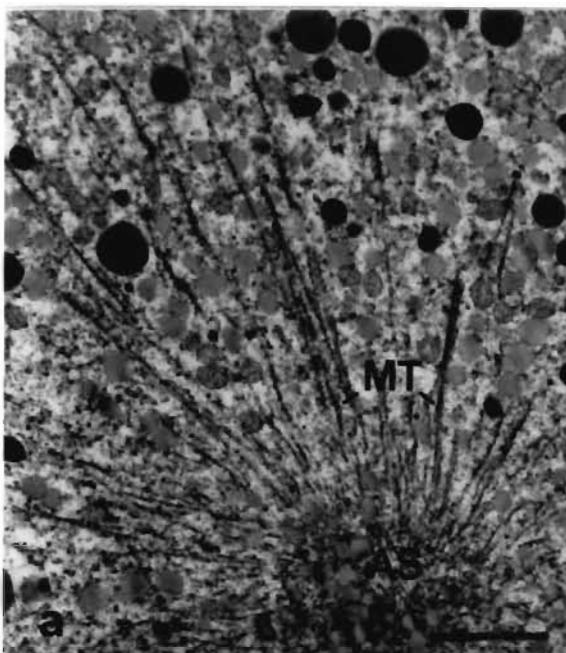


Figure 21 (I)

## Association des pronuclei

L'association des pronuclei est marqué par la rupture des enveloppes nucléaires (▼) et la condensation des chromosomes, 90 min. après fécondation. Échelle: 4 µm.

Ch: chromosome

DGP: deuxième globule polaire

PGP: premier globule polaire

PF: pronucleus femelle

PM: pronucleus mâle

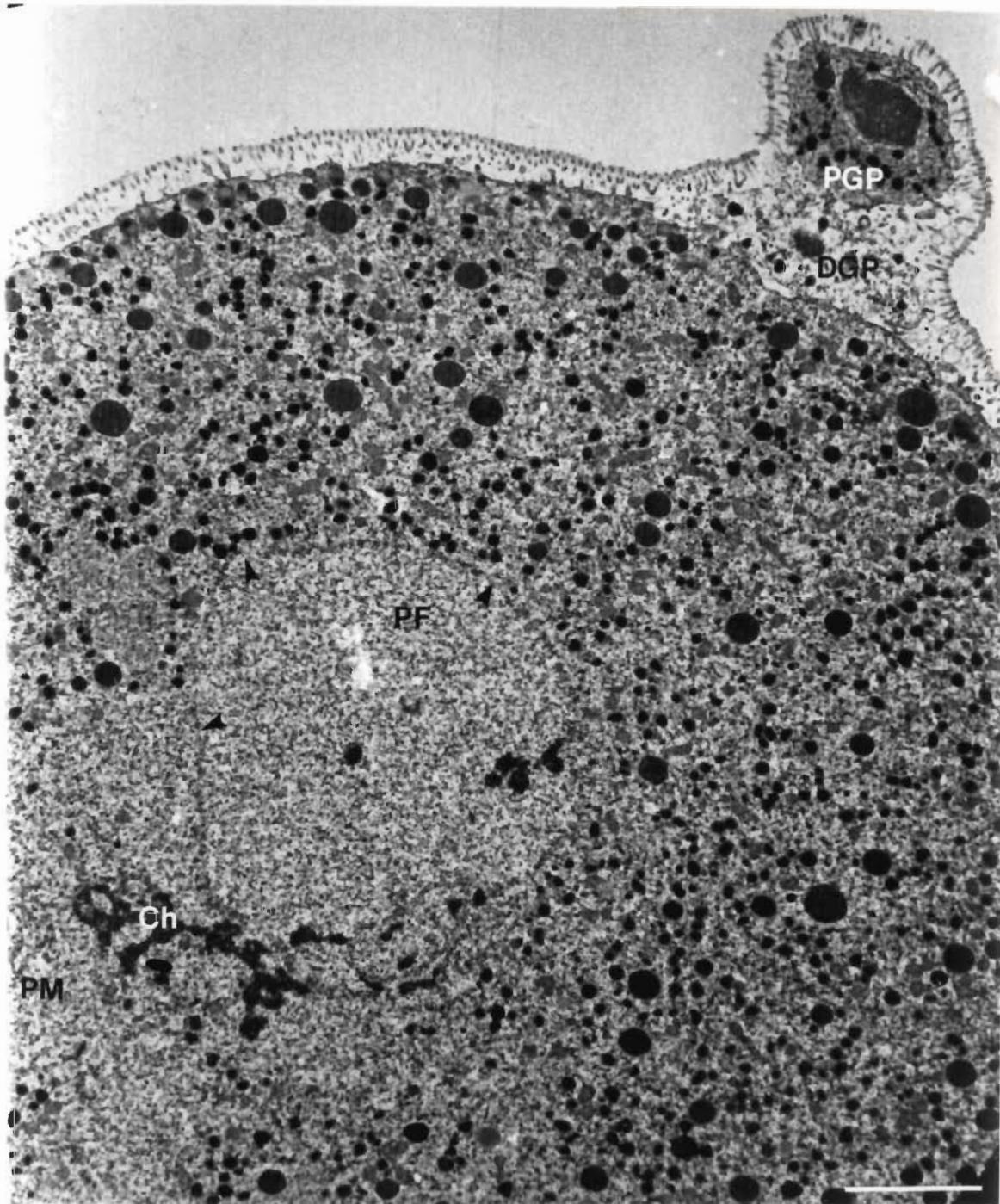
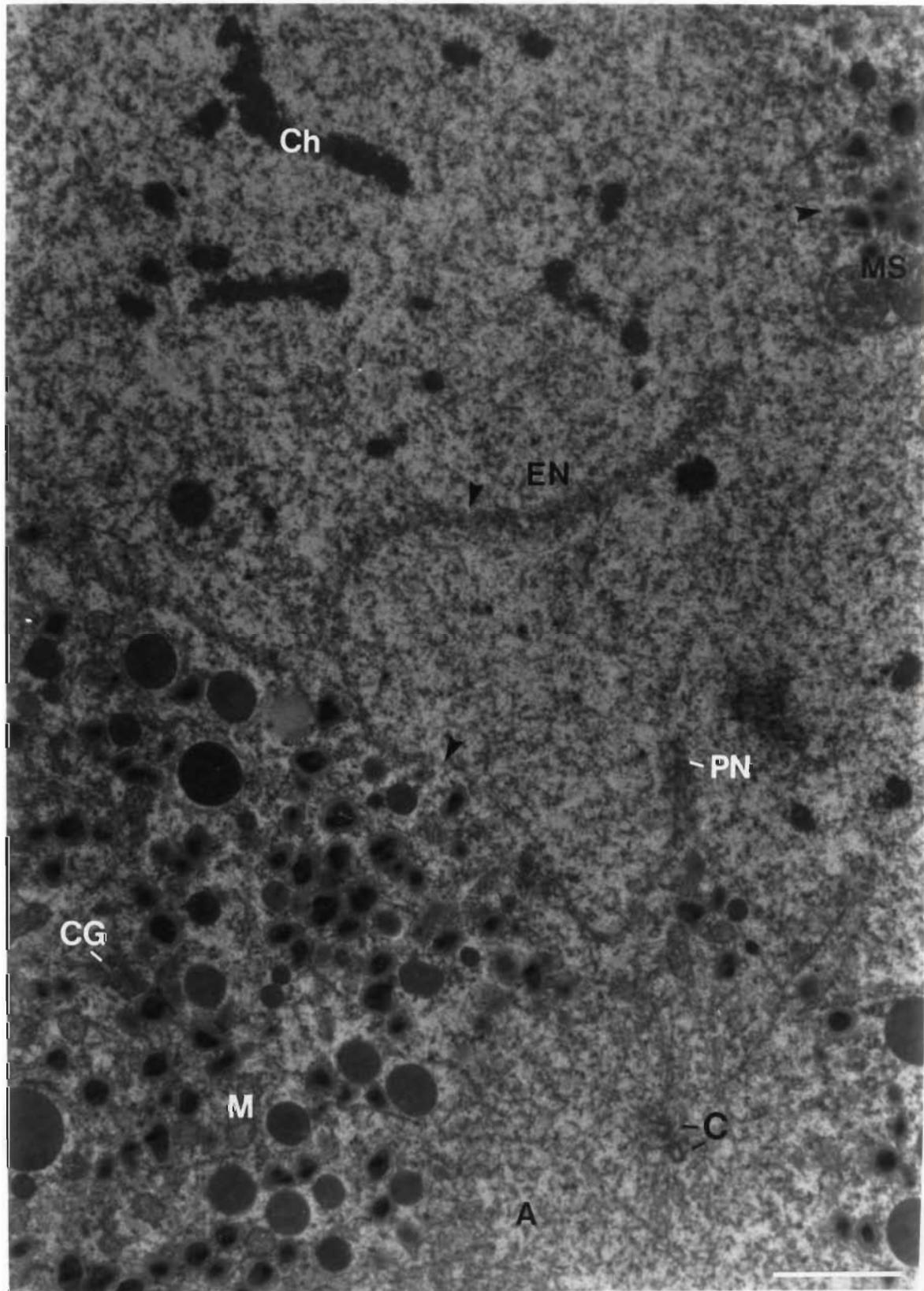


Figure 21 (II)

Association des pronuclei (à fort grossissement)

La rupture des enveloppes nucléaires des pronuclei (▼) génère la production de nombreux pores nucléaires. Remarquer la présence des mitochondries du spermatozoïde à la jonction des pronuclei. 90 min. après fécondation. Échelle: 2 µm.

A:	aster
C:	centriole
CG:	complexe de Golgi
Ch:	chromosome
EN:	enveloppe nucléaire
MS:	mitochondrie spermatique
PN:	pore nucléaire



La figure 21 (I) montre que suite à la juxtaposition des deux pronuclei, les enveloppes nucléaires se rompent et on observe au même moment que les chromosomes commencent à se condenser. La figure 21 (II) montre un stade plus avancé du bris des enveloppes nucléaires des pronuclei. La rupture des enveloppes nucléaires engendre la production de nombreux pores nucléaires. Une observation intéressante nous indique que les mitochondries du spermatozoïde sont présentes et accompagnent les 2 pronuclei. Les asters (un seul représenté ici) sont maintenant situés de chaque côté des pronuclei et établissent ce qui deviendra les pôles du premier appareil mitotique.

Après la rupture des enveloppes nucléaires des pronuclei, les groupes de chromosomes qui proviennent des 2 parents s'entremêlent sur ce qui constitue la plaque métaphasique du premier appareil mitotique (figure 22a). Ces événements terminent ainsi la fin du processus de la syngamie. Ensuite, les chromosomes migrent vers leurs pôles respectifs et marquent le début de l'anaphase (figure 22b). L'embryon poursuivra alors ses divisions mitotiques pour aboutir au stade 2 cellules et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il devienne une jeune larve.

En résumé, cette étude ultrastructurale nous a permis de mieux comprendre les différents aspects de la fécondation et de visualiser les composantes morphologiques du développement normal d'un embryon diploïde.

Figure 22

Premiers stades de maturation mitotique

- a: Premier appareil mitotique (métaphase), 105 min. après fécondation. Échelle: 1 µm.
- b: Stade anaphase, 105 min. après fécondation. Échelle: 1 µm.

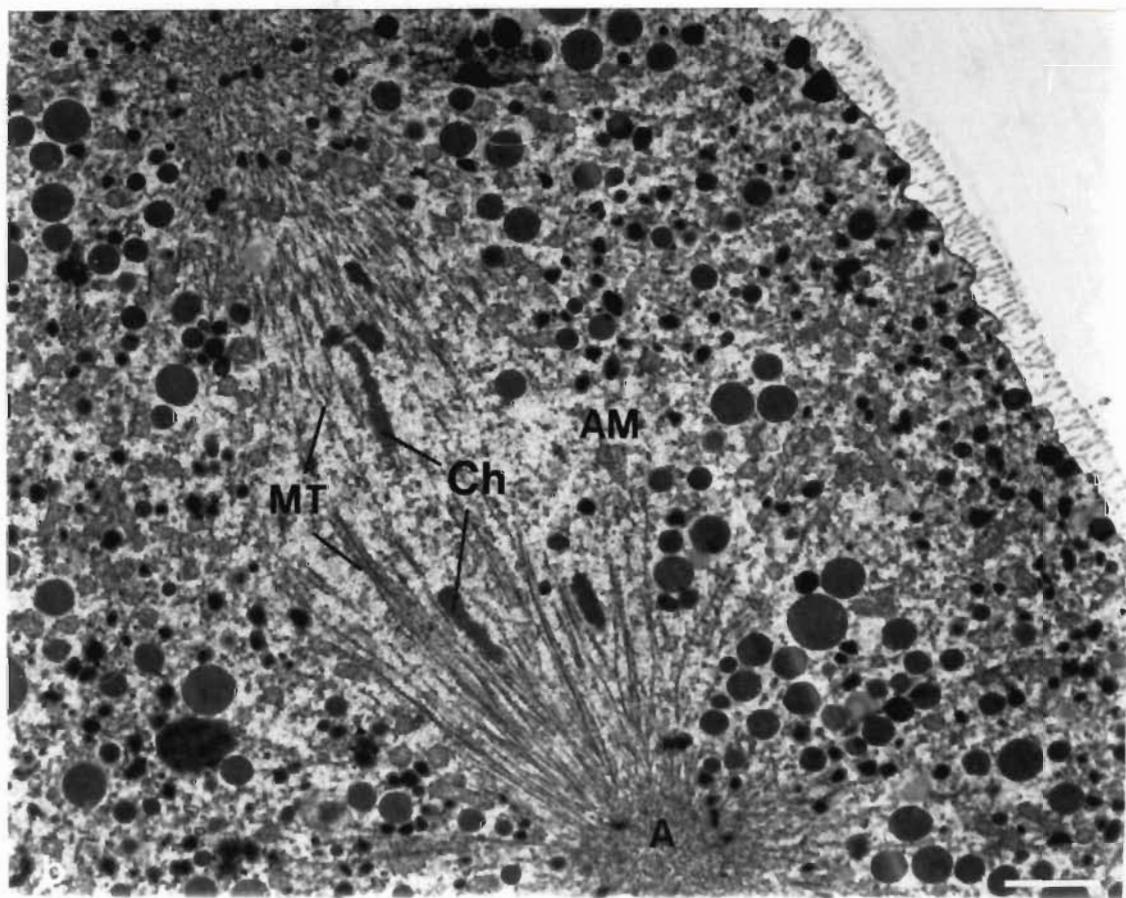
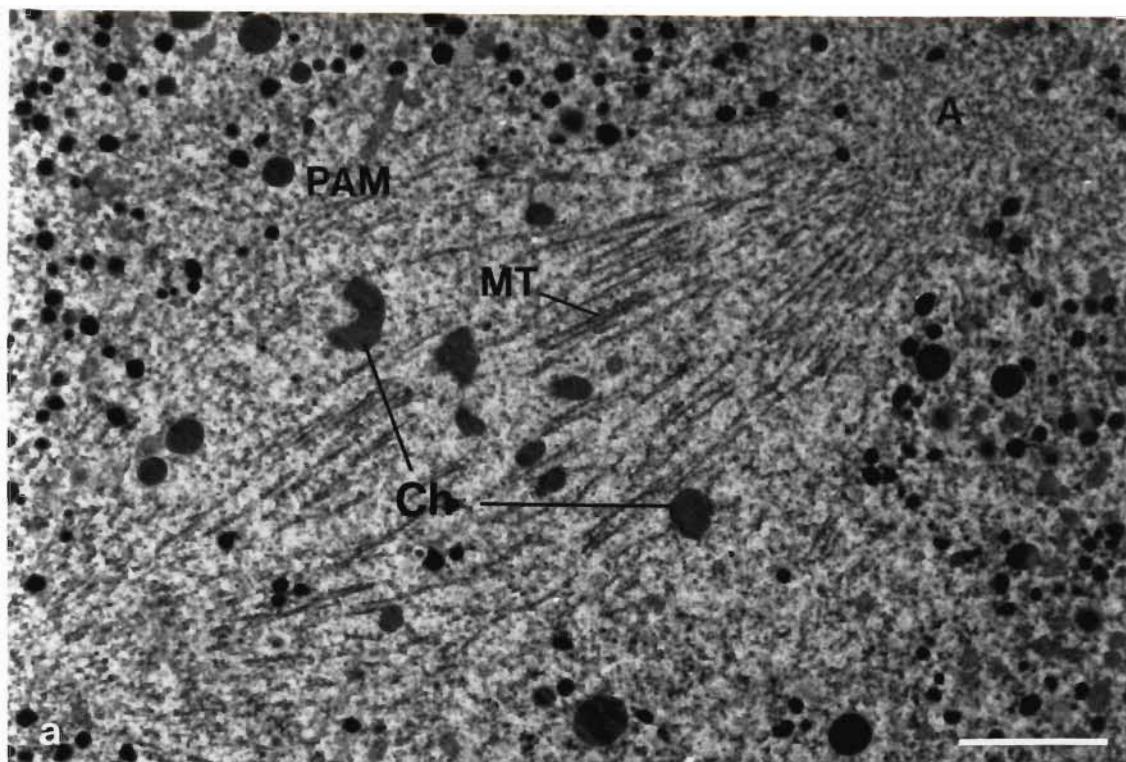
A: aster

AM: appareil mitotique

Ch: chromosome

MT: microtubules

PAM: premier appareil mitotique



## CHAPITRE V

### DISCUSSION

#### 5.1 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE FÉCONDATION

Il est essentiel de posséder des connaissances de base sur la biologie du développement embryonnaire du pétoncle géant avant de se lancer dans la production de larves triploïdes.

Pour assurer l'obtention de larves viables, il faut que la fécondation et le déroulement des premières étapes puissent s'effectuer dans des conditions optimales. Or, pour réaliser les fécondations, nous avons analysé l'importance de deux paramètres critiques tels que la température et la concentration des gamètes.

##### 5.1.1 Effet de la température sur le pourcentage de fécondation

Les résultats obtenus au cours de cette expérience montrent qu'une gamme précise de température est requise pour permettre aux ovocytes d'être fécondés et de se développer normalement. D'après la figure 6, on peut conclure que la meilleure température qui permet d'obtenir un fort pourcentage de fécondation se

situe entre 10° et 15°C. La figure 6 nous indique également que la polyspermie augmente avec la température car à 20°C, plus du quart des embryons sont polyspermiques. Nous avons observé qu'à 20°C, il y a des aberrations chromosomiques évidentes, ce qui laisse croire que la limite de tolérance supérieure est atteinte et qu'à cette température il n'y a pas de développement possible. Bien que Loosanoff & Davis (1963) aient montré que les stades précoce des embryons et des larves de mollusques possèdent des seuils de tolérance à la température généralement plus faibles que ceux des organismes adultes, nos données correspondent au seuil de tolérance thermique déterminé chez les pétoncles adultes (Dickie & Medcof, 1963) qui montrent que cet organisme ne peut survivre à des températures supérieures à 19°C.

#### 5.1.2 Effet des concentrations de gamètes sur le pourcentage de fécondation

D'après nos expériences, nous pouvons conclure que si nous voulons produire un grand nombre de larves viables, il faut porter une attention spéciale aux concentrations de gamètes. Loosanoff & Davis (1963) puis Gruffydd & Beaumont (1972) ont mentionné, dans leurs travaux sur l'huitre *Crassostrea virginica* et la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*, que pour obtenir des larves normales on doit impérativement contrôler les concentrations de gamètes avec lesquelles on effectue les fécondations, ce qui est tout à fait en accord avec nos résultats.

Dans une première expérience, figure 8a et 8b, nous avons montré que l'emploi d'un faible ratio spermatozoïdes/ovocyte (<10) entraîne un faible pourcentage de fécondation. A l'opposé, l'utilisation d'un ratio spermatozoïdes/ovocyte égal ou supérieur à 200 engendre un taux élevé d'embryons polyspermiques. Ces embryons sont voués à une mort prématurée en raison d'anomalies dans les divisions cellulaires. Nous concluons qu'un ratio spermatozoïdes/ovocyte entre 20 et 50 est nécessaire pour optimiser les conditions de fécondation monospermique.

Ces résultats sont inattendus si on les compare à ce qui est connu chez d'autres mollusques comme la palourde *Spisula solidissima* et la moule *Mytilus galloprovincialis*. Clotteau (1991) a montré que chez *Spisula*, on doit maintenir un ratio spermatozoïdes/ovocyte entre 50 et 100 dans le but d'atteindre 95% de fécondation monospermique. Dans le cas de *Mytilus*, les résultats de Dufresne et al. (1983) indiquent que le ratio spermatozoïdes/ovocyte qui permet d'avoir un bon pourcentage de fécondation monospermique se situe entre 10 et 200. Les résultats de notre étude sont surprenants pour les raisons suivantes:

- (1) l'intervalle, où le ratio spermatozoïdes/ovocyte nous permet d'obtenir un fort pourcentage de fécondation monospermique, est très restreint. La marge de manoeuvre y est étroite comparativement à ce que l'on vient

de voir chez *Spisula* et *Mytilus*.

- (2) On note l'apparition d'une forte proportion d'embryons polyspermiques avec l'emploi d'un ratio spermatozoïdes/ovocyte, qui, somme toute, semble modeste si on compare à la palourde, où l'on doit utiliser un ratio supérieur à 500 pour parvenir au même degré de polyspermie.

Ces résultats nous enseignent que l'ovocyte du pétoncle géant est très sensible à la polyspermie et qu'il ne possède pas de mécanisme efficace pour se protéger des spermatozoïdes surnuméraires. D'ailleurs, à ce propos, Dufresne et al. (1983) ont émis l'hypothèse que dans le cas de *Mytilus galloprovincialis*, il n'y a jamais établissement d'une défense totale contre la polyspermie; celle-ci est partielle et dépendante des ions Na<sup>+</sup> présents dans le milieu externe. Ainsi, devant la précarité des ovocytes du pétoncle géant face à la polyspermie, il faudra s'assurer de bien contrôler les concentrations de gamètes avant d'exécuter les fécondations.

Chez le pétoncle géant, la concentration des ovocytes est aussi un facteur important si l'on veut optimiser le pourcentage de fécondation. D'après la figure 9, nous pouvons conclure qu'avec une faible concentration d'ovocytes (<10<sup>3</sup> ovocytes/mL), nous obtenons une forte proportion d'ovocytes fécondés (>95%) dont

plus de 60% sont polyspermiques. Au contraire, lorsque nous employons une forte concentration d'ovocytes ( $>10^4$  ovocytes/mL), le pourcentage de fécondation diminue radicalement à 50%. La gamme de concentration pour laquelle le pourcentage de fécondation monospermique est le plus élevé se situe entre  $5 \times 10^3$  et  $7,5 \times 10^3$  ovocytes/mL ce qui donne aussi, par analogie à l'expérience faite avec les concentrations de spermatozoïdes, une marge de manœuvre très restreinte. Ces concentrations équivalent respectivement à un ratio spermatozoïdes/ovocyte compris entre 25 et 40 et coïncident parfaitement avec les données présentées antérieurement (N.B.: concentration de spermatozoïdes fixée à  $2 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL).

Pour ce qui est de l'expérience faite avec les différentes concentrations de spermatozoïdes, nous l'avons réalisée à 10°C et à 15°C (figure 8a et 8b). D'après ces résultats, nous concluons que la température ne change pas l'intervalle où le pourcentage de fécondation monospermique est optimal. Cependant, pour des concentrations de spermatozoïdes comprises entre  $10^5$  et  $10^6$  spermatozoïdes/mL, la proportion d'embryons polyspermiques est plus faible quand les fécondations sont réalisées à 10°C. Ces résultats viennent appuyer ce que nous avons mentionné dans la première partie de cette discussion à savoir que la polyspermie augmente avec la température.

### 5.1.3 Cinétique du développement des embryons

Maintenant que nous avons trouvé quelles sont les concentrations de gamètes à employer pour obtenir un pourcentage élevé d'embryons viables, nous avons réalisé des cinétiques de développement dans le but de déterminer le moment précis où appliquer le traitement inducteur de la triploïdie. Arai *et al.* (1986) ont clairement indiqué que la connaissance du "timing" embryonnaire est essentiel pour produire des quantités abondantes de triploïdes. Nos résultats montrent que la température joue un rôle important dans la synchronisation du développement des embryons. Lorsque nous faisons les fécondations à 15°C (figure 10), il se produit un chevauchement entre la cinétique d'apparition du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>ème</sup> globule polaire. Ce chevauchement implique qu'il sera impossible de cibler tous les embryons et que le meilleur rendement ne pourra dépasser 75% de triploïdes. Cependant, en effectuant les fécondations à 10°C (figure 12), la synchronisation du développement des embryons est plus prononcée et il n'existe pas de chevauchement entre la cinétique d'apparition du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>ème</sup> globule polaire. Soixante minutes après fécondation, plus de 90% des embryons ont émis leur 1<sup>er</sup> globule polaire (figure 11a) ce qui va permettre d'obtenir une très grande quantité de triploïdes. Il est

intéressant de noter qu'à 10°C, il existe un grand intervalle entre le temps d'apparition de la 1<sup>ère</sup> et de la 2<sup>ème</sup> division cellulaire probablement parce que plusieurs réactions enzymatiques impliquées dans ce processus fonctionnent plus lentement à basse température.

## 5.2 ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DU DÉBUT DE LA FÉCONDATION

Cette partie de la discussion traite des résultats obtenus lors de l'analyse ultrastructurale du début de la fécondation chez *Placoplecten magellanicus* (chapitre IV). Dans cette section, nous présentons une analyse plus approfondie des résultats, analyse qui montre que la fécondation n'est pas qu'un seul événement mais une pléiade d'interactions entre l'ovocyte et le spermatozoïde menant à leur activation, leur fusion, et éventuellement à l'union du matériel génétique pour ainsi engendrer la constitution héréditaire d'un nouvel individu.

### 5.2.1 Ovocyte non fécondé

Au chapitre IV, nous avons vu que les ovocytes non fécondés du pétoncle géant n'ont pas complété leur maturation méiotique et sont bloqués au stade métaphase I (figure 15d). Longo & Anderson (1969a) ont montré que c'est aussi le cas de la moule bleue *Mytilus edulis*. Les ovocytes de *Placoplecten magellanicus*

appartiennent alors à la classe II d'après la classification de Longo (1987) ce qui n'était pas connu. Les ovocytes appartenant à la classe II sont ceux qui sont fécondés au stade métaphase de la première maturation méiotique.

Les différentes inclusions cytoplasmiques (granules corticaux, lipides, plaquettes vitellines, mitochondries) sont des composantes inhérentes des ovocytes de plusieurs mollusques pélécypodes (Longo & Anderson 1969a et 1970a) et sont distribuées de façon homogène à travers tout le cytoplasme de la cellule (figure 15a). Cependant, les granules corticaux ne forment pas une couche bien définie comme ce qui est rencontré chez les ovocytes de la palourde *Spisula solidissima* (Longo & Anderson 1970a).

### 5.2.2 Fusion et incorporation du spermatozoïde fécondant

Nous avons remarqué que l'incorporation du spermatozoïde fécondant peut s'effectuer sur n'importe quel point à la surface de l'ovocyte. Cette observation indique que les ovocytes de cet organisme ne possèdent pas de micropyle, orifice spécialement conçu pour le passage du spermatozoïde, ni de régions plus favorables que d'autres à la fécondation. Comme montré à la figure 16c, l'attachement des gamètes se manifeste par une étroite association entre la portion basale de l'acrosome du spermatozoïde avec une petite portion de la couche

vitelline de l'ovocyte. Cette séquence d'événements ressemble beaucoup à ce qui est rencontré chez *Mytilus* et *Spisula* (Longo & Anderson 1969b et 1970b). Et comme indiqué chez ces 2 espèces, le cône de fécondation ne contient pas d'inclusion cytoplasmique et on observe une perte locale des microvillosités.

Suite à l'incorporation du spermatozoïde à l'intérieur de l'ovocyte (figure 16d), aucune portion du flagelle n'a pu être observé à l'intérieur du cytoplasme indiquant que celui-ci n'y est pas introduit. Cette situation est similaire à celle rencontrée lors de l'incorporation du spermatozoïde chez *Mytilus* (Longo & Anderson 1969b). La même figure montre également que la tête du spermatozoïde a effectué une rotation de 90° par rapport à son point d'entrée. Cette rotation du spermatozoïde, après avoir atteint le cytoplasme de la cellule, a aussi été observé chez *Mytilus* et *Spisula* (Longo 1983).

### 5.2.3 Absence de réaction corticale et défense contre la polyspermie

Suite à l'incorporation du spermatozoïde fécondant, nous avons vu à la figure 17a qu'il n'y a pas de modification corticale évidente, c'est-à-dire qu'il n'y a pas exocytose des granules corticaux et il n'y a pas formation d'une membrane de fécondation pour bloquer l'entrée des spermatozoïdes surnuméraires. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Humphreys (1962 et 1964); Longo & Anderson

(1969b,c) et Longo (1976a) qui montrent également que les granules corticaux, quoique présents dans les ovocytes de la moule bleue *Mytilus edulis* (mollusque pélécypode), ne sont pas modifiés et ne subissent pas d'exocytose après fécondation. Toutefois, Dufresne et al. (1983) ont indiqué que chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, il n'y a jamais établissement d'une défense totale contre la polyspermie mais plutôt que celle-ci est partielle et requiert du Na<sup>+</sup> externe. Dans le cas du pétoncle géant, si les ovocytes possèdent un mécanisme de défense contre la polyspermie, il semble être d'une efficacité plutôt réduite car les résultats obtenus avec les concentrations de gamètes au chapitre III montrent que les ovocytes sont effectivement sensibles à la polyspermie. Les données ultrastructurales viennent d'ailleurs confirmer que les ovocytes du pétoncle géant n'établissent pas de barrière physique pour empêcher l'incorporation de plus d'un spermatozoïde.

#### 5.2.4 Développement du pronucleus mâle

Plusieurs études faites sur les mollusques bivalves (Longo & Anderson 1969b, 1970b; Longo 1976a) nous enseignent que la gamme des événements qui mènent à la métamorphose du noyau spermatique en pronucleus mâle est très similaire d'une espèce à l'autre. Ces auteurs mentionnent que le développement du pronucleus mâle est issu de:

- (1) la rupture de l'enveloppe nucléaire du spermatozoïde
- (2) la dispersion de la chromatine
- (3) le développement de l'enveloppe nucléaire du pronucleus.

Comme le montrent les figures 17b à 17d, le noyau du spermatozoïde du pétoncle géant subit également ces transformations. La rupture de l'enveloppe nucléaire du spermatozoïde s'effectue peu après son incorporation dans le cytoplasme de la cellule (< 10 min.) et il semble que, tout comme la moule (Longo & Anderson 1969b), ce processus implique la fusion des feuillets internes et externes de l'enveloppe nucléaire ce qui provoque la production de nombreuses vésicules (figure 17b).

Suivant la rupture de l'enveloppe nucléaire du spermatozoïde, nous observons à la figure 17c que la chromatine du spermatozoïde passe d'un état condensé à un état dispersé. Cette transformation a aussi été étudiée chez la moule *Mytilus edulis* (Longo & Anderson 1969b) ainsi que chez la palourde *Spisula solidissima* (Longo & Anderson 1970b). Dans tous les cas, la chromatine localisée à la périphérie du noyau spermatique devient moins dense aux électrons, plus diffuse et occupe un plus grand volume que la chromatine compacte et dense aux électrons. Ce processus nous indique que l'agent ou les agents responsables de la dispersion de

la chromatine commencent par agir à la périphérie. Une fois la chromatine extérieure dispersée, la chromatine centrale peut alors aussi se disperser.

En analysant attentivement la figure 17c, nous observons que le développement de l'aster spermatique s'amorce en même temps que la chromatine du spermatozoïde se disperse. La formation de l'aster spermatique chez *Spisula* (Longo & Anderson 1970b) débute suivant la méiose de la chromatine maternelle et se déroule durant la formation de l'enveloppe nucléaire du pronucleus mâle, soit approximativement 50 min. après fécondation. La formation de l'aster spermatique peut donc varier dans le temps selon les espèces. De façon générale, l'aster spermatique prend forme autour des centrioles amenés dans l'ovocyte par le spermatozoïde. Les centrioles jouent le rôle de centres organisationnels dans le processus d'assemblage des microtubules de l'aster spermatique. La taille de l'aster spermatique augmente avec le développement du pronucleus mâle et paraît atteindre son maximum (figure 20a) lors de la migration des pronuclei.

Comme dans le cas de *Mytilus* (Longo & Anderson 1969b), la dispersion de la chromatine du spermatozoïde du pétoncle géant est suivie immédiatement par le développement d'une enveloppe nucléaire. Ce n'est pas le cas de *Spisula* (Longo & Anderson 1970b) où la chromatine demeure exposée au cytoplasme de l'ovocyte sans enveloppe nucléaire jusqu'à ce que la maturation méiotique de la chromatine

maternelle soit complétée. Selon Longo (1976b), le réticulum endoplasmique serait responsable de la synthèse des nouveaux éléments membranaires entrant dans la formation de l'enveloppe nucléaire du pronucleus. Dans le cas du pétoncle géant, l'enveloppe nucléaire du pronucleus mâle est formée bien avant que la maturation méiotique ne soit complétée, c'est-à-dire environ 45 min. après fécondation. Contrairement à *Spisula* et *Mytilus*, le contenu du pronucleus mâle bien formé n'est pas complètement homogène (figure 17d) et contient encore des amas de chromatine condensée, denses aux électrons.

#### 5.2.5 Formation du 1<sup>er</sup> globule polaire

Nous avons présenté au chapitre IV (figures 18 et 19) les phénomènes qui accompagnent la reprise de la maturation méiotique suite à la fusion du spermatozoïde fécondant avec l'ovocyte qui, jusque là, était bloqué au stade métaphase I (figure 15d). La maturation méiotique est accomplie par 2 divisions méiotiques successives durant lesquelles le nombre de chromosomes est réduit de moitié. Ces divisions réductionnelles conduisent à la formation de deux "mini" cellules appelées globules polaires qui servent principalement de réceptacles pour les chromosomes en surplus que l'ovocyte fécondé élimine.

Nos résultats montrent que chez *Placopecten*, tout comme chez *Mytilus* et *Spisula* (Longo & Anderson 1969a, 1970a):

- (1) il y a séparation des chromosomes au stade anaphase I et élévation d'une petite masse de cytoplasme où l'on retrouve l'aster périphérique et une partie des chromosomes à l'intérieur de ce qui va devenir le 1<sup>er</sup> globule polaire (figure 18a);
- (2) le 1<sup>er</sup> globule polaire, une fois formé (figure 18b), est complètement séparé du reste de l'embryon et contient généralement la plupart des inclusions cytoplasmiques rencontrées dans l'embryon (figure 18c);
- (3) la chromatine qui se retrouve à l'intérieur du 1<sup>er</sup> globule polaire a l'aspect d'une masse compacte et n'est pas associée à une enveloppe nucléaire;
- (4) le 1<sup>er</sup> globule polaire devient plus opaque aux électrons dans les stades ultérieurs du développement (figure 21 I) ce qui pourrait signifier, selon Longo, un signe de nécrose.

#### 5.2.6 Formation du 2<sup>ème</sup> globule polaire

La formation du 2<sup>ème</sup> globule polaire s'effectue selon les mêmes mécanismes qui ont mené à la formation du 1<sup>er</sup> globule polaire. D'abord, immédiatement suivant la formation du 1<sup>er</sup> globule polaire, les chromosomes qui demeurent au sein de l'embryon s'organisent (figure 18b) et vont s'aligner sur la plaque métaphasique du

second appareil méiotique. Cette observation est intéressante puisque ceci prend place sans passer par les stades télophase et prophase. C'est aussi le cas chez *Mytilus* et *Spisula* (Longo & Anderson 1969a, 1970a). Au stade anaphase II, il y a séparation des chromosomes et la suite des événements est identique à ceux impliqués dans la formation du 1<sup>er</sup> globule polaire. Cependant, comme chez *Mytilus* et *Spisula*, il existe des différences morphologiques entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> globule polaire. Dans le cas du 2<sup>ème</sup> globule polaire, la chromatine qui s'y retrouve est initialement condensée puis à mesure que le développement progresse, elle se disperse et on peut observer la formation d'une membrane nucléaire.

#### 5.2.7 Formation du pronucleus femelle

Les événements qui mènent à la formation du pronucleus femelle chez le pétoncle géant sont très similaires à ce qui est connu chez *Mytilus* et *Spisula* (Longo & Anderson, 1969a, 1970a). Tout d'abord, les chromosomes qui demeurent à l'intérieur de l'embryon après l'émission du deuxième globule polaire se dispersent (figure 19b) et on observe la production de vésicules qui s'assemblent autour des chromosomes (figure 19c). Subséquemment, ces vésicules fusionnent pour former l'enveloppe nucléaire du pronucleus femelle (figure 19d). Il est difficile de faire la différence entre le pronucleus femelle et le pronucleus mâle car leur contenu et leur taille sont similaires. Tel que décrit par Longo (1987), l'identification est basée sur

le fait que le pronucleus femelle est formé à proximité du lieu d'émission des deux globules polaires.

#### 5.2.8 Migration et rencontre des pronuclei

Les différents processus impliqués dans la migration des pronuclei chez les mollusques ne sont pas très bien compris. Toutefois, il apparaît que chez les mammifères comme le lapin (Longo, 1976c), le développement de l'aster spermatique est impliqué dans la migration des pronuclei. L'auteur prétend qu'un rôle comparable est attribuable à l'aster spermatique chez les mollusques pélécypodes.

Après la migration des pronuclei, ceux-ci se juxtaposent et deviennent intimement associés. Cette étroite association a également été observée chez la moule et le lapin (Longo & Anderson, 1969b, 1969c).

#### 5.2.9 Association des pronuclei

Suite à l'accolement des pronuclei, les enveloppes nucléaires se rompent et au même moment, il y a condensation des chromosomes (figures 21 I et 21 II). Les observations faites chez le pétoncle géant ressemblent à ce qui a été montré chez

*Mytilus* (Longo & Anderson, 1969b): tout d'abord, durant le démantèlement des enveloppes nucléaires des pronuclei, la chromatine continue de se condenser (figure 21 II) et au même moment, on peut observer que les centrioles migrent vers la zone de contact des pronuclei où, avec l'aster, ils constitueront un des pôles du premier appareil mitotique. La position des centrioles par rapport à celle des mitochondries du spermatozoïde montre que ceux-ci se sont déplacés. La présence des mitochondries du spermatozoïde, même 90 min. après fécondation, n'est pas inusitée considérant que Hinkley & Newman (1989) ont indiqué la présence des mitochondries du spermatozoïde d'oursin, par coloration sélective, jusqu'à la deuxième division cellulaire (stade 4 cellules). L'aster, associé aux centrioles, et montré à la figure 21 II est beaucoup plus volumineux et plus distinct que les asters observés durant la maturation méiotique (figure 15d). Beaucoup de segments de microtubules sont présents dans la région péricentriolaire ce qui fait que cette zone est complètement dépourvue d'inclusions cytoplasmiques.

D'après ces observations, nous concluons que suite à l'association des pronuclei, il n'y a pas formation d'un noyau zygотique, c'est-à-dire qu'il n'y a pas fusion des pronuclei comme c'est le cas chez l'oursin *Arbacia* (Longo, 1973). L'association des pronuclei chez le pétoncle géant correspond au type *Ascaris* tel que décrit par Wilson (1925); c'est-à-dire qu'il y a enchevêtrement des chromosomes issus du génome maternel et paternel sans qu'il y ait fusion des pronuclei. Les

ovocytes qui présentent ce genre d'association entre les pronuclei sont fécondés bien avant la fin de la maturation méiotique, soit au stade prophase I, métaphase I ou métaphase II (Longo, 1973).

Historiquement, l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique du premier appareil mitotique (figure 22a) représente l'étape finale de la fécondation chez les zygotes qui suivent le cheminement du type *Ascaris* (Longo, 1973).

## CONCLUSION

Dans ce travail, notre but principal était d'apporter des connaissances de base sur la biologie du développement du pétoncle géant à la fois par l'acquisition de données quantitatives et qualitatives. Nous voulions apporter ces connaissances en espérant qu'elles contribuent à améliorer et optimiser la croissance des élevages par la mise au point d'organismes triploïdes.

D'après nos résultats, tout indique qu'il est possible d'optimiser les conditions de fécondation en laboratoire. Pour obtenir un pourcentage élevé de fécondation monospermique, nous suggérons:

- (1) d'employer un ratio spermatozoïdes/ovocyte entre 20 et 50 ce qui implique l'utilisation de concentrations de spermatozoïdes variant de  $1 \times 10^5$  à  $2,5 \times 10^5$  spermatozoïdes/mL avec une concentration d'ovocytes fixée à  $5 \times 10^3$  ovocytes/mL;
- (2) d'effectuer les fécondations entre 10 et 15°C.

D'après l'étude des cinétiques du développement des embryons, nous concluons que les meilleures conditions pour obtenir le plus grand nombre de triploïdes sont:

- (1) de réaliser les fécondations à 10°C;
- (2) d'appliquer le traitement inducteur de la triploïdie exactement 65 min. après fécondation.

Les résultats de l'analyse ultrastructurale du début du développement nous permettent de conclure que:

- (1) cet organisme ne possède pas de barrière physique pour se protéger contre la polyspermie;
- (2) morphologiquement, les deux globules polaires sont différents;
- (3) l'association des pronuclei se manifeste selon le type *Ascaris* et, par conséquent, il n'y a pas formation d'un noyau zygотique.

Le fait que les deux globules polaires soient morphologiquement différents représente un aspect pratique appréciable dans le cas où l'on comparera à l'échelle ultrastructurale, l'effet biologique du traitement inducteur de la triploïdie puisqu'alors il ne devrait y avoir qu'un seul globule polaire d'émis.

Cette analyse ultrastructurale constitue une première chez le pétoncle géant et la mine de renseignements qu'elle contient pourra, j'espère, inciter les biologistes à poursuivre les recherches dans le but d'améliorer, par altérations génétiques, la croissance de ce mollusque à fort potentiel économique.

### BIBLIOGRAPHIE

- ARAI, K., NAITO, F. et F. FUJINO. (1986). Triploidization of the Pacific Abalone with temperature and pressure treatments. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **52**, 417-422.
- BARON, J., DITER, A. et A. BODOY. (1989). Triploidy induction in the black scallop (*Chlamys varia* L.) and its effect on larval growth and survival. *Aquaculture*, **77**, 103-111.
- BEAUMONT, A.R. et J.E. FAIRBROTHER. (1991). Ploidy manipulation in molluscan shellfish: A review. *Journal of Shellfish Research*, **10**, 1-18.
- BENFEY, T.J. (1989). A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, **1682**, 1-31.
- BONARDELLI, J.C. et J.H. HIMMELMAN. (1989). Relation entre les facteurs environnementaux et la ponte chez le pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*) dans la Baie des chaleurs. (*Cahier spécial d'information, Ministère de l'Agriculture, des pêcheries et de l'Alimentation, Québec, Canada*, **12**, 27-29.

BOURNE, N., HODGSON, C.A. et J.N.C. WHYTE. (1989). A manual for scallop culture in British Columbia. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, **1694**, 214 p.

BUREAU DE LA STATISTIQUE DU QUEBEC, pêches commerciales. (1990). *Recueil de données historiques: Pêche et aquaculture commerciale*. Québec, Canada, 42 p.

CALABRESE, A. (1969). Individual and combined effects of salinity and temperature on embryos and larvae of the coot clam, *Mulinia lateralis* (SAY). *Biological Bulletin*, **137**, 417-436.

CLOTTEAU, G. (1991). Optimisation des paramètres de fécondation et rôle des phosphorylations chez les ovocytes de *Spisula solidissima*. Thèse de Maîtrise en Océanographie de l'Université du Québec à Rimouski, 112 p.

COCHARD, J.C. (1983). Etude sur la reproduction de la coquille Saint-Jacques en milieu artificiel. *Rapport du contrat E.P.R. Bretagne-CNEXO*, **80/6203/F**, 61p.

CULLINEY, J.L. (1974). Larval development of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (GMelin). *Biological Bulletin*, **147**, 321-332.

DEVAUCHELLE, N. et C. MINGANT. (1991). Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquatic Living Resources*, **4**, 41-51.

DICKIE, L.M. et J.C. MEDCOF. (1963). Causes of mass mortalities of scallops (*Placopecten magellanicus*) in the southwestern Gulf of St. Lawrence. *Journal of Fisheries Ressources Board Canadian*, **20**, 451-482.

DUBE, F. (1988). Effect of reduced protein synthesis on the cell cycle in sea urchin embryos. *Journal of Cellular Physiology*, **137**, 545-552.

DUBE, F., SCHMIDT, T., JOHNSON, C.H. et D. EPEL. (1985). The hierarchy of requirements for an elevated intracellular pH during early development of sea urchin embryos. *Cell*, **40**, 657-666.

DUFRESNE, L., DUBE, F., GUERRIER, P. et P. COUILLARD. (1983). Absence of a complete block to polyspermy after fertilization of *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Pelecypoda) oocytes. *Developmental Biology*, **92**, 27-33.

FOURNIER, R. et P. MARSOT. (1985). Ecloserie expérimentale de larves du pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*) dans le Bas St-Laurent. *Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec*, projet no. INRS-84-1127, 14 p.

GAUDET, M. (1992). Cours sur la pectiniculture (élevage de pétoncle). *Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Station aquicole des îles-de-la-Madeleine, Canada*, 30 p.

GRUFFYDD, L.L.D. et A.R. BEAUMONT. (1970). Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* (Mollusca, Lamellibranchia). *Helgolander Meeresunters*, **20**, 486-497.

GRUFFYDD, L.L.D. et A.R. BEAUMONT. (1972). A method for rearing *Pecten maximus* larvae in the laboratory. *Marine Biology*, **15**, 350-355.

HINKLEY, R.E., Jr. et A.N. NEWMAN. (1989). Selective identification of the paternal mitochondrion in living sea urchin eggs and embryos by chlorotetracycline. *Journal of Experimental Zoology*, **249**, 111-114.

HUMPHREYS, W.J. (1962). Electron microscope studies of eggs of *Mytilus edulis*. *Journal of Ultrastructural Research*, **7**, 467-487.

HUMPHREYS, W.J. (1964). Electron microscope studies on the fertilized egg and the two-cell stage of *Mytilus edulis*. *Journal of Ultrastructural Research*, **10**, 244-262.

JAMIESON, G.S. et R.A. CHANDLER. (1983). Paralytic shellfish poison in sea scallops (*Placopecten magellanicus*) in the west Atlantic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **40**, 313-318.

KENNEDY, V.S., ROOSENBURG, W.H., ZION, H.H. et M. CASTAGNA. (1974). Temperature-time relationships for survival of embryos and larvae of *Mulinia laterali* (Mollusca: Bivalvia). *Marine Biology*, **24**, 137-145.

LONGO, F.J. (1973). Fertilization: A comparative ultrastructural review. *Biological Reproduction*, **9**, 149-215.

LONGO, F.J. (1976a). Ultrastructural aspects of fertilization in spiralian eggs. *American Zoologist*, **16**, 375-394.

LONGO, F.J. (1976b). Derivation of the membrane comprising the male pronuclear envelope in inseminated sea urchin eggs. *Developmental Biology*, **16**, 347-368.

LONGO, F.J. (1976c). Sperm aster in rabbit zygotes: Its structure and function. *Journal of Cell Biology*, **69**, 539-547.

LONGO, F.J. (1983). Meiotic maturation and fertilization. In K.M. Wilbur, N.H. Verdonk, J.A.M. Van Den Biggelaar and A.S. Tompa (Eds.), *The mollusca*, (vol.3), Academic Press, New York, pp. 49-89.

LONGO, F.J. (1987). Fertilization. In W.J. Brammar and M. Edidin (Eds.) Chapman and Hall, New York, pp. 1-183.

LONGO, F.J. et E. ANDERSON. (1969a). Cytological aspects of fertilization in the Lamellibranch, *Mytilus edulis*: I. Polar body formation and development of the female pronucleus. *Journal of Experimental Zoology*, **172**, 69-96.

LONGO, F.J. et E. ANDERSON. (1969b). Cytological aspects of fertilization in the Lamellibranch, *Mytilus edulis*: II. Development of the female pronucleus and the association of the maternally and paternally derived chromosomes. *Journal of Experimental Zoology*, **172**, 97-120.

LONGO, F.J. et E. ANDERSON. (1969c). Cytological events leading to the formation of the two-cell stage in the rabbit: Association of the maternally and paternally derived genomes. *Journal of Ultrastructural Research*, **33**, 495-514.

LONGO, F.J. et E. ANDERSON. (1970a). An ultrastructural analysis of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*: I. Polar body formation and development of the female pronucleus. *Journal of Ultrastructural Research*, **33**, 495-514.

LONGO, F.J. et E. ANDERSON. (1970b). An ultrastructural analysis of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*: II. Development of the male pronucleus and the association of the maternally and paternally derived chromosomes. *Journal of Ultrastructural Research*, **33**, 515-527.

LOOSANOFF, V.L. et H.C. DAVIS. (1963). Rearing of bivalve molluscs. In Russel F.S. (Ed.), *Advances in marine biology*, (vol.3), Academic Press, London, pp. 1-136.

MACDONALD, B.A. et R.J. THOMPSON. (1985). Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. II. Reproductive output and total production. *Marine Biology*, **25**, 295-303.

MERRILL, A.S. et J. BURCH. (1960). Hermaphroditism in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (GMelin). *Biological Bulletin.*, **119**, 197-201.

MINISTÈRE DES PECHES ET DES OCEANS. (1988). *Le monde sous-marin: Les pétoncles*. Ottawa, Canada, 8 p.

NAIDU, K.S. (1970). Reproduction and breeding cycle of the giant scallop, *Placopecten magellanicus* (GMelin), in Port au Port Bay, Newfoundland. *Canadian Journal of Zoology*, **48**, 1003-1012.

PECHES ET OCEANS. (1991). Analyse commerciale du pétoncle au Québec. *Rapport de l'analyse économique et commerciale*, no **121**, Ministère des Pêches et des Océans, Ottawa, Canada, 21 p.

REYNOLDS, S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **17**, 208-212.

ROTHSCHILD, L. (1950). Counting spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, **26**, 388-395.

SASTRY, A.N. (1963). Reproduction of the Bay Scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of temperature on maturation and spawning. *Biological Bulletin*, **125**, 146-153.

SPURR, A. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*, **26**, 31-43.

STANLEY, J.G., HIDU, H. et S.K. ALLEN. (1984). Growth of american oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*, **37**, 147-155.

TETTELBACH, S.T. et E.W. RHODES. (1981). Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the Northern bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Marine Biology*, **63**, 249-256.

UTTER, F.M., JOHNSON, O.W., THORGAARD, G.H. et P.S. RABINOVITCH. (1983). Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. *Aquaculture*, **35**, 125-135.

VELEZ, A., ALIFA, E. et O. AZUAJE. (1989). Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermaphroditic tropical scallop, *Pecten ziczac*. *Aquaculture*, **84**, 307-313.

WILSON, E.B. (1925). The cell in development and heredity. Macmillan, New York.

YOUNG-LAI, W.W. et D.E. AIKEN. (1986). Biology and culture of the giant scallop, *Placopecten magellanicus*: a review. *Canadian technical report of fisheries and aquatic sciences*, **1478**, 21 p.