

DRV/RA  
Laboratoire d'Aquaculture Tropicale

**Gilles Le Moullac**

Isabelle Vairuha-Lechat

Jean Pierre Bianchini

Jean René Le Coz

Jérôme Tiapari

Frédéric Laure

Yves Mitermite

....

juin 2004 - R.INT.DIR/LA4/

---

Evaluation des besoins en acides gras  
et stérols au cours de l'ovogenèse  
chez l'huître perlière  
*Pinctada margaritifera*



# Reproduction de l'huître perlière : évaluation des besoins en acides gras et stérols au cours de l'ovogenèse chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera*

## Résumé

Cette étude financée par le Ministère de l'Outre-Mer est une collaboration de l'Ifremer avec l'Université de Polynésie Française et l'Institut Louis Malardé. Cette étude a permis l'acquisition de connaissances nouvelles sur la nutrition de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* dans le milieu naturel, et ainsi, de mieux envisager les besoins nutritionnels pendant la reproduction. Les besoins en lipides, acides gras et stérols, ont été spécifiquement étudiés.

La composition en acides gras neutres et polaires des gonades femelles ne subit pas de variations significatives au cours de l'ovogenèse. En revanche, la composition des œufs après la ponte subit des modifications significatives au sein des lipides neutres et polaires. Cependant ces modifications concernent très peu d'acides gras : 3 acides gras neutres et 6 acides gras polaires. Les teneurs en stérols reflètent particulièrement bien l'évolution de l'ovogenèse et cet effet se traduit particulièrement au niveau du cholestérol et du rapport ester de stérols/stérols totaux.

Cette étude fait apparaître des différences spatio-temporelles dans la composition lipidique des œufs. En effet, les œufs obtenus à Vairao et ceux obtenus à Rangiroa ont des différences significatives de la teneur en acides gras neutres et polaires et au sein des stérols. Ces différences résultent probablement de la différence de composition des particules alimentaires filtrées par les huîtres propres à chaque lagon.

Les souches d'algues cultivées en laboratoire au Centre Océanologique du Pacifique ont été analysées pour leur contenu en acides gras et stérols afin d'être en mesure d'élaborer le régime alimentaire, un cocktail d'algues, permettant de fournir les éléments essentiels en terme d'acides gras essentiels et de stérols détectés dans les gonades des huîtres femelles et les œufs.

## Sommaire

<b>1- LE PROJET .....</b>	<b>5</b>
1.1 - RECAPITULATIF DU PROJET .....	5
1.2 - LES PARTENAIRES.....	5
1.3 - LES PHASES DU PROJET .....	6
<b>2 - INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b>3 - LES METHODES.....</b>	<b>9</b>
3.1 - ECHANTILLONNAGE DES TISSUS D'HUITRE PERLIERE, DE L'EAU, DES ALGUES.....	9
3.2 - HISTOLOGIE .....	9
3.3 - ANALYSE BIOCHIMIQUES .....	10
3.3.1 - Poids sec.....	10
3.3.2 - Protéines.....	10
3.3.3 - Lipides .....	10
3.3.4 - Glucides.....	11
3.4 - EXTRACTIONS DES LIPIDES, SEPARATION DES LIPIDES NEUTRES ET POLAIRES .....	11
3.4.1 - Extraction des lipides.....	11
3.4.2 - Séparation des lipides neutres et polaires .....	11
3.4.3 - Contrôle des fractions lipides neutres et polaires en chromatographie en couche mince.....	12
3.5 - DETECTION ET QUANTIFICATION DES ACIDES GRAS NEUTRES ET POLAIRES .....	13
3.5.1 - Transestérification des acides gras .....	13
3.5.2 - La purification des fractions d'esters méthyliques d'acides gras (EMAG).....	13
3.5.3 - L'analyse des EMAG par chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	14
3.6 - DETECTION ET QUANTIFICATION DES ESTERS DE STEROLS ET DES STEROLS LIBRES.....	15
3.6.1 - Séparation des esters de stérols et de stérols libres .....	15
3.6.2 - Transméthylation au méthanolate de sodium.....	16
3.6.3 - Méthode d'analyse en CPG des stérols libres et des esters de stérols transméthylés .....	16
3.6.4 - Résultats des analyses en CPG.....	17
3.7 - NOMENCLATURE .....	18
<b>4 - RESULTATS .....</b>	<b>20</b>
4.1 - ASPECTS DESCRIPTIFS : COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES ORGANES DE L'HUITRE PERLIERE .....	20
4.2 - CINETIQUE DES LIPIDES PENDANT LA GAMETOGENESE.....	21
1.1.1. 4.2.1 - Accumulation des lipides totaux pendant la gamétogénèse .....	21
4.2.2 - Les acides gras pendant l'ovogenèse .....	22
4.2.3 - Les stérols pendant l'ovogenèse .....	27
4.3 - COMPARAISON INTERSITES DE LA QUALITE DES ŒUFS PONDUS .....	28
4.3.1 - Les acides gras .....	28
4.3.2 - Les stérols.....	31
4.4 - COMPARAISON INTERSITE DE LA VALEUR ALIMENTAIRE DU SESTON .....	32
4.4.1 - Les acides gras .....	33
4.4.2 - Les stérols.....	35
4.5 - CARACTERISATION DE LA VALEUR ALIMENTAIRE DES ALGUES CULTIVEES EN LABORATOIRE .....	35
4.5.1 - Les acides gras .....	35

4.5.2 - <i>Les stérols</i> .....	38
<b>5 - DISCUSSION</b> .....	<b>40</b>
<b>6 - CONCLUSION</b> .....	<b>49</b>
<b>7 - BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>50</b>

# 1- Le projet

## 1.1 - Récapitulatif du projet

*Organisme* : Ifremer

*Laboratoire* : Laboratoire d'Aquaculture Tropicale

*Intitulé du Projet* : Reproduction de la nacre : Evaluation des besoins en acides gras et stéroïdes au cours de l'ovogenèse chez la nacre *Pinctada margaritifera*

*Description sommaire du projet* :

L'objectif de ce projet est de caractériser les profils lipidiques en terme d'acides gras et de stéroïdes dans la gonade pendant l'ovogenèse et dans la fraction particulaire présente dans le lagon. L'ovogenèse sera caractérisée histologiquement. Ces résultats permettront de déterminer l'évolution des besoins nutritionnels en terme de qualité de lipides sur la durée de l'ovogenèse. Ce travail, complété par l'étude de la composition des microalgues cultivées en salle à l'Ifremer (Tahiti), devra permettre de définir un régime algal de conditionnement, nécessaire à la reproduction contrôlée des huîtres perlières en éclosérie.

*Inscription du projet dans la politique régionale de la recherche* :

Trois des Instituts de recherche présents sur le territoire de Polynésie française (Ifremer, Malardé et Université) collaborent pour contribuer à améliorer les conditions de contrôle de la reproduction de la nacre nécessaire à tout programme d'amélioration génétique. Les complémentarités entre les instituts locaux sont recherchées.

## 1.2 – Les partenaires

Ifremer : Laboratoire d'Aquaculture Tropicale, Centre Océanologique du Pacifique (Gilles Le Moullac, Jérôme Tiapari)

Ifremer, Laboratoire de physiologie des invertébrés, Brest (Jean René Le Coz)

Institut Louis Malardé, laboratoire des plantes aromatiques et des substances naturelles (Isabelle Lechat)

Université de Polynésie française, laboratoire de chimie analytique appliquée (Jean Pierre Bianchini, Frédéric Laure)

Service de la Perliculture, antenne de Rangiroa (Mereani Bellais)

## **1.3 - Les phases du projet**

Phase 1 : Transfert des techniques de quantification et de détection des acides gras et stérols chez les invertébrés marins

Phase 2 : Echantillonnage et analyses des lipides des huîtres perlières, du seston et des algues de cultures

Phase 3 : interprétation et rédaction

## 2 – Introduction

La rapide expansion de la perliculture (CA = 1,2 milliard de Francs en ) a favorisé le développement d'un millier de fermes perlières en Polynésie Française dans une trentaine d'atolls. La filière d'élevage de l'huître perlière s'appuie sur le collectage de larves présentes dans le milieu naturel. Si cette technique a été à l'origine du développement de la perliculture et de sa rapide croissance, elle montre maintenant ses limites. La perliculture s'est étendue à des atolls sans collectage (stocks de géniteurs restreints ou inexistant) induisant de fait des importations d'huîtres d'autres lagons. Un marché du naissain s'est mis en place sollicitant chaque année des atolls différents en fonction du succès du collectage. L'approvisionnement en naissain devient donc un problème pour le développement de la filière du fait des prix élevés et du coûts de transport entre atolls. Les échanges de d'huîtres entre atolls ont conduit à la dissémination d'une anémone colonisant les élevages et augmentant les coûts de production induit par le nettoyage fréquent des installations. Le transfert d'huîtres entre atoll génère d'une part des risques zoonosaires et d'autre part, induit une perte de la variabilité génétique des populations locales par un brassage trop important. Afin de proposer aux professionnels de la filière perlicole du naissain de qualité de manière régulière tout en protégeant les ressources naturel, il apparaît que la production en éclosion est la solution la mieux adaptée.

L'éclosion Territoriale de Rangiroa a d'ores et déjà mis en place des structures afin de maîtriser la reproduction de la nacre. Cependant le niveau des connaissances et de maîtrise zootechnique reste insuffisant. La maîtrise de ces techniques passe par une compréhension des mécanismes physiologiques de la reproduction. En outre, la maîtrise de la reproduction, indispensable à tout programme de reproduction en captivité nécessite la connaissance des besoins nutritionnels tant quantitatifs que qualitatifs. .

L'aspect quantitatif de l'alimentation des huîtres perlières a été approché par l'étude des modalités adaptatives de la nutrition permettant d'optimiser la capture des particules dans un système oligotrophe (Pouvreau et al, 1999, Pouvreau et al, 2000a). L'aspect qualitatif a été abordé dans le milieu naturel par la caractérisation des algues unicellulaires contenu dans le seston (Delesalle et al., 2001) et en terme de sélection des particules ingérées par la taille (Loret et al., 2000). Par ailleurs, le régime alimentaire des nacres dans le milieu naturel permet la gamétogenèse pendant une grande partie de l'année (Thielley, 1993, Pouvreau et al., 2000b) avec cependant un asynchronisme assez important, la durée de la gamétogenèse étant de l'ordre de 1 à 2 mois (Pouvreau et al., 2000b).

La gamétogenèse est plus exigeante chez les femelles en terme de qualité des nutriments que chez les mâles. Les lipides présents dans l'alimentation affectent principalement la composition des oeufs. Les lipides déposés dans les ovocytes durant le conditionnement des géniteurs jouent un rôle majeur comme source énergétique durant l'embryogenèse et les premiers stades de développement des larves (Soudant et al., 1999). Les mollusques marins doivent trouver dans le milieu les acides gras polyinsaturés et les stérols qu'ils ne peuvent biosynthétiser. Parmi ces molécules se trouvent des précurseurs de impliqués dans de nombreuses régulations membranaires et métaboliques. Les besoins qualitatifs en molécules essentielles peuvent être estimés à partir de la composition des fractions des lipides neutres et de certaines fractions de lipides polaires des gonades des huîtres issues du milieu naturel.

L'objectif de cette étude est de déterminer la qualité en acides gras et stérols des membranes et des réserves des gonades et les œufs des huîtres perlières élevées à Rangiroa. La démarche proposée pour l'évaluation des besoins lipidiques pendant l'ovogenèse est axée sur l'analyse des fractions polaires et neutres des lipides des gonades des femelles. Puisque l'ovogenèse est un processus continu entre le début de la maturation et la ponte, les femelles échantillonnées sont classées selon le degré d'évolution de leur gonade décrit histologiquement et traduit par un indice de maturation (Pouvreau et al, 2000). Ceci permet de déterminer si des changements de tout ou partie des composés des fractions neutres et polaires interviennent dans la gonade pendant la maturation. Enfin pour être en mesure de composer un régime alimentaire composé d'algues unicellulaires cultivées en laboratoire, il est apparu utile de procéder à l'analyse de différentes espèces afin d'être en mesure de restituer les éléments indispensables à des huîtres conditionnées en laboratoire.



## 3 - Les méthodes

### 3.1 - Echantillonnage des tissus d'huître perlière, de l'eau, des algues

Les huîtres perlières sont ouvertes, sexées par biospsie dans la gonade. Seules les femelles sont retenues. Un indice macroscopique de maturation est attribué (Chabirand et Tiapari, 1993). Le manteau, les branchies et le muscle et la masse viscérale sont disséqués. La masse viscérale est isolée. Un morceau de gonade est prélevé et placé immédiatement dans un flacon contenant 3 mL de liquide de Folch (chloroforme : méthanol, 2 :1) et stocké au congélateur. Le reste de la masse viscérale est fixé pour 48 heures dans le liquide de Davidson pour l'analyse histologique de la gonade pour définir le stade de maturation. Les stades de développement des gonades sont attribués selon l'échelle établie par Pouvreau (1999) pour l'huître perlière.

Afin de caractériser les lipides contenus dans la matière particulaire filtrée par les huîtres perlières, un volume connu d'eau de mer est filtré sur filtre Whatmann GF/C (diamètre 47mm et de porosité nominale 1.2  $\mu\text{m}$ ). Le filtre est préalablement brûlé à 450°C. Le filtre saturé de matière particulaire est rincé à l'acétate d'ammonium puis placé dans un flacon contenant du liquide de Folch et stocké à -20°C.

Les algues sont récupérées en phase exponentielle de leur croissance. Environ 50 ml sont filtrés sur GFC préalablement brûlé à 450°C. Le filtre est ensuite rincé à l'acétate d'ammonium puis placé dans un flacon contenant du liquide de Folch et stocké à -20°C.

### 3.2 - Histologie

Les stades de développement des gonades sont attribués selon l'échelle de Pouvreau (1999). Chez les femelles, la maturation évolue avec l'augmentation de volume des tubules qui deviennent plus ronds et avec la diminution de la proportion de tissu conjonctif. Un ovocyte mature est plutôt de forme polygonale et ses parois sont renflées vers l'extérieur. Si celles-ci ont tendance à s'affaïsser vers l'intérieur on qualifie les ovocytes d'atrétiques.

Une échelle qualitative de 0 à 5 permet de classer les échantillons en fonction du remplissage de la gonade et de l'évolution des ovocytes.

1 – début de la gamétogenèse, les gonies prolifèrent

2 – en développement : les tubules sont visibles, les ovocytes augmentent en taille et en nombre. Le nombre d'ovocytes matures augmente alors que le tissu conjonctif diminue.

3 - développement avancé : les tubules sont volumineux, de forme ovoïde ou ronde, on n'observe presque plus de tissu conjonctif.

4 - mûr : l'ovaire mûr se caractérise par la présence de tubules distendus remplis par des ovocytes mûrs de forme polygonale, avec peu ou pas de tissu conjonctif.

### **3.3 – Analyse biochimiques**

Cet aspect est développé afin de présenter une description par organe de la composition biochimique des huîtres perlières en âge de se reproduire.

#### **3.3.1 - Poids sec**

Les huîtres perlières sont ouvertes à l'aide d'un écarteur. Les organes sont disséqués : le manteau, le muscle adducteur, la masse viscérale qui comprend la glande digestive, la gonade et le muscle rétracteur. Les différentes parties sont congelées pendant une nuit puis lyophilisées pendant 72 heures. Afin de connaître la masse de la gonade, la masse viscérale lyophilisée est coupée en deux au niveau de la glande digestive, la glande digestive est grattée à l'aide d'un scalpel (et récupérée dans un tube) et le muscle rétracteur est enlevé. Chaque organe est ensuite pesé.

#### **3.3.2 - Protéines**

La méthode de Lowry permet de doser les liaisons amides des protéines et les acides aminés tyrosine et tryptophane. Cette méthode (10 fois plus sensible que le biuret) se caractérise par la formation d'un complexe cuivrique des protéines qui réduit le phosphomolybdate en milieu basique (apparition d'une coloration bleu violacé). La lecture de la densité optique est réalisée à 750nm. La gamme étalon est réalisée à partir d'albumine de bœuf. (Lowry et al., 1951).

#### **3.3.3 - Lipides**

L'extraction des lipides contenus dans les tissus est réalisée à froid dans un mélange de méthanol chloroforme en proportion (1:2) tel que l'adjonction d'eau permet de séparer deux phases dont la partie chloroforme contient tous les lipides et le mélange eau méthanol toute la partie non lipidique. L'extrait lipidique est obtenu par évaporation du chloroforme. L'hydrolyse à chaud des acides gras par l'acide sulfurique concentré révèle une coloration brune. La lecture de la densité optique s'effectue à 360 nm après dilution dans de l'eau distillée (2:5). Une gamme étalon de référence est réalisée à partir de tripalmitate. (Bligh and Dyer, 1959 et Marsh and Wenstein, 1966).

### 3.3.4 - Glucides

En présence d'un acide fort les pentoses donnent du furfural et les hexoses du 5 hydroxymethyl furfural. Les furfurals ainsi obtenus se combinent avec le phénol pour donner un complexe coloré rouge brun. L'absorbance est alors lue à 490 nm contre une gamme étalon réalisée à partir d'une solution mère de glucose (Dubois, 1956).

Mode opératoire: Dans chaque tube à essai, introduire 200µl d'eau distillée ou de solution étalon ou de solution à doser, 200µl de la solution phénolique 5%, 1ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Homogénéiser le mélange en le portant au bain-marie à 100°C pendant 5mn. Refroidir 30 mn à l'obscurité. Lire les densités optiques à la longueur d'onde 480 nm.

## 3.4 - Extractions des lipides, séparation des lipides neutres et polaires

Toute la verrerie (flacon, tubes, pipettes pasteurs) utilisée au cours des différentes étapes d'extraction et de séparation des lipides est brûlée à 450°C au four pendant au moins 4 heures ou traitée à l'acétone.

### 3.4.1 – Extraction des lipides

Broyer au Potter, préalablement calibré à 6 ml), finir l'homogénéisation au sonicateur, ajuster à 6 ml, transférer dans un tube propre (préalablement brûler à 450°C), centrifuger 5 mn à 1500 rpm (4°C), transférer le surnageant dans un tube propre, gonfler à l'azote, fermer, conserver à -20°C, diviser en aliquotes de 2 ml

### 3.4.2 – Séparation des lipides neutres et polaires

La séparation des lipides neutres et polaires est réalisée sur une microcolonne garnie de silice. La silice est préparée dans un ballon en verre, brûler une nuit à 450°C, additionner de l'eau MilliQ (6% d'eau) et homogénéiser en agitant par rotation pendant une nuit. La microcolonne est une pipette pasteur dans laquelle est placé un morceau de laine de verre et remplie de silice à hauteur de 3 cm. Un entonnoir en verre est connecté à la pipette pasteur par du tube Téflon bien ajusté à l'entonnoir et à la pipette pasteur. Plusieurs microcolonnes peuvent être simultanément mises en œuvre en les plaçant sur un portoir spécialement conçu. Utiliser des flacons droits d'une contenance < 20 ml à fond plat et à col avec pas de vis et bouchon à fond téflonné. (H 7.5 cm et Ø 2.4)

Reprendre les extraits conservés sous azote à  $-20^{\circ}\text{C}$ , évaporer au bain-marie à sec sous azote, reprendre l'échantillon dans  $3 \times 500 \mu\text{L}$  de chloroforme/MeOH (98/2), déposer en tête de ( $3 \times 500 \mu\text{L}$ ), élution des lipides neutres avec 10 ml de chloroforme/MeOH (98/2) : fraction A, rincer le tube avec  $500 \mu\text{L}$  de MeOH et déposer sur la colonne, éluer les lipides polaires avec 10 ml de MeOH : fraction C. Les fractions sont recueillies dans des tubes auxquels on rajoute 2, 3  $\mu\text{g}$  de C23.

### 3.4.3 – Contrôle des fractions lipides neutres et polaires en chromatographie en couche mince

Les solvants doivent être préparés extemporanément :

POLAIRE	1 plaque	4 plaques
acétate de méthyle	20 ml	40 ml
isopropanol	20 ml	40 ml
chloroforme	20 ml	40 ml
méthanol	8 ml	16 ml
KCl 0.25 %	7.2 ml	14.4 ml
NEUTRE	1 plaque	2 plaques
hexane	60 ml	120 ml
diéthyléther	15 ml	40 ml
acide acétique	1.5 ml	4 ml

**Préparation des plaques** : régler un four à  $160^{\circ}\text{C}$ , on utilise une plaque silicagel 60F 254 activé avec un mélange hexane-diéthyléther (30 ml : 30 ml). Le solvant migre jusqu'en haut de la plaque et on laisse encore 10 minutes. Le bord de la plaque est gratté : le silicagel est enlevé sur environ 0,5 cm de largeur, puis la plaque est séchée environ 5 minutes. La plaque est ensuite activée au four à  $160^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes. Les points de dépôts sont marqués à partir de 1,5 cm du bord gauche et 1 cm du bord inférieur de la plaque, chaque spot est espacé d'au moins 1 cm.

**Dépôt des échantillons** : Les dépôts de 2 à 5  $\mu\text{L}$  sont faits avec une seringue de 5  $\mu\text{L}$ . La seringue est lavée avant et après le dépôt et entre chaque échantillon avec un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1)

**Développement** : La plaque est placée bien droite dans la cuve contenant le solvant. Pour un double développement : 1<sup>er</sup> développement dans le système polaire : laisser migrer jusqu'au

milieu de la plaque, sécher pendant *10 mn*, 2<sup>ème</sup> développement dans le système neutre : laisser migrer jusqu'à 0.5 cm du haut de la plaque, sécher pendant *10 min*

**Carbonisation** : La plaque est plongée pendant 30 secondes dans une cuve contenant une solution d'acétate de cuivre 3 % (M/V) et d'acide orthophosphorique 8 % (V/V). La plaque est égouttée sur du papier, puis elle est placée sur une feuille de papier aluminium et mise au four à 160°C pendant 20 minutes. La plaque est enfin sortie puis refroidie sur la paille. Le résultat chromatographique est scanné.

## 3.5 - Détection et quantification des acides gras neutres et polaires

### 3.5.1 – Transestérification des acides gras

La moitié ou la totalité des fractions LN et LP est évaporée à sec dans un tube Wheaton de 8 ml. On ajoute 1 ml de BF<sub>3</sub>-méthanol (14%) puis le tout est chauffé 10 mn à 95-100°C. Le chauffage à 100° au bain-marie 10 mn (eau bouillante) active la réaction d'estérification. Après refroidissement, l'arrêt de la réaction d'estérification se fait par ajout de 1ml d'eau et 1 ml d'hexane. On agite vigoureusement au moins 2 mn. Après agitation du mélange, on laisse décanter puis on centrifuge à 1000-2000 t/mn pendant 5 mn. La phase aqueuse inférieure est éliminée par aspiration à l'aide d'une pipette pasteur et on lave la phase organique restante par 1ml d'eau. Après agitation vigoureuse au moins 2 mn, le flacon est centrifugé à 1000-2000 t/mn pendant 5 mn. Un stockage à -20°C pendant la nuit provoque la congélation de la phase aqueuse inférieure. Le lendemain on récupère rapidement (avant la fonte de la glace) la phase hexanique supérieure que l'on transfère dans un tube «chromacol». Les esters méthyliques d'acides gras sont alors purifiés par HPLC.

### 3.5.2 - La purification des fractions d'esters méthyliques d'acides gras (EMAG)

Cette purification se fait par Chromatographie en Phase Liquide (CPL) : Pompes Waters 600 avec détecteur à barrettes de diodes PDA-996 et dégazeur en ligne. Le chromatographe est piloté par un ordinateur DELL à l'aide du logiciel de pilotage et traitement de données de chromatographie Millénium<sup>32</sup>. Elle est basée sur l'utilisation de 2 colonnes de caractéristiques différentes montées en série : une colonne silice greffée OH (Lichrosorb DIOL Merck) et une colonne Silice classique (Lichrospher Merck), et d'une phase mobile binaire composée d'un

solvant A (Hexane) et d'un solvant B (Hexane-Isopropanol, 90:10 v/v) à un débit de 1 ml/min. On installe en série des colonnes Interchim 25cm, 4 mm, 4 $\mu$ m phase lichrosorb diol et Interchim Si100 lichrospher et une boucle Valco/Rheodine de 200 $\mu$ l. Le cycle de gradient fait à vide présente sensiblement les mêmes caractéristiques qu'à Brest. Après concentration de l'extrait et reprise dans 100 $\mu$ l d'Hexane, on injecte dans la boucle puis on lave le tube par 50 $\mu$ l d'Hexane que l'on ajoute à l'injection.

La programmation de la séparation est la suivante

Temps en mn	Solvant A	Solvant B
0.1	100	0
0.2	85	15
3.9	85	15
4.0	50	50
8.9	50	50
9.0	100	0
35	100	0
Arrêt du débit		

Le chromatogramme obtenu donne les mêmes caractéristiques qu'à Brest, trois fractions sont collectées. La fraction collectée de 6.5 à 13.5 mn contient les Esters Méthyliques d'Acides Gras (EMAG). L'analyse des fractions collectées de 4.5 à 6.5 et 13.5 à 17 montre que tous les EMAG sont collectés dans la fraction 6.5-13.5. Ces trois fractions sont vérifiées en GC : la fraction 6.5-13.5 mn renferme les esters d'acides gras essentiels et l'étalon interne. La dernière fraction récoltée de 13.5 à 17 mn ne contient plus d'esters d'acides gras.

### 3.5.3 – L'analyse des EMAG par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

L'analyse des EMAGs est réalisée par un chromatographie CPG VARIAN 3800 équipé d'un injecteur automatique d'échantillons 8200, piloté par ordinateur DELL et logiciel de chromatographie STAR 5. Après montage d'une colonne capillaire DB WAX (30m x 0,32 mm de diamètre) avec une précolonne de 2.5m désactivée et de diamètre interne 0,32 mm, les injections se font en mode splitless. Un inlet de verre est installé spécialement en vue de cette configuration. Les extraits sont injectés grâce à un injecteur automatique d'échantillons 8200 Varian Autosampler. Les conditions de gradient et de débit de gaz définies sont quasiment équivalentes à celles de l'IFREMER : gaz vecteur He, débit de 2 ml/mn à débit constant; Injecteur 1079 split/splitless 240°C pendant 50,05 mn ; détecteur à ionisation de flamme FID 280°C ; four colonne température initiale 49°C pendant 2 mn, puis gradient de température 50°C

/mn jusqu'à 160°C, 1°C/mn jusqu'à 170°C, 2°C/mn jusqu'à 185°C, 3°C/mn jusqu'à 240°C et plateau de température à 240°C pendant 10mn, soit un cycle total d'élution d'une durée 50,05 mn.

Sur 136 fractions chromatographiques analysées seules 60 fractions ont révélé des quantités suffisantes d'esters à quantifier. En outre les analyses chromatographiques ont montré une teneur insuffisante en tridécanoate de méthyle, mettant en évidence la trop faible teneur en étalon interne C23 : 0 ajoutée lors des extractions réalisées par l'équipe du COP de Vairao. La quantification des esters méthyliques selon la méthode d'étalonnage interne étant impossible à réaliser, nous avons dû alors reprendre tous les échantillons auxquels nous avons rajouté des quantités définies de tridécanoate de méthyle afin d'effectuer les quantifications par étalonnage externe. Les échantillons contenant de l'étalon tridécanoate en quantité adéquate ont été réinjectés et ont permis de quantifier les teneurs en µg de 71 acides gras dans chacun des 60 échantillons lipidiques étudiés.

## **3.6 - Détection et quantification des esters de stérols et des stérols libres**

### **3.6.1 – Séparation des esters de stérols et de stérols libres**

La fraction des lipides neutres fournie par l'Ifremer est évaporée à sec. La fraction est reprise dans 250 µL d'Hexane (150 + 2 x 50 de rinçage) puis injectée en HPLC (boucle de 450 µL) sur une colonne Lichrosorb 5 diol Interchim de 25 cm. Eluant utilisé : mélange isocratique Hexane / isopropanol (97 : 3) ; débit : 1mL/min Collecte des fractions :

- Esters + EMAG + TG : collectés de 1 à 4,5 min
- Stérols libres + AGL + DG + MG : collectés de 4,5 à 9 min
- Diols (pavlovols) : collectés de 9 à 13 min

Remarque : le temps correspondant à la fin de la fraction 1 et au début de la fraction 2 a été légèrement modifié (4,5 minutes au lieu de 5 minutes) après l'HPLC avec détection DDL des molécules de référence suivantes : ester de cholestérol, cholestérol, stigmastérol, bêta-sitostérol.

La colonne est rincée pendant 6 minutes avec un mélange Hexane / isopropanol (9 : 1) puis équilibrée pendant 10 minutes avec le mélange de séparation (97 : 3).

Etalonnage en vue d'analyse quantitative en CPG : on ajoute dans les deux premières fractions 2,3 µg de cholestane (5 µL à 0.46 µg/µl), et on réunit les fractions 2 et 3 : deux

analyses seront faites en CPG : esters de stérols transméthylés (fraction 1) et stérols libres (fractions 2+3). La fraction des stérols libres est évaporée à sec, puis reprise dans 80  $\mu$ L de toluène en vue de son analyse en CPG.

### 3.6.2 – Transméthylation au méthanolate de sodium

La fraction ester de stérols est évaporée à sec. On ajoute 2 ml de MeONa (0,5 M dans le MeOH) et on laisse sous agitation pendant 2h00. On ajoute ensuite 1,5 ml d'eau distillée et on extrait avec 1,5 ml d'Hexane. On centrifuge et on élimine la phase aqueuse. On lave ensuite la phase organique avec 2 x 2 ml d'eau (jusqu'à obtenir un pH de 7), toujours en utilisant la centrifugation, et en congelant l'échantillon pour mieux séparer les deux phases. On récupère la phase organique, que l'on évapore à sec. Cette phase organique est reprise dans 80  $\mu$ L de toluène.

### 3.6.3 – Méthode d'analyse en CPG des stérols libres et des esters de stérols transméthylés

La colonne capillaire utilisée est une Restek RTX-65 de 15 m de longueur, de 0,25 mm de diamètre externe, et dont la phase a une épaisseur de 0,25  $\mu$ m ; elle est munie d'une précolonne. Le détecteur est un FID chauffé à 250°C. L'injecteur de type 'split à simple rétrécissement' est chauffé à 250°C. La pression d'hélium dans la colonne est fixée à 100 kPa. La fuite à l'injecteur est fixée 75 ml par minute, et celle du septum à 2 ml par minute.

Injection : 1 à 2  $\mu$ L des 80  $\mu$ L contenus dans le vial. (suivant la concentration en stérols de l'échantillon)

Paramètres splitless : vanne de purge fermée durant la première minute d'injection, puis ouverte jusqu'à la fin de l'analyse.

Gradient de température :

- 90°C pendant 2 min
- de 90°C à 170°C à 49.9°C/min
- 170°C pendant 1 min
- de 170°C à 260°C à 5°C/min
- de 260°C à 280°C à 2°C/min
- 280°C pendant 5 min

Temps total d'analyse : 37.6 min Temps de stabilisation entre chaque analyse : 5 minutes.



La déviation de la ligne de base due au gradient de température est enregistrée et soustraite au signal pour faciliter les intégrations des pics. La méthode initiale a été quelque peu modifiée, notamment car on ne disposait pas d'injecteur de type « on column ». Pour améliorer la sensibilité, on utilise une méthode d'injection « splitless », qui nécessite que l'échantillon soit dissout dans le toluène et que la température initiale du four soit de 90 °C. (Température d'ébullition du toluène : 111°C). Des essais avec comme gaz vecteur l'azote ont été effectués, mais la séparation était moins bonne qu'avec l'hélium, qui a donc été préféré. Une précolonne a été ajoutée pour améliorer la séparation et éviter d'encrasser la colonne. Plusieurs pressions de gaz vecteur ont été envisagées. On a finalement fixé cette pression à 100 kPa. Avec cette nouvelle méthode, le temps de rétention de l'étalon interne (cholestane) est de 22,0 min au lieu de 14,2 min. La zone de sortie des stérols se situe désormais entre 28 min et 36 min environ. (au lieu de 18 min à 26 min environ)

### 3.6.4 - Résultats des analyses en CPG

L'attribution des pics correspondants aux stérols principaux contenus dans les échantillons se fait à l'aide de la table de calibration suivante, établie grâce aux deux intercalibrations préliminaires effectuées conjointement avec l'Ifremer de Brest, et grâce à l'analyse de trois molécules de référence : le cholestérol, le stigmastérol et le bêta-sitostérol : (les temps de rétention peuvent fluctuer de +/- 0.2 minute)

- Etalon interne : Cholestane : 22.0 minutes
- Cis-déhydro-cholestérol : 28.1 minutes
- Trans-déhydro-cholestérol : 28.4 minutes
- Cholestérol : 28.9 minutes
- Brassicastérol : 30.0 minutes
- Desmostérol : 30.9 minutes
- Campesterol : 31.4 minutes
- 24-Méthylène-cholestérol : 31.7 minutes
- Stigmastérol : 32.1 minutes
- Méthyl-Poriférostérol : 32.5 minutes
- Béta-Sitostérol : 33.0 minutes
- Fucostérol : 33.7 minutes
- Iso-Fucostérol : 34.1 minutes
- Méthyl-Pavlovol : 34.9 minutes

- Ethyl-Pavlovol : 36.0 minutes

### 3.7 – Nomenclature

Pour la suite de cette étude, des noms simplifiés pour les acides gras et stérols ont été utilisés :

#### Nomenclature des acides gras :

Les acides gras sont nommés en utilisant le nombre de carbones, le nombre de doubles liaisons, l'emplacement de la première double liaison comptée à partir du méthyl terminal. Ainsi, 22 : 6 (n-3) est un acide gras à 22 carbones avec 6 doubles liaisons, la première étant à 3 carbones du méthyl terminal.

On distingue dans les insaturés plusieurs acides gras essentiels pour la croissance et la reproduction des mollusques :

22 :6 (n-3) = DHA, docosahexaénoic acid

20 :5 (n-3) = EPA, eicosapentaénoic acid

20 :4 (n-6) = ARA, arachidonic acid.

On trouve également les NMI (non méthyl interrupted) identifiés comme 20 : 2 et 22 : 2 avec le suffixe i pour des doubles liaisons en 5,11 pour les 20 et 7,13 pour les 22 et avec le suffixe j pour des doubles liaisons en 5,13 pour les 20 et 7,15 pour les 22.

Une autre catégorie est appelée DMA pour diméthylacétal provenant de la transméthylation des plasmalogènes.

Les stérols sont nommés par leurs noms simplifiés suivant le tableau :

#### Nomenclature des stérols (nom trivial et nom systématique)

1: Norcholestérol= 22-trans-24-5, 22-dien-3 $\beta$ -ol ;

2: c-déhydrocholestérol= 22-cis-cholesta-5,22dien-3 $\beta$ -ol ;

3: t-déhydrocholestérol= 22-trans-cholesta-5,22dien-3 $\beta$ -ol;

4: Dihydrocholestérol= Cholesta-3 $\beta$ -ol

5: Cholestérol= Cholesta-5-en-3 $\beta$ -ol ;

6: Brassicastérol= 24 $\beta$ -methylcholesta-5, 22-dien-3 $\beta$ -ol ;

7: Desmostérol= Cholesta-5, 24dien-3 $\beta$ -ol ;

8: Campestérol= 24 $\alpha$ -methylcholesta-5-en-3 $\beta$ -ol ;

9: 24-méthylènecholestérol= 24 $\beta$ -méthylènecholesta-5, 24(28)- dien-3 $\beta$ -ol;

**10:** Stigmastérol= 24 $\beta$ -ethylcholesta-5, 22-dien-3 $\beta$ -ol ;

**11:** 4 $\alpha$ -méthyl poriférostérol= 4- $\alpha$ -methyl-24- $\alpha$ -ethylcholesta-22-en-3 $\beta$ -ol ;

**12:**  $\beta$ -sitostérol= 24 $\beta$ -ethylcholesta-5-en-3 $\beta$ -ol ;

**13:** Fucostérol= 24 $\beta$ -ethylcholesta-5,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol

**14 :** Méthylpavlovol : 4 $\alpha$ , 24 $\beta$ -dimethylcholestan-3 $\beta$ , 4 $\beta$ -diol

**15 :** Ethylpavlovol : 4 $\alpha$ -methyl-24 $\beta$ -ethylcholestan-3 $\beta$ , 4 $\beta$ -diol

De plus, a été rajouté pour cette étude, l'isofucostérol qui se différencie du Fucostérol par un temps de rétention différent mais qui présente un spectre de masse identique avec le fragment caractéristique à 314 correspondant à un réarrangement de Mac Lafferty sur la double liaison en C24. Le Fucostérol est identifié par le temps de rétention de celui du commerce (sigma F5379).

## 4 - Résultats

### 4.1 - Aspects descriptifs : composition biochimique des organes de l'huître perlière

La figure ci-dessous montre la proportion moyenne de chaque organe dans l'huître perlière dans une gamme d'huîtres entre 120 et 150 mm de hauteur extérieure. C'est le muscle qui est l'organe le plus important, suivi du manteau. La glande digestive est l'organe le plus petit.

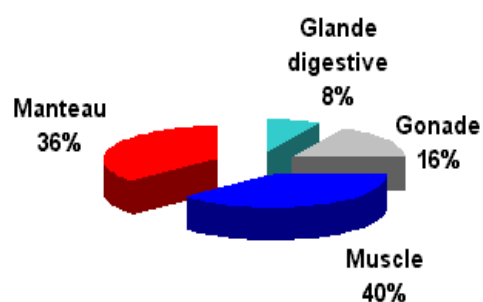


Figure 1 : Importance moyenne de chaque organe chez une huître perlière adulte (n=29)

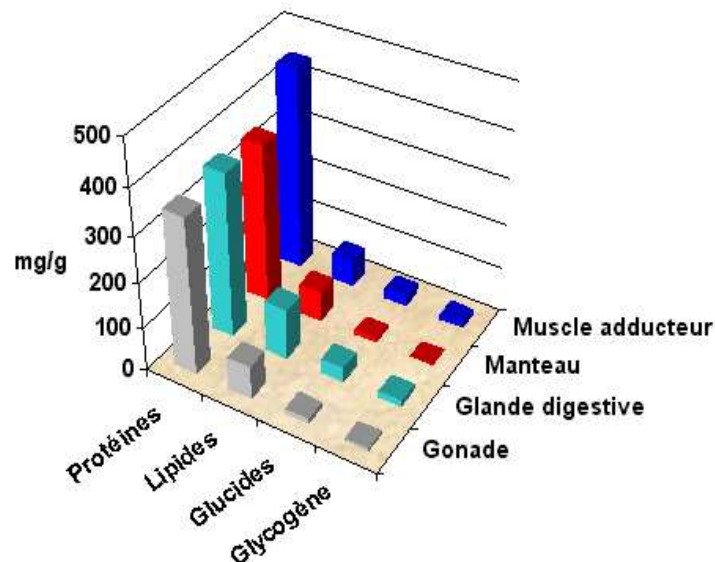


Figure 2 : Composition proximale moyenne de chaque organe d'une huître perlière adulte (n=29)

Les protéines apparaissent comme le constituant le plus concentré dans tous les tissus et en particulier dans le muscle. Puis les lipides occupent la seconde place, et c'est dans la glande digestive que ce constituant est le plus concentré. Les glucides et en particulier le glycogène sont

particulièrement concentrés dans la glande digestive. Les organes par leur masse peuvent constituer des sites de stockage des constituants biochimiques, ceci apparaît particulièrement pour les glucides dans le muscle et pour les lipides dans le manteau. Cependant c'est dans la glande digestive que l'on retrouve la plus grande concentration de lipide et de glycogène. La gonade est le second site de stockage des lipides.

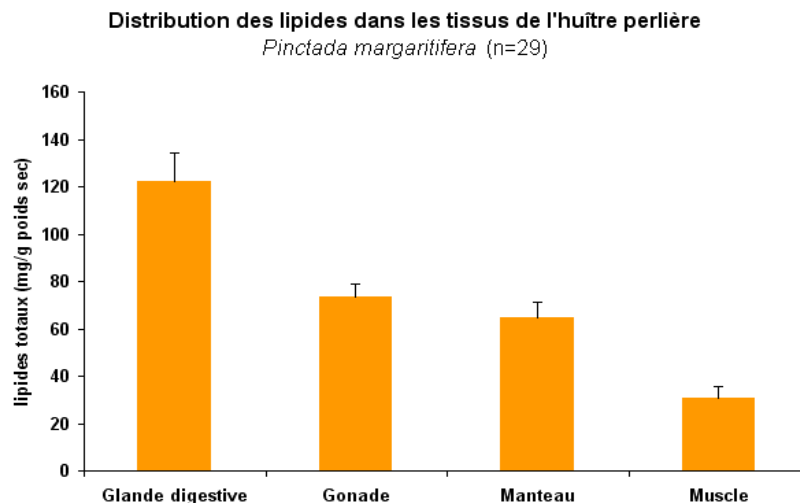


Figure 3 : Teneur en lipides totaux de chaque organe de l'huître perlière (n=29)

## 4.2 - Cinétique des lipides pendant la gamétogénèse

### 1.1.1. 4.2.1 - Accumulation des lipides totaux pendant la gamétogénèse

L'augmentation de poids de la gonade pendant la gamétogénèse s'accompagne de l'accumulation de lipides (figure 5). L'accumulation est plus importante chez les femelles que chez les mâles (Soudant, 1995). Ceci suggère que les groupes de points situés au-dessus de la courbe de tendance de la figure 5 caractérisent des femelles et les points situés au-dessous désigneraient des mâles.

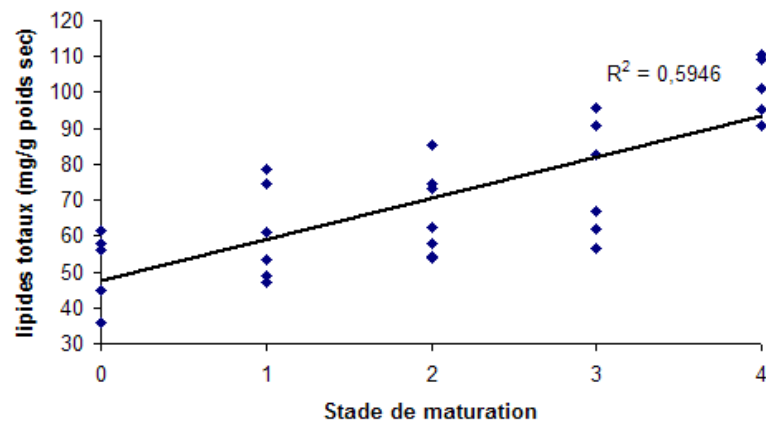


Figure 5 : Accumulation des lipides totaux pendant la gamétogénèse dans la gonade de l'huître perlière

## 4.2.2 - Les acides gras pendant l'ovogenèse

### *Les acides gras des lipides neutres*

Les proportions des différentes catégories d'acides gras neutres varient peu au cours de l'ovogenèse qui décrite par les stades de maturations. En revanche, les ovocytes ont un profil différent, particulièrement au niveau des polyinsaturés qui dans leur ensemble sont moins représentés que dans la gonade (45,8% contre >50% dans la gonade). Le ratio (n-3)/(n-6) est plus faible dans les ovocytes que dans la gonade, il en est de même pour le ratio 22:6/20:5 (n-3) représentant le DHA et l'EPA, (tableau 1).

Tableau 1 : Accumulation des catégories d'acides gras neutres dans la gonade pendant l'ovogenèse

Stade maturation	1	2	3	4	ovocytes
DIV.	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1
TO. BR.	1,4	0,6	1,2	1,1	4,2
TO.SAT.	24,0	37,1	37,5	35,7	36,0
TO.DMA	0,6	0,1	0,4	1,4	1,7
TO.MONO	11,6	10,5	10,1	10,0	12,2
TO. (n-9)	4,3	4,9	4,8	5,3	5,8
TO. (n-7)	3,6	4,1	3,8	3,5	2,7
TO.POLY	53,1	51,6	50,8	51,8	45,8
TO. (n-4)	1,3	0,4	0,4	0,8	0,8
TO. (n-6)	6,5	5,6	5,7	7,2	8,6
TO. (n-3)	43,2	44,3	43,2	41,9	31,8
TO. NMI	2,0	1,2	1,5	1,6	4,4
(n-3)/(n-6)	6,8	7,9	7,7	6,1	3,8
22:6/20:5 (n-3)	7,7	7,7	7,6	7,0	5,2
22:5/20:4 (n-6)	0,7	0,6	0,7	0,6	0,4

TO = total

L'analyse statistique des proportions d'acides gras neutres de chaque fraction est réalisée (tableau 2) montrant ainsi les variations de quelques composés au cours de l'ovogenèse et dans les ovocytes. Les changements majeurs interviennent spécifiquement au moment de la ponte. Dans la catégorie des monoinsaturés, les 20:1(n-11) et 20:1(n-9) augmentent aussi significativement dans les ovocytes ( $P < 1\%$ ,  $P < 5\%$ ). Les teneurs en acides gras essentiels, l'acide arachidonique (ARA) 20:4(n-6), l'EPA 20:5(n-3) ne changent pas significativement au cours de l'ovogenèse et dans les ovocytes. En revanche, il apparaît que la teneur en DHA 22:6(n-3) baisse significativement dans les ovocytes ( $P < 1\%$ ).

Tableau 2 : Liste simplifiée de la composition en acides gras neutres dans la gonade femelle pendant l'ovogenèse en milieu naturel et dans les ovocytes pondus. Les résultats sont exprimés en pourcentage du total des acides gras de la fraction.

Stade	1		2		3		4		ovocytes	
	moy.	écarty pe	moy.	écarty pe	moy.	écarty pe	moy.	écarty pe	moy.	écarty pe
réplicats	4		5		5		5		3	
<b>14:0</b>	4,6	1,0	5,3	0,8	5,8	0,7	4,9	1,4	8,3	0,9
<b>15:0</b>	0,8	0,1	0,9	0,0	0,9	0,1	0,5	0,5	0,9	0,5
<b>16:0</b>	21,5	4,2	23,0	2,7	22,3	1,7	19,0	5,8	27,0	7,2
<b>17:0</b>	2,0	0,2	2,1	0,2	2,1	0,3	1,6	0,6	3,0	1,3
<b>18:0</b>	4,9	0,2	5,5	0,3	5,5	0,7	4,6	1,8	5,5	3,8
<b>16:1(n-9)</b>	0,1	0,01	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0
<b>16:1(n-7)</b>	1,9	0,6	2,3	0,4	2,1	0,3	1,8	1,0	3,3	0,5
<b>18:1(n-11)</b>	0,1	0,01	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>18:1(n-9)</b>	3,7	0,7	4,1	0,2	3,9	0,5	3,9	1,1	4,9	2,2
<b>18:1(n-7)</b>	1,6	0,2	1,8	0,3	1,6	0,4	1,3	0,4	2,4	1,1
<b>20:1(n-11)</b>	0,7 <sup>a</sup>	0,1	0,7 <sup>a</sup>	0,1	0,8 <sup>a</sup>	0,2	0,5 <sup>a</sup>	0,4	2,5 <sup>b</sup>	1,7
<b>20:1(n-9)</b>	0,9 <sup>a</sup>	0,2	0,6 <sup>a</sup>	0,1	0,7 <sup>a</sup>	0,1	0,8 <sup>a</sup>	1,0	1,4 <sup>b</sup>	0,5
<b>20:1(n-7)</b>	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,3	0,2	0,1
<b>16:2(n-4)</b>	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2
<b>16:3(n-4)</b>	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7	0,6
<b>18:2(n-6)</b>	2,1	0,4	1,7	1,0	2,2	0,2	2,0	1,0	2,2	0,7
<b>18:2(n-4)</b>	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>18:3(n-6)</b>	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
<b>18:3(n-3)</b>	0,9	0,2	0,9	0,1	0,9	0,1	0,9	0,5	0,8	0,4
<b>18:4(n-3)</b>	1,6	0,5	1,7	0,3	1,7	0,3	2,2	0,8	1,2	0,9
<b>18:5(n-3)</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>20:2i</b>	0,3	0,0	0,4	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	0,2
<b>20:2j</b>	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0
<b>20:2(n-6)</b>	0,6	0,1	0,6	0,1	0,5	0,1	0,6	0,3	0,8	0,0
<b>20:3(n-6)</b>	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1
<b>20:4(n-6)</b>	1,0	0,3	1,8	1,4	1,4	0,3	1,9	0,9	1,3	0,2
<b>20:3(n-3)</b>	0,1	0,0	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>20:4(n-3)</b>	0,2	0,1	0,3	0,0	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1
<b>20:5(n-3)</b>	4,5	0,2	4,6	0,3	4,6	0,6	5,2	1,4	4,5	1,5
<b>21:5(n-3)</b>	0,5	0,3	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,3	0,7	0,3
<b>22:4(n-6)</b>	0,3	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	0,2	0,2
<b>22:2i</b>	0,8	0,3	0,7	0,2	0,9	0,2	1,0	0,8	3,1	2,4
<b>22:2j</b>	0,2	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,4	0,2
<b>22:5(n-6)</b>	1,1	0,4	0,9	0,1	0,9	0,1	1,1	0,2	0,9	0,6
<b>22:5(n-3)</b>	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,7	0,3	0,5	0,4
<b>22:6(n-3)</b>	33,9 <sup>b</sup>	1,7	35,3 <sup>b</sup>	3,6	34,4 <sup>b</sup>	2,7	32,4 <sup>b</sup>	4,4	23,3 <sup>a</sup>	5,3
<b>16:0dma</b>	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0
<b>18:0dma</b>	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	2,1	2,6	0,1	0,1
<b>20:1dma</b>	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1



### *Les acides gras des lipides polaires*

Les proportions d'acides gras des lipides polaires des différentes catégories sont relativement stables. Ce sont les polyinsaturés qui dominent dans la gonade, alors qu'il s'établit un équilibre entre les acides gras saturés et polyinsaturé dans les ovocytes. Cependant dans les ovocytes les polyinsaturés (39,9%) sont nettement moins représentés que dans la gonade (de 58,9% à 63,7%). Le ratio EPA/DHA montre une baisse continue au cours de la maturation (tableau 3).

Tableau 3 : Accumulation des catégories d'acides gras polaires dans la gonade pendant l'ovogenèse

Stade maturation	1	2	3	4	ovocytes
DIV.	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0
TO. BR.	1,1	5,9	7,3	1,5	5,7
TO.SAT.	18,9	16,9	17,5	18,4	38,3
TO.DMA	5,2	7,8	5,4	10,6	2,5
TO.MONO	10,0	10,5	10,8	10,3	13,6
TO. (n-9)	4,2	4,6	4,3	5,6	5,5
TO. (n-7)	2,2	1,8	1,7	2,0	3,9
TO.POLY	63,7	58,9	59,0	59,1	39,9
TO. (n-4)	4,3	1,5	2,1	1,9	1,0
TO. (n-6)	11,0	10,4	10,2	10,5	8,4
TO. (n-3)	41,2	40,9	40,4	40,5	25,5
TO. NMI	7,1	5,9	6,2	6,0	4,9
(n-3)/(n-6)	3,8	4,0	4,0	3,8	3,0
22:6/20:5 (n-3)	6,8	6,7	6,4	5,6	4,9
22:5/20:4 (n-6)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2

Parmi la liste simplifiée des acides gras polaires présentés dans le tableau 4, seule la teneur de 6 d'entre eux change significativement. Ces changements interviennent tous après la ponte, dans les ovocytes. Parmi les acides gras saturés, la teneur en 14 :0 et 18 :0 augmente significativement ( $P < 1\%$  et  $P < 5\%$ ) dans les ovocytes. Au sein des monoinsaturés, seul le 16 :1(n-7) varie, sa teneur augmente significativement ( $P < 5\%$ ) dans les ovocytes. Parmi les polyinsaturés, les 18 :3(n-3) et 18 :4(n-3) augmentent significativement dans les ovocytes ( $P < 5\%$  et  $P < 1\%$ ). Parmi les acides gras essentiels, seul la proportion du 22-6(n-3) change, cependant à l'inverse des précédents sa teneur baisse significativement ( $P < 1\%$ ) dans les ovocytes.

Tableau 4: Liste simplifiée de la composition en acides gras polaires dans la gonade femelle pendant l'ovogenèse en milieu naturel et dans les ovocytes pondus. Les résultats sont exprimés en pourcentage du total des acides gras de la fraction.

stade	1		2		3		4		ovocytes	
	moy.	écarty pe	moy.	écarty pe	moy.	écarty pe	moy.	écarty pe	moy.	écarty pe
réplicats	4		4		6		5		3	
14:0	0,6 <sup>a</sup>	0,1	0,6 <sup>a</sup>	0,1	0,6 <sup>a</sup>	0,1	0,5 <sup>a</sup>	0,2	1,2 <sup>b</sup>	0,4
15:0	0,1	0,1	0,3	0,0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,0
16:0	11,8	2,5	11,0	0,9	11,1	0,4	11,4	1,1	11,7	1,0
17:0	1,6	0,4	1,0	0,6	1,4	0,2	1,6	0,1	2,0	0,6
18:0	4,6 <sup>a</sup>	1,2	3,7 <sup>a</sup>	0,2	3,8 <sup>a</sup>	0,2	4,1 <sup>a</sup>	0,2	7,7 <sup>b</sup>	3,4
16:1(n-9)	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1
16:1(n-7)	0,3 <sup>a</sup>	0,1	0,4 <sup>a</sup>	0,1	0,3 <sup>a</sup>	0,1	0,4 <sup>ab</sup>	0,1	0,5 <sup>b</sup>	0,1
18:1(n-11)	0,4	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
18:1(n-9)	1,7	0,6	2,1	0,1	2,0	0,1	2,1	0,2	2,2	0,1
18:1(n-7)	1,5	1,3	1,0	0,3	1,2	0,3	0,7	0,1	1,8	0,2
20:1(n-11)	5,8	3,0	4,6	0,9	4,8	0,7	4,4	0,3	3,2	1,9
20:1(n-9)	1,7	0,4	1,1	0,1	1,4	0,2	1,2	0,1	1,7	0,3
20:1(n-7)	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1
16:2(n-4)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
16:3(n-4)	1,4	0,4	1,2	0,4	1,4	0,5	1,9	1,2	0,9	0,0
18:2(n-6)	1,0	0,5	1,2	0,1	1,1	0,1	1,1	0,1	1,1	0,1
18:2(n-4)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0
18:3(n-6)	0,0	0,0	0,1	0,	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1
18:3(n-3)	0,2 <sup>a</sup>	0,1	0,3 <sup>a</sup>	0,1	0,3 <sup>a</sup>	0,1	0,3 <sup>ab</sup>	0,1	0,5 <sup>b</sup>	0,1
18:4(n-3)	0,3 <sup>a</sup>	0,1	0,3 <sup>a</sup>	0,1	0,3 <sup>a</sup>	0,1	0,4 <sup>a</sup>	0,1	0,7 <sup>b</sup>	0,2
18:5(n-3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:2i	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
20:2j	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
20:2(n-6)	0,6	0,1	0,5	0,0	0,5	0,1	0,5	0,1	0,6	0,1
20:3(n-6)	0,1	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
20:4(n-6)	6,2	1,8	5,1	0,5	5,3	0,2	5,8	0,4	5,8	0,7
20:3(n-3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
20:4(n-3)	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1
20:5(n-3)	5,0	0,8	5,0	0,6	5,2	0,7	5,6	0,4	5,7	0,6
21:5(n-3)	1,3	0,4	1,1	0,1	1,1	0,1	1,0	0,1	0,7	0,3
22:4(n-6)	0,9	0,2	0,8	0,2	0,7	0,1	0,7	0,1	0,4	0,2
22:2i	6,1	1,7	5,2	0,7	5,3	0,4	5,3	0,2	4,4	2,2
22:2j	0,7	0,1	0,5	0,1	0,6	0,1	0,5	0,1	0,5	0,2
22:5(n-6)	2,0	0,6	1,7	0,1	1,7	0,1	1,8	0,1	1,4	0,2
22:5(n-3)	0,8	0,0	0,8	0,1	0,8	0,1	0,6	0,3	0,6	0,4
22:6(n-3)	33,5 <sup>b</sup>	4,3	33,3 <sup>b</sup>	2,6	32,5 <sup>b</sup>	1,3	31,8 <sup>b</sup>	1,2	24,9 <sup>a</sup>	2,5
16:0dma	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0
18:0dma	2,3	4,3	5,0	5,8	1,4	3,7	8,6	1,6	0,2	0,1
20:1dma	1,7	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

### 4.2.3 - Les stérols pendant l'ovogénèse

La proportion d'ester de stérols augmente de 40% à 70% au cours d'un cycle complet de maturation de l'ovaire pour atteindre un maximum en pleine maturité au stade 5 puis baisse dans les ovocytes pondus (figure 6).

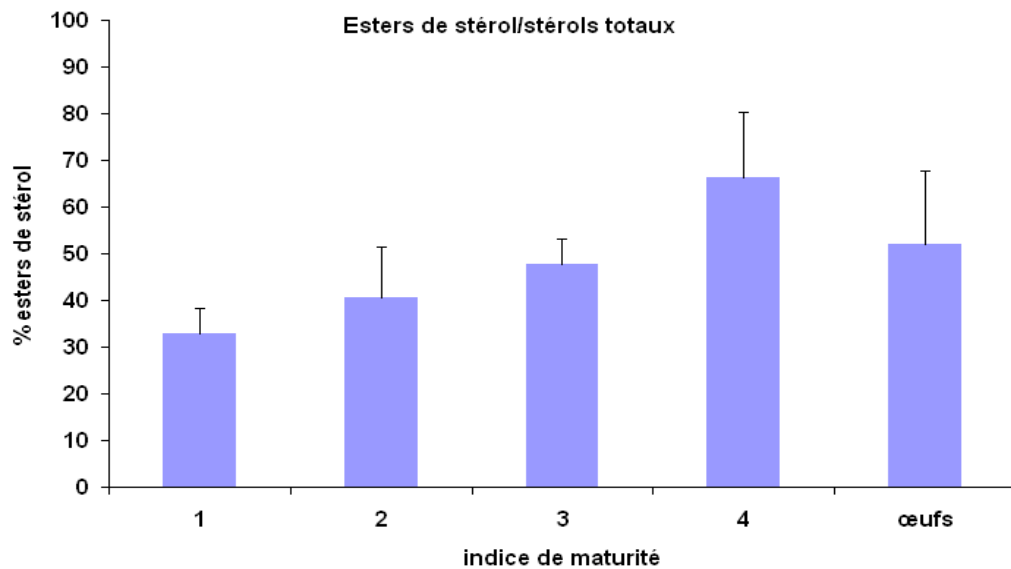


figure 6 : Evolution de la proportion d'esters dans les stérols totaux au cours de l'ovogénèse.

Parmi les variations des stérols libres au cours de l'ovogénèse, il est apparu des augmentations significatives de composés mineurs comme le 24-méthylène cholestérol ( $P < 0,1\%$ ), le  $\beta$ -sitostérol ( $P < 5\%$ ) et le Fucostérol ( $P < 1\%$ ). Cependant c'est le cholestérol qui subit la plus grande variation qui se traduit par une chute significative et continue de plus de 30% au cours du développement de l'ovogénèse ( $P < 5\%$ ) (figure 7).

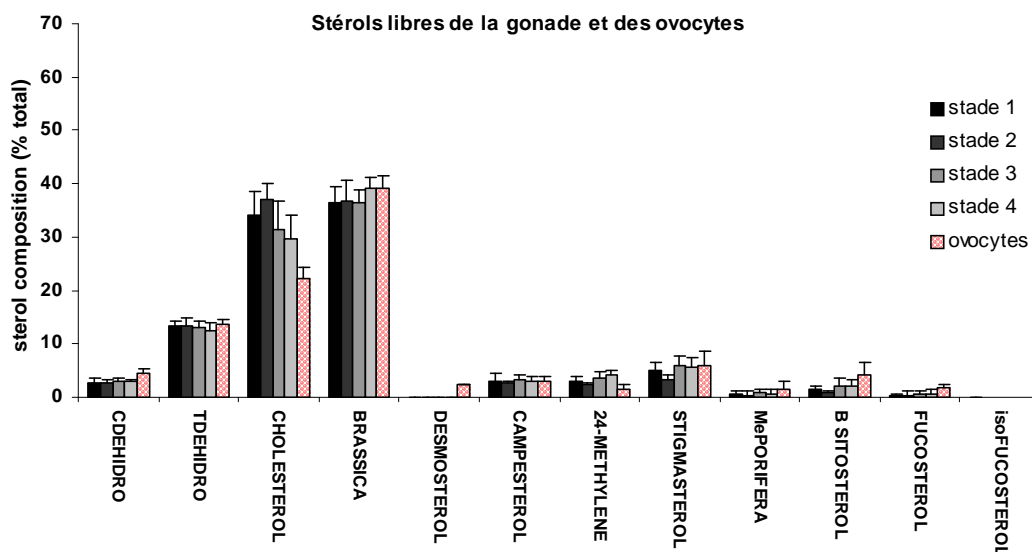


figure 7 : Composition en stérols libres de la gonade femelle et des ovocytes pondus.

Seuls le cholestérol, le Brassicastérol et le Campesterol dans la classe des esters de stérols subissent des variations significatives au cours de l'ovogenèse. En effet, la baisse de cholestérol est significative au cours de l'ovogenèse ( $P < 1\%$ ) puis dans les ovocytes la teneur revient à une proportion proche de la valeur de début de l'ovogenèse. Le Brassicastérol varie inversement au cholestérol, sa teneur augmente significativement au cours de l'ovogenèse puis chute de manière significative dans les ovocytes pondus ( $P < 5\%$ ). Le Campesterol, très faiblement représenté, subit malgré tout une augmentation significative de sa teneur au cours de l'ovogenèse ( $P < 1\%$ ).

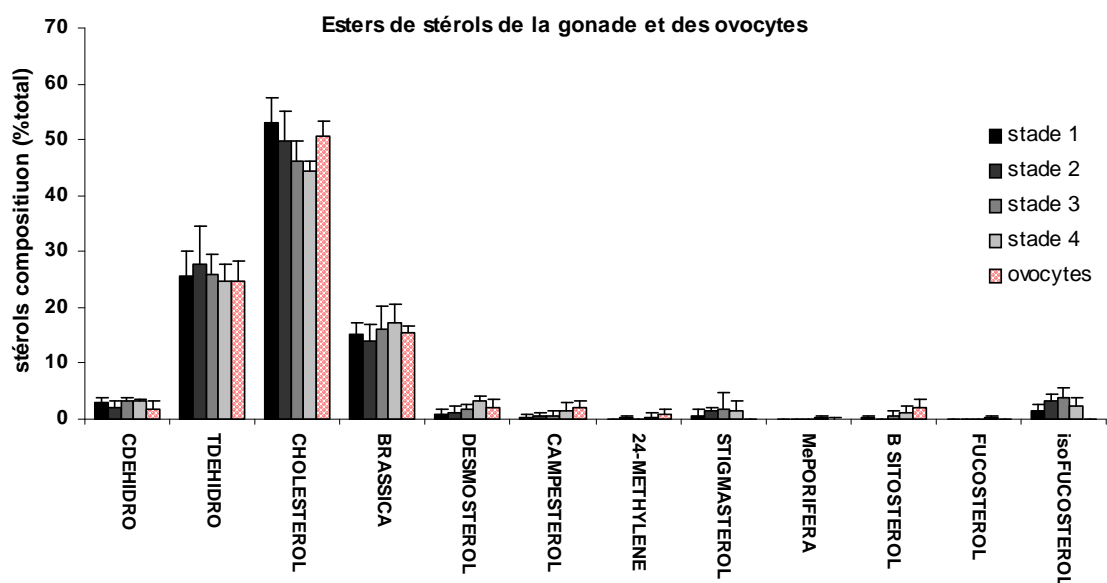


figure 8 : Composition en esters de stérol de la gonade femelle et des ovocytes pondus

## 4.3 - Comparaison intersites de la qualité des œufs pondus

### 4.3.1 - Les acides gras

La comparaison intersite proposée dans cette partie de l'étude est en fait une tentative d'interprétation puisque les prélèvements n'ont pas été réalisés au même moment. Les conditions environnementales sont donc différentes en terme de température et de ressource trophique. Cette comparaison aurait dû être établie plusieurs fois afin de déceler les constantes dans les différences ou dans les similitudes. Ici nous rapprochons les résultats de l'intercalibration (échantillons de Vairao) et de l'étude proprement dite (échantillons de Rangiroa).

Tableau 5 : Comparaison des % des catégories d'acides gras dans les pontes obtenues à Vairao (mai 2002) et à Rangiroa (novembre 2002)

Origine	Neutres		Polaires	
	Vairao	Rangiroa	Vairao	Rangiroa
<b>TO, SAT,</b>	<b>43,9</b>	<b>36,0</b>	<b>18,5</b>	<b>38,3</b>
<b>TO DMA</b>	<b>0,6</b>	<b>1,2</b>	<b>11,5</b>	<b>2,6</b>
<b>TO, MONO</b>	<b>16,1</b>	<b>12,2</b>	<b>11,6</b>	<b>13,6</b>
TO, (n-9)	6,0	5,8	3,7	5,5
TO, (n-7)	7,7	2,7	2,0	3,9
<b>TO, POLY</b>	<b>36,9</b>	<b>45,8</b>	<b>43,3</b>	<b>39,9</b>
TO, (n-4)	0,9	0,8	0,1	1,0
TO, (n-6)	6,0	8,6	11,7	8,4
TO, (n-3)	30,0	31,8	31,5	25,5
<b>TO NMI</b>	<b>1,3</b>	<b>4,4</b>	<b>7,5</b>	<b>4,87</b>
<b>(N-3)/(N-6)</b>	5,0	3,8	2,7	3,0
22:6/20:5 (n-3)	2,5	5,3	2,2	4,9
22:5/20:4 (n-6)	0,5	0,4	0,3	0,2

Nous montrons donc des différences d'origine spatio-temporelles des teneurs en acides gras saturés et polyinsaturés dans les lipides neutres et polaires des ovocytes des pontes obtenues à Vairao (mai 2002) et à Rangiroa (novembre 2002), La teneur en polyinsaturés des acides gras neutres des ovocytes obtenus à Rangiroa est beaucoup plus faible qu'à Vairao (19,5% vs 36,9%) et à l'inverse la teneur en saturés est plus faible dans les ovocytes obtenus à Vairao (tableau 5). Les différences dans la teneur en acides gras neutres dans la catégorie des polyinsaturés pourraient avoir une influence sur le rendement de la vie larvaire, en revanche pour les acides gras polaires les différences sont inexistantes pour les polyinsaturés.

Tableau 5 : Liste simplifiée de la composition en acides gras neutres et polaires des ovocytes pondus à Vairao (mai 2002) et à Rangiroa (novembre 2002), Les résultats sont exprimés en pourcentage du total des acides gras de la fraction, Les étoiles indiquent les valeurs significativement plus élevées au seuil de 5% à l'issue du test t de Student,

Lipides origine	neutres				polaires			
	Vairao		Rangiroa		Vairao		Rangiroa	
	moy	écartype	moy	écartype	moy	écartype	moy	écartype
réplicats	3		3		3		3	
14:00	6,3	0,2	8,3 *	0,9	0,4	0,0	1,2 *	0,4
15:00	0,9	0,1	0,9	0,5	0,2	0,0	0,3 *	0,0
16:00	27,5	1,2	27,0	13,1	10,1	0,1	15,1	6,6
17:00	2,0	0,1	3,0	1,3	1,3	0,0	2,0	0,6
18:00	6,6	0,5	5,5	3,8	5,9	0,7	7,7	3,5
16:1(n-9)	0,5 *	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1
16:1(n-7)	4,9 *	0,2	3,3	0,5	0,8	0,2	0,5	0,1
18:1(n-11)	0,3	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0
18:1(n-9)	4,8	0,1	4,9	2,2	1,9	0,2	2,2	0,1
18:1(n-7)	2,5	0,2	2,4	1,1	1,1	0,3	1,8	0,2
20:1(n-11)	0,8	0,2	2,5	1,7	4,6	0,4	4,3	0,7
20:1(n-9)	0,7	0,1	1,4	0,5	1,6	0,3	1,7	0,3
20:1(n-7)	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1
16:2(n-4)	0,4	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1
16:3(n-4)	0,1	0,0	0,7	0,6	0,0	0,0	0,9 *	0,0
18:2(n-6)	0,2	0,1	2,2*	0,7	0,0	0,0	1,1 *	0,1
18:2(n-4)	0,2	0,0	ND		0,1	0,0	ND	
18:3(n-6)	0,5 *	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1
18:3(n-3)	2,5 *	0,1	0,8	0,4	0,8	0,1	0,5	0,1
18:4(n-3)	3,5 *	0,3	1,2	0,9	0,6	0,1	0,7	0,2
18:5(n-3)	0,2	0,0	ND		0,02*	0,0	0,0	0,0
20:2i	0,1	0,0	0,4 *	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1
20:2j	0,1	0,1	ND		0,2	0,1	0,1	0,1
20:2(n-6)	0,5	0,0	0,8 *	0,0	0,6	0,1	0,6	0,1
20:3(n-6)	0,3 *	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1
20:4(n-6)	2,8 *	0,2	1,3	0,2	6,9	0,2	5,8	0,7
20:3(n-3)	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0
20:4(n-3)	0,4	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1
20:5(n-3)	6,3	0,5	4,5	1,5	8,3 *	0,8	5,7	0,6
21:5(n-3)	0,7	0,0	0,7	0,3	1,1	0,1	0,7	0,3
22:4(n-6)	0,4	0,0	0,2	0,3	1,7 *	0,1	0,4	0,2
22:2i	0,9	0,1	3,1	2,5	6,4	0,6	4,4	2,2
22:2j	0,2	0,0	0,4	0,3	0,9 *	0,0	0,5	0,2
22:5(n-6)	1,0	0,1	0,9	0,6	2,1 *	0,1	1,4	0,2
22:5(n-3)	0,1	0,0	0,5	0,4	0,1	0,0	0,6	0,4
22:6(n-3)	15,6	1,3	23,3	5,3	17,9	0,7	24,9 *	2,6
16:0dma	ND		ND		ND		0,1	0,0
18:0dma	0,4	0,1	0,1	0,1	10,7	1,2	0,2	0,1
20:1dma	ND		0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1

De nombreuses différences spatio-temporelles apparaissent dans la composition lipidique des ovocytes, Au niveau des acides gras essentiels, la EPA 20 : 5(n-3) est en proportion significativement plus importante ( $P < 5\%$ ) dans les neutres et les polaires des ovocytes obtenus à Vairao, L'acide arachidonique 20 :4(n-6) est en proportion significativement plus importante ( $P < 5\%$ ) dans la fraction neutre des acides gras des ovocytes de Vairao. A l'inverse, la teneur en DHA 22 : 6(n-6) est significativement ( $P < 5\%$ ) plus élevée dans la fraction polaire des ovocytes et particulièrement à Rangiroa,

### 4.3.2 - Les stérols

Le Brassicastérol est le stérol majeur de la fraction libre dans la gonade femelle, suivi du cholestérol. Il apparaît que les ovocytes de Rangiroa ont en proportion significativement plus de c-déhydro, de t-déhydro et de Brassicastérol que les ovocytes de Vairao ( $P < 5\%$ ) (figure 9). En revanche, les ovocytes de Vairao ont les proportions des stérols mineurs les plus importantes,

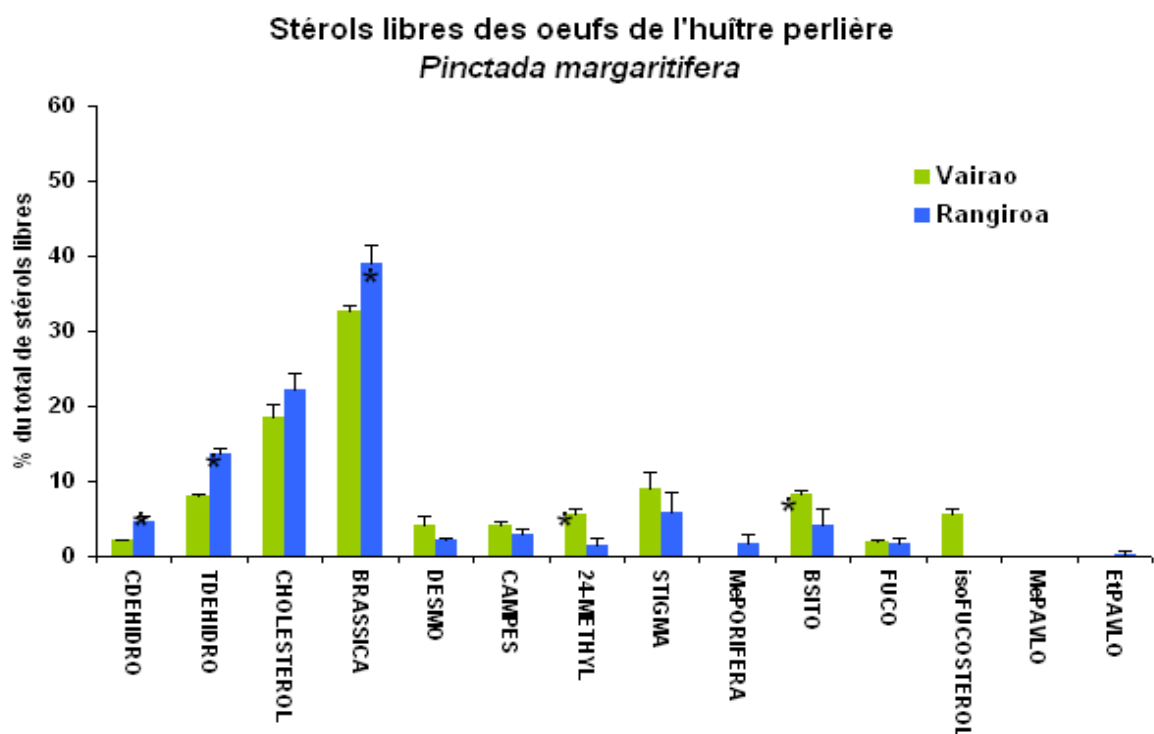


figure 9 : Profils comparés des stérols libres des ovocytes de l'huître perlière *P. margaritifera* obtenus à Vairao et à Rangiroa. Les étoiles indiquent les valeurs significativement plus élevées à l'issue des comparaisons 2 à 2 des niveaux de chaque stérol. Les barres verticales représentent l'écart type.

Le cholestérol est le stérol majeur de la fraction des esters de stérol. Les ovocytes de Rangiroa sont significativement plus riches ( $P < 5\%$ ) en t-hydro et cholestérol que les ovocytes de

Vairao (figure 10). La richesse en ester de stérol dans la gonade est une caractéristique des femelles et correspond aux stérols de réserve.

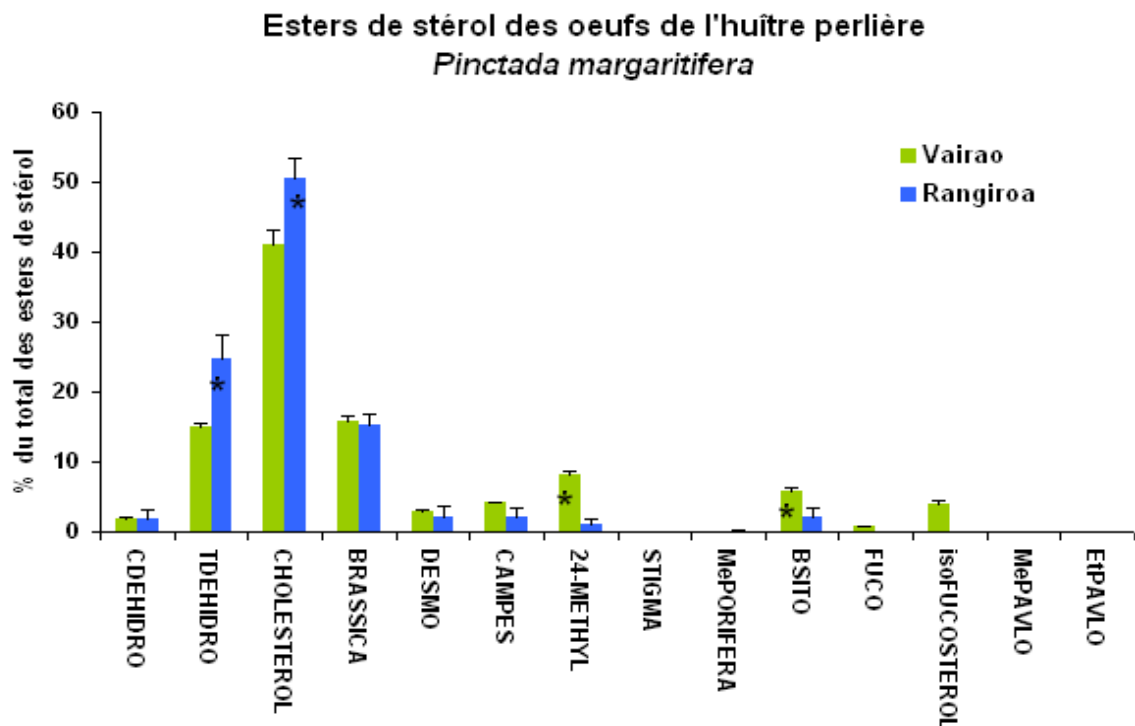


figure 10 : Profils comparés des esters de stérols des ovocytes de l'huître perlière *P. margaritifera* obtenus à Vairao et à Rangiroa. Les étoiles indiquent les valeurs significativement plus élevées à l'issue des comparaisons 2 à 2 des niveaux de chaque stérol. Les barres verticales représentent l'écart type.

#### 4.4 - Comparaison intersite de la valeur alimentaire du seston

L'échantillonnage de l'eau dans les 2 sites est réalisé selon la même technique (filtration sur filtre GFC). Cependant les modalités ont différencié quelque peu. Les 80 litres d'eau de mer prélevés à Vairao ont été filtrés sur 4 filtres à raison de 20 litres chacun. Les 4 filtres ont ensuite été réunis dans le même flacon de liquide de Folch. A Rangiroa, les 66 litres d'eau de mer ont été filtrés sur 3 filtres GFC, conservés et analysés séparément constituant ainsi un triplicat.



#### 4.4.1 - Les acides gras

Les deux sites se caractérisent principalement par une différence de la teneur en polyinsaturés qui semble plus basse à Vairao en mai 2002 qu'à Rangiroa en novembre 2002, Ceci se traduit principalement par une faible teneur du 22 : 6(n-3) (tableau 6),

Tableau 6 : Catégories d'acides gras du seston de Vairao (mai 2002) et de Rangiroa (novembre 2002)

lipides	Neutres		Polaires	
	Vairao	Rangiroa	Vairao	Rangiroa
<b>Site</b>				
<b>TO, SAT,</b>	59,16	64,64	60,83	36,12
<b>TO DMA</b>	1,80	0,38	0,93	0,66
<b>TO, MONO</b>	28,54	13,33	20,85	23,31
TO, (n-9)	23,20	10,56	11,44	12,23
TO, (n-7)	3,33	2,53	9,41	6,01
<b>TO, POLY</b>	8,05	21,64	14,47	36,79
TO, (n-4)	0,00	0,00	0,00	0,00
TO, (n-6)	1,03	4,60	6,70	5,25
TO, (n-3)	6,09	16,45	7,76	30,72
<b>TO NMI</b>	0,94	0,59	0,00	1,26
<b>(N-3)/(N-6)</b>	5,94	3,11	1,16	6,08
22:6/20:5 (n-3)	1,74	9,41	1,44	6,78
22:5/20:4 (n-6)	0,00	0,20	2,45	0,10
20:4(n-6)/20:5(n-3)	0,76	1,31	0,75	1,00

Les 2 sites comparés à 2 périodes différentes montrent des similitudes mais aussi des différences majeures. Parmi les similitudes, on peut remarquer la forte proportion d'acide palmitique (16 : 0). En revanche parmi les différences majeures, le DHA 22 : 6(n-3) est en très faible proportion à Vairao (Tableau 7).

Tableau 7 : Liste simplifiée de la composition en acides gras neutres et polaires du seston à Vairao (mai 2002) et à Rangiroa (novembre 2002). Les résultats sont exprimés en pourcentage du total des acides gras de la fraction.

lipides origine	neutres			polaires		
	Vairao	Rangiroa		Vairao	Rangiroa	
		moy	écartype		moy	écartype
réplicats	1	3		1	3	
<b>14:0</b>	2,86	10,30	1,51	8,30	11,62	1,48
<b>15:0</b>	2,27	2,22	0,68	2,41	0,00	0,00
<b>16:0</b>	40,37	39,16	5,77	36,38	19,60	0,45
<b>17:0</b>	1,75	0,00	0,00	2,06	0,00	0,00
<b>18:0</b>	10,78	21,95	1,41	10,00	4,90	0,91
<b>16:1(n-9)</b>	6,10	3,60	0,05	2,95	0,00	0,00
<b>16:1(n-7)</b>	1,13	1,43	2,02	4,77	4,54	1,67
<b>18:1(n-11)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:1(n-9)</b>	13,68	8,42	0,32	8,49	5,34	0,57
<b>18:1(n-7)</b>	1,61	0,00	0,00	4,63	1,47	2,07
<b>20:1(n-11)</b>	0,81	0,00	0,00	0,00	5,06	0,04
<b>20:1(n-9)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	6,89	0,99
<b>20:1(n-7)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>16:2(n-4)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>16:3(n-4)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:2(n-6)</b>	0,00	1,71	0,41	0,00	0,00	0,00
<b>18:2(n-4)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:3(n-6)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:3(n-3)</b>	0,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:4(n-3)</b>	0,47	0,70	0,99	0,00	0,00	0,00
<b>18:5(n-3)</b>	1,20	0,00	0,00	1,45	0,00	0,00
<b>20:2(n-6)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>20:3(n-6)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>20:4(n-6)</b>	1,03	1,87	0,41	1,94	3,87	0,86
<b>20:3(n-3)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>20:4(n-3)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>20:5(n-3)</b>	1,35	0,00	0,00	2,59	3,83	0,39
<b>21:5(n-3)</b>	0,00	0,39	0,55	0,00	0,00	0,00
<b>22:4(n-6)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>22:2i</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26	0,36
<b>22:2j</b>	0,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>22:5(n-6)</b>	0,00	0,00	0,00	4,76	0,84	0,14
<b>22:5(n-3)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>22:6(n-3)</b>	2,35	7,00	4,59	3,72	26,04	3,46
<b>16:0dma</b>	0,58	0,00	0,00	0,93	0,00	0,00
<b>18:0dma</b>	0,72	0,58	0,81	0,00	0,34	0,47
<b>20:1dma</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

### 4.4.2 - Les stérols

La valeur nutritive de l'eau de mer prélevée à Rangiroa en novembre 2002 était plus riche qu'à Vairao en mai 2002 puisque sa concentration en stérols totaux est de 16,6 ng/l alors qu'à Rangiroa cette valeur est de 28,5 ng/l.

Les principaux stérols dont le Cholestérol et le Brassicastérol sont présents dans l'eau de mer des 2 sites. La concentration de cholestérol à Vairao est de 9,6 ng/l soit 57% du total des stérols mais ne représente que 20% à Rangiroa (5,68 ng/l). Le t-dihydro est très représenté à Rangiroa (26,3%) contrairement à Vairao (5,1%). Le stigmastérol et Iso-Fucostérol sont en quantité plus importante à Rangiroa qu'à Vairao.

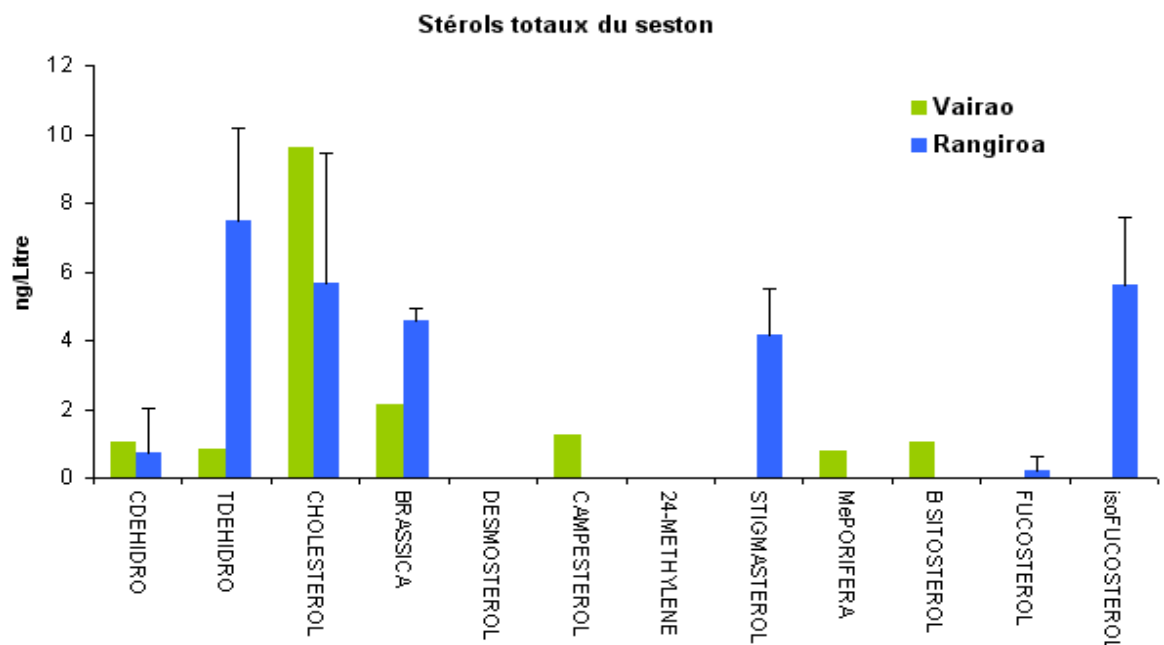


figure 11 : Distribution quantitative des stérols des prélèvements de Vairao (mai 2002) et de Rangiroa (novembre 2002),

## 4.5 – Caractérisation de la valeur alimentaire des algues cultivées en laboratoire

### 4.5.1 - Les acides gras

En dehors de toute approche statistique de la composition en acides gras des algues cultivées au COP, il apparaît des complémentarités nutritionnelles qui sont déjà exploitées pour certaines algues mais pas pour toutes (tableau 8)

Toutes les algues étudiées sont riches en acide palmitique (16 : 0) et en 14 : 0 à l'exception des diatomées qui ont une faible teneur en 14 : 0. Les complémentarités sont recherchées parmi les acides gras essentiels tel que l'acide arachidonique (ARA). *C. minus* ne contient pas moins de 13,9% de ARA. Le DHA est fourni principalement par *Pavlova*, *C. minus*, *Platymonas* et surtout par *Nannochloris*. L'EPA est essentiellement fourni par les Prymnésiophycées (*Isochrysis* et *Pavlova*) (tableau 8).

Tableau 8 : Liste simplifiée de la composition en acides gras des lipides totaux des algues cultivées en laboratoire à Vairao, Les résultats sont exprimés en pourcentage du total des acides gras de la fraction.

	Prymnésiophycées		Diatomophycées		Prasino phycée		
	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Pavlova lutherii</i>	<i>Chaeto, gracilis</i>	<i>Chaeto, minus</i>	<i>Platy monas</i>	<i>Cyano bactérie</i>	<i>Nanno chloris</i>
<b>14:0</b>	24,55	15,618	0,63	0,00	11,62	19,93	6,03
<b>15:0</b>	0,41	0,00	0,00	0,80	0,71	0,00	0,00
<b>16:0</b>	17,90	20,42	30,61	15,66	21,70	18,18	28,79
<b>17:0</b>	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:0</b>	0,25	0,93	1,26	0,88	0,00	4,91	0,00
<b>16:1(n-9)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>16:1(n-7)</b>	4,62	14,61	0,00	20,70	27,99	32,56	21,55
<b>18:1(n-11)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:1(n-9)</b>	12,96	1,13	7,49	4,86	0,00	0,94	1,88
<b>18:1(n-7)</b>	0,00	1,44	1,93	4,96	0,00	7,10	0,00
<b>20:1(n-11)</b>	0,00	0,00	1,11	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>20:1(n-9)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>20:1(n-7)</b>	0,67	11,55	2,17	1,45	1,98	9,47	0,00
<b>16:2(n-4)</b>	0,59	0,21	0,00	0,91	0,00	0,00	0,00
<b>16:3(n-4)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:2(n-6)</b>	0,08	0,86	0,26	0,20	0,33	0,00	7,03
<b>18:2(n-4)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,79	0,00	0,00
<b>18:3(n-6)</b>	0,74	2,55	0,62	3,72	0,00	1,38	0,00
<b>18:3(n-3)</b>	7,52	0,83	33,51	0,00	0,15	0,00	0,00
<b>18:4(n-3)</b>	9,62	0,00	8,46	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:5(n-3)</b>	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>20:2(n-6)</b>	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00
<b>20:3(n-6)</b>	0,07	0,00	0,00	3,32	0,24	0,00	0,00
<b>20:4(n-6)</b>	0,18	0,41	0,59	13,89	1,19	0,00	4,02
<b>20:3(n-3)</b>	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>20:4(n-3)</b>	0,00	0,00	0,20	0,85	0,36	0,00	0,00
<b>20:5(n-3)</b>	0,46	13,94	4,88	13,87	18,35	0,00	25,87
<b>21:5(n-3)</b>	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>22:4(n-6)</b>	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>22:5(n-6)</b>	5,94	1,56	0,27	0,77	0,00	0,00	0,60
<b>22:5(n-3)</b>	0,06	0,00	0,44	0,15	0,00	0,00	0,00
<b>22:6(n-3)</b>	10,38	7,34	0,48	2,61	1,72	0,00	0,00
<b>16:0dma</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:0dma</b>	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>20:1dma</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000

## 4.5.2 - Les stérols

L'étude de la composition en stérols révèle aussi les spécificités nutritionnelles des espèces. Parmi les Prymnésiophycées, *Isochrysis* fournit exclusivement du Brassicastérol alors que Pavlova contient un spectre de stérols plus large (8) (figure 13).

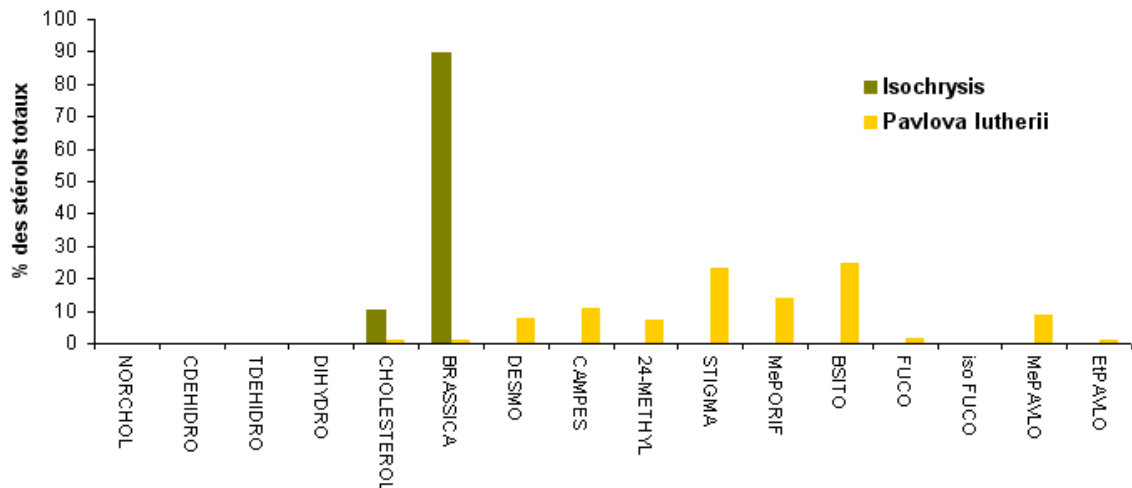


figure 12 : composition en stérols des Prymnésiophycées cultivées au COP

Les diatomées étudiées contiennent 4 stérols. *C. gracilis* contient une forte proportion de cholestérol (+50%) et de Fucostérol, alors que *C. minus* apporte du 24 méthylène cholestérol et de Iso-Fucostérol, (figure 13).

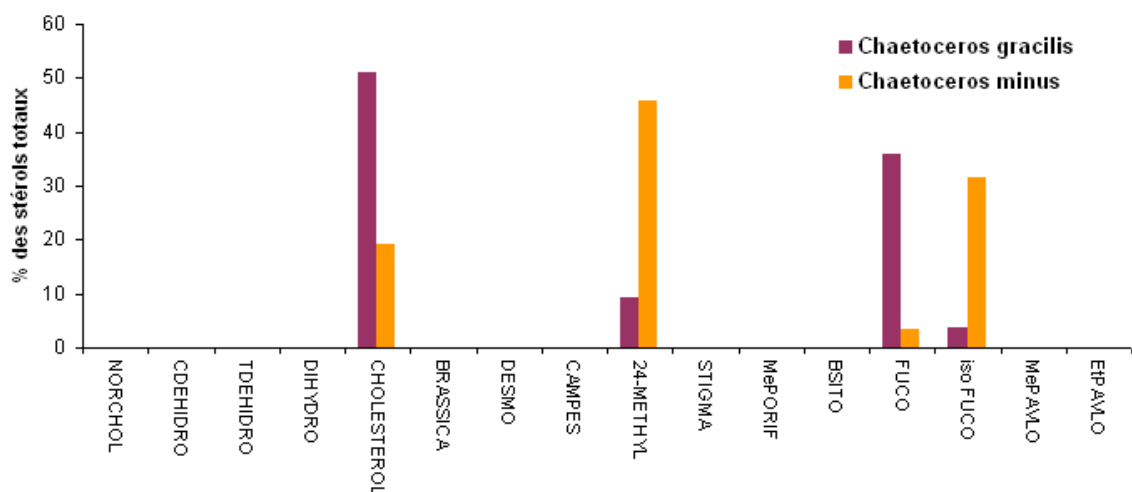


figure 13 : composition en stérols des Diatomophycées cultivées au COP

Parmi les autres algues, *Nannochloris* et la souche de cyanobactérie contiennent essentiellement du cholestérol alors que *Platymonas* apporte principalement du 24 méthylène cholestérol (figure 14).

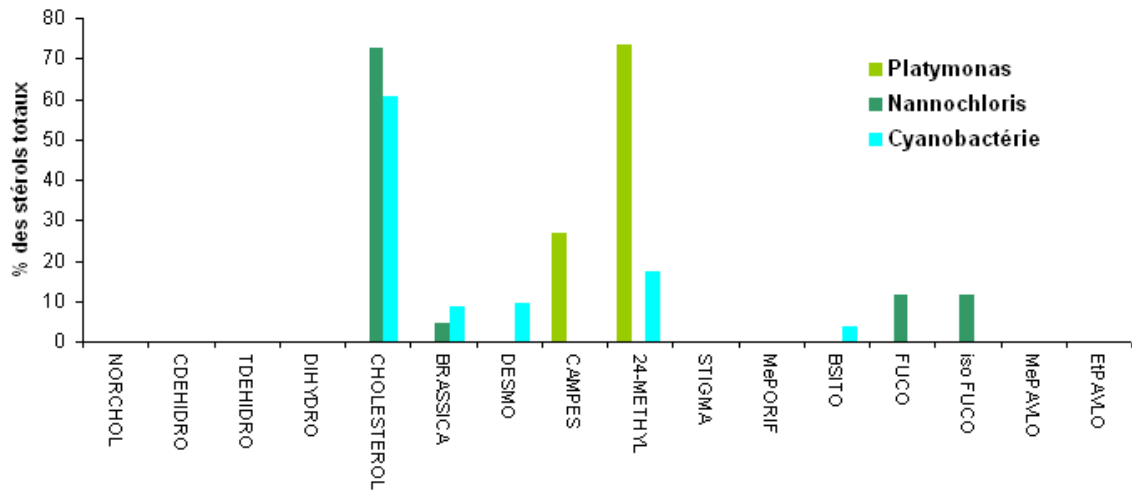


figure 14 : composition en stérols des autres algues cultivées au COP

## 5 – Discussion

L'objectif principal de cette étude était de déterminer la composition de la gonade femelle des huîtres perlières en acides gras et en stérols traduisant les besoins essentiels au cours du déroulement de l'ovogenèse. Les animaux étudiés sont tous originaires du milieu naturel. En complément de l'analyse des gonades femelles, la valeur alimentaire de la matière particulaire ou seston, qui est la base de l'alimentation des huîtres perlières dans les lagons, est aussi étudiée pour la teneur en acides gras et en stérols. Enfin, parmi les souches de microalgues cultivées au Centre Océanologique du Pacifique, 7 d'entre elles ont été caractérisées pour leur composition en acides gras et en stérols, afin d'être en mesure d'élaborer un régime alimentaire (cocktail d'algues) qui fournit les besoins essentiels qui ont préalablement été quantifiés dans la gonade. Cette étude s'inspire de travaux qui ont été menés sur la coquille St Jacques *Pecten maximus* (Soudant et al, 1996) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Soudant et al, 1999). Les résultats ont permis de déterminer l'impact de l'alimentation des bivalves sur la composition en acides gras et stérols des différents tissus et particulièrement de la gonade. Ceci semble important dans la mesure où il est désormais connu que la survie larvaire pendant les premiers jours dépend essentiellement des réserves qui ont été constituées dans les ovocytes pendant la maturation gonadique. Une approche descriptive fournit la composition proximale des différents organes de l'huître perlière ainsi que la composition lipidique de ces tissus en terme d'acides gras neutres et polaires. Quinze stérols ont été identifiés dans les différents tissus et leur distribution est équivalente dans chacun de ces tissus. Ces mêmes stérols ont aussi été identifiés chez *P. maximus* (Soudant et al, 1996) et *C. gigas*, (Soudant et al, 1999).

### *La gonade*

Pendant l'ovogenèse chez *P. margaritifera*, il apparaît finalement peu de transformations majeures. Il est connu que la masse de la gonade s'accroît par l'accumulation des réserves dont les lipides. Les résultats montrent que les proportions des différents acides gras neutres et polaires étant stables pendant la maturation, il n'y a donc pas d'accumulation préférentielle de certaines molécules. Les molécules majeures présentes dans la gonade et les ovocytes sont l'acide palmitique 16 : 0 et le 22 : 6(n-3). La prédominance de ces composés a déjà été décrite chez plusieurs bivalves dont *Pecten maximus* (Soudant et al, 1996), *C. gigas* (Soudant et al, 1999) et chez *Argopecten purpuratus* (Caers et al, 1999). Cependant la teneur de ces 2 acides gras reste plus élevée chez *P. margaritifera*. Le 22 : 6(n-3) joue un rôle majeur au niveau des



structures et des fonctions des membranes cellulaires impliquées dans l'ovogenèse et l'embryogenèse. Le taux d'éclosion serait associé à la teneur en 22 : 6(n-3) (Soudant (1995)). Une différence importante caractérise *P. margaritifera* par rapport à ces espèces, en effet le niveau de 20 : 5(n-3) est plus élevé chez les espèces rencontrées dans les régions tempérées. D'autre part, la teneur en acide arachidonique chez *P. margaritifera* est similaire à celle observée chez *P. maximus* (Soudant et al, 1996). La composition relative des ovocytes est modifiée après la ponte, et c'est particulièrement le 22 : 6(n-3) qui varie par la chute significative de sa teneur dans les ovocytes. Les autres acides gras essentiels (ARA et EPA) ne changent pas. Les changements décrits entre la gonade et les ovocytes peuvent être liés à plusieurs facteurs. Des transformations interviennent dans les ovocytes au moment de la ponte, modifiant l'équilibre des acides gras. La gonade est un tissu plus complexe que les ovocytes. En effet la gonade est composée des gamètes en cours d'élaboration, des membranes des tubules, de l'hémolymphe qui circule dans les espaces intermembranaires. L'hémolymphe est composée des molécules dissoutes dont de nombreuses lipoprotéines et des hémocytes qui y circulent. La comparaison des ratios 22 : 6(n-3)/20 :5(n-3) et 20:4(n-6)/ 20 : 5(n-3) des lipides neutres et polaires indique que le DHA et l'ARA sont incorporés sélectivement par rapport au 20 : 5(n-3). Le ratio 22 : 6(n-3)/20 : 5(n-3) est un indicateur nutritionnel chez *Pecten maximus* puisque la valeur du ratio varie profondément selon le régime alimentaire (Soudant, 1995).

Les stérols identifiées chez *P. maximus* (Soudant, 1995) et *C. gigas* (Soudant et al, 2000) ont été détectés chez *P. margaritifera*. Le cholestérol est le composé majeur des esters de stérol dans la gonade de *P. margaritifera* à l'instar de *P. maximus* (Soudant 1995). Les stérols et leur évolution sont conformes au modèle de variation des autres bivalves marins étudiés. Parmi les stérols libres, le Brassicastérol et le cholestérol ont des teneurs équilibrées. Le résultat principal acquis concernant les stérols réside dans le fait que la teneur en cholestérol diminue au cours de la maturation. Cet effet ne résulte pas de l'alimentation qui est malgré tout le facteur essentiel fournissant les stérols aux bivalves puisque ceux-ci ne sont pas ou peu capables de les synthétiser (Teshima, Patterson, 1981; Holden, Patterson 1991), Les huîtres perlières ont été échantillonnées au même endroit (atoll de Rangiroa) et à la même période (novembre 2002). Cet effet résulte probablement d'un facteur interne propre à la maturation et à la constitution des ovocytes. En effet, l'huître peut agir en sélectionnant et/ou rejetant spécifiquement des molécules. Le cholestérol a un rôle rigidifiant dans les structures membranaires et donc la teneur en stérols influence directement la fluidité membranaire (Irazu, 1988). Les stérols estérifiées sont généralement sous forme de réserve, ils seront ensuite utilisés par l'embryon pour la

biosynthèse des membranes dans lesquelles les stérols sont des éléments rigidifiants. Des larves pauvres en cholestérols ont une croissance réduite (Soudant, 1995).

### ***Les ovocytes***

Les résultats montrent des différences dans les profils des acides gras neutres et polaires des lipides des ovocytes obtenus à Vairao et à Rangiroa. Ces différences au sein de la même espèce sont probablement dues aux caractéristiques propres de ces 2 sites (île haute vs atoll) engendrant des ressources trophiques différentes ainsi qu'à un échantillonnage qui n'est pas simultané. En revanche et contre toute attente, les profils stéroliques diffèrent finalement peu.

La proportion de DHA est plus élevée à Rangiroa qu'à Vairao. En revanche les ovocytes obtenus à Vairao ont des teneurs en acide arachidonique et en DHA plus élevées que celles de Rangiroa. Le travail de Marty et al, (Giganuga, 1998) sur les ovocytes de *C. gigas* permet de comparer les profils d'acides gras polaires avec ceux des ovocytes de *P. margaritifera*. Il en résulte des différences dans la teneur relative des acides gras essentiels. Les ovocytes des huîtres perlières contiennent environ 2 fois plus d'acide arachidonique 20 :4(n-6), mais 4,5 fois moins d'EPA 20 : 5(n-3). Concernant le DHA 22 : 6(n-3), la teneur des ovocytes issus de Vairao est équivalente à celle des œufs de l'huître *C. gigas* mais 1,4 fois inférieure aux ovocytes de Rangiroa. Ceci tend à montrer l'importance des facteurs liés à l'espèce et aux conditions trophiques sur la régulation de l'accumulation des acides gras.

### ***Le seston***

La comparaison sur les mêmes bases que précédemment donne quelques indications sur la composition lipidique des sestons de Vairao et de Rangiroa, malgré les grandes quantités d'eau filtrées, les quantités de lipides sont faibles et ne permettent pas de caractériser parfaitement le milieu. Les molécules principales sont détectées dont les acides gras les plus représentés dans les 2 sites qui sont le 16 : 0 et le 22 : 6(n-3) ainsi que les acides gras essentiels 20 : 4(n-3) et 20 : 5(n-6). La teneur en 22 : 6(n-3) dans la fraction polaire est 7 fois supérieure à Rangiroa qu'à Vairao. En contre partie la teneur en 16 : 0 est 2 fois plus importante à Vairao qu'à Rangiroa. Les teneurs en 20 : 4(n-3) et 20 : 5(n-6) sont peu différentes ou mêmes équivalentes. On peut constater la faible quantité de 16 : 1(n-7) qui est un marqueur des diatomées (Volkman, et al, 1989, Shin et al, 2000), ce qui indiquerait une faible présence de celles-ci au moment des prélèvements. Les sestons de Vairao et de Rangiroa ont des profils en stérols sensiblement différents, A Vairao, le cholestérol est le stérol majoritaire, les autres stérols

sont en proportion mineure. En revanche à Rangiroa, il existe une diversité plus importante dans la distribution des stérols. En effet, 5 stérols sont distribués de manière équivalente.

Cette description qualitative de la matière particulaire est très partielle puisque cette étude ne décrit que 2 prélèvements un de Vairao et l'autre de Rangiroa. Cependant Delessale et al (2001), décrivant les caractéristiques du phytoplancton de l'atoll de Takapoto lors d'études menées entre 1974 et 1998, indiquent qu'aucun changement significatif de la biomasse et de la production primaire n'est observé sur le long terme. Il a pu observer cependant un changement de la composition du phytoplancton lorsqu'il s'agissait de planctons de petites tailles. La composition taxonomique montrait en 1974 la prédominance de 3 groupes d'algues : les diatomées, les dinoflagellés et les coccolithophoridés, alors qu'en 1996, le microphytoplancton était pratiquement absent et les communautés phytoplanctoniques étaient dominées par le pico- et le nanoplancton, principalement les chlorophycées, les prymnésiophyces et les dinoflagellés. Cette étude permet de montrer les tendances de composition à long terme d'un lagon mais il n'est pas exclu qu'il existe des variations à court terme favorisant telle ou telle algue avec comme conséquences des changements qualitatifs du régime alimentaire.

### *Relation Ovocytes/Seston*

Il est intéressant d'établir un parallèle entre la composition du seston et des ovocytes. Cette comparaison qui s'établit sur quelques composés principaux montre que la meilleure relation s'établit entre les acides gras des lipides polaires du seston et les acides gras des lipides neutres des ovocytes. Cependant à Vairao (figure 15), la teneur en 22 : 6(n-3) est très faible par rapport au contenu des ovocytes, en revanche cette relation semble mieux équilibrée pour les échantillons de Rangiroa (figure 16)

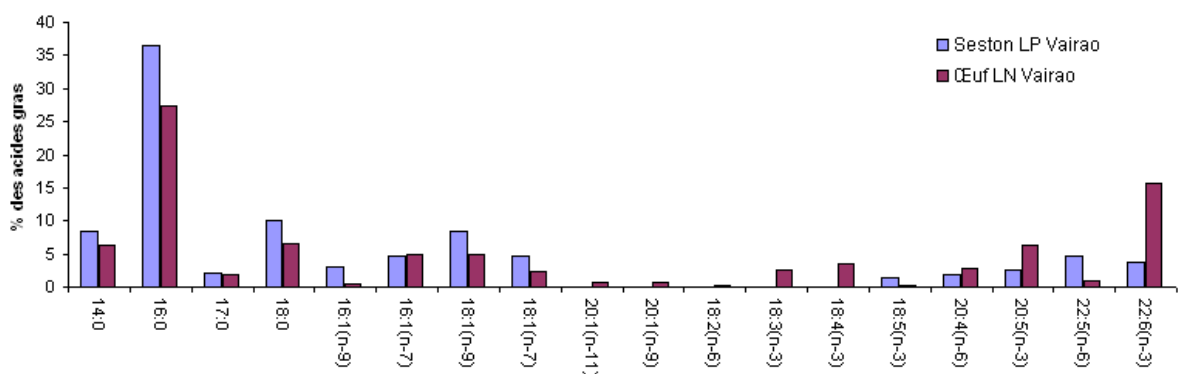


figure 15 : profils comparés de la composition en acides gras du seston et des ovocytes (Vairao mai 2002)

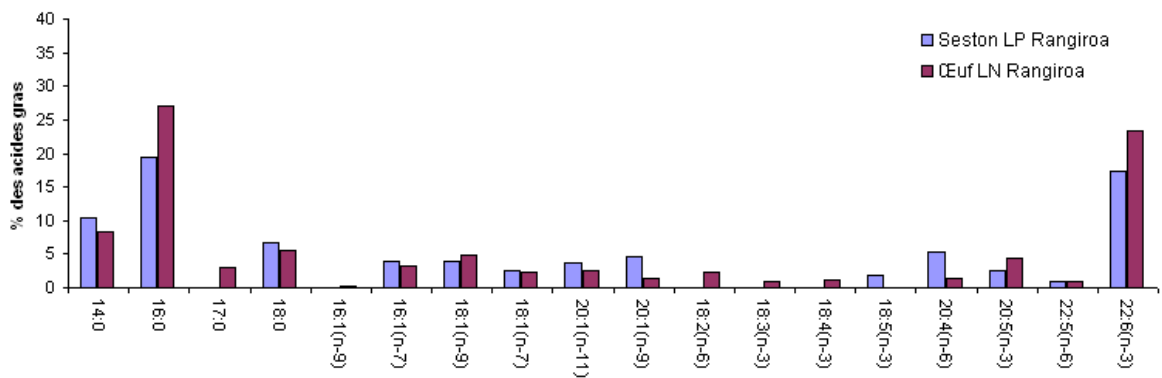


figure 16 : profils comparés de la composition en acides gras du seston et des ovocytes (Rangiroa 2002)

Concernant les stérols cette approche permet de montrer l'impact des stérols du milieu sur le profil des esters de stérols dans les ovocytes à Vairao, La distribution des esters de stérols dans les ovocytes de Vairao est similaire à celle des stérols du seston (figure 17),

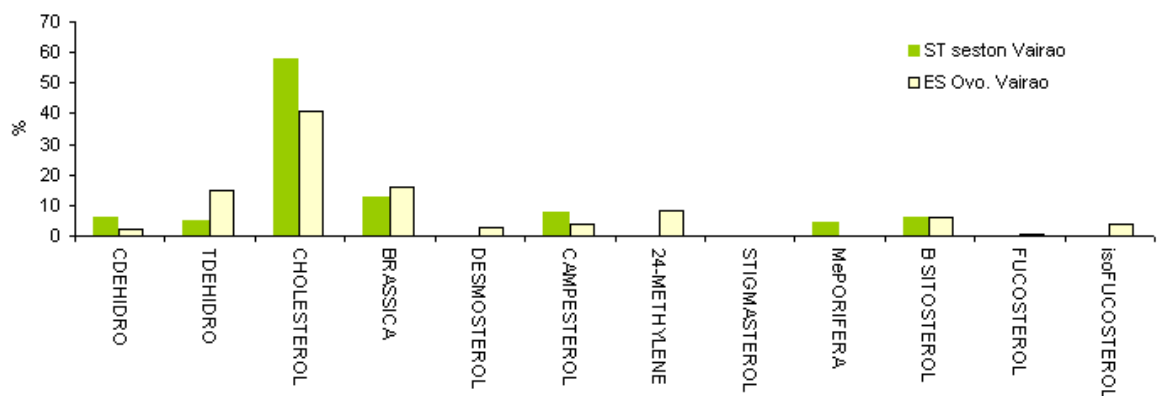


figure 17 : profils comparés de la composition en stérols du seston et des ovocytes (Vairao mai 2002)

En revanche, cette relation ne semble pas fonctionner à Rangiroa puisque le cholestérol de seston n'est pas dans une proportion équivalente à celui de l'ester des ovocytes, D'autre part, le stigmasterol et Iso-Fucostérol présent dans le seston, ne sont pratiquement pas représentés dans les ovocytes (figure 18),

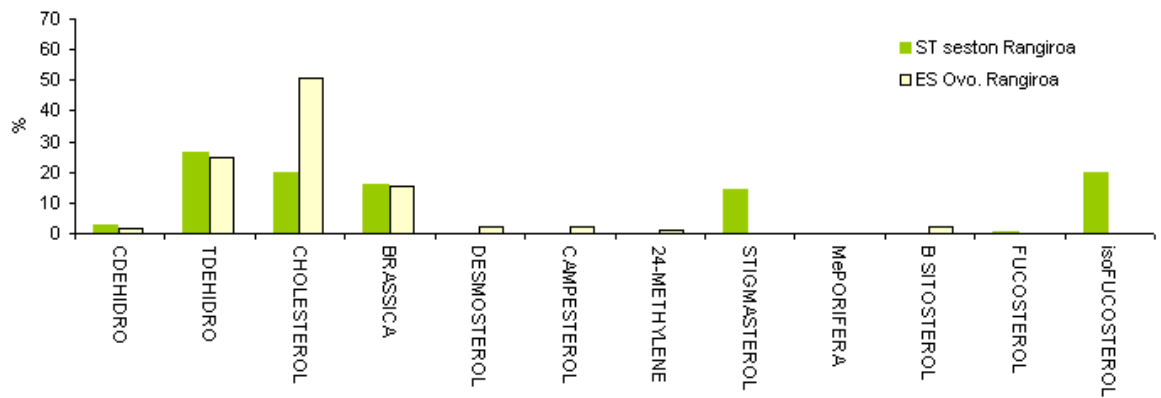


figure 18 : profils comparés de la composition en stérols du sestion et des ovocytes (Rangiroa 2002)

### *La composition des algues et leur valeur alimentaire pour l'huître Pinctada margaritifera en conditionnement pour la reproduction*

Afin d'être en mesure de fournir les besoins essentiels en acides gras polyinsaturés et en stérols aux huîtres perlières pendant un conditionnement pour la reproduction en laboratoire, il est évident que ces éléments doivent être fournis par l'alimentation car il est connu que les bivalves n'ont pas ou peu la capacité de désaturer les acides gras à longue chaîne et qu'ils ne sont pas aptes à biosynthétiser les stérols.

#### *La fourniture en acides gras*

Concernant les acides gras neutres de la gonade le besoin en 22:6(n-3) est important puisqu'il représente plus de 30% des acides gras. Les algues analysées ne possèdent pas cet acide gras dans cette proportion mais c'est *Isochrysis* qui en contient le plus suivi de *Pavlova*. Les autres algues n'en contiennent peu ou pas du tout. Le besoin en 20:4(n-6) et en 20:5(n-3) n'est pas élevé, mais ces acides gras sont malgré tout essentiels. *Isochrysis* et *C. minus* sont capables de fournir le 20:4(n-6). Le 20:5(n-3) est plus largement répandu dans les algues et son approvisionnement ne pose pas de problème d'espèce (figure 19).

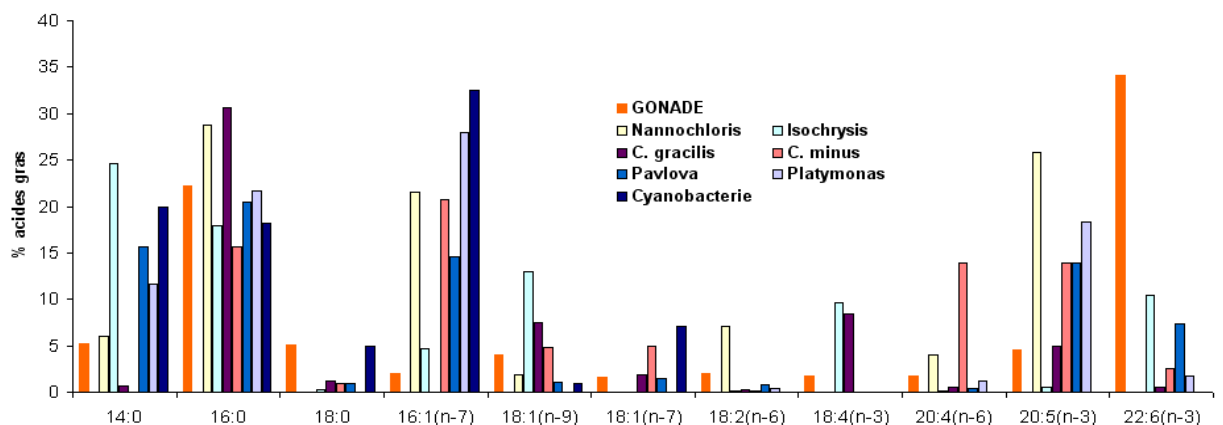


figure 19 : Comparaison des profils d'acides gras des algues et des acides gras neutres de la gonade

La fourniture en acides gras essentiels de la fraction polaire se fait sur les mêmes bases que ceux de la fraction des neutres (figure 20).

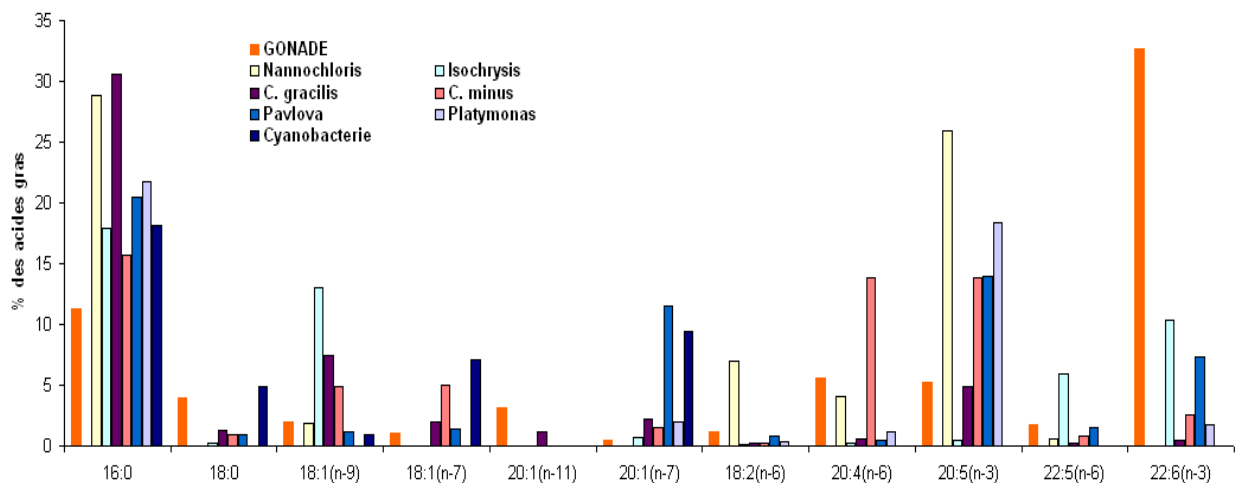


figure 20 : Comparaison des profils d'acides gras des algues et des acides gras polaires de la gonade

### *La fourniture en stérols*

Les stérols doivent être fournis par l'alimentation, les mollusques n'ayant pas ou peu de capacité de les biosynthétiser. Les stérols principaux de constitution de la gonade, cholestérol et Brassicastérol se trouvent en abondance dans l'espèce *Chaetoceros gracilis* ou *C. minus* pour le cholestérol et *Isochrysis* pour le Brassicastérol. *Pavlova lutheri* qui contient les Desmostérol, stigmastérol et béta-sitostérol contribue à la fourniture des stérols mineurs. Fucostérol, Iso-Fucostérol et 24 méthylène cholestérol peuvent aussi être apportés par *Chaetoceros*. Par contre, les déhydrocholestérol, particulièrement la forme trans, se trouvent toujours en relative abondance dans les animaux du milieu naturel et pas dans les espèces de microalgues habituellement utilisées en aquaculture. Ces stérols sont sans doute présents dans le milieu naturel. Une précédente expérience (Soudant, et al, 1998) montre, sur un élevage larvaire de coquille Saint Jacques *Pecten maximus* une diminution de ce stérol entre la phase endotrophique et la phase exotrophique au profit des stérols apportés par l'alimentation.

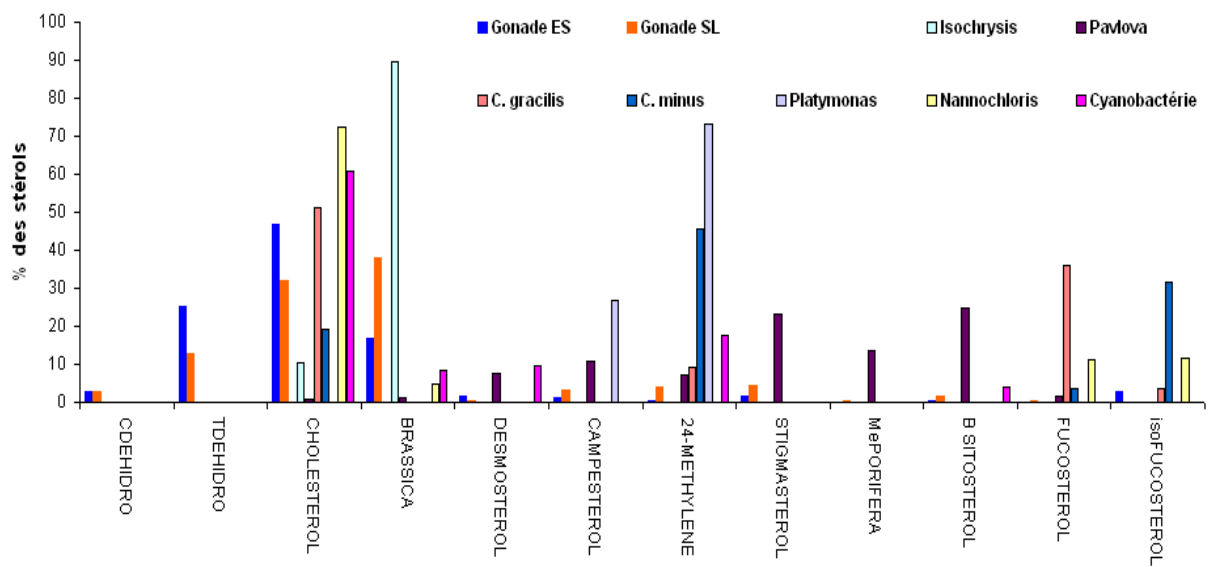


figure 21 : Comparaison des profils des stérols des algues et des stérols libres et estérifiés de la gonade



## 6 – Conclusion

Cette étude a permis de décrire les besoins en lipides essentiels de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* pendant la gamétogénèse des femelles en milieu naturel. Ce travail a été complété par l'analyse en acides gras et en stéroïdes de la matière particulaire en suspension dans le lagon que les huîtres perlières ingèrent. L'analyse des algues cultivées en laboratoire permet de déterminer un régime algal propre à satisfaire les besoins des femelles conditionnées pour la reproduction en laboratoire.

## 7 - Bibliographie

- Bligh E, G, W, J, Dyer, 1959, A rapid method of total lipide extraction and purification, Canadian J, Biochem, 37: 911-917
- Caers M, Coutteau, P, Cure, K, Morales, V, Gajardo, G, Sorgeloos, P, 1999, The Chilean Scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): I, fatty acid composition and lipid content of six organs, Comparative Biochemistry and physiology Part B 123, 89-96
- Dubois M, K,A, Gilles, J,K, Hamilton, P,A, Rebers, F, Smith, 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal, Chem, 28, 350-356,
- Holden, M,J, Patterson , G,W, 1991, Absence of sterol biosynthesis in oyster tissue culture, Lipids, 26, 81-82,
- Irazu, C,E, Pollero, R,J, Brenner, R,R, 1988, Fitosterol effect upon microsomal membrane microviscosity of the mollusc *diplodon delodontus*, Comp, Biochem, Physiol, 89B, 465-470,
- Loret P, A, Pastoureaud, C, Bacher, B, Delesalle, 2000, Phytoplankton composition and selective feeding of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* in the Takapoto lagoon (Tuamotu Archipelago , French Polynesia ): in situ study using optical microscopy and HPLC pigment analysis, Mar, Ecol, Prog, Ser, 199, 55-67,
- Lowry, Rosebrough, Farr, Randall, 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, J, Biol, Chem, 193, 251,
- Marsh J,B, D,B, Wenstein, 1966, Simple charring method for determination of lipids, J, Lipid Res, 7, 574-576,
- Delesalle B, A, Sakka, L, Legendre, J, Pagès, L, Charpy , P, Loret, 2001, The phytoplankton of Takapoto Atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia): time and space variability of biomass, primary production and composition over 24 years, Aquatic Living Resources, 14, 175-182,
- Pouvreau S, Jonquières G, Buestel D, 1999, Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particle size in a tropical lagoon habitat, Aquaculture 176, 295-314,
- Pouvreau S, Bodoy A, Buestel D, 2000a, *In situ* suspension feeding behaviour of the pearl oyster, *Pinctada margaritifera* : Combined effects of body size and weather-related seston composition, Aquaculture 181, 91-113

- Pouvreau S, A, Gangnery, J, Tiapari, F, Lagarde, M Garnier, A, Bodoy, 2000b, Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia), *Aquatic Living Resources*, 13, 37-48,
- Shin K,H, T, Hama, N, Yoshie , S, Noriki, S, Tsunogai, 2000, Dynamics of fatty acids in newly biosynthesized phytoplankton cells and seston during a spring bloom oof the west coast of Hokkaido island, Japan, *Mar, Chem*, 70, 243-256,
- Soudant, P, 1995, Les phospholipides et les stérols des géniteurs et des larves de coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.), relation avec la nutrition, Thèse Univ, Brest, 277p,
- Soudant P, Y, Marty, J, Moal and J, F, Samain, 1995, Separation of major polar lipids in *Pecten maximus* by high-performance liquid chromatography and subsequent determination of their fatty acids using gas chromatography, *J, Chromatography*, 673 B, 15-26
- Soudant, P, Moal, J, Marty, Y, Samain, J,F, 1996, Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.), *Journal of Experimental marine biology and Ecology* 205, 149-163,
- Soudant, P, Marty, Y, Moal, J, Robert, R, Quéré, C, Le Coz, J,R, Samain, J,F, 1996, Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process, *Aquaculture*, 143, 361-378,
- Soudant, P, Le Coz, J,R, Marty, Y, Moal, J, Robert, R, Samain, J,F, 1998, Incorporation of Microalgae Sterols by Scallop *Pecten maximus* (L.) Larvae, *Comparative Biochemistry and Physiology* , A 119A, 451-457,
- Soudant, P, Van Ryckeghem, k, Marty, Y, Moal, J, Samain, J,F, Sorgeloos, P, 1999, comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 123, 209-222,
- Soudant, P, Val Sanles, M, Quere, C, Le Coz, J,R, Marty, Y, Moal, j, Samain, J,F, Sorgeloos, P, 2000, The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Aquaculture* 184, 315-326,
- Teshima, S,I, Patterson, G,W, 1981, sterol biosynthesis in the oyster, *Crassostrea virginica*, *LIPIDS* 16, 234-239,
- Thielley, 1993, Etude cytologique de la gamétogénèse, de la sex-ratio et du cycle de reproduction chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* (L.) var, *cumingii* (Jameson),

- (mollusques, bivalves), Comparaison avec le cycle de *Pinctada maculata* (Gould), Thèse de doctorat de l'Université Française du Pacifique, pp, 216,
- Volkman, J,K, Jeffrey, S,W, Nichols, P,D, Rogers, G,I, Garland, C,D, 1989, Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture, J, exp, Mar, Biol, Ecol; 128, 219-240,
- Von Elert, E, Martin-Creuzburg, D, Le Coz, J,R, 2003, Absence of sterols constrains carbon transfer between cyanobacteria and a freshwater herbivore (*Daphnia galeata*), Proc, R, Soc, Lond, B 270, 1209-1214