

Défi MOREST

Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Caractérisation des facteurs de risques associés au mortalités estivales

Synthèse du thème 4B

Caractérisation phénotypique des souches R Résistantes et S Susceptibles à la mortalité estivale

(La Rochelle 14-15 mars 2006)

Projet cofinancé par :





Caractérisation des facteurs de risques associés au mortalités estivales

Synthèse du thème 4B

Caractérisation phénotypique des souches R Résistantes et S Susceptibles à la mortalité estivale

2000 - 2005

A Huvet, J Royer, J Moal, T Burgeot, S Lapègue, V Boulo, JL Nicolas, C Lambert

Contributeurs : S Pouvreau, H Bacca, J Haure, Costil K, Bouilly K, Dubrunfault T, Fleury E, Daniel JY, Quéré C, Le Coz JR, Le Souchu P, Nourry M, Avazeri Jill, Mingant C, Conan JP, Quéau I, Bédier E, Langlade A, P Soudant, G Choquet, C Paillard, M Delaporte, H Hégareth, Y Labreuche, M Gonçalves, M Jegaden, S Frouel, M Rifi, N Byrnes, B Gagnaire, N Faury, N Kerdudou, P Soletchnik, O Le Moine, P Geairon, P Madec, F Geret, D Moraga, I Boutet, T Renault, D Saulnier....

Coordinateur du programme

J.F. Samain



Organisation du thème :

1. Différences de gamétogenèse et d'effort de reproduction entre R et S	3
1.1. Matériel et méthodes d'analyses	3
1.2. Bilan des résultats.....	4
1.2.1. Stade naissain.....	4
1.2.2. Stade 18 mois	4
2. Bilan énergétique comparé des souches R et S	5
2.1. Energie disponible dans l'animal : les constituants énergétiques	5
2.2. Mesures comparées des voies glucidiques au cours de la période critique précédant l'apparition des mortalités.....	7
2.3. Stratégie d'utilisation de l'énergie durant la période de stress chronique	8
3. Les capacités de Défense des souches R et S.....	10
3.1. Introduction	10
3.2. Matériels et méthodes.....	10
3.2.1. Base génétique	10
3.2.2. Comparaison des paramètres hématocytaires des huîtres résistantes et sensibles.....	10
3.3. Résultats	11
3.3.1. Base génétique.	11
3.3.2. Paramètres hématocytaires des huîtres résistantes et sensibles.....	12
3.4. Discussion.....	18
4. Réponses aux stress des souches R et S	20
4.1. Etude expérimentale du métabolisme d'adaptation des huîtres R et S en conditions d'hypoxie et pesticides	20
4.1.1. Stress oxydant.....	20
4.1.2. Stress génotoxique	23
4.2. Effet de l'exposition aux pesticides sur l'utilisation de l'énergie	24
4.3. Stress environnemental chez les R et S associé à l'effort de gamétogenèse.....	25
5. Le taux d'aneuploïdie des souches R et S.....	26
6. Réponses aux agents pathogènes des souches R et S.....	28
7. Approche globale du différentiel d'expression de gènes entre R et S pour identifier la fonction physiologique impliquée dans la résistance à la mortalité estivale	30
7.1. En conditions in situ avant un épisode de mortalité	30
7.2. Etude des facteurs de risque en expérimentation	32
8. Discussion générale et conclusion	33
9. Bibliographie.....	36
10. Annexe : Synthèse des résultats de comparaison phénotypique des souches R et S soumise au journal Aquaculture.	39



Les résultats du programme MOREST démontrent l'existence d'une composante génétique à la survie estivale du naissain et nous permettent de disposer aujourd'hui d'huîtres « résistantes » (R) et « susceptibles » (S) aux mortalités estivales (Dégremont et al., 2002, 2005). La forte héritabilité estimée face à un tel système multifactoriel permet de suspecter que le caractère sélectionné puisse être gouverné par un ou un très petit nombre de gènes sur une région chromosomique donnée. D'après le modèle d'interaction suspecté entre l'environnement, l'huître et des pathogènes opportunistes, une hiérarchie des facteurs, conduisant aux mortalités, permet de montrer qu'aucun d'entre eux ne peut provoquer à lui seul les mortalités mais que leur combinaison est nécessaire. Ainsi, l'état physiologique de l'animal joue un rôle majeur dans cette interaction. Il est donc vraisemblable de suspecter que le caractère génétique sélectionné puisse être en relation avec une/des fonctions de l'huître, elle-même à l'origine fonctionnelle du différentiel de survie entre R et S.

C'est pourquoi un large phénotypage des huîtres R et S a été entrepris afin de rechercher un/des phénotypes corrélés au caractère survie estivale et donc rechercher et identifier le(s) mécanisme(s) biologique(s) impliqué(s) dans la survie estivale. Ces phénotypages vont de l'échelle de l'animal (mesures macroscopiques), la cellule (biochimie, biotests) à celle de la molécule (polymorphisme de l'ADN, expression de gènes) et analysent les principales fonctions de l'huître (défense, immunité, métabolisme énergétique, reproduction,...). Les résultats de ce phénotypage des huîtres R et S sont donc présentés ci dessous et sont découpés suivant les principales fonctions de l'huître.

1. Différences de gamétogenèse et d'effort de reproduction entre R et S

Les résultats présentés ici ont pour objectif d'analyser les différences de développement gonadique, en terme de dynamique de la gamétogenèse et d'effort de reproduction, entre huîtres R et S. Cette synthèse comporte des résultats obtenus à partir de différentes méthodes d'analyses et donc de différents indices qualitatifs et quantitatifs.

1.1. Matériel et méthodes d'analyses

La gamétogenèse et l'effort de reproduction ont été étudiés sur des familles (G1) ou pools d'huîtres R et S (pool de familles G2 puis G3) dans leur première (naissain) et deuxième année (18 mois ou demi-élevage) entre 2001 et 2004 sur les sites suivants : Auray, Arcachon, Baie des Veys et Marennes Oléron et en conditions contrôlées à la station expérimentale d'Argenton.

Deux grands types de méthodes ont été employés, des analyses biochimiques ou immunologiques et des analyses de lames histologiques :

➤ Dosage des lipides totaux ou des lipides neutres tels que les esters de stérol

(G1 18 mois Auray 2002 et G2 2003; G2 BDV 2003; G1 Marennes 2002);

➤ Dosage des protéines anti-ovocytaires (G3 18 mois Auray 2004 et G2 Marennes Oléron 2003 manip Dynamor), dosage immunologique permettant de quantifier les protéines ovocytaires; réalisée suivant la méthode ELISA décrite par Kang et al. (2003) et modifiée par C. Séguineau et G. le Moullac (Com. Pers.) ;

➤ Dosage de la vitelline (G2 18 mois Marennes Oléron 2003), La Vitelline a été déterminée par dosage ELISA suivant le protocole décrit par Li et al. (1998). Une modification a été apportée pour la détection de la phosphatase alcaline réalisée en chemiluminescence en utilisant le kit Roche applied-science.com (BM Chemiluminescence ELISA Substrate(AP) ;

➤ Histologie "qualitative" (naissain BDV G1 2001 et G2 2002). Cette analyse a consisté en la détermination et le suivi des stades microscopiques de maturation sexuelle entre juillet et octobre ;

➤ Histologie "semi-quantitative" (naissain Auray G3 2003; 18 mois Auray G1, G2, G3 2002-2004; Arcachon 2004; BDV G2, G3 2003-2004; Argenton G2 2003 manip Gigarepro). Cette méthode couplant l'histologie classique à l'analyse d'images permet d'évaluer la proportion de tissus gonadiques (Enriquez-Diaz, 2004). Ainsi, le pourcentage de surface d'occupation de la gonade (par



rapport à la surface totale de la masse viscérale) a été estimé au niveau d'une coupe médiane (jonction palpes-branchies), excepté sur les échantillons d'Auray en 2002 pour lesquels l'estimation a été réalisée au niveau de trois coupes (Enriquez-Diaz, 2004).

1.2. Bilan des résultats

1.2.1. Stade naissain

Les huîtres R présentent une maturation plus précoce en juillet par rapport aux huîtres S, et ce pour les deux années. En 2001, cette précocité est conservée en octobre où les huîtres résistantes reprennent plus rapidement un nouveau cycle sexuel. En 2002, le phénomène inverse est observé en août où les huîtres résistantes sont en retard dans leur maturation mais ré-initient en octobre un nouveau cycle de façon synchrone avec les huîtres sensibles (observations histologiques).

En 2003 à Auray, l'approche quantitative réalisée uniquement à 3 dates (entre juillet et septembre) n'a pas permis de discriminer les huîtres sensibles des résistantes en terme d'occupation de la gonade.

Ces deux approches (histologie qualitative et quantitative) sont complémentaires, puisqu'elles ne permettent pas de visualiser les mêmes phénomènes (gamétogenèse vs effort de reproduction) mais des données supplémentaires sont nécessaires pour conclure sur cette classe d'âge.

1.2.2. Stade 18 mois

Tous les résultats relatifs aux huîtres de 18 mois sont concordants entre les différentes méthodes d'analyse (dosages et histologie quantitative).

Une synthèse des différents résultats peut être réalisée en fonction des conditions :

- en "**conditions riches**" d'un point de vue trophique (BDV-Argenton CN3), deux caractéristiques se dégagent :

1- pendant la phase de maturation peu de différences R-S sont observées, hormis une légère avance temporelle des S en terme de production des gamètes,

2- des pontes partielles semblent plus marquées chez les S (surtout en conditions contrôlées où elles sont plus facilement visualisées). La température pourrait également avoir un effet important sur l'intensité de la ponte dans la mesure où la ponte chez les S semble plus partielle (ou la résorption gonadique plus lente) en 2004 qu'en 2003, année caractérisée par des températures estivales particulièrement élevées.

- en "**conditions moyennes**" (Auray-Marennes Oléron), un schéma différent apparaît avec une discrimination plus marquée entre les R et les S, surtout pendant la période de ponte. En juillet, des pontes partielles plus précoces sont observées chez les S (excepté en 2003, année atypique du point de vue thermique). En août, une ponte majeure plus importante est notée chez les R alors que la régression gonadique est plus longue chez les S.

- en "**conditions limitantes**" en terme de ressources trophiques (Argenton CN1) ou en « **conditions forçantes** » en terme d'amplitude thermique importante (Arcachon), aucune différence significative n'est observée tant dans la maturation que dans la ponte et/ou résorption gonadique.

En conclusion, il pourrait être distingué deux types de milieu correspondant à deux schémas en terme de stratégies de reproduction des R et S au stade 18 mois:

- des **milieux "forçants"**, correspondant à des conditions trophiques extrêmes et/ou des amplitudes thermiques importantes (BDV 2003 et 2004- Auray 2003-Arcachon 2004- Argenton CN1 et CN2), caractérisés par des **profils similaires en terme d'occupation gonadique** (avec néanmoins une légère avance des huîtres sensibles pendant la gamétogenèse en BDV).

- des **milieux intermédiaires**, correspondant à une richesse trophique et/ou des amplitudes thermiques modérées (Auray 2002 et 2004-Marennes Oléron 2002, 2003), caractérisés par des **profils d'occupation gonadique significativement différents**, essentiellement au moment de la ponte puisqu'il est observé chez les huîtres sensibles des **pontes partielles plus marquées suivies d'une régression gonadique plus lente**.



De plus, en utilisant la quantification de la vitelline et des protéines ovocytaires comme indicateur de l'effort de reproduction, les résultats permettent d'identifier deux tendances : 1) un décalage entre R et S de la production de vitelline, plus précoce chez S et donc plus tardive chez R (inversion à partir du 2 juin 2003 où quantité de vitelline supérieure chez R par rapport à S). Il faut noter que la production de vitelline constitue une ressource énergétique riche en lipoprotéine qui est cruciale pour le développement des ovocytes (voir aussi paragraphe 4). et 2) une production supérieure de protéines d'ovocytes chez S (visible au mois de juin, Figure1) suggérant un effort de reproduction supérieur chez S par rapport à R dans ces conditions. Ce phénomène est exacerbé chez les huîtres S placées à 15 cm du sédiment (par rapport à 70 cm) qui affectent un effort supérieur à la synthèse de protéines d'ovocytes (observé du 24 mai jusqu'à la période de mortalité en juin 2003).

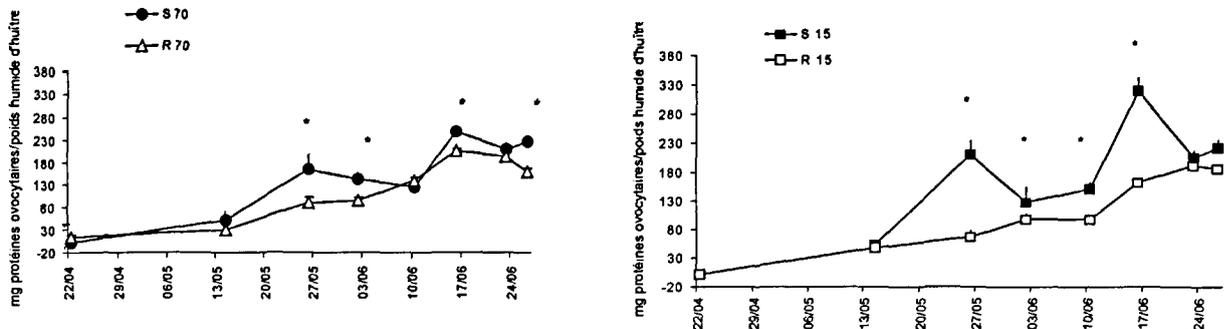


Figure 1 : Quantification des protéines ovocytaires chez les huîtres R et S placées à 15 et 70 cm du sédiment (S15 : huîtres sensibles à 15 cm ; S70 : huîtres sensibles à 70 cm ; R15 huîtres résistantes à 15 cm ; R70 : huîtres résistantes à 70 cm).

Il apparaît donc que la gamétogenèse et l'effort de reproduction des huîtres R et S varient en fonction de l'âge et de l'écosystème et parfois même au sein d'un écosystème en fonction des années. Les milieux dits forçants pourraient "masquer" les différences potentielles de stratégies de reproduction entre les huîtres résistantes et sensibles qui, quant elles sont présentes, semblent indiquer un effort de reproduction supérieur chez S ainsi que la présence de ponte partielle chez les S.

2. Bilan énergétique comparé des souches R et S

Le bilan énergétique sera présenté et synthétisé à partir d'un ensemble d'indicateurs mesurés dans le cadre de ce programme : constituants biochimiques (protéines, glucides, lipides et classes de lipides), charge énergétique adénylique, espérance de croissance ou scope for growth (SFG) tenant compte des paramètres écophysologiques tels que consommation en oxygène. De plus, nous nous sommes également intéressés à la dynamique énergétique en estimant les flux énergétiques glucidiques grâce aux mesures d'expression (ARNm et activité enzymatique) des principales enzymes clés de ce métabolisme.

2.1. Energie disponible dans l'animal : les constituants énergétiques

Les résultats sont issus d'études réalisées à Argenton (Gigarepro 2003, G2) et sur sites ostréicoles à Auray (G1 2002 et G2 2003) et en Baie des Veys (G2 2003). Les données concernent les teneurs en glucides totaux, lipides totaux (% du poids sec) (Delaporte, 2004 ; Delaporte et al., sous presse) et la charge énergétique adénylique qui représente une estimation instantanée de l'énergie cellulaire disponible (Moal et al., 1989). Des mesures d'écophysologie ont été enregistrées à Argenton en 2003 suivant le protocole décrit dans Enriquez-Diaz (2004).

Une analyse de variance globale sur l'ensemble des données (dates et sites confondus) ne montre aucune différence entre les lots R et S sur les trois paramètres biochimiques analysés (Tableau 1). L'analyse séparée des données de terrain et en milieu contrôlé ne permet pas plus de



distinguer les R et S. Aucune différence significative du « scope for growth » n'a été mesurée par les paramètres écophysologiques entre R et S.

Tableau 1 : Moyennes de la charge énergétique adénylique (CEA), des teneurs en glucides et en lipides mesurées au cours des cycles saisonniers en milieu contrôlé et in situ et résultat de l'ANOVA (NS : non significatif au seuil de 5%). La partie supérieure du tableau représente les valeurs in situ (Auray, Baie des Veys) et la partie inférieure les mesures à Argenton.

IN SITU	R	S	ANOVA
CEA	0.71	0.73	NS
Glucides	16.9	16.9	NS
Lipides	10.8	11.8	NS
ARGENTON			
CEA	0.72	0.72	NS
Glucides	13.1	14	NS
Lipides	8.2	8.6	NS

Les variations de glucides et lipides sont fortement imprimées par le cycle de gamétogenèse. Les teneurs en glucides révèlent une accumulation printanière plus ou moins forte de ces constituants puis une consommation de mai jusqu'à août qui coïncide avec l'augmentation des teneurs en lipides (Figure 2). Les teneurs en glucides apparaissent très dépendantes du milieu trophique mais aucune différence n'est observée entre R et S.

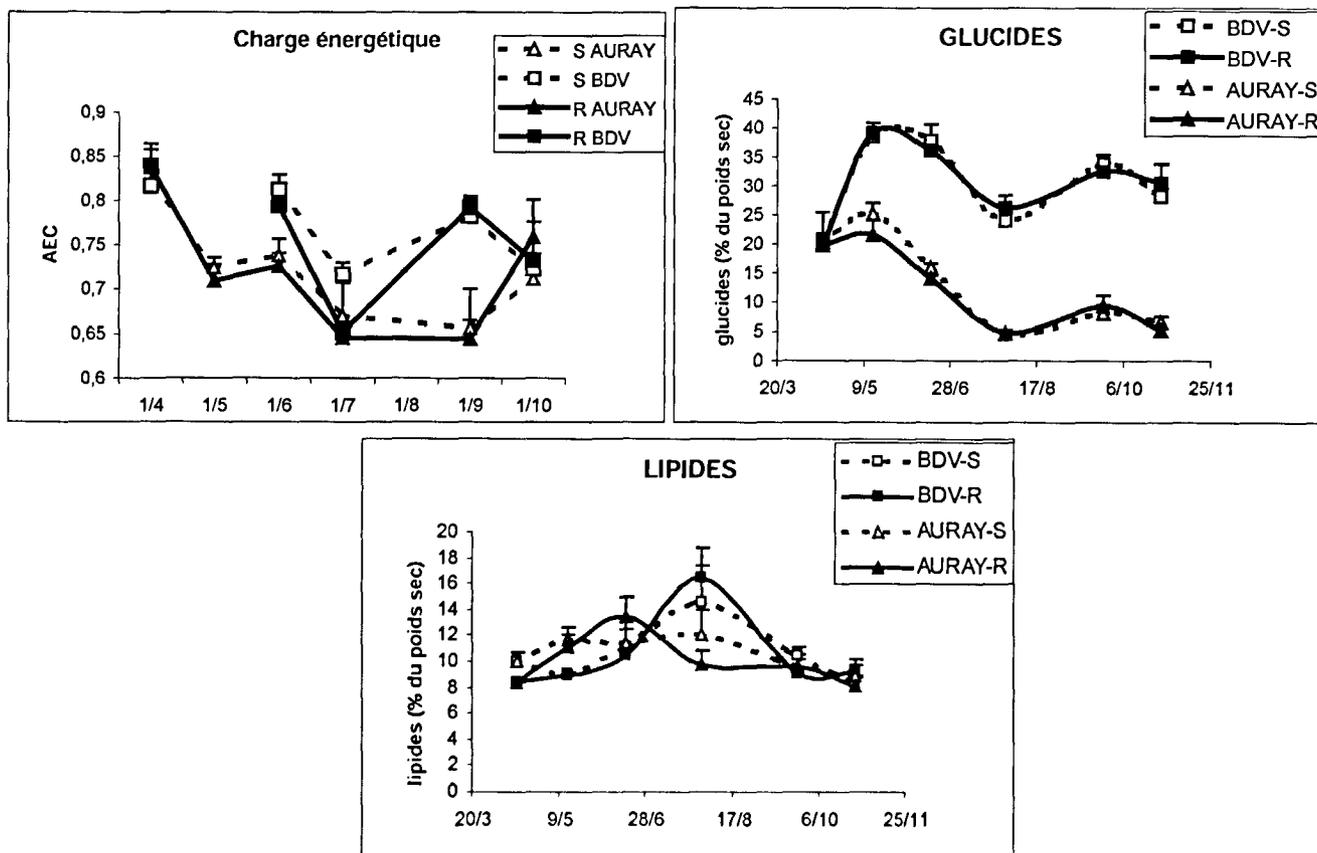


Figure 2 : Moyennes de la charge énergétique adénylique (CEA), des teneurs en glucides et en lipides mesurées au cours des cycles saisonniers en milieu contrôlé et in situ et résultat de l'ANOVA (NS : non significatif au seuil de 5%).



La charge énergétique évolue similairement pour les lots R et S. Les seules différences significatives entre R et S s'observent sur un seul point en BDV ($S > R$) et un point en milieu contrôlé à Argenton ($S < R$) en juillet mais dans un sens opposé.

En conclusion, la majorité des constituants énergétiques dosés, représentatif du bilan énergétique de l'huître, ne montre aucune différence significative entre R et S suggérant un bilan énergétique identique de ces deux lots d'huîtres R et S dans les conditions de l'expérience. Ces résultats ne laissent donc pas présager d'un effet de l'état énergétique sur la survie estivale. Par contre, les quelques différences de charge énergétique observées entre R et S à certaines périodes, en particulier en été, pourraient suggérer des flux, des orientations métaboliques différentes entre R et S. Cette hypothèse sera reprise dans le paragraphe suivant.

2.2. Mesures comparées des voies glucidiques au cours de la période critique précédant l'apparition des mortalités

Le glucose constitue une des sources énergétiques majeures au sein de l'animal et provient soit de la nourriture, soit des réserves constituées en glycogène, soit des acides aminés et du lactate via la néoglucogénèse (Felber & Golay, 1995). Chez les bivalves marins, le glycogène est la source majeure de réserves en glucose. Il est stocké dans des cellules spécialisées vésiculeuses présentes essentiellement dans les palpes labiaux (Berthelin et al., 2000) et est connu pour son rôle central dans l'approvisionnement d'énergie utilisée pour la maintenance et la reproduction (Bayne et al., 1982; Gabbott & Whittle, 1986; Ruiz et al., 1992; Mathieu & Lubet, 1993). C'est pourquoi, après une phase de caractérisation des outils enzymatiques et moléculaires (e.g. Bacca et al., 2005), nous avons mesuré le fonctionnement de ce métabolisme chez les huîtres R et S au cours de la période critique précédant l'apparition des mortalités.

Au cours du conditionnement expérimental Gigarepro 2003 réalisé à Argenton, l'expression de gènes clefs du métabolisme des glucides et les activités enzymatiques correspondantes ont donc été mesurés par PCR en temps réel et ce au cours de la période dite critique (juin-juillet 2003) pour des huîtres (pool de 3 familles G2R et 3 G2S) ayant subi un fort apport nutritif (CN3). L'analyse a été faite sur les palpes labiaux prélevés en 4 pools de 5 individus selon le protocole décrit par Bacca et al. (2005).

Les dosages (quantification relative des niveaux d'ARNm, activité enzymatique) ont été faits pour les enzymes clés du métabolisme glucidique, c'est-à-dire l'hexokinase (HK), la glycogène synthase (GS), la glycogène phosphorylase (GP), la pyruvate kinase (PK), la phosphoglucomutase (PGM), et la phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK). Les niveaux d'ARNm des gènes correspondants ont été rapportés au niveau d'ARNm du gène codant pour la glucose-6-phosphate déhydrogénase (GADH) utilisé couramment comme gène de référence de part son expression constante (Dubos et al., 2003).

De façon synthétique, deux types de profils ont été observés : (1) une nette différence de niveau d'ARNm entre R et S en période critique ($R > S$). C'est le cas des enzymes hexokinase, PGM et PEPCK (Figure 3). Pour l'hexokinase, le dosage de l'activité enzymatique a corroboré ce résultat avec une valeur moyenne pour R de 0.07 ± 0.01 UI/mg significativement supérieure ($p = 0.017$) à celle de S (0.02 ± 0.01 UI/mg protéines totales) ; et (2) aucune différence de niveaux relatifs d'ARNm mesurés pour les autres enzymes impliquées dans le métabolisme des glucides.

Même si aucune différence n'a été observée dans les constituants énergétiques (CEA et glycogène), il apparaît clairement dans ces résultats des différences entre R et S en terme d'expression de gènes (et d'activité enzymatique pour certaines enzymes) impliqués dans le métabolisme des glucides. Ceci suggère que les flux énergétiques (pour la partie glucidique) et leur gestion pourrait être différente entre R et S en période critique. Il faut noter que les mêmes analyses ont été faites en période hivernale et qu'aucune différence n'est apparue entre R et S pour ces voies métaboliques. Considérant les enzymes qui présentent plus d'ARNm et/ou d'activité chez R en période critique, il semblerait que les voies métaboliques permettant de produire du Glucose6P soient activées chez R par rapport à S. La grande différence observée du niveau relatif d'ARNm hexokinase (Figure 3) suggère que cette production accrue chez R puisse venir de l'alimentation dans ces conditions expérimentales (sous alimentation élevée : niveau trophique CN3). Quoiqu'il en soit, nous pouvons émettre l'hypothèse d'un fonctionnement énergétique des glucides différent en période critique entre ces souches qui tournerait en faveur des R avec une potentialité de production de Glucose6P accrue, donc d'ATP, énergie disponible dans l'animal. La différence d'activité



enzymatique pyruvate kinase, observée dans l'animal entier entre R et S en juillet (Figure 4), va dans ce sens et marquerait en aval une production accrue d'ATP chez R par rapport à S.

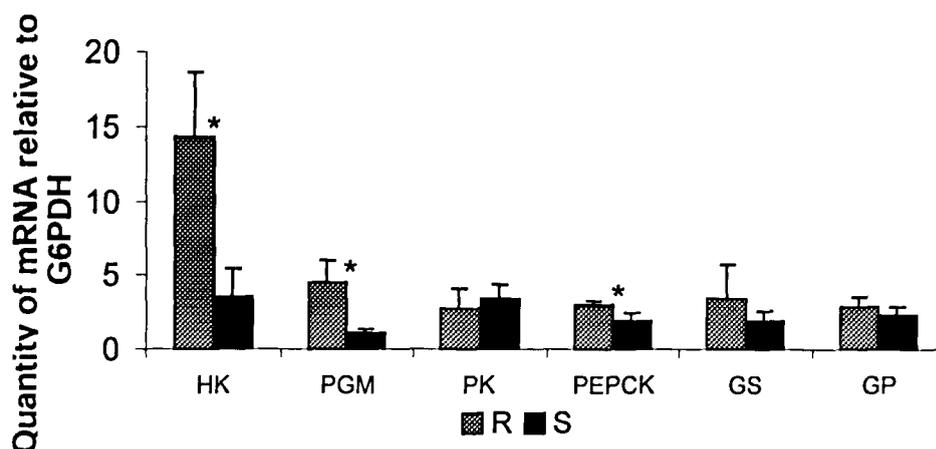


Figure 3 : Quantité d'ARNm (relative au niveau d'ARNm de G6PDH) de Hexokinase (HK), Phosphoglucomutase (PGM), Pyruvate kinase (PK), Phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK), Glycogen Synthase (GS), et Glycogen Phosphorylase (GP) chez les huîtres Résistantes R (barre hachurée) et Sensibles S (barre noire) dans les palpes labiaux au cours de la période critique (Juin) de l'expérimentation Gigarepro2003 à Argenton. Les comparaisons statistiques ont été faites par t-test à 5%, * groupes statistiquement différents entre R et S.

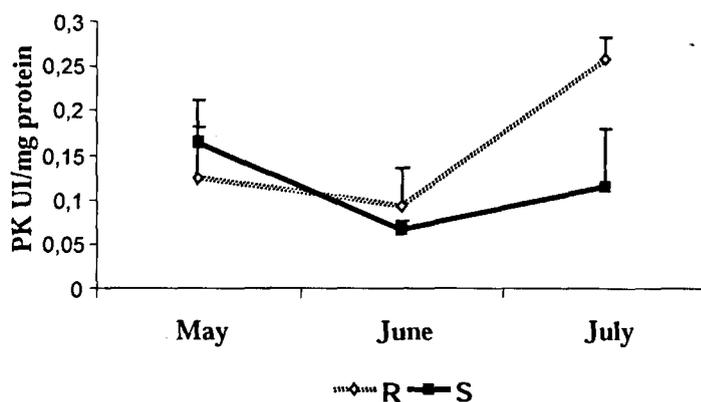


Figure 4 : Activité enzymatique de la pyruvate kinase, exprimée par mg de protéines totales chez les huîtres Résistantes R (barre noire) et Sensibles S (barre rouge) dans un broyage de l'animal entier au cours de la période critique (mai, juin, juillet) de l'expérimentation Gigarepro2003 à Argenton.

2.3. Stratégie d'utilisation de l'énergie durant la période de stress chronique

Au sein de l'expérimentation Dynamor (dont les objectifs étaient de comparer les lots G2 R et S en fonction de la proximité du sédiment au cours de l'élevage, 15 et 70cm), les paramètres biométriques tels que le poids sec, le poids de gonade et le poids de soma des animaux (suivis de mars à juillet 2003) ont permis d'obtenir des informations relatives aux stratégies d'utilisation de l'énergie durant la période de stress chronique.

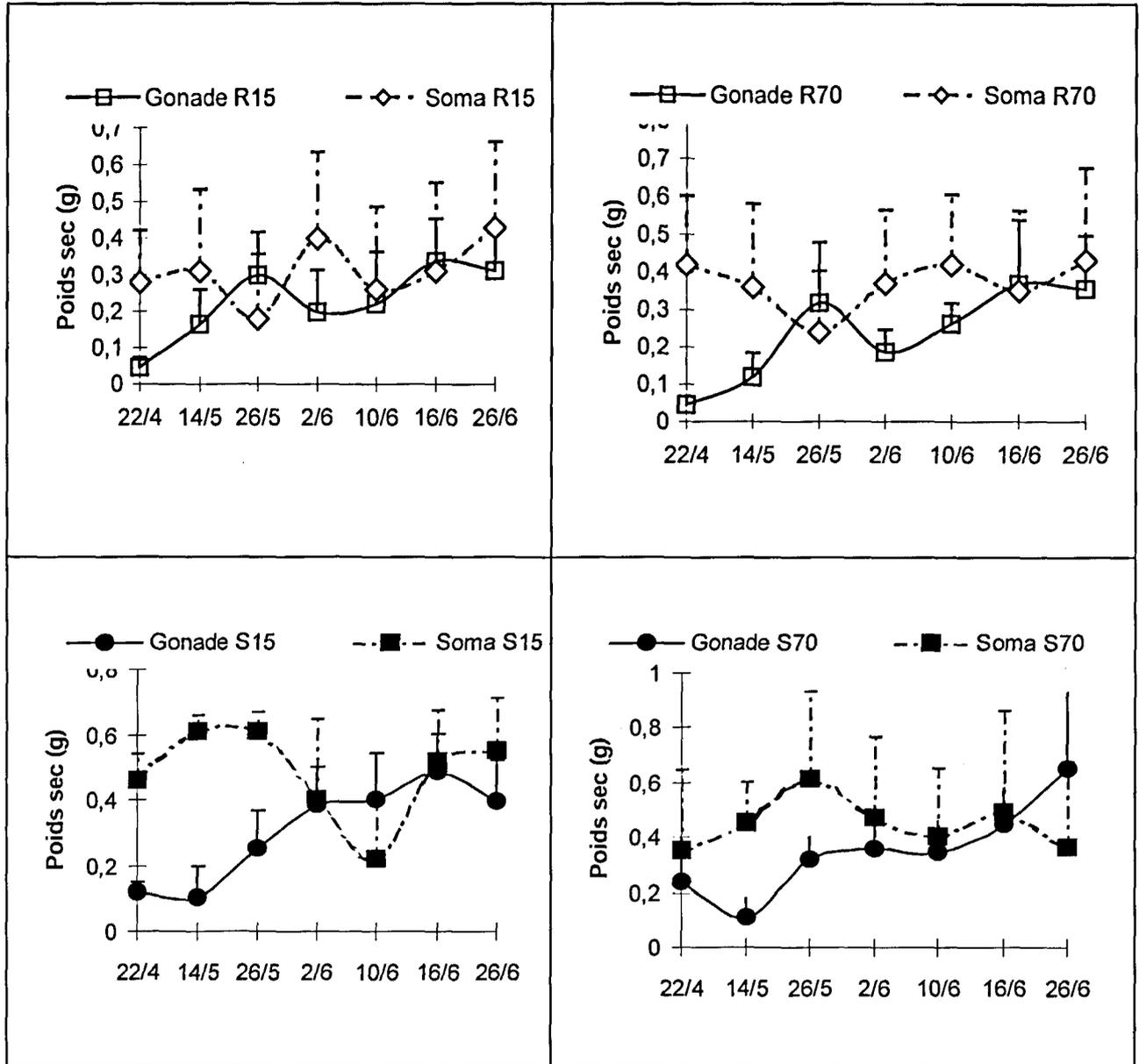


Figure 5 : Evolution des du poids de gonade et du soma en fonction du site et de l'origine R ou S des lots d'huîtres sur le site de Marennes Oléron en 2003.

Ces résultats montrent les points suivants :

- les mortalités surviennent au moment de la chute du poids sec (visible sur les S puisque pour les résistantes (70 cm) la perte d'effectif est seulement de 4 %),
- la perte de poids sec semble proportionnelle à la mortalité,
- quel que soit le niveau d'élevage, les huîtres R semblent cesser le processus de gamétogenèse au profit du soma et ce en mai en conditions environnementales stressantes,
- au contraire, les huîtres S poursuivent leur gamétogenèse durant cette même période et seul le soma chute pendant la crise de mortalité.

Les hypothèses qui peuvent être émises suite à ces résultats sont les suivantes :

- les R adopteraient une stratégie pour « Assurer la survie » avec reconnaissance de l'événement stressant et changement de stratégie de l'allocation d'énergie vers le soma pendant le stress.
- les S présenteraient une stratégie de « maintien de l'effort de reproduction » avec une absence visible de réaction à un événement stressant et le maintien de l'allocation d'énergie à la gonade.



3. Les capacités de Défense des souches R et S

3.1. Introduction

Trois questions majeures se posent sur ces deux lots d'huîtres R et S pour ce qui concerne leurs paramètres hématocytaires :

- Y a-t-il une base génétique aux paramètres hématocytaires ?
- Y a-t-il des différences entre les paramètres hématocytaires d'huîtres provenant de familles sélectionnées comme résistantes (R) ou sensibles (S) ?
- S'il existe des différences, peuvent-elles expliquer la meilleure survie des huîtres R ?

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Base génétique

Pour répondre à cette question, les paramètres hématocytaires de 6 familles G1, notées F7-25, F7-26, F7-27, F9-34, F9-35 et F9-36 ont été comparés après 4 mois d'élevage dans un même site (expérience Cares 2001). De manière à voir l'influence des conditions environnementales sur les paramètres hématocytaires, les 6 familles ont été élevées sur 3 sites : Marennes, rivière d'Auray, baie des Veys. En parallèle, la variabilité des paramètres hématocytaires d'individus (x30) d'une même famille élevés sur un même site a été étudiée.

3.2.2. Comparaison des paramètres hématocytaires des huîtres résistantes et sensibles.

Pour tenter d'aborder cette question, plusieurs expériences ont été menées au cours de ce programme :

- En octobre 2001 (expérience Cares 2001), les paramètres hématocytaires de deux groupes d'huîtres G1 (1 an), l'un caractérisé comme résistant (R) et l'autre comme sensible (S) ont été comparés après 4 mois d'élevage sur les trois sites ateliers du programme (Marennes, Auray, baie des Veys) par une première équipe. En parallèle, d'autres paramètres hématocytaires des mêmes lots ont été analysés par une autre équipe pour le site d'Auray.

- En octobre 2002 (expérience Cares 2002), une expérience identique a été répétée sur la seconde génération de production (G2).

- En 2002, uniquement sur le site d'Auray (expérience TOP FLOP Auray), les paramètres hématocytaires d'un groupe d'huîtres R et S (18 mois, pool de 3 familles G1R et 3 G1S) ont été comparés au cours de l'été (11 juin, 22 août et 11 octobre).

- En 2003 les paramètres hématocytaires d'huîtres G2 R et S (18 mois) élevées en conditions expérimentales à l'écloserie d'Argenton ont été suivies d'avril à septembre (expérience Gigarepro 2). En parallèle, des lots G2 R et S de 18 mois ont été suivis sur le site de Marennes (Dynamor pendant la période estivale et leur taux de phagocytose comparé pendant la période de gamétogenèse active (mi-mai à mi-juin) et pendant la période d'attente de ponte (mi-juin, mi-juillet).

- En 2004 (expérience Vali), des huîtres G3 de 18 mois appartenant soit au groupe R soit au groupe S, ont été maintenues du 11 juin (t0) au 24 juin (t13) en conditions contrôlées (Argenton) en pleine période de gamétogenèse et à 19°C. Leurs paramètres hématocytaires ont été comparés à t=5 et t=13. Une partie des cheptels a été traitée par des antibiotiques (Erythromycine, 10 ppm) pour comparer les paramètres hématocytaires des huîtres R et S en fonction d'une charge bactérienne forte ou faible. De plus, à t=6, une partie des animaux a été soumise à une infection expérimentale (injection de 5.10^6 cellules de *Vibrio aestuarianus* dans le muscle), et les modifications des paramètres hématocytaires des huîtres R et S comparés 24 et 48h après injection.

- Enfin, le taux de phagocytose d'huîtres G1 résistantes et sensibles a été comparé après 7 jours de stress (hypoxie + pesticides), réalisé en conditions contrôlées. Les huîtres ont été acclimatées progressivement (Geret et al., 2006) à une température de 13°C à 19°C pendant 15



jours puis soumises à une hypoxie de 30% et à un mélange de pesticides à 4,5 µg.l-1 en concentration cumulée (glyphosate, métalochlore, fosetyl AI, glyphosate, alachlore, diuron atrazine et terbutylazine).

3.3. Résultats

3.3.1. Base génétique.

L'observation des paramètres hématocytaires des 6 familles élevées dans 3 sites différents montre qu'il existe des différences significatives entre les familles pour les sites de baie des Veys et de rivière d'Auray (capacité de production de RLO par les granulocytes : Figure 6). Pour Marennes, il n'y a pas de différence significative entre les familles. On note également des différences significatives entre les sites (Figure 6), indépendamment des familles, avec par exemple une plus forte capacité de production de RLO par les granulocytes pour les familles d'huîtres élevées en baie des Veys. Les valeurs obtenues à Marennes et en rivière d'Auray ne sont pas significativement différentes.

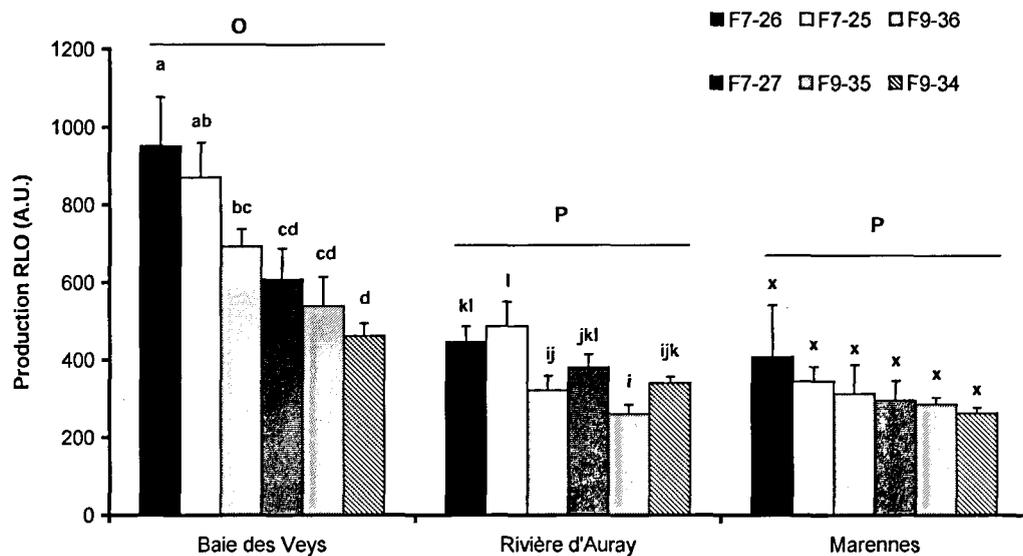


Figure 6: Capacité moyenne ($n = 3 \pm SE$) de production de radicaux libres oxygénés (RLO), en unités arbitraires (A.U.), par les granulocytes d'huîtres creuses *C. gigas* de 6 familles (F7-25, F7-26, F7-27, F9-34, F9-35, F9-36) mesurée en octobre 2001 après 4 mois d'élevage sur 3 sites (baie des Veys, rivière d'Auray et Marennes). Les lettres a-d, i-l, x, indiquent des différences significatives entre famille dans un même site (ANOVA, $p < 0,05$) ; Les lettres o-p, indiquent des différences significatives entre site (MANOVA, $p < 0,05$).

La valeur de la capacité de production de RLO par les granulocytes, mesurée individuellement sur 30 huîtres d'une même famille élevée sur un même site est présentée sur la Figure 7. On note de fortes variations inter individuelles (facteur 7 à 8 entre les valeurs extrêmes).

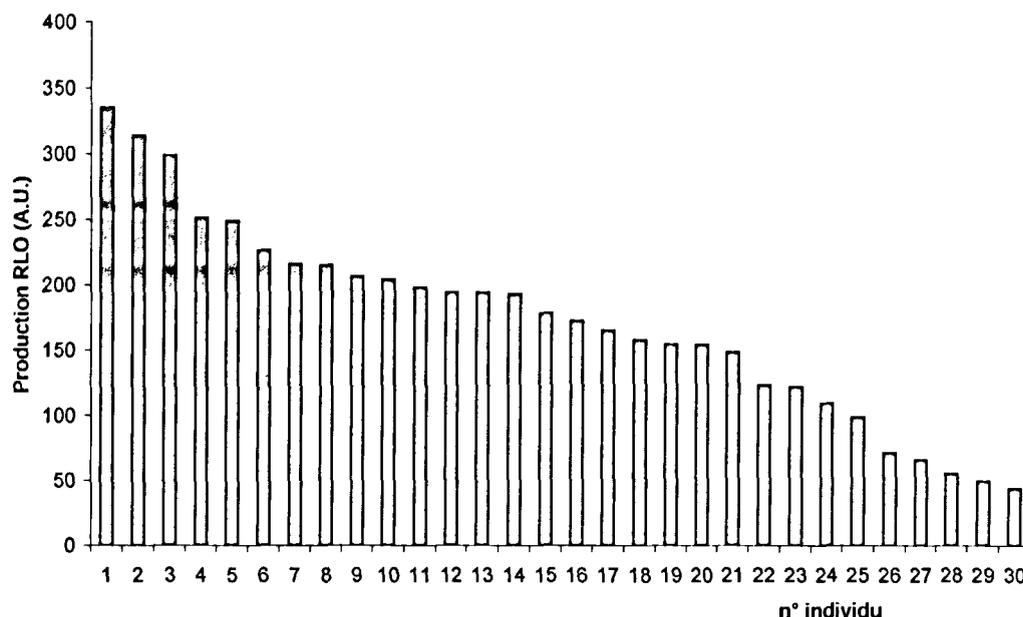
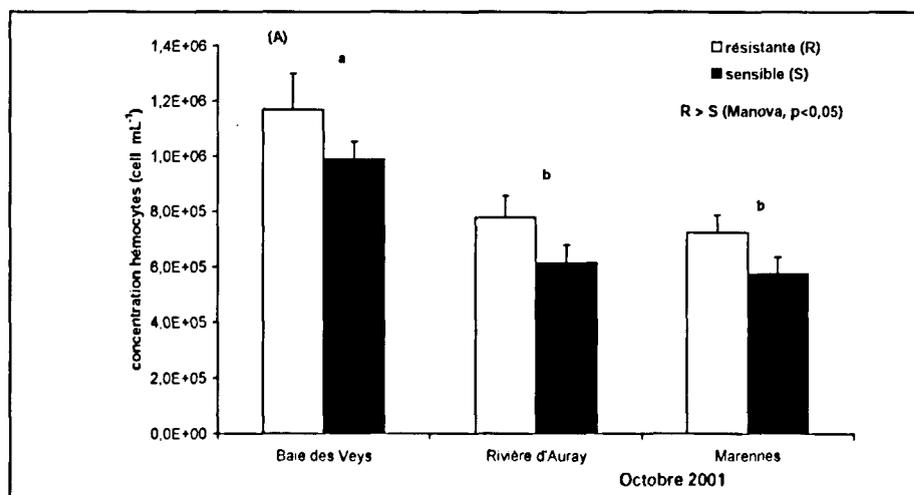


Figure 7: Capacité de production de radicaux libres oxygénés (RLO), en unités arbitraires (A.U.), mesurée individuellement sur les granulocytes de 30 huîtres *C. gigas* d'une famille en octobre 2003 après 4 mois d'élevage sur le site de Marennes.

3.3.2. Paramètres hématocytaires des huîtres résistantes et sensibles.

Les paramètres hématocytaires mesurés sur des huîtres *C. gigas* de 1 an en octobre 2001 et octobre 2002 (Cares 2001 et 2002) après 4 mois d'élevage sur les 3 sites ateliers du programme MOREST sont présentés dans la Figure 8 et dans la Figure 10. On note des variations inter sites, avec des valeurs différentes en Baie des Veys comparées aux deux autres sites de l'étude. Dans l'étude Cares 2001, les huîtres sélectionnées résistantes présentent une plus forte concentration hématocytaire et une plus faible production de radicaux libres (Figure 8).

Une autre étude menée sur les mêmes lots, mais à Auray seulement, montre également que les huîtres R présentent un plus fort taux de phagocytose et un plus grand pourcentage d'activité estérase (Figure 9). En 2002 (Cares 2002), on observe un résultat inverse pour la concentration hématocytaire ($S > R$) et pas de différence pour les autres paramètres (Figure 10).



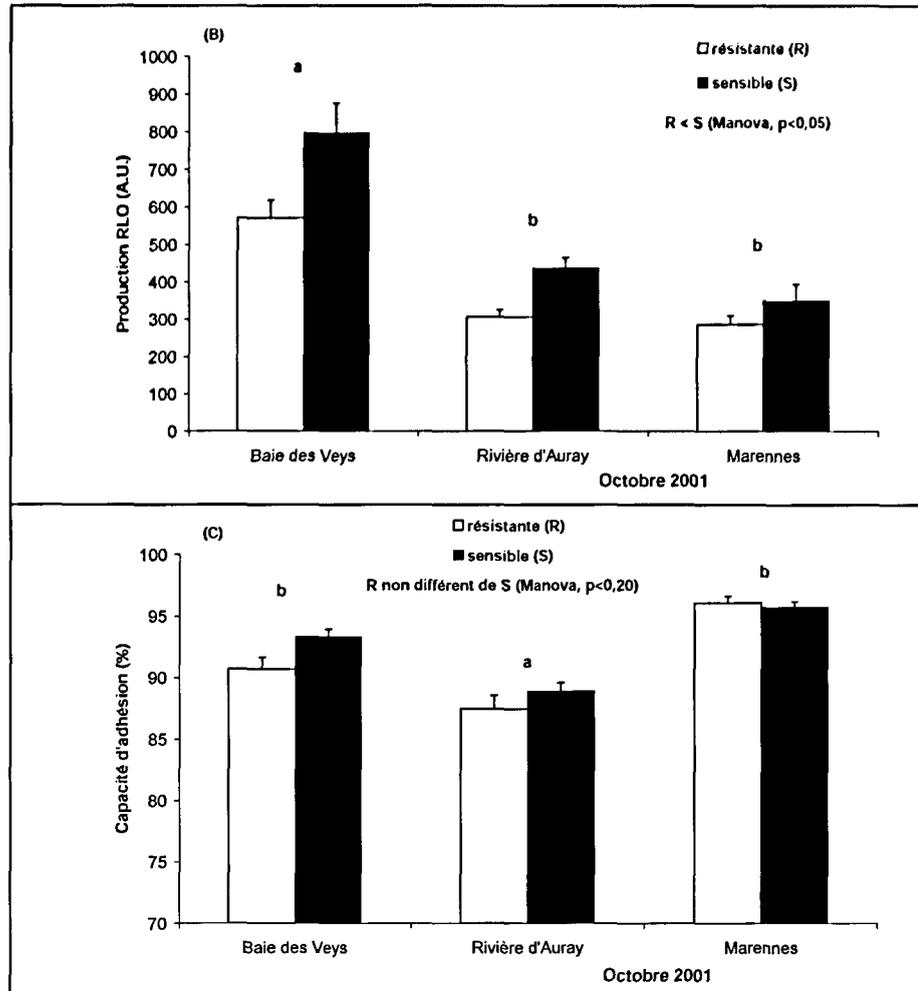


Figure 8 : Comparaison des paramètres hématocytaires d'huîtres *C. gigas* mesurés en octobre 2001 après 4 mois d'élevage, en fonction du site d'élevage et du lot d'huîtres résistant (R) ou sensible (S). A) Concentration hématocytaire moyenne ($n=9 \pm SE$) en nombre de cellules par mL d'hémolymphe circulante. B) Capacité moyenne ($n = 9 \pm SE$) de production de radicaux libres oxygénés (RLO), en unités arbitraires (A.U.) par les granulocytes. C) Capacité moyenne ($n=9 \pm SE$) d'adhésion des hématocytes d'huîtres *C. gigas*. Les mesures sont données en pourcentage de cellules adhérentes après 2 heures d'incubation à 18°C dans l'eau de mer. (Les lettres indiquent des différences significatives entre site, MANOVA, $p < 0,05$).

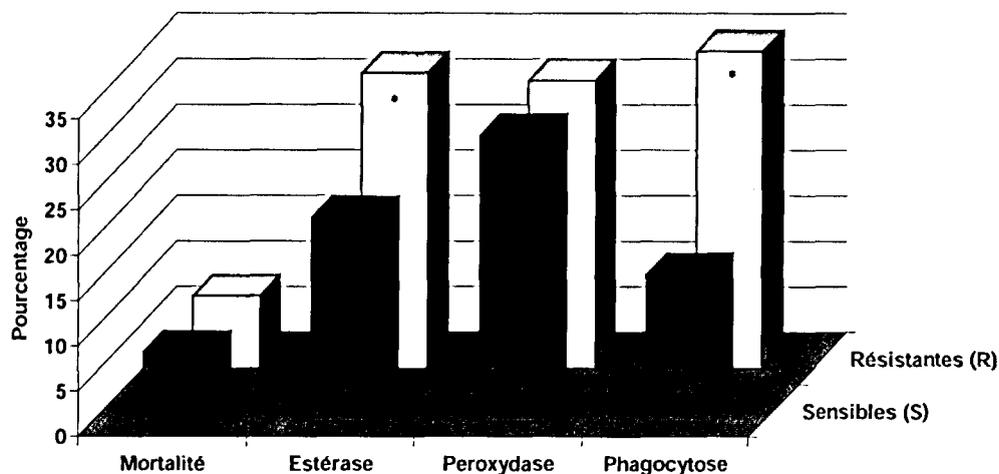


Figure 9 : Comparaison des paramètres hématocytaires d'huîtres *C. gigas* (moyenne, n=3) mesurés en octobre 2001 après 4 mois d'élevage sur le site de la rivière d'Auray, en fonction du lot d'huîtres résistant (R) ou sensible (S). (* : Différences significatives entre R et S).

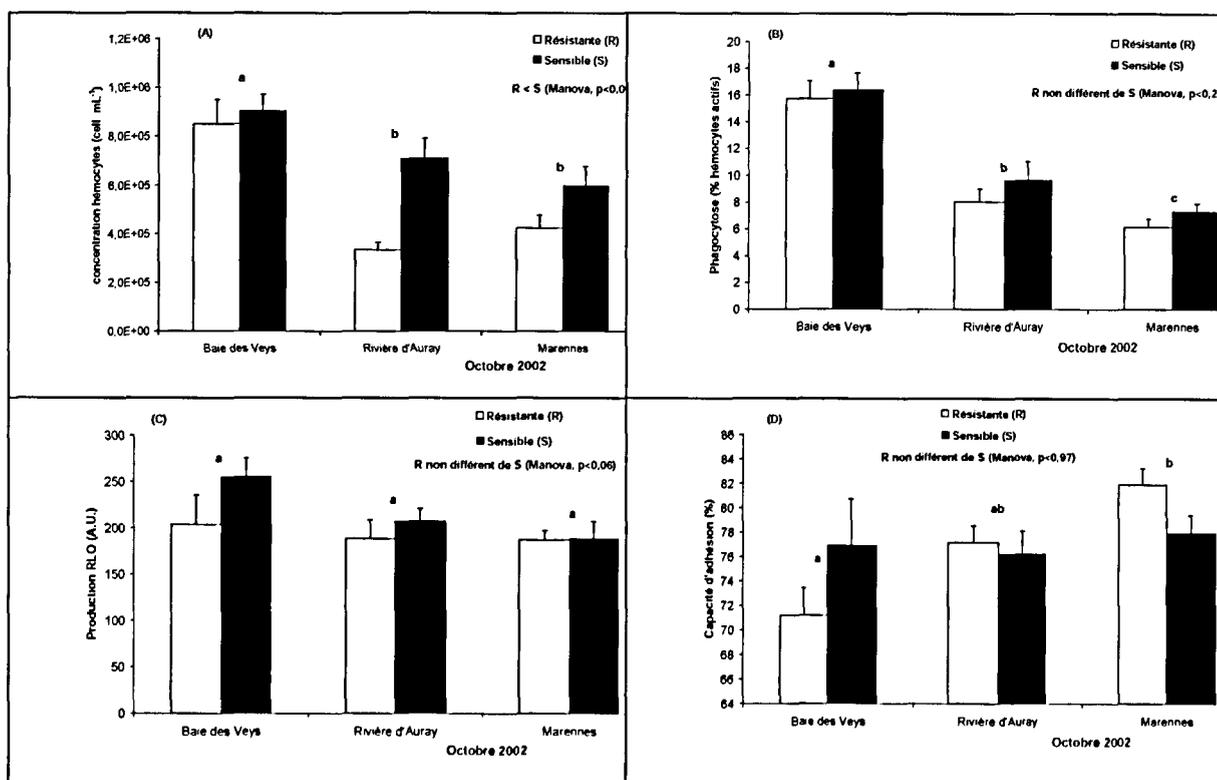


Figure 10 : Comparaison des paramètres hématocytaires d'huîtres *C. gigas* mesurés en octobre 2002 après 4 mois d'élevage, en fonction du site d'élevage et du lot d'huîtres résistant (R) ou sensible (S). A) Concentration hématocytaire moyenne (n=5 à 12 ± SE) en nombre de cellules par mL d'hémolymphe circulante. B) taux de phagocytose moyen (n=5 à 12 ± SE) en pourcentage d'hématocytes actifs capables de phagocyter 3 billes et plus en 2 heures à 18°C. C) Capacité moyenne (n = 5 à 12 ± SE) de production de radicaux libres oxygénés (RLO), en unités arbitraires (A.U.) par les granulocytes. D) Capacité moyenne (n=5 à 12 ± SE) d'adhésion des hématocytes. Les mesures sont données en pourcentage de cellules adhérentes après 2 heures d'incubation à 18°C dans l'eau de mer. (Les lettres indiquent des différences significatives entre site, MANOVA, p < 0,05).



Le suivi des paramètres hématocytaires mené en rivière d'Auray (TOPFLOP) sur des huîtres de 18 mois au cours de l'été 2002, montre que les huîtres R se différencient des S à la date du 11 juin, les hématocytes des huîtres résistantes présentant une plus faible production de radicaux libres et une plus forte capacité d'adhésion (Figure 11).

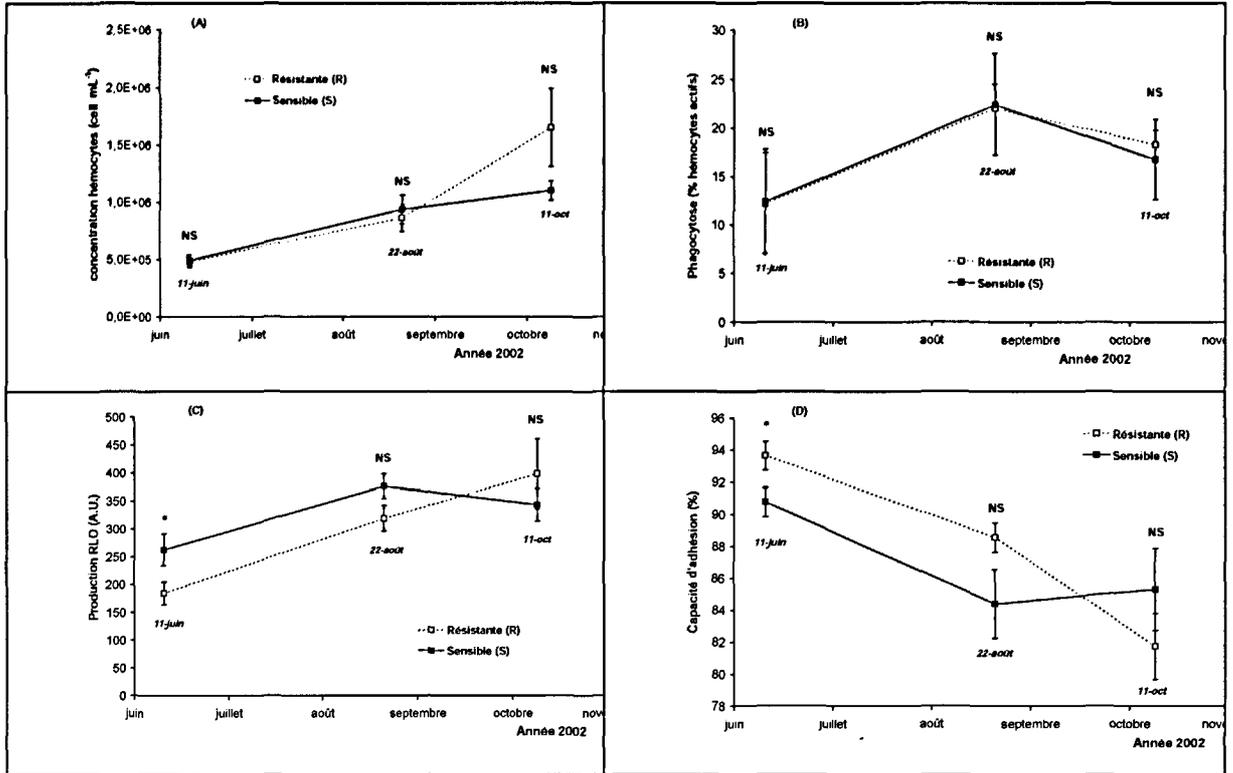
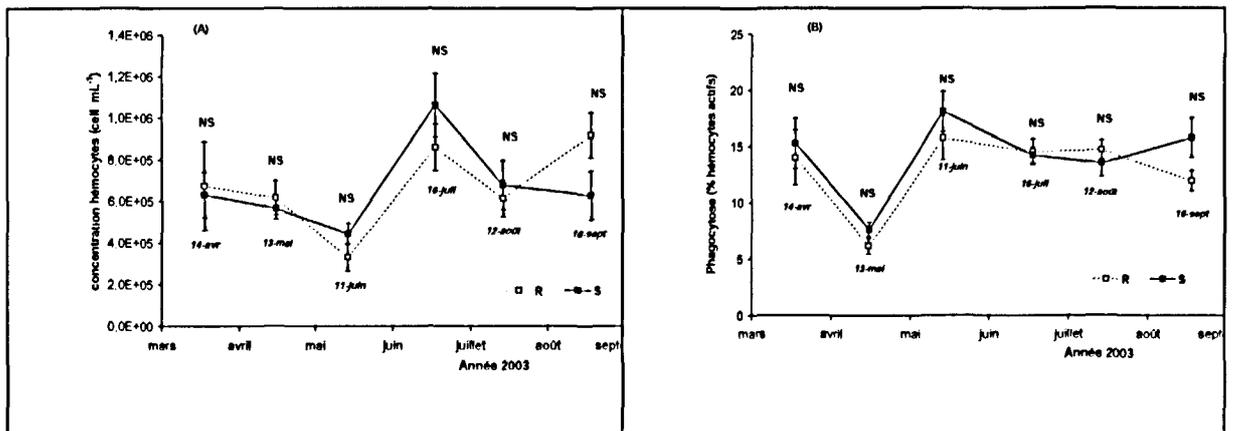


Figure 11 : Comparaison des paramètres hématocytaires d'huîtres *C. gigas* mesurés de juin à octobre 2002 sur le site de la rivière d'Auray en fonction du lot d'huîtres résistant (R) ou sensible (S). A) Concentration hématocytaires moyenne ($n=3 \pm SE$) en nombre de cellules par mL d'hémolymphe circulante. B) taux de phagocytose moyen ($n=3 \pm SE$) en pourcentage d'hématocytes actifs capables de phagocyter 3 billes et plus en 2 heures à 18°C. C) Capacité moyenne ($n=3 \pm SE$) de production de radicaux libres oxygénés (RLO), en unités arbitraires (A.U.) par les granulocytes. D) Capacité moyenne ($n=3 \pm SE$) d'adhésion des hématocytes. Les mesures sont données en pourcentage de cellules adhérentes après 2 heures d'incubation à 18°C dans l'eau de mer. (NS : pas de différence significative entre les lot R et S; * : différence significative, ANOVA, $p < 0,05$).

Au cours du suivi en milieu contrôlé (Gigarepro 2, 2003, Argenton), la production de radicaux libres apparaît significativement inférieure chez les huîtres R pour les prélèvements de mai et de juin (Figure 12), c'est-à-dire au cours des 2 mois précédents l'épisode principal de mortalité.



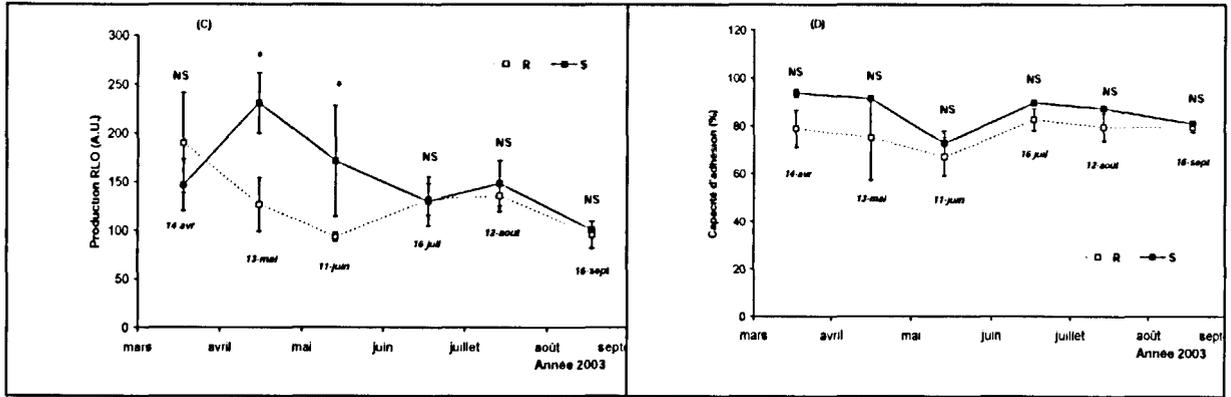


Figure 12 : Comparaison des paramètres hématocytaires d'huîtres *C. gigas* mesurés d'avril à septembre 2003 en conditions contrôlées (écluse d'Argenton), en fonction du lot d'huîtres résistant (R) ou sensible (S). A) Concentration hématocytair moyenne ($n=3$ à $8 \pm SE$) en nombre de cellules par mL d'hémolymphe circulante. B) taux de phagocytose moyen ($n=3$ à $8 \pm SE$) en pourcentage d'hémocytes actifs capables de phagocyter 3 billes et plus en 2 heures à $18^\circ C$. C) Capacité moyenne ($n = 3$ à $8 \pm SE$) de production de radicaux libres oxygénés (RLO), en unités arbitraires (A.U.) par les granulocytes. D) Capacité moyenne ($n=3$ à $8 \pm SE$) d'adhésion des hémocytes. Les mesures sont données en pourcentage de cellules adhérentes après 2 heures d'incubation à $18^\circ C$ dans l'eau de mer. (NS : pas de différence significative entre R et S; *: différence significative, ANOVA, $p < 0,05$).

Le suivi mené à Marennes la même année ne montre pas de différence de taux de phagocytose et ce aussi bien au cours de la période de gamétogenèse active que d'attente de ponte (Figure 13). Les mêmes résultats (données non présentées) ont été enregistrés avec deux autres paramètres, le pourcentage de cellules positives pour les estérases, la présence de lysosomes (Gagnaire, 2005).

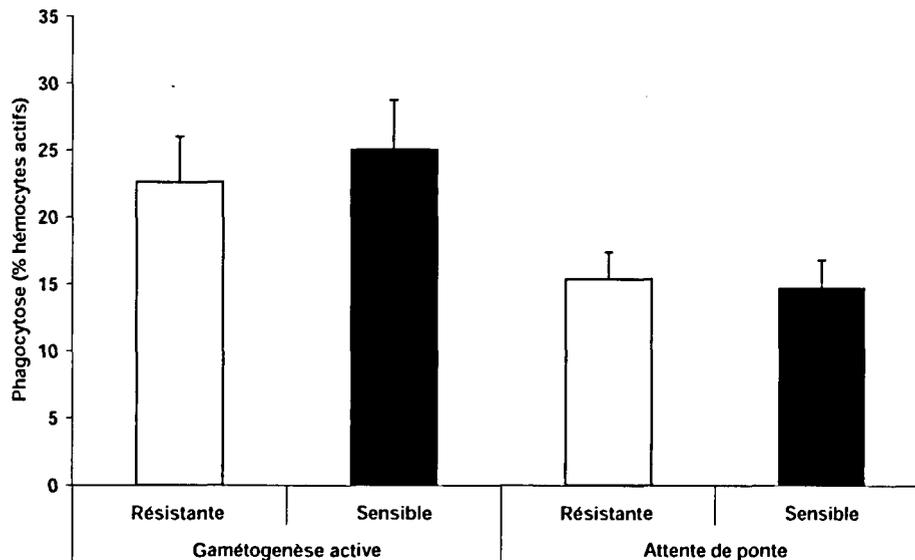


Figure 13 : Comparaison du taux de phagocytose moyen ($n= 27$ à $36 + SE$) des hémocytes d'huîtres *C. gigas* élevés sur le site de Marennes en 2003 en fonction du lot d'huîtres résistant (R) ou sensible (S) et en fonction de la période (gamétogenèse active = mi-mai à mi-juin ou attente de ponte = mi-juin/mi-juillet). Il n'y a pas de différence significative entre R et S.

Les paramètres hématocytaires d'huîtres de 18 mois, maintenues à $19^\circ C$ en pleine gamétogenèse (Vali) montre une plus forte capacité de phagocytose chez les huîtres R ($25,7\% \pm 0,72$ pour les R, $23,6 \pm 0,68$ pour les S, différence significative ANOVA, $p < 0,05$).

Si l'on considère maintenant les paramètres d'huîtres traitées aux antibiotiques et ceux d'huîtres non traitées (= augmentation de la charge bactérienne), on note que pour les huîtres résistantes, la concentration hématocytair augmente (Tableau 2).

L'injection d'un *vibrio* pathogène (*V. aestuarianus*) que ce soit chez les huîtres R ou S entraîne de profondes modifications de leurs paramètres hématocytaires, avec des différences entre les deux groupes (Tableau 3) : après injection, les huîtres R voient leur concentration hématocytair et leur



capacité d'adhésion diminuer significativement tandis que pour les huîtres S, c'est la capacité de phagocytose qui est réduite. Une baisse de production de RLO est par ailleurs observée pour les deux groupes R et S après injection.

Soumis au double stress, hypoxie 30% plus pesticides pendant 7 jours, le taux de phagocytose apparaît plus élevé pour les hémocytes des huîtres R que pour les huîtres S. Cette observation est également valable en cas de stress hypoxique seul (Figure 14).

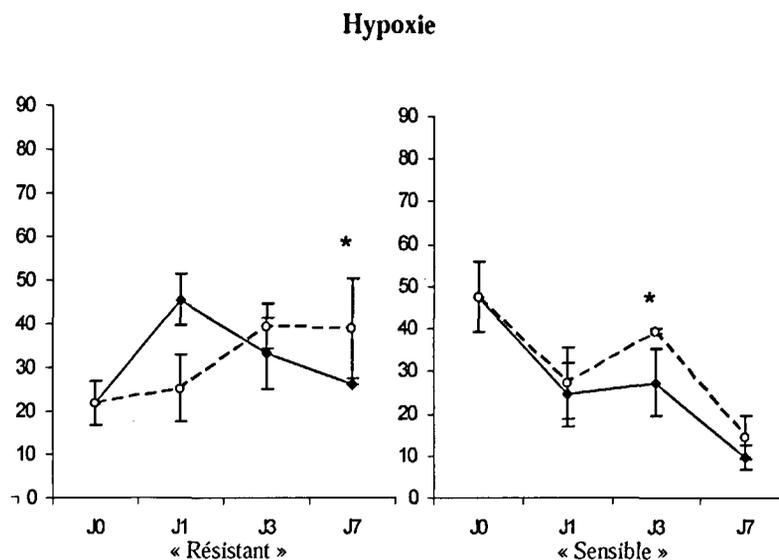


Figure 14 Evolution de l'activité moyenne de phagocytose (% de cellules actives, en ordonnée) des hémocytes d'huîtres R et S lors d'une contamination de 7 jours (en abscisse) aux pesticides dans des conditions d'hypoxie. (* : $p < 0.05$. trait plein : traitement hypoxie seul ; tirets : traitement hypoxie + pesticides).

Tableau 2: Effet de l'augmentation de la charge bactérienne (par comparaison entre des animaux traités ou non par les antibiotiques) sur les paramètres hémocytaires d'huîtres *C. gigas* de 18 mois sélectionnées R (résistante) ou S (sensible) aux mortalités estivales, maintenues à 19°C en pleine gamétogénèse en conditions contrôlées (écloserie expérimentale d'Argenton). (Concentration hémocyttaire: nombre de cellules par mL d'hémolymphe circulante. Taux de phagocytose: pourcentage d'hémocytes actifs capables de phagocyter 3 billes et plus en 2 heures à 18°C. Adhésion: pourcentage de cellules adhérentes après 2 heures d'incubation à 18°C dans l'eau de mer. Production de RLO : capacité moyenne de production de radicaux libres oxygénés (RLO), en unités arbitraires (A.U.) par les granulocytes). (↗: Augmentation significative, Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; →: pas de différence significative, ANOVA ou Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

Effet de l'augmentation de la charge bactérienne	Huîtres R	Huîtres S
Concentration hémocyttaire	↗	→
Phagocytose	→	→
Adhésion	→	→
Production de RLO	→	→



Tableau 3: Effet de l'injection de *Vibrio aestuarianus* sur les paramètres hémostatiques, mesurés 24 et 48h post injection, d'huîtres *C. gigas* de 18 mois sélectionnés R (résistante) ou S (sensible) aux mortalités estivales, maintenues à 19°C en pleine gamétogénèse en conditions contrôlées (écloserie expérimentale d'Argenton). (Concentration hémostatique: nombre de cellules par mL d'hémolymphe circulante. Taux de phagocytose: pourcentage d'hémocytes actifs capables de phagocyter 3 billes et plus en 2 heures à 18°C. Adhésion: pourcentage de cellules adhérentes après 2 heures d'incubation à 18°C dans l'eau de mer. Production de RLO : capacité moyenne de production de radicaux libres oxygénés (RLO), en unités arbitraires (A.U.) par les granulocytes). (↗, ↘: Augmentation ou diminution significative, ANOVA ou Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; →: pas de différence significative, ANOVA ou Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

Effet de l'injection de <i>Vibrio aestuarianus</i> .	Huîtres R	Huîtres S
Concentration hémostatique	↘	→
Phagocytose	→	↘
Adhésion	↘	→
Production de RLO	↘	↘

3.4. Discussion

Une des questions posées dans le cadre de ce thème du programme MOREST est de savoir si les huîtres sélectionnées comme résistantes ou sensibles aux mortalités estivales présentent des capacités de défense différentes qui pourraient expliquer leur survie. Pour répondre à cette question, les paramètres hémostatiques d'huîtres appartenant à ces deux « groupes » ont été comparés au cours de différentes expérimentations. Précisons d'abord que la mesure de ces paramètres n'est qu'une approche du système de défense des bivalves, sachant qu'ils ne varient pas uniquement en cas de stress ou de maladies mais qu'ils sont soumis entre autres, aux conditions environnementales et à l'état physiologique de l'animal (Cheng, 1996, 2000; Chu, 2000). Les variations des paramètres hémostatiques en fonction du site d'élevage mesurées au cours de cette étude confirment d'ailleurs clairement cet état de fait.

Une première question, avant d'aborder les différences entre R et S, était de savoir si des individus différents ou des individus issus de parents différents présentaient des paramètres hémostatiques différents s'ils étaient élevés dans un même environnement. Les résultats montrent qu'il existe une forte variation inter-individuelle ou inter-famille des paramètres hémostatiques. Si ce résultat permet de montrer l'existence vraisemblable d'une base génétique aux paramètres hémostatiques, permettant de justifier la sélection génétique pour tenter d'améliorer le système de défense des huîtres, il pose la question de la maîtrise de cette forte variabilité.

La comparaison des paramètres hémostatiques des huîtres résistantes et sensibles a été réalisée au cours d'expériences de type différent : analyse sur une date en fin d'été sur des animaux de 1 an (Cares 2001, 2002), suivi au cours de l'été in situ (TOP-FLOP, Dynamor), ou en milieu contrôlé (Gigarepro 2, Vali), effet d'un stress, que ce soit la charge bactérienne (Vali, traitement antibiotique et injection de *V. aestuarianus*), le manque d'oxygène (hypoxie) ou les pesticides, sur des animaux de 18 mois.

Deux approches peuvent être proposées pour synthétiser les données observées : une approche globale essayant de relier les valeurs des paramètres hémostatiques mesurés et les mortalités finales des animaux ; une approche plus dynamique s'attardant sur l'évolution dans le temps des paramètres hémostatiques en fonction des événements de mortalités.

En 2001, les plus faibles mortalités des huîtres R au cours de l'été ($\approx 5\%$ contre plus de 30% pour les huîtres S) sont associées à une plus forte concentration hémostatique et à une plus faible production de radicaux libres. Cependant en 2002, seule la concentration hémostatique différencie les huîtres R et S mais ce sont les huîtres sensibles cette fois qui présentent la plus forte concentration. Cette année là, les huîtres R présentent une mortalité de l'ordre de 5% et les S d'un peu plus de 20%. En 2003 à Marennes, malgré un différentiel de mortalité entre R et S important, aucun des paramètres hémostatiques mesurés ne permet de différencier R et S. Ces résultats contradictoires amènent à émettre l'hypothèse que les paramètres hémostatiques, le système de défense, des



huîtres R n'est pas systématiquement différent de ceux des huîtres S mais que le système de défense de ces deux catégories d'huîtres peuvent répondre différemment à un stress, à une maladie, l'un s'adaptant mieux aux perturbations que l'autre.

C'est effectivement ce que l'on observe sous l'effet d'un stress qu'il soit bactérien (injection de *V. aestuarianus*) ou provoqué par la combinaison hypoxie + pesticides. Dans ces conditions, les huîtres R semblent capables de maintenir leur capacité de phagocytose, voire de l'augmenter, alors que les huîtres sensibles voient cette activité réduite. Ce résultat est intéressant quand l'on sait que certaines des molécules constituant le mélange de pesticides ont montré un effet négatif (réduction, inhibition) sur la phagocytose chez d'autres animaux : l'atrazine chez *Lymnaea stagnalis* (Russo & Lagadic, 2004), le carbaryl chez le ver de terre, *Eisenia fetida* (Cooper & Roch, 2003), le glyphosate chez la carpe, *Cyprinus carpio* (Terech-Majewska et al., 2004). Cependant, aucun effet de l'atrazine utilisée seule n'a été observé sur la phagocytose et les autres paramètres hématocytaires suivis chez *C. gigas* lors d'expériences menées *in vivo* et *in vitro* (Gagnaire et al., 2003). L'hypothèse d'un effet combiné des molécules du mélange peut sans doute être proposée (Faust et al., 2001).

Cependant, pour les autres paramètres que la phagocytose, les choses apparaissent moins claires. Enfin, il serait nécessaire de concevoir d'autres expériences pour montrer si ce maintien du taux de phagocytose chez les huîtres R pourrait à l'origine de leur moindre sensibilité aux mortalités estivales.

Au cours du suivi à Auray en 2002 (TOPFLOP), les huîtres R et S ont montré des paramètres hématocytaires différents uniquement en juin, c'est-à-dire entre 15 jours et 1 mois avant l'évènement de mortalité qui provoquera au final 4% de mortalité chez les R et environ 15% chez les S. A cette date, les hémocytes des huîtres S présentent notamment une plus forte production de radicaux libres et une plus faible capacité d'adhésion. On retrouve cette plus forte capacité de production de radicaux libres oxygénés chez les huîtres sensibles dans le cadre de l'expérience en condition contrôlée Gigarepro 2 pendant les deux mois précédant l'évènement de mortalité. A noter cependant, qu'à la fin de cette expérience en milieu contrôlé, les huîtres R présenteront des mortalités de 12% contre 15% aux huîtres sensibles, soit un différentiel limité.

La question se pose cependant de savoir à quoi est due cette différence de production de radicaux libres entre huîtres sensibles et résistantes avant la période de mortalité et si elle peut expliquer les évènements de mortalités à suivre. La synthèse de molécules oxydantes dans les hémocytes est un mécanisme connu de défense contre les agressions externes (Torreilles et al., 1996; Roch, 1999; Canesi et al., 2002). Cependant, si ces molécules ont un effet microbicide connu, elles peuvent aussi présenter un effet délétère sur les propres cellules de l'huître. Les radicaux libres oxydants produits en excès peuvent agir à différents niveaux et induire notamment des phénomènes de peroxydation des lipides, d'oxydation de protéines, de dommages à l'ADN, d'oxydation des glucides et de façon ultime, la mort cellulaire (Manduzio et al., 2005). Afin de limiter ces dommages cellulaires, la production et l'action des radicaux libres oxydants peut être contrôlée par un certain nombre de molécules antioxydantes (glutathion, Vitamines C et E, polyphénols,...) et par des enzymes à activité antioxydante, c'est à dire capables de détruire les radicaux libres oxydants. Les principales enzymes antioxydantes sont les superoxyde dismutases Cu/Zn et Mn dépendantes (SOD), la catalase, les glutathion peroxydases séléno-dépendantes et indépendantes (GPX), les glutathion S-transférases et la glutathion réductase (Manduzio et al., 2005). L'augmentation de la production de radicaux libres oxydants chez les huîtres S pourrait s'expliquer par un système de régulation antioxydant défaillant. Il existe de fait des cas où le caractère de résistance d'un mollusque à un parasite pathogène est du à un meilleur système enzymatique anti-oxydant (Goodall et al., 2004). Cependant, dans le cas des huîtres résistantes ou sensibles aux mortalités estivales, il s'agit d'une résistance ou d'une sensibilité globale et pas à un agent pathogène précis. La différence entre les deux groupes au niveau de leur système de défense peut donc être multiple.

Cette augmentation de production de radicaux libres des hémocytes d'huîtres sensibles pourrait aussi s'expliquer par une plus forte réactivité à un stress ou à une infection. Il a été montré *in vitro* que certaines bactéries ont un effet sur la production de radicaux libres oxydants par les hémocytes d'huîtres (Bramble & Anderson, 1997; Bramble & Anderson, 1998; Lambert & Nicolas, 1998; Lambert et al., 2003; Labreuche et al., 2006). Cependant, cet effet est variable en fonction de la souche étudiée, soit en inhibant cette production (Lambert & Nicolas, 1998; Lambert et al., 2003) soit en l'activant dans le cas des produits extra cellulaires de la bactérie pathogène *V. aestuarianus*. (Labreuche et al., 2006). Au cours de ce programme (expérience Vali) l'augmentation de la charge bactérienne n'a pas entraîné de modification de la production de radicaux libres oxydants chez les



huîtres sensibles. De plus, l'injection de *V. aestuarianus* provoque non pas une hausse mais une baisse de cette production 48 heures après l'infection, aussi bien chez les huîtres R que S. Cependant dans ce cas, les animaux étaient en période de mortalité et non pas 1 ou 2 mois avant.

Au final, sur la base des données acquises, il apparaît donc difficile de conclure à l'effet ou non d'une infection précoce pour expliquer les valeurs plus fortes de production de radicaux libres observées chez les huîtres sensibles, avant la mortalité.

D'autres facteurs sont connus pour déclencher un stress oxydatif, comme les xénobiotiques (Torreilles et al., 1996; Auffret et al., 2002), les chocs thermiques (Abele et al., 2002) et les phénomènes liés à l'oxygène - anoxie, hypoxie, hyperoxie (Hermes-Lima et al., 1998). Si la présence d'un stress lié au relargage par le sédiment de molécules toxiques peut être évoqué dans le cas du suivi à Auray (TOPFLOP), ce type d'explication n'apparaît pas fondé dans le cas de l'expérience en milieu contrôlé.

En conclusion, il apparaît qu'il existe probablement une base génétique aux paramètres hématocytaires des huîtres. Cependant, les paramètres hématocytaires des huîtres sélectionnées comme résistantes ne sont pas systématiquement différents de ceux des huîtres sensibles particulièrement dans les cas de faible pression de mortalités. Dans ces cas, ce sont les conditions environnementales ou l'état physiologique des animaux qui modulent les paramètres hématocytaires. L'hypothèse d'une meilleure réponse adaptative des paramètres hématocytaires des huîtres résistantes en cas de forte pression de mortalités, de stress prononcé, reste la plus plausible. Cependant, compte tenu de la forte héritabilité du caractère « survie aux mortalités » sur l'estran, l'explication de cette meilleure survie par une amélioration des paramètres hématocytaires, une amélioration du système de défense, ne peut être que partielle.

4. Réponses aux stress des souches R et S

4.1. Etude expérimentale du métabolisme d'adaptation des huîtres R et S en conditions d'hypoxie et pesticides

4.1.1. Stress oxydant

L'étude de stress hypoxique et pesticides a été réalisée en conditions contrôlées pour évaluer les capacités métaboliques d'adaptation des huîtres de familles G1 R et S dans deux conditions stressantes proches du terrain. Les huîtres ont été acclimatées progressivement (Geret et al., 2006) à une température de 13°C à 19°C pendant 15 jours avec un apport de nourriture composé de *Skeletonema costatum* (250g de pâte congelée pour 100L soit environ 500 millions de cellules par jour). 300 individus de famille résistante et 300 individus de famille sensible ont été maintenus dans des bacs de 1200L. Des expositions en condition d'hypoxie (30%) et aux pesticides ont été conduites. Le mélange de pesticides (Tableau 4) a été sélectionné sur la base des tonnages utilisés dans le bassin versant de la Charente et à partir de concentrations de molécules actives analysées dans la Seudre et dans la Charente (Léonard, 2003). Les molécules actives, composant le mélange, étaient au nombre de huit (glyphosate, métolochlore, fosetyl AI, glyphosate, alachlore, diuron atrazine et terbutylazine).

Tableau 4 : Concentrations d'exposition testées pour le mélange de pesticides. La concentration cumulée de pesticides (4,5 µg.l⁻¹) représente des niveaux détectables dans le bassin de Marennes Oléron en estuaire de Seudre.

Concentration µg.l ⁻¹	Carbaryl	Métolochlore	Fosetyl AI	Glyphosate	Alachlore	Diuron	Atrazine	Terbutylazine
4.5	0.05	0.5	0.6	0.7	0.8	0.5	0.7	0.6

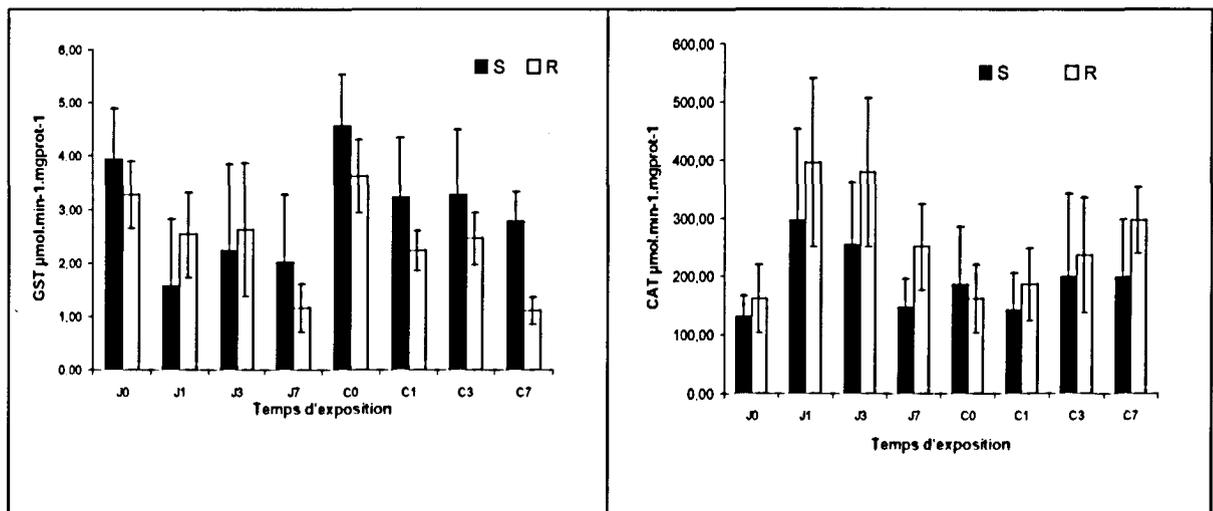
Les biomarqueurs d'activité antioxydante ont été analysés pour caractériser les variations de l'effort métabolique d'adaptation dans le cas d'un stress produit par hypoxie et par un mélange de pesticides (Burgeot et al., 2006). Les activités enzymatiques catalase (CAT), Glutamine synthétase (GS), glutathion-s-transférase (GST), les quantités de métallothionéines (MT) et de protéines de



choc thermique (HSP70) ont été analysées dans la glande digestive ou les branchies suivant les méthodes décrites par Burgeot et al. (2006) pour évaluer l'activation du métabolisme antioxydant des huîtres R et S en situation de stress.

Les variations du stress oxydant (surproduction d'espèces réactives de l'oxygène) induites par une hypoxie de 30% ont été évaluées avec les biomarqueurs d'exposition HSP70, GS, CAT, GST. Une hypoxie 30% provoque un stress oxydant plus important que l'exposition aux pesticides (à la concentration environnementale $4,5 \mu\text{g.L}^{-1}$), excepté pour les MT (Figure 15) . En condition d'hypoxie, les activités enzymatiques CAT et GS augmentent significativement ($p < 0,01$) après un et trois jours d'exposition et les activités GST décroissent dès le premier jour d'exposition. Les quantités de MT augmentent à partir du septième jour d'exposition et les HSP70 croissent significativement le troisième jour chez les huîtres S.

Les profils de réponses entre les huîtres R et S sont également différents. Cette différence est particulièrement significative ($p < 0,001$) pour les HSP70 mesurées dans les branchies qui sont très supérieures chez les huîtres S alors que les HSP70 des huîtres R sont stables durant l'exposition de sept jours (Figure 15). L'acclimatation préalable des huîtres à une augmentation progressive de la température de 13°C à 19°C pendant 15 jours peut expliquer des valeurs J0 d'HSP70 déjà élevées chez les huîtres S. Les valeurs plus élevées d'HSP70 de J0 jusqu'à J7, pourraient être interprétées comme une activation privilégiée des protéines de choc thermique chez les huîtres S. Ces protéines constitutives jouent un rôle clé dans la stabilisation de la structure des protéines néo-synthétisées ou dans le transport de protéines sous forme active ou non dans les différents compartiments cellulaires (Boutet et al., 2003). Une plus grande activation des HSP70 par les huîtres S semblerait indiquer une capacité à mobiliser plus activement des protéines constitutives alors que les huîtres R montrent plus d'aptitude à réguler les activités enzymatiques GS et CAT en condition d'hypoxie comme en condition d'exposition aux pesticides. La plus grande sensibilité des HSP70 chez les huîtres S apparaît en concordance avec une plus grande fragilité des S illustrée avec la phagocytose (Cf paragraphe 3 précédent). La CAT est impliquée dans l'élimination de peroxyde d'hydrogène formé dans le cas de stress oxydant. La perturbation de la GS favorise l'accumulation du glutamate qui devient toxique. L'activité enzymatique CAT mais également l'activité GS (plus étudiée chez les vertébrés) sont des biomarqueurs impliqués dans des mécanismes de défense antioxydant. Ils illustrent une voie d'activation métabolique qui semble privilégiée par les huîtres R. Cette différence de capacité de régulation métabolique des R et des S est également identifiable avec une plus grande expression des MT et une plus grande inhibition ($p < 0,001$) des activités enzymatiques GST des huîtres S à 7 jours d'exposition. Les MT sont directement impliquées dans la régulation de l'homéostasie et des métaux intracellulaires (Tanguy *et al.*, 2001) mais elles sont également liée au cycle de reproduction chez les bivalves (Gagné & Blaise, 2003). Les GST catalysent la conjugaison de glutathion avec des xénobiotiques et leurs métabolites dans un mécanisme de détoxification de phase 2. Les GST peuvent également intervenir dans le métabolisme des stéroïdes (Loise et al., 1996). Le lien potentiel des MT et GST avec la gamétogenèse pourrait expliquer une modulation plus active chez les huîtres S privilégiant un effort de reproduction.



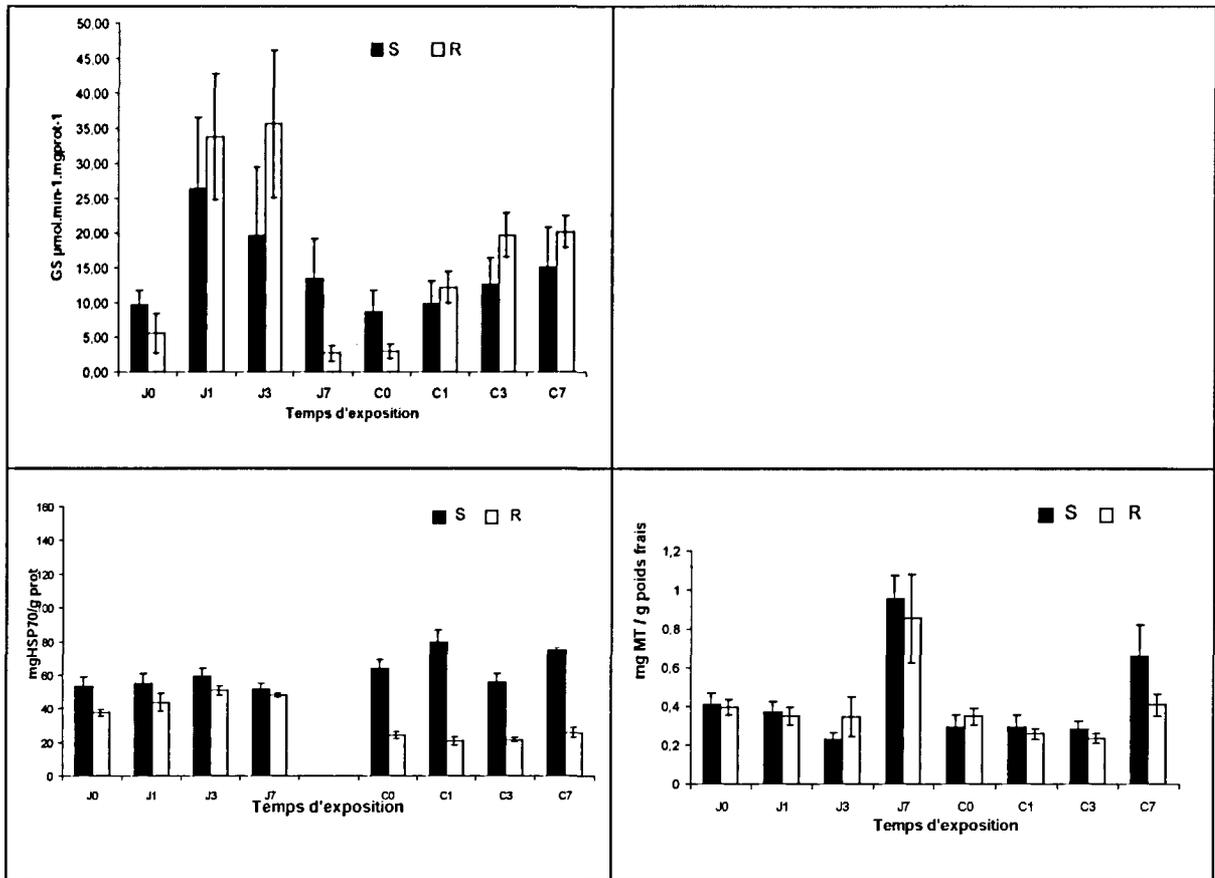


Figure 15 : Variations de biomarqueurs de défense antioxydant (catalase :CAT ; glutathion-s-transférase :GST ; Glutamine synthétase :GS ; Métallothionéine MT ; Protéines de choc thermique : HSP70) dans le cas d'exposition au stress hypoxique 30% (J0 à J7) et dans le cas d'exposition aux pesticides (C0 à C7) pendant 7 jours.

En conclusion, les huîtres R et S montrent des capacités de régulation privilégiant l'activation de mécanismes enzymatiques et protéiques différents. Les huîtres R et S manifestent également une plus grande sensibilité à un stress hypoxique (hypoxie 30%) qu'aux concentrations de pesticides détectables dans l'estuaire de la Seudre (Figure 15). Un effet pesticide est cependant observable le troisième jour d'exposition avec les activités GS et CAT. L'activation des biomarqueurs précoces CAT et GS apparaît donc avant le quatrième jour d'exposition qui est marqué par une chute du SFG (Figure 15) en réaction à la toxicité des pesticides (testé à une concentration environnementale $4,5 \mu\text{g.L}^{-1}$). Les MT et la GST caractérisent une réponse plus tardive le septième jour d'exposition et supérieure chez les huîtres S lorsque la valeur du SFG remonte. Cet effet pesticide est identifié dans le cas de concentrations environnementales et pour un mélange représentatif des molécules actives les plus épanchées dans le bassin versant de l'estuaire de la Seudre et de la Charente. Les conditions de stress hypoxique et pesticides testées n'entraînent pas de mortalité des huîtres et les effets observés avec les biomarqueurs d'exposition sont des effets subléthaux. Ils signifient que les capacités d'adaptation des huîtres sont stimulées mais pas dépassées. Cependant l'activation de mécanismes subcellulaires différents entre les huîtres R et S pourrait entraîner des différences dans l'utilisation des ressources métaboliques. Smolders et al. (2004) a ainsi démontré, chez la moule zébrée d'eau douce *Dreissena polymorpha*, qu'une réduction ou une perturbation des réserves énergétiques au niveau cellulaire pouvait avoir une influence sur les performances des individus comme la croissance et la reproduction. Dans le cas de notre étude, un lien pourrait exister entre la spécificité d'activation métabolique des huîtres S et leur stratégie de production de protéines ovocytaires. Une énergie préférentiellement allouée à la reproduction des huîtres S pourrait favoriser une activation plus tardive du système antioxydant en privilégiant la synthèse de protéines constitutives comme les HSP. Les huîtres R réduisant leur effort de reproduction, privilégieraient en cas de stress des voies d'activation enzymatique plus précoces comme l'activité catalase et peut être moins coûteuses sur le plan énergétique.



4.1.2. Stress génotoxique

L'exposition des huîtres G2 R et S a été testée avec mélange de molécules actives de pesticides les plus utilisées en tonnage dans le bassin versant de la Charente et de la Seudre. Une concentration cumulée de ces molécules actives ($24,5 \mu\text{g.l}^{-1}$) considérée comme très élevée pour le milieu marin a été testée afin de confirmer la génotoxicité potentielle des pesticides chez l'huître (Tableau 2).

Tableau 5 : Concentrations d'expositions testées pour le mélange de pesticides. La concentration $24,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ représente une forte concentration détectée en Méditerranée (Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, 2002).

Concentration $\mu\text{g.l}^{-1}$	Carbaryl	Métalochlore	Fosetyl Al	Glyphosate	Alachlore	Diuron	Atrazine	Terbutylazine
24,5	0,2	2	2	2	2	4	6	6

Cette concentration élevée est néanmoins détectée en Méditerranée (Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, 2002). Elle démontre l'apparition d'altérations primaires de l'ADN appelées adduits à l'ADN (Figure 16). Les métabolites produits par les huîtres à partir des molécules chimiques assimilées sont majoritairement excrétés mais une partie reste dans les tissus et s'accroche à l'ADN par liaison covalente. Les adduits à l'ADN permettent de caractériser un stress génotoxique liée à la présence de contaminants chimiques métabolisés dans l'organisme. Des adduits à l'ADN ont été détectés chez les huîtres R et S après 7 jours d'exposition à un mélange de pesticides. Un même profil qualitatif des adduits ADN est observable entre R et S. La méthode utilisée (Akcha *et al.*, 2003) ne permet pas de préciser quelles molécules de pesticides sont responsables de la formation d'adduit à l'ADN. Cependant, sur la plan quantitatif, les branchies des huîtres R présentent un taux d'adduits de 2 pour 10^9 nucléotides alors que le taux d'adduits chez les S est de 0,5 pour 10^9 nucléotides. Le nombre d'adduits par 10^9 nucléotides est 4 fois plus élevé chez les huîtres R. Ce résultat illustre une plus grande sensibilité des huîtres R au stress génotoxique résultant d'une exposition aux pesticides. Un même profil d'adduits à l'ADN caractérise un stress identique entre R et S. Cependant, la production supérieure d'adduits à l'ADN pourrait être soit en relation avec une moindre capacité de réparation des dommages de l'ADN soit liée à un effort métabolique plus important chez les R qui entraînerait une plus grande production de métabolites susceptibles d'endommager l'ADN en formant des adduits.

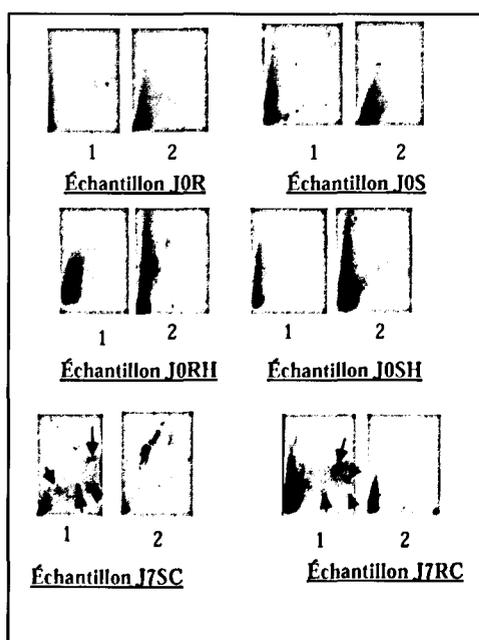


Figure 16 : Autoradiographie montrant des adduits à l'ADN dans les branchies des huîtres témoins (J0R et J0S) ou exposées aux pesticides (J7SC : 7 jours d'exposition d'huîtres S au mélange de pesticides à la concentration C de $24,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ et J7RC : 7 jours d'exposition d'huîtres R au mélange de pesticides à la concentration C de $24,5 \mu\text{g.l}^{-1}$). Deux films radiographiques sont



effectués par échantillon. Aucun spot n'apparaît dans les échantillons témoins J0R et J0S et dans les échantillons soumis à l'hypoxie J0RH et J0SH. Quatre spots sont identifiés (→) chez les résistantes et les sensibles (J7SC et J7RC).

4.2. Effet de l'exposition aux pesticides sur l'utilisation de l'énergie

Les conditions d'exposition au stress issu d'une exposition aux pesticides pendant 7 jours sur un lot témoin et un lot exposé sont décrites par Geret et al. (2006). Les concentrations en pesticides correspondent aux concentrations rencontrées dans les eaux continentales se jetant dans le bassin de Marennes-Oléron (Léonard, 2002). Elles sont les suivantes : Carbaryl : $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$, Diuron : $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$, Métolachlore : $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$, Fosetyl Al. : $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$, terbuthylazine : $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$, Glyphosate : $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$, Atrazine : $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$, Alachlore : $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$. La concentration cumulée est de $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Les résultats écophysologiques, représentés dans cette étude par l'évolution du scope for growth (SFG) (Warren & Davis, 1967) ont mis en évidence des comportements distincts entre les individus R et S en présence de pesticides (Figure 17). Les analyses de variance ont montré des différences hautement significatives chez les huîtres résistantes entre le lot témoin et le lot exposé aux pesticides ($p < 0.001$) ainsi que pour le lot exposé en fonction du facteur date ($p < 0.001$). Les individus, en contact avec les pesticides, témoignent d'une activité écophysologique inférieure au lot témoin avec une chute significative du SFG le 4^{ème} jour suivi d'une remontée le jour 7. En revanche, les analyses statistiques n'ont pas montré de différence significative sur l'évolution du SFG entre les animaux S exposés et S témoins ($p = 0.914$). On peut cependant constater une chute de l'activité écophysologique (non significative) le 4^{ème} jour tout comme chez les R.

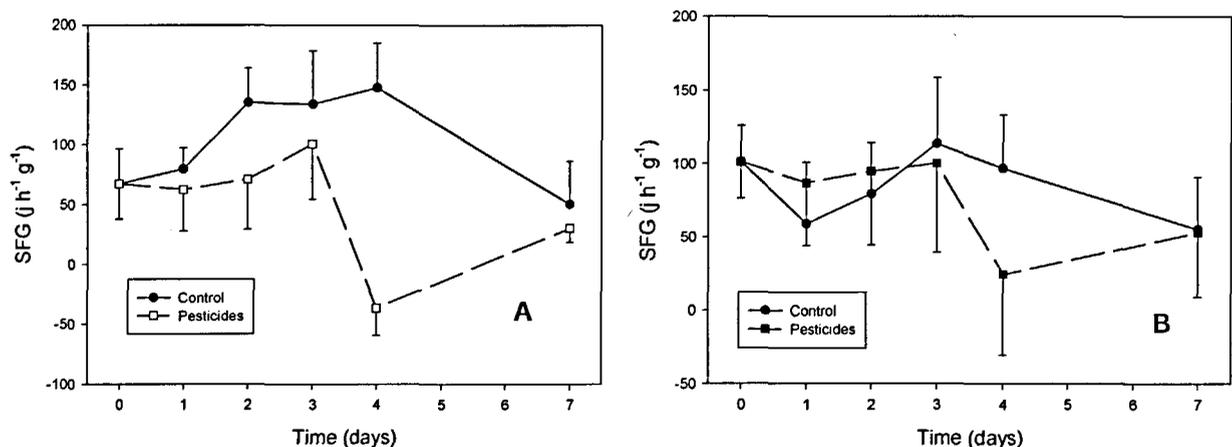


Figure 17: Evolution du SFG au cours du temps pour les huîtres résistantes (A) et les huîtres sensibles (B). Barres verticales : intervalles de confiance au seuil de 5%.

Les huîtres R montrent que, suite à une assimilation de pesticides durant les trois premiers jours, elles auraient la capacité de cesser toute activité de nutrition dès le 4^{ème} jour ($\text{SFG} < 0$). Si l'on se réfère au seul effet des glyphosates (Tableau 6), il apparaît, grâce au dosage de l'AMPA, que seules les huîtres R ont la possibilité de métaboliser ce pesticide ou d'accumuler ce métabolite après dégradation dans l'eau. Le métabolite AMPA est un produit de dégradation du glyphosate qui reflète un effet prolongé potentiel de la molécule parentale (glyphosate) après sa dégradation. La dégradation de l'AMPA pourrait influencer la chute du SFG à partir du 4^{ème} jour. Les huîtres R semblent réactives à l'AMPA. Ces mécanismes semblent différents chez les S qui, selon les réponses écophysologiques, réagissent peu à la présence des pesticides.



Tableau 6: Concentrations en glyphosate et AMPA (métabolite du glyphosate) dans les deux familles d'huîtres (S sensibles et R résistantes) à (J0) et (J7) jours d'exposition en condition de normoxie et d'hypoxie et suivant deux concentrations à 24,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (expérience de décembre 2002) et 4,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (expérience de février 2003).

Jours d'exposition	Glyphosate $\mu\text{g.kg}^{-1}$	AMPA $\mu\text{g.kg}^{-1}$
J0S	<LD	<LD
J0R	<LD	<LD
J7S	2,9	<LD
J7R	3,8	6,2

4.3. Stress environnemental chez les R et S associé à l'effort de gamétogenèse

Les variations de la vitelline peuvent être associées à des variations de facteurs environnementaux comme la température, la qualité de la nourriture, la remise en suspension sédimentaire mais également à la présence de contaminants chimiques (Gagné & Blaise, 2003). La vitelline est ainsi interprétée comme un biomarqueur de perturbations endocriniennes chez les bivalves (Gagné et al., 2005) sur des sites pollués ou vivants à la sortie de stations d'épurations. La synthèse de la vitelline est contrôlée par des récepteurs oestrogéniques qui sont modulés positivement ou négativement par les facteurs environnementaux. La présence de 17β estradiol dans les rejets de stations d'épuration peut activer via les récepteurs hormonaux, l'expression de vitelline chez la moule d'eau douce *Elliptio complanata* (Gagné & Blaise, 2003). L'activation d'hormones liées à une exposition aux contaminants chimiques est aujourd'hui démontrée chez les bivalves (Gagné et al., 2002) L'association de composés lipidiques, sucres, phosphates, zinc et calcium à la vitelline peut être modifiée suivant le niveau de contamination chimique. A ce phénomène s'ajoute l'accumulation de contaminants chimiques tels que les métaux associés à la vitelline détectés chez des moules collectées dans des marina (Blaise et al., 2003).

Bien que moins connus que chez les vertébrés, le rôle des catécholamines (dopamine et noradrénaline) et indolamines (sérotonine et tryptamine) dans la différenciation sexuelle, le développement des gamètes et la ponte est démontré chez des mollusques bivalves comme la moule d'eau douce *Elliptio complanata* (Gagné & Blaise., 2003). La dopamine réduit la ponte chez la moule *Dresseina polymorpha* (Fong et al., 1993). Chez l'huître *Crassostrea gigas*, les catécholamines jouent un rôle dans la régulation de l'assimilation d'oxygène, l'activité ciliaire des branchies, la mobilisation et l'allocation d'énergie, la croissance, la reproduction et les défenses immunitaires (Lacoste et al., 2001). La noradrénaline et la dopamine augmentent après un stress lié aux variations de la salinité et la température. La capacité de régulation des catécholamines de l'huître se modifie dans le cas d'un stress prolongé. L'hypothèse d'un stress chronique prolongé à partir de la mi-mai à Marennes Oléron pourrait favoriser une variation différente des catécholamines chez les huîtres R et S. Le stress de mai et juin (observé dans le paragraphe 3.3.1.2. de la synthèse stress environnemental) pourrait favoriser la mise en place de deux stratégies différentes chez les huîtres R et S, les huîtres R privilégiant leur métabolisme basal et les huîtres S allouant préférentiellement leur énergie à la maturation des gonades. Ce phénomène est exacerbé chez les huîtres S placées à 15 cm du sédiment qui affectent un effort supérieur à la synthèse de protéines d'ovocytes le 24 mai (Figure 5) et pendant la mortalité mi juin 2003.

La stimulation d'une re-maturation apparaît en concordance avec les périodes de stress observées fin mai et mi-juin. Une période de stress chronique a, en effet, été détectée le 24 mai et le 10 juin avec les biomarqueurs de stress oxydant (Figure 30 paragraphe 3.3.1.2. de la synthèse stress environnemental). La concordance d'un stress chronique avant les mortalités suggère la stimulation de facteurs environnementaux chez les R comme les S. Cependant, le stress environnemental favoriserait une stratégie d'adaptation des huîtres S plutôt focalisée sur un effort de maturation des gonades alors que les huîtres R mobiliseraient plutôt leur énergie pour leur métabolisme basal.



5. Le taux d'aneuploïdie des souches R et S

Des anomalies cytogénétiques, telles que l'aneuploïdie, sont connues pour être communes chez les bivalves. Chez *C. gigas*, l'aneuploïdie est caractérisée par l'altération du nombre diploïde normal de 20 chromosomes en cellules hypodiploïdes avec 19, 18 ou 17 chromosomes. Une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a déjà été décrite dans la descendance d'huîtres cultivées et dans les populations naturelles (Leitão et al., 2001a ; Zouros et al., 1996). De plus, l'hypothèse d'une base génétique dans la détermination de ce caractère a été émise (Leitão et al., 2001b) et il existe une perte préférentielle de certains chromosomes (Leitão et al., 2001c ; Bouilly et al., 2005). Les familles Morest, qui ont subi des mortalités différentielles en 2001, ont donc été analysées pour leur taux d'aneuploïdie afin de rechercher une possible corrélation entre aneuploïdie et mortalité.

Six familles G1 différenciées ont été choisies dans la série 3 (croisées le 18 avril 2001 et mises sur site le 7 août 2001) : les familles sensibles F 14-54, F 14-55 et F 16-62 ; les familles résistantes F 15-58 et F 15-59. Des huîtres de ces familles ont été prélevées à Perquis (Ronce les bains) et à la nurserie de Bouin (Vendée) où elles n'ont pas subi de mortalité (Tableau 7) (Dégremont, 2003).

Tableau 7 : Taux de mortalité (en %) des différentes familles à la nurserie de Bouin et sur le site de Perquis

Familles	Taux de mortalité (%) Bouin	Taux de mortalité (%) Perquis
F 14-54	0	73,1 ± 11
F 14-55	0	64,8 ± 9
F 16-62	0	20,4 ± 13
F 15-57	0	4,8 ± 4
F 15-58	0	4,3 ± 2
F 15-59	0	10,3 ± 7

Sur le site de Perquis, les taux d'aneuploïdie observés ne diffèrent pas entre les familles d'huîtres (Figure 18) : une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les 3 familles d'un même groupe ($F=0,672$; $p=0,515$) ni entre les familles R et S ($F=0,397$; $p=0,532$). Les taux d'aneuploïdie des différentes familles d'huîtres provenant de la nurserie de Bouin ne sont pas différents les uns des autres (Figure 18) : une analyse statistique a permis de montrer également qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les 3 familles d'un même groupe ($F=0,386$; $p=0,682$) ni entre les familles R et S ($F=0,797$; $p=0,376$). A nouveau, en comparant les huîtres des mêmes familles placées sur deux sites différents (Perquis et Bouin), nous n'observons aucune différence significative ni entre les 3 familles d'un même groupe ($F=0,813$; $p=0,446$), ni entre les familles R et S ($F=1,129$; $p=0,290$). Par contre, une différence significative entre les huîtres de Perquis et celles de Bouin a été observée ($F=6,546$; $p=0,012$). En effet, les huîtres de Bouin ont présenté un plus faible taux d'aneuploïdie que celles de Perquis.

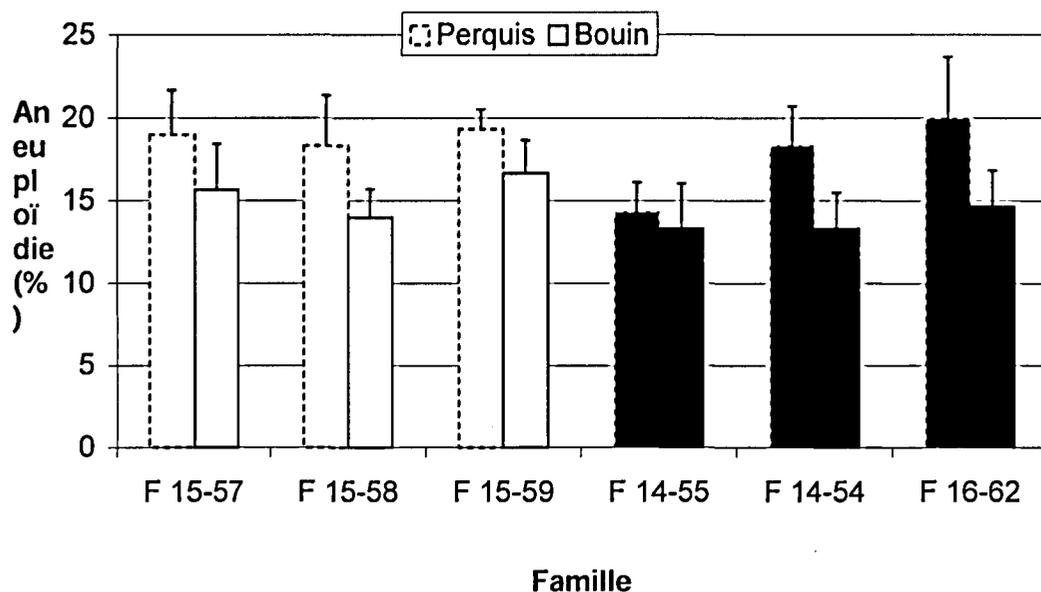


Figure 18 : Comparaison entre le pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres issues de familles « résistantes » ou « sensibles » selon le site.

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'aneuploïdie ont été mis en parallèle avec les taux de survie observés afin de déterminer s'il existe une corrélation entre ces deux paramètres. Au vu de nos résultats, il semblerait qu'il n'y ait pas de relation entre mortalités estivales différentielles et aneuploïdie étant donné qu'aucune différence significative n'a été observée entre des familles ayant un fort taux de mortalité et des familles ayant un faible taux de mortalité dans le milieu. De plus, ces mêmes familles, sans mortalité, n'ont pas montré de différence significative du taux d'aneuploïdie. A Perquis, des éléments présents dans le milieu qui étaient absents à Bouin ont dû déclencher la mortalité des familles les moins résistantes à un stress environnemental. Au delà d'un certain seuil d'aneuploïdie, les huîtres meurent peut-être mais cette hypothèse peut difficilement être vérifiée étant donné que nous ne travaillons que sur du matériel vivant et il est donc difficile de connaître le taux d'aneuploïdie d'huîtres mortes. Ainsi, les huîtres ne doivent pas tolérer physiologiquement plus d'un certain pourcentage de perte chromosomique. En effet, au sein d'une même huître, il n'a jamais été observé plus de la moitié de cellules aneuploïdes.

Une augmentation du taux d'aneuploïdie des huîtres présentes sur Perquis par rapport à celles qui sont restées à la nurserie de Bouin a été observée. Il semblerait donc que les conditions environnementales jouent un rôle au niveau des taux d'aneuploïdie observés. Ces différences de taux d'aneuploïdie entre les huîtres de Perquis et de Bouin pourraient peut-être être expliquées par la présence de produits chimiques en quantité plus ou moins importante selon le site mais cette hypothèse ne peut pas être vérifiée car aucune étude n'a été réalisée pour évaluer les teneurs en pesticides, métaux, hydrocarbures, etc... présentes dans l'eau de mer à Perquis/Bouin ou bien au sein des huîtres. Une autre hypothèse peut être émise pour expliquer ces différences de taux d'aneuploïdie selon le site. Dans le milieu, en période hivernale, la croissance du phytoplancton est assez faible. Par conséquent, les huîtres ont une plus faible quantité de nourriture pour leur propre croissance par rapport à des huîtres élevées dans une nurserie, qui elles, reçoivent une plus grande quantité de nourriture et ont donc une meilleure croissance par rapport à des huîtres du milieu naturel. Or, une corrélation négative entre le taux d'aneuploïdie et le taux de croissance, dans les mêmes conditions alimentaires, a déjà été montrée chez *C. gigas*. Il serait donc fort possible que les huîtres de Bouin aient eu une meilleure croissance que celles de Perquis et donc un taux d'aneuploïdie plus faible.



6. Réponses aux agents pathogènes des souches R et S

L'ensemble des résultats acquis au cours de ce programme montrent une sensibilité similaire des souches R et S aux agents pathogènes étudiés, que ce soit aux bactéries du genre *Vibrio* qu'au virus de type Herpes (Cf thème Pathologie).

En ce qui concerne la réponse des R et S aux bactéries du genre *Vibrio*, nous pouvons citer plusieurs exemples d'infections bactériennes réalisées expérimentalement avec des vibrios pathogènes appartenant aux espèces *V. splendidus* et *V. aestuarianus*.

1) Un challenge bactérien a été réalisé en utilisant la bactérie *V. splendidus* isolée chez des huîtres S moribondes à Bouin (3 familles G2S et 3G2R, Voir paragraphe 7 suivant). Ce challenge a été réalisé expérimentalement à 19°C (novembre 2003) selon le protocole décrit par Montagnani et al. (2002). Les résultats montrent une forte mortalité identique pour R et S dans cette expérience. En effet, 4 jours après injection de bactéries, la mortalité cumulée était de $79.5 \pm 12.0\%$ pour les huîtres R et $72 \pm 9.0\%$ pour les huîtres S. Aucune mortalité n'a été relevée sur les huîtres non injectées et les huîtres injectées par eau de mer stérile.

2) Un autre challenge, cette fois ci par baignade, a été réalisé à différentes périodes au cours de la manip Béray (suivi *in situ* de R et S de G2 âgés de 16 mois en baie des Veys et à Auray). La baignade a été réalisée à 19-20°C en inoculant 10^6 de *V. aestuarianus* par ml d'eau du bac après un choc de température de 2 heures à 40°C subi par les huîtres R et S. Des contrôles ont été faits pour vérifier que les huîtres étaient mortes de vibriose à *V. aestuarianus*.

Aucune différence n'apparaît entre les R et S quelle que soit la période et le lieu de prélèvement testés (Figure 19). Les amplitudes de mortalités sont plus grandes en mai et août. Elles sont curieusement faibles le 12 juin sur le site d'Auray alors qu'on se rapproche du pic de mortalités sur le terrain. En septembre, les huîtres apparaissent très résistantes à la baignade de *V. aestuarianus*.

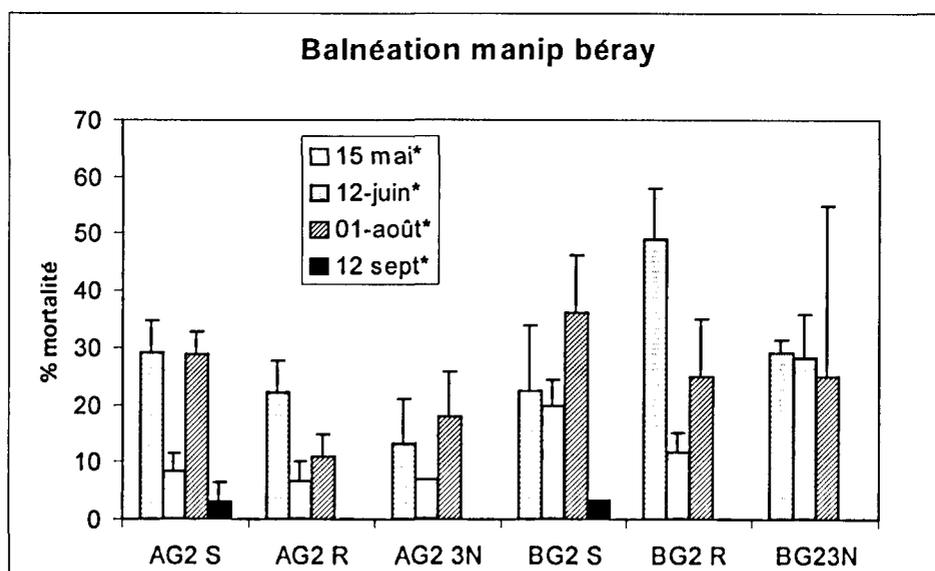


Figure 19 : % de mortalité des huîtres G2 R et S après baignade de *Vibrio aestuarianus* après un choc de température de 2h à 40°C appliqué aux huîtres. A= Auray, B= Baie des Veys. Un lot triploïde 3N a également été testé.

3) La Sensibilité des huîtres G2 R et S aux *Vibrios* a été testé en fonction du niveau de nourriture dans les mêmes conditions expérimentales que citées précédemment (voir exemple 2) et ce via 2 challenges différents (mai et août). En mai, les huîtres S les plus nourries (CN3) sont significativement les plus sensibles alors qu'en août les huîtres les mieux nourries (R comme S) sont les plus sensibles (Figure 20). Dans tous les cas, il ne se dégage pas une information très différente entre R et S face à un challenge bactérien.

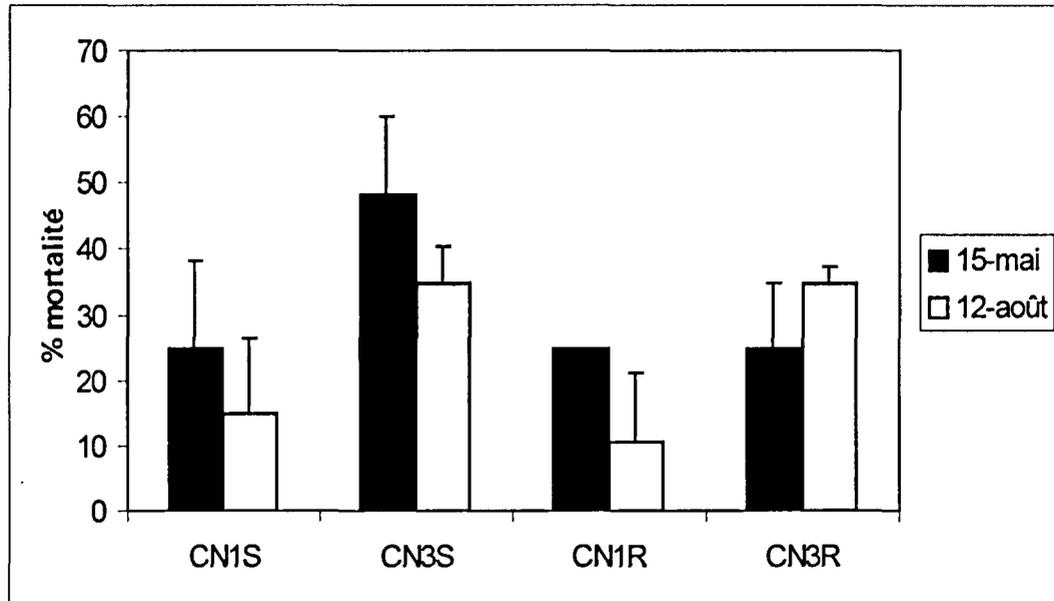


Figure 20 : % de mortalité des huîtres G2 R et S après baignée de *Vibrio aestuarianus* après un choc de température de 2h à 40°C appliqué aux huîtres à 2 dates (15 mai et 12 août).

4) Enfin, la résistance ou sensibilité à une infection expérimentale bactérienne de plusieurs familles G1 d'huîtres R et S de première génération ont été évaluées en utilisant des souches bactériennes appartenant à l'espèce *V. splendidus*, virulentes ou avirulentes. Les mortalités cumulées obtenues 4 jours post injection mettent en évidence des niveaux de sensibilité/résistance très variables d'une famille à une autre (Figure 21). Toutefois ces résultats ne sont pas corrélés à ceux obtenus sur le terrain lors de mortalités estivales.

Mortalités cumulées en %

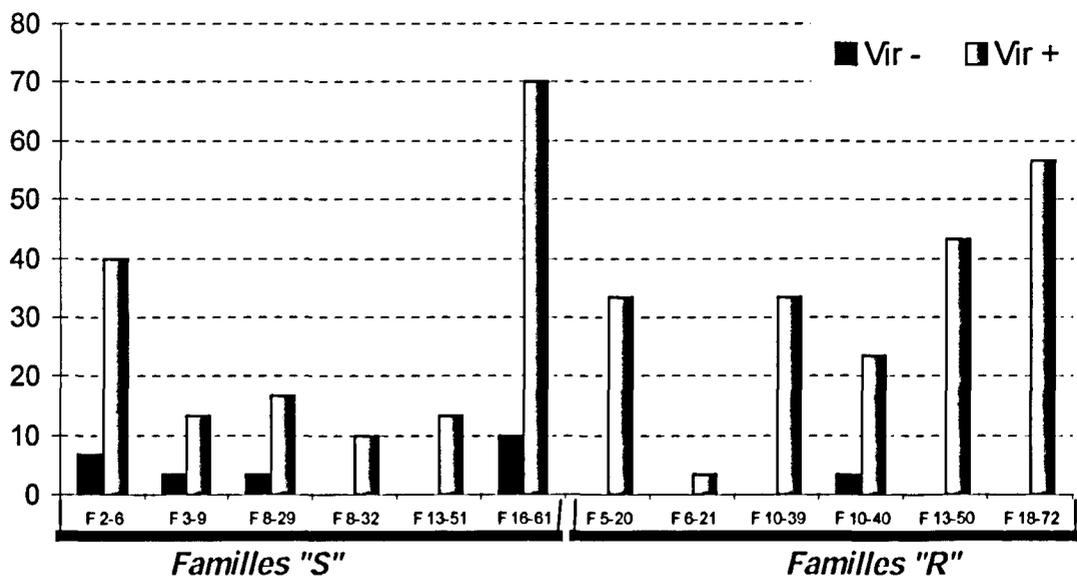


Figure 21 : Testage des familles G1 « S » et « R » par infection expérimentale à *Vibrio splendidus*, souches virulentes (Vir+) ou avirulentes (Vir-).



Le statut des géniteurs utilisés dans le cadre de MOREST vis à vis de l'infection à herpesvirus OsHV-1 a été étudié. Les analyses ont été réalisées en PCR pour une recherche d'ADN viral. Elles ont permis de qualifier les huîtres d'un point de vue pathologique. Les analyses ont porté également sur les élevages larvaires réalisés en 2003 (G3). Elles ont été réalisées en PCR pour rechercher l'ADN de virus de type herpes. Les analyses ont été effectuées sur des larves âgées de 10 jours et en cas de mortalité anormale.

Le virus OsHV-1 est détecté par PCR au stade larvaire pour les familles "R" et "S" avec cependant certaines différences en fonction des générations. La détection est comparable pour les G1 (21%) entre les familles R et S. Pour les G2 divergentes, une différence est observée entre R et S : 72,7% (8/11) des croisements de la lignée basse "S" sont positifs, alors que seulement 45,4% (4/11) des croisements de la lignée haute "R" sont positifs. Par ailleurs, le virus OsHV-1 est détecté par hybridation *in situ* chez les géniteurs G1 (0% à 43%) en fonction des familles considérées sans corrélation avec les taux de mortalité observés sur estran.

En conclusion, les familles « R » ne semblent pas plus résistantes que les familles « S » à deux agents infectieux (vibrions pathogènes ou herpesvirus OsHV-1). Cependant, une forte variabilité inter-famille est observée laissant suspecter une base génétique pour la résistance ou la sensibilité à ces agents.

7. Approche globale du différentiel d'expression de gènes entre R et S pour identifier la fonction physiologique impliquée dans la résistance à la mortalité estivale

L'analyse moléculaire des souches R et S a été initiée afin de rechercher des gènes différentiellement exprimés entre ces 2 souches dans les conditions mimant le mieux celles conduisant à la mortalité estivale (*in situ* en période critique c'est-à-dire le mois précédent l'apparition des mortalités, et expérimentalement après stress biotiques ou abiotiques). L'identification de tels gènes devrait permettre de marquer le(s) métabolisme(s) affecté(s) et donc plus largement la fonction physiologique potentiellement explicative de cette différence de survie entre souches sélectionnées.

Les approches globales utilisées dans un premier temps ont permis la construction d'une banque soustractive (SSH, Suppressive Subtractive Hybridization) et la réalisation de macroarray pour étudier les gènes différentiellement exprimés entre les souches R et S.

7.1. En conditions *in situ* avant un épisode de mortalité

Une approche différentielle de type Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) a donc été réalisée sur des lots d'huîtres G2 R et S prélevés au cours d'un épisode de mortalité subi uniquement par les lots S. Ces familles (3 G2R et 3 G2S) ont été produites à l'écloserie de La Tremblade en 2002 puis élevées à la nurserie de Bouin. Au cours de l'élevage, dès les premières mortalités observées, 10 huîtres par famille ont été prélevées (en faisant attention de ne pas prélever d'huître moribonde) puis leur tissu gonadique disséqué afin d'en extraire les ARN totaux pour la réalisation de la SSH. Les huîtres de ces mêmes familles sont restées à la nurserie de Bouin et ont été suivies pour le caractère mortalité. A la fin de l'été, la mortalité cumulée (témoin de cet épisode de mortalité) est apparue significativement supérieure chez les 3 familles G2 S ($74.5 \pm 11.0\%$) que chez les 3 familles G2R ($4.1 \pm 3.2\%$). Dans les huîtres S moribondes, les analyses bactériologiques ont montré la présence dominante (50-80%) d'une bactérie *Vibrio splendidus* de type I alors que dans les huîtres R et S vivantes, une grande diversité d'espèces bactériennes a été isolée. Ceci suggérerait que cette bactérie soit à l'origine de cet épisode de mortalité des huîtres S sans pour autant écarter une autre origine telle qu'une faiblesse physiologique des animaux.

L'approche SSH, dans le sens de soustraction (R-S), a permis la construction d'une banque différentielle de 420 clones (Huvet et al., 2004). Par criblage sur blots (PCR select method, Clontech), 165 clones ont été confirmés pour leur différentiel d'expression entre ces deux lots d'huîtres puis ont été séquencés. L'analyse de ces séquences nous a permis d'identifier 45 gènes connus et 19 séquences codantes inconnues dans les banques de données. L'analyse par PCR en



temps réel de 8 de ces clones a permis de confirmer le niveau supérieur d'ARNm chez R par rapport à S et de l'estimer à une différence d'expression d'environ 2.

Parmi ces séquences codantes ou ESTs (Expressed Sequence Tags) caractérisées, un travail a ensuite été réalisé pour identifier les ESTs qui apparaissent de façon récurrente comme différemment exprimés entre des lots d'huîtres R et S au cours de la période critique précédant les mortalités, et ce sous plusieurs conditions d'âge, de génération de sélection et d'environnement afin d'être le plus exhaustif possible. La première étape de cette étude a consisté en la mise au point de la technique de macro-array et d'hybridation par des sondes marquées à la digoxygénine (Dubrunfault, 2004). Les analyses ont ensuite été effectuées sur des échantillons R et S (pool de familles de génération G2 et G3), âgés de 5 mois et de 16 mois, et prélevés en Baie des Veys, à Auray en Bretagne Sud et à la nurserie de Bouin. Les résultats ont permis la révélation de 27 ESTs différemment exprimés entre les lots R et S. Parmi ceux-ci, uniquement 4 ESTs ont été identifiés comme systématiquement différemment exprimés quand une mortalité a été avérée dans les semaines après l'échantillonnage (i.e. pour les expériences réalisées sur les juvéniles : mortalité de R et S respectivement 4% et 75% à Bouin, 38% et 80% à Auray). Parmi ces quatre, deux coderaient pour des protéines inconnues. Leur extension jusqu'à la taille complète du message (par PCR sur banque d'ADNc de bord de manteau ou RACE-PCR) est en cours et pourrait aider à leur identification. De même pour les deux autres ESTs qui coderaient pour des protéines connues dans les banques de données : une « Bone Morphogenetic Protein » (BMP) et une « putative-precerebellin ». Cette BMP pourrait avoir une implication importante dans la gamétogénèse (e.g. Eckery et al., 2002 ; Moore et al., 2004). Elle fait actuellement l'objet d'un sujet de thèse pour déterminer sa fonction en lien avec le différentiel observé d'effort de reproduction entre R et S. La putative-precerebellin a été caractérisée chez le saumon pour son intervention dans les processus de défense (Gerwick et al., 2000) et demande des travaux supplémentaires.

Pour tenter de mimer l'épisode particulier de mortalité observé au cours de l'élevage à Bouin (expérimentation pour la SSH) et mesurer les réponses des R et S en terme d'expression de gènes, un challenge bactérien a été réalisé en utilisant la bactérie *V. splendidus* / isolée chez les S moribondes à Bouin. Ce challenge a été réalisé expérimentalement à 19°C (en novembre 2003) selon le protocole décrit par Montagnani et al. (2002). Dix heures après injection de la bactérie dans le muscle adducteur, le niveau de 8 ARNm a été mesuré par PCR en temps réel, ARNm choisis parmi ceux de la banque soustractive pour leur possible implication dans des métabolismes énergétique ou immunitaire (cyclophilin, scavenger recepteur, precerebellin, atpase transporting lysosomal protein, isocitrate dehydrogenase, glucose cotransporteur, fatty acid binding protéine, cavortin caractérisée depuis comme super oxyde dismutase (SOD, Gonzales et al., 2005)). Les résultats d'expression relative de gènes suggèrent pour les huîtres non injectés que quelque soit l'âge, la saison ou l'état physiologique, la plupart des ARNm mesurés sont sur-représentés chez R comparés à S suggérant que des différences fonctionnelles fondamentales existeraient entre R et S pour mobiliser l'énergie dans l'animal (glucose cotransporteur, fatty acid binding protéine) ou se défendre (cyclophilin, atpase transporting lysosomal protein, isocitrate dehydrogenase).

Mis à part la SOD et l'isocitrate dehydrogenase dont la diminution significative de niveau d'ARNm est identique chez R et S, les autres transcrits (scavenger recepteur, precerebellin, atpase transporting lysosomal protein, glucose cotransporteur) montrent une diminution significative de leur niveau seulement chez les R et ce après injection d'eau de mer et plus encore de *V. splendidus*. Les niveaux de deux ARNm ont diminué que chez R et spécifiquement en réponse à la bactérie, un ARNm potentiellement impliqué en immunité (cyclophilin) et le second dans la mobilisation de l'énergie (fatty acid binding protéine). De telles diminutions de niveau d'expression ont été reportées chez les crevettes dans les 12 heures suivant un challenge bactérien (Munoz et al., 2002) dont l'origine serait la migration d'hémocytes vers le tissu meurtri où l'injection a eu lieu. En extrapolant ce résultat et en s'appuyant sur la forte probabilité d'expression spécifique de certains de ces ARNm dans les hémocytes d'huître, nous pourrions supposer une plus grande capacité des R à recruter et migrer les hémocytes vers la zone infectée ce que pourrait leur conférer une meilleure défense. Cependant, les résultats de mortalité montrent une forte mortalité identique pour R et S dans cette expérience. D'autres modalités d'infection et d'autres doses devront être testées car injecter 10^8 *V. splendidus* dans le muscle semble être fatal pour l'huître.

Ce travail constitue donc une première étape dans l'étude des bases génétique et physiologique de la survie estivale via les souches sélectionnées R et S. Les gènes identifiés et les voies métaboliques correspondantes constituent les premières pistes d'études ultérieures à approfondir.

Ce travail est consultable dans son intégralité sous la référence : Huvet A, Herpin A, Dégremont L, Labreuche Y, Samain JF, Cunningham C (2004) The identification of genes from the oyster



Crassostrea gigas that are differentially expressed in progenies exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*, 343, 211-220.

7.2. Etude des facteurs de risque en expérimentation

La réponse immunitaire de l'huître aux mortalités estivales est un phénomène clé de ce programme Morest, mais encore peu connue. Nous avons choisi de l'étudier avec une méthode d'analyse globale de l'expression des gènes : les macroarrays ou puces à ADNc. Cette approche globale permet donc, par exemple, de cribler une banque de gènes afin de sélectionner ceux potentiellement impliqués dans un phénomène. Dans notre cas, nous voulons déterminer les gènes liés à la résistance chez les huîtres dites résistantes (R). Les huîtres R et S ont pour cela été soumises à des conditions expérimentales reproduisant les mortalités estivales (expérimentation VALI, VALeurs Limites, Morest) et soumises à un stress biotique (injection de *Vibrio aesturianus*). Les branchies ont été prélevées et conservées à -80°C et les ARN totaux ont été extraits en vue de réaliser des macroarrays et de déterminer les niveaux d'expression des gènes étudiés.

Le développement des macroarrays au laboratoire s'appuie sur l'utilisation de 2 banques bactériennes, une première banque d'ADNc réalisée à partir d'ARNm d'hémocytes provenant d'huîtres stimulées par injection de bactéries (1142 EST) (Gueguen et al., 2003 ; GigasBase-<http://www.ifremer.fr/GigasBase/>) et une seconde banque SSH (137 ESTs) présentée ci-dessus (7.1). La fabrication de la « Puce à ADN » consiste à amplifier les banques d'ADNc par PCR (2300 clones) afin de déposer les amplicons sur une membrane de nylon à l'aide de robots de précision (Microgrid III, Biorobotics). L'analyse des échantillons se fait à partir des ARN totaux, radio marqués par rétro transcription en ADNc. Cette sonde, mise en contact avec la puce à ADN précédemment préparée, s'hybride de façon spécifique avec les fragments d'ADN fixés sur la membrane de nylon. L'analyse des signaux obtenus permet de déduire l'expression des 2300 gènes en une seule expérience. Afin de comparer les populations R et S, des ARN issus de ces populations ont été hybridés en parallèle sur les membranes.

Les résultats préliminaires d'analyse des lots R et S (pool de familles G3R et G3S), par macroarrays sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Résultat de l'étude de l'expression de gènes sur les huîtres R et S. (expérimentation VALI). Ce tableau indique les gènes présentant des abondances différentielles d'ARNm transcrits entre les huîtres Résistantes R et Sensibles S.

Fonction associée au gène	Spécifique de R		R et S		Spécifique de S	
	Modulé positivement	Modulé négativement	Modulé positivement	Modulé négativement	Modulé positivement	Modulé négativement
Clones non séquencés	21	6	3	7	9	10
Sans Identités de séquence	11	35	0	2	2	7
Divers	Métabolisme de l'ADN	Métabolisme de l'ADN ; y-box factor	Riboprotéines	Protéines mitochondriales		
Gènes d'intérêt	Hsp90, Naca, Nadh deshydrogénase 5	Timp, ELKS, Nadh ubiquitine Oxydoreductase, Hcdi, nuclease diphosphase, Métabolisme énergétique		SuperOxideDismutase, thymosine, Tubuline	ATPase Subunit 6	Métabolisme énergétique
Nombre de gènes	56	85	4	13	15	44

Certains gènes semblent modulés à la fois chez les huîtres R et S : il s'agit de gènes impliqués dans la structure cellulaire comme le gène de la thymosine, ou de la tubuline ainsi que le gène



codant pour la SOD (SuperOxide Dismutase), qui est une protéine impliquée dans la réponse immunitaire de l'huître (Gonzalez et al. 2005).

Parmi les gènes modulés spécifiquement dans les huîtres R ou S, la moitié environ correspond à des clones qui ne sont pas séquencés. Concernant les gènes séquencés, l'analyse bio-informatique a permis de les regrouper selon leur fonction putative associée. Cependant, certains gènes, ne présentant pas d'homologie de séquence avec les bases de données actuelles (no hits : 40% des ESTs en moyenne), pourraient être spécifiques de l'huître et donc potentiellement intéressants pour l'étude de la réponse immunitaire notamment. De même pour les gènes « unknown », qui présentent des homologies de séquence mais dont la fonction n'est pas connue.

La catégorie la plus représentée parmi les gènes restants et semblant jouer un rôle dans la résistance est celle des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique (15% des ESTs), avec le gène NADH ubiquinone oxidoréductase par exemple. Enfin, certains gènes impliqués dans l'immunité apparaissent surexprimés chez R par rapport à S tels que Hsp90, la Ferritine et une lectine la Galectine, tandis que la Serpin et Timp tissue inhibitor of metalloproteinase sont sous-exprimés dans les comparaisons étudiées.

Le séquençage de certains gènes (ratio les plus élevés) ainsi que des vérifications de leur niveau d'expression par PCR en temps réel devront être réalisés ainsi que des expérimentations complémentaires.

Dans cette optique, ces candidats pourraient constituer des candidats sérieux pour de futures analyses fonctionnelles et la recherche de QTLs (Quantitative Traits Loci) en relation avec la survie aux mortalités estivales. Ceci constitue le point de départ d'un programme européen nommé Aquafirst qui a pour objectifs de dégager des marqueurs de résistance aux stress et/ou à l'infection différentiels entre les souches R et S, puis de les utiliser pour la recherche de QTLs (Quantitative Trait Loci) de la survie estivale et ainsi permettre dans l'avenir de développer un programme de sélection assisté par marqueurs pour le caractère survie estivale mais aussi aider à la compréhension du phénomène de résistance à la mortalité estivale en ciblant le(s) mécanisme(s) physiologique(s) impliquée(s).

8. Discussion générale et conclusion

Il apparaît donc que la gamétogenèse et l'effort de reproduction des huîtres Résistantes et Sensibles varient en fonction de l'âge et de l'écosystème et parfois même au sein d'un écosystème en fonction des années. Quoiqu'il en soit, des différences potentielles de stratégies de reproduction ont été observées entre les huîtres résistantes et sensibles qui, quant elles sont présentes, indiquent **un effort de reproduction supérieur chez S ainsi que la présence de ponte partielle chez les S**. Ces deux caractères différentiels de la reproduction sont à prendre en compte dans la résistance à la mortalité estivale et font l'objet de nouvelles études complétées notamment par une approche moléculaire afin de rechercher et étudier des gènes potentiellement impliqués dans ce différentiel de reproduction entre huîtres R et S.

De telles différences de caractère reproducteur entre souches sélectionnées pourraient avoir une répercussion sur le statut et la gestion énergétiques de l'animal. Ceci est d'autant vrai que la fonction de reproduction est extrêmement coûteuse pour l'huître en périodes printanière et estivale (Soletchnik et al., 1997), énergie suppléée essentiellement par les apports trophiques et les réserves en glycogène (Heude Berthelin, 2000). En phase active de gamétogenèse, une huître consacre toute ou presque son énergie à la reproduction au détriment des fonctions de défense (Myrand et al., 2000 ; Perdue et al., 1981) pour produire une gonade qui peut représenter jusqu'à 80% du poids de l'animal en période de gamétogenèse active (Deslous-Paoli et al., 1981). En analysant la majorité des constituants énergétiques représentatifs du bilan énergétique de l'huître, nous nous apercevons qu'aucune différence significative n'est apparue entre souches R et S attestant d'un **bilan énergétique identique entre R et S**. Le différentiel de reproduction des souches R et S n'affecte donc pas visiblement les constituants énergétiques. A l'inverse, les flux énergétiques glucidiques et leur gestion pourraient être différents entre ces souches. En effet, il semblerait que les voies métaboliques, permettant de produire du Glucose6P, aient un fonctionnement plus élevé chez les huîtres R que chez les huîtres S (observé par les niveaux d'ARNm et/ou activité des enzymes clés



de ce métabolisme) suggérant un fonctionnement énergétique des glucides différent en période critique entre ces souches. L'avantage serait en faveur des souches R avec une **potentialité de production d'énergie accrue par rapport aux souches S**.

Avec davantage d'énergie produite chez les R, davantage de besoins énergétiques pour la reproduction chez les S (quand une différence existe), l'allocation d'énergie au compartiment de maintenance serait donc potentiellement supérieure chez les huîtres R en période critique. Des répercussions peuvent alors être attendues pour l'animal en terme de capacité de défense face aux agents pathogènes (virus de type Herpes, bactéries du genre *Vibrio*) présents dans le milieu et/ou aux modifications environnementales stressantes (hypoxie, polluants, pratiques zootechniques, proximité du sédiment, etc...).

Expérimentalement, il a été montré une **sensibilité similaire entre souches R et S face à ces agents pathogènes** même si le virus de type Herpes (Renault et al., 1995) ou des bactéries du genre *Vibrio* (Lacoste et al., 2001a) sont décrits à l'origine de certains épisodes de mortalités de l'huître *C. gigas*. Il faut tout de même ajouter que, dans le milieu, les pontes partielles observées chez les huîtres S pourraient constituer un facteur favorisant la transmission de bactéries. En effet, la transmission de bactéries *Vibrio* a été favorisée expérimentalement entre huîtres moribondes et huîtres saines au moment d'événement de ponte (Le Roux, 2004 ; Cf thème Pathologie).

Face à des stress abiotiques, les huîtres R et S montrent des **capacités de régulation privilégiant l'activation de mécanismes enzymatiques et protéiques différents**. Les conditions de stress hypoxique et pesticides testées expérimentalement n'ont pas entraîné de mortalité des huîtres mais l'activation de mécanismes subcellulaires différents entre les huîtres R et S, ce qui pourrait entraîner des différences dans l'utilisation des ressources métaboliques. Il a notamment été observé que suite à une assimilation de pesticides, les huîtres R auraient la capacité de cesser toute activité de nutrition et de métaboliser ce pesticide, alors que ces mécanismes semblent différents chez les S qui réagissent peu à la présence des pesticides (selon les réponses écophysiological). De plus, *in situ* une stratégie différente entre souches sélectionnées a été suspectée avec reconnaissance de l'événement stressant et changement de stratégie de l'allocation d'énergie vers le soma pendant le stress chez les huîtres R (privilégiant leur maintenance) *versus* une absence visible de réaction à un événement stressant et le maintien de l'allocation d'énergie à la gonade chez les huîtres S (« maintien de l'effort de reproduction »). La question est alors de comprendre si les capacités différentes entre R et S de reconnaissance et/ou de réaction à un événement stressant proviennent de différences intrinsèques dans leur mécanismes de défense ou simplement de contraintes physiologiques liées à leur état reproducteur et/ou énergétique (i.e. état reproducteur et/ou énergétique différent entre R et S = cause ou conséquence des réactions différentes de R et S face à un stress).

L'hypothèse d'un stress chronique prolongé à partir de la mi-mai a notamment été supposé à Marennes Oléron (dans le cadre de Dynamor) avec les biomarqueurs de stress oxydant qui illustrent un effort métabolique d'adaptation chez les huîtres R. Ce stress chronique pourrait favoriser une variation différente des catécholamines chez les huîtres R et S. En effet, la capacité de régulation des catécholamines de l'huître se modifie dans le cas d'un stress prolongé et il est connu que noradrénaline et dopamine augmentent après un stress (Lacoste et al., 2001b). Les conséquences pourraient alors être multiples puisque les catécholamines (dopamine et noradrénaline) jouent un rôle dans la régulation de l'assimilation d'oxygène, l'activité ciliaire des branchies, la mobilisation et l'allocation d'énergie, la croissance, la reproduction et les défenses immunitaires (Lacoste et al., 2001b). Leurs effets ont été démontrés dans la différenciation sexuelle, le développement des gamètes et la ponte chez des mollusques bivalves comme la moule d'eau douce *Elliptio complanata* (Gagné & Blaise, 2003) avec notamment une réduction de la ponte de la moule *Dresseina polymorpha* par la dopamine (Fong et al., 1993). Dans ce cas, les pontes partielles observées chez les huîtres S en juin-juillet, et non chez les huîtres R, pourraient être attribuées à des variations de catécholamines et témoigner de l'effet d'un stress chronique. Le dosage des catécholamines devrait donc être réalisé dans de futures expérimentations pour tester cette hypothèse.

En analysant les paramètres hématocytaires (précisons ici que la mesure de ces paramètres ne constitue qu'une approche du système de défense des bivalves), il est apparu que les **paramètres hématocytaires des huîtres R ne sont pas systématiquement différents de ceux des huîtres S** particulièrement dans les cas de faible pression de mortalités. Il n'a donc pas été montré, sur ces paramètres, de corrélation stricte entre « capacité de défense des hémocytes » et « résistance à la mortalité estivale ». Par contre, l'hypothèse d'une **meilleure réponse adaptative des paramètres hématocytaires des huîtres R** en cas de forte pression de mortalités, de stress prononcé, apparaît très plausible et constituerait une explication partielle à la survie estivale. La contrainte exercée par



la reproduction sur ce système paraît importante à prendre en compte (Cf thème 3). L'allocation d'énergie suspectée supérieure à la reproduction des huîtres S pourrait en effet conduire à une activation tardive du système antioxydant chez ces huîtres sensibles alors que les huîtres résistantes engageraient plus précocement, en cas de stress, des voies d'activation enzymatique (comme l'activité catalase), meilleure stratégie en terme de chance de survie.

En conclusion, chaque paramètre, discuté dans ce thème et considéré individuellement, est à prendre en compte en terme de paramètre aggravant et non pas de paramètre causal à l'origine des mortalités estivales. Considérant l'importance de la reproduction dans les mortalités estivales (Cf thème 3), il paraît évident que le différentiel de reproduction observée entre R et S (effort de reproduction, ponte partielle) puisse exercer des contraintes fortes sur la physiologie des souches d'huître résistantes et sensibles, et notamment sur l'allocation d'énergie aux différentes fonctions de l'animal (e.g. maintenance), avec des conséquences sur la survie. Que ce soit dans la réponse aux stress environnementaux ou aux agents pathogènes, nous avons noté des réponses physiologiques différentes entre souches sélectionnées (mais pas en terme de survie). Les indicateurs mesurés nous permettent de poser l'hypothèse d'une meilleure réponse aux stress des huîtres résistantes, par comparaison aux huîtres sensibles, en terme de maintien de l'intégrité de l'organisme et donc de survie.

Les mécanismes fins de la résistance à la survie estivale devront néanmoins être décortiqués afin d'élucider la cascade d'événements et dégager les causes et les conséquences physiologiques de ce phénomène. Les approches de génomique comparative de R et S, déjà initiées dans ce programme et en cours dans le cadre du programme Européen Aquafirst, ont pour vocation d'y répondre sous deux grands aspects : 1) la génomique fonctionnelle avec la caractérisation de gènes différentiellement exprimés entre R et S et leur étude complexe dans la physiologie de ces souches d'huîtres, et 2) la génétique quantitative avec la cartographie chez *C. gigas* de gènes, notamment ceux précédemment mis en évidence (en 1), et la recherche finalisée de QTLs de la survie estivale (Quantitative Trait loci, i.e. portions chromosomiques impliquées dans la détermination du caractère survie estivale) dans des souches ségrégeantes entre R et S.



9. Bibliographie

- Abele D., Heise K., Portner H.O., Puntarulo S. (2002) Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. J. Exp. Biol. 205, 1831-1841.
- Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse, 2002. Pesticides dans les eaux superficielles du bassin Rhône Méditerranée Corse. Réseau de Données sur l'eau du bassin Rhône Méditerranée Corse. <http://rdb.eaurmc.fr.24p>.
- Akcha F., Burgeot T., Narbonne J.F., Garrigues P. (2003) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons: role of DNA adduct formation in induced carcinogenesis. In PAH: an ecotoxicological perspective, Douben P. (Ed) Wiley and Sons, London, Part II, Chap 6. 65-79.
- Auffret M., Mujdzic N., Corporeau C., Moraga D. (2002) Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Mar. Environ. Res. 54, 585-589.
- Bacca H., Huvet A., Fabioux C., Daniel JY, Delaporte M, Pouvreau S, Van Wormhoudt A, Moal J (2005) Molecular cloning and seasonal expression of the oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. Comparative Biochemistry and Physiology, 140B, 635-646.
- Bayne B.L., Bubel A., Gabbott P.A., Livingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N. (1982) Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* (L.). Mar. Biol. Lett. 3, 89-105.
- Berthelin C., Kellner K., Mathieu M. (2000) Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. Mar. Biotechnol. 2, 136-145.
- Blaise C., Gagné F., Pellerin J., Hansen P.D., Trottier S. (2003) Molluscan shellfish biomarker study of the Saguenay Fjord (Quebec, Canada) with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. Environ. Toxicol. 17, 170-186.
- Bouilly K., Leitão A., Chaves R., Guedes-Pinto H., Boudry P., Lapègue S. (2005) Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*. Genome 48, 177-180.
- Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, Auffret M, Moraga D (2003) Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Cell Stress Chaperones 8, 76-85.
- Bramble L., Anderson R.S. (1997) Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. Dev. Comp. Immunol. 21, 337-348.
- Bramble L.H., Anderson R.S. (1998) A comparison of the chemiluminescent response of *Crassostrea virginica* and *Morone saxatilis* phagocytes to zymosan and viable *Listonella anguillarum*. Dev. Comp. Immunol. 22, 55-61.
- Burgeot T, S. Quirion, D. Ménard, S. Rousseau, B. Gagnaire, T. Renault, K. Bouilly, J. Haure, F.Gagné, D. Moraga, I. Boutet, A. Van Wormhoudt, C. Lelong, P.G. Sauriau, N. Malet, G. Le Moullac, F. Quiniou, G. Arzul, J. Knoery, P.Y. Communal, A.Jadas Hecart, M.Osada, F. Geret ,P. Soletchnik, JF Samain (2006) Effet du stress : toxicité potentielle du milieu et effort d'adaptation. Rapport thème 4 du programme Morest, 51pp.
- Canesi L., Gallo G., Gavioli M., Pruzzo C. (2002) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. Microsc. Res. Tech. 57, 469-476.
- Cheng T.C. (1996) Hemocytes: Forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, College Park, MD, USA, pp. 299-333.
- Cheng T.C. (2000) Cellular Defense Mechanisms in Oysters. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology. Science Publishers, Inc., Enfield (NH), USA; Plymouth, UK, pp. 43-83.
- Chu F.L.E. (2000) Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology. Science publishers, Inc., Enfield (NH), USA; Plymouth, UK, pp. 1-42.
- Cooper E.L., Roch P. (2003) Earthworm immunity: a model of immune competence: The 7th international symposium on earthworm ecology Cardiff Wales 2002. Pedobiologia 47, 676-688.
- Dégremont L, Bédier E, Martin JL, Soletchnik P, Joly JP, Ropert M, Huvet A, Moal J, Samain JF, Boudry P (2002) Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*). In: Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier August 19-23, 2002, 481-484.
- Dégremont L. (2003) Genetic basis of summer mortality and relationship with growth in juvenile Pacific cupped oysters *Crassostrea gigas*. Thèse de l'Université de Caen, 322pp.



- Dégremont L., Bédier E., Soletchnik P., Ropert M., Huvet A., Moal J., Samain J.F., Boudry P. (2005) Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 249, 213-229.
- Delaporte M (2005) Modulation des paramètres hématocytaires par la nutrition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. Thèse de l'Université de Rennes 1, 362pp.
- Delaporte M., P. Soudant, C. Lambert, J. Moal, S. Pouvreau, J.F. Samain. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture*, sous presse.
- Deslous-Paoli J.M., Héral M., Berthome J.P., Razet D., Garnier J. (1981) Natural reproduction of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron basin in 1979 and 1981 : biochemical and energetic aspects. *Revue des travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 45, 319-327.
- Dubos MP, Badariotti F, Rodet F, Lelong C, Favrel P (2003) Molecular and physiological characterization of an invertebrate homologue of a calcitonin-related receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310, 972-978.
- Dubrunfaut T (2004). Etude de l'expression de gènes, identifiés par hybridation suppressive soustractive, au cours d'épisodes de mortalité estivale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. DEA Biologie et Productions Animales, Université de Rennes 1. 20pp.
- Eckery DC, Whale JL, Lawrence SB, Wylde KA, McNatty KP Juengel JL (2002) Expression of mRNA encoding growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Molecular and Cellular Endocrinology* 192, 115-126
- Enriquez-Diaz MR (2004) Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, 193pp.
- Faust M., Altenburger R., Backhaus T., Blanck H., Boedeker W., Gramatica P., Hamer V., Scholze M., Vighi M., Grimme L.H. (2001) Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology* 56, 13-32.
- Felber J.P., Golay A. (1995) Regulation of nutrient metabolism and energy expenditure. *Metabolism* 44, 4-9.
- Fong P.P., Noordhuis R., Ram K.L. (1993) Dopamine reduced intensity of serotonin-induced spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J. Exp. Zool.* 266, 79-83.
- Gabbott P.A., Whittle M.A. (1986) Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* (L.) II: seasonal changes in the glycogen content and glycogen synthetase activity in the mantle tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B, 197-207.
- Gagnaire B., Renault T., Bouilly K., Lapègue S., Thomas-Guyon H. (2003) Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Current Pharmaceutical Design* 9, 193-199.
- Gagnaire B. (2005) Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, La Rochelle, 377 p.
- Gagné F., Blaise C., Pellerin J., Gauthier-Clerc S. (2002) Variation in the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. *Mar. Environ. Res.* 53, 295-310
- Gagné F, Blaise C. (2003) Effects of municipal effluents on serotonin and dopamine levels in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 136, 117-125
- Gagné F, C. Blaise (2005) Effects of pharmaceutical on aquatic biota. Review. *Research trends, current topics in toxicology*. In press.
- Geret F., Burgeot T., Haure J., Gagnaire B., Renault T., Quirion S., Papin M., Ménard D., Jadas-Hecart A., Communal P.Y., Samain J.F. (2006) Physiological and metabolic responses to pesticides in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Env. Res.* (soumis).
- Gerwick L, Reynolds WS, Bayne CJ (2000) A precerebellin-like protein is part of the acute phase response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology* 24, 597-607.
- Gonzalez M, Romestand B, Fievet J, Huvet A, Lebart MC, Gueguen Y, Bachère E (2005) Evidence in oyster of a plasma Extracellular Superoxide Dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 1089-1097.
- Goodall C.P., Bender R.C., Broderick E.J., Bayne C.J. (2004) Constitutive differences in Cu/Zn superoxide dismutase mRNA levels and activity in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) that are either susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni* (Trematoda). *Molecular and Biochemical Parasitology* 137, 321-328.
- Gueguen Y., Cadoret J.P., Flament D., Barreau-Roumigièrre C., Girardot A.L., Garnier J., Hoareau A., Bachère E., Escoubas J.M. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags



- generated from haemocytes of the bacteria-challenge oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, 139-145.
- Hermes-Lima M., Storey J.M., Storey K.B. (1998) Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 120, 437-448.
- Heude Berthelin C. (2000) Etude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. Thèse de l'Université de Caen, 156pp.
- Huvet A, Herpin A, Dégremont L, Labreuche Y, Samain JF, Cunningham C (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progenies exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*, 343, 211-220.
- Kang S.G, Choi K-S, Bulgakov A.A., Kim Y., Kim S.Y. (2003) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology* 282, 1-21.
- Labreuche Y., Soudant P., Goncalves M., Lambert C., Nicolas J.L. (2006) Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 367-379.
- Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Gelebart F, Cordevant C, Lange M, Poulet SA (2001a) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Organ.* 46, 139-45.
- Lacoste A, Jalabert F, Malham SK, Cueff A, Poulet SA (2001b) Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol.* 67, 2304-9.
- Lambert C., Nicolas J.L. (1998) Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic Vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 53-63.
- Lambert C., Soudant P., Choquet G., Paillard C. (2003) Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 225-240.
- Leitão A., Boudry P., Thiriôt-Quiévreux C. (2001a) Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. *Aquaculture* 193, 39-48.
- Leitão A., Boudry P., McCombie H., Gérard A., Thiriôt-Quiévreux C. (2001b) Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquat. Living Resour.* 14, 233-237.
- Leitão, A., Boudry, P., Thiriôt-Quiévreux, C., 2001c. Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genome* 44, 735-737.
- Léonard P. (2002) Rapport de la fédération régionale de défense contre les organismes nuisibles Poitou-Charentes, GRAP.97pp
- Léonard S. (2003) Réseau régional de suivi de la qualité des eaux vis à vis des produits phytosanitaires. Année 2002, GRAP, Fédération Regionale de Défense contre les Organismes Nuisibles Poitou-Charentes, 73.
- Le Roux F (2004) Taxonomie et virulence des vibrions pathogènes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. Habilitation à Diriger des Recherches. Université de Paris VI.
- Li Q, Osada M., Suzuki T., Mori K. (1998) Changes in vitellin during oogenesis and effect of oestradiol-17 β on vitellogenesis in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 87-93.
- Looise B.A., Holwerda D.A., Foekena E.M. (1996) Induction of glutathione S-transferase in the freshwater bivalve *Sphaerium corneum* as a biomarker for short-term toxicity tests? *Comp. Biochem. Physiol.* 113, 103-107.
- Manduzio H., Rocher B., Durand F., Galap C., Leboulenger F. (2005) The point about oxidative stress in molluscs. *I.S.J.* 2, 91-104.
- Mathieu M., Lubet P. (1993) Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves-a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23, 123-129.
- Moal J., Le Coz J.R., Samain J.F., Daniel J.Y. (1989) Nucleotides in bivalves: extraction and analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B, 307-316.
- Montagnani C., Le Roux F., Berthe F., Escoubas J.M. (2002) *Cg-TIMP*, an inducible tissue of metalloprotease from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS letters* 500, 64-70.
- Moore RK, Erickson GF, Shimasaki S (2004) Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals ? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15, 356-361.



- Munoz M., Vandebulcke F., Saulnier D., Bachère E. (2002) Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur J Biochem* 269, 2678-2689.
- Myrand B., Guderley H., Himmelman J.H. (2000) Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197, 193-207.
- Perdue J.A., Beattie J.H., Chew K.K. (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington state. *J. Shellfish Res.* 1, 9-16.
- Renault T, Le Deuff RM, Cochennec N, Chollet B, Maffart P (1995) Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet Res.* 26, 539-43.
- Roch P. (1999) Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125-145.
- Ruiz C., Martinez D., Mosquera G., Abad M., Sanchez J.L. (1992) Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Mar. Biol.* 112, 67-74.
- Russo J., Lagadic L. (2004) Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environmental Pollution* 127, 303-311.
- Smolders R., Bervoets L., De Coen W., Blust R. (2004) Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organisation. *Environmental Pollution*. 129, 99-112.
- Soletchnik P., Razet D., Geairon P., Faury N., Gouletquer P. (1997) Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquat. Living Resour.* 10, 177-185
- Tanguy A., Moraga D. (2001) Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene.* 273, 123-130.
- Terech-Majewska E., Siwicki A.K., Szweda W. (2004) Modulative influence of lysozyme dimer on defence mechanisms in the carp (*Cyprinus carpio*) and European sheatfish (*Silurus glanis*) after suppression induced by herbicide Roundup. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 7, 123-128.
- Torreilles J., Guerin M.C., Roch P. (1996) Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves] *C. R. Acad. Sci. III* 319, 209-218.
- Warren C.E., Davis G.E. (1967) Laboratory studies on the feeding bioenergetics and growth in fish. In: Gerking, S.D. (Ed), *The biological basis of freshwater Fish Production*. Blackwell, Oxford, pp. 175-214.
- Zouros E., Thiriou-Quévieux C., Kotoulas G. (1996) The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. *Genetic Research* 68, 109-116.

10. Annexe : Synthèse des résultats de comparaison phénotypique des souches R et S soumise au journal *Aquaculture*.

TITLE: Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes.

Authors: J.F. Samain^{1*}, L. Dégremont², P. Soletchnik³, J. Haure⁴, E. Bédier⁵, M. Roper⁶, J.Moal¹, A. Huvet¹, H. Bacca¹, A. Van Wormhoudt¹⁰, M. Delaporte¹, K. Costil⁹, S. Pouvreau¹, C. Lambert¹¹, V. Boulo⁷, P. Soudant¹¹, J.L. Nicolas¹, F. Le Roux², T. Renault², B. Gagnaire², F.Geret⁸, I. Boutet¹¹, T. Burgeot⁸, P. Boudry².

Address: ¹ UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer, Centre de Brest, B.P 70, 29280 Plouzané, France; ² Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, 17390 La Tremblade, France; ³ Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais, Ifremer, 17390 La Tremblade, France, ⁴ LER Pays de Loire, Polder des champs, 85230 Bouin, France, ⁵



Laboratoire Environnement Ressources Morbihan Pays de la Loire, Ifremer, 56470 La Trinité, France; ⁶ Laboratoire Environnement Ressources de Normandie, Ifremer, BP 32, 14520 Port en Bessin, France, ⁷ Laboratoire GPIA 2 Place E. Bataillon, Université de Montpellier, CC80, F-34095 Montpellier cedex 5, France, ⁸ Laboratoire d'Ecotoxicologie, Ifremer, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France, ⁹ UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Université de Caen, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France, ¹⁰ UMR 5178, Station de Biologie Marine du Muséum National d'Histoire Naturelle, BP225, 29900 Concarneau, France; ¹¹ LEMAR IHP and RSA, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané France.

*** Corresponding author:**

Jean-François Samain. Email: jfsamain@ifremer.fr. UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané, France. Phone: +33 (0)2 98 22 44 02 - Fax : +33 (0)2 98 22 46 53

Abstract

Summer mortality of Pacific oysters is known in several countries. However no specific pathogen has been systematically associated with this phenomenon. A complex combination of environmental and biological parameters has been suggested as the cause and is now starting to be identified. A high genetic basis was found for survival in oysters when a first generation (G1) was tested in three sites during summer. This paper presents a synthesis on physiological characteristics of two selected groups ('R' and 'S', from families selected for resistance and susceptibility to summer mortality respectively), of the second and third generations. R and S showed improvement or reduction of survival compared with the control in both field and laboratory trials confirming the high heritability of survival of juveniles <1-yr-old. Interestingly, no correlation was observed between growth and survival.

Comparison between the two selected groups showed that S oysters invested more energy in reproduction and stayed a longer time without spawning than R oysters which had high synchronous spawning. This was mainly shown with high rather than low dietary rations (respectively 12% and 4% DW algae/DW oyster) in a controlled experiment. Moreover, early partial spawning was detected in S oysters and not R ones in the high dietary ration. S showed a higher respiration rate and an earlier decrease in absorption efficiency than R during gametogenesis, but they were not significantly different in glycogen or ATP utilisation. Two months before a mortality episode, hemocytes from S oysters had a higher adhesive capacity than R hemocytes and significantly higher reactive oxygen species production capacity. One month before mortality, S oysters had the highest hyalinocyte concentration and their expression of genes coding for glucose metabolism enzymes (Hexokinase, GS, PGM, PEPCK) was significantly lower in the labial palps. After a thermal increase from 13°C to 19°C, during 8 days in normoxia, S oysters showed a large HSP70 increase under hypoxia contrary to R oysters, suggesting their high susceptibility to stress. Their Catalase activity was lower than in R oysters and showed no further change to subsequent hypoxia and pesticide stresses, in contrast to R oysters.

These observations suggest possible links between higher reproductive effort in S oysters, their specific stress response to temperature and hypoxia, ROS production, partial spawning, hyalinocyte increase and the infection process. To compare R and S oysters in a more integrated way, a suppression subtractive hybridisation (SSH) library and a micro-array strategy are being undertaken.

1. Introduction

According to Koganezawa (1974), the phenomenon known as *Crassostrea gigas* "summer mortality" first began along the Japanese Pacific coast in 1945. Features common to mortality episodes were elevated temperature, full maturation or spawning and high trophic conditions. The relationship between gonadal maturation, energy metabolism, and the mortalities was investigated (Koganezawa, 1974, Mori, 1979) and it was concluded that summer mortality in Japan was due to a "physiological disorder and metabolic disturbance derived by heavy gonad formation and massive spawning under high water temperature and eutrophication" (Koganezawa, 1974). In the late 1950s, mortalities of *C. gigas* were first noted on the west coast of USA (Glude 1975, Cheney et al., (2000). Experimental studies further implicated gonadal maturation and loss of carbohydrate reserves (Perdue et al., 1981). Lipovsky and Chew (1972) showed experimentally that rising temperature (up to 21°C) or high levels of microalgae significantly increased mortality. Different pathogens were isolated but none of them could explain summer mortality (Elston et al., 1987, Friedman et al., 1998,



1991, 2005). In France, oyster production has experienced periodical mass mortalities for the last 20 years (Renault *et al.*, 1994; Gouletquer *et al.*, 1998; Soletchnik *et al.*, 1999). Results have confirmed that summer mortality is the result of multiple factors including elevated temperature, physiological stress associated with maturation, aquaculture practices, pathogens, pollutants, etc... (Soletchnik *et al.*, 1997, 2005a, Gouletquer *et al.*, 1998, Le Roux 2002, 2004, Gay *et al.*, 2004a). Despite inter-annual and inter-livestock variability, mortality of oysters reared on the sediment (or a few centimetres above) was significantly higher (20-30%) than mortality of animals on tables (iron frames) (Soletchnik *et al.*, 1999, 2003, 2005b). The Morest project on *C. gigas* oyster summer mortality (2001-2005) progressively classified the importance of these different factors by coupling field and experimental studies (Samain *et al.*, 2004a, 2004b, Soletchnik *et al.*, 2005b). Summer mortality has also been described in cultured eastern oysters, *C. virginica*, on the north-eastern coasts of the USA where a disease named Juvenile Oyster Disease (JOD) was reported. This disease only affects juvenile (<1 year old) and fast growing oysters when seawater temperature exceeds 20°C and plankton blooms occur (Lee *et al.*, 1996). JOD can cause the death of up to 90% of affected stocks within a few weeks (Bricelj *et al.*, 1992; Ford and Borrero, 2001). Studies have shown a genetic basis for the resistance to JOD allowing the production of resistant strains (Lewis *et al.*, 1996).

Increasing stress and disease tolerance of economically important species has long been considered feasible through selective breeding. For oysters, genetic variability is thought to be a major determinant in sensitivity to summer mortality (Hershberger *et al.*, 1984). Selected families produced in a breeding program showed greatly improved survival both in the field and in elevated-temperature laboratory trials (Beattie *et al.*, 1980). However these selected stocks appeared thinner, smaller and had slower growth than unselected stocks. During the Morest project, Dégremont *et al.* (2005) showed that 45% of the observed variance in mortality in the field was due to variation among families. Such resistance, against a complex of factors affecting survival, is a very attractive model for understanding biological resistance mechanisms. Moreover, natural populations are likely to be under selective pressure and consequently eliminate susceptible oysters. However, these observations suggest a possible difference in fitness and adaptation between resistant and susceptible oysters in different environments. In this paper, we describe the results of divergent selection based on these criteria, and present a review of the main biological aspects associated with resistance or susceptibility, by comparison of field and experimental data from different disciplines.

2. Material and Methods

2.1. Biological material

A first generation (G1) was produced following a half-sib mating design and tested in the Rivière d'Auray (South Brittany, France) in 2001 (Dégremont *et al.*, 2005). According to survival performances after the summer period, 6 families showing high survival and 6 families showing high mortality were crossed in 2002 to breed a second generation (G2) by divergent selection. The 2 selected groups, each composed of several batches, are referred to hereafter as 'R' and 'S' for progeny from parents respectively 'resistant' and 'susceptible' to summer mortality. All batches were placed in the field and mortality was recorded during summer 2002. A third generation (G3) was produced in 2003 in the same manner and tested in the field the same year.

2.2. Controlled diet experiment

One-year-old G2 oysters from three families with the R phenotype and two families with the S phenotype were respectively mixed to form R and S stocks. These were kept at the IFREMER shellfish laboratory in Argenton (Finistère, France) from April to September 2003, in separate 700-L raceways. The R and S oysters were each divided into two groups and fed either 4% or 12% algal dry weight (DW) per oyster dry weight (termed as 4% and 12% diets respectively) and kept at Marennes-Oléron mean temperatures and photoperiod cycles as described in Enriquez-Diaz, (2004). Tanks and oysters were cleaned daily, which allowed the assessment of oyster mortality on a daily basis over the whole experiment. Spawning was induced at the end of August by thermal shock. Continuous records of florescence and turbidity in the tanks were performed using optic sensors. Oysters (n=20) were sampled monthly or twice a month for biochemical, and haemocyte parameters.

2.3. Semi-quantitative histology

The length of the visceral mass was measured for each oyster, then the mass was divided into three equal portions. Sections of 5µm were cut at three representative body levels (see Enriquez-Diaz,



2004 for details). These were fixed in Davidson's solution (Shaw and Battle, 1957) and dehydrated in an ascending alcohol series for wax embedding. They were mounted and stained in Harris hematoxylin and counter-stained in eosin Y following the standard method proposed by Martoja and Martoja-Pierson (1967). Percentages of gonad and digestive areas (GA and GD, respectively) were then determined on each histological section. Slides were scanned with a digital scanner (hp scanjet 7400c) and the images saved in *.TIFF format. Tissue areas were then measured using image analysis software (Imaq Vision Builder, National Instruments Corp.). Gonad area percentage was estimated as pixel number from gonad / pixel number from total section.

2.4. Measurement of ingestion, assimilation and respiration rates

From June to August, water flowing in and out of each raceway was periodically sampled for phytoplankton and oxygen concentration measurements. According to the flow rate in each raceway, these concentrations were used to calculate ingestion (C , $J.h.g^{-1}$) and O_2 consumption rate (R , $mgO_2.h^{-1}.g$) (Enriquez-Diaz, 2004). Bio-deposits were collected periodically to estimate the absorption efficiency (AE, %), measured by the Conover ratio (Conover, 1966): $AE = F - E / [(1 - E) \times F]$, where AE = Absorption efficiency; F = Organic content of the food; E = Organic content of faeces.

2.5. Biochemical composition

At each sampling date, biochemical analyses were performed on 10 individual oysters as described in Delaporte et al. (in press). Individual animals were frozen in liquid nitrogen ($-196^\circ C$) and ground with a Danguomeau homogeniser. A known amount of frozen homogenate was used for the different analyses. Total carbohydrate content was measured as described by Dubois et al. (1956). Results were expressed as percentage of oyster dry tissue weight.

Adenylate Energy Charge (AEC) analyses were realised on the same powder used for dry weight measurement and biochemical analyses, according to Moal et al. (1989). AEC, which represents an estimation of the "instantaneous" cellular energy available, was calculated as: $AEC = (ATP + 0.5 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$, which varies between 0 and 1.

2.6. Quantification of relative gene expression

For gene expression analysis, 4 pools of 5 oysters were collected every month. The data reported here are from June. Labial palps were dissected and lysed in RNA extraction buffer (Extract-all, Eurobio). Total RNA was isolated using the Eurobio procedure, and polyadenylated RNAs were reverse-transcribed from 1 μg of total RNA denatured for 10 min at $70^\circ C$ as described in Bacca et al. (2005).

The detection and relative quantification of hexokinase (HK), phosphoglucosmutase (PGM), pyruvate kinase (PK), phosphoenol pyruvate kinase (PEPCK), glycogen synthase (GS) and glycogen phosphorylase (GP) mRNA were carried out by real time PCR using SYBR Green chemistry. Amplification of glucose-6-phosphate dehydrogenase cDNAs was performed in order to confirm the steady-state level of expression allowing an internal control for gene expression. Specific primers used for amplification are indicated in table 1. Real time PCR was performed, as described in Bacca et al. (2005), allowing the calculation of the relative quantity of target mRNAs. PCR efficiencies were determined for each primer pair by determining the slope of standard curves obtained from serial dilution analysis of cDNA.

2.7. Measurement of hemocyte parameters by flow cytometry

Various hemocyte parameters were analysed monthly from April to September using a flow cytometer (FACScalibur Becton-Dickinson): hyalinocyte and granulocyte concentrations (cells per mL), hemocyte mortality (%), phagocytosis rate (% active hemocytes able to engulf more than 3 fluorescent beads in an hour at $18^\circ C$) and hemocyte adhesive capacity in sea-water (% adhesive cells after 3 hours incubation at $18^\circ C$ in sterile sea-water). Additionally, hyalinocyte and granulocyte production of reactive oxygen species (ROS) was evaluated after two hours incubation in sterile sea-water (expressed in arbitrary units). For all these parameters, methods have been previously described (Choquet et al., 2003; Delaporte et al., 2003; Lambert et al., 2003; Delaporte, 2005).

2.8. Stress and pesticide experiment

Oysters from the second generation produced in 2002 were stored at $13^\circ C$ in the Bouin nursery from May 2002 (Dégremont et al 2005). In December 2002, two 7 day experiments with pesticides were performed successively using a total of 300 R oysters and 300 S oysters. The first one was performed in normoxia, the second in hypoxia. In each experiment, half of the population was firstly acclimated progressively from $13^\circ C$ to $19^\circ C$ over 6 days, with two more days at $19^\circ C$, and a



seawater renewal once a day. Thereafter oysters were exposed in two tanks (1200 L each) to pesticides or without pesticides with the same oxygen condition. Exposures were carried out for 7 days under controlled conditions (100% or 30% oxygen using oxygen or nitrogen respectively, temperature: $19 \pm 1^\circ\text{C}$, salinity: 32 ± 0.5 psu). The mixture of pesticides was: carbaryl $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$, diuron $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, metalochlore $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, fosetyl $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, terbutylazine $6 \mu\text{g.L}^{-1}$, glyphosate $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, atrazine $6 \mu\text{g.L}^{-1}$, alachlore $2 \mu\text{g.L}^{-1}$. The total concentration of pesticides was $24.5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Ten R and ten S oysters were removed from each treatment for each sampling date (0, 1, 3, 7 days). Mantle, digestive gland and gills were dissected, weighed and then frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyses of enzyme activities and protein content were made. Only gills in normoxia, hypoxia and hypoxia with pesticides are reported here in example. They were then homogenized in appropriate buffers for the different analyses as described in the publications cited below. HSP70 quantification by ELISA was made as described in Boutet et al. (2003). Catalase (EC 1.11.1.6) (CAT) activity was measured in the gills according to Greenwald (1985). Total protein concentration of the supernatant was measured according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard.

2.9. Infection challenges and hemolymph bacterial counts.

Bacterial challenge by injection was performed with strains belonging to *Vibrio splendidus* or *V. aestuarius* species as described previously (Gay et al., 2004b, 2004c, Labreuche et al., 2005).

Challenges by the bath method were performed by bathing 3×30 or 3×20 oysters per batch in 10^6 cell ml^{-1} (final concentration) of *Vibrio aestuarianus* (strain 02/041). Before this challenge, oysters were submitted to temperature shock (40°C for 2 hours). The experiment lasted 11 days at $19 \pm 1^\circ\text{C}$ and was performed with R and S oysters from the field (Rivière d'Auray 2002) and from the two treatments (4% and 12%) of the controlled diet experiment described above.

A survey of bacteria in hemolymph from healthy R and S oysters placed in the Rivière d'Auray site was performed in 2002. The oysters were placed in bags on a table at 70 cm above the sediment. Five animals per batch were sampled every month from May to September. Bacterial concentrations in sterilely withdrawn hemolymph were determined by serial ten-fold dilutions and plating onto Marine Agar.

2.10. Statistical analysis :

Survival was analysed by a logistic regression using the GENMOD procedure and a log transformation for binomial data using SAS[®] software (SAS Institute Inc., 1995). Statistical analyses of growth and yield are described in Dégremont et al. (2005).

Enzymatic activity data were log transformed and analyzed by an ANOVA using Duncan's test for paired multiple comparisons with the software Statistica.

Multifactor analysis of variance (MANOVA) was performed for all biochemical and immune parameters using STATGRAPHICS Plus 5.1 (Statistical Graphs Corp.). Percentage data were transformed (arcsine of the square root) before MANOVA.

3. Results

3.1. R and S mortality, growth and yield

Mortality, individual weight (initial and final) and yield are presented in table 2. The R group showed much higher survival than the S group and the control had intermediate survival ($p < 0.0001$) for both generations in Rivière d'Auray (i.e., G2 and G3 from 2002 and 2003 respectively). For example in 2002 for G2, summer mortality of the S oysters was 43%, while it was only 7% for R oysters and 24% for the unselected control. Similar results were found in 2003 for G3 where summer mortality of S was 73%, while it was only 27% for R and 48% for the unselected control. No significant growth difference was found between R, S and the control in either generation ($p > 0.05$). A significant effect was observed for the yield though: in G2, R had a daily yield 77% higher than S, and the control yield was 40% higher than S (Table 2). Similar results were found for the G3 with the highest daily yield in the R oysters, half as much for the control, and a quarter in the S oysters.

In the controlled diet experiment, a mortality event was recorded. Although cumulative mortality remained below 5% during the first two months of the experiment, a rapid increase was seen in July (Fig.1). where differences in mortality were shown between groups and treatments. Oysters batches fed the 12% diet suffered higher mortalities than those fed the 4% diet, and S oysters had higher



mortalities than R oysters. Consequently, a gradient was observed in cumulative mortality: 12% S > 12% R > 4% S > 4% R, from July until the end of the experiment in September.

3.2. Reproductive strategy

Quantitative histology performed on R and S oysters, reared in the same field site (Rivière d'Auray) showed there was higher reproductive investment in S compared with R oysters during the first part of gametogenesis. Thereafter, a small decrease in S gonad index led to similar gonad volume between the groups. R oysters spawned completely in August when maximum temperature reached 20 °C. However, S oysters did not spawn completely and a progressive gamete resorption was observed in fall (Fig. 2). This observation was repeated in 2004, under similar thermal conditions, but not in 2003 when temperature increased sharply to a maximum of 22 °C and R and S oysters spawned synchronously (data not shown).

Under high dietary rations (12%) in the controlled diet experiment, a large variability in gonad area index was observed for S oysters compared to R ones (Fig. 3). Due to this variability, the only trend clearly shown was an initial higher germinal investment for S compared with R, followed by a small decrease corresponding to partial spawning of S at the end of June (observed on continuous records of environmental data in the tank). With the low diet (4%), gonad area index increased less but in a more regular manner than with the 12% diet and no difference appeared between R and S oysters. In August a thermal stimulation was applied to induce spawning and both S and R oysters in the 4% diet spawned completely. In the 12% diet however, only the R oysters spawned completely. R oysters therefore showed the same spawning behaviour in both treatments, whereas an interaction with diet occurred for the S.

3.3. Energy acquisition and expenditure

During the dietary experiment, consumption (Fig.4a) was similar between R and S oysters in both diets and increased progressively during summer from 22 to 30 J.h⁻¹.g⁻¹ in the 4% diet and from 60 to 85 J.h⁻¹.g⁻¹ in the 12% diet. In contrast, AE (fig.4b) decreased over time reaching a minimum in August particularly for oysters in the 12% diet. No differences in AE were found between R and S oysters, except at the beginning of the measurements in June for oysters fed the 12% diet. As for energy use, the respiration rates (fig.4c) were slightly but significantly higher for S compared with R oysters.

During the same period, the use of energy previously stored for gametogenesis (Total glucose and AEC) was similar for R and S oysters whatever the diet (Fig.4d). During the critical period (June) preceding the summer mortality period, levels of mRNA coding for Hexokinase (HK), Phosphoglucosmutase (PGM) and Phosphoenolpyruvatecarboxy kinase (PEPCK) were significantly lower for S oysters than for R ones ($t = 4.28, 4.86$ and 3.20 respectively ; $p < 0.05$) (Fig.5).

3.4. Hemocyte characteristics

R and S oyster hemocyte parameters were recorded throughout the diet experiment (Delaporte 2005). Hemocyte parameters observed before and during the mortality event in mid July are summarized in Table 3. Whatever the diet concentration, no difference was observed in percentage hemocyte mortality which was low (<5%, i.e more than 95% cell viability) (ANOVA, $p > 0.1$). The first difference between S and R was observed in April (data not shown) and in May where S oyster hemocytes exhibited a higher adhesive capacity than R ones (Kruskal-Wallis, $p = 0.02$). Reactive oxygen species ROS were significantly higher in S than in R oysters in May for both hyalinocyte and granulocyte sub-populations (ANOVA, $p = 0.0001$ and $p = 0.0036$ respectively), and in June (Kruskal-Wallis, $p = 0.015$ and $p = 0.035$). After July and the major mortality event, ROS decreased and was identical for R and S oysters. Hyalinocyte concentration increased significantly more for S than for R oysters in July just before the mortality event (Kruskal-Wallis, $p = 0.055$).

3.5. Biomarker response to experimental temperature elevation and stress with hypoxia and pesticides

Several biomarkers were tested to investigate the difference in R and S oyster stress response. Surprisingly, stress protein levels (HSP70) were different between R and S oysters at J0, after 8 days of acclimation from 13 to 19°C in the two independent experiments before normoxia and hypoxia condition ($p < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively) (Fig.6 left). This difference disappeared rapidly with time in normoxia, with the progressive increase of HSP70 from R oysters. However, in hypoxia, HSP70 from S increased to a high level in 3 and 7 days ($P < 0.01$) as it stayed low and constant whatever the condition for R. This increase was not observed for S oysters after pesticides were added to hypoxia. Catalase activity (Fig 6 right) was very stable for S oysters, whatever the



condition. It was also quite stable for R oysters, but their level was significantly higher ($p < 0.05$). An increase in catalase activity was however observed in R oysters when exposed to hypoxia and pesticides at day 3 ($p < 0.05$).

3.6. Experimental infections and field analyses:

Similar mortality levels were observed in both R and S from the field after injection of virulent strains of *V. splendidus* or *V. aestuarianus* into the oyster muscles (Nicolas pers. comm. Gay 2004b). A significantly higher susceptibility of S compared with R oysters was however observed in May when animals of 15 months from Rivière d'Auray were submitted to a heat shock stress followed by a *V. aestuarianus* bath challenge. This difference was not observed for younger R and S spat of 4 months from the same site (Fig.7). Using the same bacterial bath challenge but with animals from the controlled diet experiment, high mortality and differential responses were observed between R and S with the 12% diet ($p < 0.05$). A lower mortality was observed at 4% diet with no difference between R and S (Fig.7).

During May and June, bacterial concentrations in the hemolymph of apparently healthy oysters from Rivière d'Auray, increased to 10^5 ml^{-1} , then decreased to very low levels ($< 10^2$) after the mortality event (Fig.8). During the period of bacterial increase, concentrations tended to be higher in S oysters than in R ones, although these differences were not significant.

4. Discussion

4.1. Genetic effect

R oysters demonstrated a better survival than S oysters indicating a positive response to selection for survival. These findings, combined with similar growth observed for the two selected groups and the unselected control, gave a overall higher yield for R compared with S, and intermediate yield in the control. Langdon et al. (2003) reported that yield is a heritable trait, but without distinguishing the relative influence of survival and growth. In Rivière d'Auray, survival explains most of the yield variability (Dégremont et al., 2005) indicating that survival is the most important parameter to improve in sites showing high summer mortality. Such results were repeated over 3 successive generations leading to the conclusion that a family-based selection program could be useful to develop summer mortality resistance in the field at the spat stage. The high heritability for survival also suggests that only a few genes are involved for survival in oysters under one year old.

4.2. Reproductive strategy

An overview of the results comparing R and S oysters in the field and in experimental conditions, would suggest that a difference in reproductive strategy is a key point for resistance. An apparently higher germinal investment in the S oysters compared to R ones observed in the field was reproduced under controlled experimental conditions when oysters were fed the high (12%) diet. A possible genetic difference in energy allocation to reproduction between the two groups when faced with the different diets could explain this divergence. Food availability, energy balance and reproduction are strongly related in many organisms, such as vertebrates, through complex regulatory factors (Schneider 2004). Among them, the neuropeptide Y (NPY) acts as a switch for appetite, sex and reproduction (Kalra and Kalra 2001). It has also been also detected in invertebrates (de Jong-Brink 2001), and represents a possible line of investigation into genetic differences in reproductive strategy.

Partial spawning characterized S under experimental conditions with rapid re-maturation processes explaining the observed fluctuations in S gonad quantitative histology seen in the field. Complete spawning was not obtained in experimental conditions for S oysters fed the 12% diet under classical heat shock induction. These results confirm field observations as S oysters did not have one major spawning, but partial spawnings observed at temperatures between 20 and 21°C about a month before the major spawning of the R oysters. This could represent a difference in sensitivity to temperature between the two groups because in 2003, when temperature in the field increased above 21°C, both groups had complete synchronous spawning (data not shown). Differences in spawning strategy and spawning induction by biotic or abiotic factors are another way in which R and S oysters could be genetically compared.

Differences in reproductive strategy could reflect differences in fitness between the S and R groups, but this difference would vary according to environmental conditions which might explain why S oysters are not always counter-selected in the wild.



4.3. Reproduction intensity and energy balance:

As reported by Koganezawa (1974), Mori (1979) and Perdue et al. (1981), mortality was associated with high reproductive activity when glycogen reserves decreased and reached low points just before mortality events. Such depletion of reserves would possibly lead to energetic imbalances if temperature then increased. Recently, Pouvreau et al., 2003, and Enriquez-Diaz (2004) demonstrated, using an oyster population with a large genetic base, that an increase in dietary ration during the reproductive period induced a higher investment in gametogenesis. However, there was also a higher susceptibility to experimental infection than with a low diet (Gay 2004c). Lipovsky and Chew (1972) previously showed that adding high doses of microalgae to tank seawater significantly increased mortality. Working on different phenotypes, our findings are similar to these previous results, showing that in the 12% diet, S oysters exhibited a higher investment in gametogenesis but also a higher susceptibility to mortality compared with the 4% diet and R oysters. This antagonistic correlation between reproductive investment and survival when food is abundant was also reported by Ernande et al. (2004). At the other end of the scale, when food is scarce, survival is favoured. The higher investment in gametogenesis in the S oysters is demonstrated through a higher respiration rate compared with R oysters and probably corresponds to higher biosynthetic activity. Assimilated energy was equivalent between S and R, except for an earlier decrease in absorption efficiency by S oysters occurring the month before the mortality. Respiration and absorption efficiency differences could have resulted in an unfavourable net energy balance in the S oysters. Temperature increase, spawning and/or other adverse factors could enhance this imbalance. Bourles (2004) showed that the respiration rates increased by a factor of nearly 2 over 48 h during a partial spawning. Such increases in energy demand when stored glycogen is at a low level in summer (Maurer et Comps, 1986; Li et al., 2000; Berthelin et al., 2000) could weaken the organism.

4.4. Energy storage and fluxes

Possible differences in the storage and dynamics of total glucose and AEC were investigated. Results showed that these parameters decreased in a similar pattern and level for the R and S groups during the period preceding summer mortality whatever the dietary ration supplied.

Total glucose and AEC described apparent energy stores but not fluxes. However, the first molecular results showed that some S oyster genes coding for glucose 6P (Hexokinase, phosphoglucosmutase and phosphoenolpyruvatecarboxy kinase) had significantly lower mRNA abundance compared with results from R oysters during the period immediately preceding summer mortality. This was not observed in other months (Bacca.pers.comm.) and suggests a difference in glucose flux regulation between the two groups in the month before the mortality episode. This difference might not be permanent in the S oyster, but could result from a specific response of these oysters to an external temporal factor such as a stress or infection. Glucose 6P plays a major role in metabolism, especially to rapidly provide energy to meet cell requirements. When stored glycogen is nearly used up and energy demand increases with temperature and reproductive activity, a difference in glucose uptake capacity from food or from amino acid neoglucogenesis could be critically important for coping with stress or pathogens.

4.5. Hemocyte characteristics in R and S groups

Oyster hemocyte responses were investigated during the critical period preceding summer mortality. Bacterial species may have various, even opposing, effects on the immune response of bivalve hemocytes (Bramble and Anderson, 1997; Lambert and Nicolas, 1998; Cheng, 2000; Canesi et al., 2002; Lambert et al., 2003). It is therefore difficult to interpret the different hemocyte activities observed during the period preceding the mortality event or to conclude there was possibly a better immune response of R hemocytes compared to S. However, a comparison of hemocyte activities between R and S oysters from the controlled diet experiment, showed differences in the dynamics of several hemocyte parameters. S oysters had a higher adhesive capacity than R oysters as early as April and May, a higher level of ROS in May-June, and of hyalinocyte concentration in July just before the mortality episode. The most striking result regarding hemocyte activities was the large difference between R and S for ROS production in May and June. ROS production of S oysters was from 1.5 to > 3 times that of R oysters depending on the diet and hemocyte type. Although production of ROS after activation by phorbol myristate acetate (PMA) (Nakayama, Maruyama, 1998; Arumugam et al., 2000; Takahashi, Mori, 2000; Goedken, De Guise, 2004) or during phagocytosis of zymosan particles (Bachère et al., 1991; Le Gall et al., 1991; Bramble and Anderson, 1998; Lambert and Nicolas, 1998; Lambert et al., 2001) has been frequently used to estimate bivalve hemocyte competence in internal defence, in this study ROS production by hemocytes was measured after two hours incubation in sterile sea-water without any addition of PMA or zymosan. Our result could



reflect a physiological disorder of the S oysters, due to a bacterial or viral infection or to an environmental stress. Since ROS are known to be microbicidal, they are also detrimental to oyster cells. The final increase in circulating hemocytes from S oysters before mortality could be linked to infection. Such results have been reported in bivalves infected with protozoans: *Haplosporidium nelsoni* (Ford et al., 1993), *Martelia refringens* (Carballal et al., 1998), *Perkinsus atlanticus* (Ordas et al., 2000), *Bonamia ostreae* (Cochennec-Laureau et al., 2003); and bacteria: *Vibrio* sp. (Paillard et al., 1996), *Vibrio tapetis* (Oubella et al., 1996). However, other factors like environmental parameters (temperature, salinity, etc.) or physiological status (reproduction, stress, etc.) could modulate the hemocyte parameters and consequently the immune system of bivalves (Fisher et al., 1990; Oliver and Fisher, 1995; Fisher et al., 1996; Carballal et al., 1998; Fisher et al., 2000; Oliver et al., 2001; Auffret et al., 2002).

4.6. Effect of stress

These differences in hemocyte parameters over time suggest that S and R oysters react differently to environmental stress or infection. This stimulation is detectable between one and a half months before mortality event when gametogenesis and temperature increased. Furthermore, in the field, a strong negative effect associated with sediment proximity was traced through a decrease in oyster Walne and Mann index one month before mortality occurred, and correlated with mortality rate (Soletchnik et al. 2005b). This could be due to stress by toxic compounds (H_2S , NH_3 , NH_4^+) from the sediment during this period (Knoery et al. personal communication). Several markers were tested to investigate differences in R and S oyster stress response. A significant difference was observed between S and R for HSP70 and catalase activity during an adaptation from 13°C to 19°C before the hypoxia and pesticide stress experiment. This difference increased dramatically under hypoxia but did not affect R oysters. These observations suggest a higher susceptibility of S oysters compared to R ones to some uncontrolled experimental stress or specifically to hypoxia. The rapid temperature increase or the handling of oysters during the experiment preparation could be such an event. Increasing the temperature and food for 15 days in this period (December) is also a classic method to induce also broodstock gametogenesis. This seems to be an important aspect for understanding the specific response of S oysters to stress as they invest more in gametogenesis than R oysters. At last pesticides had an opposite effect and inhibited the specific HSP70 increase in S oysters under hypoxia conditions. It is possible that these two events had a detrimental effect on the general metabolic regulations (Piano et al., 2005). The very low level of gene expression coding for glucose 6P metabolism in S oysters one month before mortality in the feeding experiment can also reflect such a general disturbance. The difference in catalase response between the two groups could have some consequence in ROS detoxification processes that are generally associated to stress (Lacoste et al., 2002). It could explain the high level of ROS observed in the S oysters two months before mortality in the feeding experiment. It will be necessary to clarify the possible link between these two parameters with new experiments.

4.7 Stress and gametogenesis

Interactions between stress and reproduction described in the literature can help to explain the detrimental effects of temperature and gametogenesis for S oysters. Two aspects can be considered. On one hand, an immediate temporary increase in dopamine and noradrenaline was reported after acute mechanical stress on *C. gigas* (Lacoste et al., 2001a) with successive inhibition and activation of hemocyte activities (ROS production and phagocytosis) for two hours before these returned to their baseline (Lacoste et al. 2002). Under chronic stress, the levels of dopamine and noradrenaline appeared to be maintained above the baseline for a longer time (Lacoste 2001b). On the other hand, spawning can be induced by thermal shock in bivalves (Barber and Blake, 1991) but there is conflicting evidence for the involvement of catecholamines in reproduction especially for spawning (Mori et al., 1972; Matsunami and Nomura, 1987; Osada et al., 1992; Smith and Croll, 1997). While Fong et al. (1993) showed that among catecholamines, dopamine and noradrenaline reduced the positive serotonin-induced spawning in the zebra mussel, Pani and Croll (2000) showed that dopamine concentration was significantly depressed in the hemolymph of scallops which had spawned compared with unspawned controls. These observations lead us to conclude that high dopamine levels associated with stress could inhibit spawning. Such inhibition was observed for the S oysters during gametogenesis when a sediment effect was recorded in the field, and under experimental conditions, when the higher diet induced more gametogenesis in S than in R oysters. Inversely, partial spawnings were observed for S oysters instead of a major spawning. This could result from rapid fluctuations in noradrenaline and dopamine levels, depending on stress duration and intensity, changing ratio of serotonin/ dopamine or related receptors. Moreover the high ROS content of S oysters and the NH_4^+ from the sediment could also contribute to spawning



induction. This interpretation would suggest that the difference in spawning strategy of S oyster is associated with a specific interaction between stress and gametogenesis leading to more partial spawning in S than in R oysters, as observed in the field and experimental data. New experiments will be necessary to study these events and mechanisms by comparison of the two groups.

4.8. R and S response to experimental infection

Experimental infections were performed either by injection or by bathing using pathogenic strains isolated following summer mortality events: *Vibrio splendidus* (LGP 31 and 32 Gay, 2004a, b, c) and *Vibrio aestuarianus* (Labreuche et al., 2005). When bacteria were injected into the muscle, R and S oysters had similar mortality rates, suggesting that they have no specific difference in their defence capacity when cellular barriers are broken by injection, or that they cannot resist such a high concentration of bacteria. This method was therefore not suitable for studying the summer mortality mechanism.

A difference in R and S oyster susceptibility was only reproduced under certain conditions using the bath method with *Vibrio aestuarianus*. A stress (thermal shock) was necessary prior to the bacterial challenge, and enough gametogenesis had to have taken place to distinguish R and S reproduction intensity. This was the case when a *vibrio* challenge was performed in May on 15-month-old oysters from the field (Rivière d'Auray), and in the controlled experiment with the high diet. The infection process was not successful for the 4 month old spat challenged in May, probably due to their lower gametogenesis at that period, compared with oysters of 18 months. In the light of the discussion above, these results suggest that stress and high gametogenesis intensity would induce partial spawnings mostly in S and would facilitate pathogen colonisation in S oysters compared with R ones.

4.9. Partial spawning and the infection process

Partial spawning, which characterized S oysters, could play a role in a differential infection process, as pathogen transmission between moribund and uncontaminated oysters was favoured during spawning events in experimental conditions with a huge increase in *vibrios* associated with organic matter output at spawning (Le Roux, 2004). A survey of *vibrios* in oyster hemolymph from the field showed that in some cases there was a significant increase just before a mortality event (Rivière d'Auray), but only minor differences were observed between R and S oysters. Bacterial increase in hemolymph was also observed after normal major spawning of oysters in Marennes a month after the mortality period and with no associated mortality. However hemolymph microflora was highly diverse in both cases (Nicolas, pers. comm.). These results demonstrated that bacteria can colonise oyster hemolymph in the last month before mortality at the same time as partial spawning events or later, during full spawning. However would only be detrimental if there were pathogenic strains in the microflora. In the field, preliminary observations are being undertaken to check the environmental microflora composition and diversity in the surrounding sea water, sediment and oyster pallear cavity when partial spawnings are observed. S oysters demonstrating partial spawning earlier than R oysters would also be infected before R oysters, and probably to a greater extent because *vibrio* number increased on gametic organic matter.

5. Conclusion

A difference in the reproductive status of R and S oysters appeared to be a key factor in the differential response to infection. But even if the energy decrease associated with reproduction intensity and temperature plays a role in summer mortality, the measured differences in reproduction intensity and in related respiration rates were quite small. These could not explain phenotypic differences between R and S except if other events, such as stress or spawning events, accentuate the energetic imbalance. After a temperature increase associated to gametogenesis S oysters appeared highly susceptible to stress compared to R oysters. This high sensitivity to hypoxia is interesting as the sediment effect could correspond to low partial hypoxia and consequently H₂S diffusion and toxicity. Catalase lower and constant level in S group compared to R one, whatever the further stress conditions could explain the ROS increase in stressed S oysters. The low response to further stress would be the consequence of the first perturbation. Further studies are necessary to measure catecholamines in R and S groups and detect a possible hormonal imbalance and a resulting spawning depression due to stressors. For the moment our data suggest that spawning inhibition of S oysters results from their specific stress reaction. These results also suggest that the partial spawning characterizing mature S oysters could occur specifically in this group due to competition between such spawning inhibition and a possible spawning induction by high ROS levels



and/or NH_4^+ from the sediment. The partial spawnings of S oysters would increase respiration and energetic imbalance and thus open a physical possibility for pathogen contamination. S oysters would be contaminated earlier than R ones when pathogens were present in the microflora. The final increase in hyalinocyte concentration, observed just before the mortality event, would have resulted from this last infection process. Perturbations in absorption efficiency were detected earlier in S oysters and could be associated with specific infection of the digestive gland affecting cellular integrity, as observed in Arcachon (Maurer and Comps 1986). The specific decrease in glucose metabolism could be a secondary event of this infection. At present we cannot exclude the possibility of another infection mechanism or lethal metabolic disturbance resulting from the regulation conflict between catecholamines and S-oyster-specific control of reproduction and immunity, and further investigations are necessary to draw conclusions about this aspect.

Towards an integrated approach: Today, molecular tools allow us to examine differences in gene expression and related proteins or peptides. The first steps have been performed to produce a SSH library (Huvet et al. 2004) and prepare macro-arrays then micro-arrays to screen available EST expression levels in different biological situations (Boulot, pers. comm.). The first results provided a number of candidate genes that should be validated using real time PCR and tested with more experiments. The high heritability of resistance to summer mortality would suggest that a very limited number of genes are directly concerned and this is an important factor considering the complexity of the interactions between oysters, their environment and opportunistic pathogens.

Acknowledgments

The authors are grateful to all the contributors involved in the Morest project for their support during the course of this work. We are indebted to H. McCombie-Boudry for her help with English language editing. We thank L. Dégremont for providing the parental oysters and all the staff of Argenton (especially P. Le Souchu, J.P. Connan and I. Quéau) and Bouin (especially M. Nourry) stations for providing experimental oysters under controlled conditions. We also thank all the staff of La Tremblade, La Trinité and Port en Bessin for their active participation in the maintenance of oysters in the field. This work was supported by the Régions of Basse-Normandie, Bretagne, Pays de la Loire, Poitou-Charentes, by the Conseil Général du Calvados and by the national Morest project funded by Ifremer.

References

- Arumugam, M., Romestand, B., Torreilles, J., 2000. Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquatic Living Resources* 13, 173-177.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research* 54, 585-589.
- Barber, F.J., and Blake, N.J., 1991. Reproductive physiology. In "Scallops : Biology, Ecology and aquaculture" (S.E. Shumway, Ed.), 377-428. Elsevier, Amsterdam.
- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A., Moal, J., 2005. Molecular cloning and seasonal expression of the oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140B, 635-646.
- Bachère, E., Hervio, D., Mialhe, E., 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 11, 173-180.
- Beattie, J.H., Chew, K.K. and Hershberger, W.K., 1980. Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proc. Nat. Shellfish. Ass.*, 70, 184-189.
- Berthelin, C., Kellner, K. and Mathieu, M., 2000. Storage Metabolism in the Pacific Oyster (*Crassostrea Gigas*) in Relation to Summer Mortalities and Reproductive Cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology* 125 B, 359-369.
- Bourles, Y., 2004. Ecophysiologie de l'huître creuse : Analyse bioénergétique de la gamétogenèse sous trois conditions trophiques distinctes. DEA Biologie et Productions Animales, Université de Rennes 1. 20p.
- Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M., Moraga, D., 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate (hsc70) and heat shock protein 70 (HSP70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress and Chaperones* : Vol.8, 1, 76-85
- Bramble, L.H., Anderson, R.S., 1998. A comparison of the chemiluminescent response of *Crassostrea virginica* and *Morone saxatilis* phagocytes to zymosan and viable *Listonella anguillarum*. *Developmental and Comparative Immunology* 22, 55-61.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bricelj, V.M., Ford, S.E., Borrero, F.J., Perkins, F.O., Rivara, G., Hillman, R.E., Elston, R.A. and Chang, J., 1992. Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.*, 11, 331-347.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C. 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* 57: 469-476
- Carballal, M.J., Villalba, A., Lopez, C., 1998. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 72, 304-312.
- Cheney, D.P., MacDonald, B.F. and Elston, R.A., 2000. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J. Shellfish Res.*, 19, 353-359.



- Cheng, T.C., 2000. Cellular Defense Mechanisms in Oysters. In: Fingerman M, Nagabhushanam R (eds) Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology. Sciences Publishers, Inc., Enfield (NH), USA; Plymouth, UK, pp 43-83
- Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2003. Reduction of adhesion properties on *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. Diseases of Aquatic Organisms 57, 109-116.
- Cochennec-Laureau, N., Auffret, M., Renault, T., Langlade, A., 2003. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. Journal of Invertebrate Pathology 83, 23-30.
- Conover, R.J., 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. Limnol.Oceanog.11: 338-345.
- de Jong-Brink, M., Bergamin-Sassen, M. and Solis Soto, M. 2001. Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host, Parasitology 123, pp. 129-141.
- Dégremont, L., Bédier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Joly, J.P., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.F., Boudry, P. 2005. Variability of survival, growth and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). Relative importance of family, site and field placement timing on survival, growth and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 249: 213-229.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain, J.F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. Journal of Experimental Biology 206, 3053-3064.
- Delaporte, M., 2005. Modulation des paramètres hématocytaires par la nutrition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. Phd Thesis in Biology. Université de Rennes 1. 362 pp. (in French). France.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., Samain, J.F. (in press). Impact of food availability on energetic storage and related hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. Aquaculture
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., (28) 350-356.
- Elston, R.A., Beattie, J.H., Friedman, C., Hedrick, R. and Kent, M.L., 1987. Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. J. Fish Dis., 10, 121-132.
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., Haure, J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I Spatial variation in fund abundance. J. Evol. Biol. 17: 342-356.
- Enriquez-Diaz, M., 2004. Variabilité bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Phd thesis. Université de Bretagne Occidentale. 150 pp. (in French), France.
- Fisher, W.S., Wishkovsky, A., Ford, S.E., 1990. Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 19, 354-360.
- Fisher, W.S., Leah, M.O., Edwards, P., 1996. Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. Journal of Shellfish Research 15, 555-564.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. Aquatic Toxicology 51, 115-138.
- Fong P.P., Noordhuis R., Ram J.L., 1993. Dopamine reduces intensity of serotonin-induced spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). J. Exp.Zool., 266, (1), 79-83)
- Ford, S.E., Ashton-Alcox, K.A., Kanaley, S.A., 1993. In vitro interaction between bivalve hemocytes and the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Journal of Parasitology 79, 255-265.
- Ford, S.E. and Borrero, F.J., 2001. Epizootiology and pathology of Juvenile Oyster Disease in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol., 78, 141-154.
- Friedman, C.S., Beaman, B.L., Chun, J., Goodfellow, M., Gee, A. and Hedrick, R.P., 1998. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 237-246.
- Friedman, C.S., Beattie, J.H., Elston, R.A. and Hedrick, R.P., 1991. Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. Aquaculture, 94, 1-15.
- Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargove, J.S., Barber, B.J., Elston, R.A., Burreson, E.M. and Reece, K.S., 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. Dis. Aquat. Org., 63, 33-41.
- Gay, M., Renault, T., Pons, A.M., Le Roux, F. 2004a. Two vibrio splendidus related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Dis Aquat Organ. 23;62(1-2):65-74.
- Gay, M., Berthe, F.C., Le Roux, F. 2004b. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dis Aquat Organ. 2004 Apr 21;59(1):49-56.
- Gay, M. 2004c. Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas* : étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus*. Thèse d'Université La Rochelle, France.
- Glude, J.B., 1975. A summary report of the Pacific Coast oyster mortality investigations 1965-1972. Proceedings of the Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture at Tokyo, Japan, October 15-16, 1974. p.28.
- Goedken, M., De Guise, S., 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. Fish and Shellfish Immunology 16, 539-552.
- Gouletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., and Taillade, S., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). ICES Mariculture Committee CM 1998/CC. pp. 14-21.
- Greenwald R.A., 1985. Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Héral, M., Deslous-Paoli, J.M., 1991. Oyster culture in European countries. In : Estuarine and marine bivalve mollusk culture. CRC Press, Menzel, W.(Ed.), Boca Raton 153-190.
- Hershberger, W.K., Perdue, J.A. and Beattie, J.H. 1984. Genetic selection and systematic breeding in pacific oyster culture. Aquaculture, 39 : 237-245.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F., Cunningham, C. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progenies exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. Gene, 343, 211-220.
- Kalra, S.P. and Kalra, P.S., 2004. NPY an endearing journey in search of neurochemical on/off switch for appetite, sex and reproduction. Peptides, 25, 3, 465-471.
- Koganezawa, A., 1974. Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. In: (Ed.), Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture, Tokyo, Japan. Journal, 29-34.



- Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., and Nicolas, J.L., 2005. In vitro effects of Extracellular Products (ECPs) from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on the oyster *Crassostrea gigas* cellular immune responses. *Developmental and Comparative Immunology* (In press).
- Lambert, C., Nicolas, J.L., 1998. Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic Vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 53-63.
- Lambert, C., Nicolas, J.L., Bultel, V., 2001. Toxicity to bivalve hemocytes of pathogenic vibrio cytoplasmic extract. *Journal of Invertebrate Pathology* 77, 165-172.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish and Shellfish Immunology* 15, 225-240.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001a. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol.*; 67:2304-2309.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001b. Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *General and Comparative Endocrinology* 122, 181-188.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Gélébart, F., Cueff, A., Poulet, S.A., 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 26, 1-9.
- Landgon, C., Evans, F., Jacobson, D., Blouin, M. 2003. Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg improved after one generation of selection. *Aquaculture* 220, 227-244.
- Lee, M., Taylor, G.T., Bricelj, V.M., Ford, S.E. and Zahn, S., 1996. Evaluation of *Vibrio* spp. and microplankton blooms as causative agents of Juvenile Oyster Disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.*, 15, 319-329.
- Le Gall, G., Bachère, E., Mialhe, E., 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific rickettsiales-like organisms. *Diseases of Aquatic Organisms* 11, 181-186.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L., and Berthe, F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*, 15 : 251-258.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J.L., Gouy, M. and Berthe F., 2004. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* related strains based on GyrB gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms* 58,143-150.
- Le Roux, F., 2004 . Taxonomie et virulence de vibriens pathogènes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. Habilitation à Diriger des Recherches Université Paris VI.
- Lewis, E.J., Farley, C.A., Small, E.B. and Baya, A.M., 1996. A synopsis of juvenile oyster disease (JOD) experimental studies in *Crassostrea virginica*. *Aquat. Liv. Res.*, 9, 169-178.
- Li, Q., Osada, M. and Mori, K., 2000. Seasonal Biochemical Variations in Pacific Oyster Gonad Tissue During Sexual Maturation. *Fisheries Science* 66, 502-508.
- Lipovsky, V.P. and Chew, K.K., 1972. Mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*: the influence of temperature and enriched seawater on survival. *Proc. Nat. Shellfish. Ass.*, 62, 72-82.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 251.
- Martoja, R. and Martoja-Pierson, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie Paris.
- Maurer, D., Comps, M., 1986. Summer mortality of oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Arcachon : environmental biochemical and histological aspects. In *Pathology in Marine Aquaculture*, C.P.Vivares, J.R. Bonami, and E.Jaspers (Eds). European Aquaculture Society, Special publication n°9, Bredene, Belgium.
- Moal, J., Le Coz, J.R., Samain, J.F. & Daniel, J.Y., 1989. Nucleotides in bivalves: extraction and analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Comp. Biochem. Physiol.*, (93 B) 307-316.
- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.*, 53, 361-369.
- Matsunami, T. and Nomura, T., 1986. Pharmacological observations on the mechanism of spawning in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 52, 1589-1594.
- Nakayama, K. and Maruyama, T., 1998. Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Developmental and Comparative Immunology* 22, 151-159.
- Oliver, L.M. and Fisher, W.S., 1995. Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Apalachicola Bay, Florida and Chesapeake Bay (Virginia). *Diseases of Aquatic Organisms* 22, 217-225.
- Oliver, L.M., Fisher, W.S., Winstead, J.T., Hemmer, B.L., Long, E.R., 2001. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquatic Toxicology* 55, 203-222.
- Ordas, M.C., Ordas, A., Beloso, C., Figueras, A., 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 597-609.
- Osada, M., Mori, K., Nomura, T., 1992. In vitro effects of estrogen and serotonin on release of eggs from the ovary of the scallop. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 223-227.
- Oubella, R., Maes, P., Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 1996. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquatic Living Resources* 9, 137-143.
- Paillard, C., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E., 1996. Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease. *Aquatic Living Resources* 9, 145-158.
- Pani A.K. and Croll R.P., 2000. Catechol concentration in the hemolymph of the scallop, *Placopecten magellanicus*. *General and Comparative Endocrinology* 118, 48-56.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H. and Chew, K.K., 1981. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington state. *J. Shellfish Res.*, 1, 9-16.
- Piano, E., Bertoli, F. B., Romani, M., Tava, A., Riccioni, L., Valvassori, M., Carroni, A. M and Pecetti, L., 2005. Specificity of Host-Endophyte Association in Tall Fescue Populations from Sardinia, Italy. *Crop Sci* 45:1456-1463.
- Pouvreau, S., Enriquez-Diaz, M., Le Souchu, P. Connan, JP. Le Roy, B. Mingant, C. Moal, J. Delaporte, M, Le Coz JR, Samain JF, 2003. Reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas*: Experimental approach. *Journal of Shellfish Research* [J. Shellfish Res.]. Vol. 22, no. 1, p. 351. Jun.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochennec, N. and Maffart, P., 1994. Herpesvirus associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France - Comparative study. *Revue Médecine Vétérinaire*, 145 (10) : 735-742.
- Samain, J.F., Boudry, P., Degremont, L., Soletchnik, P., Ropert, M., Bedier, E., Martin, J.L., Moal, J., Mathieu, M., Pouvreau, S., Lambert, C. Escoubas, J.M. Nicolas, J.L., Le Roux, F., 2004a. Summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, overview of 3-year results of the cooperative "MOREST" Project. *Journal of Shellfish Research* 23 (1): 309-310.
- Samain J.F., Boudry, P., Degremont, L., Soletchnik, P., Ropert, M., Bedier, E., Moal, J., Mathieu, M., Lambert, C., Escoubas, J.M., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Bacher, C., Renault T., and Burgeot T., 2004b. The programme Morest (Summer mortality



- of *Crassostrea gigas* oyster] Plouzane (France), Ifremer.23-30. Actes de colloques. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer [in Styli 2003 Actes Colloq 38 IFREMER]. 2004. p.23-30
- Shaw, B.L., and Battle, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Can. J.Zool. 35, 325-347.
- Smith, S.A., Nason, J., Croll, R.P., 1998. Distribution of catecholamines in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. Can.J.Zool. 76, 1254-1262.
- Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., and Gouletquer, P., 1997. Ecophysiology of maturation and spawning in oyster (*Crassostrea gigas*): Metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. Aquatic living resources 10: 177-185.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon P., and Gouletquer P., 1999. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). Aquat. Living Resour. 12: 131-143.
- Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Degrémont, L., Bédier, E., Bouget, J.F., Dubois, B., Martin, J.L., Enrique-Diaz, M., Faury, N., Lemoine, O., Renault, T., Gagnaire, B., and Samain, J.F., 2003. Characterization of summer mortality of *C. gigas* in France, in relation to environmental parameters. J. Shellfish Res. 22: 354.
- Soletchnik, P., Faury N., and Gouletquer P., 2005a. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). Aquaculture (in press).
- Soletchnik P., Lambert C., and Costil K. 2005b. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to rearing environment conditions. J Shellfish Res 24 1 197-207
- Takahashi, K.G., Mori, K., 2000. NADPH oxidase-like activity in hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish Pathology 35, 15-19.

Figure and Table Captions

Fig.1 : Controlled diet experiment: cumulative mortality rate percentage for R and S oysters fed the 4% or 12% diet.

Fig.2 : Semi quantitative estimation of gonad area percentage determined by histology in R and S oysters placed in the Rivière d'Auray site in 2002 (Means and SD, * for significant difference between groups $p < 0,05$).

Fig.3 : Controlled diet experiment: semi quantitative estimation of gonad area percentage by histology for R and S oysters fed the 4% or 12% diet (Means and SD.).

Fig.4 : Controlled diet experiment: a, food consumption rate ($J.h^{-1}g^{-1}$); b, absorption efficiency percentage; c, oxygen consumption ($J.h^{-1}g^{-1}$); d left, Total glucose percentage (mg glucose.mg DW⁻¹); d right, Adenylic energy charge (AEC) for R and S oysters fed the 4% or 12% diet (Means and SD.).

Fig.5 : Quantity (relative to *G6PDH* mRNA) of Hexokinase (HK), Phosphoglucumutase (PGM), Pyruvate kinase (PK), Phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK), Glycogen Synthase (GS), and Glycogen Phosphorylase (GP) mRNAs in Resistant R oysters (black bar) and Susceptible S oysters (white bar) in labial palps in the critical period (June). Comparisons were made using a t-test at the 5% level, * indicates groups that are statistically different.

Fig.6 :

Left : Heat-shock protein 70 concentration performed in the gills of R and S oysters exposed in normoxia (a), and hypoxia (b) and in combined stress hypoxia/pesticides (c). (* significant difference $p < 0.05$)

Right : Catalase activity analysed in gills of R and S oysters exposed in normoxia (a) and hypoxia (b) and in combined stress hypoxia/pesticides (c). (* significant difference $p < 0.05$)

Fig.7 Infection experiments

Left : Mortality of susceptible (S) and resistant (R) oysters 2 generations aged 4 and 15 months and placed in Auray site from February to May and then challenged by bathing with *Vibrio aestuarianus*.

Right : Mortality of resistant (R) and susceptible (S) oysters fed with 2 levels of microalgal diet (4% low level; 12% high level) during 2 months and challenged by bathing with *V. aestuarianus*.

Fig.8 : Occurrence of bacteria in hemolymph of healthy oysters (R: resistant group, S: susceptible group) from May to September in the Rivière d'Auray site (2002). In September the bacterial concentrations were below 10^2 cell ml⁻¹)



Table 1. Specific primers used for gene expression analysis.

Oyster-specific primers for real time PCR	
HK	Forward: 5' -AGGTCAAGATGTACCCACCT- 3' Reverse: 5' -TAAACCCGGAAGTTTGTCC- 3'
PGM	Forward: 5' -GGGGAGGAGAGCTTGG AAC- 3' Reverse: 5' -GACCATAGGTCTGCCAGTGC- 3'
PK	Forward: 5' -ACATGATTTTCGCCTCCTTC- 3' Reverse: 5' -TCTCTGGGGGAATCTCAATG- 3'
PEPCK	Forward: 5' -CATGGCGTCATGGTTGGAGC- 3' Reverse: 5' -GTCAAGCCAGTGCTGTAGG- 3'
GS	Forward: 5' -GACGCCAACGACCAAATG- 3' Reverse: 5' -TTCAGGAACTGGGGGTGA- 3'
GP	Forward: 5' -AGACGGTCCCCGATGATT- 3' Reverse: 5' -GGCAGCTCCTGGCTATCA- 3'
G6PDH	Forward: 5' -GGTGGAGAAGCCGTTTGG- 3' Reverse: 5' -CGAGGCGATTCCGTCTCT- 3'



Fig.1 :

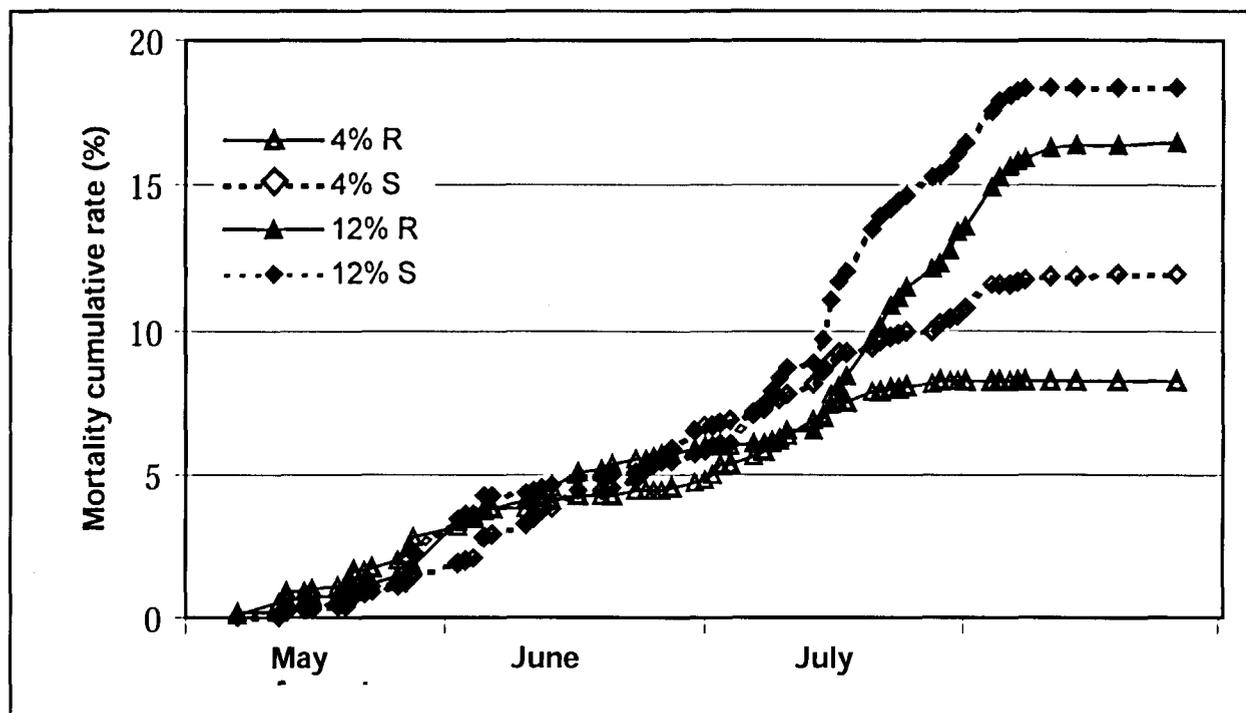


Table 2 : R and S group mortality, initial and final individual weights and daily yields (means and standard deviations) observed after the summer period for the second and third generations in Rivière d'Auray.

Generation	Parameter	R line	S line	Control
G2	Mortality (%)	7.2 ± 3.2a	43.3 ± 12.0c	23.7 ± 6.6b
	(g) Initial individual weight	1.1 ± 0.2a	1.1 ± 0.2a	1.0 ± 0.1a
	(g) Final individual weight	9.2 ± 0.7a	8.3 ± 1.0a	8.9 ± 0.7a
	Daily yield (%.d ⁻¹)	7.8 ± 0.8a	4.4 ± 1.5c	6.2 ± 0.8b
G3	Mortality (%)	27.1 ± 13.1a	72.5 ± 13.4c	47.8 ± 7.9b
	(g) Initial individual weight	2.1 ± 0.3a	2.3 ± 0.5a	2.3 ± 1.6a
	(g) Final individual weight	12.9 ± 1.4a	14.7 ± 1.5a	15.7 ± 8.0a
	Daily yield (%.d ⁻¹)	3.3 ± 0.7a	0.8 ± 1.0c	1.8 ± 0.7b

Means with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$)



Fig.2

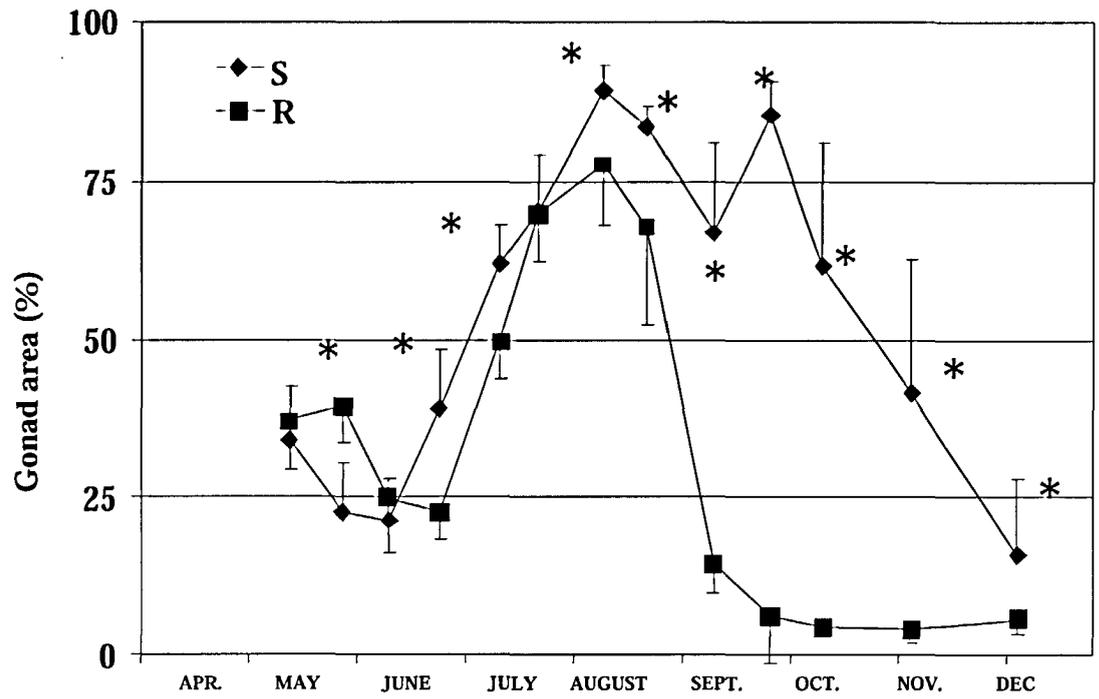


Fig.3 :

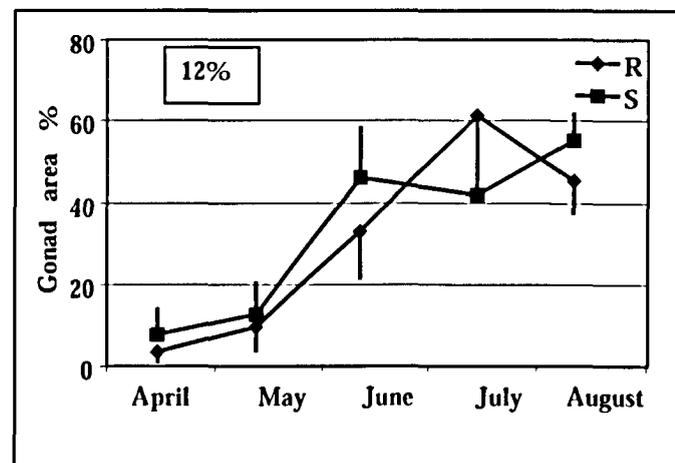
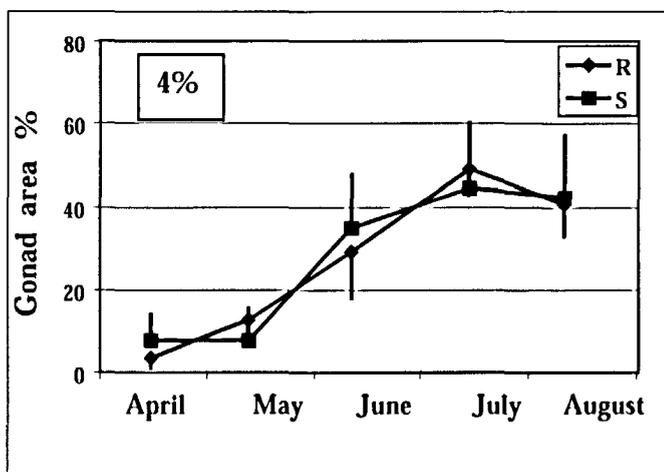
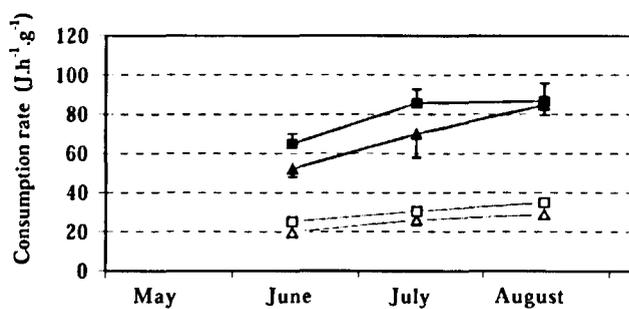


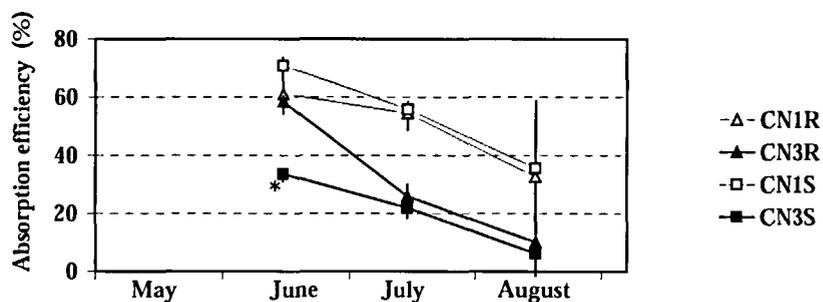


Fig.4

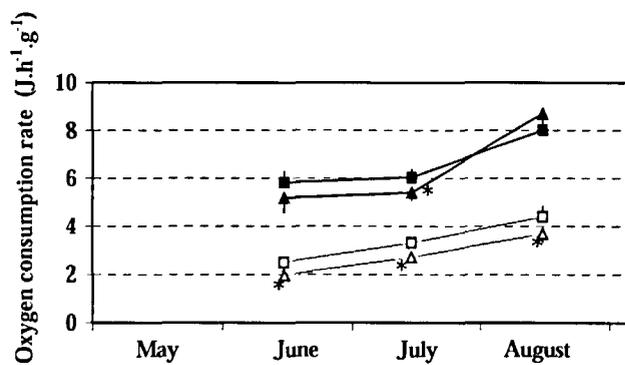
a



b



c



d

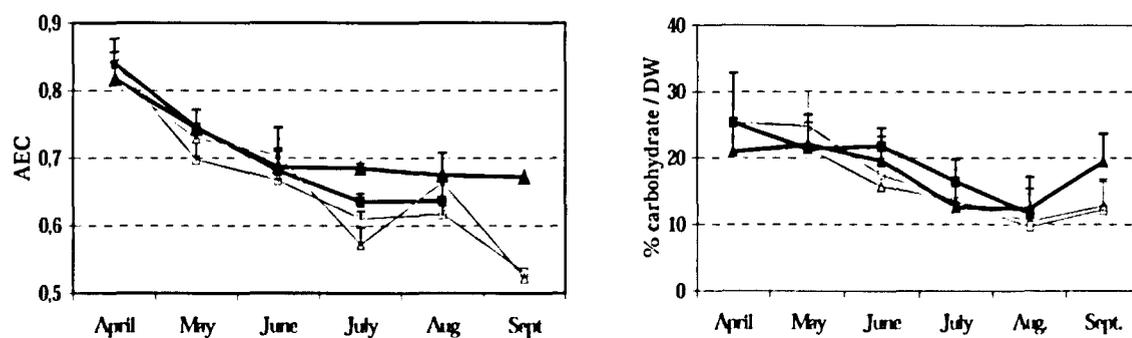




Fig.5 :

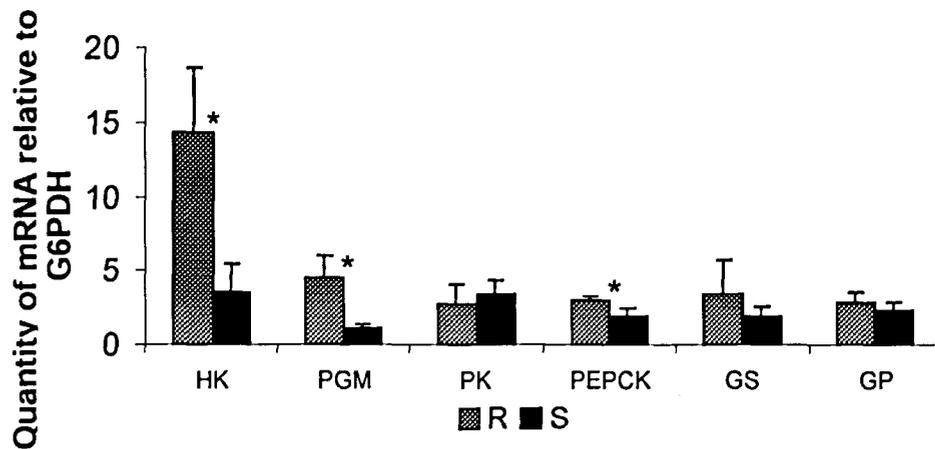


Table 3 : Comparison of hemocyte characteristics from oysters belonging to resistant R and Susceptible S groups during an experimental survey (May, June and July) around the mortality event observed mid-July. (NS: no significant differences).

Hemocyte characteristics "R" versus "S"	May	June	July
Hemocyte Adhesive capacity in SW	S>R p=0.020 Kruskal-Wallis	NS	NS
ROS production in sea-water - hyalinocytes	S>R p = 0.0001 Anova	S>R p=0.015) Kruskal- Wallis	NS NS
- granulocytes	S>R p = 0.0036 Anova	S>R p=0.035) Kruskal- Wallis	
Hyalinocyte concentration	NS	NS	S > R p= 0.055 Kruskal- Wallis
Granulocyte concentration	NS	NS	NS
Hemocyte mortality (% of dead cells)	NS	NS	NS
Phagocytosis (% of active hemocytes)	NS	NS	NS



Fig. 6

a

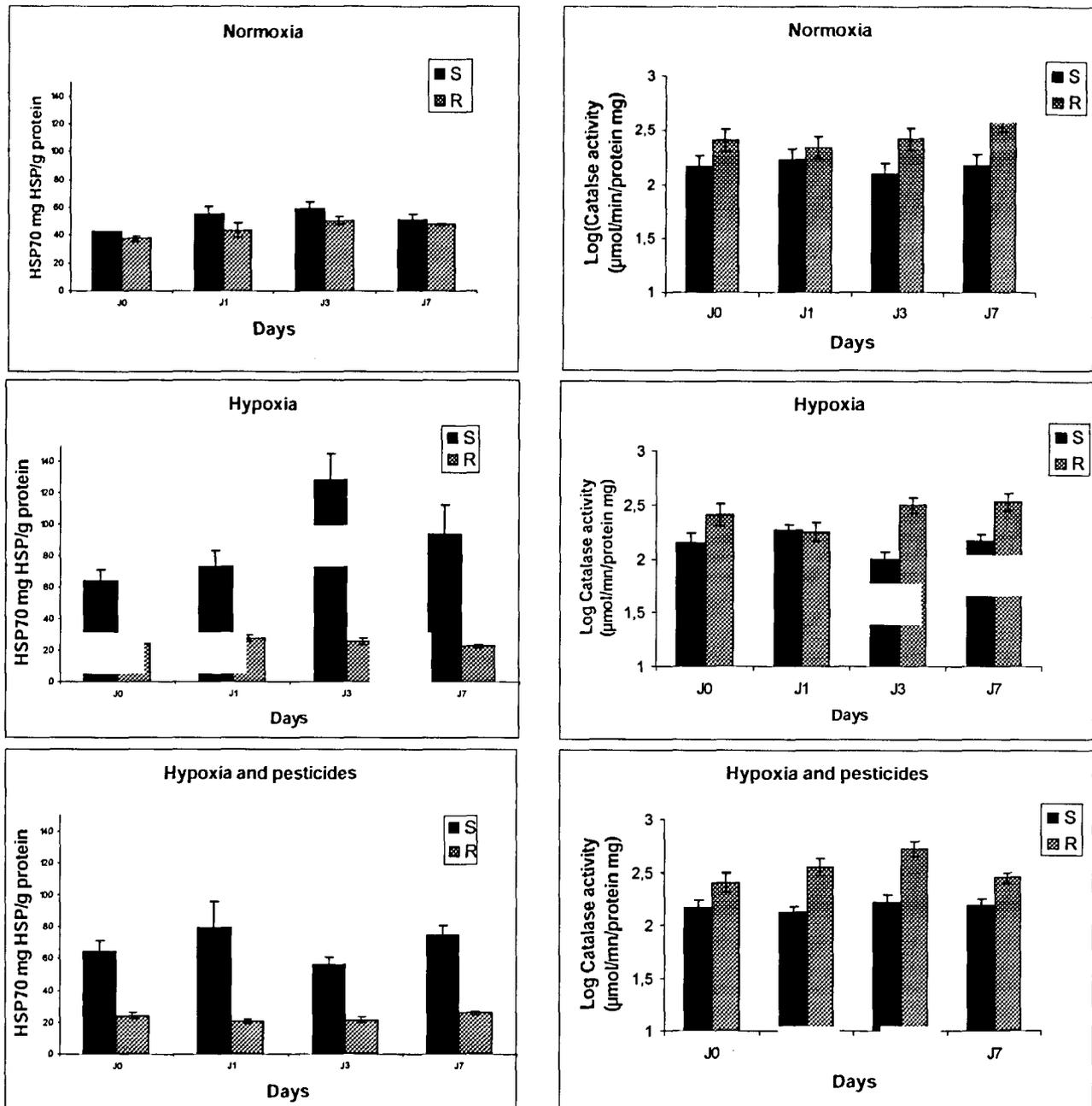




Fig.7

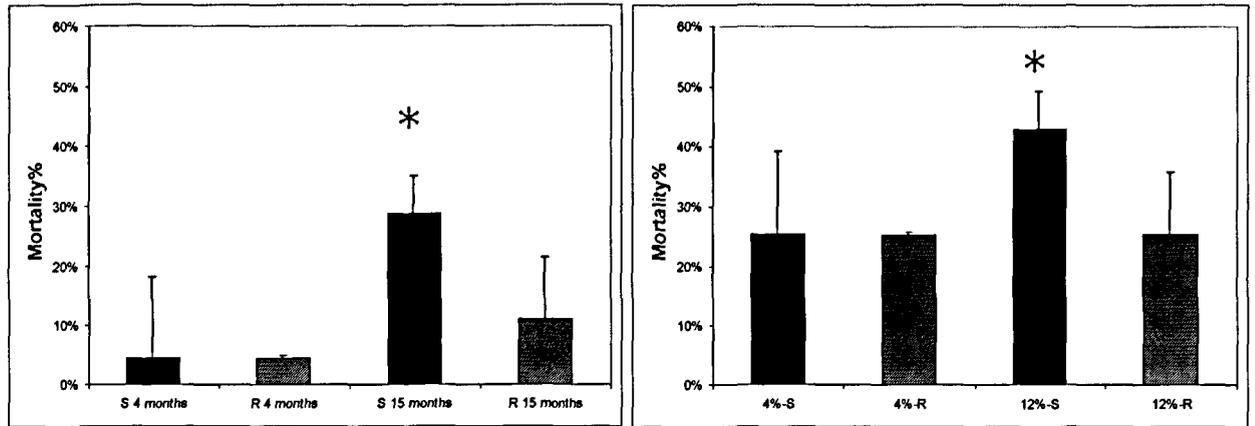
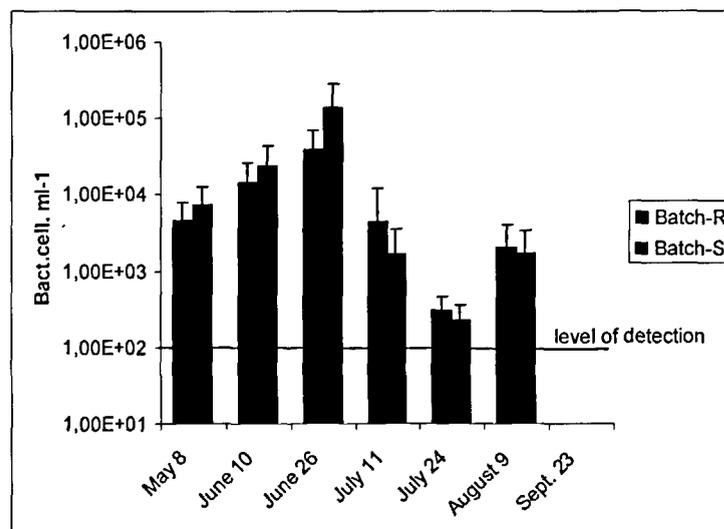


Fig.8



*Impression : Service IDM/RIC
IFREMER – Centre de Brest
BP 70 – 29280 Plouzané
Tél. : 02 98 22 43 53*