

N° ORDRE : 3103
De la thèse

THESE

Présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

Mention : Biologie

PAR

DELAPORTE Maryse

Equipe d'accueil : Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, centre IFREMER
de Brest

Ecole doctorale : VIE-AGRO-SANTE

Composante universitaire : S.V.E

**MODULATION DES PARAMETRES HEMOCYTAIRES PAR LA
NUTRITION CHEZ L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*.
IMPLICATION DANS LES MORTALITES ESTIVALES.**

Soutenue le 18 mars 2005,

Mr C. SALIGAUT – Professeur à l'Université de Rennes 1	Président du Jury
Mr S.J. KAUSHIK - Directeur de recherche INRA à Saint Pée / Nivelles	Rapporteur
Me E. BACHERE - Directeur de recherche à l'Université de Montpellier 2	Rapporteur
Me C. LABBE – Chercheur INRA à Rennes	Examineur
Mr P. SOUDANT – Chercheur CNRS à l'Université de Bretagne Occidentale	Examineur
Mr J.F. SAMAIN – Chercheur au centre IFREMER de Brest	Examineur
Me F.L. CHU – Professeur de l'Institut of Marine Science, Virginie, USA	Membre invité

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Jean-François Samain d'avoir été mon directeur de thèse, Jeanne Moal et Philippe Soudant d'avoir été mes encadrants scientifiques tout au long de ces trois années de thèse.

Merci à Evelyne Bachère, Catherine Labbé, Christian Saligaut et Sachi Kaushik d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je tiens aussi à remercier Fu-Lin Chu et Chris Langdon pour avoir accepté la collaboration Franco-Américaine ce qui m'a permis d'aller travailler aux Etats-Unis pendant quatre mois.

Un remerciement particulier à Philippe et Jeanne pour m'avoir supporté, encouragé et aidé dans l'écriture de ce manuscrit. Après plus de six mois à écrire, réécrire, lire et relire, corriger et re-re-corriger, le manuscrit a pu enfin être édité. Quel bonheur de le mettre au courrier !!!

Merci à Nono, Caro, Yannick, Maud et Juju pour les nombreux week-ends passés ensemble. Maintenant, me voilà un peu plus expérimentée en roller, il n'y a plus qu'à continuer l'entraînement pour progresser... il y a du boulot... et en plus, il va falloir me trouver un nouveau coach au Canada.

Merci aussi à tous ceux qui ont travaillé avec moi et m'ont aidé au cours de ce travail de thèse : Christophe, Claudie, Jean-renè, les collègues d'Argenton, et tous nos collaborateurs MOREST.

Un seul petit regret, eh oui, il y en a un !!! mes proches regrettrons de perdre leur petit home sweet home breton ; mais ils sont déjà en train de prévoir leur prochaine vacances au Canada....reste à trouver une petite cabane en bois pour les recevoir.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
MODELE BIOLOGIQUE	7
I. BIOLOGIE	9
II. ANATOMIE	9
II. REPRODUCTION ET DEVELOPPEMENT	11
II. 1. Reproduction.....	11
II. 2. Développement.....	12
V. NUTRITION	12
VI. SYSTEME IMMUNITAIRE.....	13
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	15
RELATION ENTRE NUTRITION LIPIDIQUE ET DEFENSES IMMUNITAIRE	17
I. CHEZ LES VERTEBRES SUPERIEURS	17
I.1. Nutrition et santé.....	17
I.2. Rôle des acides gras en (n-3) ?	19
I.3. (n-3) et infection	25
I.4. Rôle des (n-6) et de l'acide arachidonique ?	25
II. CHEZ LES VERTEBRES INFERIEURS	27
III. CHEZ LES INVERTEBRES.....	29
III.1. Chez les crevettes.....	29
III.3. Chez les mollusques bivalves.....	29
NUTRITION DES BIVALVES	30
I. APPORTS « QUANTITATIFS ».....	30
I.1. Quelques valeurs	30
I.2. Besoins spécifiques au cours du processus de reproduction.....	32
II. APPORTS « QUALITATIFS ».....	33
II.1. Composition des algues	33
II.2. Qualité algale et développement.....	34
III. TECHNIQUES DE SUPPLEMENTATION.....	35
SYSTEME IMMUNITAIRE DES BIVALVES	37
I. GENERALITES.....	37
II. DIFFERENTS TYPES D'HEMOCYTES	37
III. FONCTIONS DES HEMOCYTES	38

III.1. Phagocytose.....	38
III.2. Production d'espèces actives de l'oxygène.....	41
III.3. Synthèse de facteurs humoraux.....	44
IV. FACTEURS INFLUENÇANT LES PARAMETRES HEMOCYTAIRES.....	44
IV.1. Température et variations saisonnières.....	45
IV.2. Présence d'un pathogène.....	46
IV.3. Alimentation.....	47
MATERIEL ET METHODES.....	49
I. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	51
II. CONDITIONNEMENT DES HUITRES.....	52
II.1. Expérimentations dites « quantitatives ».....	52
II.2. Expérimentations dites « qualitatives ».....	53
III. PLAN D'ECHANTILLONNAGE.....	55
IV. PARAMETRES ENERGETIQUES.....	55
IV.1. Indice de condition.....	55
IV.2. Préparation des échantillons.....	55
IV.3. Broyage des échantillons.....	56
IV.4. Composition biochimique.....	56
IV.5. Charge énergétique adénylique (CEA).....	56
V. ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS ET STEROLS.....	57
V.1. Prélèvements d'hémolymphe.....	57
V.2. Prélèvements des branchies.....	58
V.3. Extractions lipidiques.....	58
V.4. Séparation des lipides neutres et polaires.....	60
V.5. Trans-estérification des composés lipidiques.....	60
V.6. Analyse des MEAG et des stérols par chromatographie en phase gazeuse.....	61
VI. ANALYSES DES PARAMETRES HEMOCYTAIRES.....	63
VI.1. Généralités sur la Cytométrie en Flux.....	63
VI.2. Prélèvement de l'hémolymphe.....	65
VI.3. Comptage hémocytaire.....	65
VI.4. Mortalité cellulaire.....	66
VI.5. Double marquage.....	67
VI.6. Capacité de phagocytose.....	68
VI.7. Production d'espèces actives de l'oxygène.....	70
VI.8. Capacité d'adhésion.....	74
VII. ANALYSES STATISTIQUES.....	74
1^{ERE} PARTIE : EFFET DE LA QUANTITE DE NOURRITURE SUR LES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DE L'HUITRE.....	77
INTRODUCTION.....	79
1 ^{er} article: "Impact of food availability on energetic storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> during an experimental reproductive cycle".....	81

<i>Synthèse du 1^{er} article :</i>	111
<i>2^d article : “Differences in biochemical composition and immunological parameters between two different genetic stocks of Pacific oysters Crassostrea gigas : resistant vs susceptible to summer mortalities”</i>	115
<i>Synthèse du 2^d article :</i>	143
SYNTHESE ET CONCLUSION	147
2^{EME} PARTIE : EFFET DE LA QUALITE DE LA NOURRITURE SUR LES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DE L’HUITRE	153
INTRODUCTION	155
<i>3^{eme} article : “Effect of a mono-algal diet on immune functions in two bivalves species - Crassostrea gigas and Ruditapes philippinarum.”</i>	157
<i>Synthèse du 3^{eme} article :</i>	171
<i>4^{eme} article : “Changes in immune parameters of the Pacific oysters Crassostrea gigas fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid”</i>	175
<i>Synthèse du 4^{eme} article :</i>	205
<i>5^{eme} article : ”Changes in immune parameters of the Pacific oysters Crassostrea gigas fed T-Iso supplemented with increasing amounts of arachidonic acid”</i>	209
<i>Synthèse du 5^{eme} article :</i>	239
<i>Comparaison des huîtres conditionnées à Argenton pour les expérimentations GIGAREPRO 1 vs 2 : Existe-il un effet de la nutrition ?</i>	243
SYNTHESE ET CONCLUSION	257
3^{EME} PARTIE : EFFET DE LA NUTRITION IN SITU ?	261
<i>Comparaison des huîtres placées in situ à Marennes-Oléron et en Baie des Veys : Existe-t-il un effet de la nutrition ?</i>	263
CONCLUSION GENERALE	279
I. NUTRITION ET PARAMETRES ENERGETIQUES	281
<i>I. 1. Effet de la quantité de nourriture sur les paramètres énergétiques et la reproduction des huîtres</i>	281
<i>I. 2. Variation des paramètres énergétiques au cours du cycle de reproduction</i>	282
<i>I. 3. Effet de la qualité de la nourriture sur les paramètres énergétiques</i>	284
<i>I. 4. Paramètres énergétiques et mortalités estivales</i>	284
II. NUTRITION ET PARAMETRES HEMOCYTAIRES	285
<i>II. 1. Effet de la quantité de nourriture sur les paramètres hématocytaires</i>	285
<i>II. 2. Variation des paramètres hématocytaires au cours du cycle de reproduction</i>	286
<i>II. 3. Paramètres hématocytaires et mortalités estivales</i>	288
<i>II. 4. Effet de la qualité lipidique de la nourriture sur les paramètres hématocytaires</i>	289
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	295
ANNEXES	321

Index des figures

Figure 1 : *Evolution de la production ostréicole en France depuis 1950 : tonnage par espèce (FAO, 2003).*

Figure 2 : *Schéma des interactions entre les trois compartiments intervenant dans le phénomène des mortalités estivales.*

Figure 3 : *Anatomie générale d'une huître dans sa valve gauche (ici *C. virginica*). Les axes orientaux de l'animal sont indiqués en caractère gras et en italique. (D'après Gatsoff, 1964).*

Figure 4 : *Cycle de développement de l'huître *Crassostrea gigas*. (D'après Fabioux, 2004).*

Figure 5 : *Métabolisme des acides gras essentiels chez les vertébrés supérieurs. D'après Yaqoob (2003). Le 20:4(n-6) est le précurseur des prostaglandines de la série 2 et des leucotriènes de la série 4. Le 20:5(n-3) est quant à lui le précurseur des prostaglandines de la série 3 et des leucotriènes de ma série 5. LOX (lipoxygénase). COX (cyclooxygénase). Mais tous deux utilisent les mêmes enzymes.*

Figure 6 : *Effets des lipides alimentaires sur les fonctions immunitaires chez les vertébrés supérieurs. TNF : Tumor necrosis factor. (D'après De Pablo et al., 2000).*

Figure 7 : *Représentation schématique de quelques voies de signalisation intervenant dans le processus de phagocytose chez les vertébrés. Les flèches bleues indiquent les activations et activateurs. Les vertes les inhibiteurs. PLA₂ (phospholipase A₂), COX (cyclooxygénase), PKC (phosphokinase C), PLC (phospholipase C), NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase), PGE₂ (prostaglandines E₂), ROS (espèces actives de l'oxygène ou Reactive oxygen species en anglais).*

Figure 8 : *Représentation schématique des facteurs influençant la biologie de l'huître et la répartition de l'énergie issue de la nourriture au sein de l'organisme (D'après S. Pouvreau). SFG (bilan énergétique pour la croissance ou Scope for growth en anglais).*

Figure 9 : *Représentation schématique de l'évolution du tissu de réserves (manteau-gonade) et du cycle gamétogénétique de l'huître *Crassostrea gigas*.*

Figure 10 : *Photos d'une vue d'ensemble d'hémocytes et d'un agrégat d'hémocytes d'huître creuse *Crassostrea gigas* après coloration à l'hématoxyline de Harris et à l'éosine.*

Figure 11 : *Représentation schématique du processus de phagocytose et des processus de destruction des particules phagocytées. (D'après Paillard, 2004).*

Figure 12 : *Représentation des processus de dégradation intracellulaire intervenant après phagocytose d'une particule étrangère par les hémocytes. NADPH oxydase (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase), SOD (Superoxyde dismutase), NOS (oxyde nitrite synthétase).*

Figure 13 : Représentation schématique de l'ensemble de la séquence d'analyses des lipides.

Figure 14 : Exemple de chromatographe de la séparation des acides gras en chromatographie en phase gazeuse.

Figure 15 : Représentation d'un cytomètre en flux.

Figure 16 : Exemples de cytogrammes réalisés avec le logiciel WinMDi 2.8 pour le traitement des données acquises lors du comptage et du typage des hémocytes de chaque échantillon.

Figure 17 : Exemples de cytogrammes réalisés avec le logiciel WinMDi 2.8 pour le traitement des données acquises lors de l'analyse de la viabilité cellulaire et du typage des hémocytes de chaque échantillon.

Figure 18 : Exemples de cytogrammes réalisés avec le logiciel WinMDi 2.8 pour le traitement des données acquises lors du double marquage pour l'estimation simultanée de la concentration hémocytaire et de la viabilité cellulaire.

Figure 19 : Cytogramme et histogramme obtenu avec le logiciel WinMDi 2.8 permettant le calcul de l'activité de phagocytose à partir du nombre d'hémocyte ayant ingéré au moins une bille (M1) ou du nombre d'hémocytes ayant ingérés plus de deux billes (M2) par rapport au nombre d'hémocytes total.

Figure 20 : Photos d'hémocytes de palourdes et d'huîtres après ingestion de particules de zymosan (Photos de Fu-Lin CHU).

Figure 21 : Représentation de la mesure de l'activité d'oxidative burst.

Figure 22 : Exemple de cytogramme réalisés avec le logiciel WinMDi 2.8 pour l'analyse de la production d'espèces actives de l'oxygène de chacune des sous-populations hémocytaires.

Figure 23 : Synthèse de l'évolution des paramètres physiologiques (énergétiques et immunologiques) au cours des deux expérimentations GIGAREPROs en fonction du cycle de température.

Figure 24 : Corrélation entre le ratio $(n-3)/(n-6)$ et l'activité de phagocytose des huîtres des expérimentations AA et EPA.

Index des Tables

Table 1 : *Présentation des types et fonctions de quelques cytokines (parmi un total de 18 cytokines) citées dans la figure ci-dessus. (D'après Male, 1999).*

Table 2 : *Synthèse non exhaustive de résultats obtenus sur l'effet des acides gras sur la production d'espèces actives de l'oxygène, l'activité des cellules Natural killer, la prolifération de lymphocytes, l'activité de phagocytose de certains type cellulaires, la production de cytokines et de prostaglandines. ALNA (acide linoléinique), DHA (acide docosahexanoïque), DPA (acide docosapentanoïque), TNF (Tumor necrosis factor), PMA (phorbol myristate acetate), LTB₄ (leukotriène B₄), LPS (lipopolysaccharide).*

Table 3 : *Quelques exemples de ration journalière distribuées lors de conditionnements de mollusques bivalves en milieu contrôlé. Les rations sont exprimées en pourcentage de poids sec d'algues par poids sec d'animaux.*

Table 4 : *Récapitulatif des plans d'expérimentation de cette thèse.*

Table 5 : *Récapitulatif des activateurs ou inhibiteurs utilisés dans chaque expérimentation.*

Table 6 : *Récapitulatif de analyses réalisées au cours des diverses expérimentations. Certains résultats issues de ces analyses n'ont pas été présentés dans ce travail.*

INTRODUCTION GENERALE

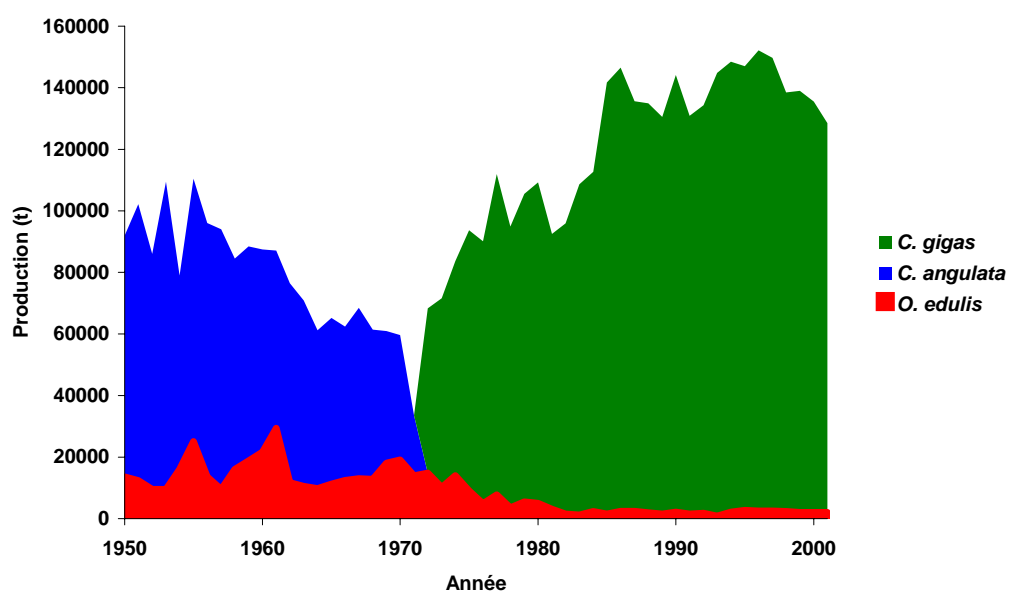


Figure 1 : Evolution de la production ostréicole en France depuis 1950 (tonnage par espèce) (FAO, 2003).

La culture des bivalves est une culture très ancienne. Les études historiques rapportent que les Chinois, les Grecs ou encore les Romains pratiquaient la cueillette de ces bivalves car ils en appréciaient leurs vertus. Les Romains furent les premiers européens à tenter la culture des huîtres et créèrent l'ostréiculture (du latin *Ostrea*). L'huître *Ostrea edulis*, seule espèce d'huître endémique des côtes françaises fut exploitée durant plusieurs siècles. Mais la pêche intensive, cumulée à des épisodes de mortalités provoquées par l'apparition de parasites dans les gisements au cours des années 1920, 1960, et 1970 ont conduit au déclin de l'espèce (Grizel, 1974, Figure 1). Pour faire face à la pénurie d'huîtres plates, des huîtres creuses *Crassostrea angulata* ont été importées à partir de 1860 dans le bassin d'Arcachon. Cette espèce rustique proliféra alors très rapidement le long des côtes françaises et devint l'espèce dominante du littoral français (Héral, 1989). Puis en 1971, cette espèce fut à son tour décimée par une infection virale engendrée par un agent pathogène de type *Iridovirus* provoquant la maladie des branchies (Comps *et al.*, 1976). Dès lors du naissain d'huître *Crassostrea gigas* est importé du Japon pour soutenir les entreprises conchylicoles, et des adultes sont importés pour faciliter le captage de larves dès juillet 1971. L'expansion de *Crassostrea gigas* fut rapide et aujourd'hui cette espèce représente 95% de la production d'huître française (FAO, 2003). Sa production est basée à 90% sur le captage naturel du naissain dans les deux bassins ostréicoles d'Arcachon et de Marennes-Oléron.

Cependant, dès son introduction, des mortalités chroniques affectent le naissain et les adultes (Maurer *et al.*, 1986 ; Cheney *et al.*, 2000). Plusieurs études montrent une grande variabilité des taux de mortalités dans des zones de cultures très proches, les taux variant de quelques % à plus de 60% pour des lots voisins ainsi qu'une grande variabilité inter-annuelle (Maurer & Comps, 1986 ; Sholz *et al.*, 1973). Si les causes exactes de ce phénomène restent encore inconnues à ce jour, plusieurs facteurs susceptibles d'être impliqués dans ces mortalités ont été incriminés :

- le facteur environnemental le plus largement cité dans la littérature est la température élevée de l'eau, avec des valeurs supérieures à 20°C (Gouilletquer *et al.*, 1998 ; Cheney *et al.*, 2000).
- l'état physiologique des huîtres en période estivale a permis d'avancer l'hypothèse d'un déséquilibre métabolique entraînant des perturbations en relation avec les facteurs environnementaux. Il s'agit d'un phénomène complexe dans lequel

intervient le processus de reproduction de l'huître *Crassostrea gigas*, que ce soit chez les juvéniles lors de leur première maturation ou bien chez les adultes (Perdue *et al.*, 1981 ; Soletchnik *et al.*, 1996 ; Gouletquer *et al.*, 1998 ; Berthelin *et al.*, 2000). Le plus souvent, les mortalités estivales sont constatées à une période où l'animal est en pleine gamétogenèse et l'hypothèse d'un effort de reproduction trop coûteux est avancée (Berthelin *et al.*, 2000). Ainsi, la majorité de l'énergie acquise y compris celle provenant des réserves de glycogène est allouée au compartiment germinale. La demande énergétique est pendant cette période à son maximum. Au moment de la ponte, les réserves énergétiques sont au plus bas voir quasi nulles. Par conséquent, si les huîtres se retrouvent confrontées à une agression extérieure : choc de température, nourriture déficiente, zootechnie contraignante, attaque bactérienne ou parasitaire, milieu hypoxique..., elles ne peuvent se défendre et lutter efficacement contre ce stress ce qui met leur survie en danger.

- Sur le plan de la génétique, il existe un déterminisme génétique lié à ces mortalités (Beattie *et al.*, 1980). De nombreuses études ont montré qu'il est possible d'utiliser le déterminisme génétique des huîtres pour sélectionner les plus résistantes aux mortalités (Beattie *et al.*, 1980 ; Pajot *et al.*, 1998 ; Boudry *et al.*, 2002 ; Dégremont, 2003).

- la présence d'un agent pathogène ne semble pas être systématiquement associé au phénomène des mortalités. Seuls certains épisodes de mortalités en France, ont pu être associés à la présence de souches bactériennes pathogènes du genre *Vibrio* (Lacoste *et al.*, 2001 ; Le Roux *et al.*, 2002 ; Waechter *et al.*, 2002). Toutefois, la présence d'une infection bactérienne dans les huîtres moribondes n'indique pas si cette présence est la résultante de l'état d'affaiblissement des huîtres ou la cause première des mortalités.

- De plus, les pratiques culturelles représentent aussi une autre cause potentielle à l'origine des mortalités estivales. La manipulation des animaux à un moment où ils sont physiologiquement les plus fragiles pourrait les rendre plus sensibles à tout type de stress et donc aux mortalités.

De nombreux paramètres sont donc impliqués dans les mortalités estivales, et plusieurs facteurs peuvent être concomitants à l'apparition de ces mortalités. Il semble donc

important de tenir compte à la fois du patrimoine génétique des animaux, des conditions environnementales d'élevage (température, nourriture, salinité, oxygène...) qui en modifiant l'état physiologique des animaux (reproduction, immunologie, énergie), pourraient moduler la réponse de l'hôte face aux pathogènes, que ces derniers soient des pathogènes vrais ou opportunistes.

Afin de comprendre l'implication de chacun des paramètres et leurs interactions, l'IFREMER a initié en 2001 un programme pluridisciplinaire (« MOREST » pour MORTalités ESTivales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*). En effet, à ce jour, il n'a pas été possible d'expliquer les mortalités par un seul facteur. Les mortalités semblent être la conséquence des interactions entre trois composantes : l'hôte, le pathogène et l'environnement. La Figure 2 illustre schématiquement ces interactions avec les facteurs intrinsèques de chaque compartiment susceptibles d'intervenir dans le phénomène des mortalités estivales.

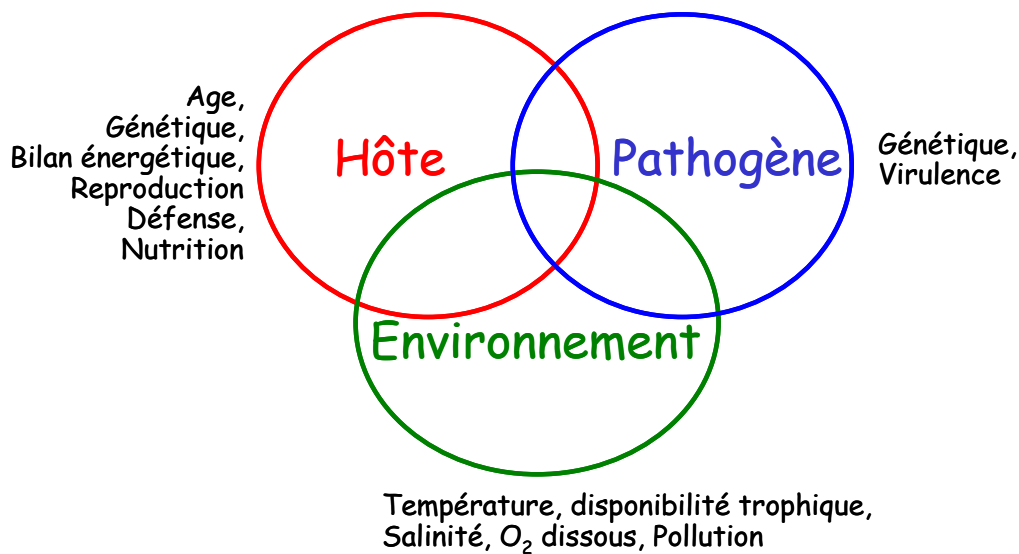


Figure 2 : Schéma des interactions entre les trois compartiments intervenant dans le phénomène des mortalités estivales.

Dans le cadre de ce programme MOREST, la présente thèse vise à apporter des éléments de réponses sur l'interaction entre l'environnement et l'hôte. L'hôte est défini par sa physiologie : énergie, reproduction et les caractéristiques des hémocytes (les cellules clé de

son système immunitaire). L'environnement est quant à lui défini par la quantité de nourriture disponible dans le milieu, et la qualité de cette nourriture.

En effet, la quantité de nourriture est un critère important car elle apporte aux huîtres non seulement les molécules essentielles mais aussi l'énergie indispensable à la croissance et à la reproduction, qui sont toutes les deux fonction de la température. Lorsque l'énergie assimilée par la nourriture est insuffisante, l'organisme puise dans ses réserves pour maintenir son métabolisme. Ainsi, la reproduction en période estivale a un coût physiologique tel qu'elle peut entraîner un important déficit énergétique (Soletchnik *et al.*, 1997). Aussi, au moment des mortalités estivales, les huîtres n'ont donc peut être plus assez d'énergie disponible à allouer à leur système de défense pour faire face à toute agression extérieure.

La qualité de l'alimentation microalgale, notamment sa composition en acides gras essentiels, est tout aussi importante car elle a des répercussions sur la composition des membranes biologiques du naissain des huîtres (Soudant *et al.*, 2000). Or, chez les vertébrés supérieurs et inférieurs, il a été démontré que la composition lipidique de l'aliment affecte la réponse immunitaire non spécifique et la résistance aux maladies (Sheldon & Blazer, 1991 ; Fracalossi & Lowell, 1994 ; Lingerfelser *et al.*, 1995 ; De Pablo *et al.*, 2000a ; Calder, 2001 ; De Pablo *et al.*, 2002). Par conséquent, la qualité nutritionnelle des blooms phytoplanctoniques qui ont lieu au printemps dans le milieu naturel pourrait aussi peut être affecter le système de défense des bivalves.

Les objectifs de cette thèse sont donc :

I. déterminer si la quantité de nourriture peut influencer les réponses physiologiques, notamment les paramètres énergétiques et hématocytaires, du naissain d'huître. Pour cela, deux expérimentations ont été réalisées : la première s'est déroulée sur une année afin de décrire le cycle complet de reproduction des huîtres, et la seconde en se focalisant uniquement sur la période estivale et en utilisant du matériel biologique spécifique (huîtres sélectionnées dans le cadre du programme MOREST).

II. déterminer l'effet de la qualité de la nourriture, c'est-à-dire de la composition lipidique des algues en certains acides gras essentiels, sur les réponses physiologiques des huîtres, en se focalisant surtout sur les paramètres hématocytaires. Pour cela, des huîtres ont été tout d'abord nourries à l'aide de régimes algaux mono-spécifiques, puis au vu de résultats

obtenus au cours de cette première expérience, deux autres expérimentations utilisant des aliments artificiels ont été réalisées pour tester spécifiquement le rôle de deux acides gras essentiels : l'acide éicosapentanoïque (20:5(n-3)) et l'acide arachidonique (20:4(n-6)).

La première partie de cette thèse commence par une présentation du modèle biologique étudié suivi d'une revue bibliographique. Cette revue se compose de différentes parties : une synthèse de ce qui est connu de l'implication de la nutrition et notamment des acides gras essentiels sur l'immunité chez les vertébrés et chez les invertébrés, puis une partie abordant l'importance de la nutrition chez les bivalves, tant en terme de quantité et de qualité, pour finir sur une description du système immunitaire des bivalves.

Une partie Matériel et méthodes présente les expérimentations et les différentes analyses réalisées dans le cadre de cette thèse.

Dans une troisième partie, les résultats des expérimentations menées pour tester l'impact de la quantité de nourriture sur les réponses physiologiques des huîtres sont présentés sous forme de deux articles scientifiques.

Une quatrième partie est consacrée à l'importance de la qualité lipidique de l'alimentation dans les réponses physiologiques des huîtres (trois articles scientifiques). A la fin de cette partie, les résultats des expérimentations « quantitatives » seront discutés en fonction de la qualité nutritionnelle des régimes algaux utilisés pour ces deux expérimentations.

Puis, dans une cinquième partie, les réponses physiologiques d'huîtres placées *in situ* seront aussi abordées.

Enfin, la dernière partie fait l'objet d'une synthèse des résultats majeurs obtenus au cours de ce travail.

MODELE BIOLOGIQUE

PRESENTATION DU MODELE BILOGIQUE

L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*



I. BIOLOGIE

Les huîtres sont des animaux filtreurs, sédentaires, fixés, peuplant des substrats meubles ou durs dans des zones intertidales et infralittorales ou dans les zones estuariennes. Elles se sont adaptées dans de nombreuses régions grâce à leur tolérance aux variations de température (eurytherme) et de salinité (euryhalines) et de quantité de nourriture.

II. ANATOMIE

Les huîtres sont des animaux à corps mou comprimé latéralement et renfermé dans une coquille à deux valves asymétriques articulées autour d'une charnière et maintenues par un muscle adducteur.

Les parties molles du corps de l'huître sont enveloppées dans un manteau dont les deux lobes sont soudés dorsalement près de la bouche (Figure 3). Le manteau délimite la cavité palléale. Dans la partie antérieure, il forme un capuchon céphalique qui recouvre les palpes labiaux et la bouche.

Le système digestif est composé de la bouche, l'œsophage, l'estomac, la glande digestive, l'intestin, le rectum et l'anus. L'estomac est formé d'un long cæcum où se trouve une évagination tubulaire -le stylet cristallin- remplie d'une gelée à forte teneur en enzymes digestives. Il est entouré par une glande digestive volumineuse.

Les branchies s'étendent de la bouche à l'anus. Elles assurent la double fonction de respiration et de nutrition. Les branchies sont lamellaires et constituées de filaments ciliés. Ces filaments ciliés assurent une circulation de l'eau qui permet un apport continu en oxygène et en particules alimentaires. Les branchies sécrètent aussi un mucus piégeant les particules alimentaires qui seront dirigées vers la bouche par des cils vibratiles et par l'intermédiaire des palpes labiaux avant d'être ingérées.

Les huîtres ont un système circulatoire partiellement clos car le fluide circulant - l'hémolymphe - n'est pas confiné aux vaisseaux et au cœur et peut s'insinuer librement au sein des tous les tissus et dans des sinus cœlomiques semi-ouverts. Le cœur est simple, composé d'un ventricule et de deux oreillettes. Il est inclus dans la cavité péricardique situé entre la masse viscérale et le muscle adducteur. Les hémocytes sont les cellules circulantes de l'hémolymphe des huîtres, ce sont les cellules clés du système immunitaire de ces animaux.

Le système nerveux est réduit à quelques ganglions difficilement observables. Le système d'excrétion est constitué d'un rein formé d'une glande tubulaire dans un sinus rénal situé sous le muscle adducteur dans la région péricardique et sous le manteau.

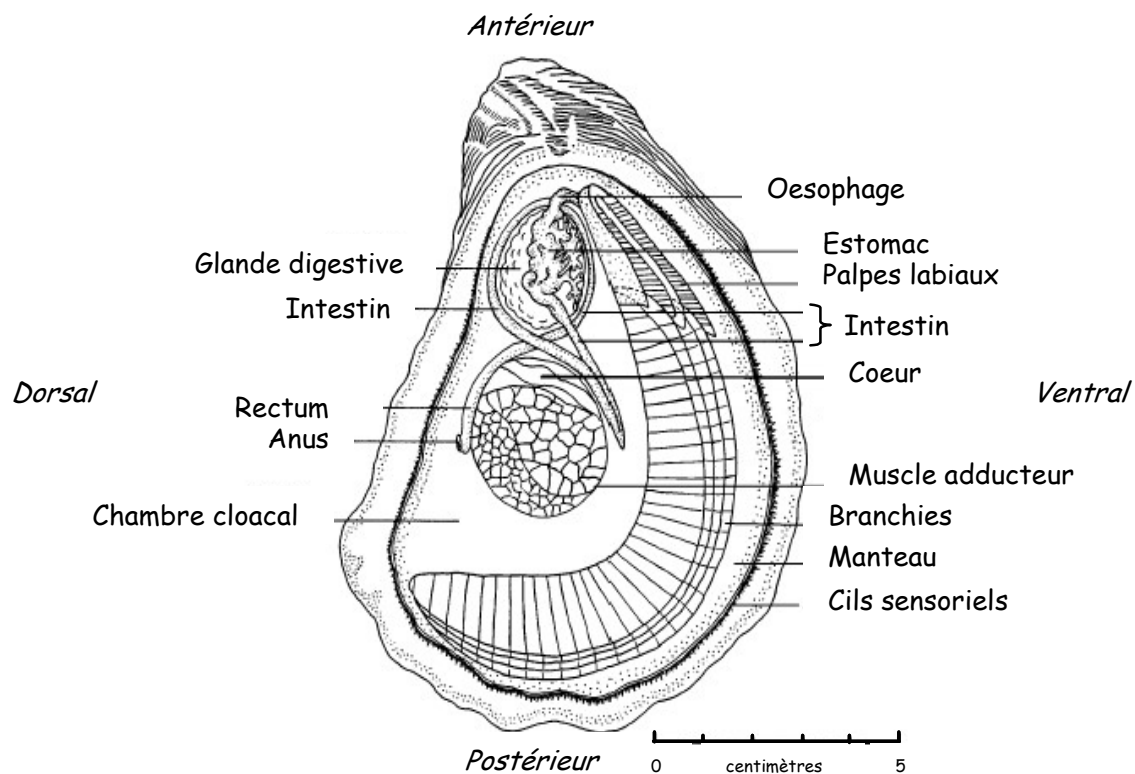


Figure 3 : Anatomie générale d'une huître dans sa valve gauche. Les axes orientaux de l'animal sont indiqués en caractère gras et en italique. (D'après Gatsoff, 1964 ; exemple *C. virginica*).

II. REPRODUCTION ET DEVELOPPEMENT

II. 1. Reproduction

Le cycle de reproduction de *C. gigas* suit un rythme saisonnier. La reproduction globalement comprend trois phases (Figure 9, page 33) : une phase de repos sexuel, une phase de gamétogenèse qui se termine avec l'émission des gamètes, et une phase de résorption gonadique. La gamétogenèse se déroule à un rythme très lent durant l'automne et au début de l'hiver, période dite de « repos sexuel » (Lubet, 1991).

Puis les cellules germinales se développent activement à la fin de l'hiver. Au printemps, le rythme de développement s'accélère, les huîtres arrivent à maturité sexuelle en juillet. L'émission des gamètes a lieu, généralement pendant la période estivale, une à plusieurs fois par an suivant la localisation géographique, la fécondation étant externe (Gouletquer, 1997 ; Chavez-Villalba *et al.*, 2001). La ponte intervient souvent en réponse à un signal extérieur, essentiellement des changements de température, un bloom phytoplanctonique ou à la présence dans l'eau de gamètes d'individus de la même espèce. L'émission de gamètes est totale dans les régions les plus chaudes de la côte française (Charente, Méditerranée) alors qu'elle n'est que partielle dans les régions ostréicoles où la température de l'eau est plus froide (Normandie, Bretagne nord) (Gouletquer, 1997). Lorsque la ponte est partielle, les gamètes sont résorbés par cytolysse et phagocytose pendant la période automnale (Lubet, 1991). Cette période de résorption de la gonade permet la restructuration du tissu et précède la reprise d'un nouveau cycle.

D'un point de vue biochimique, le cycle de reproduction se caractérise généralement par une phase de stockage en glycogène suivi d'une phase d'utilisation des réserves pendant la gamétogenèse (Berthelin *et al.*, 2000). Les réserves en glycogène représentent un support énergétique majeur de la gamétogenèse (Gabbot, 1975 ; Deslous-Paoli & Héral, 1988 ; Berthelin *et al.*, 2000) (Figure 9, page 33). Cependant, l'apport de la nourriture est prédominant. Puis après l'émission des gamètes, la restructuration du tissu gonadique s'accompagne d'une nouvelle période de mise en réserves. Les lipides sont utilisés pour la gamétogenèse et une perte de la teneur en lipides chez les femelles est généralement observée après la ponte (Gabbott, 1983). Ils peuvent aussi être utilisées comme source d'énergie pendant la période hivernale quand les réserves en glycogène sont au plus bas (White *et al.*,

1990). Les protéines peuvent quant à elles servir de source d'énergie pendant la maturation de la gonade, quand les réserves énergétiques sont au plus bas et aussi pendant les périodes de faible disponibilité trophique.

II. 2. Développement

Chez l'huître, la reproduction est externe, les gamètes mâles et femelles sont libérés directement dans le milieu et la fécondation a lieu en « pleine eau ». Après fécondation, l'embryon se divise progressivement passant des stades morula, blastula, gastrula jusqu'à la larve trochophore (Figure 2). La larve trochophore se différencie en larve véligère en forme de D caractéristique des larves planctotrophes puis celle-ci se transforme progressivement en une larve pédivéligère qui se fixera au substrat pour ensuite subir la métamorphose aboutissant à une larve aux caractéristiques de l'animal adulte. Le développement larvaire comporte donc une phase planctonique et une phase fixée. Le développement complet jusqu'à la maturité sexuelle peut prendre de quelques mois (5 à 10) à deux ans.

V. NUTRITION

Les huîtres sont des animaux filtreurs qui se servent de leurs branchies pour retenir les particules nutritives que les cils vibratiles propulsent ensuite vers la bouche en même temps qu'une pellicule de mucus. Les micro-algues constituent la nourriture de base pour les larves, les juvéniles et les géniteurs de mollusques. Elles constituent une source de protéines, de lipides et de glucides fournissant l'énergie nécessaire au développement de l'animal et à sa survie. Les besoins nutritif des huîtres en terme de quantité et de qualité sont décrits dans la revue bibliographique.

Au cours des premières phases du développement larvaire, la larve se nourrit en utilisant ses réserves vitellines (phase lécithotrophe). Puis lorsque le tractus digestif se met en place, la larve commence à se nourrir de micro-algues tout en continuant d'utiliser ses réserves vitellines (phase mixotrophe). Lorsque le phytoplancton devient la principale source de nourriture des larves, on parle de phase exotrophe. Une fois fixées, les huîtres continuent de se nourrir avec du phytoplancton.

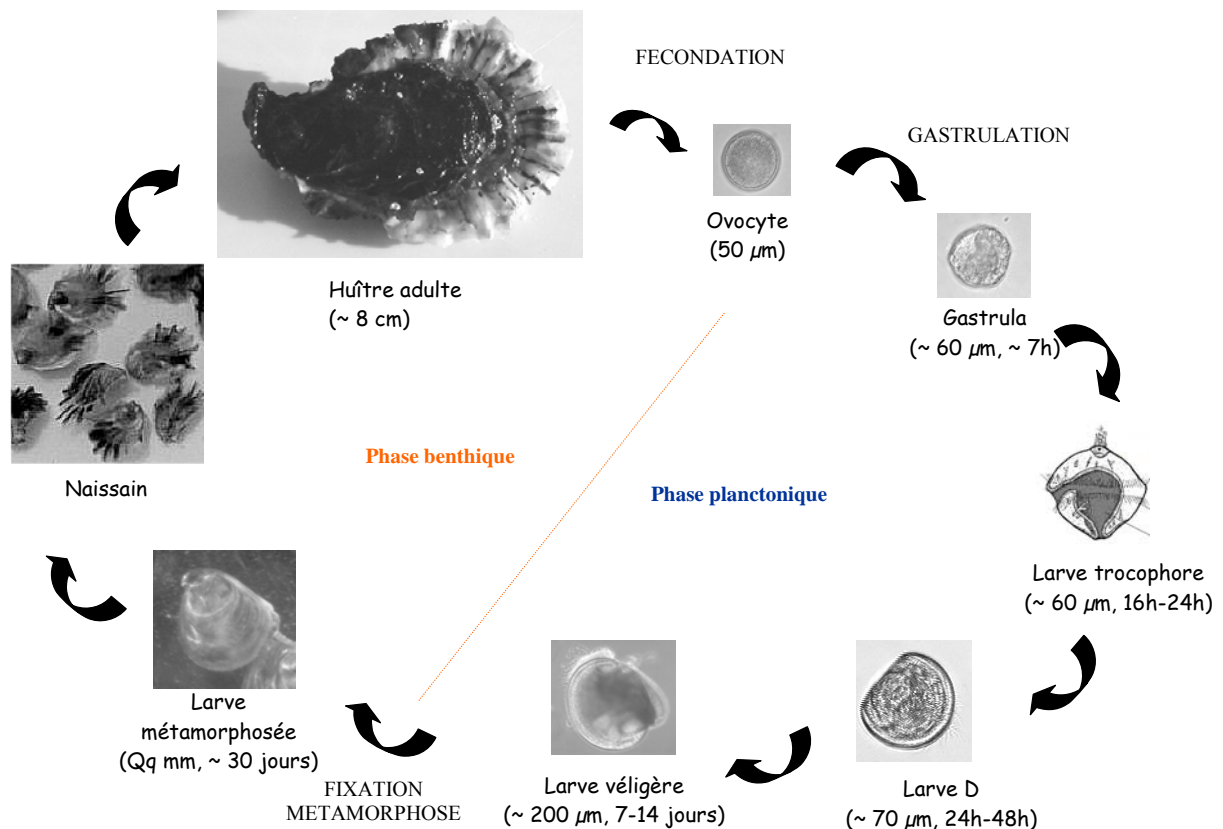


Figure 4 : Cycle de développement de l'huître *Crassostrea gigas*. (D'après Fabioux, 2004).

VI. SYSTEME IMMUNITAIRE

Chez la plupart des mollusques, l'hémolymphe baigne directement les organes internes. Dans ce système circulatoire semi-ouvert, il n'existe pas de distinction entre le sang et le liquide interstitiel. On parle donc d'hémolymphe. L'hémolymphe comme le sang des vertébrés joue un rôle spécifique dans le système de défense. Différentes revues font le point sur ce qui est connu sur les défenses cellulaires et humorales chez les bivalves (Fisher, 1986 ; Cheng, 1996 ; Chu, 2000). Les défenses de l'organisme sont essentiellement non spécifiques et basées sur les activités des hémocytes circulant dans les tissus (Cheng, 1996) et dans les fluides extrapalléaux entre le manteau et la face interne de la coquille (Allam & Paillard, 1998). Les différents types cellulaires et les fonctions hémocytaires sont décrits dans la 3^{ème} partie de la revue bibliographique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

RELATION ENTRE NUTRITION LIPIDIQUE ET DEFENSES IMMUNITAIRE

Dans tout le règne animal, la fonction de nutrition regroupe l'ensemble des mécanismes d'ingestion, d'assimilation et de dégradation des aliments qui ont lieu dans un organisme, lui permettant d'assurer ses fonctions essentielles et de croître. L'alimentation fournit à la fois l'énergie nécessaire à la respiration cellulaire, la matière organique pour la fabrication de certaines molécules (glucides, protéines), et aussi les nutriments essentiels que l'organisme ne peut synthétiser par lui-même (certains acides aminés, acides gras, vitamines, minéraux). La nourriture doit être apportée en quantité suffisante pour palier à ses besoins et être équilibrée pour assurer l'apport de tous les nutriments essentiels.

Cependant, apportée en quantité excédentaire ou de façon insuffisante, l'alimentation peut causer des troubles physiologiques. Chez l'Homme, la suralimentation, devenue un problème de plus en plus courant dans les pays industrialisés, est responsable de l'obésité qui est un facteur à risque important dans les maladies cardio-vasculaires, le diabète, l'hypertension artérielle, ou encore l'insuffisance respiratoire (Ferroni *et al.*, 2004). La malnutrition a quant à elle d'autres conséquences imputées à la déficience en certaines molécules essentielles, telle la maladie de Kwashiorkor associée à une déficience protéique et rencontrée dans les pays du Tiers-Monde.

Comme les lipides et plus particulièrement les acides gras de la série (n-3) sont largement utilisés dans la prévention de diverses maladies humaines (Sampath & Ntambi, 2004); nous attacherons une attention particulière dans cette partie de la revue bibliographique au rôle des acides gras dans les réponses immunitaires.

I. CHEZ LES VERTEBRES SUPERIEURS

I.1. Nutrition et santé

Dès 1975, Dyerberg *et al.* ont montré que l'alimentation des Esquimaux offrait une protection face aux risques de maladies cardio-vasculaires. Dans les années 1980, une étude épidémiologique menée au Groenland a permis de mettre clairement en évidence une faible

prévalence des maladies inflammatoires chez des Esquimaux, dont la principale source de nourriture est le poisson (Kromann & Green, 1980), connu pour apporter les acides gras essentiels de la série (n-3) notamment l'acide éicosapentanoïque (EPA, 20:5(n-3)) et l'acide docosahexanoïque (DHA, 22:6(n-3))^{*}.

A l'inverse de ces populations Esquimaux, chez la plupart des humains ayant une consommation de type « Occidentale », l'alimentation contient peu d'acides gras poly-insaturés de la série (n-3) par rapport à l'apport en acides gras de la série (n-6), notamment en acide linoléique (18:2(n-6)). Aussi la voie du métabolisme de l'acide linoléique prédomine (Figure 5) et les cellules immunitaires présentent typiquement de fortes proportions en acide arachidonique (20:4(n-6), AA) et de faibles proportions en acides gras poly-insaturés de la série (n-3), notamment en EPA. Ce fort taux d'AA dans les cellules est mis en cause dans les maladies cardio-vasculaires, maladies inflammatoires, dépressions ou encore maladies psychiatriques (maladies dites « occidentales »). Il peut être réduit par une alimentation riche en (n-3) telle les huiles de poisson qui favorisent l'incorporation des acides gras de la série (n-3) dans les membranes. L'exacte proportion en AA varie d'une cellule immunitaire à une autre selon le type de cellule et la fraction lipidique examinée (Calder, 2001).

Dans d'autres maladies dites auto-immunes (arthrites, psoriasis, sclérose, maladie de Crohn, etc), un enrichissement de l'alimentation en (n-3) permet une réduction des problèmes inflammatoires chez les patients atteints de ces maladies grâce entre autres à la diminution de la production d'éicosanoïdes de la série (n-6) et de cytokines pro-inflammatoires (Kelley & Bendich, 1996 ; De Pablo *et al.*, 1998 ; Alexander, 1998 ; De Pablo & Alvarez de Cienfuegos, 2000 ; Calder, 2001 ; De Pablo *et al.*, 2002 ; Harbig, 2003).

Par ailleurs, il a aussi été montré qu'une quantité trop importante de (n-6) peut se révéler néfaste pour la santé et favoriser certaines maladies. Ainsi dans les pays d'Afrique, soumis à la malnutrition et où le maïs - riche en acide linoléique (18:2(n-6)) - représente la principale source nutritive, l'émergence de nombreuses maladies dites des pays pauvres sont favorisées telles la tuberculose, le V.I.H. (Virus d'Immunodéficience Humaine) ou encore la maladie de Kwashiorkor (Sammon, 1999). Ces maladies peuvent se développer d'autant plus que cette malnutrition induit une diminution des capacités de défenses de ces individus liée à une production trop élevée de prostaglandines E₂ (PGE₂).

^{*} Quelques généralités sur les acides gras sont présentées dans l'Annexe 1.

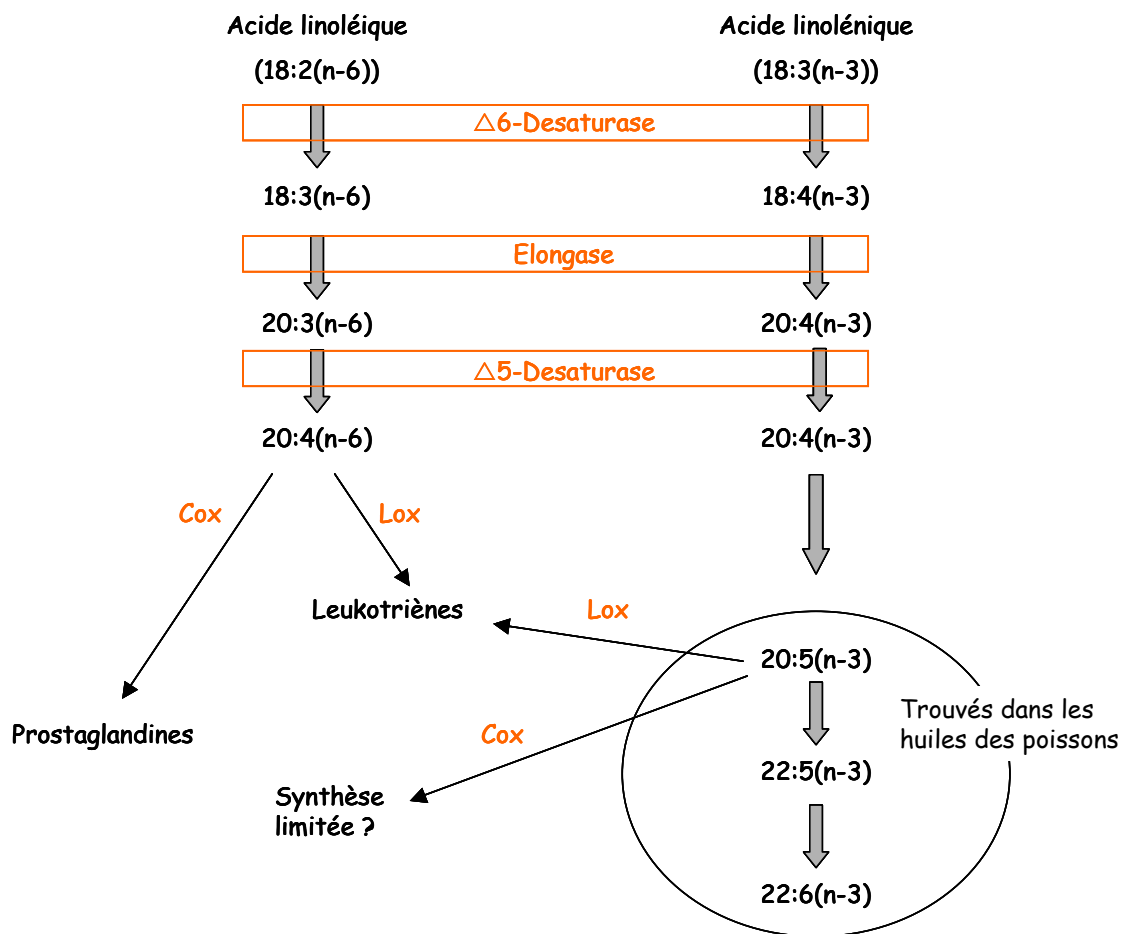


Figure 5: Métabolisme des acides gras essentiels chez les vertébrés supérieurs. D'après Yaqoob (2003). Le 20:4(n-6) est le précurseur des prostaglandines de la série 2 et des leucotriènes de la série 4. Le 20:5(n-3) est quant à lui le précurseur des prostaglandines de la série 3 et des leucotriènes de la série 5. Mais tous deux utilisent les mêmes enzymes. LOX (lipoxygénase). COX (cyclooxygénase).

Sammon (1999) indique que les effets négatifs des PGE₂ dus à la richesse en acide linoléique de l'alimentation peuvent être contrés par une alimentation riche en acides gras (n-3) notamment en EPA car celui-ci rentre en compétition avec l'AA dans la formation des éicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes) inhibant ainsi la production de PGE₂.

I.2. Rôle des acides gras en (n-3) ?

De part l'importance des propriétés anti-inflammatoires des acides gras (n-3) sur la santé humaine et de la compétitivité existante entre l'EPA et l'AA, de nombreuses études ont été réalisées pour mieux connaître les effets d'une alimentation riche en acides gras (n-3) et

particulièrement en EPA et en DHA sur l'immunité spécifique et/ou non spécifique. Plusieurs revues font le point sur ce qui est connu à ce jour chez les vertébrés (Meydani, 1996 ; De Pablo *et al.*, 1998 ; Alexander, 1998 ; De Pablo & Alvarez de Cienfuegos, 2000 ; James *et al.*, 2000 ; Calder, 2001 ; Kelley, 2001 ; De Pablo *et al.*, 2002 ; Harbige, 2003).

D'une façon générale, il a été démontré que les acides gras poly-insaturés de la série (n-3) ont un effet immunosuppresseur sur la prolifération des lymphocytes, la production de prostaglandines, d'anticorps, de certaines cytokines et sur certaines activités cellulaires notamment la phagocytose et l'activité des cellules « Natural Killer » (Figure 6 et Table 1, voir les différentes revues citées précédemment) ; mais influent aussi sur la régulation de l'expression de certains gènes, la fluidité membranaire ou encore la peroxydation lipidique.

Cependant, des effets contradictoires existent entre certaines études (Table 2, cf. revue de Calder, 2001). Calder (2001) souligne que ces différences peuvent être liées à la physiologie du sujet (âge, sexe) même si les études ont toutes été réalisées sur des sujets sains. Ainsi, Meydani *et al.* (1991) mettent en évidence que le système immunitaire des femmes âgées est plus sensible aux effets d'une alimentation riche en (n-3) avec une réduction drastique de la prolifération lymphocytaire, de la production de cytokines et une augmentation de la quantité de peroxyde lipidique dans le sang par rapport à celui de femmes jeunes.

Les effets des acides gras (n-3) semblent aussi beaucoup dépendre de la quantité apportée dans l'alimentation. Ainsi, Thies *et al.* (2001a et b) et Miles *et al.* (2004) n'observent aucun effet de l'EPA, ni du DHA sur la fonction de phagocytose et la production d'espèces actives de l'oxygène (connue aussi sous le terme « Respiratory burst ») des monocytes et neutrophiles quand ceux-ci sont apportés en dose modérée (700 mg). En effet, la consommation journalière en EPA + DHA est normalement inférieure à 150 mg et celle en AA inférieure à 200 mg. Dans la plupart des études réalisées pour tester le rôle des acides gras (n-3) sur l'immunité et dont certaines sont reportées dans la Table 2 et dans la revue de Calder (2001), les acides gras (EPA, DHA) sont souvent apportés en grande quantité dans l'alimentation. Or comme le propose Horrobin *et al.* (2002) ou encore Harbige (2003), un équilibre approprié entre les acides gras de la série (n-6) et (n-3) doit exister et être important dans la physiologie du fonctionnement du système immunitaire.

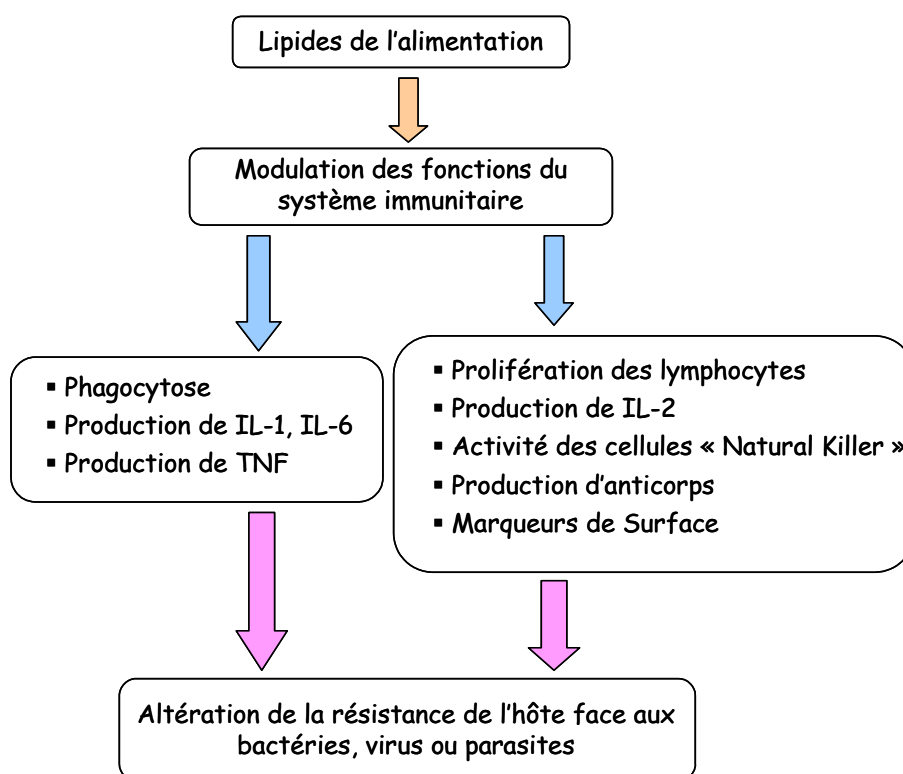


Figure 6 : Effets des lipides alimentaires sur les fonctions immunitaires chez les vertébrés supérieurs. TNF : Tumor necrosis factor. (D'après De Pablo et al., 2000a).

Cytokine	Source	Cible	Effets principaux
IL-1 α	Macrophages Fibroblastes Lymphocytes	Lymphocytes Macrophages Endothélium	Costimulation des lymphocytes Activation des phagocytes ↗ des molécules d'adhésion endothéliales
IL-1 β	Cellules épithéliales	Autres	Induit fièvre et sommeil ↗ de la synthèse des prostaglandines
IL-2	Cellules T	Cellules T Cellules NK Cellules B	Croissance et activation des cellules T Activation des cellules NK Division
IL-6	Macrophages Endothélium	Cellules T Cellules B	Croissance des lymphocytes Différenciation des cellules B

Table 1 : Présentation des types et fonctions de quelques cytokines (parmi un total de 18 cytokines) citées dans la figure ci-dessus. (D'après Male, 1999).

Auteurs	Mode d'apport (n-3)	Quantité	Fonctions étudiées	Effets
Miles <i>et al.</i> (2004)	1g / capsule	2.1g EPA 1.1g EPA 0.6g EPA 2.0g GLA	Phagocytose d'E. coli par les neutrophiles Phagocytose d'E. coli par les monocytes Respiratory burst des neutrophiles Respiratory burst des monocytes Prolifération de lymphocytes Nombre de cellules Natural Killer Présence d'immunoglobulines de Type IgE2	aucun aucun aucun aucun aucun ↘ avec dose 2g EPA ↗ avec dose 2g EPA
Kew <i>et al.</i> (2004)	1g / capsule	4.75g EPA + 0.37g DHA 0.85g EPA + 4.91g DHA	Phagocytose d'E. coli par les neutrophiles Phagocytose d'E. coli par les monocytes Production de cytokines	aucun aucun aucun
Thies <i>et al.</i> (2001 a et b)	0.45g / capsule	700mg DHA 700mg AA 2g ALNA 1g EPA + DHA	Phagocytose d'E. coli par les neutrophiles Phagocytose d'E. coli par les monocytes Respiratory burst des neutrophiles Respiratory burst des monocytes Activité des cellules Natural Killer Production de cytokines IL-1, IL-6, et TNF- α	aucun aucun aucun aucun aucun ↘ avec EPA+ DHA
Yaqoob <i>et al.</i> (2000)	1g / capsule	2.1g EPA + 1.1g DHA	Production de cytokines IL-1 α , IL-1 β et TNF- α par les cellules mononuclées en réponses au LPS	aucun
Kelley <i>et al.</i> (1999)	30% de l'énergie lipidique	6g DHA	Production de cytokines IL-1 α , IL-1 β et TNF- α par les cellules mononuclées en réponses au LPS Production de Prostaglandines PGE2 et LTB4	↘ ↘
Peterson <i>et al.</i> (1998)	17% par poids d'aliment	4g GLA 4g AA 4g EPA 4g DHA	Prolifération des lymphocytes Activité des cellules Natural Killer Production de Prostaglandines PGE2	↘ avec EPA et DHA ↘ avec EPA ↘ avec EPA et DHA

Auteurs	Mode d'apport (n-3)	Quantité	Fonctions étudiées	Effets
De Pablo <i>et al.</i> (1998)	15% par poids d'aliment	Olive oil Coconut oil Sunflower oil	Phagocytose par les cellules péritonéales Production de cytokines IL-1 β	↗ avec l'olive oil ↗ avec l'olive oil
Schmidt <i>et al.</i> (1996)	1g / capsule	0.34g EPA + 0.19g DHA	Production de superoxyde par les monocytes en réponses à du zymosan	Aucun
Halvorsen <i>et al.</i> (1997)	1g / capsule	3.8g EPA 3.8g DHA	Phagocytose d'E. coli par les monocytes Production de peroxyde d'hydrogène par les monocytes en réponses à E. coli	Aucun Aucun
Varming <i>et al.</i> (1995)	1g / capsule	2g EPA + 1.1g DHA	Production de peroxyde d'hydrogène par les neutrophiles en réponses à du zymosan ou du PMA	↘
	1g / capsule	0.34g EPA + 0.19g DHA		
Fisher <i>et al.</i> (1990)	Huile de Foie de Morue (30 ml / jour)	3.6g EPA + 2.4g DPA/DHA	Production de superoxyde par les monocytes en réponses à du zymosan Production de peroxyde d'hydrogène par les monocytes en réponses à des billes de latex	↘ ↘

Table 2 : Synthèse non exhaustive de résultats obtenus sur l'effet des acides gras de l'alimentation sur la production d'espèces actives de l'oxygène, l'activité des cellules Natural killer, la prolifération de lymphocytes, l'activité de phagocytose de certains types cellulaires, la production de cytokines et de prostaglandines. GLA (acide gamma linoléique), ALNA (acide linoléique), DHA (acide docosahexanoïque), DPA (acide docosapentanoïque), TNF (Tumor necrosis factor), PMA (phorbol myristate acetate), LTB₄ (leukotriène B₄), LPS (lipopolysaccharide).

Malgré l'existence de contradictions relevées dans les études menées sur des sujets sains, la qualité anti-inflammatoire et immunosuppressive des acides gras de la série (n-3) reste admise. Cette propriété anti-inflammatoire est très largement utilisée pour réduire les problèmes inflammatoires des patients atteints de maladies auto-immunes et/ou présentant un dérèglement fonctionnel du système de défense.

I.3. (n-3) et infection

Les résultats de certaines études (cf. De Pablo *et al.*, 2000a et b) suggèrent qu'une alimentation enrichie en acides gras (n-3) entraîne une plus grande susceptibilité face aux infections. Ainsi, des souris nourries avec un aliment contenant de l'huile de poisson se révèlent plus sensibles à une infection à *Listeria monocytogenes* (De Pablo *et al.*, 1998 ; Fristche *et al.*, 1997) ou à *Salmonella typhimurium* (Chang *et al.*, 1992). Cependant, des résultats opposés sont aussi reportés dans la littérature (De Pablo *et al.*, 2000a et b). Ces différences peuvent être associées à différents facteurs : les animaux eux-même, le type de lipides testés, ou encore la taille de l'inoculum.

I.4. Rôle des (n-6) et de l'acide arachidonique ?

Les acides gras de la série (n-6) ont fait l'objet quant à eux de peu d'études *ex vivo*. Ils semblent avoir une action à la fois pro-inflammatoire et aussi immunosuppressive (Harbige, 2003). Par contre, les études réalisées *in vitro* sur des cultures cellulaires permettent aujourd'hui de mieux comprendre l'importance de l'acide arachidonique (20:4(n-6)) et de ses métabolites dans les fonctions immunitaires, notamment dans les mécanismes de la phagocytose (Borda *et al.*, 1998 ; Lloret & Moreno, 1996 ; Bailie *et al.*, 1996 ; Burke *et al.*, 1997 ; Mancuso *et al.*, 1998 ; Davidson *et al.*, 1998, Lennartz, 1999). La Figure 7 représente quelques voies de signalisation intervenant dans le processus de phagocytose des macrophages ou monocytes : activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) qui provoque la libération de 20:4(n-6)(AA) en provenance des phospholipides membranaires (PL), libération de calcium intracellulaire par la phospholipase C (PLC), activation de la NADPH oxydase. La phagocytose résulte d'un ensemble de mécanismes complexes et très régulés qui fait aussi entrer en jeu entre autre l'activation de la phospholipase D non calcium dépendante, la MAP Kinase (Lennartz, 1999) et qui n'ont pas été représentées ici.

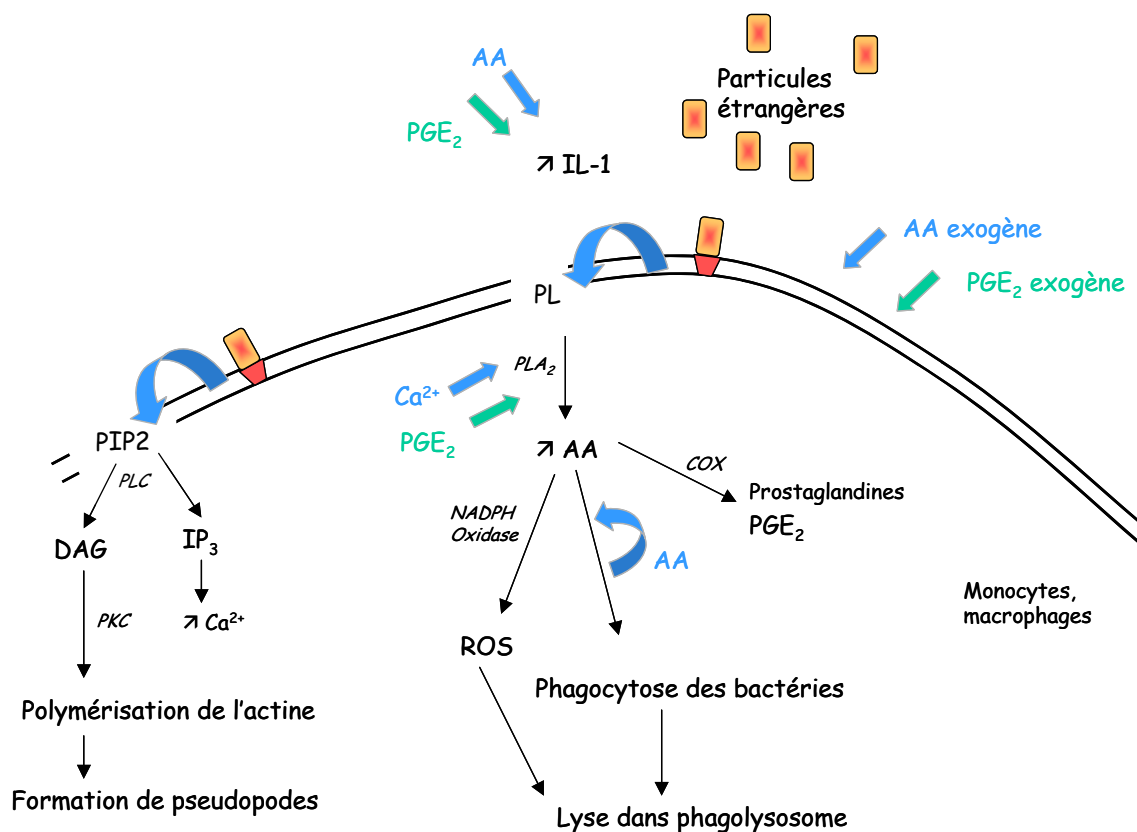


Figure 7 : Représentation schématique de quelques voies de signalisation intervenant dans le processus de phagocytose chez les vertébrés. Les flèches bleues indiquent les activations et activateurs. Les vertes les inhibiteurs. PLA₂ (phospholipase A₂), COX (cyclooxygénase), PKC (phosphokinase C), PLC (phospholipase C), NADPH oxidase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase), PGE₂ (prostaglandines E₂), ROS (espèces actives de l'oxygène ou Reactive oxygen species en anglais).

Les macrophages alvéolaires utilisent les mêmes voies de signalisation cellulaire que celles décrites ci-dessus pour la phagocytose de particules étrangères mais le leucotriène LTB₄ y joue un rôle essentiel (Bailie *et al.*, 1996 ; Mancuso *et al.*, 1998). En effet, les macrophages de souris déficientes du gène de la lipooxygénase (LOX) - ne pouvant par conséquent plus synthétiser les leucotriènes - présentent une faible capacité de phagocytose et d'élimination de la bactérie *Klebsiella pneumonia* et une plus forte susceptibilité face à cette bactérie (Bailie *et al.*, 1996). La différence avec le modèle proposé ci-dessus peut résulter d'une capacité différentielle des cellules à produire ces éicosanoïdes ou le choix dans certaines des études de mesurer soit les prostaglandines soit les leucotriènes. Cependant, il est intéressant de noter que récemment Brock *et al.* (2003) ont montré que différents éicosanoïdes peuvent être synthétisés par les macrophages du péritoine en réponse à une exposition

prolongée aux lipopolysaccharides (LPS). Au début de l'exposition, les macrophages synthétisent du LTB₄, puis, après 6 heures d'exposition, le taux de LTB₄ diminue alors que celui de la PGE₂ augmente. L'exposition prolongée aux LPS (16h) associée à une forte production de PGE₂ réduit les fonctions de ces cellules qui se traduit aussi par une réduction de leur capacité à éliminer ultérieurement la bactérie *Klebsiella pneumoniae*.

II. CHEZ LES VERTEBRES INFÉRIEURS

Les poissons ont aussi fait l'objet d'études basées sur la relation entre la nutrition et l'immunologie. Il s'agit notamment de répondre à des besoins existants dans les piscicultures : améliorer le système immunitaire des poissons afin de les rendre moins sensibles aux pathogènes et améliorer ainsi le rendement de la production.

Chez de nombreux poissons, la composition en acides gras des cellules du système immunitaire est influencée par la nature de l'aliment consommé (Bell *et al.*, 1985 ; Waagbø *et al.*, 1993 ; Bell *et al.*, 1995 ; Lingenfelser *et al.*, 1995 ; Farndale *et al.*, 1999). Cette composition lipidique des cellules du système immunitaire des poissons se distingue de celle des vertébrés supérieurs par une forte proportion en acides gras poly-insaturés (n-3), notamment en DHA et EPA. Comme chez les vertébrés supérieurs, les changements de composition membranaire affectent les fonctions des macrophages.

Cependant à l'inverse des vertébrés supérieurs, les acides gras de la série (n-3) semblent influencer positivement l'immunité (Sheldon & Blazer, 1991 ; Lin & Shiau, 2003 ; Montero *et al.*, 2003). Wu *et al.* (2003) ont montré que l'activité de phagocytose et la production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) par les leucocytes du mérrou *Epinephelus malabaricus* étaient plus élevées quand l'alimentation est enrichie spécifiquement en DHA par rapport à l'EPA. Par ailleurs, Lingenfelser *et al.* (1995) ont montré que la capacité de phagocytose des macrophages de poissons chats *Ictalurus punctatus* dépendait de l'aliment mais aussi de la température d'élevage. Une meilleure capacité de phagocytose est observée pour les macrophages des poissons chat nourris avec un aliment riche en 18:2(n-6) et déficient en EPA et DHA lorsque ceux-ci sont élevés à 28°C. Au contraire, les poissons nourris avec une alimentation enrichie en (n-3) (huile de Menhaden) à 18°C présentent de meilleures capacités de phagocytose et de production d'anion superoxyde. L'incorporation des acides gras de la série (n-3) dans les membranes semble avoir permis le maintien de la fluidité

membranaire et des fonctions immunitaires à 18°C. Cette nécessité d'ajuster sa composition lipidique pour maintenir la fluidité membranaire à différentes températures a aussi été reportée pour les érythrocytes de morue *Gadus morhua* (Lie *et al.*, 1989). Cependant, Fracalossi & Lowell (1994) montrent que la survie des poissons chats nourris avec un aliment enrichi en huile de Menhaden après une exposition à *Edwardisiella ictaluri* est moins bonne comparée à celle d'animaux nourris avec d'autres huiles (mixture, huile de maïs). Pourtant, *in vitro*, les macrophages des poissons chats présentent une meilleure capacité à éliminer les bactéries (Killing index) par rapport à des poissons nourris avec de l'huile de soja (Sheldon & Blazer, 1991). Ces études montrent l'importance de l'alimentation dans la capacité des poissons à s'adapter vis-à-vis de divers stress environnementaux (température, pathogènes) même si le rôle précis des acides gras (n-3) dans la réponse immunitaire reste à définir. Leur présence est toutefois nécessaire au bon développement des poissons puisque l'absence de ces acides gras essentiels dans l'alimentation entraîne des altérations du développement des reins et une immuno-dépression chez les juvéniles de dorade royale *Sparus aurata* (Montero *et al.*, 2003). D'autres molécules sont aussi importantes dans l'alimentation des poissons comme la vitamine E qui protège les cellules de la peroxydation lipidique et qui influe positivement les capacités de phagocytose de la truite arc-en ciel *Oncorhynchus mykiss* (Clerton *et al.*, 2001 ; Puangkaew *et al.*, 2004).

Par ailleurs, comme chez les vertébrés supérieurs, les poissons produisent des éicosanoïdes notamment ceux de la série (n-6) (Tocher & Sergent, 1987 ; Ashton *et al.*, 1994 ; Bell *et al.*, 1995 ; Farndale *et al.*, 1999) dont les proportions peuvent être modulées par l'alimentation (Ashton *et al.*, 1994 ; Bell *et al.*, 1995 ; Bell *et al.*, 1996 ; Bell *et al.*, 1998). Leurs rôles dans l'immunité des poissons commencent à être mieux définis. Ainsi, le leucotriène LTB₄ joue un rôle important dans la modulation de l'immunité des poissons, en augmentant la prolifération des lymphocytes B et T, en stimulant la libération de cytokines par les monocytes, en agissant comme chimio-attracteur et en induisant l'activité des cellules Natural Killer (Secombes *et al.*, 1994 ; Knight & Rowley, 1995 ; Farndale *et al.*, 1999). Tafalla *et al.* (2002a) montrent aussi que le leucotriène LTB₄ présent dans le surnageant de leucocytes est responsable de l'inhibition de la réplication du virus responsable de la septicémie hémorragique chez le turbot *Scophthalmus maximus*, sans pour autant exclure la possibilité de l'implication d'autres facteurs comme la PGE₂.

III. CHEZ LES INVERTEBRES

III.1. Chez les crevettes

Les crevettes représentent un groupe d'intérêt commercial important en aquaculture. Les études menées sur les différentes espèces concernent essentiellement leurs besoins protéiques dans le but d'améliorer la production, la croissance et la résistance des animaux. Peu d'études ont été menées chez les crevettes sur l'effet de la nutrition sur les paramètres immunitaires. (Scholz *et al.*, 1999 ; Chim *et al.*, 2001). Dans leur étude, Scholz *et al.* (1999) reportent les effets bénéfiques d'une alimentation enrichie en différents produits de levure (probiotiques) sur la résistance de juvénile de crevette *Penaeus vannamei* face au *Vibrio harveyi*. Chim *et al.* (2001) ont montré une meilleure résistance des crevettes *Penaeus stylirostris* nourries avec un aliment riche en (n-3) face à un stress de température et de salinité comparée à des crevettes nourries avec un aliment déficient en (n-3). Parallèlement, la production de ROS stimulée avec du zymosan s'est aussi révélée plus élevée pour les animaux nourris avec l'aliment riche en (n-3).

III.3. Chez les mollusques bivalves

Comme chez les crevettes, peu d'études existent sur la relation entre nutrition et réponses immunitaires chez les mollusques bivalves. Dans la plupart des études, les animaux proviennent du milieu naturel ou sont juste maintenus quelques jours en éclosion avant les analyses sans recevoir de régime alimentaire particulier. Quelques études répertoriées dans la littérature comparent aussi des animaux nourris par rapport à d'autres maintenus à jeun tels pour l'huître américaine *Crassostrea virginica* (Ashton-Alcox & Ford, 1998 ; Hégaret *et al.*, 2004) ou encore la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Oubella *et al.*, 1993). A ce jour, l'effet de la qualité de la nourriture, c'est-à-dire la composition en acides gras essentiels de la nourriture, sur les paramètres immunitaires des mollusques bivalves n'a jamais été abordé. L'utilisation d'aliments artificiels en complément du régime algal devrait permettre une étude plus spécifique de l'impact des acides gras sur les paramètres immunitaires.

LA NUTRITION DES BIVALVES

Comme pour tous les animaux, l'alimentation des mollusques bivalves doit fournir l'ensemble des éléments nutritifs (glucides, lipides, protéines, vitamines, minéraux) nécessaires aux fonctions vitales de l'organisme et au développement des animaux. Ces éléments dépendent de la disponibilité en micro-algues dans le milieu, elle-même sous l'influence des conditions environnementales du milieu (Figure 8).

D'une façon générale, une fois les micro-algues filtrées au niveau des branchies, elles sont acheminées vers la bouche en même temps qu'une pellicule de mucus pour y être ingérées, digérées puis assimilées au sein de l'organisme. L'énergie et la matière organique résultantes sont alors utilisées aux diverses fonctions de l'organisme (biodéposition, excrétion, respiration, croissance, reproduction, défenses immunitaires). L'alimentation influence aussi l'intensité de maturation des bivalves comme l'huître (Chavez-Villalba *et al.*, 2001 ; Enriquez-Diaz, 2004), la fécondité (c'est-à-dire le nombre d'œufs émis), le nombre de larves produites. Elle doit être apportée en quantité suffisante mais aussi être de « bonne » qualité.

I. APPORTS « QUANTITATIFS »

I.1. Quelques valeurs

La quantité de nourriture fournie lors de conditionnements expérimentaux varie généralement entre 3 à 5% de poids sec d'algues par poids sec de chair de mollusques et rarement plus (Knauer & Southgate, 1997 ; Berntsson *et al.*, 1997 ; Parrish *et al.*, 1998 ; Soudant *et al.*, 1999 ; Chavez-Villalba *et al.*, 2002 ; Delaporte *et al.*, 2003 ; Hégaret *et al.*, 2004 ; Enriquez-Diaz, 2004, voir Table 3). Dans leur revue, Utting & Millican (1997) soulignent que 3% semble être suffisant pour pallier aux besoins de la plupart des espèces de mollusques (croissance et reproduction) lors de conditionnements à basse température (inférieure à 16°C) et 6% pour des conditionnements à 20-22°C.

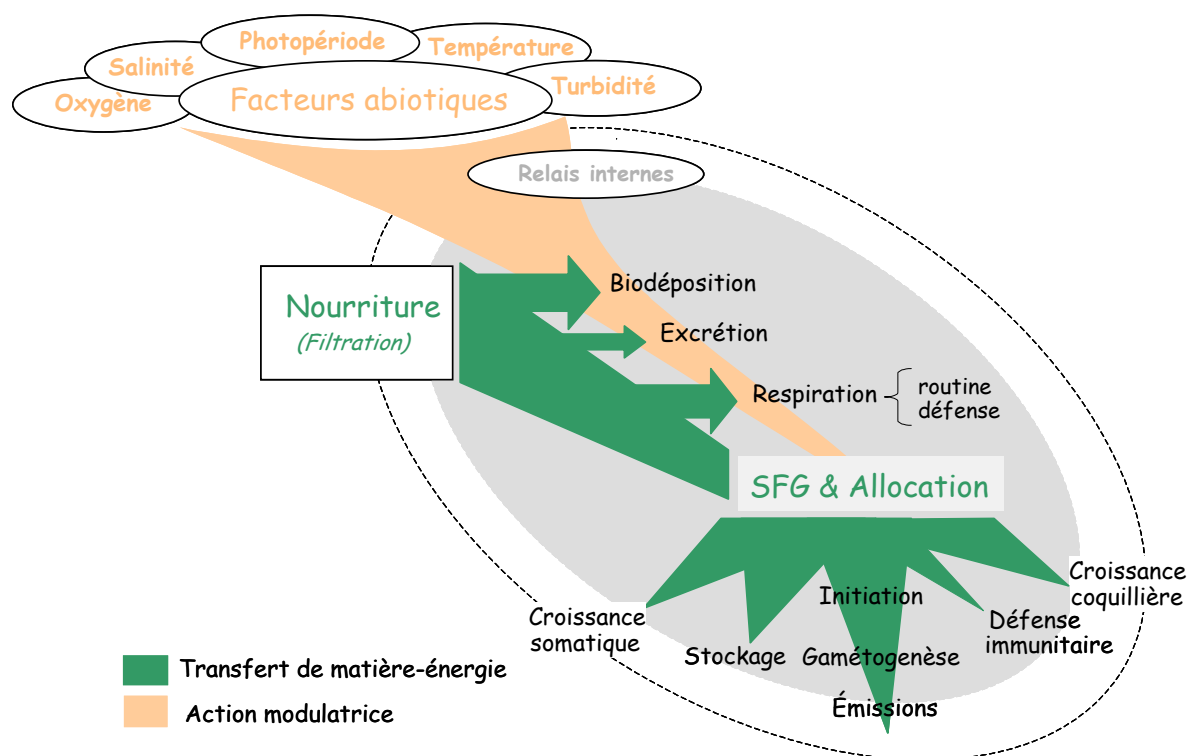


Figure 8 : Représentation schématique des facteurs influençant la biologie de l'huître et la répartition de l'énergie issue de la nourriture au sein de l'organisme (D'après S. Pouvreau). SFG (bilan énergétique pour la croissance ou Scope for growth en anglais).

Référence	Espèces	Classe d'âge	Ration journalière
Millican & Helm (1994)	<i>O. edulis</i>	-	3%
Knauer & Southgate (1997)	<i>C. gigas</i>	Juvenile	4%
Berntsson <i>et al.</i> (1997)	<i>O. edulis</i>	Adulte	6%
Parrish <i>et al.</i> (1998)	<i>P. magellanicus</i>	Juvenile	3%
Soudant <i>et al.</i> (1999)	<i>C. gigas</i>	Adulte	6%
Chavez-Villalba <i>et al.</i> (2002)	<i>C. gigas</i>	Adulte	3%
Delaporte <i>et al.</i> (2003)	<i>C. gigas</i>	Juvenile	5%
Hégaret <i>et al.</i> (2004)	<i>C. virginica</i>	Juvenile	0% , 10% et 50%
Enriquez-diaz (2004)	<i>C. gigas</i>	Juvenile	4% et 12%

Table 3 : Quelques exemples de rations journalières distribuées lors de conditionnements de mollusques bivalves en milieu contrôlé. Les rations sont exprimées en pourcentage de poids sec d'algues par poids sec de chair d'animaux.

Dans le milieu naturel, aucune estimation précise de la quantité d'algues disponible par individu ne peut être réalisée, seule la variation de la teneur en chlorophylle *a* du milieu permet d'indiquer la présence et la succession des blooms phytoplanctoniques. Ceux-ci apparaissent au printemps pour les régions tempérées comme la France. Un second bloom peut avoir lieu à la fin de l'été - début de l'automne dans les régions plus tempérées (Ruiz *et al.*, 1992). Récemment, Enriquez-Diaz (2004) a établi un lien entre des valeurs de chlorophylle *a* et la quantité exprimée en poids sec d'algues par poids sec d'huîtres. Dans son étude et pour un mélange algal constitué des algues *T-Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* et *Tetraselmis chui*, des teneurs de 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ et 15 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de chlorophylle *a* ont été mesurées dans les bacs d'élevage d'huîtres nourries à raison de 4% et 12% de poids sec d'algues par poids sec d'huître respectivement. D'après les valeurs relevées sur les sites ostréicoles, la ration de 4% correspond à des valeurs de chlorophylle *a* faibles telles celles relevées en St Germain en Ay sur la côte Ouest du Cotentin et celle de 12% à un niveau élevé de chlorophylle *a* rencontré sur les sites d'élevage de la Baie des Veys (Michel Ropert, com. pers.).

I.2. Besoins spécifiques au cours du processus de reproduction

La nourriture doit permettre aux géniteurs entre autres d'assurer leur reproduction (Utting & Millican, 1997). La reproduction est un processus qui nécessite beaucoup d'énergie pour le développement de la gonade qui peut représenter jusqu'à 55% du poids sec de l'animal (Perdue, 1983). Pendant la période de gamétogenèse active, les réserves en glycogène constituées au préalable chutent de façon drastique pour être au plus bas au moment de la ponte (Gabbott, 1975 ; Deslous-Paoli & Héral, 1988 ; Berthelin *et al.*, 2000). Ces réserves représentent un support énergétique majeur de la gamétogenèse (Figure 9). Cependant, l'apport de la nourriture est prédominant. Enriquez-Diaz (2004) a montré que plus les huîtres ont de nourriture mise à leur disposition, plus elles investissent de l'énergie dans la reproduction, et développent de tissu gonadique.

Le coût énergétique élevé de la reproduction influence considérablement la quantité d'énergie restante pour la croissance somatique. Ceci se traduit par un bilan énergétique pour la croissance souvent négatif à cette période. Puis, après l'émission des gamètes, la restructuration du tissu gonadique s'accompagne d'une nouvelle période de mise en réserve et un retour à un bilan énergétique positif.

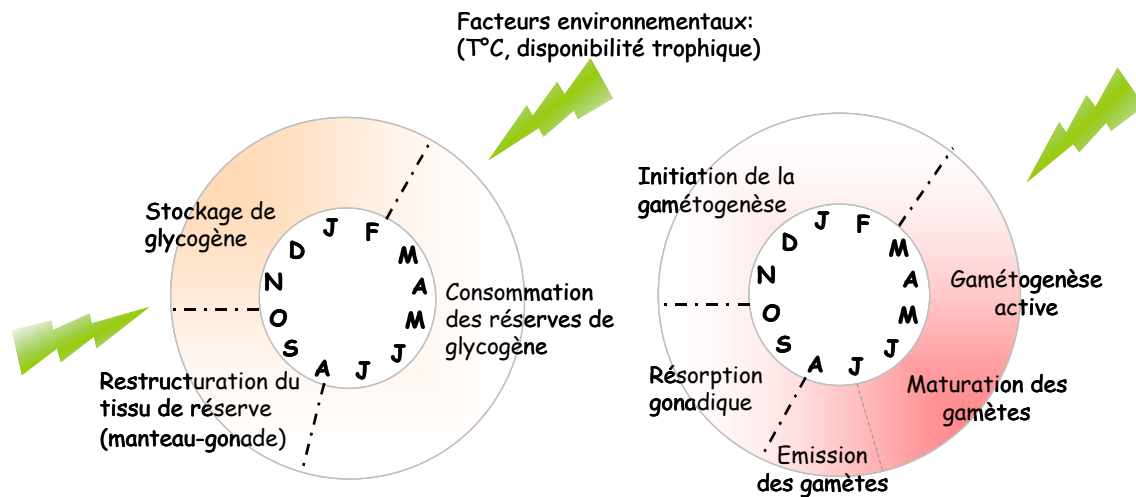


Figure 9 : Représentation schématique de l'évolution du tissu de réserves (manteau-gonade) et du cycle gamétogénétique de l'huître *Crassostrea gigas*.

Si l'énergie allouée dans les gamètes est perdue pour la croissance du géniteur, elle est très importante pour le développement ultérieur de la larve car pendant les premiers jours de sa vie, la larve se nourrit en utilisant les réserves vitellines de l'ovocyte. Par conséquent, la quantité de nourriture distribuée initialement aux géniteurs, que ce soit en milieu contrôlé ou dans le milieu naturel, va conditionner l'intensité de l'effort de reproduction des géniteurs mais aussi la qualité des œufs et la survie ultérieure des larves. Puis dès que le tractus digestif se met en place, la larve commence à se nourrir de façon exogène avec des micro-algues.

II. APPORTS « QUALITATIFS »

Si la quantité de nourriture est un paramètre primordial pour assurer le métabolisme, la croissance et la reproduction des mollusques bivalves, l'apport des éléments essentiels que l'animal ne sait synthétiser par l'alimentation est tout aussi important.

II.1. Composition des algues

De nouvelles souches d'algues sont régulièrement testées pour évaluer leur potentiel nutritionnel pour assurer la croissance des bivalves (Knuckey *et al.*, 2002), mais aussi pour trouver une alternative pouvant réduire les coûts de production en phytoplancton dans les éclosiers nurseries (Robert *et al.*, 2001) et pallier aux difficultés de production de certaines

algues (Barillé *et al.*, 2003). Les différences obtenues en terme de croissance avec différentes algues sont souvent expliquées par des variations substantielles de composition biochimique (Enright *et al.*, 1986 ; Laing & Millican, 1986 ; White *et al.*, 1989 ; Knuckey *et al.*, 2002) et de composition en acides gras poly-insaturés d'une espèce d'algue à une autre (Thompson & Harrison, 1992) et par les conditions de culture. Ainsi, l'algue *Isochrysis galbana*, aujourd'hui très largement utilisée en écloserie pour l'alimentation des mollusques, possède un fort taux de DHA (acide docosahexanoïque, 22:6(n-3)) (McCausland *et al.*, 1999). Les algues *Chaetoceros calcitrans* et *Skeletonema costatum* apportent quant à elles différents acides gras essentiels : l'AA (acide arachidonique, 20:4(n-6)) et l'EPA (acide éicosapentanoïque, 20:5(n-3)) mais sont déficientes en 22:6(n-3) (Soudant *et al.*, 1996 a et b ; Muller-Fuega *et al.*, 2003). Les régimes pluri-algaux se sont ainsi révélés être de qualité supérieure par rapport aux régimes mono-algaux, probablement grâce à la complémentarité des apports en molécules essentielles (Langdon & Waldock, 1981 ; Soudant, 1995 ; Utting & Millican, 1997 ; Parrish *et al.*, 1998 ; Brown, 2002). Les acides gras poly-insaturés : 20:5(n-3), 20:4(n-6) et 22:6(n-3) sont considérés comme des acides gras essentiels et doivent impérativement être apportés par l'alimentation. En effet, la majorité des espèces animales marines ne sont pas ou peu capables de bio-convertir l'acide linoléique (18:2(n-6)) et l'acide linoléique (18:3(n-3)) alimentaires ; qu'il s'agisse des poissons, des crustacés (Kanazawa *et al.*, 1979) ou des mollusques (De Moreno *et al.*, 1976 ; Landgon & Waldock, 1981 ; Waldock & Holland, 1984).

II.2. Qualité algale et développement

L'impact de la qualité algale dans la nutrition des mollusques est généralement étudié d'une part par le suivi de la fécondité et la fertilité des géniteurs, et d'autre part par le suivi du développement précoce des larves. Ceci s'explique par le fait que la fécondité et la fertilité des géniteurs, et ultérieurement le développement et la survie larvaire dépendent de la qualité initiale des ovocytes, elle-même conditionnée par la qualité de l'aliment donné aux géniteurs. En effet, durant l'ovogenèse, les ovocytes acquièrent leurs lipides directement de la nourriture ou par transfert du tissu de réserve (manteau et/ou glande digestive selon les espèces) vers les gonades (cellules germinales). Ce sont principalement des lipides neutres dont le spectre en acides gras est fortement influencé par le régime d'alimentation des géniteurs (Delaunay *et al.*, 1993 ; Soudant, 1995). Ainsi, Millican & Helm (1994) ont montré que la survie larvaire d'huître *Ostrea edulis* est meilleure quand les géniteurs sont nourris avec l'algue T-*Isochrysis*

par rapport à des géniteurs nourris avec l'algue *Dunaliella tertiolecta*. Puis, au cours du développement larvaire, un remaniement du profil des acides gras des membranes se produit pendant les phases endo- et mixotrophe. Ces changements observés sont le résultat d'une redistribution complexe des acides gras dans les classes de lipides polaires (Soudant *et al.*, 1998a). Ils font suite à des nécessités fonctionnelles du développement. La qualité de l'alimentation larvaire joue aussi un facteur déterminant car elle peut avoir des répercussions sur le développement larvaire, affectant la métamorphose, le recrutement, la croissance, la résistance au stress durant les transferts et le captage. Delaunay *et al.* (1993) ont montré que la composition en acides gras des lipides membranaires peut être modifiée par un régime mono-algal pouvant entraîner des perturbations de la métamorphose et de la croissance durant le développement larvaire de *Pecten maximus*. Les résultats de Soudant (1995) sont en adéquation avec ces derniers. Un régime algal constitué de l'algue *Chaetoceros calcitrans*, riche en cholestérol et 20:5(n-3), permet une bonne croissance. Mais, la déficience en 22:6(n-3) dans les lipides polaires apparaît avoir un effet négatif sur la fixation et la métamorphose des larves nourries avec cette algue. Au contraire, les larves nourries avec l'algue *T-Isochrysis*, riche en 22:6(n-3) mais déficiente en 20:5(n-3), ont une croissance faible et inférieure au standard mais sont capables de réussir leur métamorphose. Ces observations soulignent l'importance d'utiliser un aliment mixte ou supplémenté pour assurer l'apport des molécules essentielles et de meilleurs taux de survie pour les larves.

III. TECHNIQUES DE SUPPLEMENTATION

Dans les années 1980, des aliments artificiels ont été développés pour étudier les besoins nutritionnels des larves de mollusques bivalves (Langdon & De Boise, 1990 ; Langdon *et al.*, 2000), de juvéniles (Langdon & Siegfried, 1984 ; Coutteau *et al.*, 1996 ; Caers *et al.*, 2000 ; Soudant *et al.*, 2000) et d'adultes (Heras *et al.*, 1994 ; Caers *et al.*, 2002) mais aussi ceux des larves de poissons (Langdon, 2003). Ils peuvent aussi servir pour pallier aux déficiences en éléments essentiels (vitamines, acides gras poly-insaturés ou stérols) de certains régimes alimentaires.

Chez les mollusques, différents aliments artificiels ont été testés : les émulsions lipidiques, « spray beads », ou encore les liposomes (Knauer & Southgate, 1999 ; Moal *et al.*, 1999 ; Soudant *et al.*, 2000 ; Langdon *et al.*, 2000 ; Caers *et al.*, 2000 ; Novoa *et al.*, 2002). Les émulsions lipidiques se sont révélées être de bons vecteurs pour apporter des acides gras

poly-insaturés à des bivalves (Moal *et al.*, 1999) et ont un meilleur rendement par rapport aux liposomes (Caers *et al.*, 2000). Cependant, les liposomes et les émulsions apportent un mélange de molécules car leur préparation nécessite d'autres constituants lipidiques pour la formation de la capsule.

Récemment, Séguineau *et al.* (en préparation) ont testé une nouvelle technique de supplémentation basée sur les travaux de Von Elert (2002). Les auteurs ont essayé d'enrichir l'algue T-Iso (*Isochrysis aff. galbana*, clone Tahiti) en un acide gras poly-insaturé essentiel : le 20:4(n-6), dont l'algue est déficiente, directement par ajout de l'acide gras dans le milieu de culture de l'algue ou dans le bac de distribution pour nourrir les huîtres. Un enrichissement significatif de l'algue en cet acide gras a été observé. Par ailleurs, le 20:4(n-6) apporté directement en solution dans le bac d'élevage a ainsi été incorporé dans les membranes des juvéniles d'huître *Crassostrea gigas* prouvant qu'il a bien été métabolisé par les huîtres. Cette nouvelle technique de supplémentation a un avenir prometteur puisqu'elle devrait permettre de faciliter les études sur les besoins qualitatifs des mollusques et de façon plus spécifique.

Pour finir cette partie sur la nutrition des bivalves, il faut souligner qu'aucune des études citées ne souligne l'impact que pourraient avoir ces changements de composition membranaire sur la fonctionnalité même de certaines cellules clés de l'organisme tels les hémocytes, cellules clé du système immunitaire des bivalves décrit dans la dernière partie de cette revue bibliographique.

SYSTEME IMMUNITAIRE DES BIVALVES

I. GENERALITES

Les mécanismes de défenses des bivalves ont été étudiés pour quelques espèces d'intérêt économique telles les huîtres, les palourdes et les moules. Différentes revues font le point sur ce qui est connu sur les défenses cellulaires et humorales chez les huîtres (Fisher, 1986 ; Cheng, 1996 ; Chu, 2000).

II. DIFFÉRENTS TYPES D'HÉMOCYTES

Les hémocytes sont les cellules clé du système de défense des huîtres et autres mollusques. Leurs morphologies et leurs fonctions sont aujourd'hui mieux connues (Cheng, 1996 ; Xue, 1998 ; Chu, 2000). Selon les critères utilisés (morphologiques, cytochimiques ou fonctionnels), leur classification diffère. Quoique de nombreux types d'hémocytes aient été identifiés, généralement, on considère deux grands types cellulaires : les cellules granulaires et non granulaires (Cheng, 1996, Figure 10).

Si les granulocytes forment un groupe relativement homogène, du fait de leur caractérisation à partir d'un caractère positif (présence de granules), ce n'est pas le cas des hyalinocytes, qui se caractérisent par une absence ou une présence limitée de granules intracytoplasmiques. Il existe de nombreuses similarités entre les types cellulaires selon les espèces. Une exception : la classe des pectinidés qui possède uniquement des hyalinocytes (Auffret, 1988).

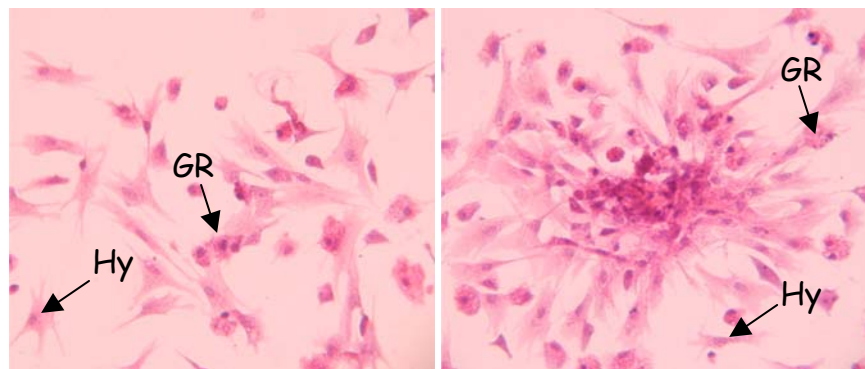


Figure 10 : Photos d'une vue d'ensemble d'hémocytes et d'un agrégat d'hémocytes d'huître creuse *Crassostrea gigas* après coloration à l'hématoxyline de Harris et à l'éosine.

Toutefois, on connaît encore peu de choses sur les origines et les mécanismes de formation des hémocytes chez les mollusques. Certains auteurs suggèrent que les hémocytes proviennent de la différenciation de cellules du tissu conjonctif (Cheng, 1996 ; Auffret, 1988).

III. FONCTIONS DES HEMOCYTES

Chez les mollusques bivalves, les hémocytes interviennent dans la cicatrisation d'une blessure, la recalcification de la coquille, le transport et la digestion de nutriments, et dans l'excrétion (Cheng, 1996). Mais, ils jouent aussi un rôle très important dans les défenses internes. Nous allons ci-après nous intéresser aux fonctions des hémocytes dans la réponse immunitaire, et plus spécifiquement à la fonction de phagocytose et la production d'espèces actives de l'oxygène.

III.1. Phagocytose

La phagocytose est un processus universel existant chez les vertébrés et les invertébrés. La phagocytose par les hémocytes fait suite à la présence d'un corps étranger (virus, bactéries, particules inorganiques, organismes pathogènes ou non) au sein ou au contact de l'organisme. Elle se déroule en plusieurs étapes : reconnaissance de l'élément « non soi », fixation du « non soi » sur l'hémocyte, internalisation ou endocytose, et enfin, dégradation intracellulaire de l'élément phagocyté (Figure 11).

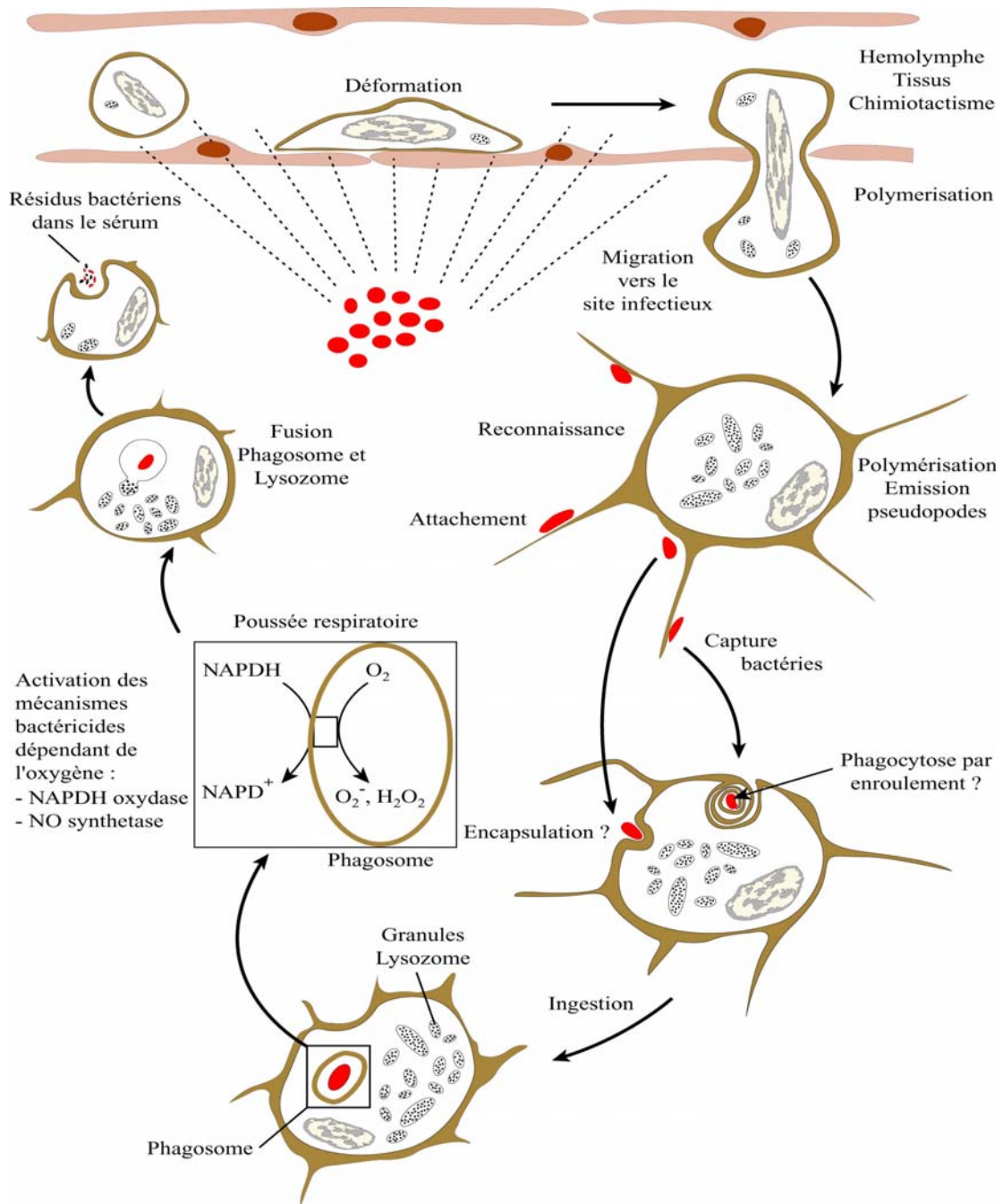


Figure 11 : Représentation schématique du processus de phagocytose et des processus de destruction des particules phagocytées. (D'après Paillard, 2004).

Plusieurs travaux montrent que la capacité de phagocytose n'est pas la même pour les différents types cellulaires. Ainsi, bien que les granulocytes et hyalinocytes soient capables de phagocyter, les granulocytes sont généralement considérés comme le type cellulaire le plus actif dans ce processus (Fisher, 1986 ; Cheng, 1996).

Chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, seuls les granulocytes sont capables de phagocyter le zymosan et les bactéries (*Vibrio tapetis*) tandis que les hyalinocytes ne semblent pas posséder la capacité de phagocytose (Carballal *et al.*, 1997a). De la même manière, dans le processus de phagocytose de particules de zymosan chez la palourde européenne *Ruditapes decussatus*, les granulocytes sont les cellules les plus actives (Lopez *et al.*, 1997a).

III.1.a. Reconnaissance et fixation du « non soi »

Les détails de la reconnaissance de l'élément « non soi » chez les bivalves ne sont pas encore bien connus. Mais, les substances produites par les particules étrangères peuvent agir comme des facteurs chimiotactiques qui favorisent le rapprochement entre les particules à phagocyter et les cellules à activité phagocytaire. La fixation des deux éléments pourrait s'expliquer par la présence de molécules particulières à la surface des hémocytes (récepteurs spécifiques et lectines).

La présence de similarité antigénique entre les récepteurs des huîtres et le parasite *Haplosporidium Nelsoni* explique certains échecs de phagocytose ; les hémocytes ne reconnaissant pas comme « étranger » le parasite (Kanaley & Ford, 1990).

III.1.b. Endocytose

Cheng (1981) a proposé trois modèles d'internalisation des particules étrangères par les hémocytes de bivalves. Dans le premier modèle, des filopodes entoureraient les particules. Ces particules seraient ensuite englobées dans des phagosomes. Pour le deuxième modèle, les particules seraient englobées dans des vacuoles d'endocytose après adhésion des particules à la surface de la cellule. Dans le troisième modèle, les particules pourraient entrer dans les phagosomes par l'intermédiaire de pseudopodes « entonnoirs » (Hinsch & Hunte, 1990).

III.1.c. Dégradation intracellulaire

Une fois les particules phagocytées dans les phagosomes, ceux-ci fusionnent avec les lysosomes pour donner des phagolysosomes. La dégradation des particules étrangères ingérées s'effectue à l'intérieur des phagolysosomes par la formation d'intermédiaires oxygénés et/ou par des enzymes lysosomales (Roch, 1999 ; Chu, 2000). Le premier mécanisme correspond à la production d'espèces actives de l'oxygène.

Il est aussi appelé « bouffée respiratoire » (respiratory ou oxidative burst en anglais, Chu, 2000). Cette activité sera détaillée dans le paragraphe III.2. Le second mécanisme non oxygène dépendant repose principalement sur l'activité des enzymes lysosomiales, notamment des hydrolases. La quantité d'enzymes lysosomiales est augmentée par la réaction de phagocytose. De plus, des acides et des protéines cationiques peuvent également participer à la destruction des particules phagocytées.

III.1.d. Devenir des particules phagocytées

La plupart des particules étrangères sont détruites par les hémocytes de mollusques après phagocytose. Cheng (1981) a décrit l'évolution des matériaux phagocytés dans les phagolysosomes chez l'huître américaine *C. virginica*. Pendant les processus de dégradation de l'organisme phagocyté, un grand nombre de granules de glycogène synthétisés à partir des sucres de la particule dégradée s'accumulent dans le phagolysosome. Puis la membrane du phagolysosome se désagrège et les granules de glycogène sont libérés dans le cytoplasme. Ils peuvent ensuite sortir de la cellule par l'intermédiaire de vésicules.

Cependant, certains parasites arrivent à contrecarrer les processus mis en place par les hémocytes pour leur destruction et peuvent induire de graves maladies telles que *Bonamia ostreae* chez l'huître plate *O. edulis* (Chagot, 1989), *Perkinsus marinus* et *Haplosporidium nelsoni* chez l'huître américaine *C. virginica* (Ford *et al.*, 1993a ; La Peyre *et al.*, 1995). D'autres micro-organismes, y compris ceux pathogènes pour l'homme, peuvent rester en vie à l'intérieur des hémocytes des mollusques sans entraîner la mort de l'hôte. Dans ce cas, les hémocytes peuvent favoriser le transport et la dissémination d'organismes pathogènes pour d'autres espèces. Ils sont de simples réservoirs (Alvarez *et al.*, 1992).

III.2. Production d'espèces actives de l'oxygène

Le terme d'espèces actives de l'oxygène (ROS) regroupe : $^1\text{O}_2$, O_2^- , OH^- , NO , OCl^- et la molécule H_2O_2 . Leur production est initiée par l'attachement de particules étrangères à la surface de la membrane cytoplasmique des hémocytes.

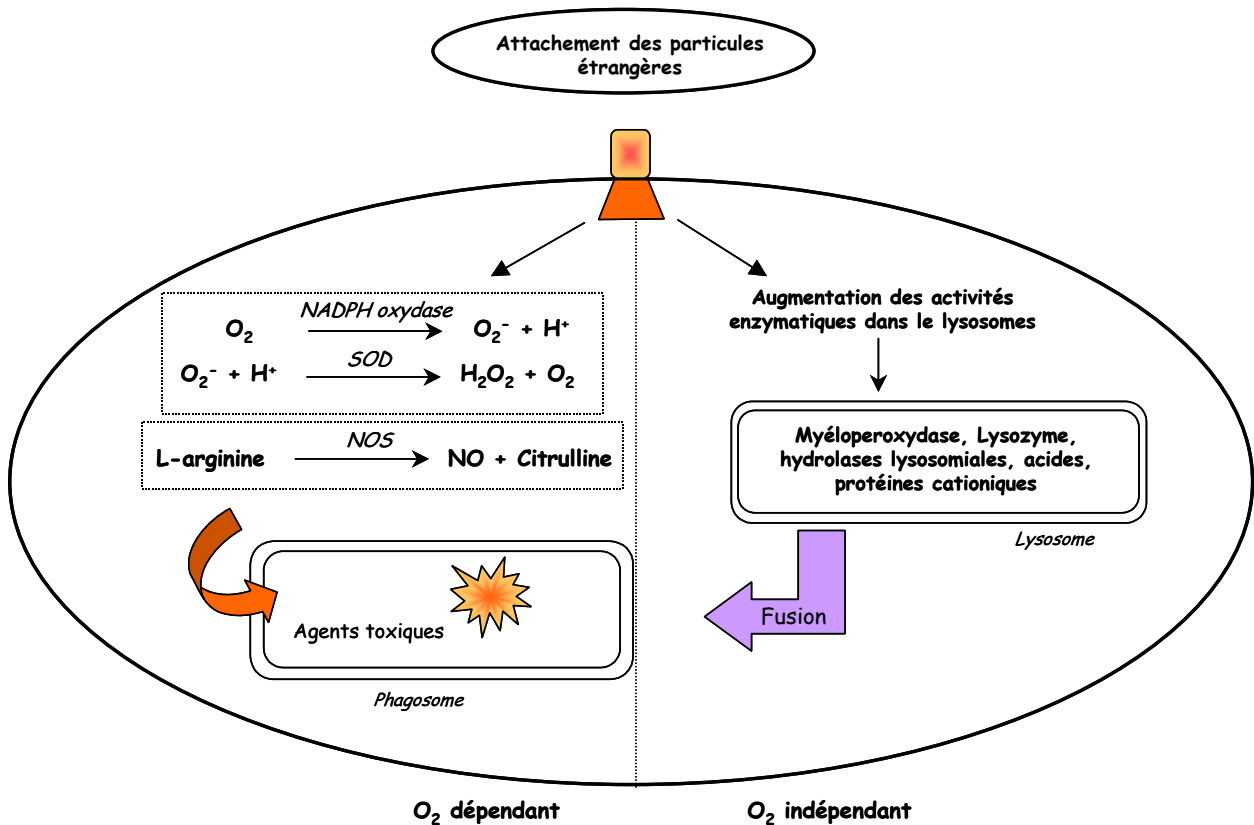


Figure 12 : Représentation des processus de dégradation intracellulaire intervenant après phagocytose d'une particule étrangère par les hémocytes. NADPH oxydase (Nicotinamide adenine dinucléotide phosphatase oxydase), SOD (Superoxyde dismutase), NOS (oxyde nitrite synthétase).

Les ROS sont produites à partir d'une réaction oxydante couplée à la phagocytose, ou quand les hémocytes sont stimulés. Cette réaction commence par la réduction d'une molécule d'oxygène en anion superoxyde par la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphatase oxydase) associée à une consommation en oxygène par les hémocytes (Chu, 2000). L'anion superoxyde (O_2^-) est alors converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase et éventuellement sous forme de radicaux hydroxyles (OH^\cdot) et de singlet d'oxygène (1O_2) (Figure 12).

Ces radicaux oxygénés sont toxiques et peuvent réagir avec d'autres composés pour former des molécules encore plus toxiques. Ils jouent un rôle essentiel dans l'élimination des particules phagocytées (bactéries, virus, levures, et protozoaires). Par ailleurs, lorsque le lysosome fusionne avec le phagosome, l'activité de la myéloperoxydase produit de l'hypochlorite à partir du peroxyde d'hydrogène et des ions chlorure. L'hypochlorite (eau de javel) est aussi très toxique pour les particules ingérées.

Trois groupes de techniques sont aujourd'hui utilisées pour détecter la production des ROS dans les hémocytes de mollusques. Ce sont les techniques de chimioluminescence (Le Gall *et al.*, 1991 ; Bachère *et al.*, 1991 ; Greger *et al.*, 1995 ; Anderson *et al.*, 1995 ; Bramble & Anderson, 1997, 1998), de réduction du bleu de tétrazolium (Anderson, 1994 ; Anderson *et al.*, 1992 ; Fisher *et al.*, 1996) et de cytométrie en flux (Lambert *et al.*, 2003 ; Delaporte *et al.*, 2003 ; Hégaret *et al.*, 2003 ; Goedken & De Guise, 2004).

La production de ROS a été mise en évidence chez plusieurs espèces de mollusques comme chez l'huître américaine *C. virginica* (Anderson *et al.*, 1992 ; Bramble & Anderson, 1997, 1998), l'huître creuse *C. gigas* (Bachère *et al.*, 1991 ; Lopez *et al.*, 1994 ; Greger *et al.*, 1995 ; Nakayama & Maruyama, 1998 ; Lambert *et al.*, 2003), l'huître plate *O. edulis* (Chagot, 1989 ; Bachère *et al.*, 1991), les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* (Pipe, 1992 ; Carballal *et al.*, 1997b), ou encore *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991 ; Lambert & Nicolas, 1998). A l'inverse, les hémocytes de la mye commune *Mya arenaria*, de palourde américaine *Mercenaria mercenaria* et de palourde européenne *Ruditapes decussatus* ne libèrent pas de ROS au cours de la phagocytose des cellules de levure, que celles-ci aient été opsonisées ou non par un traitement préalable du zymosan avec du plasma (Torreilles *et al.*, 1996). Ceci suggère l'existence d'une autre voie de dégradation des particules phagocytées.

Chez certaines espèces, les oxyde nitrique synthétases (NOS) peuvent catalyser la production d'oxyde nitrique (NO) à partir de L-arginine (Figure 10). Le NO pourrait intervenir dans différents processus physiologiques et pathologiques (Moncada *et al.*, 1991). Depuis quelques années, des études se sont attachées à démontrer l'existence du système NO chez les bivalves et à mesurer la production de NO (Franchini, *et al.*, 1995 ; Nakayama & Maruyama, 1998 ; Torreilles & Guérin, 1999 ; Arumugam *et al.*, 2000a et b ; Gourdon *et al.*, 2001 ; Tafalla *et al.*, 2002b). Ainsi, Nakayama et Maruyama (1998) ont démontré une production de NO par les hémocytes d'huître *C. gigas* après stimulation au phorbol myristate acetate (PMA). De même, les hémocytes de moules *M. galloprovincialis* sont aussi capables de produire des NO après stimulation au PMA ou par une solution de lipopolysaccharide et de zymosan ou encore des billes de latex (Arumugam *et al.*, 2000a et b ; Gourdon *et al.*, 2001 ; Tafalla *et al.*, 2002b). Au contraire, les palourdes *R. decussatus* n'en produisent pas (Arumugam *et al.*, 2000a).

III.3. Synthèse de facteurs humoraux

Chez les invertébrés comme chez les vertébrés, la réponse humorale s'effectue par l'intermédiaire de molécules solubles produites par les hémocytes à fonctions cytotoxiques que l'on peut classer en deux catégories : les effecteurs issus des cascades protéolytiques qui aboutissent à la formation de complexes cytotoxiques (cascades du complément, de coagulation, d'activation de la prophénoloxydase) et les effecteurs à actions cytotoxiques directes tels que les inhibiteurs de protéases et les peptides anti-microbiens (Montagnani, 2002).

Quelques peptides antimicrobiens ont été identifiés chez les mollusques. Ces peptides sont des effecteurs du système immunitaire les plus largement répartis dans le règne vivant. Chez les invertébrés comme chez les vertébrés, on peut distinguer deux modes de production : synthèse par les hémocytes en réponse à l'infection ou présents de manière constitutive, stockés dans les granules et libérés ensuite en réponse à l'infection. Chez les moules *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis*, des peptides anti-microbiens produits constitutivement ont été caractérisés au niveau des hémocytes (Mitta *et al.*, 2000). On distingue des défensines, des mytilines, des myticines, et des mytimicines. Bien que leur mode d'action ne soit pas complètement élucidé, les peptides anti-microbiens semblent agir en déstabilisant l'organisation des membranes des micro-organismes.

IV. FACTEURS INFLUENÇANT LES PARAMETRES HEMOCYTAIRES

Les mollusques sont des animaux poikilothermes ; ils ne possèdent pas de système de régulation thermique. Ce sont aussi des animaux directement exposés aux variations survenant dans le milieu. De nombreux travaux ont montré des variations des facteurs de défense à médiation cellulaire et humorale selon les conditions environnementales. Ces variations ne sont pas seulement saisonnières mais dépendent aussi de l'habitat et de l'état physiologique des animaux. Les effets de quelques facteurs (température, présence d'un pathogène, alimentation et le jeûne) sur la concentration hémocytaire, l'activité de phagocytose et la production de ROS seront développés ci-après.

IV.1. Température et variations saisonnières

L'effet de la température sur les paramètres hématologiques a été étudié *in vitro* (Alvarez *et al.*, 1989 ; Auffret & Oubella, 1997 ; Cima *et al.*, 2000 ; Allam *et al.*, 2002) ou sur des animaux conditionnés à différentes températures (Chu & La Peyre, 1993 ; Ashton-Alcox & Ford, 1998) ou encore indirectement par les études réalisées *in situ* à différentes périodes de l'année (Fisher *et al.*, 1989 ; McCormick-Ray & Howard, 1991 ; Ford *et al.*, 1993a ; Fisher *et al.*, 1996 ; Carballal *et al.*, 1998 ; Genter *et al.*, 1999 ; Ringwood *et al.*, 2002).

Les études réalisées *in vitro* montrent que l'activité de phagocytose des hémocytes augmente avec la température d'incubation (20-25°C) que ce soit pour les palourdes *R. philippinarum* (Cima *et al.*, 2000 ; Allam *et al.*, 2002) ou encore les huîtres *C. virginica* (Alvarez *et al.*, 1989). Cette augmentation de l'activité de phagocytose a aussi été observée par Chu et La Peyre (1993) sur des animaux conditionnés à différentes températures, mais aussi par Genter *et al.* (1999) avec une capacité des hémocytes à éliminer les bactéries *Vibrio parahaemolyticus* et *Listeria monocytogenes* plus élevée en été (Killing index). L'agrégation des hémocytes est aussi augmentée avec la température d'incubation (Auffret & Oubella, 1997). Par contre, si les concentrations hématologiques ne semblent pas être influencées par la température de l'eau en milieu contrôlé, plusieurs auteurs ont mis en évidence une variation saisonnière de la concentration hématologique chez *C. virginica* et *M. galloprovincialis* (Santarém *et al.*, 1994 ; Chu *et al.*, 1995 ; Fisher *et al.*, 1996 ; Ashton-Alcox & Ford, 1998 ; Carballal *et al.*, 1998). Ainsi, Santarém *et al.* (1994) et Fisher *et al.* (1996) ont observé une diminution des concentrations hématologiques pendant la période estivale caractérisée par des températures supérieures à 25°C. A l'inverse, Chu *et al.* (1995) ou encore Carballal *et al.* (1998) reportent des concentrations plus élevées en été pour ces deux espèces. Les contradictions entre les études peuvent être dues à des différences physiologiques entre les animaux ou l'effet d'autres facteurs pouvant affecter ce paramètre. Par ailleurs d'autres paramètres hématologiques présentent aussi des variations saisonnières. Ainsi, chez *C. virginica*, la production de ROS est moins élevée en été (Fisher *et al.*, 1996), la capacité des hémocytes à adhérer et prendre une forme améboïde nécessite plus de temps en été (Fisher *et al.*, 1989) ou encore la stabilité lysosomale est meilleure en été (Ringwood *et al.*, 2002).

IV.2. Présence d'un pathogène

L'étude des pathologies affectant des populations de mollusques a permis depuis plusieurs années d'isoler et d'identifier les agents pathogènes tels que *Perkinsus marinus* et *Haplosporidium nelsoni* chez l'huître *C. virginica*, *Marteilia refringens* et *Bonamia ostrea* chez l'huître plate *O. edulis*, *Vibrio tapetis* chez la palourde *R. philippinarum*, *Perkinsus atlanticus* chez la palourde Européenne.

Les études de suivi des paramètres hémycytaires post-infection montrent une augmentation de la concentration en hémycytes circulants (Chu & La Peyre, 1993 ; Ford *et al.*, 1993a et b ; Oubella *et al.*, 1993 ; Anderson *et al.*, 1995 ; Allam *et al.*, 2000 ; Allam *et al.*, 2001 ; Cochenec-Laureau *et al.*, 2003). Oubella *et al.* (1993) et Cochenec-Laureau *et al.* (2003) interprètent l'augmentation du nombre de cellules circulantes comme une mobilisation des hémycytes vers les tissus. En effet, Cochenec-Laureau *et al.* (2003) montrent que l'augmentation du nombre d'hémycytes dans les tissus de *O. edulis* se fait en relation avec le développement de l'infection à *Bonamia ostrea*, suggérant l'existence d'un processus de recrutement des hémycytes du système circulatoire vers le site d'infection.

Les fonctions des hémycytes sont aussi affectées lors d'infection. Ainsi, des palourdes *R. philippinarum* infectées par *V. tapetis* présentent une plus faible activité de phagocytose par rapport à des palourdes non infectées (Allam *et al.*, 2001). De la même façon, Ordás *et al.* (1999) montrent une inhibition de la capacité de phagocytose des hémycytes de palourde *R. decussatus* et de moule *M. galloprovincialis* quand ceux-ci sont traités avec les produits de sécrétion de *Perkinus atlanticus*. A l'inverse, la production de ROS en réponse à une stimulation au zymosan est plus forte pour des hémycytes d'huîtres *C. virginica* moyennement à fortement infectées par *P. marinus* (Anderson *et al.*, 1995). Mais, *in vitro*, les cellules de *P. marinus* réduisent la production de ROS par les hémycytes préalablement stimulés au zymosan (Volety & Chu, 1995). Par ailleurs, *P. marinus* seul n'induit pas la production de ROS par les hémycytes d'huîtres *C. gigas* ou *C. virginica* quand il est phagocyté (La Peyre *et al.*, 1995) ce qui laisse penser que l'élimination du parasite ne passe pas par le système de la NADPH oxydase ou que le parasite a un mécanisme d'évasion lui permettant de contrer les espèces actives de l'oxygène produites en vue de son élimination.

IV.3. Alimentation

Comme nous l'avons déjà précisé dans la première partie de cette revue bibliographique, l'influence de l'alimentation sur les paramètres hématologiques a été très peu étudiée. Il s'agit souvent de comparaisons entre des animaux nourris et des animaux mis à jeun (Oubella *et al.*, 1993 ; Ashton-Alcox & Ford, 1998 ; Hégaret *et al.*, 2004). Ainsi, Oubella *et al.* (1993) ont montré une diminution de 65% de la concentration hématologique des palourdes *R. philippinarum* après une semaine de mise à jeun. Par contre, Ashton-Alcox & Ford (1998) n'ont pas relevé d'effet de la mise à jeun sur ce même paramètre chez l'huître *C. virginica*.

Dans leur étude, Hégaret *et al.* (2004) ne présentent pas les données de concentrations hématologiques mais soulignent que les hématocytes des animaux maintenus à jeun pendant 5 semaines ont tendance à avoir une activité de phagocytose plus faible et une production de ROS plus élevée par rapport à ceux nourris.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Une grande partie du matériel biologique utilisé au cours de ce travail a été produit dans le cadre du programme de recherche MOREST (MORTalités ESTivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*). Les huîtres proviennent d'une sélection génétique basée sur le critère de résistance des huîtres aux mortalités estivales. Sur la base de cette sélection, deux types de familles ont pu être distinguées : les huîtres présentant un faible taux de mortalité et donc considérées comme résistantes « R », et des huîtres qui se sont révélées sensibles aux mortalités et dites sensibles « S ».

Comme suit, le détail de l'origine du matériel biologique utilisé dans les différentes expérimentations :

I. Dans les expérimentations réalisées pour tester l'effet de la quantité de nourriture sur les réponses physiologiques des huîtres (Expérimentations dites « quantitatives »)

1^{ère} expérience (**GIGAREPRO 1**, 2002) : Huîtres âgées de 1 an issues du plan de croisement mené en 2001 par Lionel Dégremont à l'écloserie expérimentale IFREMER de La Tremblade (Charentes-Maritime, France) dans le cadre de son doctorat (cf. Dégremont, 2003). Il s'agit d'une population d'huîtres à large base génétique constituée d'un mélange de 15 familles (pool G1 XS3) obtenues par des croisements bi-parentaux à partir de 30 géniteurs (6 mâles et 24 femelles) choisis au hasard, collectés dans le bassin ostréicole de Marennes-Oléron en Février 2001. Le naissain a été pré-grossi de façon intensive à la nurserie de la station IFREMER de Bouin (Vendée, France) puis transféré dans les claires ostréicoles de la station IFREMER de La Tremblade au cours de la période hivernale 2001-2002. En février 2002, un pool constitué d'huîtres alors âgées de 12 mois a été transporté à la station expérimentale IFREMER d'Argenton (Finistère, France) pour le conditionnement. Par ailleurs, deux autres pools d'huîtres identiques ont été placés sur deux sites ostréicoles différents : l'un à Marennes-Oléron et l'autre en Baie des Veys (expérimentation **BABE**).

2^{de} expérience (**GIGAREPRO 2**, 2003) : Huîtres âgées de 1 an issues du plan de croisement mené en Février 2002 pour l'obtention de la 2^{de} génération d'huîtres sélectionnées « R » et « S » (Sélection divergente). Les différentes familles « R » et « S » ont été conservées à la SATMAR (Société Atlantique de MARiculture) en Normandie au cours de l'hiver 2002-

2003. Différentes familles ont été mélangées pour former un pool d'huîtres de phénotype « R » (3 familles « R ») et un pool d'huîtres de phénotype « S » (2 familles « S ») avant d'être ramenées à la Station expérimentale IFREMER d'Argenton fin Mars 2003.

II. Dans les expérimentations réalisées pour tester l'effet de la qualité c'est-à-dire l'influence de la composition en acides gras poly-insaturés de la nourriture sur les réponses physiologiques des huîtres (Expérimentations dites « qualitatives »)

1^{ère} expérience (**ALGUES**, 2001) : Huîtres âgées de 18 mois provenant de la SATMAR (Finistère). Ces huîtres sont issues d'une ponte ayant eu lieu au printemps 1999, puis ont été pré-grossies en Irlande pour être mises en eau à Brouënnou (Aber Wrach, Nord Finistère) en Février 2000. Les palourdes ont été récoltées dans les claires de Marennes. Les huîtres ainsi que les palourdes ont été conditionnées au centre IFREMER de Brest.

2^{de} expérience (**EPA**, 2003) : Huîtres âgées de 1 an élevées sur la côte Ouest des Etats-Unis et conditionnées au Hatfield Marine Science Center (Newport, Oregon, USA) de Février à Avril 2003. Ces huîtres sont issues d'un programme de sélection génétique de *C. gigas* (the USDA Molluscan broodstock Program) réalisé à la Oregon State University et initié en 1996.

3^{ème} expérience (**AA**, 2004) : Huîtres âgées de 1 an issues du plan de croisement mené en Février 2003 pour l'obtention des différentes familles « R » et « S » de 3^{ème} génération, conservées sur le site ostréicole de La Trinité/mer au cours de la période hivernale 2003-2004. Les huîtres de différentes familles « R » et « S » ont été mélangées pour former un pool homogène avant d'être ramenées à la Station expérimentale IFREMER d'Argenton en Avril 2004.

II. CONDITIONNEMENT DES HUITRES

II.1. Expérimentations dites « quantitatives »

La population d'huîtres à large base génétique ainsi que les pools d'huîtres « R » et « S » ont été conditionnés dans des grands bacs de 700l remplis d'eau de mer filtrée à 20 µm. Les huîtres ont été nourries avec un mélange constitué de trois à quatre algues différentes. En 2002, le mélange algal était constitué des algues : T-Iso (*Isochrysis aff. galbana*, clone

Tahiti), *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chui* apportées en quantité de biomasse équivalente (1/3,1/3,1/3). Cependant face à des difficultés de culture de l'algue *C. calcitrans* à certaines périodes de l'expérimentation, l'algue *Skeletonema costatum* a été introduite dans le mélange pour pallier à la déficience en diatomées du régime nutritif. En 2003, les quatre algues citées ci-dessus ont été utilisées dans la constitution du régime algal et apportées en quantité de biomasse équivalente (1/4,1/4,1/4,1/4). Le mélange algal a été amené en continu à l'aide d'une pompe péristaltique sur 24h. Dans chacune des expérimentations, la moitié des huîtres a reçu une ration alimentaire de 4% de poids sec d'algues/poids sec d'huîtres, l'autre moitié a reçu une ration de 12%. L'expérimentation menée en 2002 s'est déroulée sur un cycle annuel : de Février 2002 à Février 2003. Celle de 2003 a été conduite autour de la période estivale c'est-à-dire d'Avril à Septembre 2003. Pour les deux expérimentations, le cycle moyen et saisonnier de température et de photopériode de Marennes-Oléron a été appliqué en prenant les valeurs moyennes mesurées sur les 10 dernières années.

II.2. Expérimentations dites « qualitatives »

II.2.a. Expérimentation ALGUES

Les huîtres ainsi que les palourdes ont été conditionnées pendant 8 semaines dans des grands bacs d'élevage de 700l d'eau de mer équipés d'un air-lift, et nourries avec des régimes mono-algaux. Trois algues différentes ont été testées : T-*Iso* (*Isochrysis aff. galbana* clone Tahiti), *Tetraselmis suecica* et *Chaetoceros calcitrans*. Ces algues ont été choisies pour leurs compositions spécifiques en acides gras essentiels. Chaque algue a été apportée à raison de 6% de poids sec d'algues/poids sec d'huîtres par goutte à goutte sur une durée de 24h.

II.2.b. Expérimentation EPA

Dans le cadre de l'étude de l'impact de l'acide eicosapentaénoïque (**EPA, 20:5(n-3)**), les huîtres ont été conditionnées pendant 4 semaines dans des cylindres de 60l d'eau de mer, nourries avec l'algue T-*Iso* (5% de poids sec d'algues/poids sec d'huîtres) supplémentée ou non avec une émulsion lipidique riche en 20:5(n-3). L'algue T-*Iso* a été sélectionnée pour ce conditionnement parce qu'elle se caractérise par une déficience en 20:5(n-3) et en 20:4(n-6). Différentes doses d'émulsion ont été testées : 0%, 1%, 10% et 50% d'émulsion lipidique par poids sec de la ration d'algues. L'émulsion a été préparée à partir d'un mélange de triglycérides (EPAX 4510 TG, Polaris, Pleuven, France) enrichi en 20:5(n-3)(45%) et en

22:6(n-3)(9%), selon la technique décrite dans Pernet *et al.* (2004), excepté que 5% de Span 40 et 0.02% d'ethoxiquin (antioxydants) ont été ajoutés par Chris Langdon alors que le rouge soudan n'a pas été additionné aux triglycérides. L'algue et l'émulsion ont été apportées en continu sur une période de 24h à l'aide d'une pompe péristaltique pendant 4 semaines.

II.2.c. Expérimentation AA

L'expérience menée pour tester l'impact de l'acide arachidonique (**AA, 20:4(n-6)**) sur les réponses physiologiques des huîtres a été réalisée dans des bacs de 50l équipés d'une pompe permettant l'oxygénation du bac d'élevage en circuit fermé. Les huîtres ont été nourries pendant 4 semaines avec l'algue *T-Iso* à raison de 4% de poids sec d'algues/poids sec d'huîtres à l'aide d'une pompe péristaltique sur une durée de 10h.j⁻¹. L'acide arachidonique 20:4(n-6) a été dissous dans de l'éthanol absolu comme décrit dans Segueineau *et al.* (en préparation) et distribué manuellement deux fois par jour dans les bacs d'élevage (1/2 dose matin et soir). Deux concentrations de 20:4(n-6) ont été testées : 0.25µg/ml et 0.41µg/ml (d'eau de mer). Par ailleurs, un lot d'huîtres témoin a été nourri avec l'algue *T-Iso* supplémenté par un volume d'éthanol similaire à celui apporté dans les lots supplémentés avec le 20:4(n-6). A chaque prélèvement, le volume en eau de mer des bacs a été ajusté pour maintenir la quantité en 20:4(n-6) disponible par huître identique tout au long de l'expérimentation. Un témoin sans algues a aussi été réalisé en parallèle.

Table 4 : Récapitulatif des plans d'expérimentation de cette thèse.

Année	Matériel	F.	M.	A.	M.	J.	J.	A.	S.	O.	N.	D.	J.	F
2001	Tout-venant		ALGUES											
2002	Pool mixte : R & S		GIGAREPRO 1											
			BABA											
2003	Huîtres (USA)		EPA											
	Pool R + Pool S		GIGAREPRO 2											
2004	Pool mixte : R & S			AA										

III. PLAN D'ECHANTILLONNAGE

Au cours des expérimentations dites « quantitatives », un suivi mensuel de paramètres physiologiques (énergétiques et hémostatiques) des huîtres a été réalisé. Pour les expérimentations dites « qualitatives » de durée plus courte (4 à 8 semaines), le suivi a été effectué tous les quinze jours. Pour les animaux placés *in situ*, le suivi des paramètres hémostatiques et énergétiques a été réalisé en Juin, Juillet, Août et Octobre 2002 de façon similaire à ce qui a été fait dans le cadre de l'expérimentation GIGAREPRO 1.

En général pour chaque condition nutritive, trois pools de 5 individus sont constitués pour les analyses des paramètres énergétiques (composition biochimique, charge énergétique adénylique). Les analyses des paramètres hémostatiques sont réalisées sur trois ou quatre pools d'hémolymphe issus de 5 à 6 individus. Par ailleurs, 3 pools supplémentaires d'hémolymphe de 4 ml ont été réalisés dans le cadre de l'expérimentation ALGUES en vue des analyses de la composition lipidique des hémocytes. Les branchies sont prélevées sur les animaux ayant servi aux prélèvements d'hémolymphe en constituant 3 pools de 5 branchies par traitement (sauf pour les suivis *in situ*) car les branchies s'avèrent refléter la composition lipidique des hémocytes qui y circulent en grand nombre.

IV. PARAMETRES ENERGETIQUES

IV.1. Indice de condition

A chaque prélèvement réalisé pour les analyses biochimiques et de charge énergétique adénylique (CEA), les mesures de biométrie des huîtres (poids total, poids de chair, poids de coquille) sont réalisées sur 15 animaux afin de pouvoir calculer ultérieurement l'indice de condition des animaux. Celui-ci est calculé d'après Walne & Mann (1975) ou Lucas & Beninger (1985) selon les expérimentations.

IV.2. Préparation des échantillons

Après la prise des mesures de biométrie, la chair des huîtres est congelée en 3 pools de 5 individus dans l'azote liquide le plus rapidement possible. Pour l'expérience menée aux

Etats-unis, huit huîtres par condition sont congelées de façon individuelle à -80°C avant d'être lyophilisées en vue de leur expédition en France.

IV.3. Broyage des échantillons

Les échantillons préalablement congelés dans l'azote liquide sont broyés à -196°C à l'aide d'un broyeur à bille de type Danguomeau. Les huîtres lyophilisées sont quant à elles broyées à l'aide d'un mortier maintenu dans de la glace (par lot de 8). 600 mg de poudre humide ou 100 mg de poudre lyophilisée sont re-suspendus dans 3 ml d'eau distillée puis aliquotés en vue des analyses biochimiques (lipides, protéines, glucides totaux). Les aliquotes sont conservés à -20°C jusqu'aux analyses. Le poids sec de chaque échantillon est obtenu par différence de poids après séchage à l'étuve à 80°C pendant 48h d'un aliquote de poudre ou après lyophilisation. Les analyses de la charge énergétique adénylique sont réalisées sur la poudre conservée dans l'azote liquide jusqu'au moment de l'extraction. Les mesures de CEA n'ont pu être réalisées sur les échantillons lyophilisés car pendant la lyophilisation, les nucléotides ATP et ADP se dégradent rapidement en AMP.

IV.4. Composition biochimique

Les lipides totaux sont estimés selon la méthode de Bligh & Dyer (1959) après extraction des lipides par un mélange de dichlorométhane/éthanol/eau. L'extrait lipidique est placé dans une coupelle en téflon pré-pesée, évaporé sous azote et les lipides totaux sont estimés par la différence de poids de la coupelle en téflon avant et après évaporation. Les dosages des glucides et des protéines sont réalisés selon les méthodes colorimétriques de Dubois *et al.* (1956) et Lowry *et al.* (1951), respectivement.

IV.5. Charge énergétique adénylique (CEA)

La charge énergétique adénylique est mesurée après la séparation des nucléotides en isocratique par Chromatographie Liquide de Haute Performance (HPLC) en phase inverse avec appariement d'ions (Moal *et al.*, 1989).

Pour analyser la CEA, les nucléotides sont extraits avec de l'acide Trichloracétique (TCA) à partir d'un aliquote de 200mg de poudre précédemment broyée et traitée selon Moal *et al.* (1989). Après neutralisation par un mélange trioctylamine/trifluoro-trichloro-éthane

(v:v, 1:5), les nucléotides sont analysés par HPLC en phase inverse avec appariement d'ions. L'appareillage utilisé consiste en une pompe LaChrom type L-7100 (Merck Hitachi), d'un injecteur HPLC Autosampler 460 (Uvikon), d'un spectrophotomètre UV-Visible Waters. La séparation s'effectue sur une colonne Hypersil C18 greffée de chaînes d'octadécylsilane (15cm x 4.6mm, contenant des particules sphériques de 3µm). Cette colonne est protégée par une pré-colonne Interchrom de 1 cm.

Les nucléotides sont séparés à l'aide d'une solution tampon à pH=6 constituée de NaH_2PO_4 contenant 5.4% de méthanol, et additionnée de tétra-butyl-ammonium hydroxyde (TBA). Ce dernier sert de molécule dite "d'appariement d'ions". La détection des nucléotides se fait dans l'U.V. à 254nm. Les quantités de nucléotides sont ensuite calculées par rapport à un mélange de standards analysés dans les mêmes conditions. Les chromatogrammes obtenus sont analysés avec le logiciel Kromasystem 2000. La charge énergétique adénylique est calculée selon la formule suivante : $(\text{ATP} + 0.5 \text{ ADP})/(\text{ATP}+\text{ADP}+\text{AMP})$.

Elle correspond donc à l'énergie disponible (ATP, ADP, AMP) au niveau des cellules d'un organisme vivant. Elle procure des informations sur la capacité d'un organisme à maintenir son niveau global d'énergie, mais aussi à assurer un équilibre entre les différents compartiments du métabolisme. Ainsi, à une CEA élevée correspond une inhibition des voies d'utilisation d'ATP tandis que les voies de synthèse ou stockage de composés sont stimulées. Une charge faible correspond à l'inverse.

V. ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS ET STEROLS

L'analyse de la composition en acides gras et stérols des branchies, des hémocytes ou encore des algues nécessite plusieurs étapes schématisées dans la Figure 13 et détaillées ci-après.

V.1. Prélèvements d'hémolymphe

L'hémolymphe des huîtres est prélevée dans le muscle adducteur. A cette fin, une brèche est réalisée à hauteur du muscle à l'aide d'une meule électrique la veille des prélèvements ou à la pince le jour même. L'hémolymphe est prélevée à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml montée avec une aiguille de 0,5x16 mm. La qualité de chaque échantillon est contrôlée sous microscope (objectif x10) afin d'éliminer tous les prélèvements contaminés par

du sperme, des ovocytes, des algues ou autres débris pouvant interférer avec les mesures immunologiques ou les analyses lipidiques. Chaque prélèvement est conservé de façon individuel dans un tube eppendorf maintenu dans de la glace.

V.2. Prélèvements des branchies

Les branchies sont récupérées sur les animaux ayant été prélevés pour les analyses des paramètres hématocytaires (10 ou 15). Après dissection, les branchies sont égouttées, rassemblées en 3 pools de 3 ou 5 branchies, congelées et conservées dans de l'azote liquide. Pour les animaux de l'expérimentation EPA des Etats-Unis, les branchies ont été congelées à -80°C en 3 pools de 5 et lyophilisées en vue de leur expédition en France.

V.3. Extractions lipidiques

V.3.a. Sur les hémocytes

Trois pools de 4 ml d'hémolymphe ont été réalisés pour l'expérimentation ALGUES. Cette hémolymphe est filtrée à $60\mu\text{m}$ avant d'être centrifugée à $1500\text{ tour}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 10 minutes, à 4°C . Une fois le surnageant éliminé, 3 ml d'une solution de chloroforme/méthanol (2:1, v:v). sont ajoutés au culot d'hémocytes. Les échantillons sont ensuite conservés sous azote à -20°C .

V.3.b. Sur les branchies congelées

Les pools de branchies congelées sont broyés à -196°C à l'aide d'un broyeur à bille de type Danguomeau. Un aliquote homogène du broyat est pesé (300 mg), mis dans un tube contenant 6 ml d'une solution de chloroforme/méthanol (2:1, v:v). Les échantillons sont ensuite passés à l'ultraturax (broyeur) pour compléter l'extraction et conservés sous azote à -20°C .

V.3.c. Sur les branchies lyophilisées

Les pools de branchies lyophilisées sont broyés à l'aide d'un mortier maintenu dans de la glace. Une fois broyé, un aliquote est pesé (30mg) et re-hydraté pendant 30 minutes avec de l'eau distillée. Puis deux extractions lipidiques successives sont réalisées à l'aide de 3 ml de deux solutions de chloroforme/méthanol (2:1 puis 1:2, v:v).

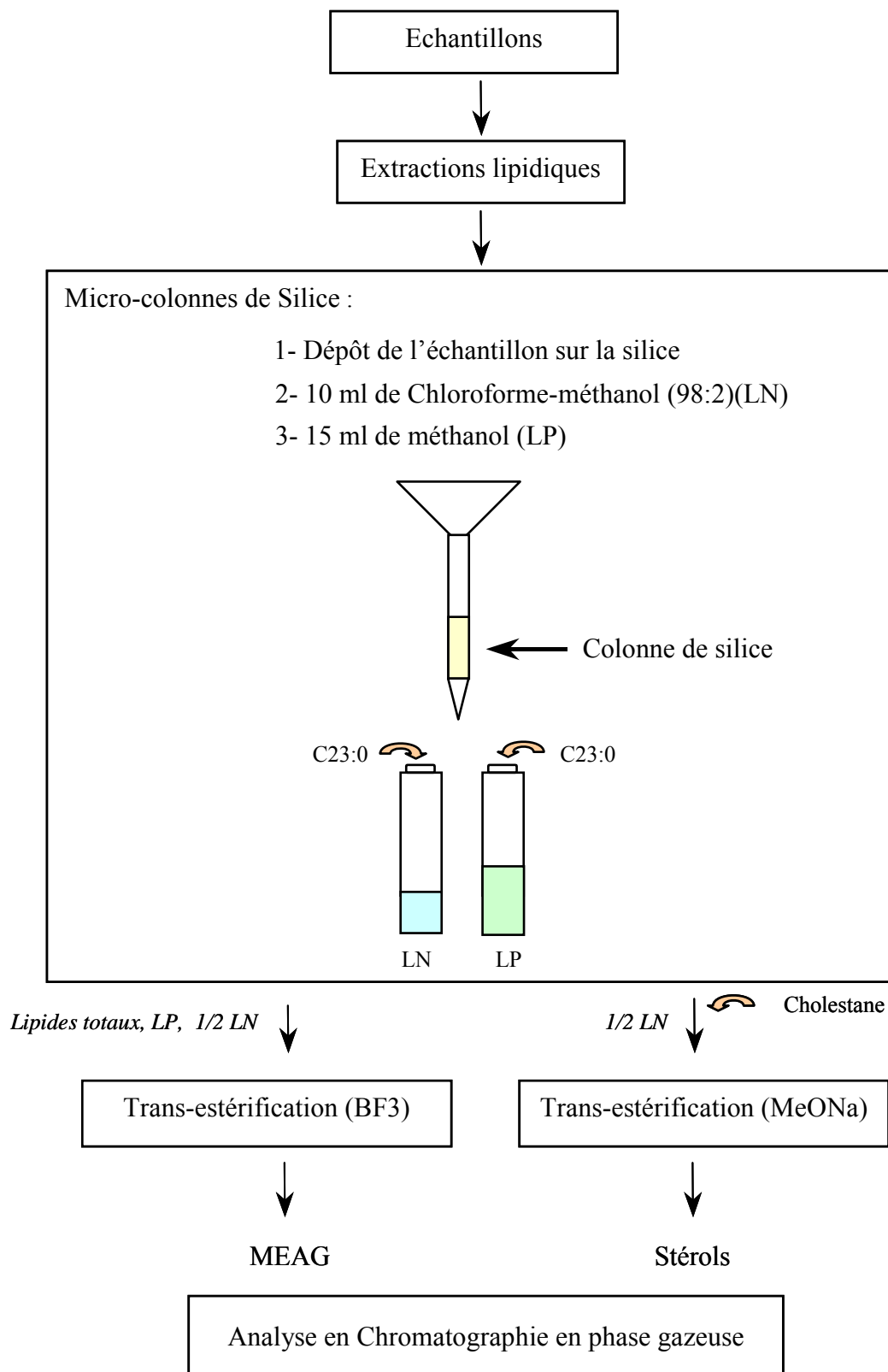


Figure 13 : Représentation schématique de l'ensemble de la séquence d'analyses des lipides. (LN : Lipides neutres, LP : Lipides polaires)

Les extraits lipidiques récupérés sont ensuite réunis, évaporés à sec sous azote et concentré dans 1 ml d'une solution de chloroforme/méthanol (2:1, v:v).

V.3.d. Sur les algues

Un volume de 5 à 15 ml de culture de micro-algues utilisées dans le cadre des expérimentations ALGUES et EPA est filtré sur des filtres en fibre de verre (GF/F) Whatman préalablement brûlés à 450°C. Le filtre est plongé dans un tube contenant 6 ml d'un mélange de chloroforme-méthanol (2:1, v:v) et stocké sous azote à -20°C.

V.3.e. Sur du broyat d'huître

Un aliquote de poudre congelée (id. à celle utilisée pour les analyses de CEA) est pesé (300 mg), mis dans un tube contenant 6 ml d'une solution de chloroforme/méthanol (2:1, v:v). Les échantillons sont ensuite conservés sous azote à -20°C.

V.4. Séparation des lipides neutres et polaires

La séparation des fractions lipidiques se réalise sur une micro-colonne de silice selon la méthode décrite par Marty *et al.* (1992). Cette séparation est basée sur l'affinité des composés lipidiques entre la colonne de silice, très polaire et l'éluant plus apolaire. Les lipides neutres (triglycérides, stérols libres et esters de stérols), peu retenus par la colonne de silice sont élués par 10 ml de chloroforme-méthanol (98:2, v:v). Les lipides polaires (glycolipides et phospholipides) sont quant à eux récupérés par 15 ml de méthanol. Les fractions sont collectées dans des tubes contenant 2,3 µg de C23:0 (standard interne). Puis, elles sont évaporées à sec sous azote avant d'être reprises avec 2 ml de chloroforme-méthanol (2:1, v:v). Pour les algues, cette étape de séparation des lipides neutres et polaires n'est pas réalisée, l'analyse de la composition en acides gras se fait sur la fraction totale.

V.5. Trans-estérification des composés lipidiques

La moitié de la fraction des lipides neutres (1 ml) et la totalité des deux autres fractions lipidiques (lipides polaires et totaux) sont trans-estérifiées par adjonction de BF₃ (trifluorure de bore, à 12% dans le méthanol, w:w), pendant 10 min à 95°C selon Metcalfe & Schmitz (1961). Le BF₃ sert de catalyseur de la réaction alors que le méthanol sert de donneur des groupements méthyles. Cette trans-estérification permet l'obtention d'esters

méthyliques d'acides gras (MEAG) qui sont ensuite extraits à l'hexane pour être injectés en chromatographie en phase gazeuse.

L'autre moitié des lipides neutres est trans-estérifiée par adjonction de méthoxide de sodium (MeONa), pendant 90 min à température ambiante selon Elder *et al.* (1992). Avant la trans-estérification, une quantité connue de Cholestane est ajoutée comme standard interne. Les stérols sont ensuite extraits à l'hexane avant d'être injectés en chromatographie en phase gazeuse.

V.6. Analyse des MEAG et des stérols par chromatographie en phase gazeuse

V.6.a. Analyses des MEAG par CG

Les MEAG sont analysés sur un chromatographe en phase gazeuse (CPG) Agilent 6890 équipé d'un injecteur automatique on-colonne et d'un détecteur FID. Les MEAG sont séparés sur une colonne capillaire DBWAX contenant la phase stationnaire (30m x 0,25 mm ; 0,25 μm epf) à l'aide d'hydrogène pour gaz vecteur (ou phase mobile). La colonne est connectée à une pré-colonne désactivée de 2.5m de longueur et 0.43mm de diamètre interne. Les MEAG sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec celui de standards (Figure 14). Les concentrations sont ensuite calculées par rapport à l'étalon interne (C23:0) en fonction de la surface des pics correspondants. Les données sont analysées sur un ordinateur équipé du logiciel HP ChemStation.

V.6.b. Analyses des stérols par CG

Les stérols sont analysés sur un chromatographe en phase gazeuse (CPG) Chrompak 9001 équipé d'un injecteur automatique on-colonne et d'un détecteur FID. Les stérols sont séparés sur une colonne capillaire Restek Rtx65 contenant la phase stationnaire (15 m x 0,25 mm ; 0,25 μm epf) à l'aide d'hydrogène pour gaz vecteur (ou phase mobile). Les stérols sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec celui de standards. Les concentrations sont ensuite calculées par rapport à l'étalon interne (cholestane) en fonction de la surface des pics correspondants. Les données sont analysées sur un ordinateur équipé du logiciel Chrompak.

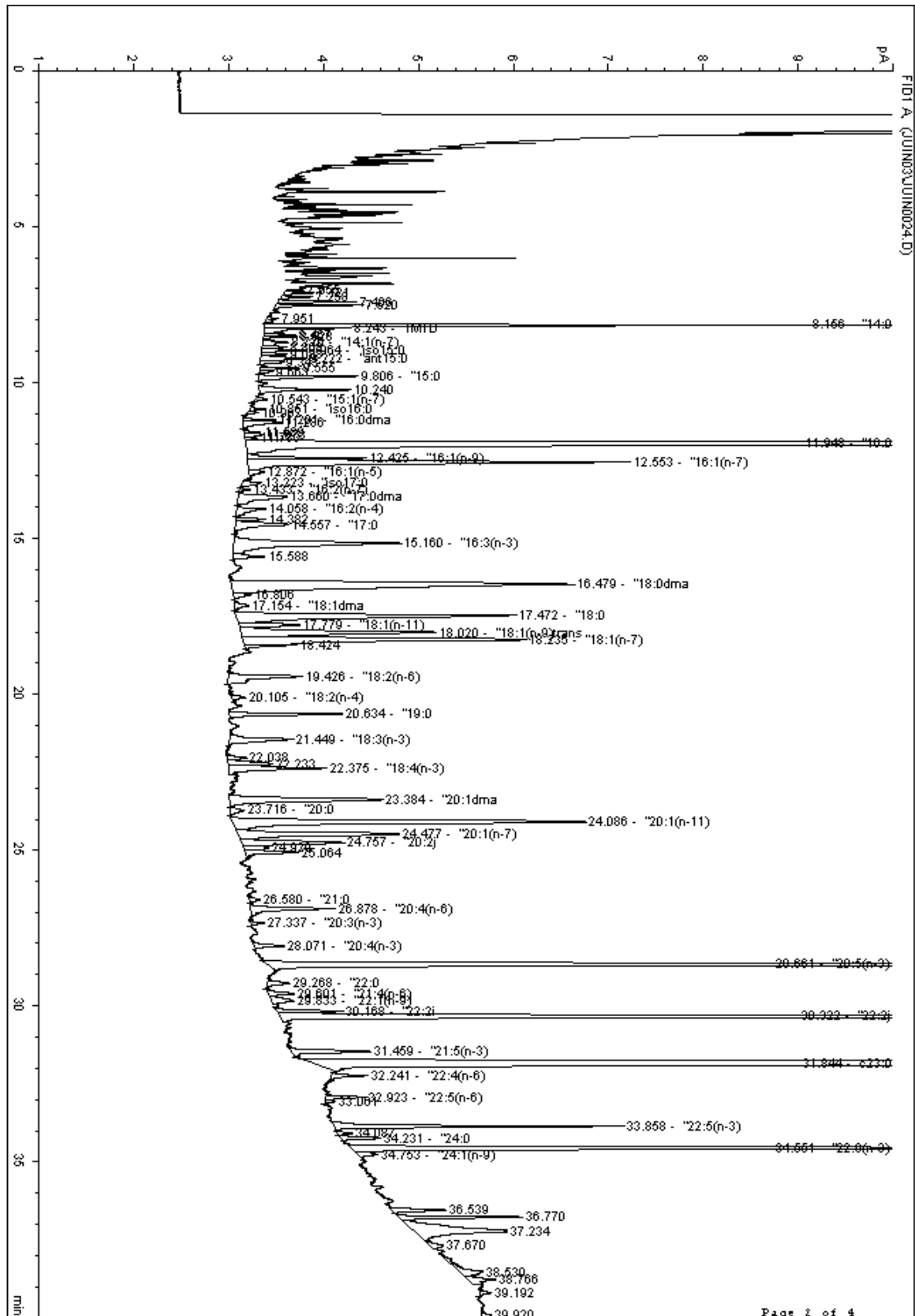


Figure 14 : Exemple de chromatographe de la séparation d'esters méthyliques d'acides gras en chromatographie en phase gazeuse.

VI. ANALYSES DES PARAMETRES HEMOCYTAIRES

Les analyses des paramètres hématocytaires réalisées dans le cadre de ce travail ont été effectuées au Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin (UMR-CNRS 6539, UBO) à l'aide d'un cytomètre en flux FACScalibur (Becton-Dickinson) relié à un ordinateur équipé du logiciel CellQuest. Dans le cadre de la collaboration Franco-Américaine avec Chris Langdon (Coastal Oregon Marine Experimental Station) et Fu-Lin Chu (Virginia Institute of Marine Sciences), un cytomètre en flux de type EPIC ALTRA (Coulter) a été utilisé.

VI.1. Généralités sur la Cytométrie en Flux

La cytométrie en flux est une technique rapide et simple, de plus en plus utilisée, qui permet d'étudier les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de cellules entraînées dans un flux liquide à une vitesse de l'ordre de 100 à 1000 événements par seconde.

L'échantillon à analyser est aspiré par une aiguille de précision qui entraîne les cellules -les hémocytes- grâce à un liquide porteur ou liquide de gaine vers une chambre à quartz. Les cellules sont alors interceptées par un faisceau laser de type argon de longueur d'onde d'émission fixée à 488 nm (Figure 15). Les signaux de diffraction des rayons du laser et de fluorescence sont enregistrés pour chaque cellule. Le signal de diffraction aux petits angles (inférieur à 10°) est transformé en signal électrique par une photodiode (FSC : Forward Scatter height). L'intensité de ce signal est liée à la taille des cellules analysées : plus la cellule est petite, plus la diffraction est faible. Le signal de diffraction aux grands angles ainsi que les signaux de fluorescences sont collectés par des photomultiplicateurs. L'intensité de la lumière diffractée à 90° est recueillie sur le photomultiplicateur SSC (Size Scatter height) pour le FACScalibur ou PMT1 (PhotoMulTiplicateur 1) pour l'EPIC Altra ; elle est liée à la structure interne des cellules (granularité, organelles, rapport nucléo-cytoplasmique, etc.).

Par ailleurs, sous l'effet de l'excitation du laser, les cellules peuvent émettre un signal de fluorescence si elles sont naturellement autofluorescentes (présence de pigments photosynthétiques par exemple) ou si elles ont été marquées par un ou plusieurs fluorochromes artificiels tels l'iodure de propidium (IP), le SYBR Green, la 2,7-dichlorofluorescéine (DCFH) ou encore l'utilisation de billes de latex fluorescentes.

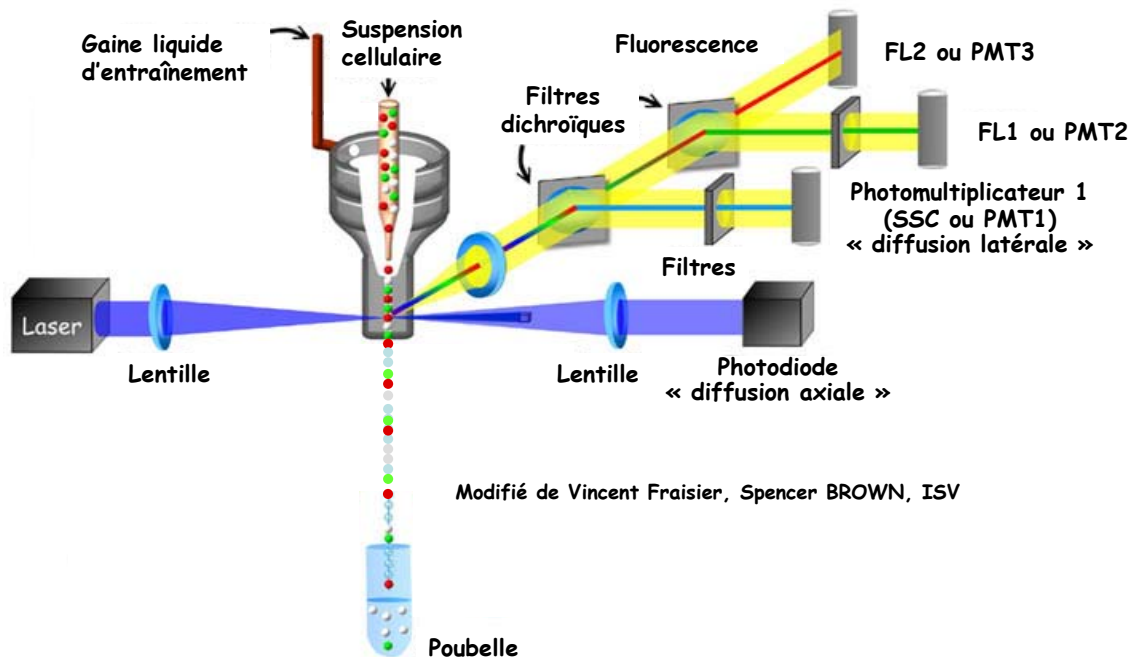


Figure 15 : Représentation d'un cytomètre en flux.

L'intensité de fluorescence est alors proportionnelle au contenu cellulaire en molécules ou billes en état de fluorescer.

Le FACScalibur et l'EPIC Altra sont équipés de trois photomultiplicateurs qui leur permettent de recueillir des fluorescences émises dans trois gammes de longueur d'onde :

- La fluorescence verte ($515 \text{ nm} < \lambda > 530 \text{ nm}$) détectée sur le FL1 ou PMT2
- La fluorescence orange ($565 \text{ nm} < \lambda > 592 \text{ nm}$) détectée sur le FL2 ou PMT3
- La fluorescence rouge ($\lambda > 620 \text{ nm}$) détectée sur le FL3 ou PMT4

L'ensemble des signaux récoltés par les photomultiplicateurs sur 30 secondes pour chaque échantillon sont ensuite transformés en signaux électriques, numérisés et stockés sur un ordinateur couplé au cytomètre en flux. Les données sont ensuite traitées à l'aide du logiciel WinMDi 2.8 qui permet la présentation des résultats soit sous forme de cytogrammes (un paramètre en fonction d'un autre), soit sous forme d'histogrammes (un paramètre en fonction du nombre d'événements).

VI.2. Prélèvement de l'hémolymphe

L'hémolymphe des huîtres est prélevée dans le muscle adducteur comme décrit dans le paragraphe V.1. Chaque prélèvement est conservé de façon individuelle dans un tube eppendorf maintenu dans de la glace jusqu'aux analyses immunologiques. Trois pools de 5 à 6 échantillons d'hémolymphe sont constitués pour réaliser les analyses décrites ci-dessous. De la préparation des pools d'hémolymphe jusqu'au début de l'incubation, les tubes sont constamment maintenus dans de la glace.

VI.3. Comptage hémocytaire

La concentration hémocytaire de chaque échantillon d'hémolymphe est déterminée après fixation des cellules avec une solution de formol (4%) et marquage au SYBR Green I. Ce fluorochrome est un intercalant des acides nucléiques à double brin (ADN ou ARN) qui pénètre dans les cellules vivantes ou fixées. La fluorescence du complexe SYBR Green I - acides nucléiques est détectée sur le photomultiplicateur FL1 ou PMT2. L'ensemble des cellules analysées sont représentées sur un cytogramme selon leur SCC (densité) et leur intensité de fluorescence (FL1) (Figure 16). La mise en place de fenêtres permet de délimiter des régions où se localise la population d'hémocytes marquée au SYBR Green I et permet d'obtenir rapidement la concentration hémocytaire totale de chaque échantillon et le pourcentage d'agrégats. La représentation graphique des données relatives aux cellules marquées au SYBR Green I selon leur FSC (taille) et leur SCC (densité) permet ensuite la distinction des différentes sous-populations d'hémocytes : granulocytes, hyalinocytes, et agranulocytes, et la détermination de leurs caractéristiques morphologiques et leurs concentrations (Figure 16).

Le logiciel WinMDi 2.8 permet l'obtention des données associées à chacune des régions établies.

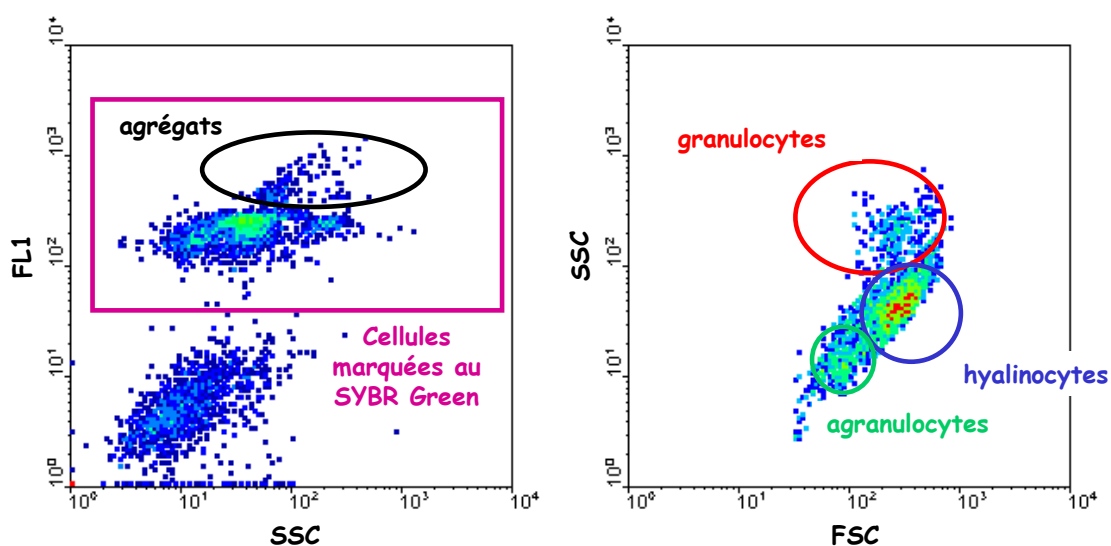


Figure 16 : Exemples de cytogrammes réalisés avec le logiciel WinMDi 2.8 pour le traitement des données acquises lors du comptage et du typage des hémocytes de chaque échantillon.

VI.4. Mortalité cellulaire

Les hémocytes fraîchement prélevés sont incubés avec de l'iodure de propidium, un intercalant des acides nucléiques à double brin (ADN ou ARN), en présence d'une solution anti-agrégante (Auffret & Oubella, 1995). L'iodure de propidium (IP) est utilisé comme indicateur de viabilité cellulaire car les membranes intactes, caractéristiques des cellules vivantes, sont imperméables à ce colorant. L'IP ne peut donc marquer que les cellules mortes ou endommagées et dont l'intégrité membranaire est altérée. Le complexe IP- acides nucléiques des cellules mortes ou endommagées émet une lumière rouge-orangée dont l'intensité de fluorescence peut être détectée sur le photomultiplicateur FL2 ou FL3 (ou encore PMT4) selon les réglages du cytomètre. Les cellules vivantes quant à elles présentent un signal très faible en FL2. Les données relatives aux cellules analysées sont représentées sous la forme d'un cytogramme selon leur SSC (taille) et leur intensité de fluorescence (FL2). La mise en place de deux régions l'une délimitant la population hémocytaire totale et l'autre les cellules marquées à l'IP (Figure 17) permet une estimation du taux de mortalité cellulaire dans nos échantillons. Celui-ci est exprimé par le ratio du nombre de cellules marquées à l'IP par rapport à l'ensemble des cellules comptées multiplié par 100.

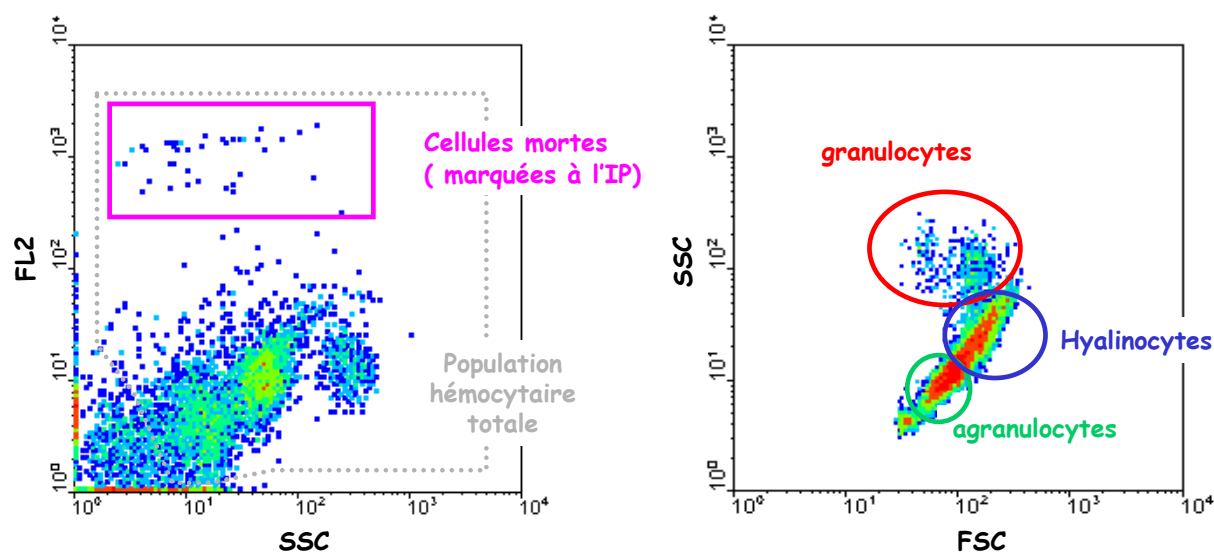


Figure 17 : Exemples de cytogrammes réalisés avec le logiciel WinMDi 2.8 pour le traitement des données acquises lors de l'analyse de la viabilité cellulaire et du typage des hémocytes de chaque échantillon.

Cependant, les résultats sont généralement exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire. La représentation graphique des données relatives aux cellules non fixées selon leur FSC (taille) vs leur SSC (densité) permet aussi la distinction des différentes sous-populations d'hémocytes : granulocytes, hyalinocytes, et agranulocytes, la détermination de leurs concentrations et l'acquisition de leurs caractéristiques morphologiques comme dans le cas du comptage (Figure 17).

VI.5. Double marquage

Dans le cadre du Stage de DEA de Marine Jegaden (DEA de Biologie et Productions Animales, 2002-2003), un protocole de double marquage des hémocytes a été mis au point. Ce protocole permet d'effectuer simultanément le comptage et la mesure de la viabilité cellulaire sur un échantillon d'hémolymphe fraîchement prélevé et dilué avec une solution anti-aggrégante. Les hémocytes sont incubés en présence des deux fluorochromes : le SYBR Green I qui pénètre dans les cellules vivantes et mortes et l'IP qui marque seulement les cellules mortes ou endommagées.

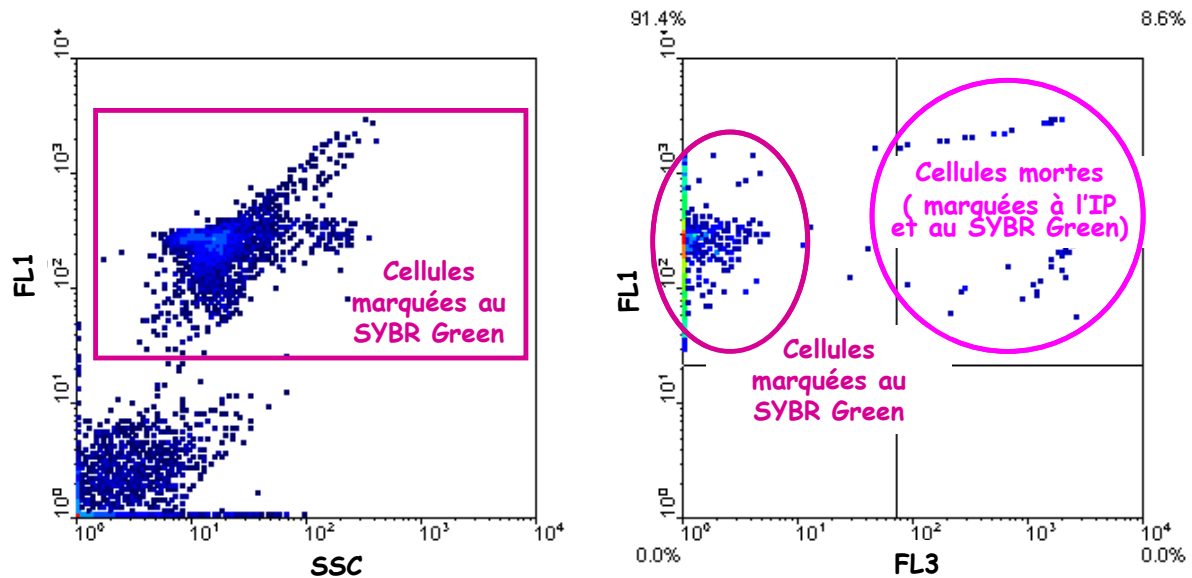


Figure 18 : Exemples de cytogrammes réalisés avec le logiciel WinMDi 2.8 pour le traitement des données acquises lors du double marquage pour l'estimation simultanée de la concentration hémocytaire et de la viabilité cellulaire.

Comme dans le cadre du comptage, la représentation graphique des données relatives aux cellules marquées au SYBR Green I et à l'IP selon leur SSC et leur fluorescence FL1 permet le dénombrement des hémocytes (vivants et morts) (Figure 18). La représentation des données selon la fluorescence des cellules (FL3 vs FL1) permet la distinction des cellules mortes marquées au SYBR Green I et à l'IP de celles simplement marquées au SYBR Green I. Ce cytogramme permet l'acquisition des nombres d'hémocytes morts et vivants, et ultérieurement le calcul du taux de mortalité cellulaire.

VI.6. Capacité de phagocytose

VI.6.a. En cytométrie en flux

L'analyse de la capacité de phagocytose des hémocytes en cytométrie en flux se fait grâce à l'utilisation de billes fluorescentes de latex de 2 μm de diamètre. Dans l'expérimentation ALGUES, les hémocytes sont mis en contact avec les billes fluorescentes pendant 60 minutes à 18°C, puis les échantillons sont fixés au formol 6% avant d'être passés au cytomètre en flux. Parallèlement, deux autres aliquotes d'hémolymphe ont subi une pré-incubation de 2 heures à deux températures différentes (18°C et 30°C) avant l'addition des billes fluorescentes afin d'évaluer l'influence de la température et du délai de la mesure sur le

maintien des capacités de phagocytose. Pour chaque condition d'incubation, un tube contrôle est aussi réalisé avec de la cytochalasine B (10 µg/ml) -un inhibiteur de la phagocytose.

L'activité de phagocytose « vraie » (hors adhésion) a donc été calculée par la différence entre le taux de phagocytose obtenu sans cytochalasine minoré de celui obtenu avec cytochalasine. Il a par ailleurs été démontré empiriquement que cette activité de phagocytose (hors adhésion) peut être estimée en ne considérant que les cellules ayant au moins trois billes ingérées sans inhibiteur ($p < 0.0001$, coefficient de corrélation = 0.84).

Aussi pour les autres expérimentations, les hémocytes sont mis en contact avec les billes fluorescentes pendant 1h à 2 heures à 18°C. A la fin de la période d'incubation, l'activité phagocytaire des hémocytes est bloquée soit en mettant le tube dans de la glace soit en fixant les hémocytes au formol 6%. Le tube témoin avec de la cytochalasine n'est plus réalisé et le pourcentage de phagocytose est estimé par le pourcentage d'hémocytes présentant une intensité de fluorescence supérieure ou égale à trois billes ingérées (Figure 19).

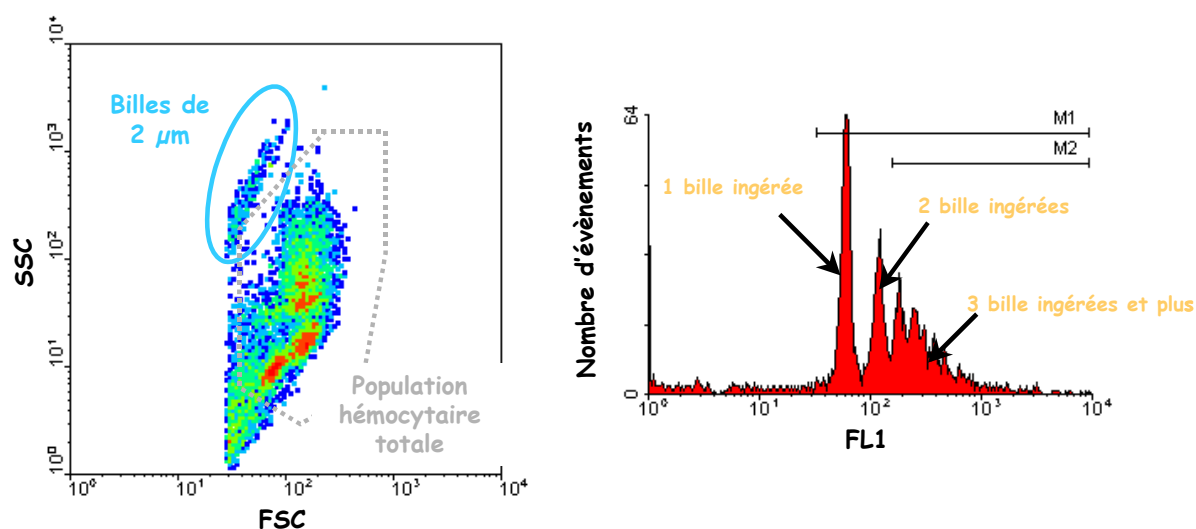


Figure 19 : Cytogramme et histogramme obtenu avec le logiciel WinMDi 2.8 permettant le calcul de l'activité de phagocytose à partir du nombre d'hémocyte ayant ingéré au moins une bille (M1) ou du nombre d'hémocytes ayant ingérés plus de deux billes (M2) par rapport au nombre d'hémocytes total.

VI.6.b. En microscopie

Cette méthodologie a été utilisée pour l'expérimentation EPA réalisée aux Etats-Unis. Un aliquote d'hémolymphe (20 μ l) est déposé sur une lame histologique. Les lames sont ensuite incubées pendant 30 minutes à température ambiante pour permettre l'adhésion des hémocytes. Une goutte d'une solution de particule de zymosan (1 mg/ml) est alors ajoutée à chaque échantillon d'hémolymphe. Puis, les lames sont laissées 1h à température ambiante avant d'être rincées avec de l'eau de mer stérile (EMS) et mises à sécher. Les hémocytes sont enfin fixés et colorés avec de l'hématoxyline de Harris et de l'éosine (Figure 20). L'indice de phagocytose correspond au nombre d'hémocytes ayant ingérés des particules de zymosan sur le nombre total d'hémocytes comptés.

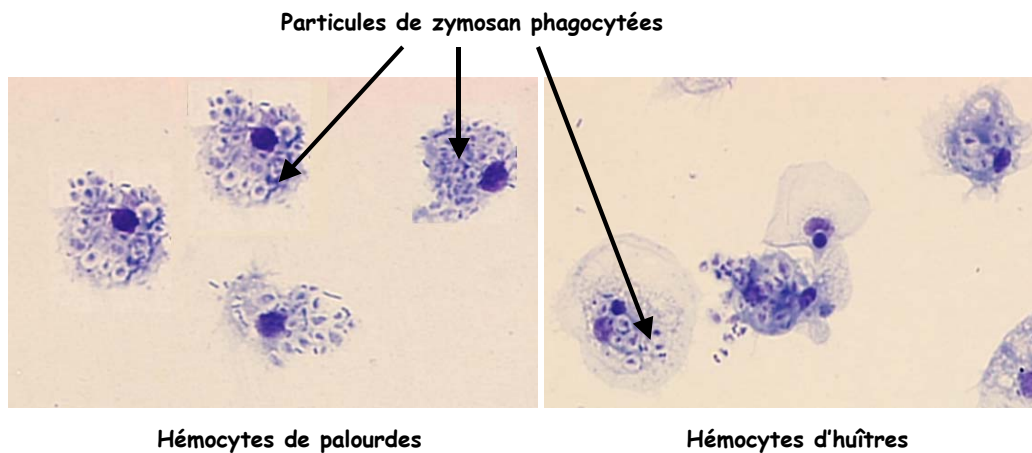


Figure 20 : Photos d'hémocytes de palourdes et d'huîtres après ingestion de particules de zymosan (Photos de Fu-Lin CHU).

VI.7. Production d'espèces actives de l'oxygène

La production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) est mesurée selon la méthode de Bass *et al.* (1983) et adaptée à l'huître par Lambert *et al.* (2003). Chaque échantillon d'hémolymphe est incubé avec du 2'-7'dichlorofluorescéine d'acétate (DCFH-DA). Après pénétration dans la cellule, le DCFH-DA est clivé en DCFH par des estérases (Figure 21). Puis le DCFH -une molécule non fluorescente- est oxydée en DCF -une molécule fluorescente- sous l'action de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) mais aussi d'autres molécules oxygénées (peroxynitrite, superoxide). Cette conversion est accélérée en présence de

peroxydases. Le DCF possède une fluorescence verte (détectée en FL1) dépendante de la quantité de molécules oxygénées et de la présence de peroxydase dans les hémocytes.

Au cours de ce travail, des mises au point techniques ont été réalisées pour mieux comprendre le processus de production de ROS par les hémocytes (Jegaden, 2003). Au final, le phorbol myristate acétate (PMA), le Zymosan et les produits extra-cellulaires (ECP) du *Vibrio aestuarianus* (Labreuche *et al.*, en révision) ont été utilisés comme stimulateurs de la production de ROS des hémocytes alors que le *Vibrio* pathogène sp S322 (Lambert & Nicolas, 1998 ; Lambert *et al.*, 2001) et le DiPhenylene Iodonium chloride (DPI) ont été utilisés en tant qu'inhibiteurs.

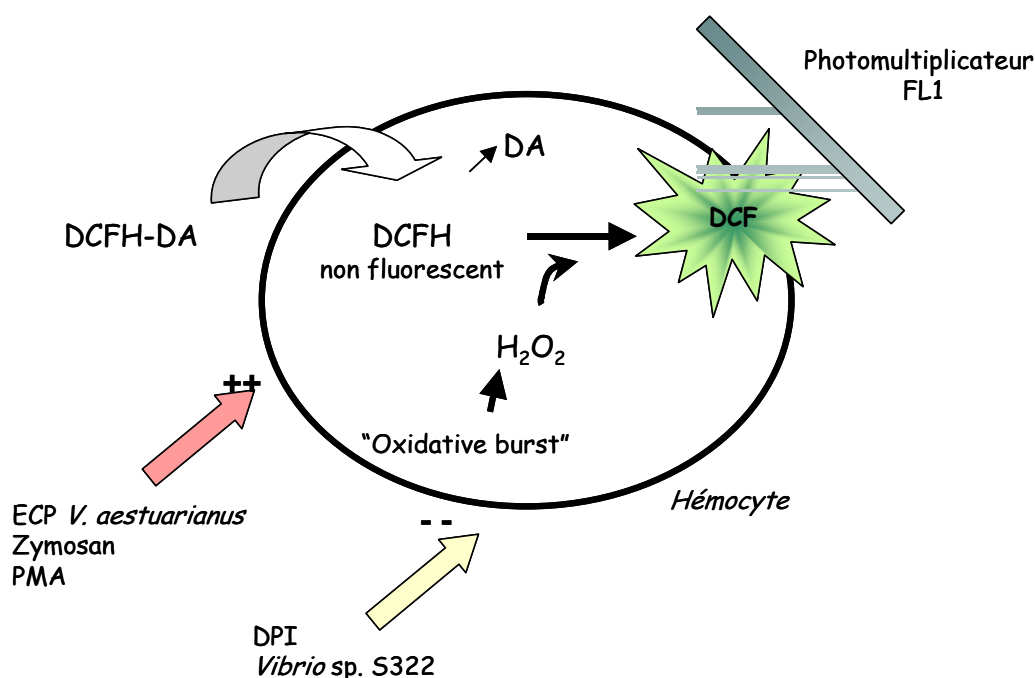


Figure 21 : Représentation de la mesure de la production des espèces actives de l'oxygène.

VI.7.a. Avec du PMA

Ce protocole a été utilisé dans le cadre de l'expérimentation ALGUES. Un aliquote d'hémolymphes fraîchement prélevée est diluée avec de l'EMS (1:1, v:v) et incubée avec du DCFH-DA pendant 20 min à 18°C ou 30°C en présence ou non de phorbol myristate acétate (PMA, concentration finale à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Puis, à la fin de la période d'incubation, l'intensité de fluorescence du DCF, proportionnelle à la quantité de H_2O_2 dans les hémocytes, est mesurée.

VI.7.b. Avec du zymosan et le *Vibrio sp. S322*

Dans ce protocole, chaque échantillon d'hémolymphe est réparti dans trois tubes différents. Dans les deux premiers tubes, l'aliquote d'hémolymphe est diluée avec de l'EMS (1:1, v:v), alors que dans le troisième tube une solution de *Vibrio sp. 322* est ajoutée à raison de 50 bactéries par hémocyte (Lambert *et al.*, 2003). Puis dans chaque tube, la solution de DCFH-DA est ajoutée. Les échantillons sont alors mis à incuber pendant 120 minutes à 18°C. A la fin du temps d'incubation, une première mesure de l'intensité de fluorescence des hémocytes est réalisée. Une solution de zymosan (20 particules par hémocyte) est ensuite ajoutée dans chacun des tubes avant que les échantillons soient de nouveau incubés à 18°C pendant 60 minutes. Au bout des 60 minutes, une dernière mesure de l'intensité de fluorescence est effectuée. Au cours des expérimentations GIGAREPRO 1, BABE et EPA, ce protocole a été utilisé. Toutefois, le *Vibrio sp. 322* n'a pu être utilisé dans l'expérimentation EPA.

VI.7.c. Avec les ECP de *V. aestuarianus*, le *Vibrio sp. S322* et le DPI

Chaque échantillon d'hémolymphe est cette fois-ci réparti dans cinq tubes différents et diluée avec de l'EMS (final 1:3, v:v). Puis, les trois premiers tubes sont incubés pendant 120 minutes avec soit 5 µM de DPI comme inhibiteur, soit 30 µg.ml⁻¹ d'ECP de *Vibrio aestuarianus* comme activateur, ou soit de l'EMS comme contrôle. Les deux derniers tubes sont incubés pendant 180 minutes avec une solution de *Vibrio sp. 322* à raison de 50 bactéries par hémocyte ou de l'EMS comme second contrôle. Toutes les incubations sont réalisées à 18°C en présence de DCFH-DA. A la fin de la période d'incubation, la réaction est bloquée dans de la glace et l'intensité de fluorescence de chacun des tubes est mesurée au cytomètre en flux. Ce protocole a été utilisé pour les expérimentations GIGAREPRO 2 et AA. Le *Vibrio sp. 322* n'a pas été utilisé pour l'expérimentation AA.

Table 5 : Récapitulatif des activateurs ou inhibiteurs utilisés dans chaque expérimentation.

	PMA	Zymosan	DPI	ECP	S322	EMS
ALGUES	X	X	X	X	X	X
GIGAREPRO 1	X	X	X	X	X	X
BABE	X	X	X	X	X	X
GIGAREPRO 2	X	X	X	X	X	X
EPA	X	X	X	X	X	X
AA	X	X	X	X	X	X

VI.7.d. Traitement des données

Quel que soit le protocole utilisé, l'intensité de fluorescence de chacune des sous-populations hémocytaires est détectée en FL1 (Figure 22). L'intensité de fluorescence mesurée dans les tubes contrôles (eau de mer, EMS) permet d'avoir le niveau de production d'espèces actives de l'oxygène de chaque sous-population hémocyttaire en absence de stimulation (niveau de base) ; celle détectée dans les lots stimulés ou inhibés permet d'avoir l'intensité de réponse face aux différents stimuli (activateurs ou inhibiteurs). Dans ce travail, les résultats sont généralement présentés sous la forme de l'intensité de fluorescence des contrôles EMS (exprimée en unité arbitraire U.A.). Mais, ils sont aussi parfois présentés sous la forme du ratio de l'intensité de fluorescence détectée dans les hémocytes en présence d'activateur ou d'inhibiteur sur l'intensité de fluorescence du contrôle EMS. A un ratio supérieur à 1 correspond une stimulation de la production de ROS par rapport au contrôle EMS, alors qu'un ratio inférieur à 1 souligne une inhibition de cette capacité.

L'ensemble des résultats issus de la mise au point de la mesure de la production de ROS des hémocytes en présence de différents inhibiteurs et activateurs sont présentés dans le rapport de fin d'étude de Marine Jegaden (2003) et sont repris par Lambert *et al.* (en préparation).

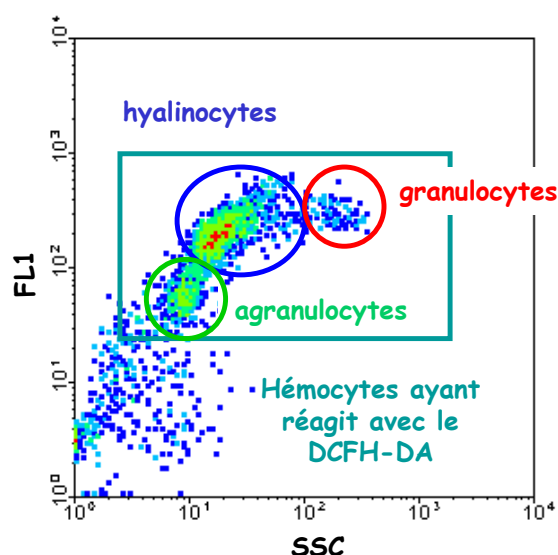


Figure 22 : Exemple de cytogramme réalisé avec le logiciel WinMDi 2.8 pour l'analyse de la production des espèces actives de l'oxygène de chacune des sous-populations hémocytaires.

VI.8. Capacité d'adhésion

La capacité d'adhésion des hémocytes se mesure par une différence de comptage entre le nombre d'hémocytes déposés et le nombre d'hémocytes récupérés dans le surnageant après trois heures d'incubation dans une micro-plaque à 24 puits. Les hémocytes récupérés dans chaque surnageant sont fixés à l'aide d'une solution de formol 6% et marqués au SYBR Green I avant leur comptage. La capacité d'adhésion des hémocytes a été testée en présence du *Vibrio* sp. S322 ou des ECP du *Vibrio aestuarianus*, mais aussi en présence d'eau de mer (contrôle). Le pourcentage d'hémocytes ayant adhéré à la microplaque est calculé par rapport au nombre d'hémocytes initialement déposés selon la formule suivant : $100 - (\text{nombre d'hémocytes n'ayant pas adhéré} / \text{nombre initialement déposés} \times 100)$.

VII. ANALYSES STATISTIQUES

Des analyses de variance (ANOVA et MANOVA) et des tests *a posteriori* (test PLSD de Fisher) ont été effectués pour montrer l'existence ou non de différences significatives entre les différents lots de chaque expérimentation. Des tests T sont aussi effectués pour tester les différences entre deux lots à une date donnée. Ces analyses sont réalisées à l'aide du logiciel STATGRAPHIC 5.1 ou STATVIEW. Une transformation Arcsinus($\sqrt{\quad}$) a été faite sur les données exprimées en pourcentage avant de procéder aux analyses statistiques.

Table 6 : Récapitulatif de analyses réalisées au cours des diverses expérimentations. Certains résultats issus de ces analyses n'ont pas été présentés dans ce travail.

Année	Expérimentation	Biom.	Bioch.	CEA	Lipides	Paramètres hémyocytaires														
						Br. Tot.	Comp.	Viab.	Phago.	Adhésion			Production de ROS							
										EMS	S322	ECP	EMS	PMA	ZYM	DPI	S322	ECP		
2001	ALGUES																			
2002	GIGAREPRO 1																			
2002	BABE																			
2003	GIGAREPRO 2																			
2003	EPA																			
2004	AA																			

*1^{ERE} PARTIE : EFFET DE LA QUANTITE DE
NOURRITURE SUR LES PARAMETRES
PHYSIOLOGIQUES DE L'HUITRE*

INTRODUCTION

Depuis 1991, les ostréiculteurs français ont signalé des mortalités massives sur les parcs d'huîtres creuses *C. gigas* pendant la période estivale pouvant touchées jusqu'à 60% de la production (Maurer & Comps, 1986). Ce phénomène de mortalité semble être associé à une faiblesse physiologique des huîtres à une période où elles sont en pleine maturation (Soletchnik *et al.*, 1996 ; Gouletquer *et al.*, 1998 ; Berthelin *et al.*, 2000), à une température élevée de l'eau (>19°C) (Gouletquer *et al.*, 1998 ; Cheney *et al.*, 2000) et à la présence d'un pathogène opportuniste dans le milieu (Lacoste *et al.*, 2001 ; Le Roux *et al.*, 2002). A ce jour, les causes exactes de ces mortalités ne sont pas clairement déterminées. Aussi pour répondre à la demande des ostréiculteurs, l'IFREMER a initié un programme de recherche visant à identifier le ou les facteurs impliqués dans ce phénomène.

Dans le cadre de ce programme, l'hypothèse d'une déficience immunologique associée à la reproduction pendant la période estivale a été avancée. En effet, la reproduction des huîtres a été décrite comme un processus physiologique coûteux en énergie (Soletchnik *et al.*, 1997 ; Berthelin *et al.*, 2000) et dont l'intensité dépend de la quantité de nourriture (Enriquez-Diaz, 2004). Plus les huîtres ont de l'énergie disponible, plus elles investissent cette énergie dans la reproduction. Par conséquent, les huîtres n'auraient donc plus assez d'énergie disponible à allouer à leur système de défense. Or si elle existe, cette déficience immunitaire pourrait expliquer la vulnérabilité des huîtres pendant la période estivale, les huîtres étant trop affaiblies pour faire face à toute agression extérieure. L'objectif de cette première partie du travail de thèse a donc été de tester l'effet de la quantité de nourriture sur les paramètres énergétiques et immunologiques de l'huître *C. gigas* au cours d'un cycle de reproduction. Les résultats sont présentés sous la forme de deux articles scientifiques.

- 1^{er} article : Impact of food availability on energetic storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle
- 2^{ème} article : Difference in biochemical composition and immunological parameters between two different genetic stocks of Pacific oysters *Crassostrea gigas*; resistant vs susceptible to summer mortalities

1^{er} article: "Impact of food availability on energetic storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle"

Maryse Delaporte ^a, Philippe Soudant ^{b*}, Christophe Lambert ^b, Jeanne Moal ^a, Stéphane Pouvreau ^a & Jean-François Samain ^{a*}

Abstract

The aim of this study was to test the effect of food quantity on energy storage and defence capacities of oysters during a reproductive cycle. One-year old *Crassostrea gigas* oysters were fed two different food levels (4% and 12% of oyster dry weight in algal dry weight per day) in controlled, experimental conditions over an annual cycle. Condition index, carbohydrate and lipid contents, energetic adenylate charge, and related hemocyte parameters of oysters were significantly affected by reproductive processes related to seasonal temperature variation and, to a lesser extent, by food availability. Energy parameters decreased during gametogenesis as gonads developed, then these parameters increased during the gonad resorption phase. The additional energy supply provided to oysters fed the 12% diet was allocated mainly to the development of more gonad tissue, compared to oysters fed the 4% diet. Concomitantly, regardless of diet, hyalinocyte concentrations were also seasonally affected. Hyalinocyte concentrations were low during gametogenesis and significantly increased during the gonadal resorption and tissue restoration phase. Phagocytic activity and adhesive capacity of hemocytes were temporary inhibited during gametogenesis and were to their lowest levels in June. Oysters fed the 12% diet had significantly higher hemocyte concentrations and lower phagocytosis activity and reactive oxygen species production compared to those fed the 4% diet.

Keywords: *Crassostrea gigas*, energy storages, reproduction, hemocyte parameters, phagocytosis, reactive oxygen species production

^a Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, centre IFREMER de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

^b Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Copernic, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France.

* Corresponding author (Philippe.Soudant@univ-brest.fr)

Short title: Oyster reproduction and immunity

Introduction

Since 1991, summer mortalities affecting both juveniles and adults of Pacific oyster *Crassostrea gigas* have been reported in French sea farms (Gouilletquer *et al.*, 1998). These mortalities are generally associated with temperatures $> 20^{\circ}\text{C}$ (Beattie *et al.*, 1980; Soletchnik *et al.*, 1999, 2003) and coincided with the period of sexual ripeness (Perdue *et al.*, 1981). As high temperature and sexual ripeness are associated to low energetic status, it is unclear how food availability may affect oyster weakness during the reproductive cycle.

Food availability is known to be an important factor for bivalve development affecting broodstock energy reserves, duration of maturation process, fecundity, quality and quantity of eggs, and larval development (Berntsson *et al.*, 1997 ; Utting & Millican, 1997 ; Hendricks *et al.*, 2003). Food provides energy for all metabolic processes directly or indirectly via previous storage formation. Food availability is also a critical environmental factor along with temperature for gametogenesis processes. In general, a temperature threshold (above $7\text{-}10^{\circ}\text{C}$ according to literature) has to be reached before gametogenesis can be initiated (Deslous-Paoli & Héral, 1988 ; Ruiz *et al.*, 1992), and then after initiation the rate at which gametogenesis proceeds depend on temperature and food availability. The high energetic cost of reproduction process was suspected to immuno-depressed and to be involved in summer mortality events by making them more susceptible to opportunistic pathogens and/or to environmental stress (Pouvreau *et al.*, 2003).

Generally, it is believed that the capability of oysters to react to diseases, injuries or parasite infections depends upon their defense system. Hemocytes are considered as the main cellular mediators of the defense system in bivalves (Cheng, 1996). Hemocytes are responsible for recognition, phagocytosis, and elimination by microbicidal activities of non-self particles (Cheng, 1996 ; Pipe, 1992 ; Chu, 2000). Many authors have showed that environmental factors modulate hemocyte capabilities of bivalves (Fisher *et al.*, 1989 ; Santarém *et al.*, 1994 ; Fisher *et al.*, 1996 ; Carballal *et al.*, 1998 ; Fisher *et al.*, 2000 ; Chu, 2000 ; Hauton *et al.*, 2000 ; Oliver *et al.*, 2001, 2003 ; Chu *et al.*, 2002 ; Fisher *et al.*, 2003 ; Soudant *et al.*, 2004). It is generally thought that hemocyte activities vary seasonally among geographical location, habitat and the physiological conditions of the oysters (including disease). Nevertheless, the complexity of the natural environment makes difficult to distinguish the impact of different environmental parameters (e.g. food availability, water

temperature, pollutions, presence of pathogens) and physiological state (e.g. sexual cycle, infected or not) on the health and survival of bivalves.

The purpose of this study is to assess the impact of two levels of food availability on the biochemical composition and hemocyte parameters (hemocyte concentrations, phagocytic activity, adhesive capacity and reactive oxygen species production of hemocytes) of oysters over an annual cycle by rearing oysters under controlled temperature and photoperiod conditions in an experimental hatchery. Results will be discussed according to a histological study (Enriquez-Diaz, 2004) performed in parallel to the present study to assess the reproductive status.

Material and Methods

Broodstock conditioning

Oysters were produced in 2001 in the IFREMER hatchery at La Tremblade (Charente, France) from 30 wild broodstocks collected in the Marennes-Oléron Bay. Spat was then reared at the IFREMER station in Bouin (Vendée, France), then juveniles were stored in marine ponds of Marennes during the winter of 2002. One-year-old oysters were conditioned at the IFREMER shellfish laboratory in Argenton (Finistère, France) from February 2002 to February 2003, in 700-L raceways with 20 µm-filtered running seawater. Oysters were fed with a mixed diet of three micro-algae (*T-Iso* (*Isochrysis aff. galbana*, clone Tahiti), *Chaetoceros calcitrans*, and *Tetraselmis chui*) provided in equal biomass proportions (1/3:1/3:1/3). Occasionally, difficulties were encountered to produce *Chaetoceros calcitrans* making it necessary to replace with *Skeletonema costatum*. The algal daily ration was established at 4% of algal dry weight per oyster dry weight for the first group (4% diet) of oysters and 12% for the second (12% diet). During the dietary conditioning, the annual average photoperiod and temperature cycle of Marennes-Oléron was applied and spawning was induced mid-July (Figure 1). Tanks and oysters were cleaned twice a week. From Feb. 2002 to Feb. 2003, 15 oysters were sampled monthly for biochemical analysis, except in January 2003. Twenty oysters were sampled monthly for immune analysis from March to December 2002.

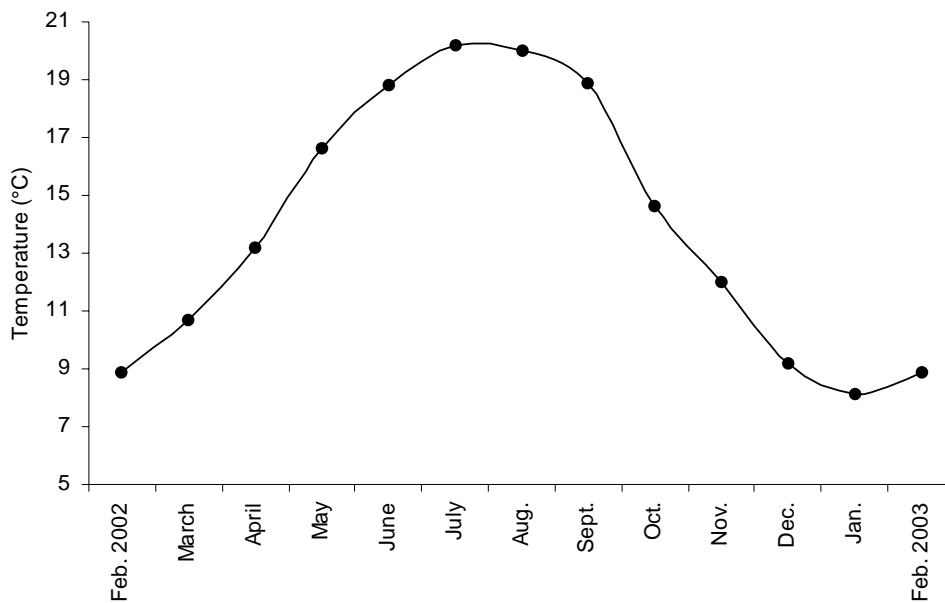


Figure 1: *Temperature cycle applied during the conditioning corresponds to the mean of temperature reported in Marennes-Oléron over the last of ten years.*

Oyster dry weight

At each sampling date, whole wet flesh weights of 15 oysters were measured and their flesh were combined in 3 pools of five animals. Pools were then frozen and stored in liquid nitrogen (-196°C) for later biochemical analyses. Pooled tissues were ground with a Danguomeau homogeniser. About 1 g of wet powder from each pool were placed in a pre-weighed aluminium cup, dried for 48h at 80°C and then weighed again for dry weight measurement. Whole oyster dry flesh weight was calculated from the whole wet flesh weight based on the dry to wet weight ratio of the 1 g powder.

Biochemical composition

For total lipid, protein and carbohydrate analyses, 600 mg of the above powder was re-suspended with 3 ml of distilled water, and then divided into three aliquots (200 µl for carbohydrate and protein analysis and 400µl for total lipid analysis). Total lipid contents were estimated according to Bligh & Dyer (1959) after extraction in a dichloromethane-ethanol-water mixture. The purified extract was placed in a pre-weighted Teflon cup, evaporated under a nitrogen stream, and the lipid content was estimated by weighting. Carbohydrate and protein contents were measured colorimetrically as described by Dubois *et al.* (1956) and

Lowry *et al.* (1951), respectively. Results are expressed as percentages of oyster dry tissue weight.

Adenylate energy charge

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). Briefly, nucleotides were extracted from 200 mg of the oyster powder prepared above with 2 ml of trichloro-acetic acid (TCA), neutralized with 1.2 ml of amine freon (trioctylamine/trifluoro-trichloro-ethane, v:v, 1:5). Extracted nucleotides were analysed by high-performance liquid chromatography on a reverse phase with a counter-ion (tributylamine). AEC was calculated as followed: $(ATP + 0.5 ADP)/(ATP + ADP + AMP)$ which varies between 0 and 1. AEC represents an estimation of the “instantaneous” cellular energy available for oysters. In healthy animals, AEC varies between 0.8-0.9; in partial stress the values drops to 0.5 (Ivanovici, 1980).

Hemolymph sampling

Hemolymph was withdrawn from individual oysters using a 1 ml plastic syringe fitted with a 25-gauge needle via a notch adjacent to the adductor muscle. Shells of oyster were notched adjacent to the adductor muscle a day before withdraw of hemolymph. All hemolymph samples were stored individually in a micro-tube held on ice. Individual samples were examined microscopically for contamination (sperm, ovocytes, algae, debris) and filtered on 80µm mesh. In April, June, July, August and October all immune assays were combined into three pools of five or six individual samples. For the other sampling dates (March, May, September, November and December), only hemocyte concentration was determined in 10 individual samples.

Bacteria preparation

The *Vibrio* sp. strain S322 was used as a challenge for the adhesive capacity assay. This strain was demonstrated to be pathogenic for larvae of the scallop *Pecten maximus* and the oysters *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* by Nicolas *et al.* (1996) The *Vibrio* sp. S322

suspension was prepared as described by Lambert *et al.* (2003) after 24h of culture in Zobell's medium.

Measurements of hemocyte parameters by flow cytometry

The characterisation of hemocyte type, number and functions were realised using a FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA USA) flow cytometer equipped with a 488 nm argon laser. Methods to measure hemocyte parameters are described hereafter.

Hemocyte concentration

100 μ l of each hemolymph sample was fixed by adding 300 μ l of a 4% formalin solution in filtered sterile seawater (FSSW). Samples were incubated with SYBR Green I (Molecular probes, 10X final concentration), a nucleic acid specific dye, in darkness at room temperature for 30 minutes before flow cytometry analysis. SYBR Green fluorescence was measured at 500-530 nm by the flow cytometry.

All SYBR Green stained cells were visualised on a Forward SCatter height (FSC, size) and Side SCatter height (SSC, complexity) cytogram allowing identification of hemocyte sub-populations. Granulocytes are described by a high FSC and a high SSC, hyalinocytes by a high FSC and a low SSC, while agranulocytes presented a low FSC and SSC. Thus, the three sub-populations were distinguished according to their size and complexity. Only granulocyte and hyalinocyte concentrations expressed as number of cells per ml are presented here as they accounted for 60-95% of total hemocytes and as agranulocytes are considered to possess little activity (Lambert *et al.*, 2003). Moreover, changes of the morphological characteristics (size and density) of each hemocyte sub-population are described.

Data from individual and pooled samples are presented all together in order to represent granulocyte and hyalinocyte concentrations and hemocyte morphological characteristics over all the 12 month experiment. However, statistical analyses were performed on immunological data obtained from pooled samples.

Hemocyte viability

Hemocyte viability was assayed according to Delaporte *et al.* (2003). Briefly, 150 μl of hemolymph from each pool was transferred into a tube containing 150 μl of anti-aggregant solution for bivalve hemocytes stored on ice. Ten minutes before flow cytometry analysis, samples were incubated with propidium iodide (PI, final concentration of 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), a fluorescent dye specific for nucleic acids which permeates membranes of dead cells only. The PI fluorescence of dead cells was measured at 550-600 nm. The percentage of viable hemocytes was calculated by the percentage of hemocytes not showing PI fluorescence relative to total hemocyte counts.

Phagocytosis assays

100 μl of hemolymph, primarily diluted with FSSW (1:1, v:v), were brought into contact with fluorescent beads (fluoresbrite microspheres YG 2.0 microns, polysciences, Eppelheim, Germany) in a micro-tube at a final concentration of 0.3% of the commercial suspension. After 60 minutes of incubation at 18°C, hemocytes were fixed with 230 μl of 6% formalin solution, and analysed at 500-530 nm by flow cytometry to detect hemocytes containing fluorescent beads. The phagocytic activity of hemocytes was estimated as the percentage of hemocytes that had engulfed two beads or more.

Adhesive capacity

The adhesive capacity of *C. gigas* hemocytes was assessed by modifying the procedure of Choquet *et al.* (2003). Two 100 μl sub-samples of hemolymph from each pool were distributed into a 24 well-microplate. Then, 100 μl of FSSW were added to the first sub-sample (control) and 100 μl of a *Vibrio* sp. S322 suspension (50 cells / hemocyte) to the second. Simultaneously, one 100 μl sub-sample was fixed by adding 300 μl of a 4% formalin solution in FSSW to estimate the hemocyte concentration at the beginning of the assay. After three hours of incubation at 18°C, hemocytes in the microplate were fixed by addition of 200 μl of 6% formalin solution. The supernatant containing non adhesive cells was filtered and transferred into a tube for flow cytometry. Cells from the supernatant and the cells fixed in 4% formalin from the beginning were incubated with SYBR Green I (10X final concentration) for 30 minutes in darkness at room temperature. Cell concentrations were then

evaluated by flow cytometry as described above. Results are expressed as the percentage of adhering hemocytes with or without bacteria, relative to the initial hemocyte concentration.

Basal reactive oxygen species production

The reactive oxygen species (ROS) production of hemocytes was measured following a method from Bass *et al.* (1983) adapted to *C. gigas* by Lambert *et al.* (2003) and using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). For each sample, an aliquots of 150 µl pooled hemolymph were diluted with FSSW (1:1, v:v) into a tube maintained on ice. DCFH-DA (final concentration of 0.01 mM) was added and tubes were incubated at 18°C. After 120 minutes of incubation, DCF fluorescence, quantitatively related to the ROS production of hemocytes without any stimulation (basal level), was measured at 500-530 nm by flow cytometry. Results are expressed as the mean DCF fluorescence (expressed in arbitrary units, A.U.) of the different hemocyte sub-populations.

Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed for all biochemical and immune parameters using STATGRAPHICS Plus 5.1 (Statistical Graphs Corp.) to test the effect of diet and sampling date. One-way analysis of variance was also performed to test the effect of sampling date within each dietary treatment. A T-Test was performed to compare effect of diet at each sampling date. Percentage data and ratio were transformed (arcsin of the square root) before ANOVA, but are presented in figures as untransformed percentage values.

Results

Oyster dry weight

Dry weight (DW) of oysters fed the 12% diet was significantly higher than oysters fed the 4% diet during the whole experiment (Figure 2, ANOVA, $p < 0.0001$). DW of oysters fed the 12% diet increased in the first part of the dietary conditioning (Feb. to July) and then stayed at a constant level during summer and increased again from fall to February 2003. At the end of the experiment, DW of oysters fed the 12% diet increased significantly, almost two fold from the beginning of the conditioning. By contrast, DW of oysters fed the 4% diet was stable from February to June. Then, a significant decrease (ANOVA, $p < 0.0001$) was observed from 0.6 in June to 0.3 in August. Finally, DW increased rapidly from August to September and remained stable and similar to the initial value until the end of the experiment (Feb. 2003).

Biochemical composition

Total carbohydrate

Oysters fed the 12% diet had a significantly higher carbohydrate content than those fed the 4% diet (Figure 3A, ANOVA, $p < 0.0001$). In May, carbohydrate content dropped from 18.7% and 23.0% for oysters fed the 4% and 12% diet respectively to 6.2% in August for both diets. During the fall period, feeding oysters with the 12% diet resulted in a faster and more intense restoration of carbohydrate content than the 4% feeding. At the end of the dietary conditioning, oysters fed the 12% diet possessed more carbohydrate than at the beginning of the experiment.

Total lipids

Over the whole conditioning, oysters fed the 12% diet had a significant higher lipid content than those fed the 4% diet (Figure 3B, ANOVA, $p < 0.0001$). Lipid content of oysters fed the 12% diet slowly increased from the beginning of the dietary conditioning in February to September (10.4% to 12.2%, ANOVA, $p < 0.001$).

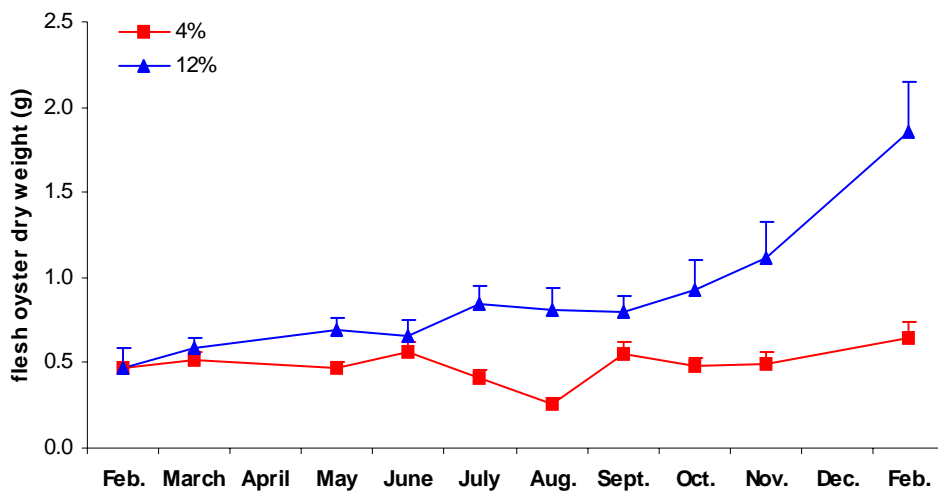


Figure 2 : Dry weight of oysters fed two food levels (4% and 12% of algal dry weight/oyster dry weight) during an average temperature cycle (similar to Marennes-Oléron, France) under hatchery controlled conditions ($n=15$, mean \pm SE).

Then, lipid content of those oysters increased significantly from 12.2% to 14% at the end of the experiment. The lipid content of oysters fed the 4% diet did not change from initial levels until October except a rapid and short drop observed in August (ANOVA, $p>0.05$). From November to February 2003, lipid contents of oysters fed the 4% diet increased significantly and reached its maximum value at the end of the experiment (12.9%).

Proteins

Oysters fed the 4% and 12% diet had similar protein contents over the whole experiment (Figure 3C, ANOVA, $p>0.05$). Protein content increased steadily from 37.2% in February to 51.9% in August (ANOVA, $p<0.001$). The protein content of oysters fed the 12% diet decreased significantly in September and was significantly lower compared to oysters fed the 4% diet during the fall (October, November and December) (T-Test, $p<0.05$).

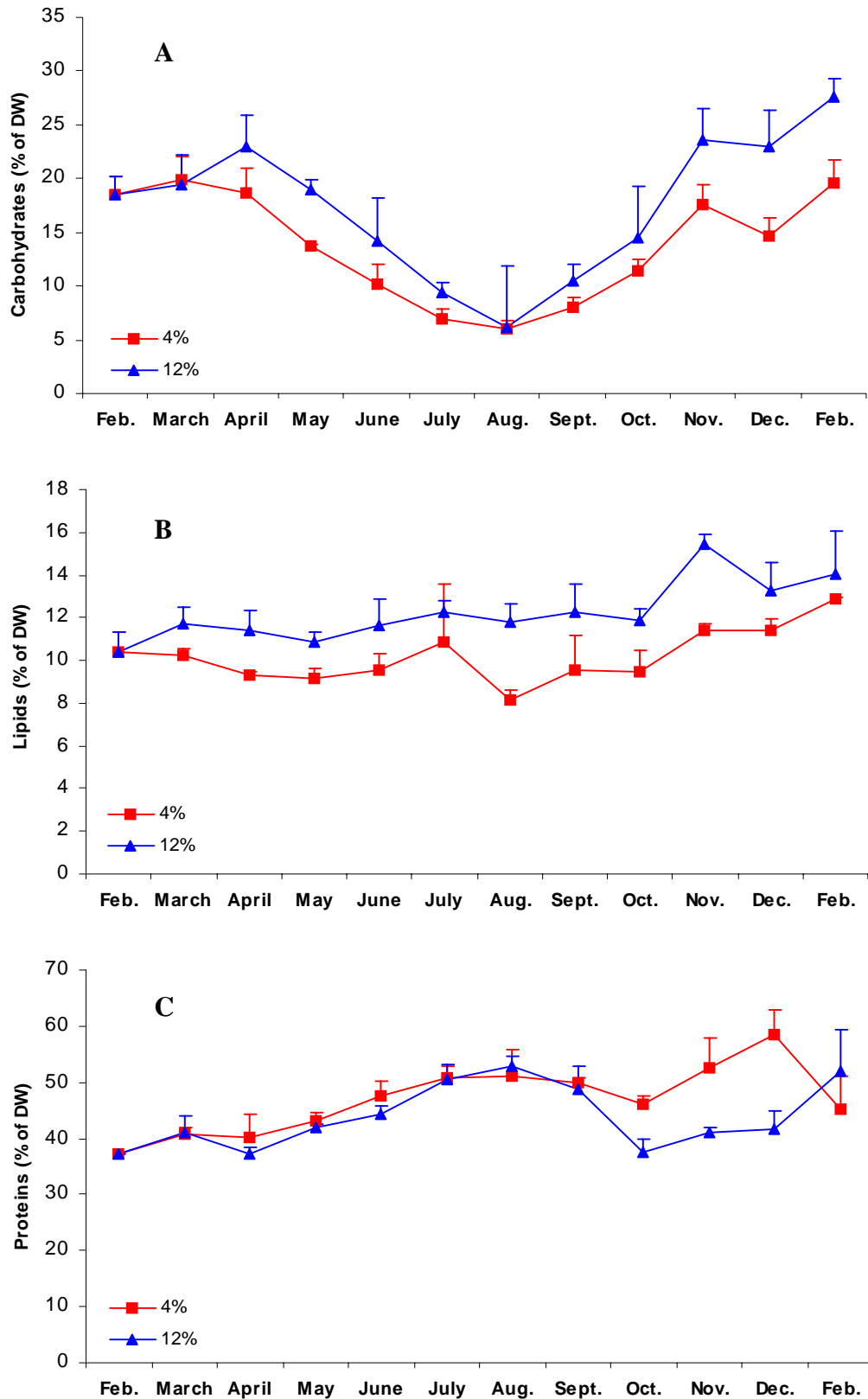


Figure 3 : Total carbohydrate (A), lipid (B) and protein (C) contents of oysters fed two food levels (4% and 12% of algal dry weight/oyster dry weight) during an average temperature cycle (similar to Marennes-Oléron, France) under hatchery controlled conditions ($n=3$, mean \pm SD). Results are expressed as % of oyster dry tissue weight.

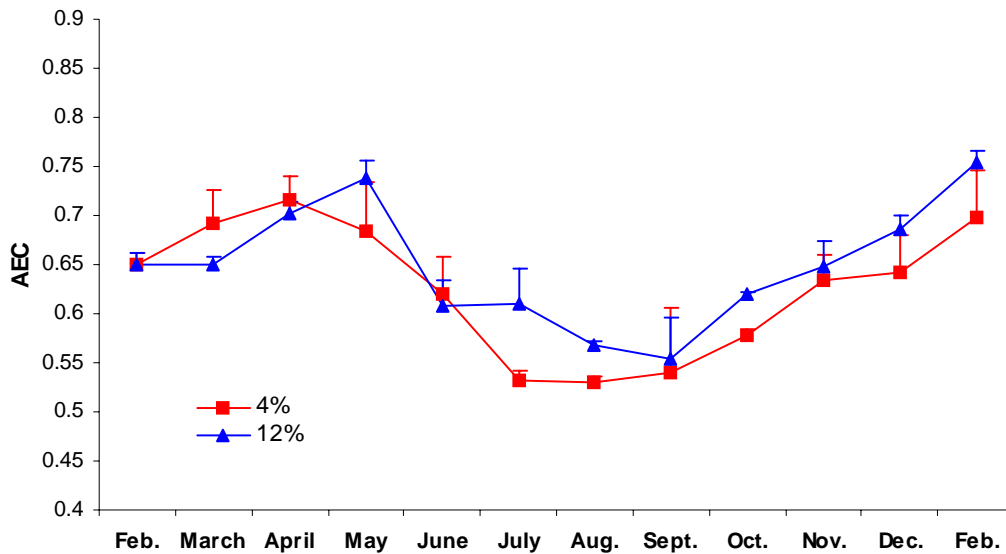


Figure 4 : Adenylate energy charge of oysters fed two food levels (4% and 12% of algal dry weight/oyster dry weight) during an average temperature cycle (similar to Marennes-Oléron, France) under hatchery controlled conditions ($n=3$, mean \pm SD).

Adenylate energetic charge

Changes of AEC during the present experiment can be divided in three phases (Figure 4) : (1) an increase until April and May for oysters fed both the 4% and 12% diet respectively, (2) a decrease until September with the lowest values in July for oysters fed the 4% diet and in September for those fed the 12% diet, (3) a concomitant increase for the 2 diets until the end of the experiment in Feb. 2003 reaching the maximal value of 0.70 and 0.75 for oysters fed the 4% and 12% diet respectively. During the 2 last phases, AEC of oysters fed the 12% diet was significantly higher than those fed the 4% diet in July, August and October (T-test, $p<0.01$). Moreover, changes of AEC during the whole experiment paralleled changes in total carbohydrate. A significant and strong correlation between AEC and total carbohydrate content was observed ($p<0.0001$, correlation coefficient = 0.79).

Granulocyte and hyalinocyte concentrations

The hyalinocyte concentration was significantly affected by the dietary conditioning over the whole experiment (Figure 5B, ANOVA, $p<0.01$), while the granulocyte concentration was not (Figure 5A, ANOVA, $p>0.05$). Oysters fed the 12% diet had a significantly higher hyalinocyte concentration than those fed the 4% diet, especially in April, August and October.

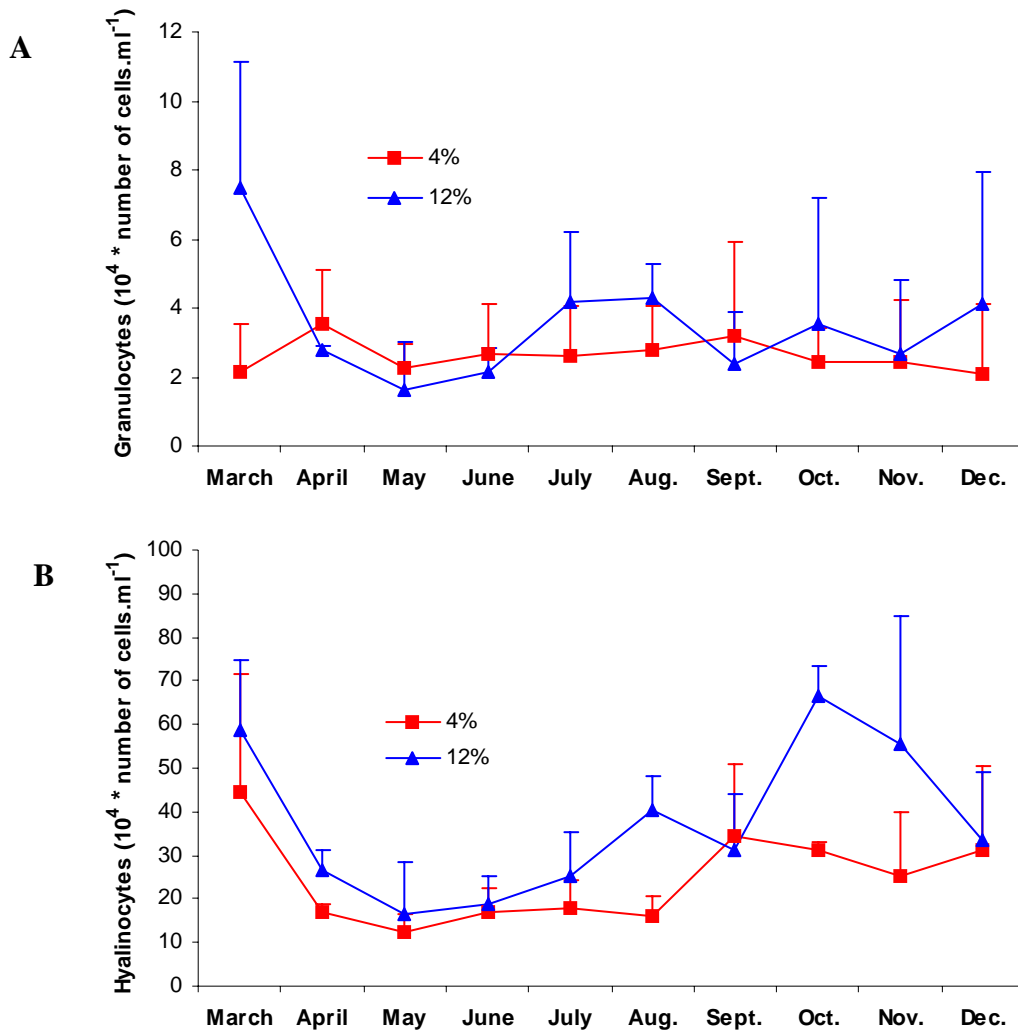


Figure 5 : Granulocyte (A) and hyalinocyte (B) concentrations (in $10^4 \text{ cell.ml}^{-1}$) of oysters fed two food levels (4% and 12% of algal dry weight/oyster dry weight) during an average temperature cycle (similar to Marennes-Oléron, France) under hatchery controlled conditions (mean \pm SD; $n=3$ pools in April, June, July, August, October, and $n=10$ individuals in March, May, September, November and December).

The hyalinocyte concentration exhibited more seasonal variation than the granulocyte concentration (ANOVA, $p < 0.0001$). Hyalinocyte concentration was high in March, decreased in April and then remained low from May to July. Hyalinocyte concentration then increased drastically for oysters fed the 12% diet to reach a maximum level in October. A similar, but much smaller, increase was observed in oysters fed the 4% diet. Finally, the hyalinocyte concentration of oysters fed the 12% diet dropped at the end of the experiment to a concentration similar to the 4% diet. Granulocyte concentration was stable for oysters fed the 4% diet (ANOVA, $p > 0.05$) with an average of $2.6 \cdot 10^4 \text{ cells.ml}^{-1}$.

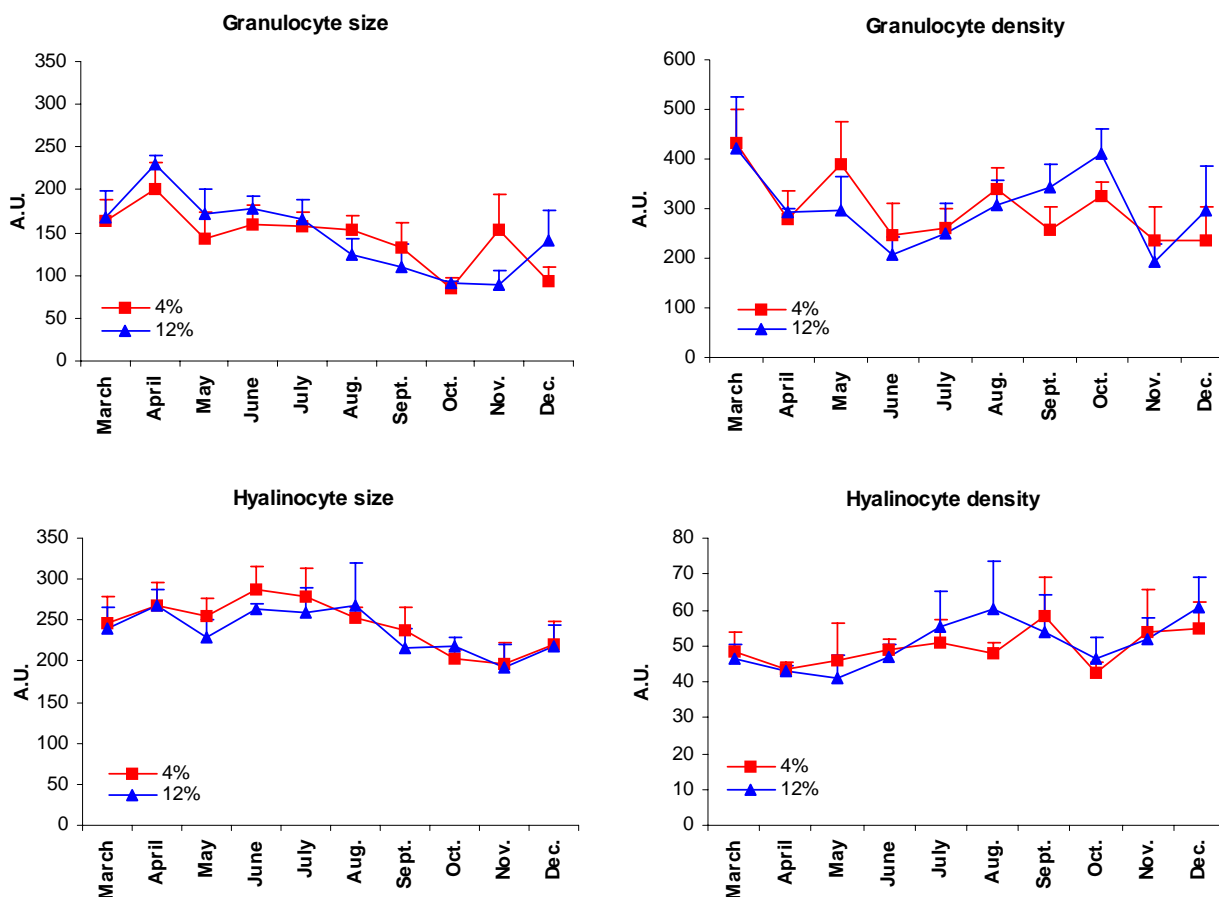


Figure 6 : Size and density (respectively the Forward Scatter height and the Side Scatter height measured by flow cytometry expressed in Arbitrary Units) of hemocyte sub-populations from oysters fed two food level (4% and 12% of algal dry weight/oyster dry weight) during an average temperature cycle (similar to Marennes-Oléron, France) under hatchery controlled conditions (mean \pm SD; $n=3$ pools in April, June, July, August, October, and $n=10$ individuals in March, May, September, November and December).

Granulocyte concentration of oysters fed the 12% diet was significantly higher than those of oysters fed the 4% diet in March, July and August (ANOVA, $p<0.01$) with an average of $3.9 \cdot 10^4$ cells.ml⁻¹.

Size and density of hemocyte sub-populations

FSC and SSC parameters of hemocyte sub-populations were not affected by the dietary conditioning (Figure 6). During the experiment, a significant effect of the sampling date was observed on the size (FSC) (ANOVA, $p<0.01$) and the density (SSC) (ANOVA, $p<0.05$) of both granulocytes and hyalinocytes. Granulocyte size dropped continuously from 215 A.U. in April to 88 A.U. October (ANOVA, $p<0.001$) while hyalinocytes size remained

stable until August (average of 268 A.U.) before dropping in October to 210 A.U. (ANOVA, $p<0.01$). In regard to the density of these two hemocyte sub-populations, granulocyte density varied considerably during whole the experiment. First, a decrease of granulocyte density was observed from March until June, followed by an increase until October (ANOVA, $p<0.05$), and then a decrease at the end of the experiment. Meanwhile, hyalinocyte density significantly increased from April to August and then decreased in October to initial value (ANOVA, $p<0.05$). Hyalinocyte density then increased again at the end of the experiment.

Hemocyte viability

During the experiment, hemocyte viability was not affected by the dietary conditioning or sampling date (Table 1, ANOVA $p>0.05$). High viability percentages were observed with an average of 92.5% of viable cells in hemolymph samples (i.e 7.5% of dead cells).

	April	June	July	August	October
Hemocyte viability					
4%	91.0 ± 2 ^a	92.6 ± 3 ^{ab}	93.3 ± 2 ^{ab}	90.8 ± 2 ^a	95.4 ± 1 ^b
12%	92.6 ± 1 ^a	93.1 ± 1 ^a	89.5 ± 4 ^a	92.3 ± 3 ^a	94.2 ± 1 ^a

Table 1 : Viability (expressed in % of total hemocyte counts) of hemocyte from oysters fed two food levels (4% and 12% of algal dry weight/oyster dry weight) during an average temperature cycle (similar to Marennes-Oléron, France) under hatchery controlled conditions. Small letters indicate difference between sampling date ($n=3$; mean ± SD; ANOVA, $p<0.05$).

Phagocytic activity

Oysters fed the 4% diet had a significantly higher phagocytic activity than those fed the 12% diet (Figure 7, ANOVA, $p<0.05$) over the whole experiment. This activity varied also significantly during the dietary conditioning ($p<0.0001$). An initial rapid decrease of the phagocytic activity from 10.6% in April to 6.9% in June was observed, followed by a sharp increase reaching 16.2% in July. Phagocytic activity then remained stable until October.

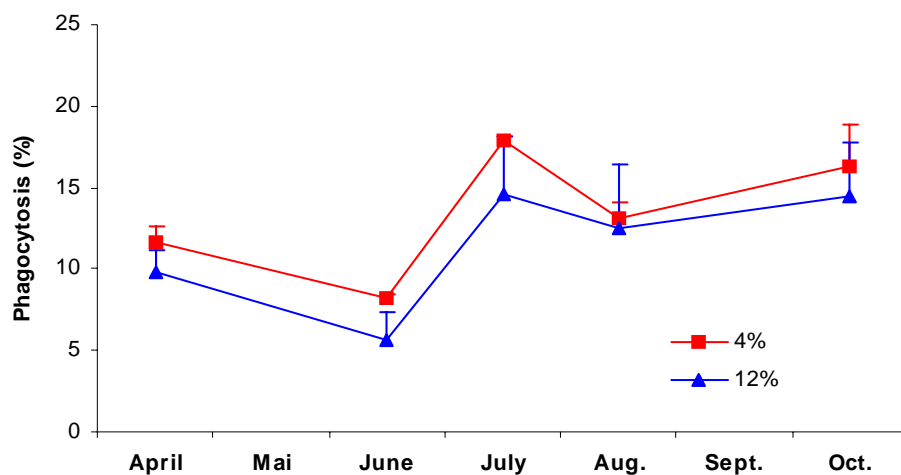


Figure 7: *Phagocytic activity of hemocytes (expressed as percentage of hemocytes that have engulfed two beads and more) of oysters fed two food levels (4% and 12% of algal dry weight/oyster dry weight) during an average temperature cycle (similar to Marennnes-Oléron, France) under hatchery controlled conditions (n=3; mean \pm SD).*

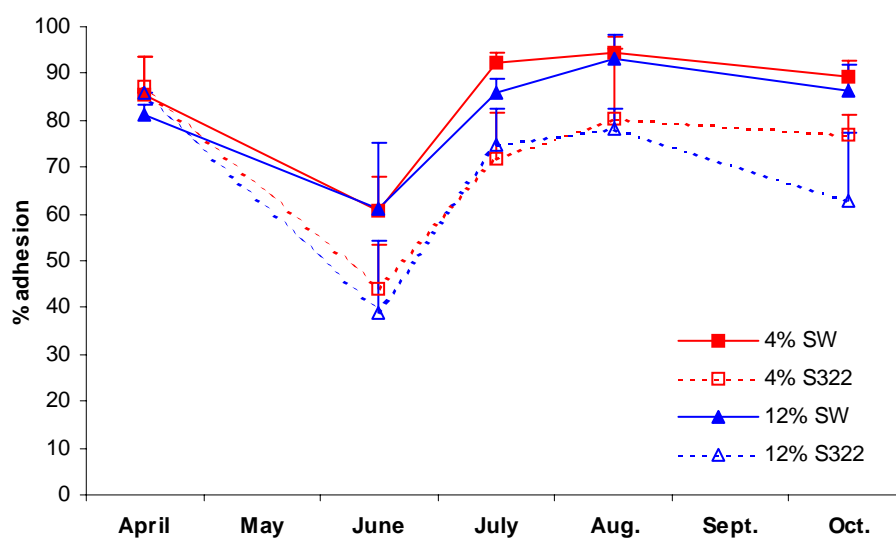


Figure 8 : *Adhesive capacity of hemocytes incubated 3 hours with sterile seawater and in presence of the Vibrio sp. S322 in oysters fed two food levels (4% and 12% of algal dry weight/oyster dry weight) during an average temperature cycle (similar to Marennnes-Oléron, France) under hatchery controlled conditions (n=3; mean \pm SD).*

Adhesive capacity

Over the whole experiment, the adhesive capacity of hemocytes incubated with seawater or with the *Vibrio* sp. S322 was not significantly affected by the dietary conditioning (Figure 8, ANOVA, $p>0.05$). However, an effect of sampling date effect was detected for hemocytes incubated with or without the bacteria. Adhesive capacity of hemocytes in June (40% and 60% with and without the *Vibrio* sp. S322 respectively) was significantly lower than in April, July, August and October (an average of 77% and 88% with and without the *Vibrio* sp. S322 respectively)(ANOVA, $p<0.0001$). Interestingly, hemocyte adhesive capability in April was not affected by the incubation with the *Vibrio* sp. S322.

Basal reactive oxygen species production

Basal reactive oxygen species (ROS) production of hemocyte sub-populations after 120 minutes in FSSW was slightly affected by the dietary conditioning (Table 2). Over all sampling dates were considered, granulocyte ROS production of oysters fed the 12% diet was significantly higher than the ROS production of oysters fed the 4% diet (ANOVA, $p<0.05$). This was not the case for hyalinocytes (ANOVA, $p>0.05$). ROS production was also seasonally affected ($p<0.0001$), mainly because of the high ROS production measured in April (371 A.U. for granulocytes and 306 A.U. for hyalinocytes) significantly higher than those measured at other sampling dates. From June to October, the ROS production of both hemocyte sub-populations was stable with an average of 161 A.U. for granulocytes and 178 A.U. for hyalinocytes.

		April	June	July	August	October
Granulocytes	4%	364 ± 67 ^b	153 ± 5 ^{ac}	135 ± 19 ^a	182 ± 37 ^c	129 ± 30 ^{ac}
	12%	388 ± 41 ^b	161 ± 24 ^{ac}	155 ± 28 ^a	177 ± 43 ^c	194 ± 41 ^{ac}
Hyalinocytes	4%	330 ± 6 ^{b*}	187 ± 49 ^a	168 ± 32 ^a	164 ± 2 ^a	155 ± 34 ^a
	12%	287 ± 5 ^{b*}	166 ± 19 ^a	197 ± 22 ^a	172 ± 49 ^a	212 ± 29 ^a

Table 2 : Basal reactive oxygen species production of hemocytes (expressed in Arbitral Units; $n=3$; mean ± SD) from oysters fed two food level (4% and 12% of algal dry weight/oyster dry weight) during an average temperature cycle (similar to Marennes-Oléron, France) under hatchery controlled conditions. Small letters indicated difference between sampling dates (ANOVA, $p<0.05$). Asterisk indicated difference between dietary treatments at one date (ANOVA, $p<0.05$).

Discussion

The present study tested the impact of food supply on the biochemical composition and hemocyte parameters of oysters over an annual cycle under experimentally-controlled conditions. An histological study was simultaneously performed by Enriquez-Diaz (2004) on other oysters, so discussion of the biochemical and hemocyte parameters results according to the reproductive processes is possible. Combined, these data will contribute to a better understanding of the interactions between energetic, hemocyte parameters and reproductive processes.

Changes related to the reproductive processes

Irrespective of food levels, changes of all energetic and hemocyte parameters can be separated in two successive phases related to the reproductive processes : gametogenesis phase and growth phase including glycogen storage and somatic growth.

Measures of energy status such as the carbohydrate content and adenylate energy charge (AEC) revealed that there was a significant consumption of the energy reserves from May to August and then a restoration of this compartment in the fall. Changes in these two parameters were inversely correlated with seawater temperature of the rearing tanks ($p < 0.0001$, $p < 0.01$, coef. of correlation = - 0.80 and - 0.57 respectively), which affected physiological processes of the oysters. The depletion of carbohydrate content and AEC from May to August is considered to be a consequence of utilization of reserves for gametogenesis processes taking place during this period (Moal *et al.*, 1991a et b). This result was in agreement with studies of Mori *et al.* (1965), Perdue & Erickson (1984), Ruiz *et al.* (1992) and more recently Li *et al.* (2000) and Berthelin *et al.* (2000). Thereafter, there is a restoration of the energy reserves of oysters in the fall. Histological analyses of Enriquez-Diaz (2004) confirmed that those changes were related to the balance between the reproductive process, energy storage and growth.

Oysters had a low hemocyte concentration (mostly represented by hyalinocytes) from April to July. Hemocyte concentration then increased steadily to the highest concentrations in October. These changes in hemocyte concentrations during the reproductive process agreed with the study of Fisher *et al.* (1996) on the seasonal hematological variability of Eastern oysters *Crassostrea virginica* from two sites in Florida. They observed a decline of hemocyte

concentrations through the summer, reaching their lowest level in August and coinciding with the highest water temperature and active spawning by the oysters. In the present study, the lowest hemocyte concentration also corresponds with the highest water temperature, but not with the active spawning of all oysters as only those fed 4% spawned completely in July (Enriquez-Diaz, 2004). The high hemocyte concentrations recorded in September and October were hypothesized by Fisher *et al.* (1996) to be correlated to a decreasing temperature and the end of the spawning, when oysters are resorbing gonad tissue. Similarly, in our study, hemocyte concentrations increased steadily from July to the highest levels in October. We suggest that more hemocytes were needed and perhaps generated for gamete resorption and restructuring of gonad tissue. This concurred with the histological observation of the implication of hemocytes in the gamete resorption and storage tissue restoration reported by Mathieu *et al.* (2003).

Intriguingly, other studies on oysters *C. virginica* (Chu & La Peyre, 1993 ; Volety *et al.*, 1999 ; Chu, 2000) revealed a higher hemocyte concentration during summer than during winter. A higher hemocyte concentration in summer was also observed for other species such as the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1998) and the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Soudant *et al.*, 2004). It is possible that the contrasting results are due to the presence of pathogens. Indeed, an increase of circulating hemocytes was often reported in bivalves infected with pathogens (Ford *et al.*, 1993 ; Paillard *et al.*, 1996 ; Carballal *et al.*, 1998 ; Ordas *et al.*, 2000 ; Cochenec-Laureau *et al.*, 2003).

With regard to hemocyte activities, the phagocytic activity varied according to sampling date. The lowest phagocytic activity was reported in June when temperatures reached 19°C and when oysters had low energy reserves, but increased as soon as July. Also, during the same period, oysters were in an intense phase of gametogenesis, with maximum gonad growth period (Enriquez-Diaz, 2004). In the present study, the lowest phagocytic activity in June occurred simultaneously with a loss of adhesive capacity, accentuated when challenged *in vitro* with *Vibrio* sp. S322. This relationship is consistent with the observations of Beckmann *et al.* (1992) studying differences between diseased and non diseased hemocytes of *Mya arenaria* (neoplasia). These authors associated the hemocyte capacity to phagocytose foreign particles with their adhesive capacity. At this point, it is unclear what exogenous and endogenous parameters may be related to the loss of phagocytic activity, as changes in phagocytic activity were not correlated with either maximum seawater temperature or

minimum energy content (as the lowest energy contents and the highest temperature were recorded in August). After the first phase of decrease, phagocytosis then increased in July and stayed stable until October. A similar pattern was observed for diploid and triploid oysters reared in fields (P. Soletchnik and B. Gagnaire, personal communications), with a similar decrease in June and a further increase in July. However, triploids demonstrated a much faster increase in July. The authors argued that when gonads of diploid oysters are ripened, oysters have to insure maintenance of the gonad tissue and, thus, can not spare energy for hemocyte activities such as phagocytosis. Nevertheless triploids which did not invest energy in reproduction had also a similar decrease in June. So, unidentified endogenous factors may also be implicated in hemocyte activities. The relationship between hormonal factors and hemocyte activities during oyster reproductive processes should be investigated, as hormones like estradiol and progesterone were demonstrated to inhibit phagocytosis activity of macrophages in the common carp *Cyprinus carpio* (Yamaguchi *et al.*, 2001; Watanuki *et al.*, 2002).

Although the initial decrease in ROS production from April to June could be linked with the decrease of phagocytosis observed during the same period ; the ROS production stayed thereafter low until the end of the experiment while phagocytosis increased. In natural populations of *C. virginica*, Fisher *et al.* (1996) reported seasonal variation of ROS production with a decrease from spring to summer, followed by an increase during the fall and winter months. They suggested that ROS production can be related to temperature variation, but was not clearly linked to the reproductive cycle of oysters. In the present study, no relationships could be established between ROS production with either reproduction processes or temperature variation.

Finally, FSC (size) and SSC (internal complexity) of hemocytes, as measured by flow cytometry, were only significantly affected by sampling date. We speculate that the high complexity of granulocytes and hyalinocytes during the gametogenic process may reflect their involvement in the reproductive process initially by carrying nutrients into gonad tissue for its development and maintenance, then by eliminating unreleased gametes. Hemocytes were demonstrated to carry nutrients in bivalves (Yonge, 1926; Feng *et al.*, 1977), but, to date, no studies have definitively demonstrated that hemocytes transport nutrients to gonad tissue.

Changes related to food levels

In the present study, dry weight (DW) of oysters fed the 12% diet was always higher than those fed the 4% diet. Interestingly, no decrease was reported during the reproductive period for those oysters. This suggested that the additional energy supply was sufficient to allow oysters to maintain their DW despite the energy cost of the gametogenesis process. By contrast, DW of oysters fed the 4% diet significantly decreased during this period, suggesting that the food supply was not sufficient to compensate for the high energy expense associated to temperature increased and reproduction.

It is well known that increase and utilization of carbohydrate storage is a result of the balance between food supply and energy demands of two successive biological processes, reproduction and growth, both of which are temperature dependent. During the first part of the experiment, carbohydrate content and AEC of oysters fed the 12% diet were observed to be significantly higher, compared to those of oysters fed the 4% diet, but similarly decreased during gametogenesis to their lowest level in August. AEC reached very similar low values of 0.5 and 0.6 for oysters fed the 4% and 12% diets, respectively. Such low AEC values indicate partially-detrimental conditions according to Ivanovici (1980). Interestingly, the additional food provided by the 12% diet appeared as insufficient as the 4% diet to compensate for the energy reserve decrease (carbohydrate and AEC) observed during gametogenesis. This suggests that additional energy provided by the 12% diet was primarily invested in gametogenesis. Indeed, the lipid content of the oysters fed the 12% diet was significantly higher than in oysters fed the 4% diet. Increased lipid content is generally associated with gonad development. Enriquez-Diaz (2004) also showed histologically that, at the maximum period of gametogenesis (mid-summer), the percentage of gonad area of oysters fed the 12% diet was 66% while it was only 49% for oysters fed the 4% diet. Agreement between biochemical and histological data shows that the reproductive effort depends on the level of food supply. Thus, during the reproductive period, the more oysters are fed, the more energy they devote to reproductive processes, and this energy expense increases with temperature at the expense of energy storage.

Such high energy expense transfer (relative to food supply) during reproduction of oysters fed the 12% diet may be more physiologically stressful for these oysters than for those fed the 4% diet. This may explain their higher susceptibility observed in the experimental bacterial infection with *Vibrio lentus* which was performed in July 2002 (Pouvreau *et al.*,

2003). At this date, it was also observed that the scope for growth of oysters was more deeply negative for oysters fed the 12% diet, which developed more gonad tissue than those fed the 4% diet (Enriquez-Diaz, 2004). Also, we suggest that these oysters may have insufficient energy to invest in their immune system and fight against bacteria infection during gametogenesis.

Thereafter, during the second phase (August to the end of the experiment), oysters fed the 12% diet had higher DW, carbohydrate contents and AEC values than those fed the 4% diet. This suggested that contrary to the first spring period devoted to reproduction, the additional food inputs was invested in growth and energy storage.

Hemocyte parameters were also affected by the dietary treatments with the two food levels but to a lesser extent compared to the seasonal effect. Oysters fed the 12% diet had a significant higher hemocyte concentration than those fed the 4% diet. Also, it is possible that feeding oysters with the 12% diet allowed them to invest some energy in processes such as hemocyte production especially during the gonad resorption and restructuring phase. In August, October and November, the highest hemocyte concentration in oysters fed the 12% diet can be related to their higher energy reserve observed at this period as a consequence of the decrease in reproductive metabolism and temperature.

Oysters fed the 12% diet had slightly lower phagocytic activity. The lower hemocyte activity was unrelated to energy content as carbohydrate and AEC values were significantly higher for oysters fed the 12% diet during the entire experiment than oysters fed the 4% diet. It is possible that phagocytic activity was more affected by reproductive effort, as oysters fed the 4% diet transferred less energy in the development of gonad tissue compared to those fed the 12% diet. Statistical analysis also revealed a higher ROS production of granulocytes for oysters fed the 12% diet, compared to oysters fed the 4% diet. This concurred with recent results of Hégaret *et al.* (2004) showing a higher values of oxidative burst activity for granulocytes of oysters fed the 50% diet.

Conclusion

This is the first study examining the relationships between food availability, temperature and reproductive cycle on the immune responses of oyster *C. gigas* under

experimental conditions. We demonstrated that the hemocyte parameters of oysters were more influenced by reproduction related to seasonal temperature variation than by food availability. It appeared clearly that active gametogenesis in May-June resulted in a reduction of energy reserves, with a concomitant reduction in the number of circulating hemocytes (mostly hyalinocytes), adhesion capacity and phagocytic activity. This strategy can be detrimental in the presence of pathogens or any other stressful situation. In our study, oysters fed the 12% diet demonstrated a higher reproductive effort compared to oysters fed the 4% diet, a higher energy expense revealed by a the deeper decrease in the Scope For Growth when temperature increased (Enriquez-Diaz, 2004), and a higher susceptibility to an experimental infection (Pouvreau *et al.*, 2003). Lower phagocytosis activity and ROS production in oysters fed the 12% diet may also indicate that hemocyte functions were perturbed by the higher reproductive effort. It is certainly necessary to investigate more immune parameters that could better explain the pathogen susceptibility observed in oysters during gametogenesis, and to consider instantaneous energy mobilization, rather than storage, when energy reserves are depressed.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Lionel Dégremont and co-workers for the hatchery production of the oysters used in the present study. We want also to thank our colleagues of the Argenton hatchery for taking care of oysters during this one year conditioning and Dr J.L. Nicolas for supplying the *Vibrio* sp. S322. This research was a part of the MOREST project supported by a grant from IFREMER, the Région Bretagne, Région Normandie, Région Pays de Loire, Région Poitou-Charente and the Conseil Général du Calvados.

References

- Auffret, M. & Oubella, R., 1995. Cytological and cytometric analysis of bivalves molluscs hemocytes, in: (Eds: Stolen, J.S., Fletcher, C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaattari, S.L., Anderson, R.S., Soderhall, K. & Weeks-Perkins, B.A.). Fair Haven: SOS Publication
- Bass, D.A., Wallace Parce, J., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., Thomas, M., 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils : a graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology*. 130, 1910-1917.
- Beattie, J.H., Chew, K.K., Hershberger, W.K., 1980. Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. Proceedings of the *National Shellfisheries Association*. 70, 184-189.
- Beckmann, N., Morse, M.P., Moore, C.M., 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 59, 124-132.
- Berntsson, K.M., Jonsson, P.R., Wängberg, S.A., Carlsson, A.S., 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. 154, 139-153.
- Berthelin, C., Kellner, K., 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.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37, 911-917.
- 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.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes : forms and functions, in: The eastern oyster *Crassostrea virginica*. (Eds: Newell, R.I.E., Kennedy, V.S. & Eble, A.F.). Maryland Sea Grant College. 299-329.
- 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.

Chu, F.L.E., La Peyre, J., 1993. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica* : temperature effects. *Diseases of Aquatic Organisms*. 16, 223-234.

Chu, F.L.E., 2000. Defense Mechanisms of Marine Bivalves. *Marine Biotechnology*. 1-42.

Chu, F.L.E., Volety, A.K., Hale, R.C., Huang, Y., 2002. Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field - contaminated sediments. *Marine Environmental Research*. 53, 17-35.

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.

Deslous Paoli, J.M., Héral, M., 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes - Oléron. *Aquatic Living Resources*. 1, 239-249.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350-356.

Enriquez-Diaz, M., 2004. Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale*.

Feng, S.Y., Feng, J.S., Yamasu, T., 1977. Role of *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* blood cells in defense and nutrition. *Comparative Pathobiology*. 3, 31-67.

Fisher, W.S., Chintala, M.M., Moline, M.A., 1989. Annual variation of estuarine and oceanic oyster *Crassostrea virginica* Gmelin hemocyte capacity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 127, 105-120.

Fisher, W.S., Oliver, L.M., 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.

Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Volety, A.K., 2003. Stimulation of defense factors for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology*. 64, 375-391.

Ford, S.E., Ashton-Alcox, K.A., Kanaley, S.A., 1993. *In vitro* interactions between bivalve hemocytes and the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Aquaculture*. 88, 285-301.

Gagnaire, B., Soletchnik, P., Faury, N., Kerdudou, N., Le Moine, O. & Renault, T. A cytometric morpho-functional analysis of the hemocytes in the Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in two contrasted field environments. I - Effects of sampling date and oyster group. *submitted to Fish and Shellfish Immunology*.

Gouletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Taillade, S., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). *CM 1998 / CC14*, p.20.

Hauton, C., Hawkins, L.E., Hutchinson, S., 2000. The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella anguillarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 127 B, 203-212.

Hendriks, I.E., van Duren, L.A., Herman, P.M.J., 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 296, 199-213.

Ivanovici, A.M., 1980. The adenylate energy charge in the estuarine mollusc (*Pyrazus ebenimus*). Laboratory studies of responses to salinity and temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 66 A, 43-45.

Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry. A tool to evaluate pathogenic *Vibrio* inhibiting capacity. *Fish and Shellfish Immunology*. 15, 225-240.

Li, Q., Osada, M., Mori, K., 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonad tissue during sexual maturation. *Fisheries Science*. 66, 502-508.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. 265-275.

Mathieu, M., Dubois, B., Costil, K., Heude, C., Huvet, A., Kellner, K., Pouvreau, S., 2003. Characterization of summer mortalities of *Crassostrea gigas* oyster in relation to physiological parameters. *Journal of Shellfish Research*. 22, p. 343.

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). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 93 B, 307-316.

Moal, J., Le Coz, J.R., Samain, J.F. & Daniel, J.Y., 1991a. Adenylate energy charge: a possible trophic index for management of oyster intensive aquaculture. *Comparative Biochemistry Physiology*. 100 C, 201-205.

Moal, J., Le Coz, J.R., Samain, J.F., Daniel, J.Y. & Bodoy, A., 1991b. Oyster adenylate energy charge: response to levels of food. *Aquatic Living Ressources*. 4, 133-138.

Mori, K., Tamate, H., Imai, T., Itikawa, O., 1965. Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima bay. V. Changes in the metabolism of lipids and glycogen of the oyster during the stages of sexual maturation and spawning. *Bulletin of Tohoku Reg. Fisheries Research Laboratory*. 25, 49-63.

Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop (*Pecten maximus*) larval culture. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27, 67-76.

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.

Oliver, L.M., Fisher, W.S., Volety, A.K. & Malaeb, Z., 2003. Greater hemocyte bactericidal activity in oysters (*Crassostrea virginica*) from a relatively contaminated site in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology*. (64) 363-373.

Ordas, M.C., Ordas, A., Beloso, C., Figueras, A., 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 10, 597-609.

Paillard, C., Ashton-Alcox, K., 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.

Perdue, J., Erickson, K.L., 1984. A comparison of the gametogenetic cycle between the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the suminoe oyster *Crassostrea rivularis* in Washington State. *Aquaculture*. 37, 231-237.

Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981. Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington state. *Journal of Shellfish Research*. 1, 9-16.

Pipe, R.K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental & Comparative Immunology*. 16, 111-122.

Pouvreau, S., Enriquez-Diaz, M., Le Souchu, P., Connan, J.P., Le Roy, B., Mingant, C., Moal, J., Delaporte, M., Le Coz, J.R., Samain, J.F., 2003. Reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas*: experimental approach. *Journal of Shellfish Research*. 22, 351.

Ruiz, C., Abad, M., Sedano, L.O., Garcia-Martin, L.O., Sanchez Lopez, J.L., 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 155, 249-262.

Santarem, M.M., Robledo, J.A.F., Figueras, A., 1994. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 18, 217-222.

Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Gouilletquer, P., 1999. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquatic Living Resources*. 12, 131-143.

Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Dégremont, L., Bédier, E., Bouget, J.F., Dubois, B., Martin, J.L., Enriquez-Diaz, M., Faury, N., Le Moine, O., Renault, T., Gagnaire, B., Samain, J.F., 2003. Characterization of summer mortalities of *C. gigas* in France relation to environmental parameters. *Journal of Shellfish Research*. 22, 354.

Soletchnik, P., Gagnaire, B., Madec, P., Geairon, P., Le Moine, O., Renault. A cytometric morpho-functional analysis of the hemocytes in the Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in two contrasted field environments. - II - Searching for relationships between hemocyte parameters, sexual maturation and mortality. *submitted to Fish and Shellfish Immunology*.

Soudant, P., Paillard, C., Choquet, G., Lambert, C., Reid, H.I., Marhic, A., Donaghy, L., Birkbeck, T.H., 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= Tapes, =Ruditapes) *philippinarum*. *Aquaculture*. 229, 401-418.

Utting, S.D., Millican, P.F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. 155, 45-54.

Volety, A.K., Oliver, L.M., Genthner, F.J., Fisher, W.S., 1999. A rapid tetrazolium dye reduction assay to assess the bactericidal activity of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 172, 205-222.

Watanuki, H., Yamaguchi, T., Sakai, M., 2002. Suppression in function of phagocytic cells in common carp *Cyprinus carpio* L. injected with estradiol, progesterone or 11-ketotestosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 132 C, 407-413.

Yamaguchi, T., Watanuki, H., Sakai, M., 2001. Effects of estradiol, progesterone and testosterone on the function of carp, *Cyprinus carpio*, phagocytes *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 129 C, 49-55.

Yonge, C.M., 1926. Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *Journal of Marine Biology Association U.K.* 14, 295-386.

Synthèse du 1^{er} article :

"Impact of food availability on energetic storage and related hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle"

Ce premier article sera soumis au journal : *Aquaculture*.

L'objectif de cette première étude était de déterminer l'effet de la quantité de nourriture sur les réponses physiologiques d'huîtres *C. gigas* au cours d'un cycle annuel. Les résultats de cette 1^{ère} expérimentation GIGAREPRO ont permis de mettre en évidence que le cycle de reproduction des huîtres (alternance croissance germinale vs somatique), associé aux variations saisonnières de température mimant celles de Marennes-Oléron, a significativement plus influencé les paramètres énergétiques et hématocytaires des huîtres que la quantité de nourriture fournie aux huîtres (4% et 12% du poids sec d'algues par poids sec de chair d'huîtres). Aussi les résultats ont été discutés d'abord en fonction du cycle de reproduction et ensuite en fonction de la quantité de nourriture fournie.

Pendant la période de gamétogenèse active (Mai-Juin), le développement du tissu gonadique s'est accompagné d'une consommation en glucides et en ATP au niveau cellulaire (charge énergétique adénylique, CEA) pour les huîtres. Cette consommation d'énergie associée à la gamétogenèse est en accord avec les études de Mori *et al.* (1965), Perdue & Erickson (1984), Ruiz *et al.* (1992), Berthelin *et al.* (2000) ou encore Li *et al.* (2000). En Juillet-Août, lorsque les huîtres sont matures, l'ensemble des réserves énergétiques des huîtres sont au plus bas. D'après Ivanovici (1980), les faibles valeurs de charge énergétique adénylique relevées pendant la période estivale Juillet-Août indiquent un stress partiel pour les animaux. Pendant cette même période, une réduction du nombre d'hémocytes circulants et de la capacité de phagocytose et d'adhésion de ces hémocytes a été observée. La diminution transitoire de la capacité de phagocytose et d'adhésion des hémocytes n'est pas en phase avec la consommation des réserves énergétiques, mais elle pourrait être liée à un changement hormonal en association avec le cycle saisonnier. En effet, on sait que les oestradiols peuvent inhiber l'activité de phagocytose des macrophages de la carpe *Cyprinus carpio* (Yamaguchi *et al.*, 2001; Watanuki *et al.*, 2002).

Au cours de la phase de résorption de la gonade et de restauration du tissu gonadique, l'ensemble des paramètres énergétiques augmente à nouveau. Les huîtres restaurent leurs réserves énergétiques (glucides et CEA) et investissent l'énergie dans la croissance somatique. Parallèlement, une forte augmentation des concentrations hémocytaires est observée. Celle-ci pourrait résulter soit d'une redistribution des hémocytes au sein de l'organisme ou soit de la production de nouveaux hémocytes pour la phagocytose des gamètes résiduels. Ceci corrobore les observations de Mathieu *et al.* (2003). Ces auteurs ont décrit une infiltration hémocytaire au niveau du tissu gonadique au moment de la résorption des gamètes. A cette même période, les hémocytes présentent une activité de phagocytose élevée et une bonne capacité d'adhésion.

En ce qui concerne l'effet de la quantité de nourriture sur les paramètres physiologiques, il est intéressant de noter que pendant la gamétogenèse active l'excédent d'énergie fourni aux huîtres nourries avec la ration alimentaire de 12% a notamment permis à ces huîtres de développer une gonade plus volumineuse (Enriquez-Diaz, 2004), et à un moindre degré de sauvegarder plus d'énergie (glucides) disponible par rapport à celles nourries avec la ration de 4%. Par ailleurs, des différences significatives de concentrations hémocytaires, d'activité de phagocytose et de production d'espèces actives de l'oxygène existent entre les huîtres des deux rations alimentaires. Elles semblent être liées aux efforts de reproduction différents entre les huîtres. Ainsi, les plus fortes concentrations hémocytaires reportées pour les huîtres nourries avec la ration alimentaire de 12% peuvent refléter (1) la possibilité pour ces huîtres d'investir plus d'énergie dans la production d'hémocytes ou (2) la nécessité d'avoir plus d'hémocytes pour le développement et ultérieurement la résorption de leur gonade.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'infection expérimentale réalisée en Juillet par injection avec *Vibrio lentus* (M. Gay, IFREMER La Tremblade ; S. Pouvreau *et al.*, 2003) a mis en évidence que les huîtres, qui ont investi plus d'énergie dans le développement de la gonade (12%), se sont révélées les plus sensibles au challenge bactérien. Ceci souligne l'existence d'un lien étroit entre l'effort de reproduction des huîtres et leur plus grande susceptibilité aux pathogènes.

Dans le cadre du programme MOREST, Enriquez-Diaz (2004) a aussi mis en évidence que les huîtres de phénotype « S » ont un effort de reproduction plus grand et ont été plus sensibles aux mortalités estivales (Moal *et al.*, 2003) que les huîtres de phénotypes « R ». D'autre part, Soudant *et al.* (2002) et Lambert *et al.* (en préparation) ont aussi démontré l'existence de différences dans les paramètres hématologiques entre des huîtres de phénotypes « R » et « S » placées sur trois sites ostréicoles différents. Par conséquent, comme il a été démontré dans cette première étude que la quantité de nourriture influence l'effort de reproduction (Enriquez-Diaz, 2004) et les paramètres énergétiques et hématologiques des huîtres, il est apparu intéressant d'étudier les effets combinés du phénotype « R » et « S » des huîtres et de la quantité de nourriture sur leurs paramètres énergétiques et hématologiques en milieu contrôlé et ce pendant la période de gamétogenèse active. Cette étude fait l'objet du second article.

2^d article : "Differences in biochemical composition and immunological parameters between two different genetic stocks of Pacific oysters *Crassostrea gigas* : resistant vs susceptible to summer mortalities"

Maryse Delaporte^a, Philippe Soudant^{b*}, Christophe Lambert^b, Marine Jegaden^a, Jeanne Moal^a, Stéphane Pouvreau^a & Jean-François Samain^a •

Abstract

Three resistant "R" families and two susceptible "S" families were respectively pooled in two groups "R" and "S". These two groups were exposed for 6 months to two food levels (4% and 12% of algal dry weight per oyster dry weight) and to a temperature gradient that mimics that of Marennes-Oléron during the reproduction period of oysters. Biometrical, biochemical and immunological parameters of the two oyster groups were thus measured monthly. Dry weight, condition index, carbohydrate and lipid contents of oysters were highly influenced by food level showing significantly higher values for oysters fed the 12% diet compared to those fed the 4% diet. Interestingly, "R" and "S" oysters appeared to present different strategies of reproduction. "S" oysters seemed to develop more gonad tissue than "R" oysters as suggested by their highest total lipid content. Consequently, a gradient of gonad development was observed as followed: 12% S > 12% R > 4% S > 4% R. A similar gradient in cumulative mortality rate was reported in July during a mortality event. This highlights a possible link between the highest gonad development of oysters and the highest oyster susceptibility to mortalities. Immune parameters were also significantly affected by oyster phenotypes, food levels and reproduction processes. Interestingly, during active gametogenesis, "S" oysters had a higher reactive oxygen species (ROS) production than "R" oysters regardless of the dietary conditioning. Phagocytic activity of hemocytes was slightly affected by the oyster phenotype showing a higher phagocytosis activity in hemocytes from "S" oysters. Moreover, phagocytosis was temporarily affected by gametogenesis. A

• ^a Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, centre IFREMER de Brest, BP70, 29280 Plouzané, France

^b Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France.

* Corresponding author (Philippe.Soudant@univ-brest.fr)

significant decrease of this activity, observed in May 2003, was thought to be related to a hormonal change. Hemocyte concentration, mostly hyalinocytes, was low and slightly higher for oysters fed the 12% diet and for “S” oysters. Finally, high increase of hemocyte concentration was reported in July during the mortality event suggesting a bacterial infection at this date.

Keywords: *Crassostrea gigas*, genetic stocks, immune parameters, biochemical composition, summer mortalities

Short title : Oyster genetic stocks, reproduction and immunity

Introduction

Since 1991, summer mortalities have been reported in the Pacific oysters *Crassostrea gigas* in French sea farms affecting both adults and juveniles (Goulletquer *et al.*, 1998). In Japan, where the first summer mortality events were recorded, studies concluded that the mortalities were likely the result of physiological stress associated to high eutrophication in areas of high primary production and water temperature exceeding 20°C. These conditions coincided also with the period of maximum gonad development (Hershberger *et al.*, 1984). It was also concluded that although *Vibrio* spp. may play a significant role in laboratory mortality, they do not appear to be a causative pathogen under field conditions (Hershberger *et al.*, 1984). Genetic selection of *C. gigas* was employed to limit summer mortalities in Japan and the USA. Interestingly, selection of thermotolerant oysters was found to improve the survival during summer period (Beattie *et al.*, 1980).

As in Japan and the USA, summer mortalities in France are generally associated with temperatures above 20°C, and coincided with the period of sexual ripeness in oysters. To date, some pathogen agents have been detected and isolated during summer mortality events (Lacoste *et al.*, 2001 ; Waechter *et al.*, 2002 ; Le Roux *et al.*, 2002 ; Gay *et al.*, 2003), but they have not been clearly and systematically implicated in those mortalities. Mortalities were suggested to depend on multi-factorial parameters : combination of environmental, physiological and pathological factors (Waechter *et al.*, 2002). Oyster summer mortality in France was found to be linked, to some extent, to genetic variability in oysters (Ernande, 2001). Thus, in order to better understand the respective influence of genetic variability and of the environment on oyster summer mortality events in France, IFREMER has developed a national multidisciplinary program, named MOREST.

In 2001, oysters were selectively bred based on their ability to survive summer mortalities. The result of these breedings identified different resistant (“R”) and susceptible (“S”) families (Dégremont, 2003). Interestingly, this first generation of “R” and “S” oysters had different immune parameters after 4 months of rearing in three different sites (Soudant *et al.*, 2002 ; Lambert *et al.*, submitted). The following summer, two pools of three “R” and “S” families (first generation) were reared in Fort Espagnol (Morbihan, France) in order to study their gametogenesis during the summer period (Enriquez-Diaz, 2004). From this study, it appeared that “R” and “S” oysters presented different strategies of reproduction, with “S”

oysters exhibiting an earlier and higher gonad development. Moreover, “S” oysters were more susceptible to summer mortalities (15%) than “R” oysters (5%) (Moal *et al.*, 2003).

In a parallel study, Delaporte *et al.* (in prep., cf. 1^{er} article) demonstrated that immune parameters of non-selected oysters were influenced by reproductive processes during a one year hatchery experiment. Active gametogenesis in May-June was observed to result in a reduction of the number of circulating hemocytes (primarily hyalinocytes), adhesion capacity and phagocytic activity of hemocytes. This depletion appeared to be partially related to energetic consumption but this deficit was not compensated by increasing food supply. Indeed, increasing food supply (from 4 to 12% of algal dry weight per oyster dry weight) resulted in an increased percentage of gonad occupation indicating a higher gonad development (Enriquez-Diaz, 2004).

From the above studies, it is likely that immune parameters are directly and/or indirectly affected by active gametogenesis and summer mortality phenotype but the interaction between these endogeneous factors is still in question.

The present study tested the combined effects of oyster phenotype and food levels (4% and 12% of algal dry weight per oyster dry weight) on the biochemical composition and immunological parameters of oysters from April to September, during a period of active reproduction.

Material and Methods

Broodstock conditioning

Oysters were produced in 2002 in the IFREMER hatchery at La Tremblade (Charente, France) from broodstocks selected on their survival phenotype in 2001. Two phenotypes were considered for selection: “R” for oysters resistant to summer mortalities and “S” for susceptible oysters. Spat from several “R” and “S” families were reared at the IFREMER station in Bouin (Vendée, France) and kept in a commercial hatchery in Normandy (France) during the winter period of 2002-2003. In March 2003, one-year-old oysters from three families with “R” phenotype were mixed to constitute a “R” stock population and similarly oysters of two “S” families were mixed together to constitute a “S” stock. “R” and “S” oysters were then conditioned at the IFREMER shellfish laboratory in Argenton (Finistère, France)

from April to September 2003, in separate 700-L raceways. “R” and “S” oysters were both divided in two groups which were fed either 4% or 12% of algal dry weight per oyster dry weight (termed as 4% and 12% diets). Although Dégremont (2003) demonstrated no difference in growth and weight between “R” and “S” oysters, in the present study “S” oysters presented a higher dry weight than “R” oysters. The algal diet consisted of a mixture of four micro-algae: *T-Iso* (*Isochrysis aff. galbana*, clone Tahiti), *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum* and *Tetraselemis chui* provided in equal proportions (1/4, 1/4, 1/4, 1/4). In May, mortality events associated to the *Vibrio aestuarianus* were reported (J.L. Nicolas, com. pers.) and counteracted by addition of antibiotics. Oyster mortality was daily followed during the whole experiment. During the dietary conditioning, the annual average of photoperiod and temperature cycle of Marennes-Oléron was applied. Spawning was induced at the end of August. Tanks and oysters were cleaned daily. Monthly, 20 oysters were sampled for immune analysis. At the end of the experiment, “S” oysters fed the 12% diet could not be sampled because those oysters suffered substantial mortalities during the conditioning and an insufficient number of oysters remained for the final sampling.

Condition index

At each sampling date, total (shell and flesh), shell and whole wet flesh weights of 10 oysters were measured after bleeding for immune analysis described in following paragraphs. Individual animals were frozen in liquid nitrogen (-196°C) and ground with a Danguomeau homogeniser. An aliquot of powder of individual sample was placed in pre-weighed aluminium cups, dried for 48h at 80°C and then weighed again for dry weight measurement. The remaining powder was used for biochemical analyses. Whole oyster dry flesh weight was calculated from the whole wet flesh weight based on the dry to wet weight ratio of the aliquot of powder. The condition index of oysters was then calculated as described by Walne & Mann (1975) following the formula: dry flesh weight / dry shell weight X 1000.

Biochemical composition

Biochemical analyses were performed on 10 individual oysters. Depending on the quantity of powder available per animal, 300 to 600 mg of powder was re-suspended with 2 to 3 ml of distilled water, and then sub-sampled for total lipid (400 µl), protein (200 µl) and carbohydrate analyses (200 µl). Total lipid contents were estimated according to Bligh &

Dyer (1959) after extraction in a dichloromethane-ethanol-water mixture. The purified extract was placed in a pre-weighed teflon cup, evaporated under a nitrogen stream, and the lipid content was estimated by weighing. Carbohydrate and protein contents were measured colorimetrically following the procedure of Dubois *et al.* (1956) and Lowry *et al.* (1951), respectively. Only results of carbohydrate and lipid contents were presented in this study and were expressed as percentage of oyster dry tissue weight.

Measurements of immunological parameters by flow cytometry

The characterisation of hemocyte type, number and functions were realised using a FACScalibur Becton-Dickinson flow cytometer equipped with a 488 nm argon laser. Measurements of different immune parameters are described hereafter. All working solutions of fluorescent probes were used at 1/100 final concentration (v:v) in all the immune assays

Hemolymph sampling

Hemolymph was withdrawn from individual oysters using a 1 ml plastic syringe fitted with a 25-gauge needle via a notch adjacent to the adductor muscle. Oysters were notched just prior to bleeding. All hemolymph samples were examined microscopically to check for contamination and then stored in micro-tubes held on ice. Thereafter, three pools of five individual samples were realised and used for all functional immune assays, except that hemocyte concentrations were measured on 10 individual samples per treatment.

Bacteria and extra-cellular products of bacteria preparation

A *Vibrio* sp. strain S322 was used as a challenge for the hemocyte adhesive capacity assay. This strain was demonstrated to be pathogenic for larvae of the scallop *Pecten maximus* and the oysters *C. gigas* and *Ostrea edulis* (Nicolas *et al.*, 1996). The *Vibrio* sp. S322 suspension was prepared as described by Lambert *et al.* (2003).

Extra-cellular products (ECP) of the *Vibrio aestuarianus* were prepared according to Labreuche *et al.* (in revision) and were used to stimulate the reactive oxygen species (ROS) production. Preliminary assays showed that ECP was a good inducer of ROS production by *C. gigas* hemocytes (Lambert *et al.*, submitted ; Labreuche *et al.*, in revision).

Viability, total and hemocyte sub-population concentration

These three parameters were measured on the same sub-sample. 100 μl of hemolymph was filtered through an 80 μm mesh nylon and transferred into a tube containing a mixture of anti-aggregant solution (AASH) and filtered sterile seawater (FSSW) (200 μl and 100 μl respectively). AASH was prepared according to Auffret and Oubella (1995). Samples were simultaneously incubated with 4 μl of SYBR Green I (final concentration 10X), and 4 μl of iodide propidium (final concentration of 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) working solutions in the dark at room temperature for 60 minutes before flow cytometry analysis. SYBR Green I working solution was prepared by diluted 10 times in FSSW the commercial solution 10,000X in dimethyl sulfoxide (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). PI working solution, a fluorescent dye specific for nucleic acid, which permeates membranes of dead cells, was prepared by dissolving 1 mg PI (PI, Sigma, St Quentin Fallavier, France) in 1 ml of distilled water. The SYBR Green fluorescence was measurable at 500-530 nm on the FL1 detector (green) of the flow cytometer while the fluorescence of PI was detected at 550-600 nm on the FL3 (red). Percentage of hemocyte mortality was calculated as the ratio of the number of dead cells (stained by SYBR Green and PI) on the number of all cells stained by SYBR Green.

All SYBR Green stained cells were represented on a Forward SCatter height (FSC, size) and Side SCatter height (SSC, complexity) cytogram which allowed identification of hemocyte sub-populations. Three sub-populations were distinguished according to their size and complexity: granulocytes, hyalinocytes and small agranulocytes. Only total hemocyte concentrations, granulocyte and hyalinocyte sub-population concentrations (expressed as the number of cells. ml^{-1}) were presented as granulocytes and hyalinocytes accounted for 60-95% of total hemocytes and agranulocytes were considered to have low activity (Lambert *et al.*, 2003).

Phagocytosis assays

A 100 μl sub-sample of hemolymph, diluted with 100 μl of FSSW, was incubated with 30 μl of the fluorescent bead working solution. Fluorescent bead working solution was prepared from fluoresbrite microspheres YG 2.0 microns stock solution (Polysciences, Eppelheim, Germany) diluted to 2% in FSSW. After 60 minutes of incubation at 18°C, hemocytes were fixed with 230 μl of a 6% formalin solution and analysed at 500-530 nm on

the FL1 detector by flow cytometry to detect cells containing fluorescent beads. The phagocytic activity of hemocytes was estimated by the percentage of hemocyte that have engulfed two beads and more.

Adhesion capacity

Hemocyte adhesion capacity was performed according to a modified procedure of Choquet *et al.* (2003). Two sub-samples of each hemolymph pool were distributed in 24-well microplates (100µl per well). 100 µl of FSSW were added to the first sub-sample as a control and 100 µl of *Vibrio* sp. S322 suspension to the second (50 bacteria / hemocyte). After three hours of incubation, the supernatant containing non adhering hemocytes was transferred into a tube for flow cytometer analysis and the hemocytes were fixed by addition of 200 µl of a 6% formalin solution. Hemocytes were then incubated with SYBR Green I (final concentration 10X) for 30 minutes in the dark at room temperature before flow cytometer analysis. Cell concentrations were then evaluated by flow cytometry as described above. Results are expressed as the percentage of adhering hemocytes with or without bacteria, relative to the initial hemocyte concentration.

Reactive oxygen species production

Reactive oxygen species (ROS) production by hemocytes was measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). DCFH-DA working solution was prepared by diluting 10 times the DCFH-DA stock solution (10mM, in DMSO, Sigma) in FSSW. ECP of the *Vibrio aestuarianus* was used to stimulate the ROS production of hemocytes. For this assay, a 100 µl aliquot of hemolymph was diluted with 200 µl of FSSW in a tube to which 100 µl of ECP (30 µg/ml final concentration) was added. In another tube, hemolymph was diluted with 300 µl of FSSW (as a control). Four µl of the DCFH-DA working solution was added to each tube while maintained on ice. Tubes were then incubated at 18°C for 120 minutes. After the incubation period, DCF production, quantitatively related to the ROS production of hemocytes with and without stimulation, was measured at 500-530 nm on the FL1 detector of the flow cytometer. Unstimulated ROS production (FSSW) was expressed as the mean geometric fluorescence detected in hemocyte sub-populations (in arbitrary units). The ratio of the mean DCF fluorescence detected in hemocytes in presence of ECP to the

mean DCF fluorescence detected in hemocytes in FSSW was then calculated. This ratio reflects the ability of ECP to stimulate ROS production of the hemocytes. A ratio above 1 represents a stimulation of the ROS production.

Statistical analysis

Multifactor analysis of variance (MANOVA) were performed for all biochemical and immune parameters using STATGRAPHICS Plus 5.1 (Statistical Graphs Corp.) in order to test the effects of diet, phenotype and date. Although statistical analysis were realised with regards to each condition (12% R, 12% S, 4% R and 4% S), in order to simplify data presentation, results from “R” and “S” oysters were pooled in order to clarify dietary effect (4% and 12%), and results from oysters fed 4% and 12% were also pooled to show only oyster phenotype effect. Percentage data were transformed (arcsin of the square root) before MANOVA, but are presented in figures and tables as untransformed percentages.

Results

Oyster mortality

Cumulative mortality was monitored throughout the whole experiment. Cumulative mortality remained below 5% during the 2 first months of the experiment. A rapid increase in mortality was noticed in July (Figure 1), resulting in differences in mortality according to the dietary treatment and oyster phenotype. Oysters fed the 12% diet exhibited higher mortalities than those fed the 4% diet, while “S” oysters had higher mortalities than “R” oysters. Consequently, a gradient in oyster cumulative mortality was observed: 12% S > 12% R > 4% S > 4% R from July until the end of the experiment.

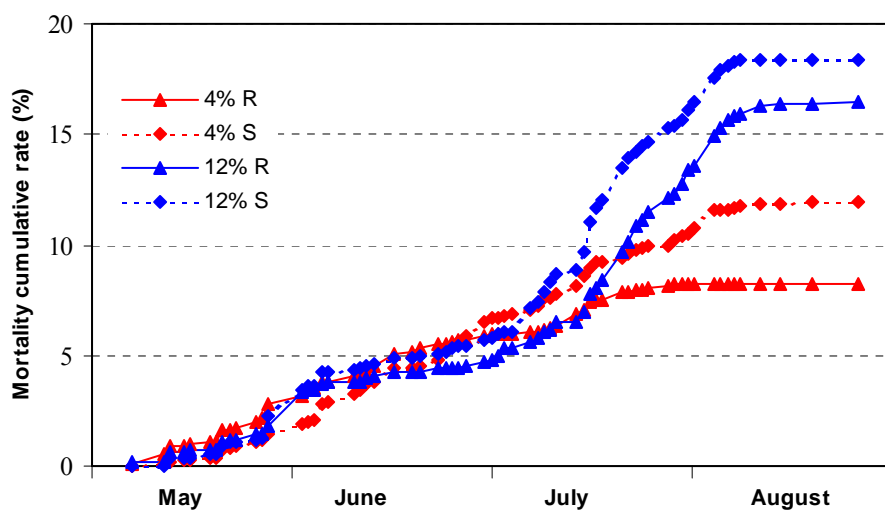


Figure 1 : Cumulative mortality of resistant “R” and susceptible “S” oysters fed two food levels (4 and 12% of algal DW/oyster DW) reported during the experiment.

Dry weight

When all sampling dates were considered, oyster dry weight was highly affected by food level, oyster phenotype and date (Figure 2, MANOVA, $p < 0.001$). The highest oyster dry weight was in oysters fed the 12% diet (MANOVA, $p < 0.0001$) and for “S” oysters (MANOVA, $p < 0.01$). However, no differences due to oyster phenotype was in oysters fed the 12% diet (MANOVA, $p > 0.05$). By contrast, a significant difference in oyster dry weight were observed between “R” and “S” oysters fed the 4% diet with the higher values in “S” oysters (MANOVA, $p < 0.0001$). Over the whole experiment, a significant effect of date was reported (MANOVA, $p < 0.0001$). Oysters fed the 12% diet had higher dry weights especially in July, August and September while dry weights of oysters fed the 4% diet did not change during the experiment.

Condition index (CI)

Condition index was significantly affected by food levels (Figure 3, MANOVA, $p < 0.0001$), but not by oyster phenotype (MANOVA, $p > 0.05$). Oysters fed the 12% diet had a higher condition index than those fed the 4% diet. In oysters fed the 4% diet, MANOVA revealed a significant effect of date with a continuous and slight decrease of the CI throughout the experiment ($p < 0.0001$).

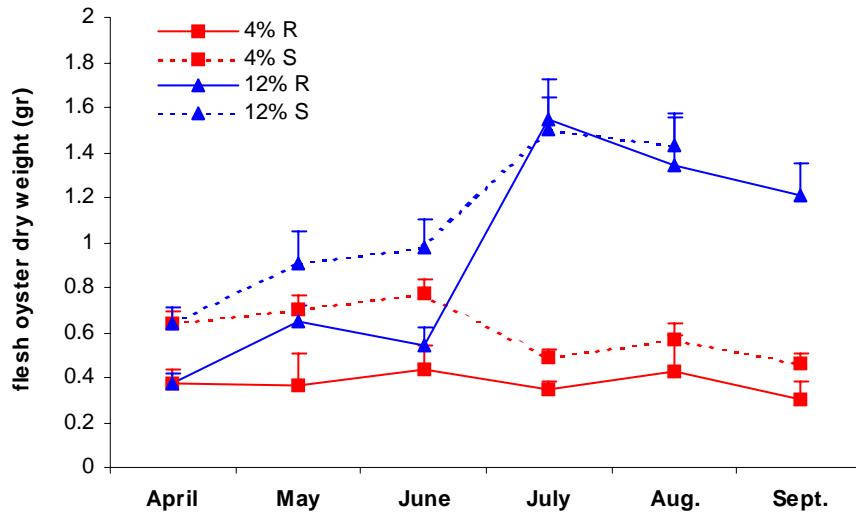


Figure 2 : Flesh oyster dry weight of resistant “R” and susceptible “S” oysters fed two food levels (4 and 12% of algal DW/oyster DW)(mean \pm SE, n=10).

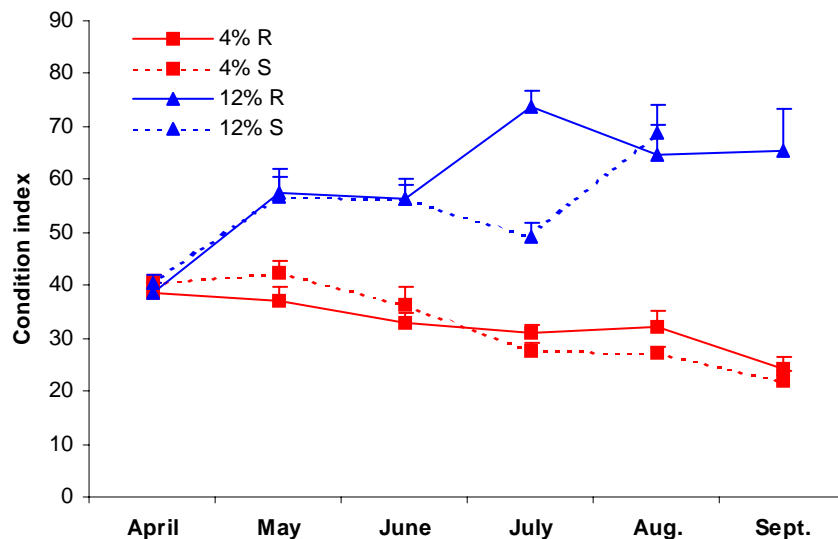


Figure 3 : Condition index of resistant “R” and susceptible “S” oysters fed two food levels (4 and 12% of algal DW/oyster DW)(mean \pm SE, n=10).

For oysters fed the 12% diet, no effect of date was reported (MANOVA, $p>0.05$). It should be noted that in July “S” oysters fed the 12% diet had a significant lower CI than the “R” oysters fed the 12% diet (ANOVA, $p<0.05$).

Biochemical composition

Carbohydrate content

Across all sampling dates, carbohydrate content of oysters was not affected by oyster phenotype (Figure 4, $p>0.05$). A significantly higher carbohydrate content was reported in oysters fed the 12% diet compared to oysters fed the 4% diet ($p<0.001$). Carbohydrate content was also greatly affected by date ($p<0.0001$) in both diets phenotypes. Carbohydrate content decreased from May to August and then increased in the last month.

Total lipid content

Interestingly, for each dietary treatment, a significantly higher lipid content was observed in “S” oysters compared to “R” oysters (Figure 4, $p<0.05$). Total lipid content was also significantly affected by the dietary conditioning ($p<0.0001$). Oysters fed the 12% diet presented a higher lipid content than those fed the 4% diet. As with carbohydrate content, total lipid content was affected by date ($p<0.05$). Total lipid content increased from April to June-July, stayed stable until August, and then decreased in September.

Hemocyte mortality

Percentage of hemocyte mortality was similar between both dietary treatment and “R” and “S” oysters and were low during over whole conditioning ($<5\%$ i.e more than 95% of cell viability, data not shown).

Granulocyte and hyalinocyte concentrations

As total hemocyte concentration was mostly represented by hyalinocytes and granulocytes (Figure 6), only changes in these hemocyte sub-population concentrations of “R” and “S” oysters fed the two dietary conditionings are detailed below.

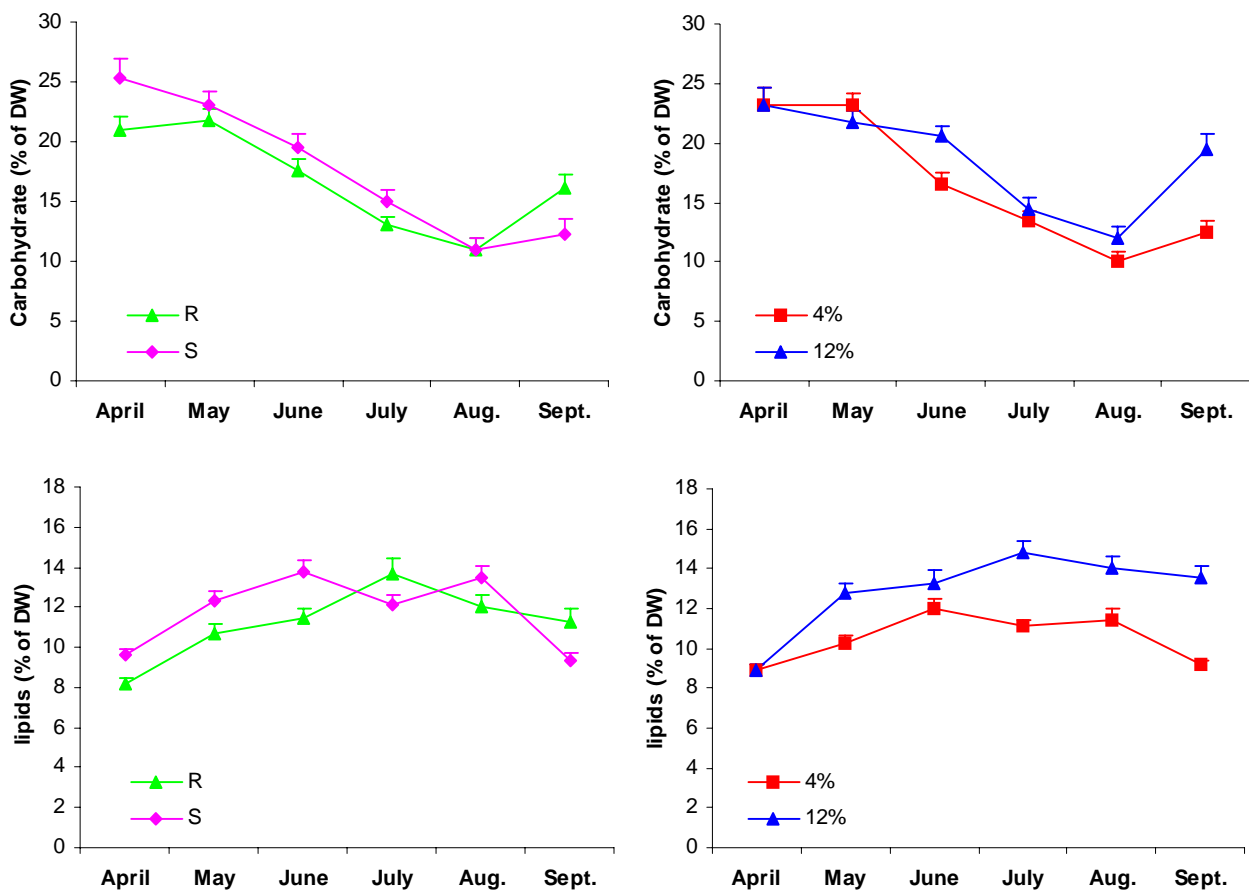


Figure 4: Total carbohydrate and lipid contents of oysters according to dietary treatment (4 and 12% of algal DW/oyster DW), and oyster phenotype (resistant “R” and susceptible “S”) (mean \pm SE, $n=20$). Results were expressed as % of oyster dry weight.

Hyalinocytes which represented the predominant hemocyte sub-population, were not affected by the oyster phenotype ($p>0.05$), but were affected by the dietary conditioning (Figure 6, MANOVA, $p<0.0001$). Over the whole experiment, oysters fed the 12% diet possessed more hyalinocytes than those fed the 4% diet. Neither oyster phenotype or dietary treatment affected granulocyte concentrations (MANOVA, $p>0.05$), the second main hemocyte sub-population (around 20%). The most significant changes in hyalinocyte and granulocyte concentrations were related to the sampling date ($p<0.0001$ and $p<0.001$ for hyalinocytes and granulocytes respectively). Differences were mainly due to a drastic increase in both cell types in July. Past July, hyalinocyte concentrations stayed at this high level while granulocyte concentrations decreased to their initial levels.

Phagocytosis activity

Results showed that oyster phenotype slightly but significantly affected the phagocytic activity of hemocytes (Figure 7, MANOVA, $p < 0.05$) while no dietary conditioning effect was observed (MANOVA, $p > 0.05$). Over the whole experiment, “S” oysters had significantly higher phagocytic activity in comparison to “R” oysters. Also, the phagocytic activity of hemocytes significantly varied between dates with the lowest phagocytic activity in May and the highest in June ($p < 0.0001$).

Adhesive capacity

Results showed that oyster phenotype significant affect the adhesive capacity of hemocytes in FSSW conditions (Figure 8, MANOVA, $p < 0.05$). Hemocytes of “S” oysters exhibited a higher adhesive capacity than for hemocytes of “R” oysters. However, no difference between “R” and “S” was reported when hemocytes were exposed to *Vibrio* sp. S322 ($p > 0.05$). Meanwhile, hemocytes of oysters fed the 4% and 12% diet had a similar adhesive capacity ($p > 0.05$) considering each incubation condition.

The adhesive capacity of hemocytes varied also during the experiment ($p < 0.05$ in FSSW and $p < 0.0001$ in presence of *Vibrio* sp. 322). The lowest hemocyte adhesive capacity was reported in June when hemocytes incubated in FSSW whatever the oyster phenotype or dietary treatment. Moreover, hemocytes exhibited a lower adhesive capacity when incubated in presence of *Vibrio* sp. 322 than in FSSW ($p < 0.0001$). The level of inhibition by *Vibrio* sp. 322 increase after June for all treatments.

Reactive oxygen species production

The reactive oxygen species (ROS) production of oyster hemocytes was greatly influenced by oyster phenotype for both hyalinocyte and granulocyte sub-populations (MANOVA, $p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively; Figure 9). ROS production was higher in “S” oysters in May and June than in “R” oysters. After this period, differences between oyster populations were not seen. There was no effect of diet or date on the two hemocyte sub-populations (MANOVA, $p > 0.05$).

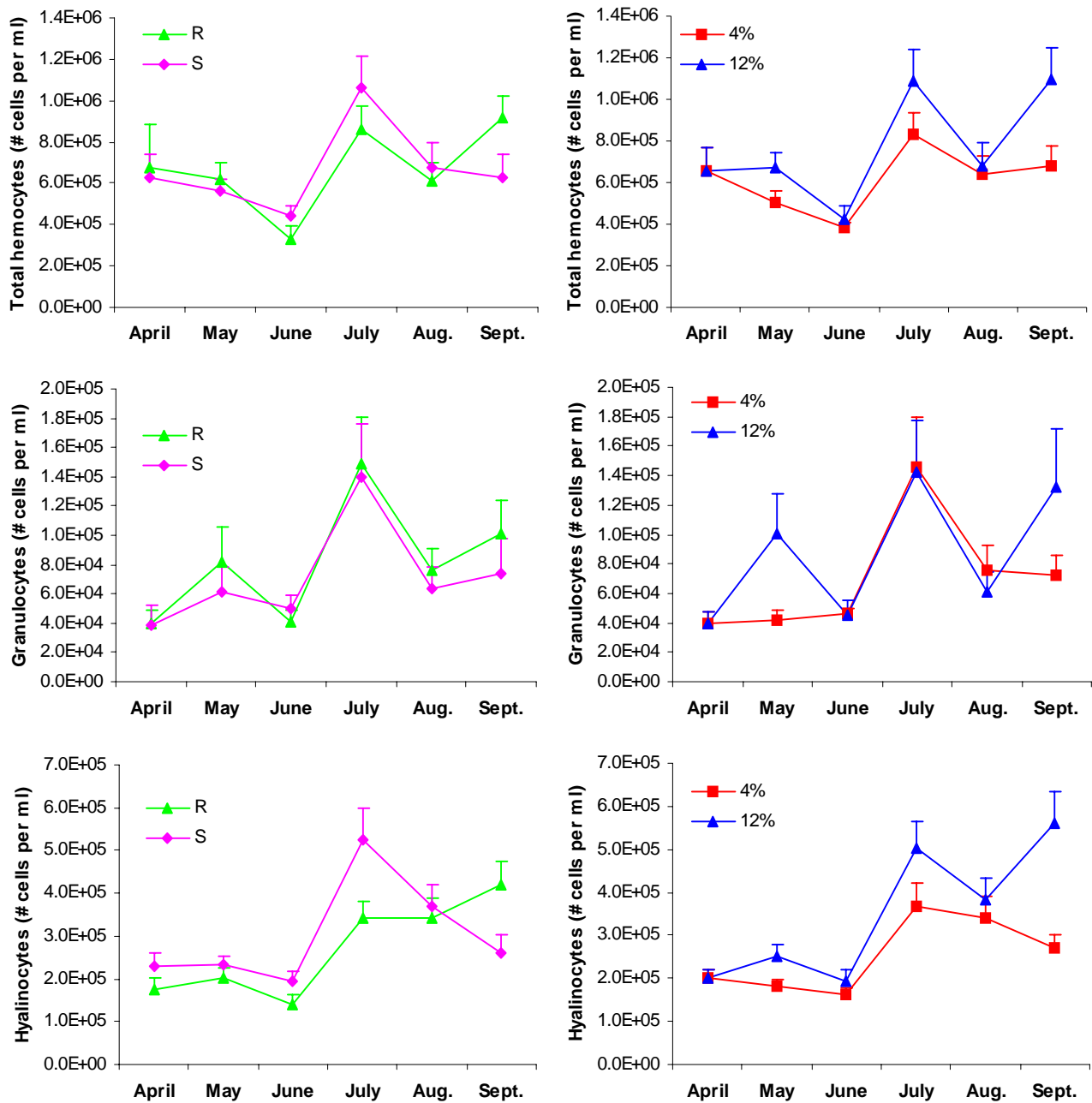


Figure 6: Changes in total hemocyte, granulocyte and hyalinocyte concentrations of oysters according to dietary treatment (4 and 12% of algal DW/oyster DW), and to oyster phenotype (resistant “R” and susceptible “S”) (mean \pm SE, n=20).

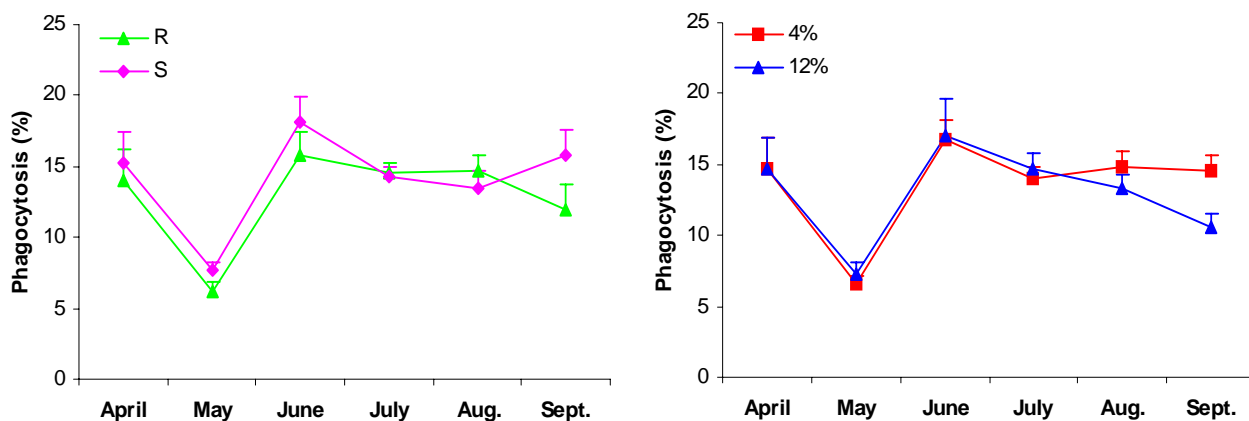


Figure 7 : Phagocytic activity of hemocytes of oysters according to dietary treatment (4 and 12% of algal DW/oyster DW) and oyster phenotype (resistant “R” and susceptible “S”) (mean ± SE, n=20).

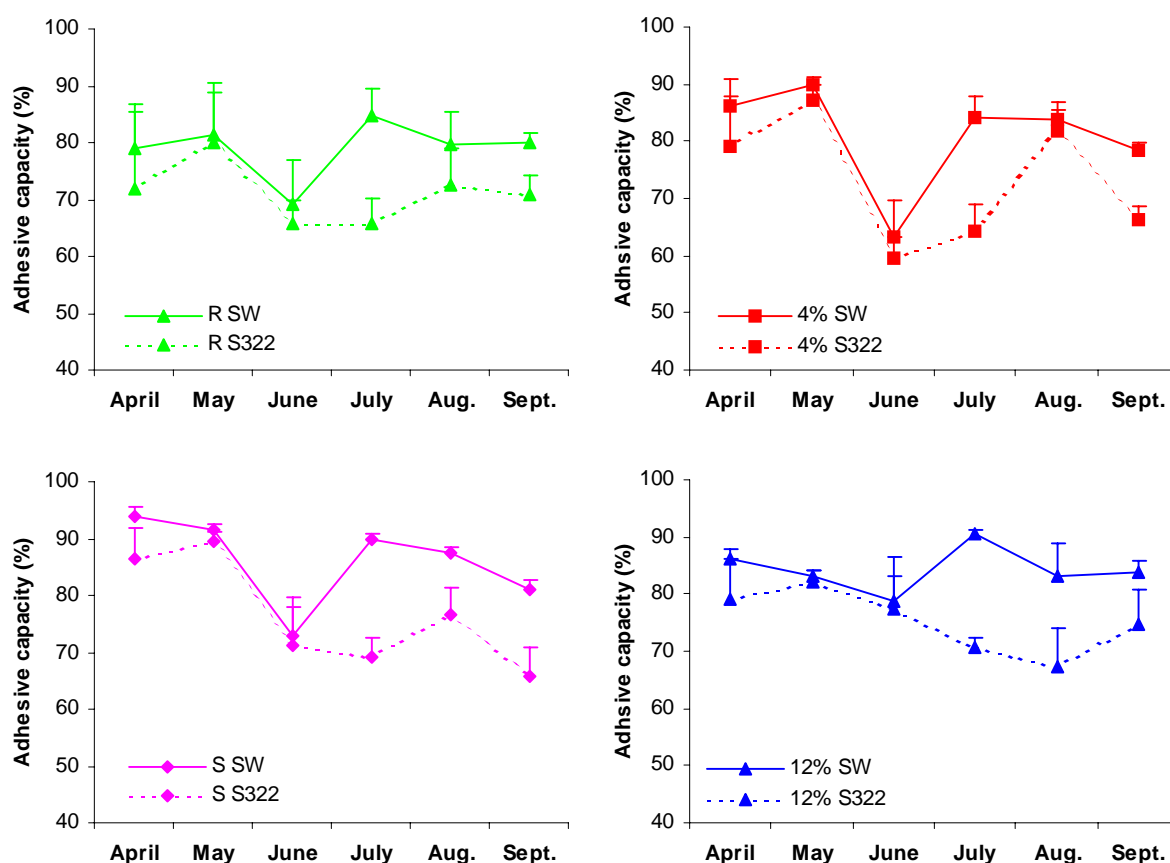


Figure 8 : Adhesive capacity of hemocyte of oysters to dietary treatment (4 and 12% of algal DW/oyster DW) and oyster phenotype (resistant “R” and susceptible “S”) in seawater (SW) or in presence of the *Vibrio* sp. S322 (mean ± SE, n=8).

ECP was efficient in inducing an increase of reactive oxygen species production as showed by the ratio of ECP : FSSW (mean DCF fluorescence detected in hemocytes in presence of ECP to the mean DCF fluorescence detected in FSSW condition; ratio ~ 2.5, data not shown). However, no differences between the two diets, “R” and “S” phenotype, or dates were observed in the ECP : FSSW ratio (MANOVA, $p > 0.05$).

Discussion

Resistant “R” and susceptible “S” pools of *Crassostrea gigas* families, selected on their response to summer mortality (MOREST project), were reared under hatchery conditions with two food levels (4% and 12% of algal dry weight per oyster dry weight) and exposed to a temperature cycle which mimics the seasonal pattern observed in Marennes-Oléron during the reproduction period of oysters. The aim of this study was to test the combined effects of oyster phenotype and food levels on the biochemical composition and immunological parameters of oysters during the period of active reproduction. All statistics are summarized in Table 1.

First, it has to be noticed that results of the present study are in good agreement with our previous study (Delaporte *et al.*, in prep., cf. 1^{er} article) on the impact of a quantitative dietary conditioning (12% vs 4%) on biochemical and immune parameters of an unselected pool of oysters reared during an annual reproductive cycle.

Feeding oysters the 12% diet resulted in a higher oyster dry weight, condition index, carbohydrate and lipid content than those fed the 4% diet, as observed in our previous study. The reproductive intensity was also significantly modified by the food levels (Enriquez-Diaz, 2004 ; Delaporte *et al.*, in prep.). The additional food provided by the 12% diet was mainly invested in a higher gonad development reflected by a higher lipid increase. However, carbohydrate difference between the two diets was small during the spring period corroborating that energy is allocated in priority to gonads and poorly to storages at this period.

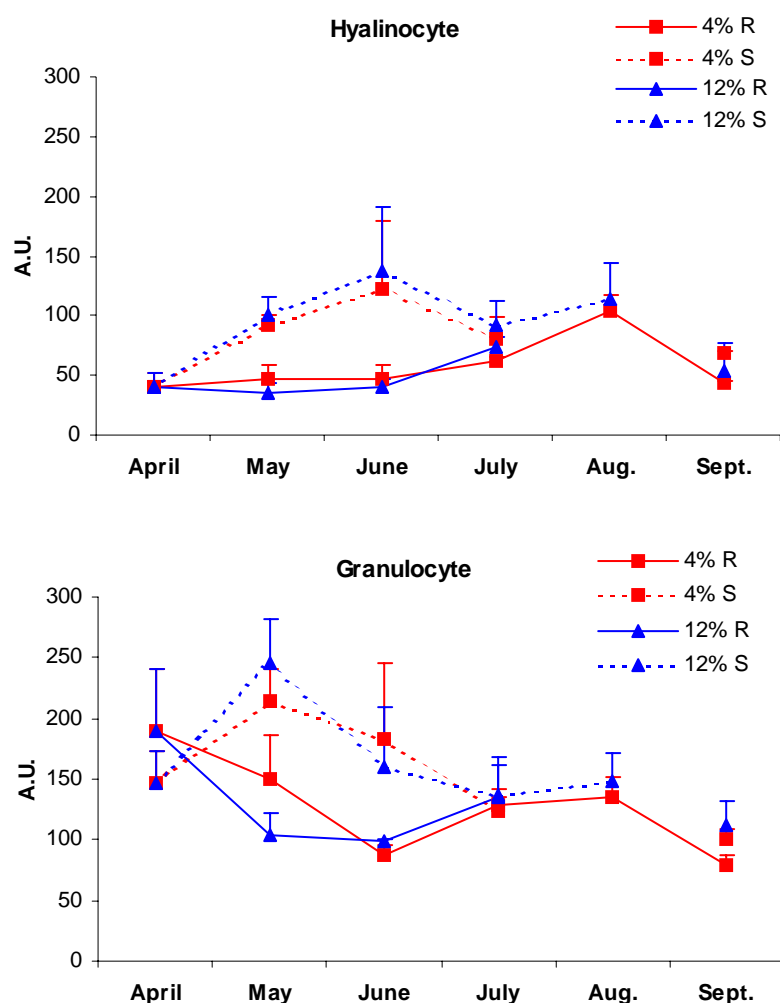


Figure 9 : Reactive oxygen species production of hemocytes of resistant “R” and susceptible “S” oysters fed two food levels (4 and 12% of algal DW / oyster DW) (mean \pm SD, n=3). A: Hyalinocyte sub-population. B: Granulocyte sub-population.

Carbohydrate similarly decreased in both studies during the gametogenesis process strengthening all previous studies stating that there is a drastic energy consumption during reproduction processes of oysters (Mori *et al.*, 1965 ; Perdue & Erickson, 1984 ; Ruiz *et al.*, 1992 ; Berthelin *et al.*, 2000).

With regards to hemocytes parameters, changes in hemocyte concentration followed two different patterns : (1) a low hemocyte concentration during gametogenesis, and (2) an increase in hemocyte concentration during the gamete resorption and restructuring period. Additionally, higher hemocyte concentrations were found in oysters which developed more gonad tissue and partially spawned (i.e. those fed the 12% diet). This suggests that hemocytes may play an important role in gonad resorption. Moreover, the reversion of hemocyte

concentration trends at the end of gametogenesis may reflect a change in energy allocation between germinal and somatic metabolism. A photoperiod signal may control this change in energy allocation as observed in the scallop *Pecten maximus* (Saout *et al.*, 1999).

A similar temporary decrease of phagocytosis activity was observed in both studies although the decrease occurred in May in the present study instead of June. This confirmed that the decrease observed in phagocytosis was not the result of an energy deficiency associated with gametogenesis, which could prevent oysters from investing energy in this immune activity, or an increase of seawater temperature above 19°C. This suggests that a hormonal control may exist in relation to gametogenesis or other unidentified factors may be involved. Yamaguchi *et al.* (2001) and Watanuki *et al.* (2002) demonstrated that *in vitro* and *in vivo* inhibition of the phagocytosis activity of the carp *Cyprinus carpio* with estradiol, progesterone and 11-ketotestosterone. Surprisingly, the loss of hemocyte adhesive capacity (in June) was not quite synchronized with the decrease in phagocytosis (in May) as observed in Delaporte *et al.* (in prep.), and even though Beckmann *et al.* (1992) reported a relationship between hemocyte phagocytosis and adhesive capacity.

Difference between "R" and "S" oysters from April to June

In contrast with our previous study (Delaporte *et al.*, in prep.), a mortality phenomenon was reported in the present study starting in May associated to the presence of *Vibrio aestuarianus*. It was temporally counteracted by a 2 days antibiotic treatment (in May and June). After this first episode, mortality stayed low but dramatically increased in July when seawater temperature was above 19°C and concomitantly with partial spawning. At this date, no search of pathogen occurrence was performed and no antibiotics were used. This led to distinguish two phases in our experiment : (1) period before high mortality from April until June, coinciding with active gametogenesis, (2) high mortality period in July which was associated with partial spawning. Physiological differences between resistant "R" and susceptible "S" oysters will be thus discussed according to these phases.

In the present study, it was demonstrated that gametogenesis process depended on the oyster phenotype, but at a lesser extent than food levels. "S" oysters presented a higher total lipid content than "R" oysters, suggesting a greater gonad development for "S" oysters. As a consequence, in this study, a gradient in gonad development was demonstrated : 12% S > 12% R > 4% S > 4% R. This difference in reproductive strategy between "R" and "S" oysters

was previously stated by Enriquez-Diaz (2004) using histological analyses. The author demonstrated that “S” oysters developed more gonad tissue than “R” oysters when reared at the same location (Fort Espagnol, Morbihan, France) and had apparently different spawning strategies. However, no differences in carbohydrate consumption was observed between “S” and “R” oysters even though carbohydrate is considered to be an energetic support for gametogenesis.

One of the most striking result regarding hemocyte activities was the high difference between “R” and “S” oysters in reactive oxygen species (ROS) production. In May and June, hyalinocytes and granulocytes of “S” oysters had a much higher ROS production than those of “R” oysters regardless of dietary treatment. These differences in ROS production may result of a differential infection level between “R” and “S” oysters as mortality phenomenon associated to *Vibrio aestuarianus* started in May. Indeed Labreuche *et al.* (in revision) demonstrated that extra-cellular products (ECP) of *Vibrio aestuarianus* were observed to stimulate ROS production. So, it can be speculated that *Vibrio aestuarianus* infection resulted in the production of ECP within the hemolymph of oysters affecting differentially ROS production by “R” and “S” oysters. The slight higher hemocyte concentration and phagocytosis activity of “S” oysters could be also a response to this potential differential of infection level. Indeed, increase in phagocytosis activity was observed 24h after an experimental infection (Delaporte, data not shown), although inhibition of phagocytosis activity is often reported in infected/diseased animals (Allam *et al.*, 2001; Ordás *et al.*, 2000). Consequently, more investigations are needed to confirm the effect of bacteria infection on modulation of immune parameters in these oysters (balneation vs injection, dose effect...).

Moreover, these differences may also reflect a genetic difference between the two oyster populations. Similarly, Soudant *et al.* (2002) and Lambert *et al.* (submitted) demonstrated a significant phenotype effect (“R” vs “S”) on ROS production of 7 month old oysters reared 4 months in three different locations. In their study, “S” oysters had a significantly higher ROS production than “R” oysters in October. These differences in ROS production between the two oyster populations may resulted in different capability of hemocytes of “R” oysters to rapidly detoxify ROS at those dates. This suggests that concurrently with selection for the phenotype “survival” to summer mortalities, some selection may have occurred for enzymes of detoxification (superoxyde dismutase, catalase, glutathione peroxidase).

Table 1: Summary of the statistical analysis for each parameters measured during the experiment. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

	Date effect	Diet effect	Phenotype effect		
Condition index	NS	****	12% > 4%	NS	-
Carbohydrate content	***	***	12% > 4%	NS	-
Lipid content	NS	****	12% > 4%	*	S > R
Hemocyte mortality	****	NS	-	NS	-
Hyalinocyte count	****	***	12% > 4%	NS	-
Granulocyte count	***	NS	-	NS	-
Phagocytosis	****	NS	-	*	S > R
Adhesive capacity (FSSW)	*	NS	-	*	S > R
Adhesive capacity (S322)	***	NS	-	NS	-
Ratio S322/ FSSW	****	NS	-	NS	-
ROS Production :					
Hyalinocytes	NS	NS	-	***	S > R
Granulocytes	NS	NS	-	**	S > R

FSSW : Filtered Sterile Sea Water. *S322*: *Vibrio sp. 322*. Ratio *S322/ FSSW* = ratio of adhesive capacity of hemocyte in presence of *S322* to adhesive capacity in *FSSW*, this ratio represents adhesive capacity susceptibility of hemocyte to the *Vibrio sp. 322*.

To determine the origin of the difference of ROS production between “R” and “S” oysters and the physiological implications of such differences, different measurements of enzymatic activity associated to ROS production in “R” and “S” oysters would be interesting to assess at different stages of their reproductive cycle.

Phagocytosis activity of hemocytes was slightly but significantly affected by oyster phenotype. “S” oysters exhibited a higher phagocytosis activity than “R” oysters. Concomitantly, the adhesive capacity of hemocytes was also significantly higher for “S” oysters. Interestingly, no difference in phagocytosis activity or adhesive capacity were reported between oysters fed the 4% and 12% diets even though feeding oysters the 12% diet led to a higher energy content and greater gonad development. These results suggested that the highest phagocytosis activity and adhesive capacity of “S” oysters was not linked with either the energetic or the reproductive status of those oysters, but may more reflected of genetic difference. To date, it is difficult to confirm this genetic effect. Indeed, in their study, Lambert *et al.* (submitted) did not analyse phagocytosis activity of hemocytes of different families.

Difference between “R” and “S” oysters in July

In July, when oysters were ripened, partial spawning was observed for “S” oysters as reported by the slight decrease in total lipids and by turbidity change in tanks (S. Pouvreau, pers. com.), while the significant decrease in total lipids observed in early September resulted from an induced spawning. At this date, high mortalities were also reported and the gradient of mortality paralleled the one of the gonad development ($12\% \text{ S} > 12\% \text{ R} > 4\% \text{ S} > 4\% \text{ R}$). This gradient of mortality agreed with the result of the experimental bacterial infection realised in a previous study (Pouvreau *et al.*, 2003). Oysters that invested more energy in the reproductive process ($12\% > 4\%$) were more susceptible to an experimental bacterial infection of *Vibrio lentus*. Consequently, a link between the mortality event and the reproductive status of the oysters seemed to exist. Thus, it can be suggested that in the present study the higher gonad development and partial spawning of “S” oysters, especially those fed the 12% diet, may have enhanced their susceptibility to infection. As no significant differences between “R” and “S” oysters and oysters fed the 4% and 12% in the use of carbohydrate were demonstrated at this date, it is necessary to estimate whether differences in susceptibility to mortalities may be related oyster capacities to mobilise glucose to face infections.

Concurrently with the mortality event, a temporary high increase in hemocyte (granulocyte and hyalinocytes) concentrations was observed in July while in Delaporte *et al.* (in prep.) hemocyte concentrations stayed low during summer. It is speculated that the high increase in hemocyte concentration observed in July reflects a possible response to bacterial infection. Indeed, increases of circulating hemocytes were generally reported in bivalves infected with pathogens in studies of Ford *et al.* (1993), Paillard *et al.* (1996), Oubella *et al.* (1996), Carballal *et al.* (1998), Ordas *et al.* (2000) and Cochenec-Laureau *et al.* (2003). A redistribution of the hemocytes throughout the circulatory system or hematopoiesis is thought to occur in response to bacterial infection. Interestingly, more the oysters were affected by mortalities, higher was the increase of hemocyte concentrations ($12\% > 4\%$ and “S” > “R”).

During the same period, no difference in phagocytosis activity and ROS production was reported ; however as more hemocytes were generated in July, more hemocytes with these activity should be found in order to fight the infection. Meanwhile, when measuring adhesive capacity, hemocyte exhibited a higher susceptibility to *Vibrio* sp. 322 (loss of 20%). This suggest that hemocytes were more susceptible and weakened at this period and unable to counteract the effect of the *Vibrio* sp. 322.

Conclusion

The present study confirmed seasonal changes in energetic and immune parameters observed in Delaporte *et al.* (in prep.) according to food level. Moreover, it was demonstrated that these parameters were influenced by oyster phenotype “R” vs “S”. During the gametogenesis, “S” oysters were demonstrated to develop more gonad tissue as reported by the higher total lipid content of those oysters. Interestingly, during the same period, “S” oysters presented an significant higher ROS production than “R” oysters. Slight differences were also demonstrated for phagocytosis activity and hemocyte concentration. These results may reflect genetic difference between oyster phenotype ; however, it may also result of difference in bacterial exposition. Indeed, in May, mortality phenomenon associated to *Vibrio aestuarianus* started to affect oysters and was counteracted by antibiotic treatment. In July, high mortality was again reported. Interestingly, those mortalities affected oysters which presented the highest gonad development (12% S > 12% R > 4% S > 4% R) and partially spawned. Consequently, the higher gonad development and partial spawning of “S” oyster seemed to aggravate this phenomena and may partially explain their higher susceptibility to summer mortality. In regard to summer mortalities, if “R” oysters have some advantages over “S” oysters because of their differential strategy of reproduction, “R” oysters fed the 4% diet seemed present the better advantages over others oysters perhaps just because they developed less gonad tissue. It will be interesting to pursue such multi-parametric study of oyster physiological status and to extend it to the comparison of diploid and triploid oysters reared in the same conditions.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Lionel Dégremont, Dr Pierre Boudry and all co-workers from La Tremblade for the spat production of the oysters used in the present study and our colleagues of the Argenton hatchery for taking care of oysters during the experimental conditioning. This research was a part of the MOREST project supported by a grant from IFREMER, the Région Bretagne, Région Normandie, Région Pays de Loire, Région Poitou-Charente and the Conseil Général du Calvados.

References

- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A. & Ford, S.E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Develop. Comp. Immunol.*, (25) 365-375.
- Auffret, M. & Oubella, R., 1995. Cytological and cytometric analysis of bivalves molluscs hemocytes, in: (Eds: Stolen, J.S., Fletcher, C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaattari, S.L., Anderson, R.S., Soderhall, K. & Weeks-Perkins, B.A.). Fair Haven: SOS Publication.
- Beattie, J.H., Chew, K.K. & Hershberger, W.K., 1980. Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*. (70) 184-189.
- Berthelin, C., Kellner, K. & 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.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. (37) 911-917.
- 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.
- 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.
- Dégremont, L., 2003. Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de l'Université de Caen*.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S. & Samain, J.F. Impact of food availability on energetic storage and related hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. (in preparation, cf. 1^{er} article)

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. (28) 350-356.

Enriquez-Diaz, M., 2004. Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale*.

Ernande, B., 2001. Développement, plasticité phénotypique et évolution. *Thèse de l'Université de La Rochelle*.

Fisher, W.S., Oliver, L.M. & Edwards, P., 1996. Hematologic and serologic variability of Eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. *Journal of Shellfish Research*. (15) 555-564.

Ford, S.E., Ashton-Alcox, K.A. & Kanaley, S.A., 1993. *In vitro* interactions between bivalve hemocytes and the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Aquaculture*. (88) 285-301.

Gay, M., Lancelot, G., Chollet, B., Renault, T., Cochenec-Laureau, N., Berthe, F., Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C., Gouy, M., Le Roux, F. & Gouletquer, P., 2003. Characterization of *Vibrio* isolated from Pacific oysters spat suffering from summer mortality outbreaks. *Journal of Shellfish Research*. (22) 331.

Gouletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N. & Taillade, S., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). (CM 1998 / CC14) p.20.

Hershberger, W.K., Perdue, J.A. & Beattie, J.H., 1984. Genetic selection and systematic breeding in Pacific oyster culture. *Aquaculture*. (39) 237-245.

Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C. & Nicolas, J.L., in revision. *In vitro* effects of extracellular products (ECPs) from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on the oyster *Crassostrea gigas* cellular immune responses. *Developmental & Comparative Immunology*.

Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cueff, A. & Poulet, S.A., 2001. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied Environmental Microbiology*. (67) 2304-2309.

Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G. & Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry. A tool to evaluate pathogenic *Vibrio* inhibiting capacity. *Fish and Shellfish Immunology*. (15) 225-240.

Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J. & Samain, J.F. Modulation of reactive oxygen species (ROS) production in *Crassostrea gigas* hemocyte "oxidative burst": specific activity of granulocytes and hyalinocytes. *submitted to Developmental & Comparative Immunology*.

Lambert, C., Soudant, P., Degrémont, L., Choquet, G., Delaporte, M., Moal, J., Paillard, C., Soletchnik, P., Joly, J.P., Ropert, M., Bédier, E., Huvet, A. & Samain, J.-F.. Hemocyte parameters in families of *Crassostrea gigas* reared under different environmental conditions and selected for differential survival during summer. *submitted to Fish and Shellfish Immunology*.

Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L. & Berthe, F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*. (15) 251-258.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. 265-275.

Moal, J., Bédier, E., Fleury, P.G., Langlade, A., LeCoguic, Y., Dégremont, L., Boudry, P., Le Coz, J.R., Pouvreau, S., Enriquez-Diaz, M., Lambert, C., Soudant, P. & Samain, J.F., 2003. Genetic variability in reproduction and summer mortality in *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*. (22) p. 345.

Mori, K., Tamate, H., Imai, T. & Itikawa, O., 1965. Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima bay. V. Changes in the metabolism of lipids and glycogen of the oyster during the stages of sexual maturation and spawning. *Bulletin of Tohoku Reg. Fisheries Research Laboratory*. (25) 49-63.

Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R. & Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop (*Pecten maximus*) larval culture. *Diseases of Aquatic Organisms*. (27) 67-76.

Ordas, M.C., Ordas, A., Beloso, C. & Figueras, A., 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. (10) 597-609.

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. & 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.

Perdue, J. & Erickson, K.L., 1984. A comparison of the gametogenetic cycle between the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the suminoe oyster *Crassostrea rivularis* in Washington State. *Aquaculture*. (37) 231-237.

Pouvreau, S., Enriquez-Diaz, M., Le Souchu, P., Connan, J.P., Le Roy, B., Mingant, C., Moal, J., Delaporte, M., Le Coz, J.R. & Samain, J.F., 2003. Reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas*: experimental approach. *Journal of Shellfish Research*. (22) 351.

Ruiz, C., Abad, M., Sedano, L.O., Garcia-Martin, L.O. & Sanchez Lopez, J.L., 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (155) 249-262.

Saout, C., Quéré, C., Donval, A., Paulet, Y.M. & Samain, J.F., 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest. *Aquaculture*. (172) 301-314.

Soudant, P., Lambert, C., Choquet, G., Ford, S., Paillard, C., Dégremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Soletchnik, P., Joly, J.P., Ropert, M., Bédier, E., Huvet, A. & J.F., S., 2002. Relationships between summer mortalities and defence mechanisms in families of *Crassostrea gigas* reared in different environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*. (21) p. 407.

Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.L., Marissal, E. & Berthe, F., 2002. Characterisation de bactéries pathogènes de naissain d'huitre creuse *Crassostrea gigas*: Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *Comptes Rendus Biologies*. (325) 231-238.

Walne, P.R. & Mann, R., 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Ninth European Marine Biology Symposium*. (in Barnes, H. (Ed.)) 587-607.

Watanuki, H., Yamaguchi, T. & Sakai, M., 2002. Suppression in function of phagocytic cells in common carp *Cyprinus carpio* L. injected with estradiol, progesterone or 11-ketotestosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (132 C) 407-413.

Yamaguchi, T., Watanuki, H. & Sakai, M., 2001. Effects of estradiol, progesterone and testosterone on the function of carp, *Cyprinus carpio*, phagocytes *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (129 C) 49-55.

Synthèse du 2^d article :

"Differences in biochemical composition and immunological parameters between two different genetic stocks of Pacific oysters *Crassostrea gigas*: resistant vs susceptible to summer mortalities"

Ce second article sera soumis au journal : *Aquaculture*.

Cette deuxième expérimentation GIGAREPRO avait pour objectif de caractériser les différences physiologiques entre deux pools de familles d'huîtres *C. gigas*, sélectionnées selon le critère de survie aux mortalités estivales, de phénotype « R » (résistantes) et « S » (susceptibles) au cours d'un cycle de reproduction (Avril-Septembre) et en fonction de la quantité de nourriture fournie (4% et 12% du poids sec d'algues par poids sec de chair d'huîtres).

Il est tout d'abord important de souligner que la majorité des résultats de cette seconde étude a confirmé ceux obtenus au cours de la première expérimentation GIGAREPRO concernant l'effet de la gamétogenèse sur les paramètres physiologiques des huîtres. Ainsi, les huîtres nourries avec la ration alimentaire de 12% présentent tout au long de l'expérimentation un index de condition, un poids sec de chair, une teneur en glucides et lipides plus élevés que celles nourries avec la ration de 4%. Elles ont aussi développé une gonade plus volumineuse. Comme dans la précédente étude et les études de Mori *et al.* (1965), Perdue & Erickson (1984), Ruiz *et al.* (1992), Berthelin *et al.* (2000) ou encore Li *et al.* (2000), le développement de la gonade s'est traduit par une consommation des réserves énergétiques. Par ailleurs, l'évolution de la concentration hémocytaire ressemble globalement à celle observée au cours de l'expérimentation GIGAREPRO 1 : les concentrations sont faibles pendant la gamétogenèse active et augmentent au moment de la résorption du tissu gonadique. Enfin, le même phénomène de diminution temporaire de l'activité phagocytose des hémocytes est observé pendant la gamétogenèse. Ceci confirme que cette diminution ne relève pas d'une déficience en énergie. Mais, elle pourrait être liée à un changement hormonal comme celui observé par Yamaguchi *et al.* (2001) et Watanuki *et al.* (2002) pour les macrophages de carpe *Cyprinus carpio*.

Néanmoins, à l'opposé de la première étude, des mortalités ont été observées au cours de l'expérimentation GIGAREPRO 2. Initialement, elles ont été associées au *Vibrio aestuarianus* et traitées à l'aide d'antibiotiques. Puis, en Juillet, un nouvel épisode de mortalité a été reporté. Ce dernier n'a pas été enrayé par l'utilisation d'antibiotiques compte tenu de la proximité de la fin de l'expérimentation. Aussi, les paramètres physiologiques des huîtres ont été discutés selon deux phases : (1) une période avant les mortalités de Juillet (Avril à Juin) pendant la gamétogenèse active des huîtres, et (2) une période pendant les mortalités de Juillet et les pontes partielles.

Tout d'abord, il a été démontré que les huîtres de phénotype « S » ont une teneur en lipides plus élevée que les huîtres « R » suggérant qu'elles ont développé plus de tissu gonadique. Ceci est en accord avec les résultats de Enriquez-Diaz (2004) qui révèlent que les huîtres « S » élevées *in situ* ont une stratégie de reproduction différente des huîtres de phénotype « R » placées sur le même site. Ainsi, au cours de l'expérimentation GIGAREPRO 2, un gradient a pu être observé pour le volume d'occupation de la gonade : 12% S > 12% R > 4% S > 4% R.

Pendant la gamétogenèse active (Avril-Juin) et avant les mortalités, le résultat le plus marquant est le fort différentiel de production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) entre les huîtres (sans stimulation). Les huîtres de phénotype « S » ont produit plus de ROS que celles de phénotype « R » et ce indépendamment de la ration alimentaire. Ces différences de production de ROS pourraient être liées à un différentiel d'exposition entre les huîtres « R » et « S » au *Vibrio aestuarianus*, agent pathogène responsable des mortalités reportées en Mai. Même si la production des ROS *in vitro* n'est pas toujours activée par la présence des bactéries pathogènes (Lambert *et al.*, soumise), Labreuche *et al.* (en révision) ont démontré que les produits extra-cellulaires du *Vibrio aestuarianus* stimulaient la production de ROS des hémocytes. Ces différences pourraient aussi résulter d'une différence génétique entre les huîtres « R » et « S » pour certaines enzymes de détoxification des ROS. Parallèlement à la sélection basée sur le critère de survie, il est possible que des enzymes de détoxification des ROS aient aussi été sélectionnées différemment. D'autres études sont encore nécessaires pour comprendre les différences de production de ROS entre les huîtres des deux phénotypes à cette période.

Pendant la période des mortalités de Juillet, les huîtres nourries avec la ration alimentaire de 12% et celles de phénotype « S », c'est-à-dire celles qui ont développé le plus de tissu gonadique, ont aussi été les plus touchées par les mortalités. Parallèlement, des pontes partielles ont été observées chez ces huîtres à la même période. Aussi, il semblerait que le développement d'une gonade volumineuse et les pontes partielles aggravent la susceptibilité des huîtres aux mortalités. A cette même période, les concentrations hémocytaires ont significativement augmenté. D'après la littérature, cette forte augmentation laisse supposer une réponse à une infection bactérienne (Ford *et al.*, 1993 ; Paillard *et al.*, 1996 ; Oubella *et al.*, 1996 ; Carballal *et al.*, 1998 ; Ordas *et al.*, 2000). Les huîtres les plus affectées par les mortalités ont une concentration hémocytaire plus élevée (12% > 4%, et « S » > « R »). Par ailleurs, les hémocytes présentent des activités de phagocytose et de production de ROS élevées. Néanmoins, la plus forte perte de capacité d'adhésion des hémocytes en présence du *Vibrio* sp. 322 à cette période souligne que les hémocytes sont plus fragiles et moins efficaces pour lutter face au *Vibrio* sp. 322.

SYNTHESE ET CONCLUSION

« Effet de la quantité de nourriture sur les paramètres physiologique de l'huître creuse *C. gigas* »

Au cours des deux expérimentations GIGAREPROs, les analyses histologiques ont permis de mettre en évidence que l'excédent d'énergie apporté avec la ration alimentaire de 12% a été investi dans le développement d'une gonade plus volumineuse par rapport aux huîtres nourries avec la ration de 4% (Coquard, 2003 ; Enriquez-Diaz, 2004). Par ailleurs, il a pu être démontré que les huîtres de phénotype « S » ont une stratégie de reproduction différente des huîtres « R » (Coquard, 2003 ; Enriquez-Diaz, 2004). Les huîtres « S » développent plus de tissu gonadique que les huîtres « R ». Quels que soit la ration alimentaire (4% vs 12%) et le phénotype des huîtres (« R » vs « S »), le développement du tissu gonadique s'est accompagné d'une consommation en glucides et en ATP au niveau cellulaire (CEA) pour les huîtres (Figure 23). Cette consommation d'énergie associée à la gamétogenèse est en accord avec les études de Mori *et al.* (1965), Perdue & Erickson (1984), Moal *et al.* (1991a et b), Ruiz *et al.* (1992), Berthelin *et al.* (2000) ou encore Li *et al.* (2000). Cependant, il est intéressant de souligner que ces paramètres sont le reflet des stocks au sein de l'animal à un moment donné et ne reflètent pas les flux de transfert d'énergie d'un compartiment vers un autre. Aussi, bien que la ration alimentaire de 12% ait permis aux huîtres de stocker initialement plus d'énergie et que la consommation des réserves énergétiques de ces huîtres soit comparable à celles des huîtres nourries avec la ration de 4%, la consommation des réserves n'est pas représentative du flux d'énergie alloué au développement de la gonade. Celui-ci serait plus important pour les huîtres nourries avec la ration alimentaire de 12%. Ceci pourrait expliquer le fait que le bilan énergétique pour la croissance (Scope for Growth, SFG) de ces huîtres soit très négatif en Juillet par rapport à celui des huîtres nourries avec la ration de 4% (Enriquez-Diaz, 2004).

En Juillet-Août, lorsque les huîtres sont matures, l'ensemble des réserves énergétiques des huîtres est au plus bas. D'après la table d'Ivanovici (1980), les faibles valeurs de charge énergétique adénylique relevées pendant la période estivale Juillet-Août indiquent une situation critique pour les animaux. Par conséquent, la reproduction, associée à la température, est non seulement un processus physiologique engendrant un coût énergétique

important mais aussi un affaiblissement des huîtres pouvant être considéré comme un stress à part entière dans certaines conditions. Cette faiblesse physiologique est certainement impliquée dans le phénomène des mortalités estivales, elle ne semble toutefois pas être une cause suffisante puisque aucune mortalité anormale n'a été observée lors de la première expérimentation GIGAREPRO.

Les deux expérimentations GIGAREPROs nous ont aussi permis d'étudier la modulation des paramètres hématocytaires en fonction de la quantité de nourriture et du phénotype des huîtres au cours d'un cycle de reproduction de l'huître *C. gigas*.

Lors de la gamétogenèse active et de la maturation des gamètes, le nombre d'hématocytes, et notamment les hyalinocytes, diminue et reste bas. Les concentrations hématocytaires sont toutefois plus élevées pour les huîtres nourries avec la ration de 12%. L'excédent d'énergie fournie à ces huîtres leur ayant permis un effort de reproduction plus important, ces huîtres nécessitent peut-être plus d'hématocytes pour le transport de nutriments vers la gonade. Il en serait de même pour les huîtres de phénotype « S » qui développent une plus grosse gonade par rapport à celles de phénotype « R ». Une telle fonction est tout à fait envisageable puisque Yonge (1926) et Feng *et al.* (1977) ont montré que les hématocytes étaient impliqués dans le transport d'éléments nutritifs de la glande digestive vers les tissus périphériques plus profonds tel que le muscle. Puis au moment de la résorption du tissu gonadique (Septembre-Octobre), l'augmentation de la concentration hématocytaire est supposée résulter soit d'une redistribution des hématocytes au sein de l'organisme soit d'une production de nouveaux hématocytes pour la phagocytose des gamètes résiduels. Aussi, comme les huîtres nourries avec la ration de 12% ont perdu de façon partielle, elles présentent donc plus de gamètes résiduels dans leur tissu gonadique par rapport aux huîtres nourries avec la ration de 4% (GIGAREPRO 1, Enriquez-Diaz, 2004), et nécessitent donc peut-être plus d'hématocytes à cette période. Ceci semble probable puisque Mathieu *et al.* (2003) ont observé une infiltration hématocytaire au niveau du tissu gonadique au moment de la résorption des gamètes. Cette saisonnalité de la concentration hématocytaire correspond à celle décrite par Fisher *et al.* (1996) pour *Crassostrea virginica* ; mais diffère avec de nombreuses autres études (Chu & La Peyre, 1993 ; Chu, 2000 ; Carballal *et al.*, 1998 ; Volety *et al.*, 1999 ; Soudant *et al.*, 2004). Ces différences sont peut-être dues à des différences physiologiques entre les animaux ou encore à la présence de pathogènes dans le milieu.

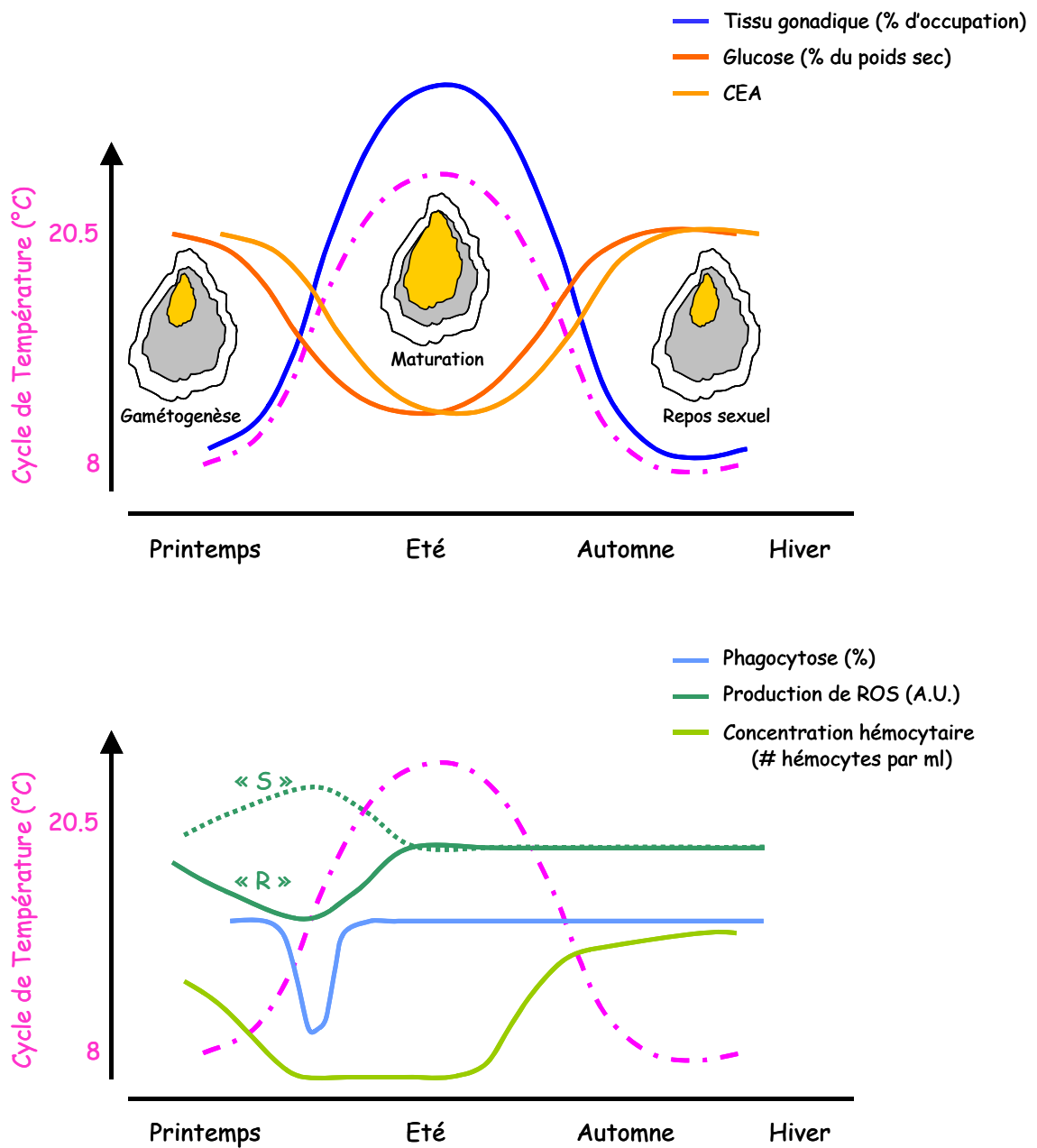


Figure 23 : Synthèse de l'évolution des paramètres physiologiques (énergétiques et hémocytaires) au cours des deux expérimentations GIGAREPROs en fonction du cycle de température.

D'autres études sont nécessaires pour mieux discriminer les fonctions de défense et de nutrition des hémocytes notamment pendant le cycle de reproduction des huîtres.

Au cours des deux expérimentations, une inhibition temporaire de l'activité de phagocytose et de la capacité d'adhésion des hémocytes a pu être observée pendant la période de la gamétogenèse (Mai-Juin). Celle-ci n'est pas associée au cycle de température, ni à l'état d'avancement de la gamétogenèse, et ni aux niveaux des réserves énergétiques (Figure 23). Soletchnik *et al.* (submitted) ont aussi reporté une inhibition de la phagocytose à la même période pour des huîtres triploïdes. Par conséquent, l'hypothèse d'un contrôle hormonal a été avancée ; les oestradiols ayant *in vitro* un effet inhibiteur sur l'activité de phagocytose de macrophages de carpe *Cyprinus carpio* (Yamaguchi *et al.*, 2001 ; Watanuki *et al.*, 2002). Mais, cette hypothèse reste à vérifier par le suivi et la mesure de telles hormones chez l'huître *C. gigas*. Il a aussi été démontré que les hémocytes des huîtres « S » ont une activité de phagocytose légèrement supérieure à celles des huîtres « R ». Ceci pourrait résulter d'une différence génétique entre les deux phénotypes (« R » vs « S »).

La production des espèces actives de l'oxygène (ROS) par les hémocytes semble quant à elle ne pas être reliée avec le cycle de reproduction des huîtres ni même corrélée avec l'activité de phagocytose. Cependant, l'utilisation des familles génétiques MOREST a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les pools d'huîtres « R » et « S » au cours de la gamétogenèse (Mai-Juin). Cette différence de production de ROS entre les huîtres « R » et « S » pourrait résulter d'un différentiel d'exposition à une bactérie qui pourrait avoir plus affecté les huîtres « S » et stimulé la production de ROS par les hémocytes pour se défendre. En effet, en Mai 2003, un épisode de mortalité associé à la présence d'une bactérie pathogène (*Vibrio aestuarianus*) a commencé à affecter les huîtres. Néanmoins, il est aussi possible que cette différence soit le reflet d'une différence génétique entre les deux phénotypes. On peut envisager qu'au cours de la sélection réalisée dans le cadre du programme MOREST sur le critère de « survie » des huîtres, des enzymes de détoxification des ROS aient été aussi sélectionnées en parallèle. Cette différence de production de ROS entre les huîtres « R » et « S » soulève de nombreuses questions. Aussi pour mieux appréhender les différences observées entre ces familles et leur signification, il est envisagé de réaliser des mesures concomitantes d'activités de diverses enzymes impliquées dans ce processus de production des ROS par les hémocytes : estérase, catalase, superoxyde

dismutase, glutathione peroxydase et de suivre ces activités après une infection expérimentale.

Dans le cadre de la problématique des mortalités estivales, l'hypothèse d'une déficience immunitaire associée à la faiblesse énergétique des huîtres à cette période avait été avancée.

Le suivi des paramètres énergétiques et hématocytaires réalisés au cours des deux expérimentations GIGAREPROs permet tout d'abord de mettre en évidence que le déficit énergétique engendré par le développement de la gonade n'est pas suffisant pour expliquer les mortalités. Aucune mortalité n'a été observée dans le cadre de l'expérimentation GIGAREPRO 1 malgré la très grande faiblesse physiologique des huîtres. Par conséquent, il semblerait qu'un facteur déclenchant soit nécessaire pour entraîner des mortalités, comme une infection, pollution, ou tout autre stress qui fragiliserait encore plus les huîtres.

Ainsi, en présence de *Vibrio aestuarianus*, les huîtres sont affectées par des mortalités. Ces mortalités ont été enrayerées par l'utilisation d'antibiotiques au début de l'expérimentation dans GIGAREPRO 2. En Juillet, une recrudescence de mortalités est observée, sans qu'elles soient contre-carrées par l'utilisation d'antibiotiques. A cette date, il est intéressant de souligner que les huîtres qui ont développé plus de gonade (12% et de phénotype « S ») ont été plus affectées par les mortalités. Parallèlement, des pontes partielles ont été observées chez ces huîtres. Par conséquent, il semblerait que le développement d'une gonade volumineuse et les pontes partielles des huîtres soit un facteur à risque important dans les mortalités estivales. Dans ces conditions, les huîtres « R » nourries avec la ration de 4% sont avantagées puisqu'elles ont développé une plus petite gonade et n'ont pas pondu. De la même façon, les huîtres triploïdes peuvent être avantagées pendant la période estivale parce qu'elles n'ont pas investi d'énergie dans le développement d'une gonade ; mais aussi parce qu'elles présentent des activités hématocytaires plus élevées (Soletchnik *et al.*, en préparation ; Gagnaire *et al.*, en préparation).

Le suivi de quelques paramètres hématocytaires décrits comme étant des éléments importants du système de défense des bivalves au cours des deux expérimentations a permis de tester l'hypothèse d'une déficience immunitaire concomitante à la faiblesse énergétique des huîtres à cette période critique. L'évolution de la capacité de phagocytose et de la production de ROS des hématocytes montrent que ces deux activités sont temporairement

affectées en Mai-Juin (Figure 23). Mais, au moment des mortalités estivales (Juillet-Août), les hémocytes présentent des activités de phagocytose et de production de ROS élevées. Aussi, ces fonctions ne semblent pas être influencées par la faiblesse énergétique des huîtres à cette période critique, ni par la quantité de nourriture et ni par le phénotype des huîtres. Par ailleurs, il semblerait que le système immunitaire des huîtres ait été activé pour contrer l'infection puisqu'on observe en Juillet 2003 plus d'hémocytes circulants c'est-à-dire aussi plus d'hémocytes actifs. Néanmoins, la plus forte perte de capacité d'adhésion des hémocytes en présence du *Vibrio* sp. 322 à cette période souligne que les hémocytes sont plus fragiles et moins efficaces pour lutter face au *Vibrio* sp. 322.

*2^{ÈME} PARTIE : EFFET DE LA QUALITE DE LA
NOURRITURE SUR LES PARAMETRES
PHYSIOLOGIQUES DE L'HUITRE*

INTRODUCTION

De nombreuses études ont montré que la qualité nutritionnelle, et notamment la composition en acides gras essentiels de l'alimentation, affectait les réponses immunitaires et la résistance à certaines maladies chez les vertébrés supérieurs (voir les revues de Alexander, 1998 ; De Pablo *et al.*, 2000a et b ; Calder, 2001 ; De Pablo *et al.*, 2002 ; Harbige, 2003), mais aussi chez les poissons (Sheldon & Blazer, 1991 ; Lin & Shiau, 2003 ; Montero *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2003) et chez la crevette (Chim *et al.*, 2001). Chez les mollusques bivalves, l'effet de la qualité de la nourriture sur les paramètres immunitaires des mollusques bivalves n'a jamais été abordé. Or, la qualité nutritionnelle des blooms phytoplanctoniques du milieu naturel pourrait affecter le système de défense des bivalves et ainsi conditionner, au moins en partie, la survie ultérieure des huîtres.

La deuxième partie de cette thèse a eu pour objectif de tester l'influence de régimes algaux mono-spécifiques sur des paramètres hématocytaires d'huîtres *C. gigas* et de palourdes *R. philippinarum*. Puis au vu des résultats de cette première étude, deux nouvelles expérimentations ont été réalisées pour tester plus particulièrement le rôle de deux acides gras dits essentiels sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse : le 20:5(n-3) et le 20:4(n-6). Les résultats de ces différentes expérimentations « qualité » sont présentés sous la forme de trois articles scientifiques.

- 3^{ème} article : Effect of a mono-algal diet on immune functions in two bivalves species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*, publié dans *The Journal of Experimental Biology*, 2003, vol. 206 (17), 3053-3064.
- 4^{ème} article : Changes in immune parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid.
- 5^{ème} article : Changes in immune parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with increasing amounts of arachidonic acid 20:4(n-6).

Par ailleurs, suite au changement de régime alimentaire entre les deux expérimentations GIGAREPROs (ajout de l'algue *Skeletonema costatum* dans le régime pour l'expérimentation GIGAREPRO 2), il est apparu important de déterminer l'impact de ce changement qualitatif du régime alimentaire sur les paramètres physiologiques des huîtres.

3^{ème} article : "Effect of a mono-algal diet on immune functions in two bivalves species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*."

L'article suivant a fait l'objet d'une publication dans *The Journal of Experimental Biology*.

Synthèse du 3^{ème} article :

"Effect of a mono-algal diet on immune functions in two bivalves species -
Crassostrea gigas and *Ruditapes philippinarum* "

L'objectif de cette première expérimentation dite « qualité » a été de déterminer si la qualité de l'alimentation pouvait modifier la composition lipidique membranaire des hémocytes et affecter leurs fonctions hémocytaires. A cette fin, des huîtres creuses *Crassostrea gigas* et des palourdes japonnaises *Ruditapes philippinarum* ont été nourries pendant 2 mois avec trois algues aux compositions en acides gras essentiels différentes. Ainsi, l'algue *Chaetoceros calcitrans* se caractérise des deux autres algues par ses fortes proportions en 20:5(n-3) et 20:4(n-6) ; par contre elle est déficiente en 22:6(n-3). Au contraire, l'algue *T-Iso* est déficiente en 20:5(n-3) et 20:4(n-6) mais riche en 22:6(n-3). La dernière algue utilisée *Tetraselmis suecica* a un niveau intermédiaire en 20:5(n-3), et elle est déficiente en 22:6(n-3) et 20:4(n-6).

Cette étude a tout d'abord permis de mettre en évidence une corrélation entre la composition en acides gras des membranes des hémocytes et celles des branchies. Les tables de corrélation et le détail de la composition en acides gras des hémocytes et des branchies des huîtres et des palourdes à la fin de l'expérimentation sont présentées dans les Annexes 3 et 4. Par ailleurs, l'effet de la qualité des régimes mono-algaux sur la composition des lipides polaires des branchies de ces deux espèces a fait aussi l'objet d'une publication sous presse dans le journal : *Comparative Biochemistry and Physiology* (Annexe 4).

Au cours de l'expérimentation, il a été démontré que la composition en acides gras des membranes des hémocytes des deux espèces (et des branchies, cf. Annexes 3, 4 et 5), principalement constituées de lipides polaires, est fortement influencée par celle de l'alimentation. Ainsi, la déficience en 22:6(n-3) de l'algue *C. calcitrans* induit une diminution de cet acide gras dans la composition des membranes des hémocytes des huîtres et des palourdes. Au contraire, l'apport en 20:5(n-3) et 20:4(n-6) permet de maintenir voire d'augmenter les proportions de ces deux acides gras. De la même manière, le régime algal *T-Iso* permet de maintenir la proportion de 22:6(n-3) dans les membranes des hémocytes alors que la proportion de 20:5(n-3) chute drastiquement. L'algue *T. suecica* marque différemment les compositions en acides gras des hémocytes des deux espèces. On a une baisse du 22:6(n-

3) et un maintien voire une légère baisse des autres acides gras : 20:5(n-3) et 20:4(n-6). Les marquages alimentaires observés sont en adéquation avec les observations faites sur des tissus différents et larves par d'autres auteurs (Delaunay *et al.*, 1993 ; Berntsson *et al.*, 1997 ; Fernandez-Reiriz *et al.*, 1998, 1999 ; Soudant *et al.*, 1997, 1999).

En ce qui concerne les paramètres hémyocytaires, à la fin des 2 mois de conditionnement, les huîtres et les palourdes nourries avec l'algue *C. calcitrans* présentent les plus fortes concentrations hémyocytaires. Par ailleurs, les hémyocytes des palourdes nourries avec ce régime algal ont aussi une activité de phagocytose et de production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) plus élevées que celles des hémyocytes des palourdes nourries avec les deux autres algues *T-Iso* et *T. suecica*. Aussi, il semblerait que les paramètres hémyocytaires des palourdes et à un moindre degré des huîtres puissent être affectés par la qualité lipidique du régime alimentaire, et peut être plus particulièrement par les changements de composition en acides gras des membranes des hémyocytes. Dans cette étude, on s'est particulièrement intéressé aux acides gras dits essentiels (20:5(n-3), 20:4(n-6) et 22:6(n-3)). En effet, les acides gras 20:5(n-3) et 20:4(n-6) sont des acides gras importants dans la réponse immunitaire chez les vertébrés supérieurs. Toutefois, il faut souligner qu'en parallèle la proportion d'autres acides gras a aussi été modifiée.

Le 20:5(n-3) et 20:4(n-6) semblent jouer un rôle important dans la modulation des paramètres hémyocytaires des palourdes et des huîtres au cours du conditionnement. Il a été supposé que le 20:5(n-3) pourrait avoir un rôle énergétique dans les fonctions hémyocytaires (phagocytose et production d'espèces actives de l'oxygène (ROS)). Le 20:4(n-6) pourrait quant à lui avoir une fonction comparable à celle observée chez les vertébrés supérieurs, notamment pour la production de ROS en association avec la phagocytose de particules étrangères (Lennartz, 1999). Il est aussi intéressant de noter que lorsque les hémyocytes d'huître sont placés dans des conditions stressantes (2h de pré-incubation à 18°C ou 30°C), on observe une corrélation positive entre le 22:6(n-3) contenu dans les membranes des hémyocytes et le taux de phagocytose. Ceci laisse envisager un rôle protecteur du 22:6(n-3) en situation de stress (Kazanawa *et al.*, 1979).

Il est difficile à partir de cette étude d'identifier précisément quel acide gras est responsable des différences de réponses immunitaires puisque la modification de la composition lipidique des hémyocytes a été obtenue par le changement de la souche d'algue.

Néanmoins, au vu de ces premiers résultats, deux nouvelles expérimentations ont été réalisées pour tenter d'élucider plus précisément les rôles du 20:5(n-3) et du 20:4(n-6), acides gras abondants dans l'algue *C. calcitrans*, sur les paramètres hématocytaires des huîtres.

Enfin, sur la base de cette étude, Hégaret *et al.* (2004) ont aussi testé l'effet de la qualité de deux régimes algaux sur les paramètres hématocytaires des huîtres *Crassostrea virginica*.

4^{ème} article : "Changes in immune parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-*Iso* supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid"

Maryse Delaporte ^a, Philippe Soudant ^d, Fu-Lin Chu ^b, Chris Langdon ^c, Jeanne Moal ^a & Jean-François Samain ^a •

Abstract

The aim of this study was to assess the effect of dietary eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) on hemocyte parameters in oysters. One-year old oysters (*Crassostrea gigas*) were fed T-*Isochrysis aff. galbana* (T-*Iso* ; low in EPA) either alone or with supplements of a lipid emulsion rich in eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) at 1%, 10% or 50% (dry weight algal ration) up to seven weeks. Results indicated oysters fed supplements of 50% and, to a lesser extent, 10% lipid emulsions had a higher total lipid content compared with oysters fed other diets and they partially spawned during the last three weeks of the seven-week feeding experiment. The lipid supplement had a significant influence on the hemocyte concentration and phagocytic activity in oysters. After 4 weeks, highest hemocyte concentrations were found in oysters fed on a supplement of 50% lipid emulsion compared with those fed on other diets but the hemocytes derived from these oysters had a significantly lower phagocytic activity. After 7 weeks of dietary conditioning, production of reactive oxygen species (ROS) without zymosan stimulation in hemocytes of oysters fed 10% and 50% lipid emulsion declined. Interestingly, at this time, ROS production in hemocytes from oysters fed 10% and 50% lipid emulsion could be re-activated by zymosan addition. By contrast, zymosan addition tended to have a negative effect on ROS production in hemocytes from oysters fed low lipid supplements.

Key words : *Crassostrea gigas*, eicosapentaenoic acid, hemocyte concentration, phagocytosis, reactive oxygen species production, immune parameters

• ^a Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, centre IFREMER de Brest, BP70, 29280 Plouzané (France)

^b Virginia Institute of Marine Science, School of Marine Science, Gloucester Point, VA-23062, Virginia (USA)

^c Coastal Oregon Marine Experimental Hatchery, Oregon State University, Newport, OR-97365, Oregon (USA)

^d Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané (France)

Short title : Hemocyte parameters and Eicosapentaenoic acid

Introduction

The impact of nutrition, especially dietary long chain (n-3) essential polyunsaturated fatty acids (PUFAs), has been extensively studied in human medical research. Fish oil, which is rich in long chain (n-3) PUFAs, has been shown to be immunosuppressive for a number of human immune functions, including *ex vivo* lymphocyte proliferation, cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell activities, and production of cytokines in human and laboratory animals (see Calder, 2001 ; Harbige, 2003 for review). Similar immunomodulatory effects were also observed in fish (Waagbø *et al.*, 1993 ; Kiron *et al.*, 1995 ; Lingenfelser *et al.*, 1995 ; Thompson *et al.*, 1996). Lingenfelser *et al.* (1995) demonstrated that macrophage phagocytic activity of the channel catfish *Ictalurus punctatus* depends on the fatty acid composition of the diet and also the rearing temperature condition. Their results suggest that macrophage long chain (n-3) PUFA enrichment via feeding fish with menhaden oil might allowed maintenance of macrophage membrane fluidity and increase phagocytic activity at 18°C while it was not beneficial when fishes were reared at 25°C.

Several studies have reported the importance of lipids in bivalve nutrition. The long chain (n-3) PUFAs, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5(n-3)) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6(n-3)) and the long chain (n-6) PUFA arachidonic acid (AA, 20:4(n-6)) are believed to be essential to bivalve nutrition (De Moreno *et al.*, 1976 ; Chu & Greaves, 1991 ; Jonsson *et al.*, 1999). Consequently, algal diets have to provide those essential PUFAs (Langdon & Waldock, 1981; Chu & Webb, 1984 ; Knauer & Southgate, 1997 ; Jonsson *et al.*, 1999) and mixed-species diets are often recommended and used in hatchery because they provide a greater range of potentially essential lipids (Enright *et al.*, 1986 ; Laing & Millican, 1986; Albentosa *et al.*, 1993 ; Brown *et al.*, 1998).

Artificial particle types, such as microcapsules (Langdon & Waldock, 1981 ; Langdon & Siegfried, 1984 ; Numaguchi & Nell, 1991), liposomes (Parker & Selivonchick, 1986), or lipid microspheres (Heras *et al.*, 1994) have been developed to substitute or supplement live algal diets with essential PUFAs. Several studies reported the effect of PUFA supplied with artificial diets on growth and development of several bivalve species: *Argopecten purpuratus* larvae (Nevejan *et al.*, 2003), *Ruditapes phillipinarum* and *Crassostrea gigas* spat (Langdon & Waldock 1981 ; Caers *et al.*, 2000), *Placopecten magellanicus* juveniles (Coutteau *et al.*, 1996), *Crassostrea gigas* adult (Robinson, 1992 ; Uriarte *et al.*, 2004) and *Ostrea edulis* adult

(Heras *et al.*, 1994). Although, they are still not used routinely in hatcheries, artificial particles can offer a practical solution to reducing PUFA deficiencies in hatchery-reared molluscs. Lipid emulsions have been described as effective carriers of essential fatty acids for bivalve nutrition. This technique can thus be used to study *in vivo* effects of essential PUFAs on immune responses of bivalve species.

The relationship between nutrition and immune responses in bivalves has been recently investigated. Delaporte *et al.* (2003) have demonstrated that Pacific oysters *Crassostrea gigas* and Manila clams *Ruditapes philippinarum* fed *Chaetoceros calcitrans* alga, which is rich in 20:5n-3 (17.8 %), showed higher hemocyte concentration, reactive oxygen species production and phagocytic activity than animals fed *T-Isochrysis aff. galbana* or *Tetraselmis suecica*. Both *T-Isochrysis aff. galbana* or *Tetraselmis suecica* contain small amounts of 20:5n-3 (0.4 and 5.4% respectively). These authors argued that difference in quantity in 20:5n-3, 22:6n-3 and 20:4n-6 between algae might be implicated in the changes in bivalve hemocyte parameters as demonstrated for vertebrates and fishes fed on different oils. Similarly, Hégaret *et al.* (2004) demonstrated that the quality of the algal diet affected some hemocyte parameters of Eastern oysters *Crassostrea virginica*. Phagocytic activity of oysters fed *Skeletonema costatum* was higher than those fed *Tetraselmis chui* or the mix diet when oysters were subjected to a temperature increase. Nonetheless, no specific PUFA could be clearly identified as responsible of those changes.

The objective of this study was to assess the impact of supplements of 20:5n-3 in the algal diet on several hemocyte parameters (hemocyte sub-population concentrations, hemocyte viability, phagocytic activity, reactive oxygen species production) of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. During seven weeks, oysters were fed *T-Iso* alga (*Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitian) that possessed low levels of 20:5n-3 with or without supplements of a lipid emulsion rich in 20:5n-3. Their hemocyte parameters were measured at 0, 2, 4 and 7 weeks.

Materials and Methods

Lipid emulsions

The lipid emulsion was prepared with EPAX 4510 TG (Polaris, Pleuven, France) - an marine oil mixture of triglycerides (TAG) rich in 20:5(n-3)(eicosapentaenoic acid, 45%) and

DHA (docosahexaenoic acid, 10%) according to the method described by Pernet *et al.* (2004) except that 5% Span 40 and 0.02% ethoxyquin (antioxidant) were added to the TAG and no Sudan red was used as a marker.

Dietary conditioning and animal sampling

Oysters were fed on the experimental diets at the Hatfield Marine Science Center (Newport, Oregon, USA). One-year-old Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg 1793 were acclimated at 17°C for two weeks prior to the start of the experiment, and reached a mean total live weight of 24 g. During the acclimation period, oysters were fed T-*Iso*. T-*Iso* was chosen as the algal diet because it contains low levels of 20:5n-3 (1.9%, Table 1). After the acclimation period, oysters were randomly divided and distributed into twelve 60 l tanks (3 replicates per treatment) continuously supplied with filtered (0.2 µm) seawater at 36 exchanges per day. Thereafter, oysters were fed either T-*Iso* alone or T-*Iso* supplemented with different level of a lipid emulsion for seven weeks (mid February- April 2003). The daily algal ration (algal dry weight) was adjusted each week to equal 5% oyster dry tissue weight. Lipid emulsion supplements were added at 0%, 1%, 10%, or 50% of the dry weight of the algal ration of T-*Iso*. T-*Iso* and lipid supplements were continuously added to tanks via peristaltic pump.

Oysters were sampled at 0, 2, 4 and 7 weeks of dietary conditioning. At each sampling date and for each dietary treatment, 13 oysters per replicate were sent to the Virginia Institute of Marine Science, Gloucester Point, Virginia, USA. Upon arrival at the laboratory, oysters were notched, maintained unfed for 24h in 30 ‰ seawater at 17°C. Animals were then bled for immune assays. A day after the bleeding, gills from 5 oysters and the whole body of the 8 remaining oysters were frozen at -80°C, freeze dried and stored at -20°C for fatty acid and proximal biochemical analysis. Condition indices of oysters were determined as dry flesh weight / dry shell weight X 100 (Lucas & Beninger, 1985).

Biochemical analysis (lipid-protein-carbohydrate)

Biochemical analyses were performed on freeze-dried tissue samples from eight individual animals. Samples were pooled and ground together, then 100 mg of dry powder was hydrated with 3 ml of distilled water and divided into three aliquots for total lipid, protein and carbohydrate analyses. Total lipid content was determined according to Bligh & Dyer

(1959) after extraction with a mixture of dichloromethane-ethanol-water. The lipid extract was placed in a pre-weighted Teflon cup, evaporated under nitrogen, and the lipid content was estimated gravimetrically. Carbohydrate and protein contents were measured colorimetrically as described by Dubois *et al.* (1956) and Lowry *et al.* (1951), respectively. Results were expressed as mg of carbohydrates, lipids and proteins per mg of total oyster dry tissue weight.

Total lipid extraction

Gills

Changes in the fatty acid composition of hemocyte membranes due to diet are paralleled in oysters by similar changes in the fatty acid composition of their gill membranes (Delaporte, 2001 ; cf. Annexe 4); therefore, fatty acid analyses were performed on gills rather than hemocyte samples because of insufficient material of the latter for lipid analysis. Aliquots of 30 mg of freeze-dried gills were powdered and rehydrated in 800 µl of distilled water before being extracted successively with two aliquots of 3 ml of chloroform-methanol solutions (1:2 and 2:1, v:v). The lipid extract was stored at -20°C under nitrogen for later lipid analysis.

Algae and lipid emulsion

T-*Iso* and emulsion samples were filtered onto pre-ashed (450°C) GF/F filters. The filters were then placed in tubes containing 3 ml of methanol. The methanol was evaporated to dryness and replaced with 6 ml of a mixture of chloroform-methanol (2:1, v:v) for complete lipid extraction. Thereafter, algal and emulsion lipid extracts were stored at - 20°C under nitrogen until analysis was conducted. Fatty acid analyses were performed on total lipid extracts.

Polar and neutral separation of gill total lipids and fatty acid analysis

Neutral and polar lipids of gill lipid extracts were purified on a Silica gel micro-column according to Marty *et al.* (1992). The gill neutral and polar lipid extracts, and total algal and emulsion lipids extracts were transesterified with 10% w:w boron trifluoride/methanol (Metcalfé & Schmitz, 1961) and processed as described by Delaporte *et al.* (in press). Fatty acid composition was expressed as weight percentage of the total fatty

acids of each lipid fraction or of total lipid extract. Total fatty acid content (neutral + polar lipids) per gill was expressed as μg of FAs per mg of gill dry weight.

As polar lipids are generally the dominant lipids in gill tissues (Allen & Conley, 1982; Delaporte *et al.*, in press), only fatty acid composition of the polar lipid fraction of gill lipid extracts are presented in this study in order to simplify data presentation.

Hemolymph sample

Hemolymph was withdrawn from individual oysters via a notch adjacent to the adductor muscle using a 1 ml plastic syringe fitted with a 25-gauge needle. Notches were made in the shell 24h before hemolymph withdrawal. All hemolymph samples were stored individually in micro-tubes at 0°C and examined microscopically for any contamination with bacteria and sperms/eggs. Samples from five oysters were pooled to constitute one replicat and three replicates were analysed for each hemocyte assay.

Phagocytosis assay

Hemocyte phagocytic activity was assayed by microscopic methodology according to Chu & La Peyre (1993). Briefly, a 20 μl aliquot of each hemolymph sample was added to a glass slide and allowed to adhere and form hemocyte monolayer at room temperature for 30 minutes. A 20 μl aliquot of zymosan suspension (1 mg/ml) in filtered sterile seawater (FSSW) were added to the hemocyte monolayer and incubated for one hour at room temperature. After the incubation period, slides were rinsed with FSSW and hemocytes were fixed with Dietrich' fixative and stained with Hemal-Stains I and II (Hemal Stain Co., Inc., Danbury, CT) for later counting with a light microscope at 400X. The phagocytic activity was expressed as number of hemocytes with zymosan / total number of hemocytes.

Flow cytometry

The total and differential hemocyte sub-population concentrations, hemocyte viability and oxidative burst activity were analysed using a Beckman Coulter® EPICS® Altra™ flow cytometer (Miami, FL, USA) connected to a computer using Expo32 as acquisition software. Optical alignment and stability was monitored daily using 10 μm diameter fluorescent flow-Count fluorospheres (Coulter PN6605359).

Total and differential hemocyte concentrations

Aliquots of 100 µl pooled hemolymph were filtered and each transferred to a tube containing 300 µl of a 4% (v:v) formalin solution made up in FSSW. Hemocyte DNA was stained with SYBR Green I (Molecular probes, 10X final concentration) 30 minutes prior analysis in darkness at room temperature. SYBR Green stained hemocytes were detected at 500-530 nm (yellow-green fluorescence) by the flow cytometer and were plotted based on their Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC), which are proportional to the size and the complexity of the cells, respectively. Based on these measurements (FSC and SSC), three hemocyte sub-populations stained with SYBR Green could be identified: granulocytes (high FSC, high SSC), hyalinocytes (high FSC, low SSC) and small agranulocytes (low FSC, low SSC). Only granulocyte and hyalinocyte concentrations, expressed as number of cells per ml, are presented in this study as they accounted for 60-95% of total hemocytes and as agranulocytes are considered to possess little activity (Lambert *et al.*, 2003).

Hemocyte viability

Hemocyte viability was assayed according to Delaporte *et al.* (2003). Briefly, aliquots of 150 µl pooled hemolymph were filtered and transferred to a tube containing an anti-aggregating solution for bivalve hemocytes. Ten minutes before flow cytometry analysis, samples were incubated with propidium iodide (final concentration 20 µg.ml⁻¹). Propidium iodide is a fluorescent DNA/RNA-specific dye, which only permeates through membranes of dead cells and its fluorescence is measured at 550-600 nm. Percentage of viable hemocytes was calculated by the percentage of hemocytes not showing PI fluorescence relative to total hemocyte counts.

Reactive oxygen species (ROS) production

ROS production of hemocytes was measured following the method of Lambert *et al.* (2003) using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Briefly, during incubation with hemocytes, DCFH-DA diffuses into the cells, where the acetate groups (-DA) are removed by esterase, thereby trapping DCFH within the cells. Intracellular DCFH oxidation into fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) is quantitatively related to ROS production of hemocytes. DCF fluorescence was measured at 500-530 nm by the flow cytometer.

For each sample, three aliquots of 150 µl pooled hemolymph were diluted with 150 µl of FSSW in three separate tubes maintained on ice. DCFH-DA (final concentration of 0.01 mM) was added and tubes were incubated at 18°C. After 120 minutes incubation, measurement of the DCF fluorescence was carried out on one set of tubes to determine non-stimulated ROS production of hemocytes. An aliquot of 300 µl of a zymosan suspension (20 particles per hemocyte) was added to one of the remaining tubes of each set and 300 µl of FSSW was added in the other as a control. A second measurement of the DCF fluorescence was carried out 60 minutes later (180 minutes after addition of DCFH-DA). ROS production with or without zymosan as determined by the mean DCF fluorescence in hemocyte sub-populations after 120 and 180 minutes of incubation was expressed in fluorescent arbitrary units (A.U). Only results of ROS production by hemocytes after 180 minutes of incubation were presented in this study as differences among dietary treatments were reported for this incubation time.

Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test the effects of diet and feeding period on all immune and biochemical parameters using STATGRAPHIC version plus 4.1 (Statistical Graphs Corp.). Percent data were transformed (arcsin of the square root) before ANOVA, but are presented in figures and tables as untransformed percentage values.

Results

Fatty acid (FA) composition of T-*Iso* alga and of the lipid emulsion

The FA compositions of T-*Iso* and of lipid emulsion were determined (Table 1). T-*Iso* alga was rich in 18:4n-3 (19%), 22:6n-3 (17.2%), 18:1n-9 (12%), 14:0 (11.6%) and 16:0 (10.5%); but, it was low in 20:5n-3 (2%) and deficient in 20:4n-6 (0.2%). The lipid emulsion contained high levels of 20:5n-3 (40.9%) and 22:6n-3 (9.4%). Three fatty acids present at very low levels in T-*Iso* : 20:4n-6 (0.2%), 20:1n-9 (0.1%) and 18:0 (0.5%), were found in fairly high proportions in the lipid emulsion (2.2%, 3.7% and 3.9% respectively). The ratio of n-3/n-6 fatty acids was also higher in the lipid emulsion (13.9) than in T-*Iso* (8.3).

Fatty acid composition of gill polar lipids

The fatty acid composition of gill polar lipids was significantly affected by dietary treatment after 2 weeks of feeding and these effects increased until the end of the experiment (Table 2; ANOVA, $p < 0.0001$). At the end of the experiment, 20:5n-3 content of gill polar lipids was positively correlated with the lipid supplement level. The 20:5n-3 content was significantly higher in oysters fed 50% than in oysters fed T-*Iso* alone (ANOVA, $p < 0.001$). During the whole experiment, 20:5n-3 content was maintained in gills of oysters fed 50% lipid emulsion, but significantly decreased in gills of oysters fed the other diets (ANOVA, $p < 0.0001$). The 20:4n-6 content of gill polar lipids of oysters fed T-*Iso* alone or supplemented with 1% of lipid emulsion was stable over the duration of the experiment; however, 20:4n-6 content of oysters fed 10% and 50% lipid emulsion increased significantly during the experiment (ANOVA, $p < 0.0001$) and was significantly higher than those of oysters fed T-*Iso* alone or T-*Iso* supplemented with 1% of lipid emulsion (ANOVA, $p < 0.01$). As a consequence, during the entire experiment, 20:5n-3/20:4n-6 ratio decreased faster in gills of oyster fed low lipids supplements than those fed 10% and 50% of lipid emulsion.

At the end of the experiment, some other fatty acids in gill polar lipids also varied significantly according to dietary treatments and included the 18:0, 18:2n-6, 18:3n-3, 22:5n-6, 22:5n-3 and 22:6n-3 (Table 2). The 18:2n-6, 18:3n-3, 22:5n-6 and 22:6n-3 content of gill polar lipids was higher in oysters fed T-*Iso* alone or supplemented with 1% of lipid emulsion than those fed 10% and 50% lipid emulsion. In contrast, 18:0 and 22:5n-3 content increased in oysters fed increasing supplements of lipid emulsion. The proportions of fatty acid classes (saturated, mono- and polyunsaturated) were not affected by dietary treatments (ANOVA, $p > 0.05$).

Table 1: *Fatty acid composition of T-Iso and the lipid emulsion used in the experiment expressed as percentage of total lipids (n=3, Mean ± SD).*

	T-Iso	Emulsion
	11.2 ± 1.4	0.4 ± 0.0
16:0	10.4 ± 0.8	6.3 ± 0.0
18:0	0.5 ± 0.1	3.9 ± 0.1
16:1(n-7)	3.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1
18:1(n-9)	12.0 ± 0.3	7.5 ± 0.1
18:1(n-7)	1.3 ± 0.2	4.5 ± 0.0
20:1(n-9)	0.1 ± 0.0	3.7 ± 0.1
18:2(n-6)	3.4 ± 0.3	0.9 ± 0.0
18:3(n-3)	6.2 ± 0.5	0.7 ± 0.0
18:4(n-3)	18.6 ± 1.5	3.2 ± 0.0
20:4(n-6)	0.2 ± 0.0	2.2 ± 0.0
20:5(n-3)	1.9 ± 0.3	40.9 ± 0.0
22:5(n-6)	1.9 ± 0.2	0.3 ± 0.0
22:5(n-3)	0.3 ± 0.0	2.4 ± 0.0
22:6(n-3)	18.0 ± 1.6	9.4 ± 0.0
Total SFAs	22.5 ± 1.2	12.0 ± 0.2
Total MUFAs	18.0 ± 0.5	21.8 ± 0.0
Total PUFAs	59.2 ± 1.4	66.1 ± 0.2
(n-3)/(n-6)	8.3 ± 0.2	13.9 ± 0.2
22:6(n-3)/20:5(n-3)	9.6 ± 2.2	0.2 ± 0.0
22:5(n-6)/20:4(n-6)	10.8 ± 2.1	0.1 ± 0.0

SFAs: Saturated Fatty Acids, MUFAs: Mono-Unsaturated Fatty Acids, PUFAs: Poly-Unsaturated Fatty Acids

*Table 2 : Fatty acid composition of the gill polar lipids, expressed as weight percentage of total fatty acids of the fraction, total FAs (expressed as μg of FAs per mg of gill DW) and percentage of polar lipids (corresponding to the proportion of FAs associated to the polar lipid fraction) of *C. gigas* during the dietary conditioning. Small letters indicate significant among dietary treatments (ANOVA, mean \pm SD).*

	2 weeks					4 weeks					7 weeks		
	Initial	0%	1%	10%	50%	0%	1%	10%	50%	0%	1%	10%	50%
	(n=6)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
14:0	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1 ^a	1.0 \pm 0.1 ^{ab}	0.9 \pm 0.1 ^{bc}	0.7 \pm 0.1 ^c	1.2 \pm 0.1 ^a	1.4 \pm 0.4 ^a	1.3 \pm 0.3 ^a	0.7 \pm 0.1 ^b
16:0	9.9 \pm 0.3	9.6 \pm 0.3	10.1 \pm 0.2	9.8 \pm 0.5	9.7 \pm 0.2	10.0 \pm 0.5	10.5 \pm 0.3	10.3 \pm 0.5	10.5 \pm 0.4	10.7 \pm 1.0	11.9 \pm 1.1	11.7 \pm 0.3	11.1 \pm 0.4
18:0	5.4 \pm 0.4	5.0 \pm 0.2	5.1 \pm 0.3	5.6 \pm 0.0	5.0 \pm 0.4	5.0 \pm 0.1 ^a	5.0 \pm 0.2 ^a	5.4 \pm 0.3 ^{ab}	5.7 \pm 0.4 ^b	3.4 \pm 0.2 ^a	4.0 \pm 0.0 ^{ab}	4.2 \pm 0.3 ^b	5.5 \pm 0.1 ^c
16:1n-7	1.3 \pm 0.4	1.7 \pm 0.7	1.7 \pm 1.0	1.5 \pm 0.7	1.6 \pm 0.2	1.7 \pm 0.5	1.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2	1.9 \pm 0.9	2.4 \pm 0.5	2.2 \pm 0.2	1.3 \pm 0.9
18:1n-9	1.8 \pm 0.1	2.5 \pm 0.4	2.1 \pm 0.2	2.2 \pm 0.3	2.4 \pm 0.1	2.7 \pm 0.2	2.9 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2	2.7 \pm 0.3	3.5 \pm 0.1	3.6 \pm 0.1	3.4 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2
18:1n-7	5.2 \pm 0.2	5.6 \pm 0.3 ^a	5.0 \pm 0.4 ^b	5.4 \pm 0.2 ^{ab}	6.2 \pm 0.2 ^c	4.7 \pm 0.4 ^a	4.8 \pm 0.1 ^a	5.3 \pm 0.2 ^b	5.8 \pm 0.2 ^b	4.8 \pm 0.1 ^a	4.4 \pm 0.6 ^a	5.1 \pm 0.0 ^a	5.7 \pm 0.2 ^b
20:1n-11	3.3 \pm 0.3	3.2 \pm 0.3 ^a	3.3 \pm 0.3 ^a	3.5 \pm 0.1 ^a	2.7 \pm 0.2 ^b	3.1 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2	3.0 \pm 0.3	2.8 \pm 0.1	2.5 \pm 0.3	2.6 \pm 0.1	2.6 \pm 0.0	2.5 \pm 0.1
20:1n-9	1.6 \pm 0.2	2.2 \pm 0.3 ^{ab}	1.9 \pm 0.2 ^a	2.3 \pm 0.1 ^b	2.9 \pm 0.1 ^c	2.7 \pm 0.4	2.9 \pm 0.1	3.5 \pm 0.0	3.4 \pm 0.1	3.0 \pm 0.2	3.1 \pm 0.3	3.3 \pm 0.0	3.6 \pm 0.1
20:1n-7	5.4 \pm 1.5	6.1 \pm 0.2	6.2 \pm 0.3	6.2 \pm 0.3	5.6 \pm 0.2	6.2 \pm 0.3 ^a	5.9 \pm 0.0 ^a	6.0 \pm 0.2 ^a	5.3 \pm 0.2 ^b	5.2 \pm 0.3	5.2 \pm 0.2	4.9 \pm 0.2	5.3 \pm 0.4
18:2n-6	0.6 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1 ^a	0.7 \pm 0.0 ^b	0.6 \pm 0.0 ^b	0.6 \pm 0.0 ^b	0.8 \pm 0.0 ^a	0.8 \pm 0.1 ^a	0.7 \pm 0.1 ^b	0.5 \pm 0.0 ^c	1.1 \pm 0.1 ^a	1.0 \pm 0.1 ^a	0.8 \pm 0.0 ^b	0.5 \pm 0.0 ^c
18:3n-3	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0 ^a	0.5 \pm 0.0 ^a	0.4 \pm 0.0 ^b	0.4 \pm 0.0 ^b	0.6 \pm 0.0 ^a	0.6 \pm 0.1 ^a	0.5 \pm 0.0 ^b	0.3 \pm 0.0 ^c
18:4n-3	1.3 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	1.6 \pm 0.6	1.5 \pm 0.1	1.2 \pm 0.3	1.0 \pm 0.4
20:2i	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.0	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.0 ^a	0.4 \pm 0.1 ^b	0.5 \pm 0.0 ^b	0.4 \pm 0.0 ^b	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0
20:2j	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0 ^a	0.5 \pm 0.0 ^a	0.5 \pm 0.1 ^a	0.4 \pm 0.0 ^b	0.6 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0
20:2n-6	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0
20:4n-6	3.8 \pm 0.1	3.9 \pm 0.2 ^a	4.0 \pm 0.0 ^a	4.1 \pm 0.1 ^{ab}	4.3 \pm 0.2 ^b	4.2 \pm 0.0 ^a	4.3 \pm 0.0 ^a	4.9 \pm 0.2 ^b	4.9 \pm 0.2 ^b	4.0 \pm 0.2 ^a	3.9 \pm 0.1 ^a	4.8 \pm 0.1 ^b	5.5 \pm 0.6 ^c
20:5n-3	14.8 \pm 1.4	12.3 \pm 1.4 ^a	13.8 \pm 0.4 ^a	13.9 \pm 0.7 ^a	15.8 \pm 0.6 ^b	10.0 \pm 0.6 ^a	9.9 \pm 0.7 ^a	12.4 \pm 0.6 ^b	15.5 \pm 0.7 ^c	7.5 \pm 0.3 ^a	9.3 \pm 0.1 ^b	11.6 \pm 0.4 ^c	15.3 \pm 0.4 ^d
22:2i	2.0 \pm 0.2	2.5 \pm 0.3	2.2 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2	2.7 \pm 0.2	3.2 \pm 0.2 ^a	3.4 \pm 0.2 ^a	3.8 \pm 0.2 ^b	3.4 \pm 0.1 ^a	3.9 \pm 0.4	3.9 \pm 0.6	4.0 \pm 0.1	3.8 \pm 0.1
22:2j	11.0 \pm 0.8	10.7 \pm 0.5	10.7 \pm 0.8	11.2 \pm 0.3	9.7 \pm 0.6	10.7 \pm 0.5 ^a	10.3 \pm 0.2 ^a	9.9 \pm 0.5 ^a	8.5 \pm 0.5 ^b	8.6 \pm 0.7	8.6 \pm 0.6	7.7 \pm 0.4	7.4 \pm 0.5
22:5n-6	1.9 \pm 0.4	2.5 \pm 0.2 ^a	2.2 \pm 0.1 ^{ab}	2.1 \pm 0.2 ^b	1.8 \pm 0.0 ^c	2.9 \pm 0.2 ^a	2.9 \pm 0.2 ^a	2.5 \pm 0.0 ^b	1.8 \pm 0.1 ^c	3.6 \pm 0.5 ^a	3.1 \pm 0.0 ^{ab}	2.7 \pm 0.1 ^b	1.7 \pm 0.1 ^c
22:5n-3	1.5 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1 ^a	1.3 \pm 0.1 ^a	1.3 \pm 0.1 ^a	1.8 \pm 0.1 ^b	1.0 \pm 0.2 ^a	1.1 \pm 0.1 ^a	1.4 \pm 0.1 ^b	2.0 \pm 0.1 ^c	0.8 \pm 0.0 ^a	0.9 \pm 0.1 ^a	1.3 \pm 0.0 ^b	2.0 \pm 0.2 ^c
22:6n-3	19.3 \pm 1.2	19.0 \pm 0.4 ^a	18.4 \pm 0.8 ^a	17.0 \pm 0.4 ^b	16.7 \pm 0.4 ^b	19.5 \pm 0.3 ^a	18.8 \pm 0.6 ^a	17.7 \pm 0.5 ^b	16.2 \pm 0.6 ^c	20.4 \pm 1.8 ^a	19.3 \pm 0.1 ^a	18.1 \pm 0.6 ^{ab}	16.0 \pm 0.6 ^b

SFAs	18.6 ± 0.3	17.4 ± 0.3	17.9 ± 0.6	18.2 ± 0.5	17.2 ± 0.2	18.3 ± 0.8	18.6 ± 0.5	18.5 ± 0.8	18.5 ± 0.6	17.2 ± 1.3	19.3 ± 1.4	18.9 ± 0.4	19.0 ± 0.7
MUFAs	20.2 ± 1.7	23.5 ± 1.8	22.4 ± 1.8	23.0 ± 1.4	23.4 ± 0.4	23.5 ± 1.2	23.9 ± 0.7	22.3 ± 1.1	23.3 ± 0.8	23.1 ± 1.9	23.5 ± 0.4	24.0 ± 0.4	23.7 ± 2.1
PUFAs	60.2 ± 1.5	58.2 ± 1.7	58.6 ± 2.5	57.8 ± 1.5	58.7 ± 0.4	57.4 ± 0.4	56.5 ± 0.4	58.5 ± 0.2	57.6 ± 1.3	59.0 ± 3.4	56.3 ± 1.2	56.1 ± 0.0	56.9 ± 2.5
Total n-6	7.2 ± 0.5	8.3 ± 0.5	8.1 ± 0.1	7.9 ± 0.5	7.7 ± 0.2	9.1 ± 0.2 ^a	9.2 ± 0.2 ^a	9.3 ± 0.3 ^a	8.4 ± 0.2 ^b	10.1 ± 0.6	9.9 ± 0.2	9.7 ± 0.6	9.2 ± 0.5
Total n-3	38.6 ± 1.6	35.2 ± 1.9	36.2 ± 1.5	34.7 ± 1.6	37.3 ± 0.8	33.2 ± 0.7 ^{ab}	32.6 ± 0.2 ^a	34.3 ± 0.5 ^b	36.3 ± 1.1 ^c	35.1 ± 4.4	32.8 ± 0.3	33.5 ± 1.2	35.4 ± 1.5
n-3/n-6	5.4 ± 0.5	4.2 ± 0.5	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.4	4.9 ± 0.1	3.7 ± 0.1 ^a	3.6 ± 0.1 ^a	3.7 ± 0.1 ^a	4.3 ± 0.1 ^b	3.5 ± 0.6 ^a	3.3 ± 0.0 ^a	3.5 ± 0.3 ^a	3.9 ± 0.1 ^b
20:5n-3/20:4n-6	3.8 ± 0.4	3.1 ± 0.3 ^a	3.4 ± 0.1 ^{ab}	3.4 ± 0.1 ^{ab}	3.7 ± 0.2 ^b	2.4 ± 0.2 ^a	2.3 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.0 ^a	3.2 ± 0.1 ^b	1.9 ± 0.2 ^a	2.4 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.1 ^b	2.8 ± 0.2 ^c
Total FAs	35.2 ± 5.8	26.8 ± 0.6 ^a	32.3 ± 5.4 ^{ab}	33.3 ± 5.0 ^{ab}	39.4 ± 4.5 ^b	28.1 ± 3.0 ^a	27.0 ± 0.4 ^a	32.8 ± 1.2 ^b	44.7 ± 2.9 ^c	31.9 ± 5.3	32.6 ± 1.5	33.8 ± 2.8	38.5 ± 6.6
% polar lipids	69.4 ± 8.4	69.7 ± 2.6	64.3 ± 1.5	69.1 ± 4.3	64.6 ± 3.0	64.7 ± 2.0	68.1 ± 1.7	68.7 ± 3.8	59.5 ± 8.6	71.7 ± 5.5	65.9 ± 6.1	65.5 ± 0.6	71.9 ± 8.3

Note: SAFs=Total Saturated Fatty Acids; MUFAs= Total Mono-unsaturated Fatty Acids; PUFAs= Total Poly-unsaturated Fatty Acids. Non Methylene Interrupted Fatty Acids: 20:2i=20:2Δ5,11 ; 22:2i=22:2Δ7,13 ; 20:2j=20:2Δ5,13; 22:2j=22:2Δ7,15 ; FAME: Fatty Acid Methyl Ester.

Condition index

Results showed that condition index was slightly but significantly influenced by dietary conditioning (Table 3, ANOVA, $p < 0.05$) with the highest values found in oysters fed 50% of lipid emulsion. However, condition index was more affected by the sampling date with a higher condition index evident at the end of the experiment than at the start (ANOVA, $p < 0.0001$).

Oyster dry tissue weight

Oyster dry weight tissue was not affected by dietary treatments (Table 3; ANOVA, $p > 0.05$), but was significantly affected by the experiment duration (ANOVA, $p < 0.0001$). Oysters dry tissue weight significantly decreased in the first 2 weeks of the experiment, especially for oysters fed T-*Iso* supplemented with 1% and 10% of lipid emulsion. At the end of the dietary conditioning, oyster dry tissue weight increased back.

Biochemical composition

Carbohydrate, lipid and protein contents per mg of dry tissue of oysters fed T-*Iso* supplemented with 0%, 1%, 10% and 50% lipid emulsion are presented in Table 3.

No differences in carbohydrate content was observed among dietary treatments after 2 and 4 weeks of conditioning (ANOVA, $p < 0.05$); however, at the end of the experiment, oysters fed T-*Iso* alone had the highest carbohydrate content ($0.20 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ of DW), while those fed 50% of lipid emulsion had the lowest ($0.15 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ of DW). A significant experiment duration effect was also observed for carbohydrate contents and it was mainly due to an initial decrease in carbohydrate content after two weeks of feeding (ANOVA, $p < 0.0001$) followed by an increase to higher levels at the end of the experiment.

Total lipids were greatly influenced by diets (ANOVA, $p < 0.0001$). Oysters fed 50% lipid emulsion had higher lipid content especially after 4 weeks of conditioning, compared with oysters fed the other diets (ANOVA, $p < 0.001$). By the end of the experiment, this dietary treatment effect was absent since total lipid contents of oysters fed T-*Iso*, 1% and 10% lipid emulsion reached the same level as in oysters fed 50% lipid emulsion.

Table 3 : Condition index ($n=15$, Mean \pm SD), oyster dry weight (grams, $n=8$, Mean \pm SD) and proximal biochemical composition (carbohydrate, lipid and protein contents expressed as mg per mg of oyster dry weight, $n=3$, Mean \pm SD) of oysters fed T-Iso supplemented with lipid emulsion at 0%, 1%, 10% and 50% of algal dry weight. Different lower-case letters indicate significant difference between sampling dates. Different upper-case letters indicate significant difference between dietary treatments.

		Initial	2 weeks	4 weeks	7 weeks
Condition index	0%	3.9 \pm 0.1 ^a	3.7 \pm 0.2 ^{aA}	3.5 \pm 0.5 ^a	4.4 \pm 0.3 ^b
	1%	3.8 \pm 0.2 ^a	3.2 \pm 0.1 ^{bB}	3.6 \pm 0.3 ^a	4.2 \pm 0.2 ^c
	10%	3.9 \pm 0.2 ^a	3.8 \pm 0.3 ^{aAC}	3.7 \pm 0.5 ^a	4.7 \pm 0.4 ^b
	50%	4.0 \pm 0.7 ^a	4.1 \pm 0.1 ^{aC}	4.2 \pm 0.3 ^a	4.3 \pm 0.3 ^a
Oyster dry weight	0%	0.51 \pm 0.15 ^{ab}	0.46 \pm 0.16 ^{ab}	0.40 \pm 0.13 ^a	0.56 \pm 0.14 ^b
	1%	0.55 \pm 0.15 ^a	0.41 \pm 0.17 ^b	0.43 \pm 0.11 ^b	0.58 \pm 0.17 ^a
	10%	0.57 \pm 0.21 ^a	0.42 \pm 0.17 ^b	0.47 \pm 0.17 ^b	0.55 \pm 0.18 ^a
	50%	0.52 \pm 0.20 ^a	0.48 \pm 0.14 ^a	0.49 \pm 0.18 ^a	0.51 \pm 0.15 ^a
Carbohydrate	0%	0.134 \pm 0.01 ^a	0.109 \pm 0.01 ^b	0.141 \pm 0.01 ^a	0.200 \pm 0.02 ^{cA}
	1%	0.155 \pm 0.02 ^a	0.095 \pm 0.01 ^b	0.152 \pm 0.01 ^a	0.187 \pm 0.01 ^{cA}
	10%	0.152 \pm 0.02 ^a	0.099 \pm 0.01 ^b	0.137 \pm 0.03 ^a	0.165 \pm 0.01 ^{aAB}
	50%	0.158 \pm 0.03 ^a	0.102 \pm 0.01 ^b	0.136 \pm 0.01 ^a	0.150 \pm 0.01 ^{aB}
Lipid	0%	0.103 \pm 0.00 ^a	0.104 \pm 0.00 ^a	0.104 \pm 0.00 ^{aA}	0.118 \pm 0.00 ^b
	1%	0.111 \pm 0.00 ^a	0.102 \pm 0.01 ^a	0.104 \pm 0.01 ^{aA}	0.115 \pm 0.00 ^a
	10%	0.106 \pm 0.00 ^a	0.103 \pm 0.00 ^a	0.110 \pm 0.01 ^{aA}	0.126 \pm 0.00 ^b
	50%	0.110 \pm 0.01 ^a	0.112 \pm 0.00 ^a	0.133 \pm 0.00 ^{bB}	0.130 \pm 0.01 ^b
Protein	0%	0.420 \pm 0.04 ^a	0.458 \pm 0.01 ^a	0.447 \pm 0.03 ^a	0.461 \pm 0.05 ^a
	1%	0.377 \pm 0.04 ^a	0.461 \pm 0.00 ^b	0.459 \pm 0.01 ^b	0.409 \pm 0.03 ^a
	10%	0.422 \pm 0.05 ^{ab}	0.450 \pm 0.01 ^a	0.459 \pm 0.04 ^a	0.417 \pm 0.01 ^b
	50%	0.449 \pm 0.03 ^a	0.443 \pm 0.01 ^a	0.455 \pm 0.03 ^a	0.430 \pm 0.02 ^a

Dietary treatments had no effect on protein contents (ANOVA, $p>0.05$), but a significant time effect was evident (ANOVA, $p<0.01$) with protein contents higher after 2 weeks and 4 weeks of dietary conditioning than either at the beginning or the end of the experiment.

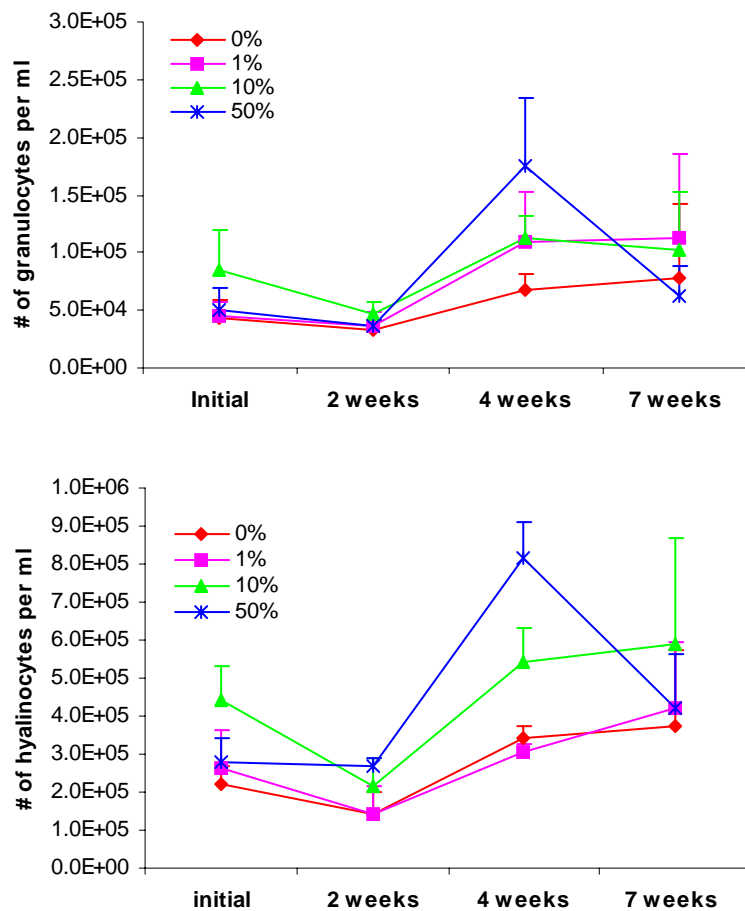


Figure 1: Granulocyte and hyalinocyte concentrations in hemolymph samples from oysters fed *T-Iso* alone or *T-Iso* supplemented with 0%, 1%, 10% and 50% lipid emulsion.

Hemocyte concentrations

Concentrations of granulocytes and hyalinocytes were significantly affected by dietary treatment after 4 weeks of feeding (Figure 1; ANOVA, $p < 0.05$ and $p < 0.0001$ respectively) but not after 2 and 7 weeks.

Oysters fed a supplement of 50% lipid emulsion possessed a higher granulocyte concentration than those fed *T-Iso* alone (Figure 1; ANOVA, $p < 0.05$). Oysters fed 1% and 10% lipid emulsion had intermediate concentrations but were not significantly different from the two other diets. Following the same trend, hyalinocyte concentration of oysters fed 50% lipid emulsion was significantly higher than those of oysters fed 10% lipid emulsion ; the latter being also significantly higher than in oysters fed *T-Iso* alone and *T-Iso* supplemented with 1% lipid emulsion.

A significant experiment duration effect was evident for both hemocyte sub-populations (ANOVA, $p < 0.0001$) where granulocyte and hyalinocyte concentrations slightly but significantly decreased after the first two weeks, then significantly increase at 4 weeks and stayed at the same levels through the remaining period of the experiment.

Phagocytosis assay

Phagocytic activity was significantly affected by the dietary conditioning (Figure 2; ANOVA, $p < 0.0001$). High differences were observed between treatments after 4 weeks of dietary conditioning; hemocytes of oysters fed 1% lipid emulsion possessed the highest phagocytic activity (0.7), followed by those fed *T-Iso* alone ; whereas, hemocytes of oysters fed 10% and 50% lipid emulsion were characterized by a low phagocytic activity (0.2). A significant experiment duration effect was observed. After 2 weeks, phagocytic activity of all oysters was low (average 0.2). At 4 weeks, a significant increase from 0.2 to an average of 0.6 occurred for hemocytes of oysters fed *T-Iso* alone or *T-Iso* supplemented with 1% lipid emulsion, while they remained low for oysters fed 10 and 50% lipid emulsion. At the end of the experiment, hemocytes had a high phagocytic activity whatever the dietary conditioning (ANOVA, $p < 0.0001$).

Reactive oxygen species (ROS) production

ROS production without zymosan addition

ROS production of granulocytes and hyalinocytes without zymosan addition was significantly affected by the dietary treatment and by the duration of the experiment when hemocytes were incubated 180 min (Figure 3; ANOVA, $p < 0.01$) but surprisingly not significant effects were observed after 120 min of incubation (data not shown; ANOVA, $p > 0.05$). The major differences among dietary treatments in non-stimulated ROS production of granulocytes and hyalinocytes were observed at the end of the experiment (7 weeks conditioning). Granulocytes and hyalinocytes of oysters fed 1% lipid emulsion and *T-Iso* alone showed high ROS production (average of 160 A.U. and 110 A.U. respectively) while hemocytes of oysters fed 10% and 50% lipid emulsion showed low ROS production (30.5 A.U. and 72 A.U., respectively).

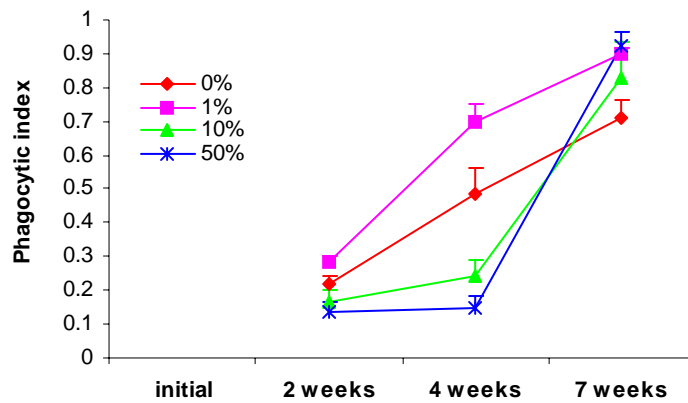


Figure 2: *Phagocytic index of hemocytes of oysters fed T-Iso alone or T-Iso supplemented with 0%, 1%, 10% and 50% lipid emulsion. Phagocytic index corresponds to the ratio between the number of hemocytes that engulfed zymosan particles and the total number of hemocytes.*

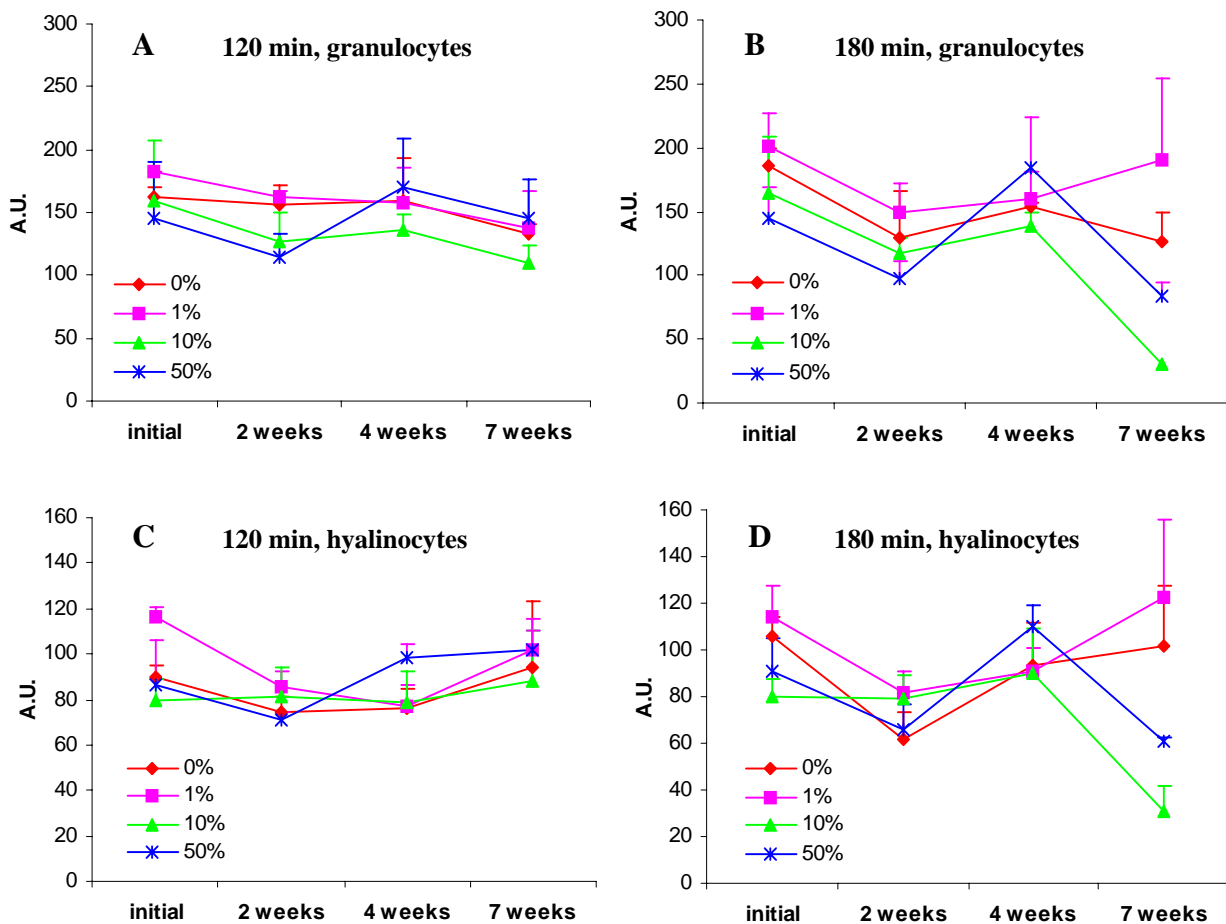


Figure 3 : *Granulocytes (A and B) and hyalinocytes (C and D) reactive oxygen species production of oysters fed T-Iso alone or T-Iso supplemented with 0%, 1%, 10% and 50% lipid emulsion after 120 and 180 minutes of incubation with DCFH-DA in FSSW condition respectively.*

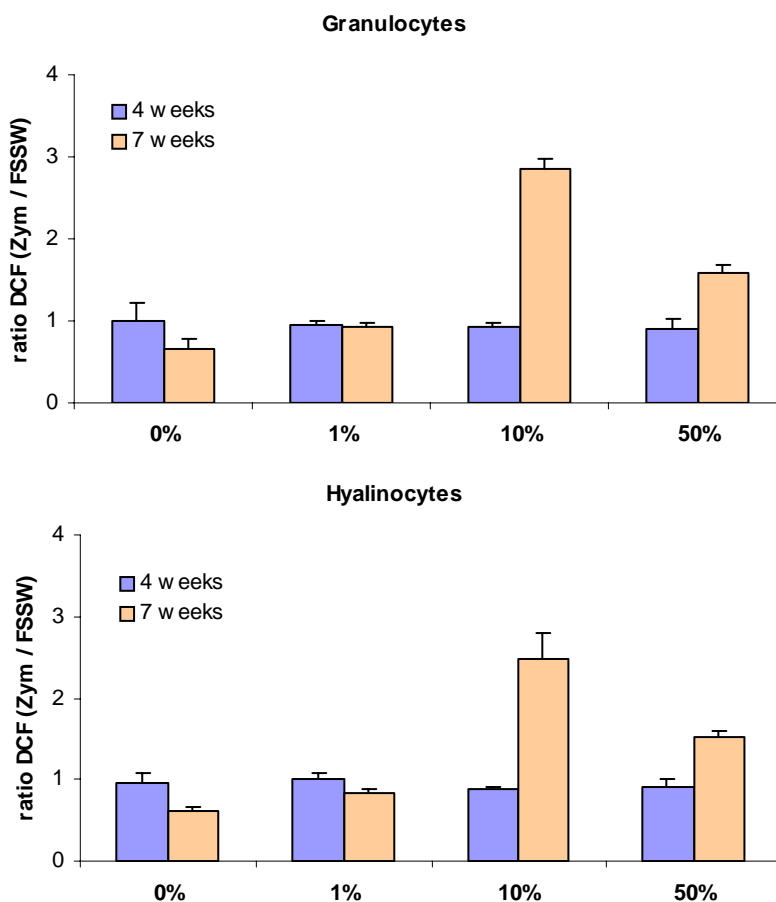


Figure 4: Ratio of the DCF fluorescence detected in hemocytes after zymosan stimulation to DCF fluorescence of non-stimulated controls ($t=180$ minutes) sampled from oysters after 4 weeks and 7 weeks of feeding on *T-Iso* alone or *T-Iso* supplemented with 1%, 10% or 50% lipid emulsion. A: ratio Zym / FSSW of granulocytes. B: ratio Zym / FSSW of hyalinocytes.

Zymosan stimulated ROS production

After 4 weeks of dietary conditioning, ROS production of granulocytes and hyalinocytes were poorly stimulated by zymosan, and no differences were observed among dietary treatments (ANOVA, $p>0.05$). However, after 7 weeks of dietary conditioning, ROS production of granulocytes and hyalinocytes of oysters fed 10% lipid emulsion were highly stimulated by zymosan particles (Figure 4; T-test, $p<0.0001$ for both sub-populations) when compared to ROS production without zymosan addition. A similar positive effect of zymosan addition was observed on ROS production of oyster fed 50% lipid emulsion, but it was not significant for both hemocyte sub-populations (T-test, $p>0.05$). Surprisingly, granulocytes and hyalinocytes of oysters fed *T-Iso* alone and *T-Iso* supplemented with 1% lipid emulsion

incubated with zymosan tended to have a lower ROS production when compared to those without addition of zymosan (T-test, $p > 0.05$).

Discussion

Impact of the dietary conditioning on fatty acid profile of gill polar lipid

During the experiment, the maintenance of 20:5n-3 content to a high level in gill polar lipid of oysters fed 10% and 50% lipid emulsion revealed that emulsion was well ingested. Indeed, feeding oysters with 10% and 50% lipid emulsion allowed oysters to compensate T-*Iso* deficiency in this fatty acid. By contrast, a decrease of this fatty acid was observed in gills of oysters from the other dietary treatments. Similarly, higher 20:4n-6 content was found in oysters fed 10% and 50% lipid emulsions in comparison to oysters fed T-*Iso* alone or T-*Iso* supplemented with 1% of lipid emulsion corroborating the efficiency of the dietary conditioning with the lipid emulsion since emulsion carried 2.0% of 20:4n-6 and T-*Iso* is almost deficient in this fatty acid.

At the end of the experiment, the highest level of 20:5n-3 in gill polar lipids was obtained with T-*Iso* supplemented with 50% of lipid emulsion and this resulted in a 20:5n-3 gradient of 7.8% when compared to oysters fed T-*Iso* alone. This value was comparable to those obtained by Caers *et al.* (2000, 2002) when feeding oyster spat or broodstock with a 22:6n-3 deficient microalgae (*T. suecica* or *Dunalliella tertiolecta*, respectively) supplemented with 50% of lipid emulsion rich in 22:6n-3. Moreover, dietary induced gradient of 22:6n-3 contents in the total lipid fraction was found to vary from 0.1% in muscle to 6.6% in the digestive gland of adult Chilean scallop *Argopecten purpuratus* fed a mixed algal diet alone or supplemented with a 22:6n-3 rich lipid emulsion (Caers *et al.*, 2003). So, it is interesting to note that the PUFA gradient resulting from the supplementation of microalgae with PUFA enriched emulsion can vary between tissues.

Impact of the dietary conditioning on biochemical composition of oysters

High doses of lipid emulsion (10% and 50%) appeared to accelerate and/or increase gonadal development during the dietary conditioning as condition index and lipid content of oysters fed these high doses were higher than in oysters fed T-*Iso* alone or supplemented by

1% of lipid emulsion (after 4 and 7 weeks). This increased of reproduction effort for oysters fed on the 10% and 50% lipid emulsion was confirmed by the fact that those oysters spontaneously spawned between 4 and 7 weeks of dietary conditioning. The effect of high doses of lipid emulsion on the gametogenesis is possibly related to the additional energy provided by the lipid emulsion. Indeed, in another study, Enriquez-Diaz (2004) and Delaporte (2005) demonstrated that during the active gametogenesis of *C. gigas* oysters an increase of food supply from 4 to 12% algal dry weight per oyster dry tissue weight was almost exclusively invested in the gonadal development and few for energy storage. Also, a specific effect of the 20:5n-3 contributing to accelerate gonadal development in oysters fed the highest lipid supplements is suggested. Soudant *et al.* (1999) observed in a field experiment that gametogenesis of *C. gigas* was associated with preferential accumulation of 20:5n-3 in gonad tissues. Moreover, use of a lipid emulsion rich in 22:6n-3 was previously demonstrated to enhance gametogenesis of *Argopecten purpuratus* (Caers *et al.*, 1999, 2002). Similarly, Martinez *et al.* (2000) and Hendricks *et al.* (2003) showed that substitution of n-3 PUFA-enriched lipid emulsion in the microalgal diet during the reproductive output of *A. purpuratus* and the Baltic mussel *M. balthica* resulted in a better fecundity and better responses to spawning induction than broodstock receiving the standard algal diet.

Impact of the dietary conditioning on the immune parameters

In the present study, differences in hemocyte parameters due to dietary treatment were clearly observed. Highest granulocyte and hyalinocyte concentrations were found in oysters fed 50% lipid emulsion. This increase in hemocyte concentration appeared to be similar to that observed with *R. philippinarum* and *C. gigas* after 8 weeks of being fed on *C. calcitrans* which contains high amounts of 20:5n-3 (17.8%) and 20:4n-6 (2.0%) compared to T-Iso or *T. suecica* diets (Delaporte *et al.*, 2003). Also, it is possible that maintenance of high levels of 20:5n-3 and/or incorporation of 20:4n-6 in gills by a dietary supplement had some positive effect on hemocyte multiplication or release into the hemolymph.

However, a significant decrease in granulocyte and hyalinocyte concentrations was observed in oysters fed 50% lipid emulsion over the period from 4 to 7 weeks even though the concentration of 20:5n-3 in gill lipids remained stable over this time period. It is possible that this change is the result of the partial spawning of some of the oysters fed 50% of lipid emulsion just prior the hemolymph sampling. Indeed, as demonstrated by Cho & Jeong

(2005), a decrease of hemocyte concentration was observed in oysters that have been induced to spawn just before the bleeding.

Dietary supplements of 20:5n-3 also influenced hemocyte activities. After 2 and 4 weeks, lower phagocytic activity was noticed in oysters fed high doses of lipid emulsion (10% and 50%) compared to animals fed no or lower dose of lipid emulsion (1%). Such observations were analogues to those made on human non-specific immune system. Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) was demonstrated to be implicated in the inhibition of the phagocytic activity of human neutrophil (Sipka *et al.*, 1996; Kew *et al.*, 2004) and leukocytes (Virella *et al.*, 1989), and natural killer cell activity (Peterson *et al.*, 1998; Thies *et al.*, 2001). Nevertheless, the inhibition effect of 20:5n-3 disappeared at the end of the experiment although the amount of 20:5(n-3) was still high in gill polar lipids of the conditioned oysters. The increase of others long chain PUFAs content, especially 20:4n-6, observed in gill lipids of oysters fed 10% and 50% lipid emulsion may have interfered to some levels and affected the phagocytic activity of oysters fed T-*Iso* supplemented with high doses of lipid emulsion. Indeed, implication of 20:4n-6 and its metabolite (leukotriene LTB₄) in the increase of the phagocytic activity has been described in vertebrates studies (Bailie *et al.*, 1996; Mancuso *et al.*, 1998; Lennartz, 1999). Also, the balance between n-3 and n-6 FAs, especially between 20:5n-3 and 20:4n-6, may affect to some extent hemocyte activity of oysters such as phagocytic activity (cf. Figure 5). Horrobin *et al.* (2002) and Harbige (2003) highlighted that for vertebrates an optimal balance between n-3 and n-6 FAs, i.e. 20:4n-6/20:5n-3 ratio, may ensure effective immunological responses against pathogens. Moreover, Harbige (2003) underlined that the effect of n-3/n-6 balance may be different at different period of the life cycle.

The possibility that hemocyte phagocytic activity was affected by more intense reproductive processes, observed in oysters fed high levels of lipid emulsion, may need to be considered. Delaporte *et al.* (in prep., cf. 1^{er} et 2^d articles) showed a decrease of hemocyte phagocytic activity during gametogenesis. Hormonal changes related to reproductive processes or with membrane composition modifications, may have affected the defence mechanisms of maturing animals. Such hormonal control is possible as Yamaguchi *et al.* (2001) and Watanuki *et al.* (2002) demonstrated an *in vitro* and *in vivo* inhibition of phagocytic activity in carp *Cyprinus carpio* with estradiol, progesterone and 11-ketotestosterone.

Although production of ROS is thought to be associated with phagocytic activity in the destruction of foreign particles, ROS production was not, in the present study, correlated with phagocytic activity. A significant dietary effect on non-stimulated ROS production was evident in hemocytes, sampled at the end of the experiment and only after 180 minutes of incubation. Hemocytes of oysters fed T-*Iso* alone or T-*Iso* plus 1% lipid emulsion maintained a higher production of ROS than those fed 10% and 50% lipid supplements. Interestingly, ROS production by granulocytes and hyalinocytes of oysters fed high lipid supplements can be ‘restored’ by addition of zymosan particles while no zymosan effect was observed for oysters fed no or low lipid supplement. It is difficult to clearly explain the changes of the non-stimulated ROS production at only 180 minutes for oysters fed 10% and 50% of lipid emulsion and their highest response to zymosan particles at the end of the experiment. This may result of a complex fatty acid reorganization or/and changes in eicosanoid production. EPA, 20:5n-3 may act as a competitive inhibitor of 20:4n-6 in eicosanoid production and NADPH-oxydase stimulation as reported for vertebrates (Fisher *et al.*, 1990; Varming *et al.*, 1995; Lennartz, 1999; Calder, 2001).

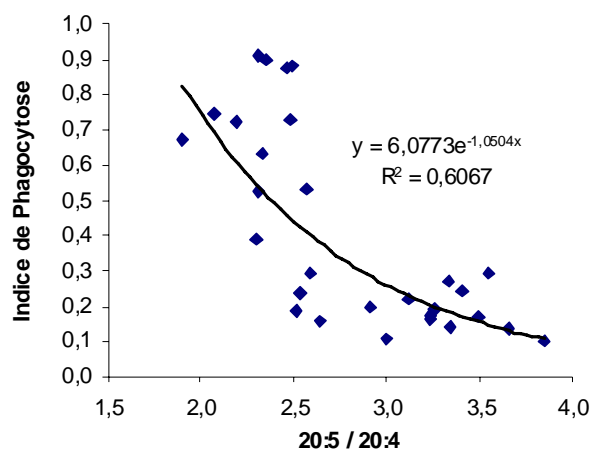


Figure 5: Correlation between 20:5n-3/20:4n-6 ratio of gill polar lipids and the phagocytosis index of hemocytes.

Conclusion

In conclusion, this study demonstrated that high amounts of 20:5n-3 PUFAs supplied by lipid emulsion appeared to enhance hemocyte proliferation, but have a suppressive and temporary effect on the phagocytosis activity and ROS production. 20:5n-3 may affect

hemocyte parameters by changing membrane properties or by acting as a competitive inhibitor of 20:4n-6 for eicosanoid production and in NADPH-oxydase activation.

Acknowledgements

We are grateful to Eric Lund, Vincent Encomio and Georgeta Constantin for their help in hemolymph sampling. We want also to thank John Brake and Sean Matson of the Coastal Oregon Marine Experimental Hatchery for rearing oysters during the experiment. This research was a part of the MOREST project supported by a grant from IFREMER, the Région Bretagne, Région Normandie, Région Pays de Loire, Région Poitou-Charente and the Conseil Général du Calvados.

References

- Albentosa, M., Perez-camacho, A., Labarta, U., Beiras, R. & Fernandez-Reiriz, M.J., 1993. Nutritional value of algal diets to clam spat *Venerupis pullastra*. *Marine Ecology Progress Series*. (97) 261-269.
- Allam, B., Paillard, C. & Auffret, M., 2000. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. (76) 63-69.
- Auffret, M. & Oubella, R., 1995. Cytological and cytometric analysis of bivalves molluscs hemocytes, in: (Eds: Stolen, J.S., Fletcher, C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaattari, S.L., Anderson, R.S., Soderhall, K. & Weeks-Perkins, B.A.). Fair Haven: SOS Publication.
- Bass, D.A., Wallace Parce, J., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C. & Thomas, M., 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils : a graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology*. (130) 1910-1917.
- Berntsson, K.M., Jonsson, P.R., Wängberg, S.A. & Carlsson, A.S., 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. (154) 139-153.
- Berthelin, C., Kellner, K. & 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.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. (37) 911-917.
- Brown, M.R., McCausland, M.A. & Kowalski, K., 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*. (165) 281-293.

Caers, M., Coutteau, P. & Sorgeloos, P., 2000. Incorporation of different fatty acids, supplied as emulsions or liposomes, in the polar and neutral lipids of *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*. (186) 157-171.

Calder, P.C., 2001. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? *Nutrition Research*. (21) 309-341.

Cho, S.M., Jeong, W.G., 2005. Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. (244) 383-387.

Chu, F.L.E. & Webb, K.L., 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids*. (19) 815-820.

Chu, F.-L.E. & Greaves, J., 1991. Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*. (110) 229-236.

Chu, F.L.E. & La Peyre, J., 1993. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica* : temperature effects. *Dis. Aqua. Org.*, (16) 223-234.

Coutteau, P., Castell, J.D., Ackman, R.G. & Sorgeloos, P., 1996. The use of lipid emulsions as carriers for essential fatty acid in bivalves: A test case with juvenile *Placopecten magellanicus*. *Journal of Shellfish Research*. (15) 259-264.

De Moreno, J.E.A., Moreno, V.J. & Brenner, R.R., 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides* : 2-Polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids*. (11) 561-566.

Delaporte, M., 2001. Etude de la qualité lipidique du régime nutritif sur la composition des membranes des hémocytes de *C. gigas*. Impact sur les capacités de défense. *Mémoire de fin d'études du DEA de Biologie et Productions animales. Université de Rennes 1*.

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C. & Samain, J.-F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalves species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology*. (206) 3053-3064.

Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S. & Samain, J.F. Impact of food availability on energetic storage and related hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. (in preparation, cf. 1^{er} article).

Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S. & Samain, J.F. Differences in biochemical composition and immunological parameters between two different genetic stocks of Pacific oysters *Crassostrea gigas* : resistant vs susceptible to summer mortalities. (in preparation, cf. 2^d article)

Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. & Samain, J.F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (173) 163-179.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. (28) 350-356.

Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. & Castell, J.D., 1986. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (96) 1-13.

Enriquez-Diaz, M., 2004. Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale*.

Fisher, M., Levine, P.H., Weiner, B.H., Johnson, M.H., Doyle, E.M., Ellis, P.A. & Hoogasian, J.J., 1990. Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte-enriched preparation of leukocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*. (51) 804-808.

Ford, S.E., Kanaley, S.A. & Littlewood, D.T.J., 1993. Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*. (61) 49-57.

Harbige, L.S., 2003. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids*. (38) 323-341.

Haugland, R.P., 2002. Molecular Probes. Handbook of fluorescent probes and research products. Ninth Edition, in: (Eds: Molecular probes Inc.,

Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Delaporte, M., Alix, J.H., Smith, B.C., Dixon, M.S., Quéré, C., Le Coz, J.R., Paillard, C., Moal, J. & Samain, J.F., 2004. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture*. (234) 541-560.

Heras, H., Kean-Howie, J. & Ackman, R.G., 1994. The potential use of lipid microspheres as nutritional supplements for adults *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. (123) 309-322.

Jonsson, P.R., Berntsson, K.M., André, C. & Wänberg, S.-A., 1999. Larval growth and settlement of the European oyster (*Ostrea edulis*) as a function of food quality measured as fatty acid composition. *Marine Biology*. (134) 559-570.

Kew, S., Mesa, M.D., Tricon, S., Buckley, R., Minihane, A.M. & Yaqoob, P., 2004. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans¹⁻³. *American Journal of Clinical Nutrition*. (79) 674-681.

Kiron, V., Fuduka, H., Takeushi, T. & Watanabe, T., 1995. Essential fatty acids nutrition and defense in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (111 A) 361-367.

Knauer, J. & Southgate, P.C., 1997. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. *Aquaculture*. (154) 293-303.

Laing, I. & Millican, P.F., 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. *Aquaculture*. (54) 245-262.

Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G. & Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry. A tool to evaluate pathogenic *Vibrio* inhibiting capacity. *Fish and Shellfish Immunology*. (15) 225-240.

Langdon, C.J. & Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of Marine Biology Association U.K.*, (61) 431-448.

Langdon, C.J. & Siegfried, C.A., 1984. Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. *Aquaculture*. (39) 135-153.

Lingenfelter, J.T., Blazer, V.S. & Gay, J., 1995. Influence of fish oils in production catfish feeds on selected disease resistance factors. *Journal of Applied Aquaculture*. (5(2)) 37-48.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. 265-275.

Lucas, A. & Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*. (44) 187-200.

Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J. & Samain, J.F., 1992. Change in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (163) 221-234.

Metcalf, L.D. & Schmitz, A.A., 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*. (33) 363-364.

Mori, K., Tamate, H., Imai, T. & Itikawa, O., 1965. Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima bay. V. Changes in the metabolism of lipids and glycogen of the oyster during the stages of sexual maturation and spawning. *Bulletin of Tohoku Reg. Fisheries Research Laboratory*. (25) 49-63.

Nevejan, N., Saez, I., Gajardo, G. & Sorgeloos, P., 2003. Energy vs. essential fatty acids: what do scallop larvae (*Argopecten purpuratus*) need most? *Comparative Biochemistry and Physiology*. (134 B) 599-613.

Numaguchi, K. & Nell, J.A., 1991. Effects of gelatin-acacia microcapsule and algal meal supplementation of algal diets on growth rates of Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley), larvae. *Aquaculture*. (94) 65-78.

Ordas, M.C., Ordas, A., Beloso, C. & Figueras, A., 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. (10) 597-609.

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. & 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.

Parker, R.S. & Selivonchik, D.P., 1986. Uptake and metabolism of lipid vesicles from seawater by juvenile pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. (53) 215-228.

Perdue, J. & Erickson, K.L., 1984. A comparison of the gametogenetic cycle between the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the suminoe oyster *Crassostrea rivularis* in Washington State. *Aquaculture*. (37) 231-237.

Pernet, F., Tremblay, R., Langdon, C. & Bourget, E., 2004. Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussels (*Mytilus sp.*) larvae. *Marine Biology*. (144) 693-703.

Peterson, L.D., Jeffery, N.M., Thies, F., Sanderson, P., Newsholme, E.A. & Calder, P.C., 1998. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid

composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids*. (33) 171-180.

Robinson, A., 1992. Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* Kumamoto (Thunberg) : II Effects of glycogen; lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. *Journal of Shellfish Research*. (11) 443-447.

Ruiz, C., Abad, M., Sedano, L.O., Garcia-Martin, L.O. & Sanchez Lopez, J.L., 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (155) 249-262.

Sipka, S., Dey, I., Buda, C., Csongor, J., Szegedi, G. & Farkas, T., 1996. The mechanism of inhibitory effect of eicosapentaenoic acid on phagocytic activity and chemotaxis of human neutrophil granulocytes. *Clinical Immunology and Immunopathology*. (79) 224-228.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J. & Samain, J.F., 1995. Separation of major polar lipids in *Pecten maximus* by high performance liquid chromatography and subsequent determination of their fatty acids using gas chromatography. *Journal of Chromatography*. (673) 15-26.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quéré, C., Le Coz, J.R. & Samain, J.F., 1996. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture*. (143) 361-378.

Soudant, P., Moal, J., Marty, Y. & Samain, J.F., 1997. Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.). Effect of nutrition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (215) 103-114.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Masski, H. & Samain, J.F., 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*. (121 A) 279-288.

Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F. & Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (123 B) 209-222.

Thies, F., Nebe-von-Caron, G., Powell, J.R., Yaqoob, P., Newsholme, E.A. & Calder, P.C., 2001. Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged >55y¹⁻³. *American Journal of Clinical Nutrition*. (73) 539-48.

Thompson, K.D., Tatner, M.F. & Henderson, R.J., 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition*. (2) 21-31.

Uriarte, I., Farias, A., Hernandez, J., Schafer, C. & Sorgeloos, P., 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture*. (230) 349-357.

Varming, K., Schmidt, E.B., Svaneborg, N., Moller, J.M., Lervang, H.H., Grunnet, N., Jersild, C. & Dyerberg, J., 1995. The effect of n-3 fatty acids on neutrophil chemiluminescence. *Scandinavia Journal of Clinical Laboratory Investigation*. (55) 47-52.

Virella, G., Kilpatrick, J.M., Rugeles, M.T., Hyman, B. & Russell, R., 1989. Depression of humoral responses and phagocytic functions *in vivo* and *in vitro* by fish oil and eicosapentanoic acid. *Clinical Immunology and Immunopathology*. (52) 257-270.

Waagbo, R., Sandnes, K., Jorgensen, J., Engstad, R., Glette, J. & Lie, O., 1993. Health aspects of dietary lipid sources and vitamin E in atlantic salmon (*Salmo salar*). II. Spleen and erythrocyte phospholipid fatty acid composition, nonspecific immunity and disease resistance. *Fisk. Dir. Skr. Ser. Ernering*. (6) 62-80.

Watanuki, H., Yamaguchi, T. & Sakai, M., 2002. Suppression in function of phagocytic cells in common carp *Cyprinus carpio* L. injected with estradiol, progesterone or 11-ketotestosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (132 C) 407-413.

Yamaguchi, T., Watanuki, H. & Sakai, M., 2001. Effects of estradiol, progesterone and testosterone on the function of carp, *Cyprinus carpio*, phagocytes *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (129 C) 49-55.

Synthèse du 4^{ème} article :

« Changes in immune parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with rich lipid emulsion of eicosapentaenoic acid. »

A la fin de la première expérimentation ALGUES (3^{ème} article), il a été supposé que les différences de paramètres hématologiques des huîtres et des palourdes nourries avec l'algue *C. calcitrans* par rapport à celles nourries avec les algues T-Iso et *T. suecica* pouvaient résulter de la richesse en 20:5(n-3) et/ou en 20:4(n-6) de l'algue *C. calcitrans*. Comme ces deux acides gras sont des éléments importants de la réponse immunitaire des vertébrés, il a été décidé de déterminer tout d'abord le rôle du 20:5(n-3) sur les paramètres hématologiques des huîtres. Pour répondre à cette question, les huîtres ont été nourries pendant 7 semaines avec l'algue T-Iso, caractérisée par sa déficience en 20:5(n-3) (Soudant, 1995 ; Fernandez-Reiriz *et al.*, 1998, 1999 ; McCausland *et al.*, 1999 ; Delaporte *et al.*, 2003) à raison de 5% du poids sec d'algues par poids sec d'huîtres. L'apport du 20:5(n-3) a été réalisé via l'utilisation d'une émulsion lipidique qui évite les apports simultanés d'autres classes de composés, mais qui ne permet pas toutefois un apport exclusif de cette molécule. Le régime algal T-Iso a ainsi été complété avec différentes doses de l'émulsion lipidique enrichie en cet acide gras (0%, 1%, 10% and 50% d'émulsion par poids sec de la ration algale).

Les résultats de cette étude montrent que l'émulsion lipidique a bien été ingérée et digérée. En effet au cours du conditionnement, l'apport en 20:5(n-3) via l'émulsion lipidique a permis de maintenir la proportion de cet acide gras dans les membranes des branchies des huîtres nourries avec la ration de 50% d'émulsion lipidique. Au contraire, la proportion de cet acide gras diminue dans les huîtres nourries avec les autres traitements. Par ailleurs, un enrichissement en 20:4(n-6) a été également observé dans les membranes des huîtres nourries avec 10% et 50% d'émulsion lipidique. Or, cet acide gras n'est fourni que par l'émulsion lipidique, puisque l'algue T-Iso est déficiente en cet acide gras. Les changements dans les proportions des autres acides gras des membranes des branchies tels le 18:0, 18:1(n-9), 18:2(n-6), 22:5(n-6), 22:5(n-3) et 22:6(n-3) attestent aussi de l'efficacité de la supplémentation. L'ensemble de ces changements sont en accord avec la littérature pour ce qui concerne l'effet de la nutrition lipidique sur la composition des membranes de divers tissus et larves de bivalves (Langdon & Waldock, 1981 ; Delaunay *et al.*, 1993 ; Berntsson *et*

al., 1997 ; Fernandez-Reiriz *et al.*, 1998, 1999 ; Soudant *et al.*, 1996, 1997, 1999 ; Delaporte *et al.*, 2003).

L'évolution de l'indice de condition et de la composition biochimique des huîtres indique que les huîtres nourries avec la dose de 50% d'émulsion lipidique, et à un moindre degré celles nourries avec la dose de 10%, ont développé plus de tissu gonadique jusqu'à arriver à maturité sexuelle. Ceci s'est traduit par des pontes partielles dans les bacs d'élevage au cours des trois dernières semaines de conditionnement (C. Langdon, com. pers.), et aussi lors du dernier prélèvement d'hémolymphe. Il est possible que l'apport en grande quantité en lipides et/ou 20:5(n-3) via l'émulsion lipidique ait favorisé la gamétogenèse de ces huîtres. En effet, Soudant *et al.* (1999) ont démontré que cet acide gras était accumulé de façon préférentielle dans le tissu gonadique des huîtres au cours de la gamétogenèse.

En ce qui concerne les paramètres hématocytaires, la supplémentation lipidique a significativement influencé l'évolution de la concentration hématocytaire et l'activité de phagocytose des hémocytes des huîtres.

Après 4 semaines de conditionnement, les huîtres nourries avec la dose de 50% d'émulsion présentent les plus fortes concentrations hématocytaires. Comme dans le cadre de la précédente étude (cf. 3^{ème} article) avec l'algue *C. calcitrans*, il semblerait qu'un lien existe entre la richesse en 20:5(n-3) et peut être en partie en 20:4(n-6) de ce traitement (T-Iso + 50% d'émulsion) et la concentration hématocytaire.

La supplémentation lipidique à l'aide de l'émulsion lipidique riche en 20:5(n-3) a aussi influencé les activités hématocytaires des huîtres. Ainsi, au cours des quatre premières semaines de conditionnement, l'activité de phagocytose des hémocytes des huîtres nourries avec les doses de 10% et 50% d'émulsion restent faibles. Le maintien de 20:5(n-3) en grande proportion dans les membranes des huîtres semble avoir un effet négatif sur cette activité. Ce résultat est en accord avec ceux reportés sur l'effet inhibiteur du 20:5(n-3) sur l'activité de phagocytose chez les vertébrés (Virella *et al.*, 1989 ; Sipka *et al.*, 1996 ; Peterson *et al.*, 1998 ; Thies *et al.*, 2001 ; Kew *et al.*, 2004).

Cependant, à la fin du conditionnement, l'effet de la supplémentation en 20:5(n-3) disparaît alors que les changements de composition en acides gras des membranes entre les huîtres des différentes conditions nutritives s'accroissent. L'augmentation de la proportion en 20:4(n-6) ou d'un autre acide gras dans les membranes des huîtres nourries avec les doses de

10% et 50% d'émulsion peut aussi avoir eu aussi un impact sur la modulation de l'activité de phagocytose de ces huîtres.

L'évolution de l'activité de phagocytose n'est pas corrélée avec la proportion en 20:5(n-3) ni en 20:4(n-6) des membranes des huîtres ($p > 0.05$), mais elle est négativement corrélée à celle du ratio en acides gras (n-3)/(n-6) ($p < 0.01$, $R^2 = 0.7$). Cette dernière corrélation semble suggérer qu'il existe un équilibre entre les acides gras en (n-3) et (n-6) à respecter pour que les cellules conservent leur potentialité fonctionnelle, comme le propose Harbige (2003) pour les vertébrés.

Bien que la production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) soit souvent associé au processus de phagocytose pour la destruction des particules phagocytées, dans cette étude, aucune relation n'existe entre ces deux paramètres hémostatiques. Cependant, cette étude nous a permis de mettre en évidence une diminution de la production de ROS après 180 minutes d'incubation pour les huîtres nourries avec les doses de 10% et 50% d'émulsion. Il est possible que le 20:5(n-3) ait un effet négatif sur cette activité en influençant la structure membranaire des hémostates et/ou en rentrant en compétition avec le 20:4(n-6) dans la production d'écosanoides et la stimulation de la NADPH-Oxydase (Fisher *et al.*, 1990 ; Varming *et al.*, 1995 ; Lennartz, 1999 ; Calder, 2001).

Après avoir testé le rôle du 20:5(n-3) sur les paramètres physiologiques des huîtres, il a été décidé d'étudier le rôle du 20:4(n-6), l'autre acide gras présent dans l'algue *C. calcitrans* mais aussi apporté avec l'émulsion lipidique. Afin d'éviter l'apport d'autres acides gras qui pourraient aussi affecter les paramètres hémostatiques mesurés, une nouvelle technique de supplémentation mise au point par Séguineau *et al.* (en préparation) a été utilisée. Cette technique permet de tester de façon plus spécifique le rôle du 20:4(n-6).

5^{ème} article : "Changes in immune parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-*Iso* supplemented with increasing amounts of arachidonic acid"

Maryse Delaporte ^a, Philippe Soudant ^{b*}, Emilie Giudicelli ^a, Jeanne Moal ^a, Christophe Lambert ^b, Catherine Séguineau^a & Jean-François Samain ^a •

Abstract

The aim of this study was to assess the impact of arachidonic acid (ArA) supplementation on fatty acid composition and hemocyte parameters of oysters. One year old oysters were fed T-*Iso* supplemented with ArA solutions, using ethanol as carrier, directly added in rearing tanks (0, 0.25 and 0.41 µg ArA / ml of sea water) for one month. To assess assimilation and incorporation of Ara in ethanol, a control experiment was conducted with only Ara (without algae) during two weeks. Results showed that ArA was efficiently incorporated in gill polar lipids. ArA percentage increased from 4.5% up to 19.7% after one month of experiment with the highest dose of ArA solution. Incorporation of ArA was also observed in the oyster gills which were supplemented with only ArA added in the rearing tanks. Concomitantly, ArA supplementation led to an increase of hemocyte concentration in oysters fed T-*Iso* supplemented with ArA when compared to oysters fed T-*Iso* alone. Phagocytosis activity of these oysters was higher after two weeks of ArA dietary conditioning; but this effect disappeared at the end of the experiment. Also the susceptibility of hemocyte adhesive capacity to *Vibrio aestuarianus* extra-cellular products was significantly reduced after 2 and 4 weeks of feeding ArA supplemented T-*Iso* as compared to the beginning of the experiment. Finally, a high increase of reactive oxygen species production was observed after 4 weeks of feeding oysters with T-*Iso* supplemented with ArA.

Keywords : *Crassostrea gigas*, arachidonic acid, nutrition, poly-unsaturated fatty acids, hemocyte parameters

• ^a Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, centre IFREMER de Brest, BP70, 29280 Plouzané, France.

^b Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France.

* Corresponding author (Philippe.Soudant@univ-brest.fr)

Short title : hemocyte parameters and AA incorporation

Introduction

Since more than two decades, studies about bivalve nutrition have been focus on the determination of the nutritional quality of various algal species to support and improve larval development, growth, and reproduction in hatchery conditions (Epifanio *et al.*, 1979 ; Enright *et al.*, 1986 ; Thompson & Harrison, 1992 ; Albentosa *et al.*, 1993 ; Wikfors *et al.*, 1996 ; Thompson *et al.*, 1996 ; Brown *et al.*, 1998 ; Utting & Millican, 1997 ; Knauer & Southgate, 1997 ; Fernández-Reiriz *et al.*, 1999 ; McCausland *et al.*, 1999 ; Soudant *et al.*, 2000 ; Knuckey *et al.*, 2002 ; Hendrick *et al.*, 2003 ; Martinez-Fernandez *et al.*, 2004). Only, few studies have investigated the impact of the nutrition on immune parameters of mollusc bivalves (Delaporte *et al.*, 2003 ; Hégaret *et al.*, 2004 ; Delaporte *et al.*, in prep., cf. 4^{ème} article) although high intake of dietary (n-3) poly-unsaturated fatty acids (PUFAs) has been demonstrated to modulate immune responses in human (see Calder, 2001, Harbige, 2003) and in fish (Waagbø *et al.*, 1993 ; Kiron *et al.*, 1995 ; Lingenfelser *et al.*, 1995 ; Thompson *et al.*, 1996). Lingenfelser *et al.* (1995) demonstrated on the channel catfish *Ictalurus punctatus* that macrophage (n-3) PUFA enrichment of fish fed menhaden oil allowed to maintain macrophage membrane fluidity and high phagocytic activity at 18°C while it was not beneficial when fishes are reared at 25°C.

Recently, Delaporte *et al.* (2003) have demonstrated that feeding Pacific oysters *Crassostrea gigas* and Manila clams *Ruditapes philippinarum* with *Chaetoceros calcitrans* alga led to an increase of hemocyte concentration, reactive oxygen species production and phagocytosis capacity for those animals in comparison to those fed T-*Iso* (*Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitian) or *Tetraselmis suecica* alga. The authors argued that difference in fatty acid composition between algae might be implicated in the changes in bivalve hemocyte responses as demonstrated for vertebrates and fishes fed on different types of oils. Thus, as the fatty acid composition of *Chaetoceros calcitrans* (a diatom) is typically characterised by higher proportions of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3, 17.8%) and arachidonic acid (ArA, 20:4n-6, 2.0%) compared to T-*Iso* and *T. suecica*, these two PUFAs were suspected to be responsible of the changes in the immune parameters. Similarly, Hégaret *et al.* (2004) showed that immune parameters of the Eastern oysters *Crassostrea virginica* were modulated by the quality of the algal diet. The phagocytosis activity of oysters fed *Skeletonema costatum* (another diatom) were higher than those fed *Tetraselmis chui* or the mix diet when they were subjected a sudden increase of temperature. Nonetheless, no PUFA could be clearly and

individually identified as responsible of those changes. It is difficult to assess the respective impact of individual PUFA since the quantity and quality of PUFA vary with algae species along with other essential nutrients (sterols, oligoelements, vitamins...).

Although they are still not used routinely in hatchery, artificial diets such as lipid emulsion have been developed to supplement live algal diets with essential PUFAs (Langdon & Waldock, 1981 ; Langdon & Siegfried, 1984 ; Parker & Selivonchick, 1986 ; Numaguchi & Nell, 1991 ; Heras *et al.*, 1994). However, lipid emulsion presented two major inconvenients : 1) their assimilation is generally low, between 5-10% (Soudant *et al.*, 2000) ; 2) they can not be prepared with pure individual PUFA. Thus, others fatty acid lipids contributing to its preparation constituted also a significant source of energy and may result in confounding effects. Recently, a new technique of supplementation was developed (Séguineau *et al.*, in prep.). The method is based on the direct addition of individual PUFA (20:4n-6) along with *T-Iso* feeding (deficient in 20:4(n-6)) and was demonstrated to be an efficient way to incorporate individual PUFA in polar lipids of oyster spat. Therefore, this new technique of supplementation was applied to determine the impact of the 20:4n-6 on the hemocyte parameters of *C. gigas*.

Material and Methods

Broodstock conditioning

One year old oysters *C. gigas* produced in 2003 in the IFREMER hatchery in La Tremblade (Charente, France) were conditioned at the IFREMER shellfish laboratory in Argenton (Finistère, France) in 50-L tanks in May 2004. Oysters were acclimated at the final temperature of 17°C two weeks prior to the dietary conditioning. *T-Iso* alga was chosen for this experiment because of its deficiency in arachidonic acid (AA, 20:4(n-6), 0.1%, Delaporte *et al.*, 2003). After acclimation period, oysters were divided randomly and distributed into 9 tanks (3 replicates per treatment). Thereafter, oysters were fed *T-Iso* supplemented or not with AA solution for 4 weeks. The daily algal ratio was established at 4% of algal dry weight per oyster dry weight. Arachidonic acid was dissolved in ethanol solution according to Séguineau *et al.* (in prep.) at the concentration of 10 mg.ml⁻¹ (working solution). Three doses of ArA solution were prepared using similar amount of ethanol and were added during the algal feeding : 0 µg (control ethanol solution), 0.25µg or 0.41 µg of ArA per ml of sea water. Every

two weeks, 15 oysters were sampled for biochemical analyses and 20 oysters for immune analyses.

A control experiment was conducted with the same experimental protocol to assess the assimilation of dissolved arachidonic acid without algae dietary supplementation during a period of 2 weeks.

Condition index

At each sampling date, whole oyster, shell and whole wet flesh weights of 15 oysters were measured and flesh tissues were used to constitute 3 pools of five animals. These pools were then frozen in liquid nitrogen (-196°C). For dry weight measurement, pools were ground with a Danguomeau homogeniser. About 1 g of powder of each pools were placed in pre-weighted aluminium cups, dried for 48h at 80°C and then weighted again. The remaining powder was used for biochemical analyses. Whole oyster dry flesh weight was back calculated from the whole wet flesh weight based on the dry to wet weight ratio of the aliquot of powder. The condition index of oysters was then calculated as described by Walne & Mann (1975) following the formula: $\text{dry flesh weight} / \text{dry shell weight} \times 1000$.

Biochemical composition

An aliquot of 600 mg of powder was re-suspended with 3 ml of distilled water and then divided into three aliquots. Total lipid content was estimated according to Bligh & Dyer (1959) after extraction with a mixture of dichloromethane-ethanol-water. The lipid extract was placed in a pre-weighted Teflon cup, evaporated under nitrogen, and the lipid content was estimated gravimetrically. Carbohydrate and protein contents were measured colorimetrically following the procedure of Dubois *et al.* (1956) and Lowry *et al.* (1957), respectively. Results are expressed as mg per total oyster tissue dry weight.

Fatty acid analysis of oyster gills

Sampling and extraction

Dietary changes measured in the fatty acid composition of hemocyte membranes are paralleled in oysters by similar changes in the fatty acid composition of their gill membranes (Delaporte, 2001 ; cf. Annexe 3); therefore, in the present study fatty acid analyses were performed on gills rather than on hemocyte samples which are more difficult to collect in significant amounts.

Gills were dissected from the same animals utilised for the hemocyte parameter analysis. Three pools of gills from 5 animals were constituted and frozen in liquid nitrogen at -196°C. Pooled gills were ground with a Danguomeau homogeniser and 300 mg of the ground tissue was transferred to a tube containing 6 ml of chloroform-methanol mixture (2:1, v:v). After centrifugation, lipid extract was transferred in a clean tube, sealed under nitrogen and stored at -20°C.

Separation of polar and neutral lipid

Neutral and polar lipids of gill lipid extracts were purified on a Silica gel microcolumn according to Marty *et al.* (1992). Briefly, an aliquot of the lipid extract in chloroform/methanol was evaporated to dryness. Lipids were re-dissolved in three aliquots of 500 µl chloroform-methanol mixture (98:2, v:v) and the pooled lipid extract placed on a silica gel microcolumn [30x5 mm i.d. Kieselgel, 70-230 mesh (Merck); previously heated to 450°C and deactivated with 5% water]. Neutral lipids were eluted with 10 ml chloroform-methanol mixture (98:2, v:v) and the polar lipids were eluted separately with 15 ml methanol. A known amount of 23:0 fatty acid (2.3 µg) was added in both neutral and polar fractions, as internal standard.

Fatty acid analysis

Neutral and polar lipids of gills were transesterified by 10% w:w boron trifluoride/methanol (Metcalf & Schmitz, 1961) and analysed according to the method described by Marty *et al.* (1992). Fatty acid methyl esters (FAME) were analysed in a gas chromatograph equipped with a on-column injector, a DB-Wax (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness) capillary column, a flame ionization detector. Hydrogen was used as the

carrier gas. The fatty acids were identified by comparing their retention times with those of standards.

Polar lipids, mainly phospholipids, generally provide a good approximation of cell membrane lipids whereas neutral lipids are found at low levels in gill lipids (Soudant *et al.*, 1995a; Soudant *et al.*, 1996; Soudant *et al.*, 1997; Soudant *et al.*, 1998). Moreover, as the neutral lipid fraction represented less than 20% of gill total lipids and in order to simplify data presentation, only the fatty acid composition of gill polar lipids was presented in this study.

Measurements of immunological parameters by flow cytometry

The characterisation of hemocyte type, number and functions were realised using a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickinson) equipped with a 488 nm argon laser. Hemolymph sampling and hemocyte parameters measurements are described hereafter. All the described working solutions were used at 1/100 final concentration (v:v) in all the immune assays

Preparation of *Vibrio aestuarianus* extra-cellular products (ECP)

Since it has been showed that ECP can induce ROS production by *C. gigas* hemocytes (Labreuche *et al.*, in revision), extra-cellular products of the *Vibrio aestuarianus* were used to modulate the reactive oxygen species (ROS) production of hemocytes.

Hemolymph sampling

Hemolymph was withdrawn from individual oysters using a 1 ml plastic syringe fitted with a 25-gauge needle via a notch adjacent to the adductor muscle realised just prior the bleeding. All hemolymph samples were examined microscopically for contamination (oocytes, sperms, algae...) and stored individually in micro-tubes at 0°C. Three pools of five individual samples were used for all the following immune assays.

Hemocyte viability, total hemocyte and sub-population concentrations

An aliquot of 100 µl pooled hemolymph was filtered through an 80 µm mesh and transferred into a tube containing a mixture of anti-aggregant solution for hemocytes

(AASH)(200 µl) and filtered sterile seawater (FSSW) (100 µl). AASH was prepared according to Auffret and Oubella (1995). Hemocyte DNA was stained with two fluorescence DNA/RNA specific dyes, SYBR Green I (final concentration 10X) and with propidium iodide (PI, final concentration of 20 µg.ml⁻¹), in darkness at room temperature for 60 minutes before flow cytometry analysis. SYBR Green I permeates both dead and live cells, while PI permeates only through membranes of dead cells. SYBR Green fluorescence was measurable at 500-530 nm (green) by flow cytometry while PI fluorescence was detected at 550-600 nm (red). So, by counting the cells stained by PI among cells stained by SYBR Green, it was possible to estimate precisely the percentage of viable cells in each sample.

All SYBR Green I stained cells were plotted on a FSC (size) - SSC (complexity) cytogram allowing identification of hemocyte sub-populations. Three sub-populations were distinguished according to their size and complexity and termed granulocytes (high FSC and high SSC), hyalinocytes (high FSC and low SSC) and small agranulocytes (low FSC and low SSC). Total and differential hemocyte concentrations are expressed as number of cells per ml.

Phagocytosis assays

An aliquot of 100 µl pooled hemolymph, primarily diluted with 100 µl of FSSW, were brought into contact with 30 µl of the working solution of fluorescent beads. Fluorescent bead working solution was prepared from fluoresbrite microspheres YG 2.0 microns stock solution (Polysciences, Eppelheim, Germany) diluted to 2% in FSSW. After 120 minutes of incubation at 18°C, hemocytes were fixed with 230 µl of a 6% formalin solution and analysed at 500-530 nm on the FL1 detector by flow cytometry to detect cells containing fluorescent beads. The phagocytic activity of hemocytes was estimated by the percentage of hemocyte that have engulfed two beads and more.

Adhesion capacity

The adhesive capacity of *C. gigas* hemocytes was assessed by modifying the procedure of Choquet *et al.* (2003). In the present study, live pathogenic bacteria were replaced by the extra-cellular products of the *Vibrio aestuarianus*, previously demonstrated to affect adhesive capacity of *C. gigas* hemocytes (Labreuche *et al.*, in press). Two sub-samples of each pooled hemolymph were distributed (100 µl per well) in a 24-well microplates. An

aliquot of 100 µl FSSW was added to the first sub-sample as a control and 100 µl ECP suspension to the second (30 µg/ml final concentration). After three hours of incubation, the supernatant containing not adhering cells was transferred into a flow cytometer tube and fixed by addition of 200 µl of a 6% formalin solution. After 30 minutes of incubation with SYBR Green I, cell concentration was then evaluated as described above. Results are expressed as the percentage of hemocytes in the supernatant, with or without ECP, relative to the hemocyte concentration measured in the hemolymph pool prior incubation.

Reactive oxygen species (ROS) production

Measurement of the ROS production of hemocytes was assayed by modifying the procedure of Lambert *et al.* (2003) and Labreuche *et al.* (in press) using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). For this assay, 100 µl aliquot hemolymph was diluted with 200 µl of FSSW, then 100 µl of *Vibrio aestuarianus* ECP (30 µg/ml final concentration) was added. In a other tube, hemolymph was diluted with 300 µl of FSSW (as a control). DCFH-DA (final concentration of 0.01 mM) was added to each tube maintained on ice and tubes were incubated at 18°C for 120 minutes. After incubation period, DCF fluorescence, quantitatively related to intra-cellular ROS production of hemocytes, was measured at 500-530 nm by flow cytometry. Results are expressed as the mean geometric fluorescence (in arbitrary units) detected in hemocyte sub-populations maintained in FSSW (non-activated ROS production) and after addition of ECP (activated ROS production).

Statistical analysis

Two ways analysis of variance (MANOVA) were performed for all biochemical and immune parameters using STATGRAPHICS Plus 5.1 to test the arachidonic acid dose effect and the date effect (after 2 and 4 weeks of dietary conditioning). One way-ANOVA were also performed to test the dietary effect at each sampling date. Percentage data were transformed (arcsin of the square root) before ANOVA or MANOVA, but were presented in figures and tables as untransformed percentage values.

Results

Mortality and condition index (CI)

During the experiment, no mortalities were recorded. In addition, condition index of oyster was not affected by either dietary conditioning or sampling date (Table 1, ANOVA, $p > 0.05$).

Oyster dry weight

Oyster tissue dry weights were not affected by dietary conditioning at the end of the experiment (Table 1, ANOVA, $p > 0.05$); however a significant date effect was reported (ANOVA, $p < 0.001$). Oyster dry tissue weights were lower at the end of the experiment than initially.

Biochemical composition

The biochemical composition of oysters is presented in Table 1. Carbohydrate content decreased significantly during the 4 weeks of the dietary conditioning from 0.205 mg initially to an average of 0.155 mg at the end of the experiment (ANOVA, $p < 0.001$) while total lipid content of oysters increased during the conditioning (ANOVA, $p < 0.0001$).

No significant differences between dietary treatments were observed for carbohydrate and lipid contents (ANOVA, $p > 0.05$). Protein contents of oysters were comparable regardless dietary treatment and sampling date (ANOVA, $p > 0.05$).

Table 1: Condition index ($n=15$, Mean \pm SD), oyster dry tissue weight in grams ($n=15$, Mean \pm SD) and carbohydrate, lipid and protein contents expressed mg per oyster dry tissue weight ($n=3$, Mean \pm SD) of oysters fed T-Iso supplemented with 0, 0.25 and 0.41 $\mu\text{g/ml}$ of ArA. Different lower-case letters indicate significant difference between dietary treatments (ANOVA, $p<0.05$). Asterisks indicate significant difference with initial composition (T-test, $p<0.05$).

	Initial	After 4 weeks of conditioning		
		0 μg AA / ml	0.25 μg AA / ml	0.41 μg AA / ml
Condition index	4.3 \pm 0.9	3.6 \pm 0.7 ^a	3.9 \pm 0.5 ^a	3.5 \pm 0.6 ^a
Oyster dry weight (g)	0.476 \pm 0.17	0.341 \pm 0.07 ^{a*}	0.341 \pm 0.15 ^{a*}	0.302 \pm 0.09 ^{a*}
Carbohydrate content	0.205 \pm 0.02	0.160 \pm 0.02 ^{a*}	0.155 \pm 0.01 ^{a*}	0.151 \pm 0.02 ^{a*}
Lipid content	0.087 \pm 0.00	0.115 \pm 0.01 ^{a*}	0.109 \pm 0.01 ^{a*}	0.107 \pm 0.00 ^{a*}
Protein content	0.359 \pm 0.03	0.403 \pm 0.01 ^{a*}	0.380 \pm 0.02 ^a	0.393 \pm 0.02 ^a

Fatty acid composition of gill polar lipids

Impact of the dietary conditioning with AA supplemented T-Iso

Feeding oysters with T-Iso alone resulted in an enrichment of gill polar lipids by 14:0, 16:0, 18:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:4n-3, 22:6n-3 and a decrease of 20:5n-3 (Table 2, ANOVA, $p<0.01$). Similar changes were observed in gill polar lipids of oysters fed ArA supplemented T-Iso, but ArA supplementation greatly increased the 20:4n-6 percentage of gill polar lipids as early as 2 weeks of dietary conditioning (Figure 1).

At the end of the experiment, percentages of 20:4(n-6) reached 6.2%, 15.3% and 19.7% of 20:4(n-6) in gill polar lipid of oysters fed respectively T-Iso supplemented with 0.0, 0.25 and 0.41 $\mu\text{g/ml}$ of AA solution. This high increase in 20:4(n-6) also led to a significant increase of total (n-6) fatty acid content in gill polar lipids and consequently a decrease of the (n-3) / (n-6) ratio and 20:5(n-3) / 20:4(n-6) ratio. However, the proportions of different fatty acid classes (SAFA, MUFA, PUFA) were not affected by the dietary conditioning.

Table 2: Fatty acid composition (expressed in weight percentage of total fatty acids) of gill polar lipid of *C. gigas* fed T-Iso supplemented 0, 0.25 and 0.41 µg/ml of AA. Different lower-case letters indicate significant differences between dietary treatments at the end of the conditioning (ANOVA, $p < 0.05$). Asterisks indicate significant differences with the initial composition (T-Test, $p < 0.05$).

Fatty acids	initial		After 4 weeks of conditioning					
			0 µg AA / ml		0.25 µg AA / ml		0.41 µg AA / ml	
	(N=2)		(N=3)		(N=3)		(N=3)	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
14:0	0.9	0.3	1.1 ^a	0.1	0.8 ^a	0.3	1.0 ^a	0.2
16:0	10.5	0.5	9.5 ^{a*}	0.6	8.4 ^{b*}	0.2	8.4 ^{b*}	0.2
18:0	5.9	0.0	4.8 ^{a*}	0.4	4.9 ^{a*}	0.3	4.9 ^{a*}	0.2
16:1(n-7)	2.2	0.3	1.8 ^a	0.1	1.3 ^{b*}	0.3	1.1 ^{b*}	0.1
18:1(n-9)	1.1	0.2	2.6 ^{a*}	0.1	2.1 ^{b*}	0.2	2.0 ^{b*}	0.2
18:1(n-7)	4.1	0.2	5.2 ^{a*}	0.2	5.3 ^{a*}	0.7	5.5 ^{a*}	0.1
20:1(n-11)	3.1	0.1	2.0 ^{a*}	0.3	2.2 ^{a*}	0.5	1.9 ^{a*}	0.2
20:1(n-7)	6.4	0.5	5.0 ^{a*}	0.1	5.4 ^{a*}	0.4	5.2 ^{a*}	0.1
18:2(n-6)	1.0	0.3	4.0 ^{a*}	0.4	2.8 ^{b*}	0.1	2.6 ^{b*}	0.1
18:3(n-3)	0.4	0.0	1.1 ^{a*}	0.0	0.7 ^{b*}	0.0	0.6 ^{b*}	0.1
18:4(n-3)	0.7	0.0	1.4 ^{a*}	0.0	1.1 ^{b*}	0.1	1.0 ^b	0.1
20:2i	0.6	0.0	0.4 ^a	0.0	0.3 ^{b*}	0.0	0.3 ^{b*}	0.0
20:2j	0.6	0.1	0.6 ^a	0.1	0.3 ^{b*}	0.1	0.3 ^{b*}	0.1
20:2(n-6)	0.3	0.2	1.1 ^{a*}	0.2	1.2 ^{a*}	0.1	1.1 ^{a*}	0.1
20:3(n-6)	0.1	0.0	0.3 ^{a*}	0.0	0.3 ^{a*}	0.0	0.3 ^{a*}	0.0
20:4(n-6)	3.7	0.1	6.2 ^a	1.5	15.3 ^{b*}	1.0	19.7 ^{c*}	0.5
20:5(n-3)	17.1	0.7	12.0 ^{a*}	1.4	9.7 ^{b*}	0.9	9.0 ^{b*}	0.6
22:2i	1.7	0.2	2.1 ^a	0.4	1.7 ^a	0.3	1.5 ^a	0.1
22:2j	11.2	0.4	7.4 ^{a*}	0.1	7.1 ^{a*}	0.7	6.5 ^{a*}	0.3
22:5(n-6)	0.9	0.2	1.0 ^a	0.2	2.1 ^{b*}	0.2	2.7 ^{c*}	0.1
22:5(n-3)	1.7	0.2	1.2 ^{a*}	0.1	1.1 ^{ab*}	0.1	1.0 ^{b*}	0.0
22:6(n-3)	17.5	0.5	21.3 ^{a*}	0.3	17.2 ^b	1.0	15.5 ^{c*}	0.8
TO. SAFA	19.8	0.8	17.4 ^{a*}	1.3	16.1 ^{a*}	0.7	16.4 ^{a*}	0.6
TO. MUFA	19.7	0.4	19.6 ^a	0.1	19.8 ^a	0.5	18.7 ^b	0.4
TO. PUFA	60.5	1.3	62.9 ^{a*}	1.1	64.0 ^{a*}	1.1	64.8 ^{a*}	0.9
Total (n-6)	7.1	0.4	13.4 ^{a*}	2.3	23.0 ^{b*}	2.0	27.1 ^{c*}	0.2
Total (n-3)	38.9	1.4	38.6 ^a	1.0	31.4 ^{b*}	2.0	28.7 ^{b*}	1.2
Total NMIs	14.1	0.3	10.5 ^{a*}	0.1	9.4 ^{b*}	1.0	8.6 ^{b*}	0.3
(n-3)/(n-6)	5.5	0.5	2.9 ^a	0.6	1.4 ^{b*}	0.2	1.1 ^{b*}	0.0
22:6(n-3)/20:5(n-3)	1.0	0.0	1.8 [*]	0.2	1.8 [*]	0.1	1.7 [*]	0.1
20:5(n-3)/20:4(n-6)	4.6	0.1	2.4 ^{a*}	0.8	0.6 ^{b*}	0.1	0.5 ^{c*}	0.0

Note: TO. SAFA=Total Saturated Fatty Acids; TO. MUFA= Total Mono-unsaturated Fatty Acids; TO. PUFA= Total Poly-unsaturated Fatty Acids; TO. NMIs=Total Non Methylene Interrupted Fatty Acids; 20:2i=20:2Δ5,11 ; 22:2i=22:2Δ7,13 ; 20:2j=20:2Δ5,13; 22:2j=22:2Δ7,15

Table 3: *Fatty acid composition (expressed in weight percentage of total fatty acids) of gill polar lipid of C. gigas fed only different doses of AA without algae. Different lower-case letters indicate significant differences between dietary treatments at the end of the conditioning (ANOVA, $p < 0.05$). Asterisks indicate significant differences with the initial composition (T-test, $p < 0.05$).*

Fatty acids	Initial		After 2 weeks of conditioning					
			0 µg AA / ml		0.25 µg AA / ml		0.41 µg AA / ml	
	(N=3)		(N=3)		(N=3)		(N=2)	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
14:0	0.4 ^{a*}	0.1	0.4 ^a	0.0	0.4 ^a	0.0	0.4 ^a	0.1
16:0	8.8	0.2	8.8 ^a	0.1	8.7 ^a	0.0	8.8 ^a	0.3
18:0	5.0	0.2	5.1 ^a	0.3	5.3 ^a	0.3	5.4 ^a	0.5
16:1(n-7)	2.0	0.1	2.6 ^{a*}	0.1	1.8 ^a	0.1	1.8 ^{a*}	0.1
18:1(n-9)	1.4	0.0	2.3 ^{a*}	0.2	2.2 ^{a*}	0.0	2.2 ^{a*}	0.1
18:1(n-7)	4.7	0.2	4.2 ^{a*}	0.0	4.2 ^{a*}	0.1	4.0 ^{a*}	0.1
20:1(n-11)	5.2	0.5	5.3 ^a	0.1	5.1 ^a	0.0	5.1 ^a	0.1
20:1(n-7)	5.2	0.2	5.1 ^a	0.1	5.3 ^a	0.2	5.1 ^a	0.1
18:2(n-6)	0.7	0.1	0.6 ^{a*}	0.0	0.6 ^a	0.1	0.6 ^{a*}	0.1
18:3(n-3)	0.5	0.0	0.5 ^a	0.0	0.5 ^a	0.0	0.4 ^{b*}	0.0
18:4(n-3)	0.4	0.0	0.3 ^a	0.0	0.3 ^{a*}	0.0	0.2 ^{a*}	0.0
20:2i	0.3	0.0	0.4 ^{a*}	0.0	0.3 ^b	0.0	0.3 ^{b*}	0.0
20:2j	0.4	0.0	0.4 ^a	0.1	0.4 ^a	0.0	0.4 ^a	0.0
20:2(n-6)	0.8	0.1	0.7 ^a	0.1	0.5 ^{a*}	0.0	0.5 ^{a*}	0.2
20:3(n-6)	0.1	0.0	0.2 ^{a*}	0.0	0.3 ^{a*}	0.0	0.3 ^{a*}	0.1
20:4(n-6)	6.8	0.3	6.7 ^a	0.1	11.3 ^{b*}	0.8	12.1 ^{b*}	1.2
20:5(n-3)	11.2	0.2	11.5 ^a	0.2	10.9 ^a	1.0	10.4 ^a	0.5
22:2i	1.9	0.0	2.1 ^{a*}	0.1	2.0 ^a	0.1	1.9 ^a	0.1
22:2j	9.6	0.2	10.7 ^{a*}	0.1	10.0 ^{b*}	0.0	9.7 ^b	0.3
22:5(n-6)	1.0	0.1	1.1 ^{a*}	0.0	1.5 ^{b*}	0.0	1.6 ^{b*}	0.1
22:5(n-3)	1.4	0.1	1.6 ^a	0.1	1.5 ^a	0.1	1.4 ^a	0.0
22:6(n-3)	24.0	0.4	22.2 ^a	0.6	19.9 ^{b*}	0.2	19.9 ^{b*}	0.3
TO. SAFA	16.7	0.5	17.1 ^a	0.5	17.1 ^a	0.2	17.5 ^a	1.1
TO. MUFA	21.9	0.6	21.9 ^a	0.1	20.9 ^a	0.2	20.5 ^{a*}	0.1
TO. PUFA	61.3	0.2	61.0 ^a	0.4	62.0 ^{a*}	0.0	62.0 ^a	1.2
Total (n-6)	9.8	0.3	9.7 ^a	0.0	14.5 ^{b*}	0.9	15.5 ^{b*}	1.4
Total (n-3)	38.9	0.3	37.2 ^a	0.4	34.4 ^{b*}	0.9	33.7 ^{b*}	0.3
Total NMIs	12.2	0.2	13.5 ^{a*}	0.0	12.7 ^b	0.0	12.3 ^b	0.4
(n-3)/(n-6)	4.0	0.1	3.8 ^a	0.0	2.4 ^{b*}	0.2	2.2 ^{b*}	0.2
22:6(n-3)/20:5(n-3)	2.1	0.1	1.9 ^{a*}	0.1	1.8 ^a	0.2	1.9 ^{a*}	0.1
20:5(n-3)/20:4(n-6)	1.7	0.1	1.7 ^a	0.1	1.0 ^{b*}	0.2	0.9 ^{b*}	0.1

Note: TO. SAFA=Total Saturated Fatty Acids; TO. MUFA= Total Mono-unsaturated Fatty Acids; TO. PUFA= Total Poly-unsaturated Fatty Acids; TO. NMIs=Total Non Methylene Interrupted Fatty Acids; 20:2i=20:2Δ5,11 ; 22:2i=22:2Δ7,13 ; 20:2j=20:2Δ5,13; 22:2j=22:2Δ7,15

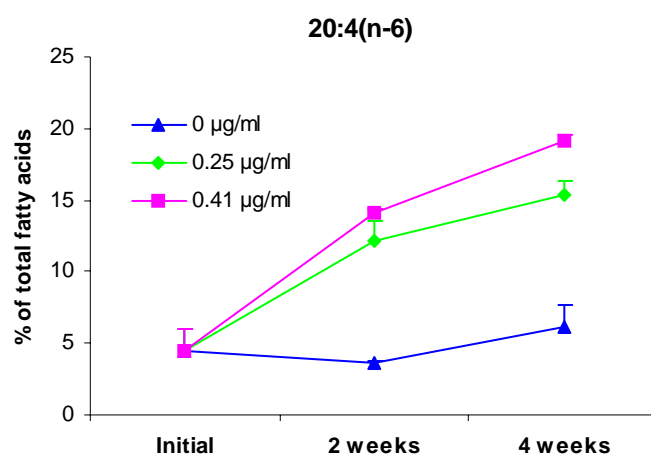


Figure 1 : ArA weight percentage of *C. gigas* gill polar lipids during the dietary conditioning (*T-Iso* alone, *T-Iso* + 0.25µg/ml and 0.41 µg/ml of AA).

Table 4: Total and differential hemocyte concentrations and percentage of viable cells in oysters fed *T-Iso* supplemented with 0, 0.25 and 0.41 µg/ml of ArA. ($n=3$, Mean \pm SD). Different lower-case letters indicate significant difference between dietary treatments (ANOVA, $p<0.05$). Asterisks indicate significant difference with initial composition (*T-test*, $p<0.05$).

	Initial	After 4 weeks of conditioning		
		0 µg AA / ml	0.25 µg AA / ml	0.41 µg AA / ml
Total hemocyte counts : (10^5 cell.ml ⁻¹)	4.3 \pm 0.6	4.4 \pm 1.5 ^a	5.8 \pm 1.5 ^a	6.0 \pm 1.1 ^a
Granulocytes	0.3 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2 ^a	1.0 \pm 0.3 ^{a*}	1.1 \pm 0.2 ^{a*}
Hyalinocytes	2.2 \pm 0.3	3.1 \pm 1.1 ^a	3.7 \pm 0.8 ^{a*}	3.9 \pm 1.2 ^{a*}
Agranulocytes	1.7 \pm 0.4	0.7 \pm 0.1 ^{a*}	1.1 \pm 0.7 ^a	1.0 \pm 0.2 ^{a*}
Viability percentage (%)	91.6 \pm 1.5	88.7 \pm 2.3 ^a	91.2 \pm 1.3 ^a	89.9 \pm 2.5 ^a

Impact of the conditioning with only AA (control experiment)

The fatty acid composition of gill polar lipids was also greatly affected by 2 weeks of ArA dietary conditioning with 0.25 and 0.41 $\mu\text{g/ml}$ of AA solution (final concentration without algae supplementation, Table 3). The percentage of 20:4(n-6) of gill polar lipids increased two fold after 2 weeks of AA supplementation (ANOVA, $p < 0.01$). However, no dose effect was recorded. These drastic changes of 20:4(n-6) content in oysters fed AA solutions also resulted in a significant increase of total (n-6) fatty acids and 22:5(n-6) in gill polar lipids, and a significant decrease in (n-3) / (n-6) ratio and 20:5(n-3) / 20:4(n-6) ratio.

Hemocyte viability, total and differential hemocyte concentrations

Hemocyte viability percentage was similar between oysters fed T-*Iso* supplemented with 0.0, 0.25 and 0.41 AA $\mu\text{g/ml}$ (Table 4).

During the experiment, the total hemocyte concentration (including granulocytes, hyalinocytes and agranulocytes) tended to decrease in oysters fed T-*Iso* alone and increase in oysters fed T-*Iso* supplemented with AA solutions (ANOVA, $p > 0.05$). Granulocyte and hyalinocyte concentrations of oysters fed T-*Iso* supplemented with AA solutions tended to be higher than those of oysters fed T-*Iso* alone, and were significantly higher compared to oysters at the beginning of the experiment (Table 4). In contrast, agranulocyte concentrations decreased after 4 weeks of dietary conditioning.

Phagocytosis activity

After 2 weeks of experiment, the phagocytosis activity of oysters fed T-*Iso* supplemented with AA solutions were significantly higher than for oysters fed T-*Iso* alone (Figure 2, ANOVA, $p < 0.05$); however, the AA supplementation effect disappeared after 2 weeks of dietary conditioning (ANOVA, $p > 0.05$).

Adhesive capacity

After 2 and 4 weeks of dietary conditioning, no dietary effect was noticed on the adhesive capacity of hemocytes incubated in FSSW (Figure 3, ANOVA, $p > 0.05$).

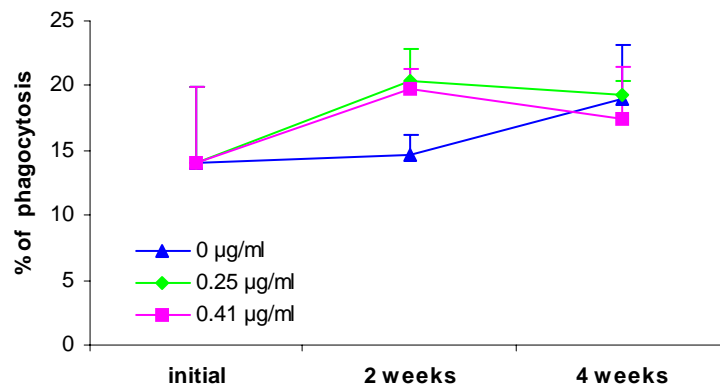


Figure 2 : Phagocytosis activity (corresponding to the percentage of hemocytes that engulfed more than 2 beads).

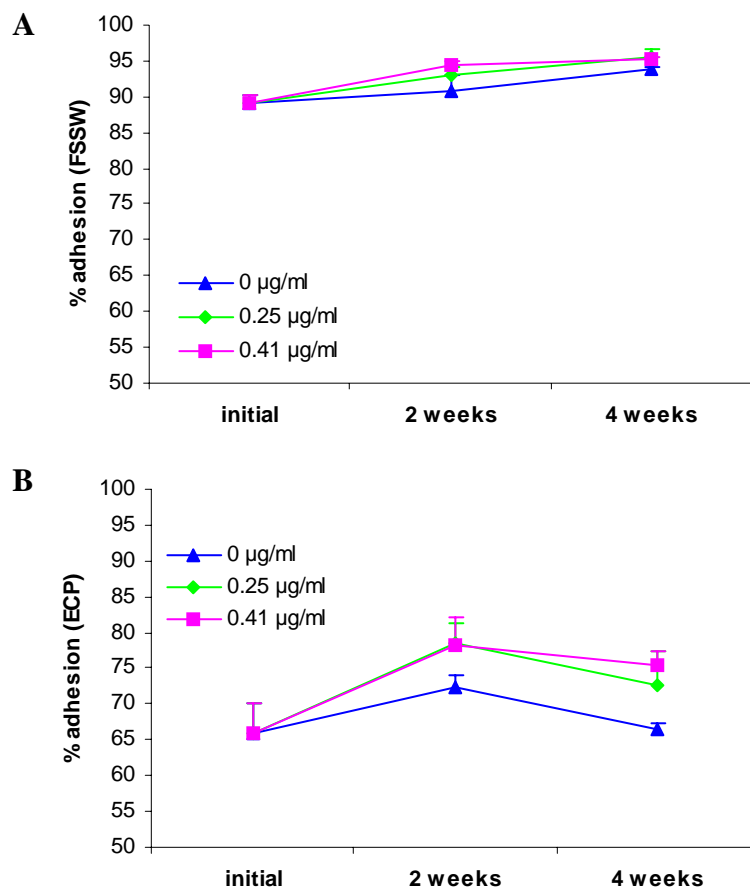


Figure 3 : Percentage of adhering cells after three hours of incubation with sterile sea water (A) and with 30 µg/ml of *Vibrio aestuarianus* extra cellular products (ECP) prepared in sea water (B).

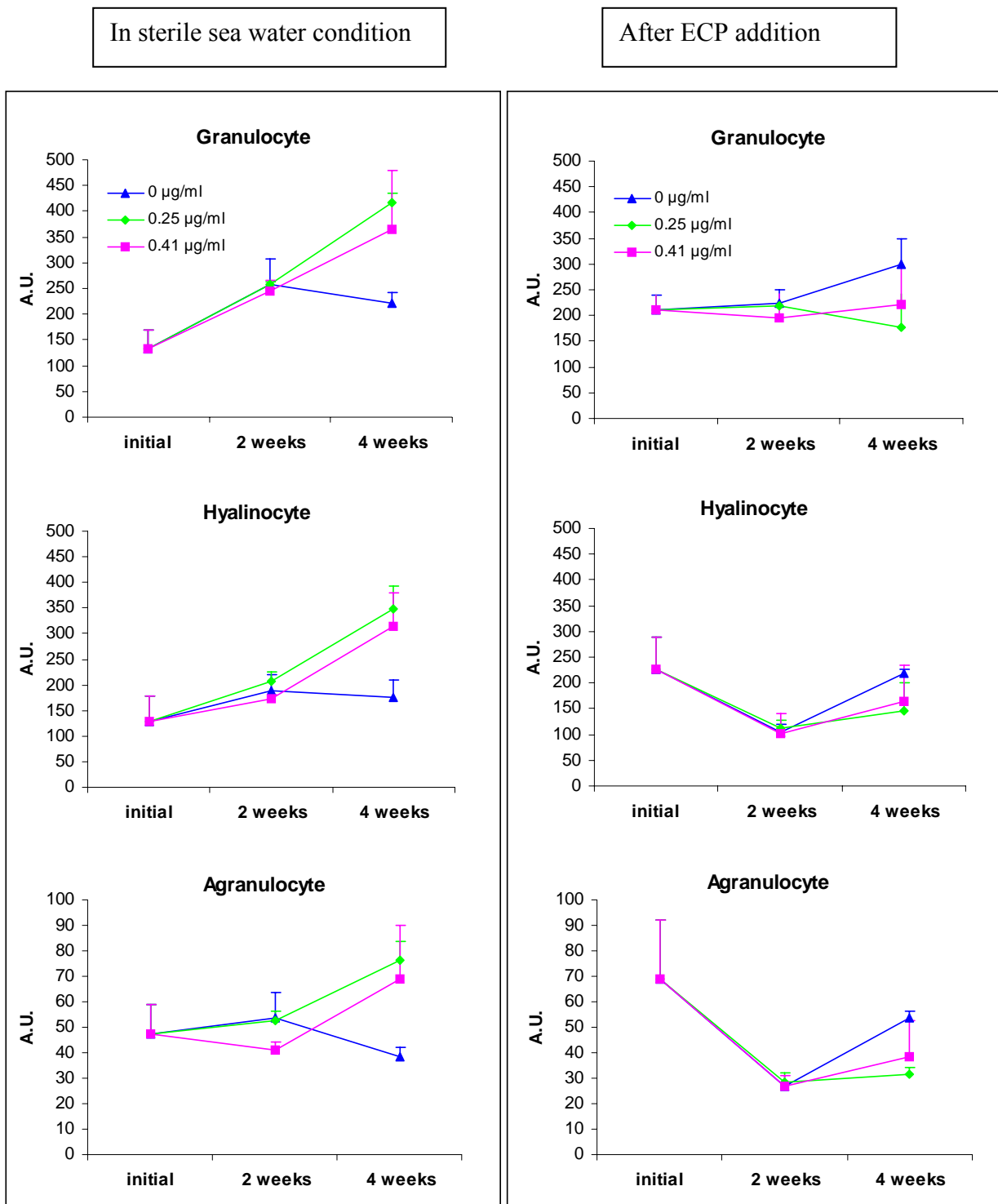


Figure 4 : Reactive oxygen species production of hemocyte sub-populations of oysters fed *T-Iso* supplemented with 0, 0.25 and 0.41 $\mu\text{g/ml}$ of AA. Hemocytes were incubated 2 hours with sterile sea water (graphes on the left) and with 30 $\mu\text{g/ml}$ of *Vibrio aestuarianus* extra cellular products (ECP, graphes on the right).

Hemocytes of oysters fed *T-Iso* alone were more susceptible to ECP with a lower (but not significantly) adhesive capacity than those of oysters fed *T-Iso* supplemented with AA solutions (Figure 3, ANOVA, $p > 0.05$). More, the susceptibility of hemocyte adhesive capacity by ECP was significantly reduced for oysters fed *T-Iso* supplemented with AA solutions than for oysters at the beginning of the experiment (T-test, $p < 0.05$). 2 and 4 weeks of *T-Iso* alone feeding did not affect the ECP susceptibility of the hemocytes.

Reactive oxygen species (ROS) production

ROS productions of hemocyte sub-populations with and without ECP addition are presented in Figure 4. A significant dietary effect was observed for the non-activated ROS production of each hemocyte sub-population after 4 weeks of dietary conditioning (ANOVA, $p < 0.05$). Granulocytes, hyalinocytes as well agranulocytes of oysters fed *T-Iso* supplemented with 0.25 and 0.41 μg AA/ml presented the highest non-activated ROS production. An increase of 150 A.U. for granulocytes and hyalinocytes, and 30 A.U. for agranulocytes was observed when compared to the values obtained with oysters fed *T-Iso* alone. Moreover, the non-activated ROS production increased significantly between the initial sampling and the end of the conditioning for hemocytes of oysters fed *T-Iso* supplemented with AA solutions while those of oysters fed *T-Iso* alone remained quite stable.

Regarding ROS production after ECP incubation, no dietary treatment effect was reported for each hemocyte sub-population (ANOVA, $p > 0.05$), while a significant date effect was noticed for hyalinocytes and agranulocytes (ANOVA, $p < 0.01$). Intriguingly, the ROS production of hyalinocytes and agranulocytes after incubation with ECP was lower after 2 weeks and 4 weeks of dietary conditioning than at the beginning of the experiment.

Discussion

Impact of the dietary conditioning on gill fatty acid composition

Fatty acid changes in the gill polar lipids of oysters fed *T-Iso* supplemented with ArA solutions and *T-Iso* alone reflected the assimilation of predominant fatty acids of *T-Iso* algae. These changes are in agreement with other studies using *T-Iso* as mono-specific diet (Langdon & Waldock, 1981 ; Delaunay *et al.*, 1993 ; Berntsson *et al.*, 1997 ; Fernandez-

Reiriz *et al.*, 1998, 1999 ; Soudant *et al.*, 1996, 1997, 1999 ; Delaporte *et al.*, 2003). More interesting was the high incorporation of 20:4n-6 in gill polar lipids from 4.5% up to 19.7% for oysters fed 4 weeks T-*Iso* supplemented with ArA solutions. Such 20:4n-6 enrichment of polar lipids was also reported by Séguineau *et al.* (in prep.) using the same technique of supplementation on oyster (*C. gigas*) spat for 5 weeks. High concentrations of 20:4n-6 in bivalve phospholipids observed in the present work and in the study of Séguineau *et al.* (in prep.) have not been previously reported in the literature whatever the tissue, the development stages and species considered. The highest percentage of 20:4n-6 in polar lipids found in the literature reached 10% in *C. gigas* (Delaporte *et al.*, 2003), 8% in *Ruditapes philippinarum* (Delaporte *et al.*, 2003), 4% to 6% in larvae and adults of *Ostrea edulis* (Napolitano *et al.*, 1988 ; Helm *et al.*, 1991 ; Abad *et al.*, 1995), 4% in *Mytilus galloprovincialis* (Freites *et al.*, 2002), 7% in gonad of *Pecten maximus* (Soudant *et al.*, 1995), 3% in *Argopecten purpuratus* larvae (Farias *et al.*, 2003), and 4% in *Placopecten magellanicus* (Napolitano *et al.*, 1993). Our results demonstrated that this supplementation technique was efficient to greatly increase the membrane content in polyunsaturated fatty acids such as 20:4n-6 (ArA). Direct ArA supplementation without algae performed in this study showed that algae was not necessary to obtain a good incorporation of 20:4n-6 supplied in ethanol solution directly in the tanks. Indeed, an increase of 35% of the 20:4n-6 content in gill polar lipids was observed after 2 weeks of conditioning. Thus, we can suggest as proposed by Bunde & Fried (1978) that the AA may be directly incorporated through mantle and gill membranes without passing through digestive system. However, it has to be noticed that ArA in solutions was 2.7 to 3.1 fold more incorporated when combined with the micro-algae T-*Iso* than when provided alone. Feeding oysters with T-*Iso* algae likely stimulated oyster filtration and may thus explain the higher incorporation of 20:4n-6 when it is combined with T-*Iso*. Also, Séguineau *et al.* (in prep.) suggested that the free ArA added to the algal culture could coat or be incorporated to the algae favouring thus its high incorporation and assimilation in the oysters lipids.

Impact of the arachidonic acid supplementation on immune parameters

In a previous study, Delaporte *et al.* (2003) reported higher hemocyte concentration, phagocytosis activity and ROS production for clams *Ruditapes philippinarum* at a less extent for oysters *C. gigas* fed *Chaetoceros calcitrans* algae than for animals fed T-*Iso* and *Tetraselmis suecica*. However, it was difficult to establish a clear relationship between the fatty acid composition of each algae and the hemocyte parameter changes. Delaporte *et al.* (2003) proposed that these changes were related to the essential poly-unsaturated fatty acid (PUFA) variations, more specifically to the 20:5n-3 and the 20:4n-6, of the tested micro-algae. In the present study, total and sub-population hemocyte concentrations tended to be higher for oysters fed T-*Iso* supplemented with ArA. Although hemocyte hematopoiesis processes still remained unknown in bivalves, it seemed that 20:4n-6 have stimulated hemocyte “production”. This positive relation for n-6 FA with hemocyte concentrations (Table 5) can be opposed with many studies on the negative effect of n-3 FAs on lymphocyte proliferation of vertebrates (see De Pablo *et al.*, 2000, 2002; Calder, 2001 for reviews).

With regards to hemocyte activities, the phagocytosis activity of hemocytes was significantly affected by the dietary treatments after 2 weeks of conditioning. At this date, phagocytosis activity of oysters fed T-*Iso* supplemented with 0.25 and 0.41 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of ArA was higher than the one of oysters fed T-*Iso* alone. The highest phagocytosis activity of hemocytes was associated with the highest 20:4n-6 content of gill polar lipids (Figure 5). Strangely, after 4 weeks of dietary conditioning, hemocytes have a similar phagocytosis activity whatever the dietary treatment. The relation between 20:4n-6 and phagocytosis activity observed in this study may be related to some extent to the production of ArA metabolites. Indeed, ArA metabolites were demonstrated to be involved in the nodulation process of insect hemocytes, which is the predominant response to large bacterial infection and result in the formation of an overlapping sheath of hemocytes around a target (Stanley-Samuelson & Pedibhotla, 1996; Stanley-Samuelson *et al.*, 1997; Mandato *et al.*, 1997; Dean *et al.*, 2002; Lavine & Strand, 2002; Tunaz *et al.*, 2003).

Table 5 : Summary of the main correlations between immune parameters and fatty acid compositions of gill polar lipids of oysters fed T-Iso supplemented with 0, 0.25 and 0.41 µg/ml of AA.

	Fatty acids	Coef. de correlation	p
Hemocyte concentration	20 :4(n-6)	R = 0.68	p<0.01
	(n-3)/(n-6) ratio	R = -0.66	p<0.05
Phagocytosis activity	20 :4(n-6)	R = 0.80	p<0.001
	(n-3)/(n-6) ratio	R = -0.88	p<0.0001
Adhesive capacity (FSSW)	20 :4(n-6)	R = 0.64	p<0.05
	(n-3)/(n-6) ratio	R = -0.60	p<0.05
Adhesive capacity (ECP)	20 :4(n-6)	R = 0.23	NS
	(n-3)/(n-6) ratio	R = -0.32	NS
ROS production (FSSW)	20 :4(n-6)	R = 0.42	NS
	(n-3)/(n-6) ratio	R = -0.40	NS
Hyalinocytes	20 :4(n-6)	R = 0.56	NS
	(n-3)/(n-6) ratio	R = -0.51	NS

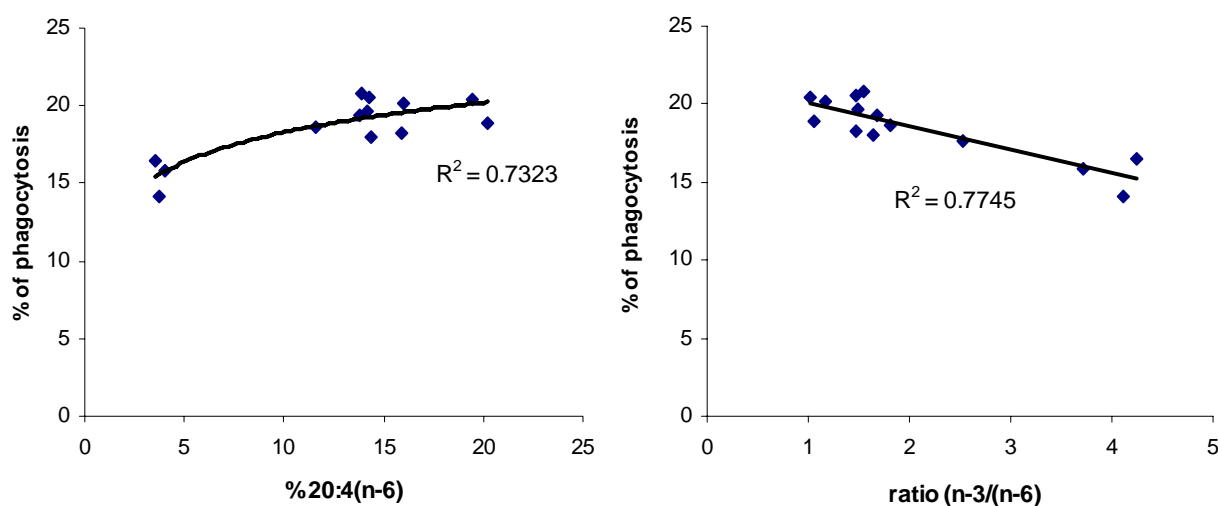


Figure 5 : Correlation between percentage of phagocytosis and the percentage of 20:4(n-6) and (n-3)/(n-6) ratio of gill polar lipids of oysters. All dietary treatments and sampling date included.

Interestingly, increasing adhesive capacity of hemocytes from oysters fed T-*Iso* supplemented with 0.25 and 0.41 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of ArA was also associated with increasing 20:4n-6 percentage in gill polar lipids. This result can be paralleled with the study of Mandato *et al.* (1997). Those authors demonstrated that ArA metabolites are involved in spreading process (similar to the process involved in our adhesive assay) of insect hemocytes.

A tremendous increase of the non-activated ROS production of each hemocyte sub-population of oysters fed T-*Iso* supplemented with ArA solutions was reported at the end of the experiment. Moreover, it is important to note that addition of DPI (diphenylene iodonium chloride), an inhibitor of the NADPH-oxidase and of the NO-synthase pathways, strongly reduced (70%) the non-activated ROS production from hemocytes (data not shown), allowing us to confirm that the measured ROS production was associated to NADPH-oxidase and /or NO-synthase-like activity. Also, the highest incorporation of 20:4n-6 content in gill polar lipids of those oysters seemed to be involved in this non-activated ROS production as previously observed with the *C. calcitrans* dietary conditioning providing the highest 20:4n-6 concentration (Delaporte *et al.*, 2003). Thus, it is suggested that the high incorporation of 20:4(n-6) in gill polar lipids would have allowed a higher availability of this FA for eicosanoid production (leukotriene LTB₄), and both may have act on NADPH-oxidase activation. Indeed, in a review, Calder (2001) underlined that LTB₄ enhanced ROS production of vertebrate leukocytes. However, in an *in vitro* study, Mazière *et al.* (1999) demonstrated that human fibroblast incubated with 20:4n-6 presented a higher ROS production without stimulation than control fibroblasts, but also reported an higher content of lipid peroxidation products. Thus, in our study, the drastic change of 20:4n-6 content in gill polar lipids may have lead to a an overproduction of ROS by the NADPH-oxidase (via or not the production of LTB₄) and/or an increase of lipid peroxide products as in vertebrate.

Intriguingly, when hemocytes were incubated with extra-cellular products (ECP) of the *Vibrio aestuarianus* which was previously demonstrated to stimulate ROS production by 1.5 to 2.5 fold using the same technique of measurement (Labreuche *et al.*, in press), a decrease of ROS production was observed after 2 and 4 weeks of ArA dietary conditioning. Consequently, the activating effect of ECP seemed to be clearly counteracted by the incorporation of 20:4n-6 in polar lipids especially at the end of the experiment.

Also, it can be hypothesized that the combination of the ROS over-producton related to the enhance ArA enrichment with an additional stimulation of ROS production via ECP of

V. aestuarianus may lead to activate detoxification processes to counteract the negative effect of over produced ROS which are toxic for the cells

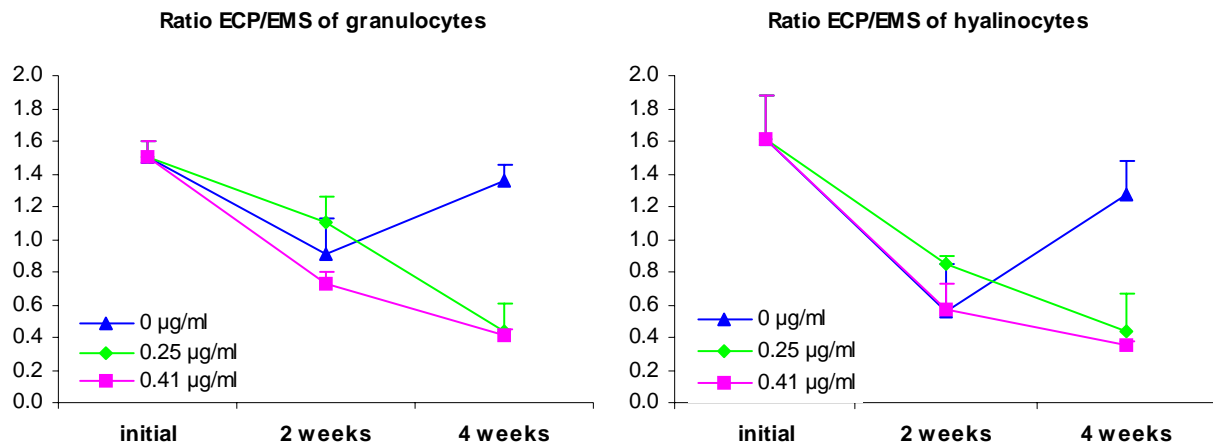


Figure 6: Ratio of hemocyte DCF fluorescence after addition of ECP on DCF fluorescence in FSSW condition ($T=120$ min). A ratio higher to 1 corresponds to stimulation of the OB while an inhibition of the activity is represented by a ratio lower than 1.

Conclusion

In conclusion, this study demonstrated the new technique of supplementation was very efficient to greatly incorporate 20:4n-6 in gill polar lipids of oysters and to more specifically assess the role of 20:4n-6 on hemocyte parameters of oysters. High supplementation of 20:4n-6 appeared to enhance hemocyte proliferation, phagocytosis activity and ROS production, and to reduce susceptibility of hemocyte adhesive capacity to *Vibrio aestuarianus*. This suggests that 20:4n-6 and/or its metabolites may be highly implicated in immune responses of oysters. The use of inhibitors of eicosanoid synthesis should help to establish the implication of these ArA metabolites in oysters immune parameters. Finally, as the level of 20:4n-6 reported in gill polar lipids at the end of the dietary conditioning was probably above physiological normal levels in oysters, a new experiment with lower doses of ArA should be done and perhaps in combination with a supply of an antioxidant such as vitamin E and /or C.

Acknowledgements

We are grateful to and all co-workers from the Argenton hatchery for taking care of oysters during the experimental conditioning. This research was a part of the MOREST project supported by a grant from IFREMER, the Région Bretagne, Région Normandie, Région Pays de Loire, Région Poitou-Charente and the Conseil Général du Calvados.

References

- Abad, M., Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G. & Sanchez, J.L., 1995. Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oysters, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Comparative Biochemistry and Physiology*. (110 C) 109-118.
- Albentosa, M., Perez-camacho, A., Labarta, U., Beiras, R. & Fernandez-Reiriz, M.J., 1993. Nutritional value of algal diets to clam spat *Venerupis pullastra*. *Marine Ecology Progress Series*. (97) 261-269.
- Auffret, M. & Oubella, R., 1995. Cytological and cytometric analysis of bivalves molluscs hemocytes, in: (Eds: Stolen, J.S., Fletcher, C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaattari, S.L., Anderson, R.S., Soderhall, K. & Weeks-Perkins, B.A.). Fair Haven: SOS Publication.
- Bass, D.A., Wallace Parce, J., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C. & Thomas, M., 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils : a graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology*. (130) 1910-1917.
- Berntsson, K.M., Jonsson, P.R., Wängberg, S.A. & Carlsson, A.S., 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. (154) 139-153.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. (37) 911-917.
- Brown, M.R., McCausland, M.A. & Kowalski, K., 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*. (165) 281-293.
- Bunde, T.A. & Fried, M., 1978. The uptake of dissolved free fatty acids from seawater by a marine filter feeder, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (60 A) 139-144.
- Calder, P.C., 2001. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? *Nutrition Research*. (21) 309-341.
- 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.
- De Pablo, M.A. & Alvarez de Cienfuegos, G., 2000. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunology and Cell Biology*. (78) 31-39.

De Pablo, M.A., Puertollano, M.A. & Alvarez de Cienfuegos, G., 2002. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. (9) 945-950.

Dean, P., Gadsden, J.C., Richards, E.H., Edwards, J.P., Keith Charnley, A. & Reynolds, S.E., 2002. Modulation by eicosanoid biosynthesis inhibitors of immune responses by the insect *Manduca sexta* to the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. (79) 93-101.

Delaporte, M., 2001. Etude de la qualité lipidique du régime nutritif sur la composition des membranes des hémocytes de *C. gigas*. Impact sur les capacités de défense. *Mémoire de fin d'études du DEA de Biologie et Productions animales. Université de Rennes I*. p. 36.

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C. & Samain, J.-F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalves species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology*. (206) 3053-3064.

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Kraffe, E., Marty, Y. & Samain, J.F. in revision. Incorporation and modification of dietary fatty acids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comparative biochemistry and Physiology*.

Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S. & Samain, J.F. Differences in biochemical composition and immunological parameters between two different genetic stocks of Pacific oysters *Crassostrea gigas* : resistant vs susceptible to summer mortalities. (in preparation, cf. 2^d article)

Delaporte, M., Chu, F.-L., Langdon, C., Soudant, P., Moal, J. & Samain, J.F. Changes in immune parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with a rich lipid emulsion of eicosapentaenoic acid. (in preparation, cf. 4^{ème} article)

Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. & Samain, J.F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (173) 163-179.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. (28) 350-356.

Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. & Castell, J.D., 1986. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (96) 1-13.

Epifanio, C.E., 1979. Growth in bivalve molluscs: Nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture*. (18) 1-12.

Farias, A., Bell, J.G., Uriarte, I. & Sargent, J.R., 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae : effects of diet and temperature. *Aquaculture*. (228) 289-305.

Fernandez-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M. & Perez-camacho, A., 1998. Effect of microalgal diets and commercial wheatgerm flours on the lipid profile of *Ruditapes decussatus* spat. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (124 B) 369-377.

Fernandez-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M. & Perez-Camacho, A., 1999. Lipid profile and growth of the clam spat, *Ruditapes decussatus* (L), fed with microalgal diets and cornstarch. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (124 B) 309-318.

Freites, L., Labarta, U. & Fernandez-Reiriz, M.J., 2002. Evolution of fatty acid profiles of subtidal and rocky shore mussel seed (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk.). Influence of environmental parameters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (268) 185-204.

Harbige, L.S., 2003. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids*. (38) 323-341.

Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Delaporte, M., Alix, J.H., Smith, B.C., Dixon, M.S., Quere, C., Le Coz, J.R., Paillard, C., Moal, J. & Samain, J.F., 2004. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture*. (234) 541-560.

Helm, M.M., Holland, D.L., Utting, S.D. & East, J., 1991. Fatty acid of early non-feeding larvae of the european flat oyster, *Ostrea edulis*. *Journal of Marine Biology Association U.K.*, (71) 691-705.

Hendriks, I.E., van Duren, L.A. & Herman, P.M.J., 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (296) 199-213.

Heras, H., Kean-Howie, J. & Ackman, R.G., 1994. The potential use of lipid microspheres as nutritional supplements for adults *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. (123) 309-322.

Kiron, V., Fuduka, H., Takeushi, T. & Watanabe, T., 1995. Essential fatty acids nutrition and defense in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (111 A) 361-367.

Knauer, J. & Southgate, P.C., 1997. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. *Aquaculture*. (154) 293-303.

Knuckey, R.M., Brown, M.R., Barrett, S.M. & Hallegraeff, G.M., 2002. Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. (211) 253-274.

Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C. & Nicolas, J.L., in revision. *In vitro* effects of extracellular products (ECPs) from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on the oyster *Crassostrea gigas* cellular immune responses. *Developmental & Comparative Immunology*.

Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G. & Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry. A tool to evaluate pathogenic *Vibrio* inhibiting capacity. *Fish and Shellfish Immunology*. (15) 225-240.

Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J. & Samain, J.F. Modulation of reactive oxygen species (ROS) production in *Crassostrea gigas* hemocyte "oxidative burst": specific activity of granulocytes and hyalinocytes. (submitted to *Developmental Comparative Immunology*)

- Langdon, C.J. & Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of Marine Biology Association U.K.*, (61) 431-448.
- Langdon, C.J. & Siegfried, C.A., 1984. Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. *Aquaculture*. (39) 135-153.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. (32) 1295-1309.
- Lingenfelter, J.T., Blazer, V.S. & Gay, J., 1995. Influence of fish oils in production catfish feeds on selected disease resistance factors. *Journal of Applied Aquaculture*. (5(2)) 37-48.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. 265-275.
- Mandato, C.A., Diehl-Jones, W.L., Moore, S.J. & Downer, R.G.H., 1997. The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*. (43) 1-8.
- Martinez-Fernandez, E., Acosta-Salmon, H. & Rangel-Davalos, C., 2004. Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) larvae. *Aquaculture*. (230) 417-423.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J. & Samain, J.F., 1992. Change in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (163) 221-234.
- Mazière, C., Conte, M.A., Degonville, J., Ali, D. & Mazière, J.C., 1999. Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP1 and NF κ B. *Biochemica and Biophysical Research Communications*. (265) 116-122.
- McCausland, M.A., Brown, M.R., Barrett, S.M., Diemar, J.A. & Heasman, M.P., 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. (174) 323-342.
- Metcalf, L.D. & Schmitz, A.A., 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*. (33) 363-364.
- Napolitano, G.E., Ratnayake, W.M.N. & Ackman, R.G., 1988. Fatty acid components of larval *Ostrea edulis* (L.) : importance of triacylglycerols as a fatty acid reserve. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (90 B) 875-883.
- Napolitano, G.E. & Ackman, R.G., 1993. Fatty acid dynamics in sea scallops *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791) from Georges Bank, Nova Scotia. *Journal of Shellfish Research*. (12) 267-277.
- Numaguchi, K. & Nell, J.A., 1991. Effects of gelatin-acacia microcapsule and algal meal supplementation of algal diets on growth rates of Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley), larvae. *Aquaculture*. (94) 65-78.
- Parker, R.S. & Selivonchik, D.P., 1986. Uptake and metabolism of lipid vesicles from seawater by juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. (53) 215-228.

Séguineau, C., Soudant, P., Moal, J., Delaporte, M., Miner, P., Quéré, C. & Samain, J.F., in prep. New techniques for individual PUFA delivery to oyster *Crassostrea gigas* spat. A preliminary investigation.

Soudant, P., 1995. Les phospholipides et les stérols des géniteurs et des larves de Coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.). Relation avec la nutrition. *Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale*. p. 294.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J. & Samain, J.F., 1995. Separation of major polar lipids in *Pecten maximus* by high performance liquid chromatography and subsequent determination of their fatty acids using gas chromatography. *J. Chromato.*, (673) 15-26.

Soudant, P., Moal, J., Marty, Y. & Samain, J.F., 1996. Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (205) 149-163.

Soudant, P., Moal, J., Marty, Y. & Samain, J.F., 1997. Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.). Effect of nutrition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (215) 103-114.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Masski, H. & Samain, J.F., 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*. (121 A) 279-288.

Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F. & Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (123 B) 209-222.

Soudant, P., Chu, F.L.E. & Samain, J.F., 2000. Lipids requirements in some economically important marine bivalves. *Journal of Shellfish Research*. (19) 605.

Stanley-Samuelson, D.W. & Pedibhotla, V.K., 1996. What can we learn from prostaglandins and related eicosanoids in insects? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. (26) 223-234.

Stanley-Samuelson, D.W., Pedibhotla, V.K., Rana, R.L., Rahim, N.A.A., Hoback, W.W. & Miller, J.S., 1997. Eicosanoids mediate nodulation responses to bacterial infections in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (118 A) 93-100.

Thompson, K.D., Tatner, M.F. & Henderson, R.J., 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition*. (2) 21-31.

Thompson, P.A. & Harrison, P.J., 1992. Effects of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Marine Biology*. (113) 645-654.

Thompson, P.A., Guo, M.X. & Harrison, P.J., 1996. Nutritional value of diets that vary in fatty acid composition for larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. (143) 379-391.

Tunaz, H., Park, Y., Buyukguzel, K., Bedick, J.C., Aliza, A.R. & Stanley, D.W., 2003. Eicosanoids in insect immunity: bacterial infection stimulates hemocytic phospholipase A₂ activity in Tobacco hornworms. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. (52) 1-6.

Utting, S.D. & Millican, P.F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. (155) 45-54.

Waagbo, R., Sandnes, K., Jorgensen, J., Engstad, R., Glette, J. & Lie, O., 1993. Health aspects of dietary lipid sources and vitamin E in atlantic salmon (*salmo salar*). II. Spleen and erythrocyte phospholipid fatty acid composition, nonspecific immunity and disease resistance. *Fisk. Dir. Skr. Ser. Ernering*. (6) 62-80.

Walne, P.R. & Mann, R., 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Ninth European Marine Biology Symposium*. (in Barnes, H. (Ed.)) 587-607.

Wikfors, G.H., Patterson, G.W., Ghosh, P., Lewin, R.A., Smith, B.C. & Alix, J.H., 1996. Growth of post-set oysters, *Crassostrea virginica*, on high-lipid strains of algal flagellates *Tetraselmis spp.* *Aquaculture*. (143) 411-419.

Synthèse du 5^{ème} article :

"Changes in immune parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-*Iso* supplemented with increasing amounts of arachidonic acid 20:4(n-6)."

Cette dernière étude « qualité » a eu pour objectif de déterminer l'impact d'une alimentation enrichie en acide arachidonique (20:4(n-6)) sur les paramètres hématologiques des huîtres grâce à la nouvelle technique de supplémentation mise au point par Séguineau *et al.* (en préparation). Les huîtres ont été nourries pendant un mois avec l'algue T-*Iso*, déficiente en 20:4(n-6), et supplémentée avec trois doses d'acide arachidonique en solution (0, 0.25 et 0.41 µg de 20:4(n-6) / ml d'eau de mer). Les différentes doses d'acide gras ont été directement versées dans les bacs d'élevage comme décrit par Séguineau *et al.* (en préparation). Par ailleurs, un témoin sans algue a aussi été réalisé.

Il est tout d'abord intéressant de souligner que la nouvelle technique de supplémentation a conduit à une incorporation importante de 20:4(n-6) dans les lipides polaires des branchies des huîtres (de 4.5 à 19.7%). L'efficacité de cette incorporation en 20:4(n-6) est rapide. En 7 jours, la composition en acides gras des branchies est significativement changée (Annexe 7). Les résultats de cette présente étude corroborent ceux de Séguineau *et al.* (en préparation) obtenus sur du naissain d'huîtres. Auparavant, aucune étude n'avait reporté de tels niveaux de 20:4(n-6) dans les tissus de mollusques bivalves. Dans la littérature, les pourcentages en 20:4(n-6) dans les membranes des bivalves sont généralement inférieurs à 10% des acides gras totaux (Napolitano *et al.*, 1988 ; Helm *et al.*, 1991 ; Napolitano *et al.*, 1993 ; Soudant *et al.*, 1995 ; Abad *et al.*, 1995 ; Freitas *et al.*, 2002 ; Delaporte *et al.*, 2003 ; Farias *et al.*, 2003). L'expérimentation contrôlée réalisée sans algue a permis de démontrer que l'algue T-*Iso* n'était pas nécessaire à l'incorporation du 20:4(n-6) dans les membranes, mais facilitait son incorporation. La présence de l'algue dans le bac d'élevage pourrait stimuler la filtration de l'eau de mer par les huîtres, ou bien le 20:4(n-6) pourrait s'attacher à l'algue ou être incorporé dans celle-ci (Séguineau *et al.*, en préparation). Ceci permettrait une meilleure efficacité d'assimilation de l'acide gras et ultérieurement son incorporation dans les membranes. Par ailleurs, comme l'ont proposé Bunde & Fried (1978),

le 20:4(n-6) pourrait aussi être incorporé directement à travers les membranes du manteau et des branchies sans passer par le système digestif.

Le suivi des paramètres hémyocytaires des huîtres au cours de cette expérimentation a permis de mettre en évidence un effet significatif de la supplémentation en 20:4(n-6) sur la concentration hémyocytaire, l'activité de phagocytose, la capacité d'adhésion des hémyocytes et la production d'espèces actives de l'oxygène.

Ainsi, les huîtres nourries avec les deux doses d'acide arachidonique (0.25 et 0.41 µg/ml d'AA) présentent les plus fortes concentrations hémyocytaires tout au long de l'expérimentation. Ces plus fortes concentrations ont pu être corrélées avec les fortes proportions en 20:4(n-6) des membranes des branchies de ces huîtres, et négativement corrélées avec le ratio (n-3)/(n-6). Bien que le processus d'hématopoïèse ne soit pas connu chez les bivalves, il semblerait que les acides gras de la série (n-6) puissent stimuler la production d'hémyocytes, au contraire des acides gras (n-3). Cette corrélation négative avec les acides gras (n-3) ressemble à ce qui a été décrit chez les vertébrés sur le rôle immunosuppresseur des acides gras de la série (n-3) sur la prolifération des lymphocytes (voir les revues de De Pablo *et al.*, 2000 ; Calder, 2001 ; De Pablo *et al.*, 2002)

En ce qui concerne les activités hémyocytaires, l'activité de phagocytose des hémyocytes des huîtres a été significativement affectée par la supplémentation en 20:4(n-6) après les deux premières semaines de conditionnement. Puis, cet effet disparaît. Cependant, lorsque l'ensemble des données sont combinées entre elles, des corrélations positives avec le 20:4(n-6) et négatives avec le ratio (n-3)/(n-6) sont trouvées. La corrélation avec le 20:4(n-6) est intéressante car cet acide gras est impliqué dans le processus de nodulation chez les insectes, c'est-à-dire la formation d'un amas d'hémyocytes autour d'une particule à phagocyter (Stanley-Samuelson & Pedibhotla, 1996 ; Stanley-Samuelson *et al.*, 1997 ; Mandato *et al.*, 1997 ; Dean *et al.*, 2002 ; Lavine & Strand, 2002 ; Tunaz *et al.*, 2003). De même, comme les métabolites du 20:4(n-6) sont impliqués dans le processus d'adhésion des hémyocytes chez les insectes (Mandato *et al.*, 1997), il est possible que ces métabolites soient aussi impliqués dans l'activité de phagocytose et la capacité d'adhésion des hémyocytes des huîtres.

La production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) des hémyocytes est aussi augmentée par la supplémentation en 20:4(n-6). L'incorporation en grande quantité du 20:4(n-6) dans les membranes des branchies, (et donc des hémyocytes, cf. Annexe 3), pourrait avoir augmenté la disponibilité de cet acide gras pour la production d'eicosanoïdes et la

stimulation de la NADPH-oxidase. Il a été démontré que les eicosanoïdes (leucotriènes LTB₄) stimulent la production de ROS chez les vertébrés (cf la revue de Calder, 2001). Par conséquent, les changements drastiques de composition en acides gras des membranes des branchies ont pu induire une sur-production de ROS. Mais, ils ont peut être aussi induit une augmentation des produits issus de la peroxydation lipidique (Mazières *et al.*, 1999).

Finalement, la production de ROS des huîtres supplémentées en 20:4(n-6) n'a pas été stimulée par l'utilisation des produits extra-cellulaires (ECPs) du *Vibrio aestuarianus*, alors que Labreuche *et al.* (en révision) et Lambert *et al.* (soumise) ont démontré que les ECPs de cette bactérie pouvaient faire doubler la production de ROS des hémocytes. Par conséquent, l'incorporation de 20:4(n-6) dans les membranes a pu contre-carrer l'effet des ECPs sur la production de ROS des hémocytes. Il peut être aussi proposé que la stimulation de la production de ROS par les ECPs a conduit à l'activation de la cascade de détoxification des ROS.

Au vu de l'ensemble des résultats des trois expérimentations « qualité » (ALGUES, EPA et AA) sur l'impact de la qualité de la nourriture sur les paramètres hémocytaires des huîtres, il a été décidé de comparer les résultats des deux expérimentations GIGAREPROs au regard de la qualité de la nourriture fournie aux huîtres lors de ces deux expérimentations « quantité » puisque des modifications du régime alimentaire ont été apportées entre les 2 années.

Comparaison des huîtres conditionnées à Argenton pour les expérimentations GIGAREPRO 1 vs 2 : Existe-il un effet de la nutrition ?

Suite à certains résultats biologiques et certaines difficultés d'approvisionnement en l'algue *Chaetoceros calcitrans* au cours de l'expérimentation GIGAREPRO 1, des modifications zootechniques ont été réalisées. Ainsi, le régime alimentaire des huîtres a été sensiblement modifié : quatre algues ont été utilisées dans le cadre de l'expérimentation GIGAREPRO 2 au lieu de trois dans GIGAREPRO 1 (*T-Iso*, *C.calcitrans* et *T. suecica* à raison de 1/3,1/3,1/3). L'algue *Skeletonema costatum* a été ajoutée au régime algal en complément à l'algue *Chaetoceros calcitrans* pour augmenter l'apport en diatomées (1/2 au lieu de 1/3). En effet, les diatomées tendent à favoriser la croissance des bivalves (Laing *et al.*, 1987 ; Enright *et al.*, 1986 ; Delaunay *et al.*, 1993 ; Soudant, 1995 ; McCausland *et al.*, 1999 ; Knuckey *et al.*, 2002 ; Brown, 2002 ; Barillé *et al.*, 2003). Par ailleurs, il a été démontré dans la 2^{ème} partie de ce travail que la qualité du régime alimentaire influence les paramètres hématologiques des huîtres. Dès l'ores, on peut s'interroger sur l'influence de la plus grande richesse en diatomées dans la composition du régime algal de l'expérimentation GIGAREPRO 2 sur les paramètres énergétiques et hématologiques des huîtres.

Les données des deux expérimentations GIGAREPROs ayant déjà été présentées auparavant (cf. 1^{ère} partie de ce travail), seuls certains paramètres ont été repris et comparés dans cette partie. Par ailleurs, l'analyse de la composition lipidique (acides gras et stérols) des membranes a été entreprise pour établir ou non l'existence de différences de régime alimentaire entre les deux expérimentations GIGAREPROs. En effet, de nombreuses études ont permis de montrer que les compositions en acides gras et en stérols des membranes changent avec le régime alimentaire (Langdon & Waldock, 1981 ; Marty *et al.*, 1992 ; Delaunay *et al.*, 1993 ; Soudant *et al.*, 1996 a et b ; Berntsson *et al.*, 1997 ; Caers *et al.*, 2000 ; Delaporte *et al.*, 2003). Quelques semaines suffisent à changer significativement le profil lipidique des huîtres (de 1 à 4 semaines selon le régime alimentaire). Par conséquent, la composition en acides gras et en stérols des huîtres a été analysée en Juillet 2002 et Juin 2003 afin de mieux appréhender l'impact de la qualité du régime algal des huîtres lors de ces deux expérimentations. A ces dates, les huîtres sont conditionnées à Argenton depuis quelques mois. Les résultats sont présentés en fonction de la ration nutritive mais indépendamment du phénotype des huîtres.

Résultats

Composition lipidiques des huîtres

Les analyses de composition en acides gras ont été réalisées sur les lipides polaires des branchies des huîtres en Avril, Juillet, et Octobre 2002 pour l'expérimentation GIGAREPRO 1 et en Avril, Juin, et Août 2003 pour l'expérimentation GIGAREPRO 2. Les stérols ont quant à eux été analysés sur les lipides neutres d'un extrait lipidique d'huîtres entières en Juin 2002 et sur les lipides neutres de branchies en Juin 2003. Pour simplifier la présentation des résultats, seuls les résultats en acides gras et stérols obtenus en Juin-Juillet 2002 et Juin 2003 pour respectivement GIGAREPRO 1 et 2 sont décrits ci-après. Ces deux points se situent en période de pleine gamétogenèse et ils intègrent en terme de marquage alimentaire 4 et 3 mois de conditionnement à Argenton. Cependant, l'ensemble des résultats de la composition en acides gras est présenté en annexe (cf. Annexe 8).

Ainsi, les huîtres de GIGAREPRO 1 se distinguent de celles de GIGAREPRO 2 par une composition en acides gras plus riche en 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:4(n-3), 20:4(n-6), 22:5(n-6), 22:6(n-3), et par un ratio 22:6(n-3)/20:5(n-3) supérieur (Table 1, Figure 1). Les huîtres de GIGAREPRO 1 possèdent également plus de cholestérol et de brassicastérol que dans GIGAREPRO 2. A l'inverse, les pourcentages des acides gras 18:0, 20:1(n-11), 20:1(n-7) et 22:2j, le ratio (n-3)/(n-6) ainsi que les pourcentage en stigmastérol et β -sitostérol sont plus élevés dans l'expérimentation GIGAREPRO 2.

Comparaison des index de condition et du poids sec de chair

Les index de conditions des huîtres des deux expérimentations GIGAREPROs sont présentés dans la Figure 2. Les résultats montrent que les huîtres de l'expérimentation GIGAREPRO 2, notamment celles nourries avec la ration de 12% de poids sec par poids sec d'huître, présentent un index de condition supérieur à celui des huîtres de GIGAREPRO 1 tout au long de l'expérimentation. Similairement, le poids sec de chair des huîtres nourries avec la ration de 12% est très nettement supérieur à celles nourries à 4%, surtout à partir de Juillet 2003 (Figure 3). Les huîtres nourries avec la ration de 4% ont des poids sec de chair comparables entre les deux années.

Table 1: Composition en acides gras des lipides polaires et en stérols des lipides neutres des huîtres conditionnées à Argenton lors des expérimentations GIGAREPROs.

	GIGAREPRO 1				GIGAREPRO 2			
	4%		12%		4%		12%	
	N=3		N=3		N=6		N=6	
	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.
14:0	1.0	0.2	1.7	0.1	1.7	0.4	1.9	0.3
16:0	10.6	0.5	10.8	0.4	11.7	0.9	12.2	0.9
18:0	4.8	0.4	4.0	0.2	6.5	0.3	6.9	0.5
16:1(n-7)	2.2	0.5	2.2	0.0	1.3	0.3	1.4	0.2
18:1(n-9)	1.8	0.2	2.4	0.1	1.5	0.1	1.5	0.1
18:1(n-7)	6.8	0.6	7.7	0.4	5.2	0.2	5.1	0.8
20:1(n-11)	3.2	0.3	2.1	0.3	4.0	0.1	4.2	0.3
20:1(n-7)	4.8	0.3	4.7	0.0	5.9	0.3	5.7	0.6
18:2(n-6)	1.5	0.2	2.2	0.1	1.6	0.1	1.9	0.3
18:4(n-3)	0.8	0.0	1.4	0.1	0.5	0.1	0.4	0.1
20:2(n-6)	0.3	0.2	0.5	0.1	0.4	0.0	0.4	0.0
20:4(n-6)	5.8	0.3	5.3	0.2	3.5	0.1	3.2	0.3
20:5(n-3)	12.4	0.7	14.4	1.1	14.0	0.7	13.0	1.3
22:2i	1.5	0.1	1.1	0.1	1.8	0.2	1.8	0.2
22:2j	8.5	0.7	7.1	0.1	10.3	0.2	10.2	0.9
22:5(n-6)	3.7	0.2	3.3	0.0	1.6	0.3	2.0	0.3
22:5(n-3)	1.0	0.0	0.8	0.0	1.0	0.1	0.9	0.1
22:6(n-3)	18.1	1.6	17.7	1.1	13.3	1.4	11.4	1.2
Total saturés	18.5	0.9	18.1	0.8	23.4	1.1	24.1	1.9
Total mono-insaturés	22.5	0.9	22.7	0.7	22.3	0.4	21.5	2.1
Total poly-insaturés	58.0	1.5	58.4	1.6	53.1	1.4	53.3	4.2
Total NMI	11.5	1.3	9.3	0.3	13.2	0.2	13.1	1.2
(n-3)/(n-6)	2.8	0.1	3.0	0.3	3.5	0.2	3.6	1.1
22:6(n-3)/20:5(n-3)	1.5	0.0	1.2	0.0	1.0	0.1	0.9	0.1
	N=3		N=3		N=3		N=3	
Norcholestérol	0.9	0.1	0.6	0.1	1.4	0.3	0.8	0.1
Tdehydro cholestérol	1.7	0.1	1.2	0.2	2.5	0.2	1.4	0.2
Cholestérol	36.1	0.3	37.3	1.6	32.3	0.7	30.7	0.5
Brassicastérol	22.7	1.4	19.6	1.7	14.5	1.4	16.8	1.4
Desmostérol	1.3	0.1	1.6	0.4	1.0	0.2	1.2	0.1
Campestérol	9.5	0.2	11.1	0.5	11.7	0.9	15.3	0.1
24-méthylène	15.2	1.1	14.2	0.7	17.8	0.1	14.6	0.1
Stigmastérol	1.4	0.3	1.1	0.2	2.7	0.3	2.5	0.3
β Sitostérol	3.6	0.1	3.5	0.4	6.9	0.2	6.8	0.7
Fucostérol	5.4	0.1	8.1	0.3	5.0	1.1	7.3	0.2

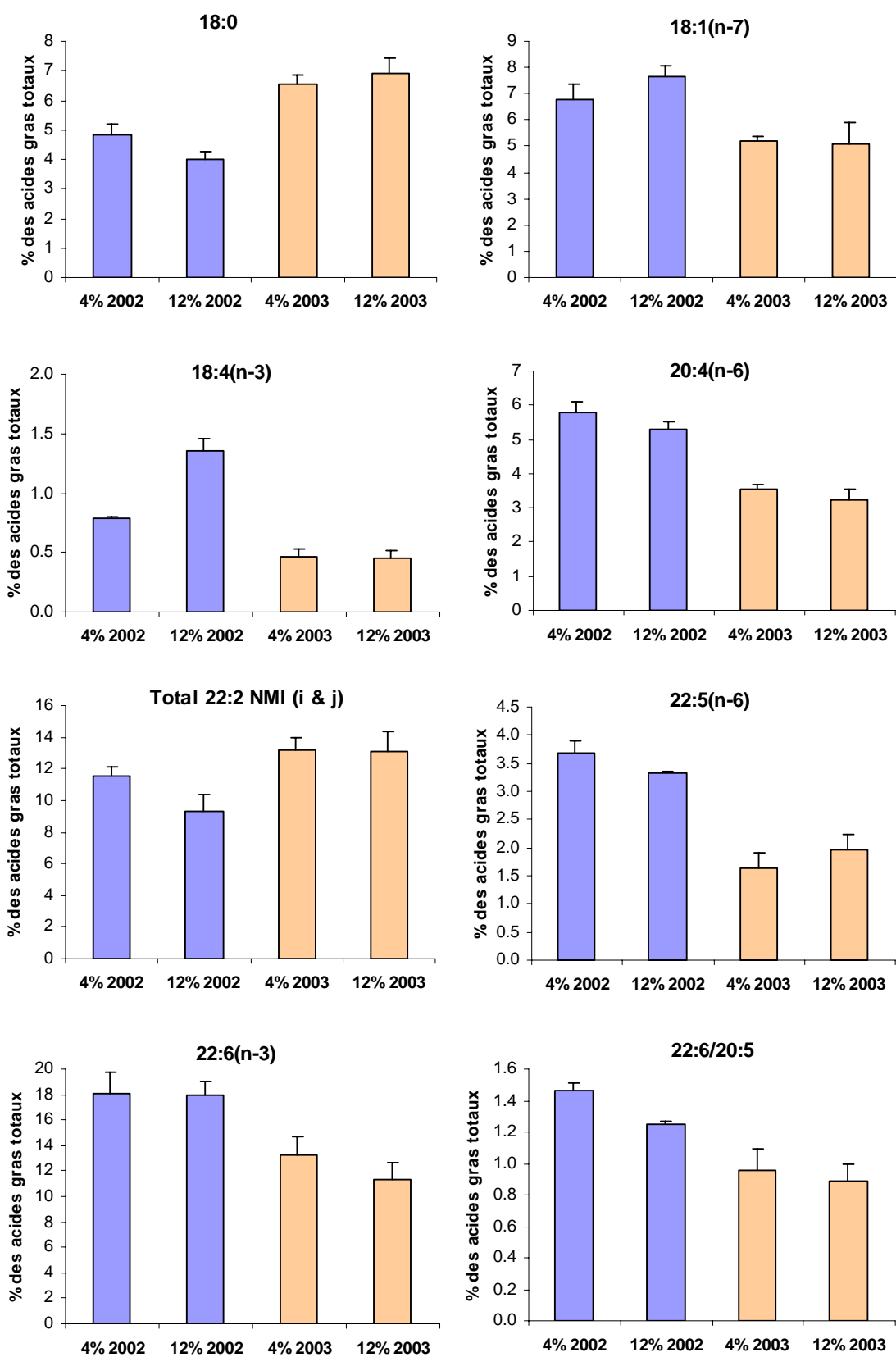


Figure 1: Quelques exemples de différences de composition en acides gras des huîtres après quelques mois de conditionnement à Argenton au cours des expérimentations GIGAREPROs 1(2002) et 2 (2003).

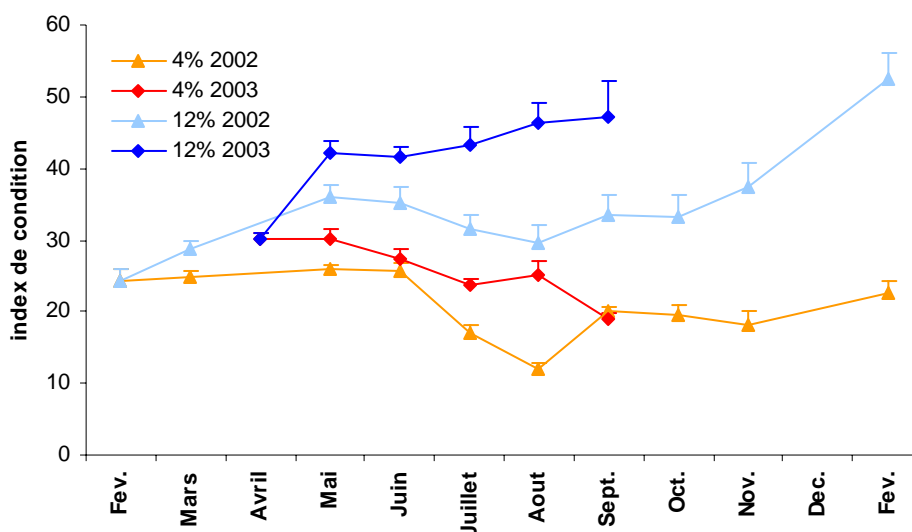


Figure 2 : Variations de l'index de condition des huîtres conditionnées à Argenton au cours des expérimentations GIGAREPRO 1 (2002, n=15) et 2 (2003, n=20).

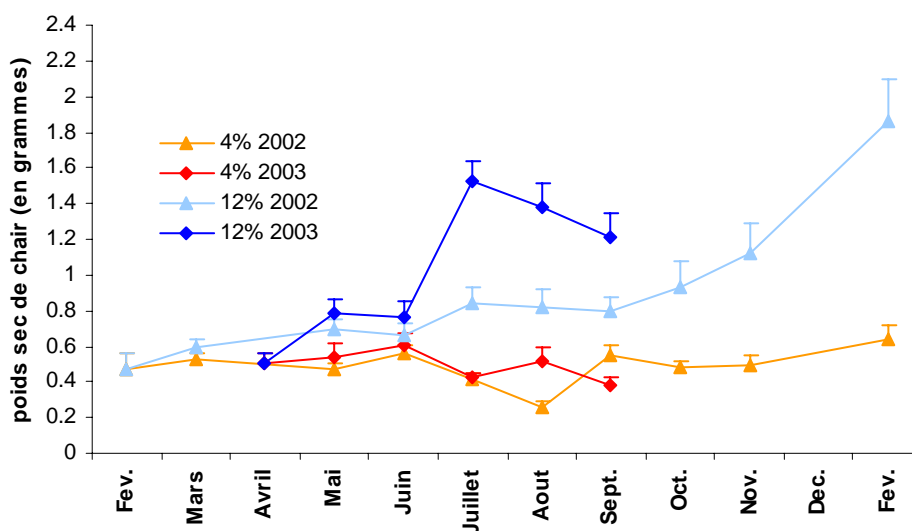


Figure 3 : Variations du poids sec de chair (en grammes) des huîtres conditionnées à Argenton au cours des expérimentations GIGAREPRO 1 (2002, n=15) et 2 (2003, n=20).

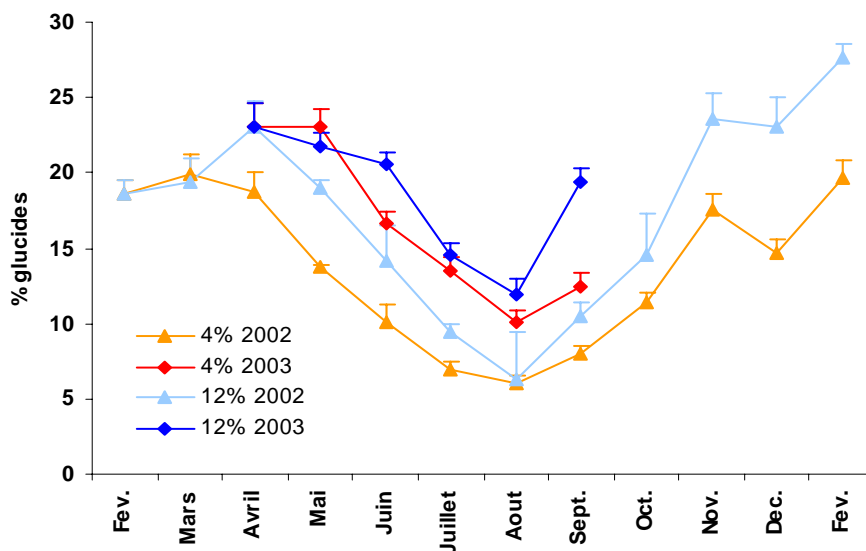


Figure 4 : Variations de la teneur en glucides des huîtres conditionnées à Argenton au cours des expérimentations GIGAREPRO 1 (2002, n=3 pools de 5 huîtres) et 2 (2003, n=20 individus).

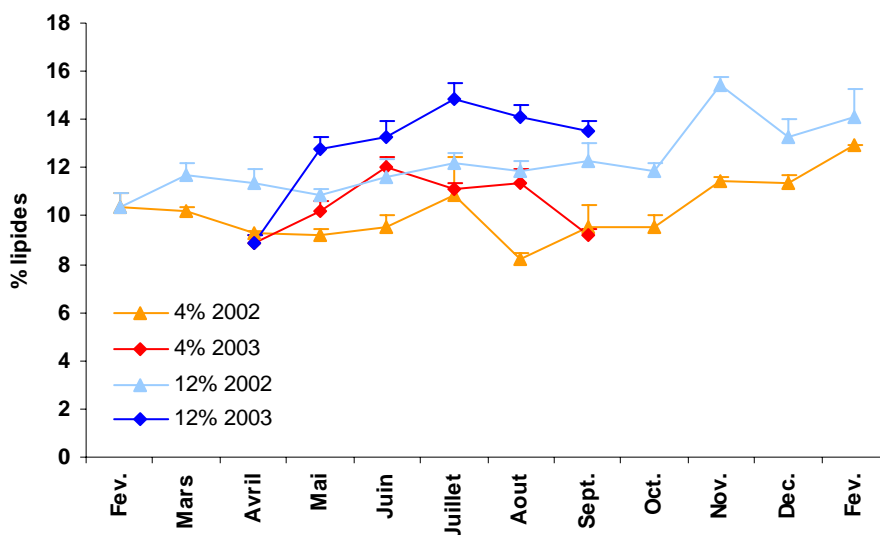


Figure 5 : Variations de la teneur en lipides des huîtres conditionnées à la station d'Argenton au cours des expérimentations GIGAREPRO 1 (2002, n=3 pools de 5 huîtres) et 2 (2003, n=20 individus).

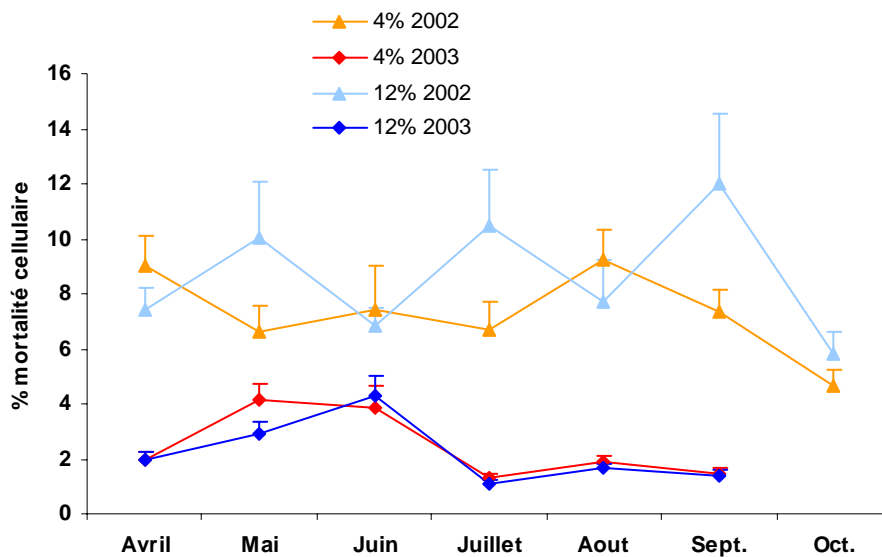


Figure 6 : Pourcentage de mortalités hémyocytaires des huîtres conditionnées à Argenton au cours des expérimentations GIGAREPRO 1 (2002, $n=3$ pools ou 10 individus selon les dates, cf. article 1) et 2 (2003, $n=10$ individus).

Comparaison des compositions biochimiques

Les huîtres de l'expérimentation GIGAREPRO 2 présentent des teneurs en glucides et lipides très supérieures à celles des huîtres de la première expérimentation à niveau nutritif équivalent (Figures 4 & 5). Par ailleurs, les teneurs en glucides et lipides des huîtres nourries avec la ration de 12% du poids sec d'algues par poids sec d'huître sont systématiquement plus élevées par rapport aux huîtres nourries à 4% que ce soit en 2002 ou 2003.

Comparaison des paramètres hémyocytaires

Mortalité hémyocytaire

Les mortalités hémyocytaires des huîtres conditionnées dans le cadre des expérimentations GIGAREPROs sont généralement faibles (2% à 8% en moyenne, Figure 6). Cependant, il est intéressant de noter qu'en 2003, les mortalités hémyocytaires varient de 2 à 4% et sont systématiquement inférieures à celles relevées en 2002 (8%).

Concentration hémocytaire

La comparaison des concentrations hémocytaires des huîtres des deux GIGAREPROs montre que les huîtres de GIGAREPRO 2 présentent globalement une concentration hémocytaire totale deux fois supérieure à celle de l'expérimentation GIGAREPRO 1 (Figure 7). Les huîtres nourries avec la ration de 12% présentent généralement une concentration hémocytaire supérieure à celles nourries avec la ration de 4%, notamment en 2002.

Activité de phagocytose

Au cours des deux expérimentations, l'évolution de l'activité de phagocytose des hémocytes est assez similaire quel que soit le niveau nutritif (4% vs 12%), avec des taux variant de 7 à 15% (Figure 8). Par ailleurs, on observe au cours des deux expérimentations le même phénomène de diminution de l'activité de phagocytose des hémocytes pendant la période de gamétogenèse active des huîtres, mais avec un décalage de 1 mois (Juin 2002 vs Mai 2003).

Discussion

Suite aux modifications zootechniques apportées après la première expérimentation GIGAREPRO, l'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de l'apport supplémentaire de la diatomée *Skeletonema costatum* dans la composition du régime algal de l'expérimentation GIGAREPRO 2 sur les paramètres énergétiques et hémocytaires des huîtres et de déterminer si ce changement alimentaire pouvait expliquer les différences observées entre les deux expérimentations.

Les résultats des analyses de la composition lipidique des huîtres des deux expérimentations GIGAREPROs indiquent que les régimes alimentaires des deux expérimentations présentent des différences de qualité en terme de composition en acides gras et de stérols. Après 4 mois de conditionnement à Argenton, les huîtres de l'expérimentation GIGAREPRO 1 contiennent en plus grande proportion les marqueurs lipidiques de l'algue *T-Iso*, à savoir du 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:4(n-3), 22:5(n-6), 22:6(n-3) et du brassicastérol (Table 1) mais aussi certains marqueurs de l'algue *T. chui* (20:4(n-6), cholestérol, campestérol, 24 méthylène cholestérol).

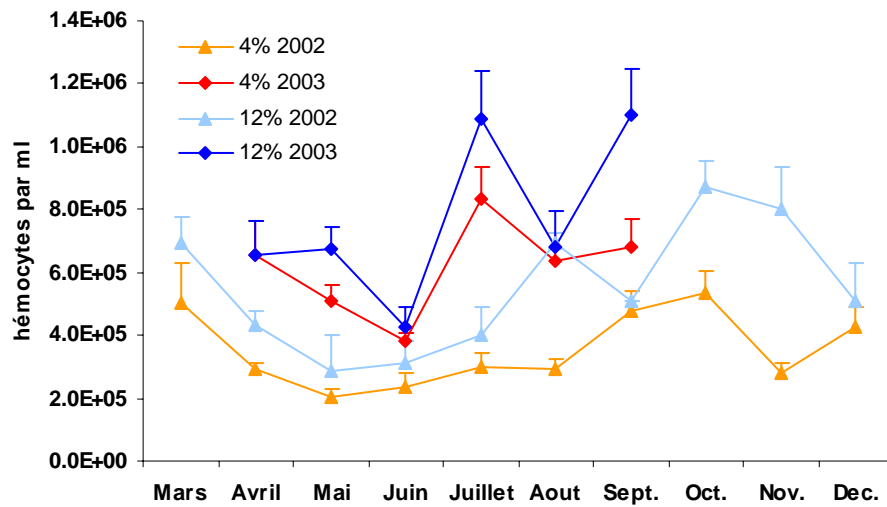


Figure 7 : Concentration hémocytaire totale (exprimée en nombre d'hémocytes par ml) des huîtres conditionnées à Argenton au cours des expérimentations GIGAREPRO 1 (2002, n=3 pools ou 10 individus selon les dates, cf. article 1) et 2 (2003, n=10 individus).

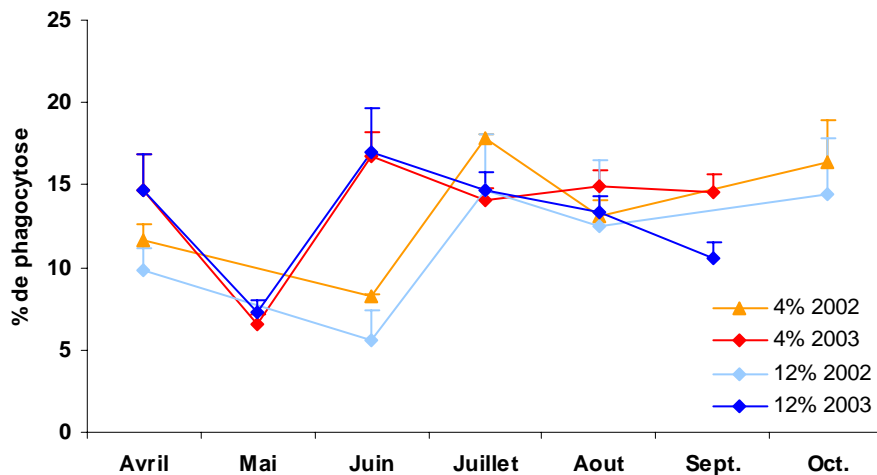


Figure 8 : Evolution de l'activité de phagocytose des hémocytes des huîtres conditionnées à Argenton au cours des expérimentations GIGAREPRO 1 et 2 (2002 et 2003, n=3 pools).

Au contraire, la composition lipidique des huîtres de GIGAREPRO 2 se caractérise par un ratio (n-3)/(n-6) plus élevé et un enrichissement en β -sitostérol et stigmastérol. Ces deux stérols sont présents en plus grande quantité dans les diatomées alors que le brassicastérol et le campestérol sont caractéristiques de l'algue *T-Iso* et *T. chui* (Soudant, 1995 ; Soudant *et al.*, 1998b ; Muller-Feuga *et al.*, 2003). Par conséquent, les huîtres de l'expérimentation GIGAREPRO 1 semblent avoir ingéré et assimilé plus de *T-Iso* et à moindre degré l'algue de *T. chui* alors que celles de GIGAREPRO 2 ont ingéré plus des diatomées, fournies en plus grande quantité. Les marquages lipidiques obtenus au cours des deux expérimentations GIGAREPROs sont en adéquation avec différentes études de nutrition réalisées sur d'autres tissus, espèces ou encore sur des larves de bivalves (Langdon & Waldock, 1981 ; Delaunay *et al.*, 1993 ; Berntsson *et al.*, 1997 ; Soudant, 1995 ; Soudant *et al.*, 1999 ; Caers *et al.*, 2000 ; Delaporte *et al.*, 2003 ; Delaporte *et al.*, en révision) et nous permettent d'affirmer qu'il y a eu un changement important de qualité nutritionnelle entre les deux expérimentations.

De plus, le changement de qualité nutritionnelle entre les deux expérimentations GIGAREPROs semble avoir clairement affecté les paramètres énergétiques et hématocytaires des huîtres. Ainsi, bien que la consommation de glucides associée à la gamétogenèse soit similaire entre les deux expérimentations et correspond à ce qui a été décrit par Mori *et al.* (1965), Perdue & Erickson (1984), Ruiz *et al.* (1992), Li *et al.* (2000) ou encore Berthelin *et al.* (2000), les huîtres de l'expérimentation GIGAREPRO 2 ont un niveau de teneurs glucidiques et lipidiques plus élevées par rapport à celles de GIGAREPRO 1. L'apport d'une deuxième diatomée dans le régime alimentaire de l'expérimentation GIGAREPRO 2 avec l'algue *S. costatum* s'est aussi traduit par un indice de condition et un poids sec de chair supérieurs à ceux des huîtres de GIGAREPRO 1, notamment pour les huîtres nourries avec la ration de 12%. Ceci semble corroborer le potentiel nutritionnel supérieur des diatomées par rapport à d'autres algues en terme de croissance (Laing *et al.*, 1987 ; Enright *et al.*, 1986 ; Delaunay *et al.*, 1993 ; Soudant, 1995 ; McCausland *et al.*, 1999 ; Knuckey *et al.*, 2002 ; Brown, 2002 ; Barillé *et al.*, 2003). Cependant, il faut souligner qu'il est difficile de dissocier l'effet de la valeur énergétique propre à l'algue (composition biochimique) de celui lié à composition lipidique (l'apport en acides gras essentiels).

La concentration et la mortalité hémocytaire semblent avoir été affectées par les changements de qualité nutritionnelle entre les deux régimes alimentaires. Les huîtres de GIGAREPRO 2 présentent des concentrations hémocytaires plus élevées par rapport à celles de GIGAREPRO 1 mais aussi une plus faible mortalité hémocytaire. Il est intéressant de noter que la différence de concentration et de mortalité hémocytaire existant entre les deux expérimentations est plus grande que la différence existant entre les deux rations alimentaires (4% vs 12%). Par conséquent, il peut être proposé que les différences de concentration résultent de la différence de qualité nutritionnelle des régimes alimentaires, et plus spécifiquement de la différence de qualité lipidique.

Sur la base des résultats des expérimentations « qualité » (ALGUES, EPA, AA), les plus fortes concentrations ont été reliées à des taux forts en 20:4(n-6) et en 20:5(n-3)(Table 2). Ainsi, dans le cadre de l'expérimentation ALGUES, les huîtres nourries avec l'algue *C. calcitrans* ont une composition lipidique enrichie en 20:4(n-6) et 20:5(n-3) et présentent une concentration hémocytaire qui tend à être plus élevée que celles des huîtres des autres conditionnements (*T-Iso* et *T. suecica*). De même, les huîtres nourries avec l'algue *T-Iso* supplémentée avec 50% d'émulsion lipidique (riche en 20:5(n-3) et aussi 20:4(n-6)) présentent aussi une plus forte concentration hémocytaire par rapport aux huîtres des autres conditions alimentaires après 4 semaines de conditionnement. La supplémentation en acide arachidonique a aussi permis de mettre en évidence des concentrations hémocytaires plus élevées pour les huîtres dont les membranes ont été enrichies en 20:4(n-6). Cependant, bien que l'augmentation de la concentration hémocytaire dans GIGAREPRO 2 soit associée à une augmentation de la proportion de diatomées dans le régime alimentaire, aucun enrichissement en 20:4(n-6) et 20:5(n-3) n'a pu être observé dans les huîtres de GIGAREPRO 2. Aussi, l'effet d'autres acides gras tel le 22:6(n-3), présent en plus faible quantité dans les huîtres des expérimentations GIGAREPRO 2, ALGUES (*Chaetoceros calcitrans*), et EPA (dose 50% d'émulsion lipidique) peut être envisagé. Cette hypothèse devra être testée ultérieurement.

L'évolution de l'activité de phagocytose des hémocytes des huîtres des deux expérimentations GIGAREPROs ne semble quant à elle pas être influencée par la qualité nutritionnelle différente des deux expérimentations.

Table 2 : Evolution des acides gras essentiels et des ratios (n-3)/(n-6) et 20:5(n-3)/20:4(n-6) dans les membranes d'huîtres nourries avec deux régimes nutritifs différents pour chaque expérimentation (augmentation, diminution ou un maintien).

	GIGAREPRO (2002 → 2003)	ALGUES (<i>T-Iso</i> → <i>C. calcitrans</i>)	EPA (0% → 50%)	AA (0 → 0.4 µg AA/ml)
20:4(n-6)	↘	↗	↗	↗
20:5(n-3)	=	↗	↗	↘
22:6(n-3)	↘	↘	↘	↘
(n-3)/(n-6)	↗	↘	↗	↘
20:5(n-3)/20:4(n-6)	↗	↗	↗	↘

Ceci confirme les résultats de l'expérimentation ALGUES. Dans les conditions de mesure comparables (sans pré-incubation) à celles utilisées pour les expérimentations GIGAREPROs, les hémocytes des huîtres nourries avec les différents régimes mono-algaux présentent des activités de phagocytose comparables, bien que les compositions lipidiques membranaires de ces huîtres soient drastiquement très différentes à la fin du conditionnement. Néanmoins, les résultats des autres expérimentations « qualité » (EPA et AA) démontrent que l'activité de phagocytose peut être temporairement affectée par la composition lipidique des membranes des huîtres. Les expérimentations EPA et AA ont aussi permis de mettre en évidence une corrélation entre le ratio (n-3)/(n-6) et l'activité de phagocytose. Ainsi, un ratio (n-3)/(n-6) inférieur à 4 est associé à une forte activité de phagocytose ; à l'inverse, un ratio (n-3)/(n-6) supérieur à 4 est associé à une faible activité de phagocytose. Ceci peut expliquer l'absence de différence entre les expérimentations GIGAREPROs puisqu'en Juin et Juillet, les huîtres des deux expérimentations présentent un ratio (n-3)/(n-6) inférieur à 4. Aussi, comme le souligne Horrobin *et al.* (2002) pour les vertébrés supérieurs, un équilibre entre acide gras de la série (n-3) et (n-6) doit exister chez les huîtres, et de façon plus générale chez les invertébrés, pour permettre aux cellules de conserver toute leur fonctionnalité malgré des changements de composition en acides gras. Par ailleurs, il faut aussi rappeler que la gamétogenèse influence l'activité de phagocytose des huîtres des expérimentations GIGAREPROs, avec une inhibition temporaire en Mai-Juin.

Pour finir, il est important de signaler que l'effet de la mise à sec journalière réalisée dans le cadre de l'expérimentation GIGAREPRO 2 et de la différence de méthodologie pour les prélèvements d'hémolymphe sur l'évolution des paramètres hémocytaires ont aussi été

envisagées. Mais, la comparaison de nos résultats avec ceux d'autres expérimentations MOREST montre que ces effets s'ils existent, semblent être mineurs par rapport à l'effet de la différence de qualité nutritionnelle entre les deux régimes alimentaires.

En conclusion, le changement de qualité nutritionnelle entre les deux expérimentations GIGAREPROs semble avoir favorisé positivement le statut physiologique (énergétique et hémocytaire) des huîtres. Ainsi, les huîtres nourries avec un régime algal enrichi en diatomées ont une composition biochimique plus riche en glucides et lipides et une concentration hémocytaire supérieure. Par contre, ni l'activité de phagocytose des hémocytes ni la production de ROS (non présentée) ne semblent pas être influencées par cette différence de qualité nutritionnelle entre les deux régimes alimentaires.

SYNTHESE ET CONCLUSION

« Effet de la qualité de la nourriture sur les paramètres physiologique de l'huître creuse *C. gigas* »

L'étude réalisée à l'aide de régimes algaux mono-spécifiques (ALGUES, 3^{ème} article) a tout d'abord permis de montrer que la composition lipidique des membranes des hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* et de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* pouvait être changée par l'alimentation. Les acides gras caractéristiques des algues utilisées sont incorporés au sein des membranes des hémocytes (Delaporte, 2001 ; cf. Annexes 3 et 4) mais aussi des branchies (Delaporte *et al.*, soumise ; cf. Annexe 5). Ce marquage lipidique est en adéquation avec différentes études réalisées sur d'autres tissus, espèces ou encore des larves (Langdon & Waldock, 1981 ; Delaunay *et al.*, 1993 ; Berntsson *et al.*, 1997 ; Soudant *et al.*, 1999 ; Caers *et al.*, 2000). Par ailleurs, des corrélations positives existent entre la composition en acides gras des membranes des hémocytes et celles des branchies (Annexe 3). Aussi pour simplifier les prélèvements, les analyses de composition en acides gras ont été ensuite réalisées systématiquement sur les branchies, matériel biologique qui a l'avantage d'être plus facile à prélever et présent en quantité largement suffisante.

A la fin du conditionnement ALGUES, les animaux nourris avec l'algue *Chaetoceros calcitrans* présentent des caractéristiques hémocytaires différentes par rapport aux animaux nourris avec les algues T-Iso ou *Tetraselmis suecica*. La concentration hémocyttaire, l'activité de phagocytose et la production des espèces actives de l'oxygène (ROS) des hémocytes de ces animaux sont plus élevées, notamment pour les palourdes. Comme les acides gras 20:5(n-3) et 20:4(n-6) sont des éléments importants dans la réponse immunitaire chez les vertébrés supérieurs, les changements de la composition en acides gras essentiels (20:4(n-6), 20:5(n-3) et 22:6(n-3)) des membranes des hémocytes pourraient être impliqués dans les différences de paramètres hémocytaires observées entre les animaux des trois conditions nutritives. Aussi, il a été décidé de préciser le rôle de ces deux acides gras dans la modulation des paramètres hémocytaires des huîtres. Deux nouvelles expérimentations ont été réalisées, l'une en utilisant une émulsion lipidique enrichie en 20:5(n-3) (4^{ème} article, expérimentation EPA) et l'autre en apportant directement l'acide gras à tester : le 20:4(n-6) dans le bac d'élevage (5^{ème} article, expérimentation AA). Par ailleurs, les résultats des expérimentations GIGAREPROs ont aussi

été comparés en fonction de la qualité nutritionnelle des deux régimes alimentaires. L'ensemble des résultats de ces expérimentations apportent différents éléments de réponses sur l'impact de la qualité lipidique de la nourriture sur les paramètres hématocytaires des huîtres.

Ainsi, il a pu être démontré que les différences de concentration hématocytaire entre les conditions nutritives des trois expérimentations « qualité » (ALGUES, EPA, AA) pourraient être associées à une augmentation de 20:4(n-6), un maintien ou une augmentation de 20:5(n-3), ou encore une diminution de 22:6(n-3) et du ratio (n-3)/(n-6) dans les membranes des huîtres (Table 2, page 256). La diminution du 22:6(n-3) dans les membranes des huîtres semblent systématiquement associée à de plus fortes concentrations hématocytaires, y compris pour les expérimentations GIGAREPROs. Ce type de réponses fait penser au rôle immunodépresseur des acides gras de la série (n-3) sur la prolifération de lymphocytes observé chez les vertébrés supérieurs (cf. les revues de De Pablo & Alvarez de Cienfuegos, 2000 ; Calder, 2001 ; De Pablo *et al.*, 2002).

En ce qui concerne l'activité de phagocytose, les résultats des expérimentations « qualité » montrent que l'activité de phagocytose peut être temporairement affectée par les changements de composition en acides gras des huîtres nourries avec les différents régimes (ALGUES, EPA, AA). Lorsque l'ensemble des données de chacune des expérimentations ALGUES et AA sont combinées entre elles, une corrélation positive entre l'activité de phagocytose et la proportion de 20:4(n-6) dans les membranes des huîtres est mise en évidence. Cette dernière est très intéressante puisque chez les insectes, la nodulation est positivement affecté par cet acide gras (Stanley-Samuelson & Pedibhotla, 1996 ; Stanley-Samuelson *et al.*, 1997 ; Mandato *et al.*, 1997 ; Dean *et al.*, 2002; Lavine & Strand, 2002 ; Tunaz *et al.*, 2003). De plus, l'implication 20:4(n-6) et de ses métabolites dans le processus de phagocytose a été démontré chez les vertébrés supérieurs (Lennartz, 1999).

Par ailleurs, au cours de l'expérimentation EPA, il a pu aussi être mis en évidence que les fortes proportions en 20:5(n-3) dans les membranes des huîtres nourries avec les doses de 10% et 50% d'émulsion ont pu avoir un effet inhibiteur sur l'activité de phagocytose. D'après les études menées chez les vertébrés sur diverses cellules du système immunitaire (Virella *et al.*, 1989 ; Sipka *et al.*, 1996 ; Peterson *et al.*, 1998 ; Thies *et al.*, 2001 ; Kew *et al.*, 2004), ceci est envisageable.

Le 20:5(n-3) pourrait rentrer en compétition avec l'effet du 20:4(n-6) dans la cascade des processus lié à la phagocytose d'une particule étrangère (cf. Figure 7 page 26), et donc inhiber temporairement cette activité. Par conséquent, les apports conjugués de 20:5(n-3) et 20:4(n-6) par les diatomées pourraient donc avoir des effets antagonistes. Ceci pourrait expliquer en partie l'absence d'effet de l'apport de diatomées en régime monospécifique ou en addition d'un régime d'algue sur la phagocytose. Aussi, comme le souligne Horrobin *et al.* (2002) et Harbige (2003), un optimum pour le ratio (n-3)/(n-6), et peut être 20:5(n-3)/20:4(n-6), pourrait exister et réguler cette fonction hémostatique.

La production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) est aussi affectée par la qualité lipidique de l'alimentation. Ainsi au cours de l'expérimentation AA, une forte augmentation de la production de ROS est observée pour les hémocytes des huîtres nourries avec T-*Iso* supplémentée avec les solutions à 0.25 et 0.41 µg AA /ml. Cet effet pourrait être lié à une augmentation de la mise à disposition du 20:4(n-6) dans les membranes pour la production d'eicosanoïdes et l'activation de la NADPH-oxydase. En effet, dans sa revue, Calder (2001) souligne que le leucotriène LTB₄ est impliqué dans la stimulation de la production des ROS des leucocytes. Par conséquent, les changements drastiques de composition en acides gras des membranes des branchies ont pu induire une sur-production de ROS. Mais, ils ont peut être aussi induits une augmentation des produits issus de la peroxydation lipidique (Mazières *et al.*, 1999). L'ensemble a pu conduire à un « désordre de type inflammatoire » comme chez les vertébrés. Aussi, la répétition de l'expérimentation AA avec des doses plus faibles semble nécessaire pour confirmer l'effet de cet acide gras sur la production de ROS.

Le 20:5(n-3) semble avoir quand à lui un effet négatif sur la production de ROS. Le maintien du 20:5(n-3) en grande proportions dans les membranes pourrait affecter la structure et la stabilité des membranes des hémocytes. Cet effet négatif du 20:5(n-3) pourrait aussi être lié à la compétitivité entre cet acide gras et le 20:4(n-6) dans la production des eicosanoïdes.

Il est intéressant de souligner que l'évolution de la production de ROS et de l'activité de phagocytose ne semblent pas être liées entre elles. Ceci laisse supposer que les mécanismes affectant et régulant ces deux paramètres pourraient être différents.

Dans le cadre des mortalités estivales, l'ensemble des résultats des expérimentations « qualité » ainsi que la comparaison des résultats des GIGAREPROs montrent que la qualité lipidique de l'alimentation peut avoir un rôle non négligeable sur les paramètres hématocytaires des huîtres. Ainsi, l'ajout de l'algue *S. costatum* dans le régime alimentaire des huîtres GIGAREPROs a eu un impact non seulement sur les paramètres énergétiques des huîtres mais aussi sur la concentration hématocytaire. Par conséquent, la qualité nutritionnelle des blooms phytoplanctoniques du milieu naturel pourrait avoir un impact sur les capacités de défense des huîtres, et en partie sur leur survie ultérieure. Aussi, il serait intéressant de coupler le suivi des paramètres hématocytaires des huîtres *in situ* à l'étude de la composition floristique des blooms.

Enfin, il est important de souligner l'efficacité de la nouvelle technique de supplémentation mise au point par Séguineau *et al.* (in prep.). Cette nouvelle technique a permis d'enrichir significativement les membranes des huîtres avec un seul acide gras sur une période de temps très courte. Ainsi, la proportion de 20:4(n-6) dans les membranes (lipides polaires) est quasiment triplée sur sept jours (cf. Annexe 7). Aussi, cette nouvelle méthode de supplémentation devrait permettre de préciser le rôle de chacun de ces acides gras essentiels sur les paramètres physiologiques des huîtres à partir d'un même lot d'animaux sans avoir la contrainte d'un long conditionnement avec les algues ou des émulsions.

3^{EME} PARTIE : EFFET DE LA NUTRITION IN SITU ?

Comparaison des huîtres placées *in situ* à Marennes-Oléron et en Baie des Veys : Existe-t-il un effet de la nutrition ?

Après avoir testé l'impact de la quantité et de la qualité de la nourriture sur les réponses physiologiques d'huîtres placées en conditions expérimentales, il est apparu intéressant d'examiner les résultats recueillis sur des huîtres placées *in situ* à Marennes-Oléron et en Baie des Veys au cours de l'année 2002 (expérimentation BABE). Les paramètres énergétiques et hématocytaires des huîtres placées *in situ* seront présentés dans cette dernière partie et mis en parallèle avec ceux obtenus lors de l'expérimentation GIGAREPRO 1 pour laquelle le même pool d'huître ainsi que les mêmes protocoles d'analyses ont été utilisés. Comme les résultats de l'expérimentation GIGAREPRO 1 ont été détaillés précédemment (cf. le premier article de la partie « quantité »), ils seront juxtaposés avec les résultats *in situ* en tant que référence.

L'objectif de cette partie est d'évaluer l'influence potentielle de l'alimentation des huîtres du milieu naturel, dont ni la quantité ni la composition ne sont connues, sur les réponses physiologiques de ces animaux, et de discuter quel est l'impact de cette alimentation dans le cadre des mortalités estivales. La nature de l'alimentation *in situ* étant inconnue, elle a été approchée par l'analyse de la composition lipidique des membranes des huîtres qui marque celles de la nourriture.

Les compositions en acides gras et stérols des huîtres de Marennes-Oléron et celles de Baie des Veys ont été réalisées sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour les analyses biochimiques du prélèvement de Juin 2002. A cette date, les huîtres ont déjà passé plus de 4 mois *in situ*. Or quinze jours à un mois de conditionnement avec un régime algal sont suffisants pour marquer la composition des membranes des huîtres, aussi on peut considérer que le profil lipidique des huîtres en Juin reflète l'alimentation qu'elles ont reçue préalablement.

Résultats

Mortalités relevées sur les sites

Au cours de cette expérimentation, un suivi bimensuel des mortalités a été réalisé sur les deux sites ostréicoles (Figure 1). Un épisode important de mortalités a été observé à Marennes-Oléron début Juillet 2002, alors que les mortalités sont apparues plus tardivement en Baie des Veys (fin Août).

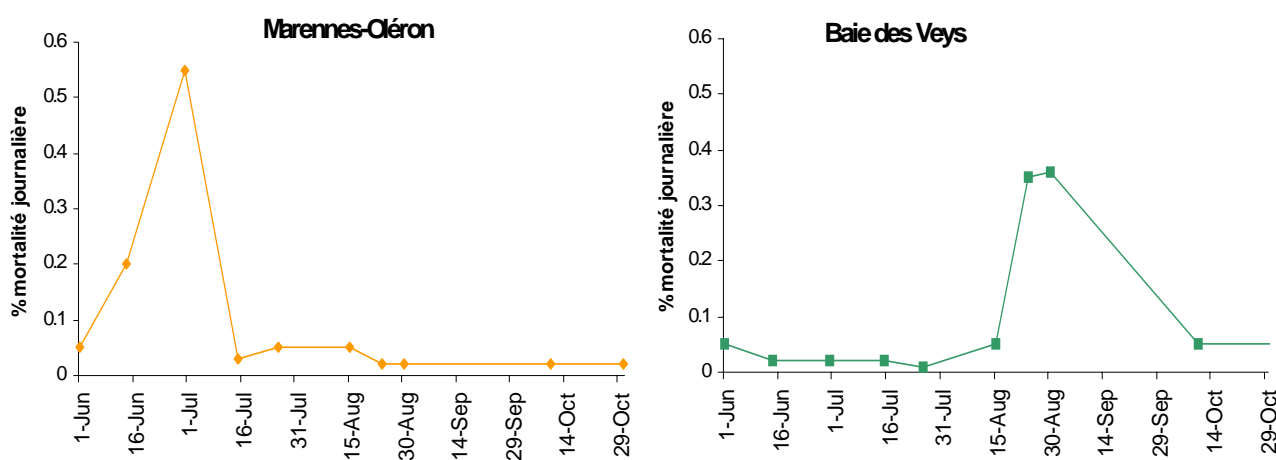


Figure 1 : Pourcentage de mortalité journalière relevé sur les deux sites expérimentaux.

Paramètres énergétiques

Charge énergétique adénylique (CEA)

Les valeurs de CEA mesurées varient significativement entre les deux sites (Figure 2, ANOVA, $p < 0.0001$). Les huîtres de Baie des Veys présentent des valeurs de CEA constantes tout le long de l'expérimentation avec en moyenne une CEA de 0.8. Au contraire, la CEA des huîtres de Marennes-Oléron augmente légèrement début Juin (de 0.7 à 0.76) puis diminue régulièrement pour être au plus bas fin Août (0.6). Les valeurs de CEA des huîtres de Marennes-Oléron ressemblent à celles obtenues dans le cadre de l'expérimentation GIGAREPRO 1.

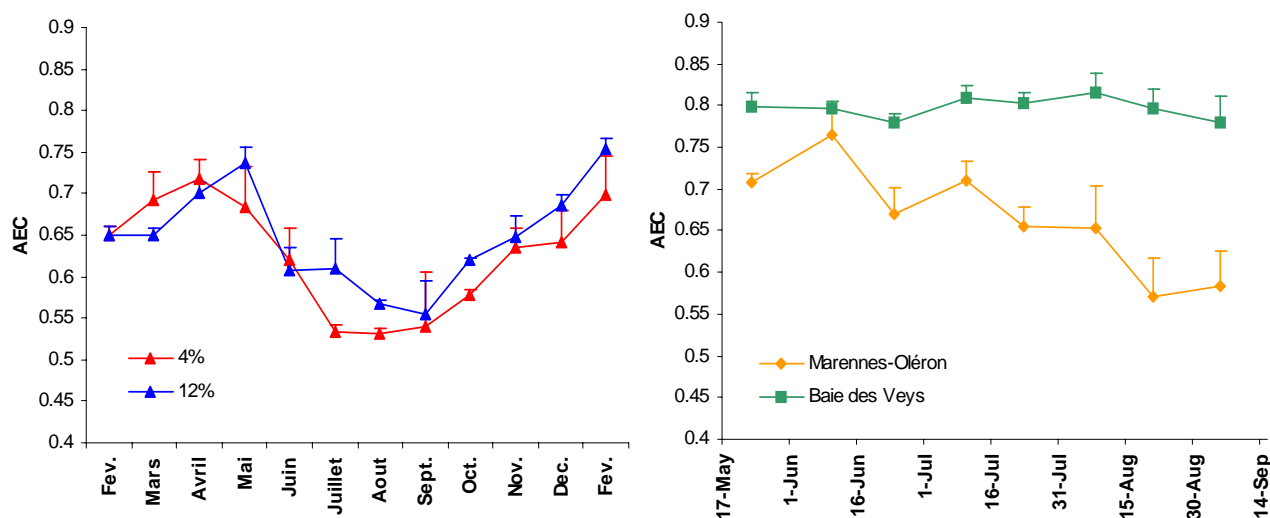


Figure 2 : Charge énergétique adénylique des huîtres conditionnées à Argenton (GIGAREPRO 1) et celles placées in situ à Marennes-Oléron et en Baie des Veys ($n=3$).

Composition biochimique des huîtres

Les huîtres de Baie des Veys se distinguent significativement de celles de Marennes-Oléron par un taux de glucides très élevé tout au long de l'expérimentation (Figure 3, ANOVA, $p<0.0001$). De plus, quelle que soit l'origine des huîtres, le taux de glucides des huîtres varie significativement au cours du temps (ANOVA, $p<0.001$).

Ainsi, le taux de glucides des huîtres de Baie des Veys augmente jusqu'en Juin pour atteindre des valeurs de 50% avant de chuter drastiquement jusqu'au début du mois d'Août. A cette date, le taux de glucides ne représente plus que 20%, puis remonte assez rapidement en Septembre. En ce qui concerne les huîtres de Marennes-Oléron, le taux de glucides diminue aussi pendant la période estivale. Il passe de 15% à la fin du mois de Mai à 7% au début du mois d'Août. A la fin de la période estivale, les huîtres reconstituent leur réserve et le taux de glucides augmente à nouveau et atteint un maximum de 17% en Décembre. Le taux de glucides des huîtres de Marennes est semblable à celui des deux conditions nutritives de l'expérimentation GIGAREPRO 1.

Au contraire des glucides, le taux moyen de lipides totaux est similaire entre les huîtres de Baie des Veys et celles de Marennes-Oléron (ANOVA, $p>0.05$), mais leur variation dans le temps diffère (ANOVA, $p<0.001$). Le taux de lipides des huîtres de Marennes-Oléron reste stable jusqu'au début du mois d'Août, date à laquelle il chute de 13% à 8% mi-Août (ANOVA, $p<0.0001$). Puis, il se maintient à ces valeurs basses jusqu'en Décembre.

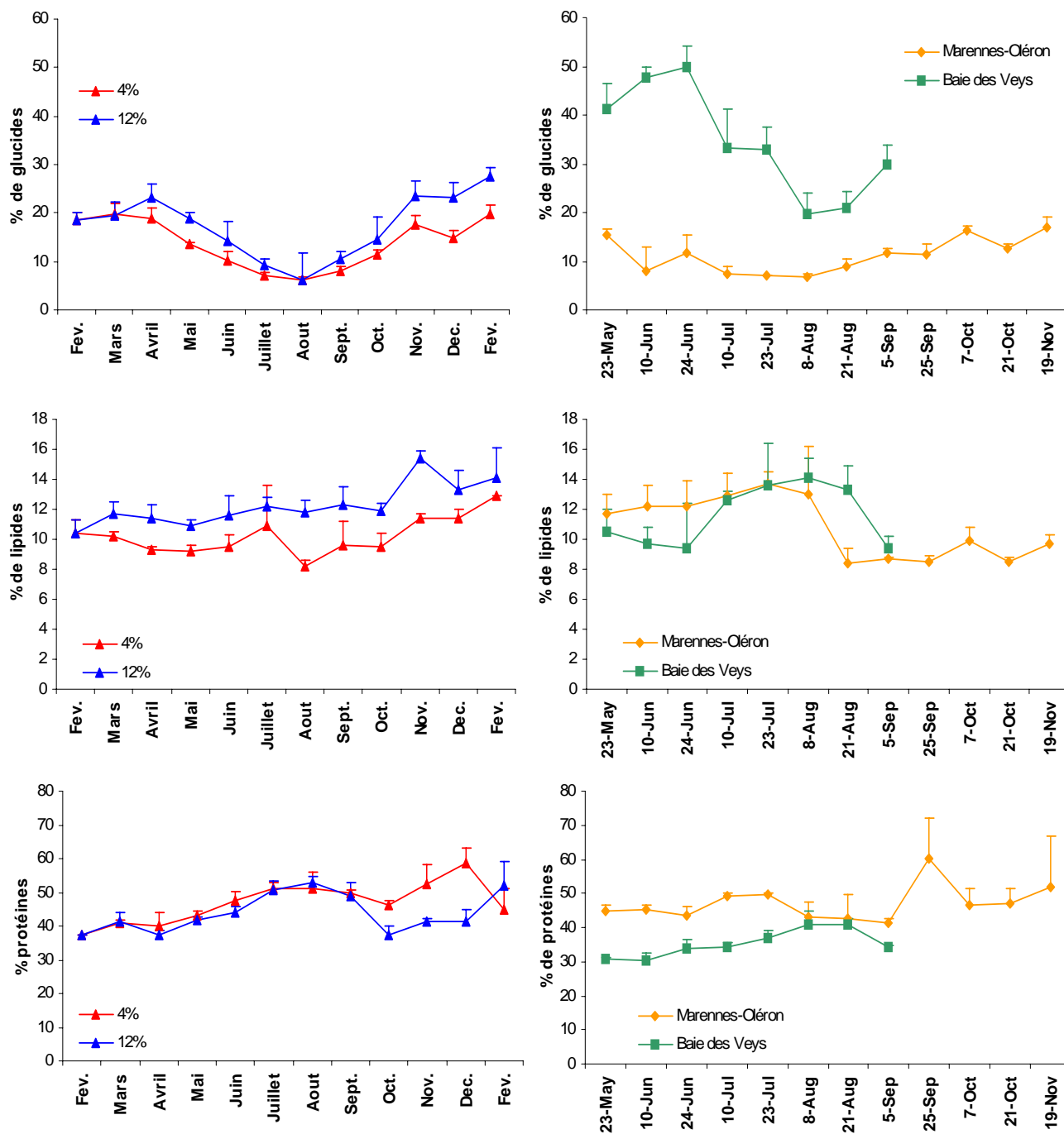


Figure 3 : Composition biochimique des huîtres conditionnées à Argenton (GIGAREPRO 1, à gauche) et celles placées *in situ* à Marennes-Oléron et Baie des Veys (BABE, à droite)(n=3).

Pour les huîtres placées en Baie des Veys, le taux de lipides augmente significativement entre fin Juin et fin Juillet, avant de diminuer à la fin du mois d’Août (ANOVA, $p < 0.05$). Les taux de lipides des animaux placés *in situ* à Marennes-Oléron comme en Baie des Veys se distinguent de ceux des huîtres de l’expérimentation GIGAREPRO 1 notamment par la forte diminution relevée en Août.

Finalement, le taux de protéines est significativement différent entre les huîtres des deux sites (ANOVA, $p < 0.0001$). Les huîtres de Marennes-Oléron présentent un taux de protéines supérieur à celles de Baie des Veys. Ce taux est stable au cours du temps pour les huîtres de Marennes-Oléron (ANOVA, $p > 0.05$) avec une moyenne de 47%. Par contre, il augmente significativement au cours de l’expérimentation pour les huîtres de Baie des Veys (ANOVA, $p < 0.0001$) similairement à ce qui est observé pour les huîtres de GIGAREPRO 1. Il passe de 30.6% initialement à 41% à la fin du mois d’Août avant de diminuer à nouveau en Septembre.

Composition en acide gras et stérols des huîtres

Dans les Tables 1 et 2, la composition en acide gras et en stérols des huîtres issues des deux expérimentations (GIGAREPRO 1 et BABE) sont détaillées. Il est intéressant tout d’abord de noter qu’il existe des différences significatives entre les compositions en acides gras des huîtres de Marennes-Oléron et celles de Baie des Veys. Les huîtres de Baie des Veys contiennent plus de 18:1(n-7), 20:1(n-7), 20:5(n-3) et 22:5(n-3), et aussi un ratio (n-3)/(n-6) supérieur par rapport aux huîtres de Marennes-Oléron. Par contre, ces dernières se caractérisent par un taux plus important de 22:6(n-3) dans leurs membranes.

Les huîtres de l’expérimentation BABE ont aussi des compositions en stérols différentes. Ainsi, les huîtres placées en Baie des Veys se distinguent de celles de Marennes-Oléron par des pourcentages en desmostérol, 24-méthylène cholestérol et β systostérol plus élevés ; alors que le norcholestérol, le brassicastérol et le campestérol caractérisent plus les huîtres de Marennes-Oléron.

Table 1 : Composition en acide gras des lipides polaires des huîtres conditionnées à Argenton (GIGAREPRO 1) et celles placées *in situ* à Marennes-Oléron et Baie des Veys (BABE) au mois de Juin. Les analyses ont été réalisées sur un extrait lipidique d'huîtres entières.

	4%		12%		Baie des Veys		Marennes	
	(N=3)		(N=3)		(N=3)		(N=3)	
	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.
16:0	1.4 ^a	0.2	1.5 ^a	0.2	1.4 ^a	0.0	1.2 ^a	0.0
18:0	13.7 ^a	0.9	14.0 ^a	0.4	14.6 ^a	0.1	14.5 ^a	0.7
16:1(n-7)	4.5 ^a	0.1	3.6 ^b	0.6	3.9 ^b	0.1	4.4 ^{ab}	0.3
18:1(n-9)	1.3 ^a	0.0	1.6 ^b	0.0	1.5 ^b	0.1	1.4 ^{ab}	0.1
18:1(n-7)	1.7 ^a	0.1	1.5 ^a	0.1	1.2 ^b	0.0	1.0 ^b	0.1
20:1(n-11)	5.2 ^a	0.3	5.7 ^b	0.2	4.5 ^c	0.2	3.6 ^d	0.2
20:1(n-7)	2.2 ^a	0.3	1.6 ^b	0.2	1.9 ^b	0.1	2.4 ^{ab}	0.3
18:2(n-6)	4.8 ^a	0.1	4.4 ^b	0.3	5.0 ^a	0.1	4.5 ^b	0.1
18:3(n-3)	2.4 ^a	0.2	2.6 ^a	0.3	0.8 ^b	0.1	0.9 ^b	0.1
18:4(n-3)	1.3 ^a	0.1	1.5 ^b	0.1	0.9 ^c	0.1	0.9 ^c	0.0
20:2i	1.2 ^a	0.1	1.6 ^b	0.1	1.4 ^c	0.0	1.5 ^{bc}	0.1
20:2j	0.4 ^a	0.0	0.3 ^a	0.0	0.3 ^a	0.0	0.5 ^a	0.3
20:2(n-6)	0.3 ^a	0.0	0.3 ^{ab}	0.0	0.2 ^b	0.0	0.3 ^b	0.1
20:4(n-6)	0.3 ^a	0.0	0.2 ^b	0.0	0.1 ^c	0.0	0.2 ^{ab}	0.1
20:5(n-3)	4.3 ^a	0.5	3.6 ^b	0.3	2.9 ^c	0.1	3.1 ^{bc}	0.1
22:2i	15.5 ^a	1.4	17.7 ^{ab}	1.1	25.7 ^c	0.9	19.7 ^b	1.1
22:2j	0.9 ^a	0.3	0.6 ^a	0.1	0.8 ^a	0.1	1.0 ^a	0.1
22:5(n-6)	5.5 ^a	0.5	4.3 ^a	0.6	5.2 ^a	0.5	5.1 ^a	0.3
22:5(n-3)	3.3 ^a	0.4	2.4 ^b	0.1	0.3 ^c	0.0	0.5 ^c	0.0
22:6(n-3)	1.1 ^a	0.2	1.2 ^a	0.1	2.2 ^b	0.3	1.8 ^c	0.1
Total saturés	19.0 ^a	0.5	15.5 ^b	1.1	16.2 ^b	1.3	21.4 ^c	0.6
Total mono-insaturés	22.1 ^a	0.8	21.4 ^a	0.7	21.7 ^a	0.1	22.7 ^a	0.7
Total poly-insaturés	18.4 ^a	0.2	17.9 ^a	0.9	16.4 ^b	0.4	15.4 ^c	0.3
Total (n-6)	58.6 ^a	0.7	59.8 ^a	1.7	61.1 ^a	0.3	61.1 ^a	1.0
Total (n-3)	11.3 ^a	1.0	9.7 ^b	0.4	5.1 ^c	0.2	5.5 ^c	0.2
Total NMIs	39.8 ^a	0.9	39.1 ^a	1.8	48.9 ^b	0.8	48.1 ^b	1.5
(n-3)/(n-6)	7.2 ^a	0.7	5.5 ^{ab}	0.6	6.5 ^{ab}	0.6	6.9 ^a	0.5
22:6(n-3)/20:5(n-3)	3.5 ^a	0.4	4.0 ^a	0.2	9.6 ^b	0.3	8.7 ^c	0.2
20:5(n-3)/20:4(n-6)	1.2 ^a	0.2	0.9 ^b	0.1	0.6 ^c	0.1	1.1 ^a	0.0
22:5(n-6)/20:4(n-6)	3.7	0.8	5.0	0.3	8.9	0.4	6.4	0.2
	0.8 ^a	0.0	0.7 ^b	0.1	0.1 ^c	0.0	0.2 ^c	0.0

Table 2 : Composition en stérol des lipides neutres des huîtres conditionnées à Argenton (GIGAREPRO 1) et celles placées *in situ* à Marennes-Oléron et Baie des Veys (BABE) au mois de Juin. Les analyses ont été réalisées sur un extrait lipidique d'huîtres entières.

	4% (N=3)		12% (N=3)		Baie des Veys (N=3)		Marennes (N=3)	
	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.
Norcholesterol	0.9 ^a	0.1	0.6 ^a	0.1	2.5 ^b	0.1	3.8 ^c	0.3
Tdehydro cholesterol	1.7 ^a	0.1	1.2 ^a	0.2	4.1 ^b	0.1	7.5 ^c	0.4
Cholesterol	36.1 ^a	0.3	37.3 ^a	1.6	32.6 ^b	0.7	30.9 ^b	0.5
Brassicasterol	22.7 ^a	1.4	19.6 ^b	1.7	13.4 ^c	0.6	15.6 ^d	0.5
Desmosterol	1.3 ^a	0.1	1.6 ^a	0.4	4.9 ^b	0.2	2.7 ^c	0.2
Campesterol	9.5 ^a	0.2	11.1 ^b	0.5	3.8 ^c	0.1	5.4 ^d	0.1
24-méthylène cholesterol	15.2 ^a	1.1	14.2 ^a	0.7	23.6 ^b	0.4	15.2 ^a	0.5
Stigmasterol	1.4 ^a	0.3	1.1 ^a	0.2	2.2 ^b	0.2	2.5 ^b	0.3
β Sistosterol	3.6 ^a	0.1	3.5 ^a	0.4	8.1 ^b	0.2	5.9 ^c	0.3
Fucosterol	5.4 ^a	0.1	8.1 ^b	0.3	0.8 ^c	0.1	1.0 ^c	0.1

Enfin, des différences significatives entre les compositions en acides gras des huîtres du milieu naturel et celles d'Argenton sont observées, notamment en ce qui concerne les acides gras : 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 20:4(n-6), et 22:5(n-6). Ces acides gras sont présents en plus grande proportions dans les huîtres conditionnées à Argenton. De ce fait, le total des acides gras de la série (n-6) est aussi plus important pour ces huîtres (en moyenne 10% des acides gras totaux) alors qu'il ne représente que 5% des acides gras totaux pour les huîtres de Marennes-Oléron et de Baie des Veys. Cette différence se répercute par conséquent sur le ratio (n-3)/(n-6) qui est beaucoup plus élevé pour les huîtres du milieu naturel.

Il existe aussi des différences significatives entre les compositions en stérols des huîtres selon leur origine (GIGAREPRO vs BABE). Ainsi, les huîtres placées *in situ* en Baie des Veys et à Marennes-Oléron présentent une composition en stérols avec de forts taux en norcholestérol, T-déhydro-cholestérol, stigmastérol et β sistostérol alors qu'un taux élevé de cholestérol, brassicastérol, campestérol et de fucostérol caractérise les huîtres élevées à Argenton.

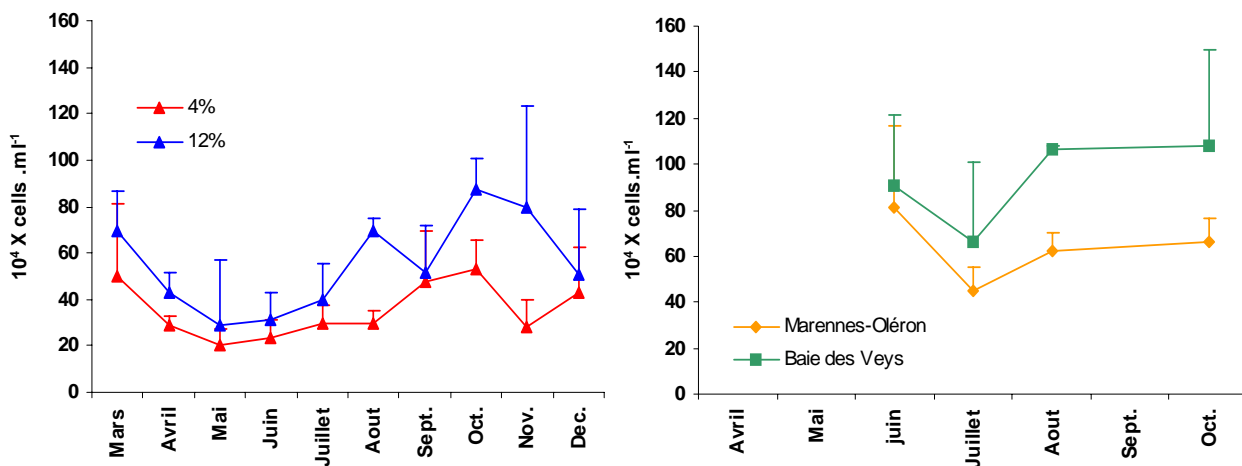


Figure 4: Concentration hémocytaire (exprimée en $10^4 \text{ cellules} \cdot \text{ml}^{-1}$) des huîtres conditionnées à Argenton (GIGAREPRO 1, $n=3$ ou 10 selon les dates, cf. article 1) et celles placées in situ à Marennes-Oléron et Baie des Veys (BABA, $n=3$).

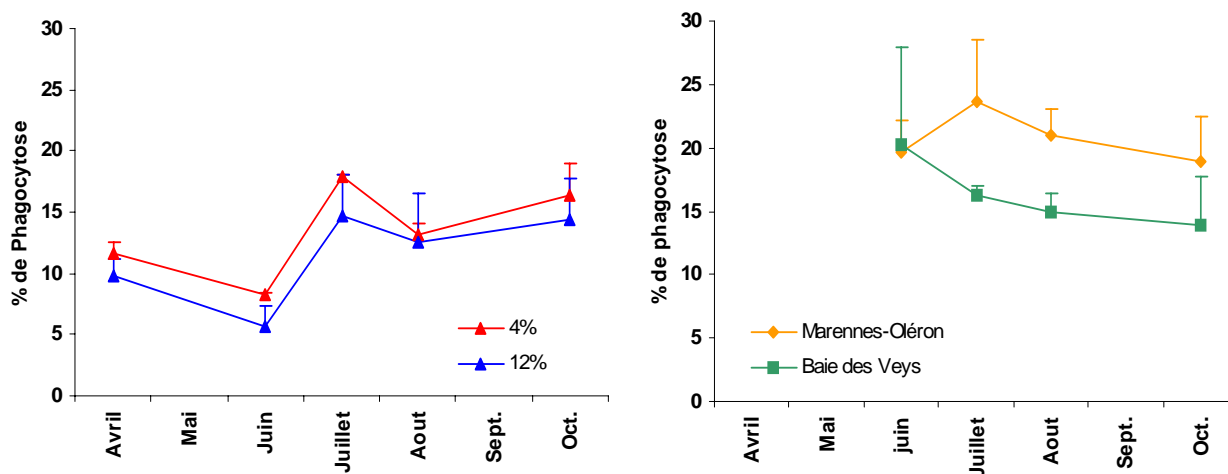


Figure 5 : Activité de phagocytose des hémocytes des huîtres conditionnées à Argenton (GIGAREPRO 1) et celles placées in situ à Marennes-Oléron et Baie des Veys (BABA)($n=3$).

Paramètres hématologiques

Concentration hématologique

La concentration hématologique des huîtres de Baie des Veys est significativement supérieure à celle des huîtres de Marennes-Oléron (Figure 4, ANOVA, $p < 0.05$) et à celle des huîtres de l'expérimentation GIGAREPRO 1. Au contraire, la concentration hématologique des huîtres de Marennes-Oléron est du même ordre de valeur que celle des huîtres d'Argenton nourries avec la ration de 12% de poids sec d'algues par poids sec d'huître.

Les concentrations des huîtres *in situ* sont relativement stables au cours du temps car la baisse observée en Juillet est non significative.

Activité de phagocytose

Les hématocytes des huîtres placées *in situ* à Marennes-Oléron et en Baie des Veys présentent une activité phagocytaire significativement différente (ANOVA, $p < 0.01$). Le taux moyen de phagocytose des hématocytes des huîtres de Marennes-Oléron est de 21% contre 16% pour les huîtres de Baie des Veys (Figure 5). Au cours de l'expérimentation *in situ* (BABE), les taux de phagocytose restent relativement stables quelque soit le site d'origine des huîtres (ANOVA, $p > 0.05$).

Au contraire, les taux de phagocytose des huîtres de l'expérimentation GIGAREPRO 1 varient significativement au cours du temps et ils sont les plus bas en Juin. Par ailleurs, ils sont aussi inférieurs aux taux de phagocytose des huîtres placées à Marennes-Oléron, mais similaires à ceux des huîtres de Baie des Veys.

Capacité d'adhésion des hématocytes

La capacité d'adhésion des hématocytes dans l'eau de mer est légèrement différente pour les huîtres des deux sites (Figure 6, ANOVA, $p < 0.05$). Ceci résulte de la plus faible capacité d'adhésion des hématocytes des huîtres de Baie des Veys en Juin. Les différences entre les sites sont plus marquées lorsque le test est réalisé en présence du *Vibrio* sp. S322 surtout en Juillet, Août et Octobre (ANOVA, $p < 0.05$).

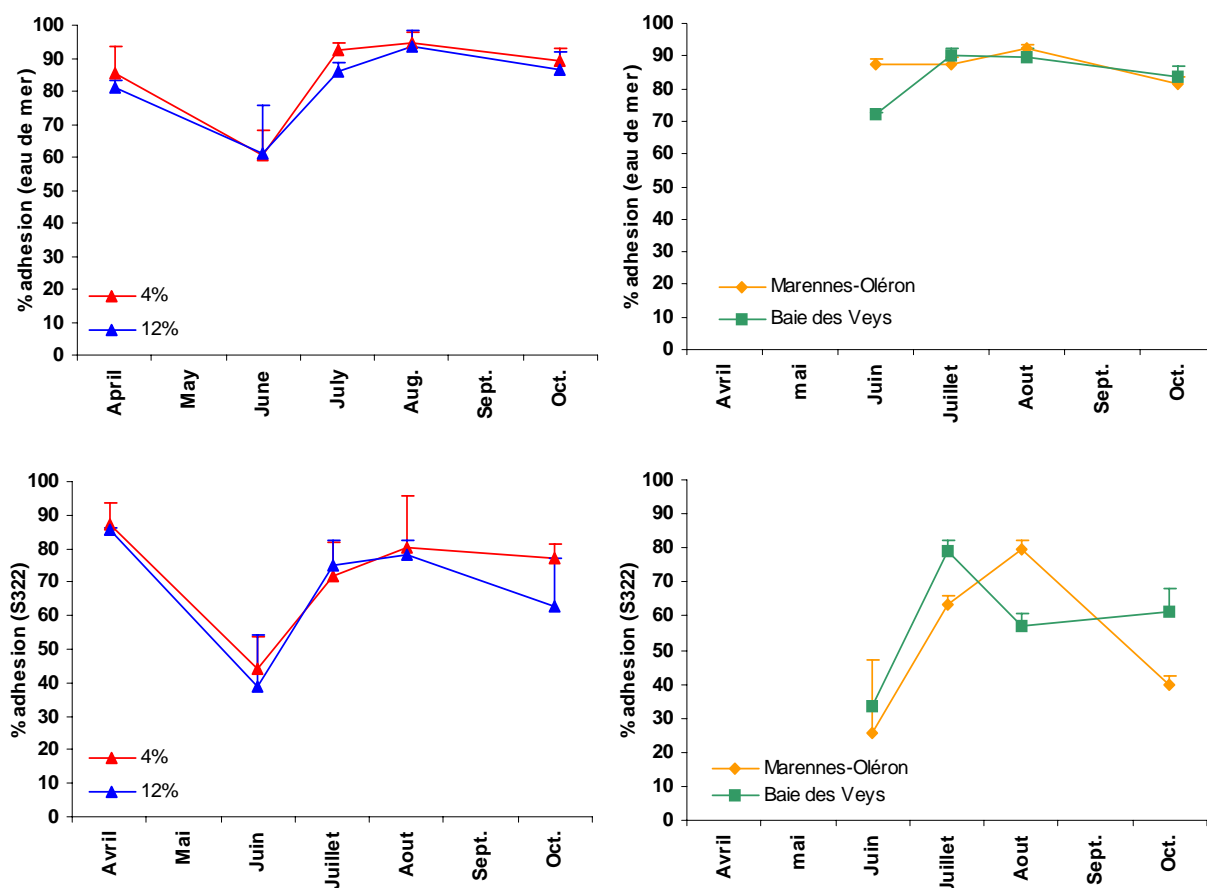


Figure 6 : Capacité d'adhésion des hémocytes sur microplaque en présence d'eau de mer stérile ou en présence du *Vibrio* sp. S322 pour les huîtres conditionnées à Argenton (GIGAREPRO 1) et celles placée *in situ* à Marennes-Oléron et Baie des Veys (BABE)(n=3).

Comme dans le cadre de l'expérimentation GIGAREPRO 1, la capacité d'adhésion des hémocytes est fortement réduite en Juin en présence du *Vibrio* sp. S322. On observe ainsi en Juin une perte d'adhésion de 60% et 40% de la capacité d'adhésion des hémocytes des huîtres de Marennes-Oléron et de Baie des Veys, respectivement.

Production d'espèces actives de l'oxygène

La production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) de chaque sous-population hémocytaire est présentée dans la Figure 7, en absence de stimulation. Les granulocytes des huîtres de Baie des Veys ont une production de ROS supérieure à ceux des huîtres de Marennes-Oléron (Figure 7B, ANOVA, $p < 0.05$) principalement en Juin.

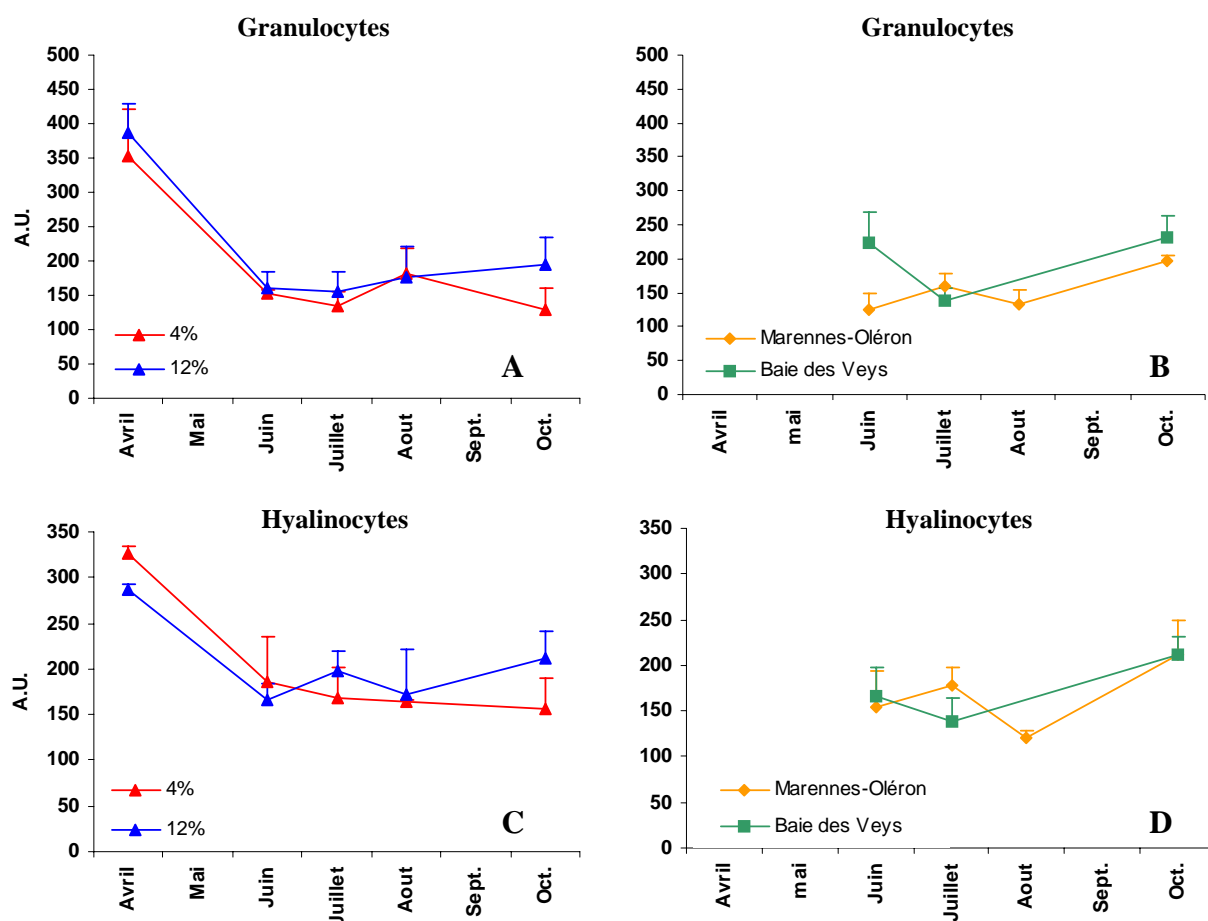


Figure 7 : Production des espèces actives de l'oxygène (exprimée en unité arbitraire, A.U.) des granulocytes et hyalinocytes des huîtres conditionnées à Argenton (A : granulocytes, C : hyalinocytes) (GIGAREPRO 1) et celles placées *in situ* à Marennes-Oléron et Baie des Veys (B : granulocytes, D : hyalinocytes) (BABE)(n=3).

Aucune différence significative de production de ROS pour les hyalinocytes n'est observée entre les deux sites (Figure 7D, ANOVA, $p > 0.05$). La production de ROS varie aussi au cours de l'expérimentation BABE pour les deux sous-populations hémocytaires ; elle est significativement plus élevée en Octobre (ANOVA, $p < 0.05$). Par ailleurs, la production de ROS des huîtres placées *in situ* est similaire à celle des huîtres d'Argenton.

Discussion

Les résultats des paramètres énergétiques indiquent tout d'abord que les huîtres placées en Baie des Veys ont une composition biochimique particulière : avec un taux de glucides et une CEA très élevés par rapport à celles de Marennes-Oléron et même très

supérieurs aux valeurs mesurées pour les huîtres nourries avec la ration de 12% à Argenton. Pourtant, cette ration nutritive choisie pour les expérimentations GIGAREPROs correspond à des valeurs moyennes de chlorophylle *a* de 15 µg.l⁻¹ similaire à ce qui peut être mesuré *in situ* sur les sites d'élevage de la Baie des Veys considéré comme un site riche (Michel Ropert, com. pers.). Par conséquent, le milieu naturel de Baie des Veys doit fournir plus de nourriture que l'estimation de 12% qui avait été faite à partir de la teneur en chlorophylle *a*. Cette estimation aurait du prendre en compte la productivité du milieu, la chlorophylle *a* n'étant que la mesure du stock résultant de la production et de la consommation instantanée. Au contraire, le site de Marennes-Oléron se rapproche des conditions d'Argenton. Les huîtres de Marennes-Oléron ont une composition biochimique intermédiaire à celles des huîtres nourries avec la ration de 12% et de 4%.

La composition lipidique (lipides et stérols) des huîtres placées *in situ* en de Baie des Veys et Marennes-Oléron indique que les huîtres ont eu accès à une nourriture de qualité nutritionnelle différente. Les huîtres de Baie des Veys ont probablement été nourries avec un régime plus riche en diatomées. Le 20:5(n-3), cholestérol, 24 méthylène cholestérol, caractéristiques des diatomées, sont présents en plus grandes proportions. Au contraire, les huîtres de Marennes-Oléron ont une empreinte lipidique qui ressemble à celle d'un mélange de diatomées et de prymnésiophyces (flagellées) avec une composition lipidique enrichie en 20:5(n-3), 22:6(n-3), campestérol, stigmastérol et β sitostérol (Volkman *et al.*, 1989 ; Soudant, 1995 ; Soudant *et al.*, 1998b ; Muller-Feuga *et al.*, 2003). Le marquage lipidique des huîtres placées *in situ* reporté dans cette étude reflète donc ce qu'elles ont ingéré pendant la période des blooms phytoplanctoniques printaniers. Or ces blooms se caractérisent par des successions phytoplanctoniques variables et différentes selon les sites. Aussi, on peut donc déduire que les deux sites présentent des caractéristiques nutritionnelles très différentes, d'un point de vue énergétique mais aussi pour l'apport des composés lipidiques essentiels. Il est intéressant de souligner que ces variations de composition lipidique sont faibles par rapport aux différences observées entre les huîtres de GIGAREPRO 1, dont le régime est enrichi en flagellés (*T-Iso* et *T. chui*), et celles placées *in situ*. Finalement, il serait intéressant de valider nos résultats par une approche plus écologique telle que le suivi des paramètres énergétiques, hématocytaires et de la composition lipidique des huîtres en relation avec la composition floristique du milieu. Ce type d'étude vient d'être initiée en Baie des Veys (S. Lefebvre, com. pers.).

Comme, il a été démontré dans ce travail que la quantité et la qualité de la nourriture affectent les paramètres hématocytaires des huîtres. Il est apparu important de comparer les paramètres hématocytaires des huîtres de ces deux sites. Les différences observées entre les sites peuvent résulter de la quantité d'algue mise à disposition aux huîtres mais aussi de la valeur énergétique et de la qualité lipidique des algues constituant les régimes algaux de chaque site ; ainsi que des paramètres du cycle reproducteur des huîtres qui sont décalés dans le temps du fait de la montée thermique différente entre le sud et le nord et de nombreux autres facteurs environnementaux. Les résultats ont aussi été mis en parallèle avec les résultats obtenus à Argenton à titre indicatif, car de nombreuses différences existent entre les deux environnements *in situ* vs Argenton : variation journalière de la température, mise à sec, dessalure, exposition à des pathogènes, pollution... n'autorisant pas *sensu stricto* les comparaisons.

Tout au long de l'expérimentation BABE, les huîtres de la Baie des Veys, nourries avec un régime apparemment plus riche en diatomées, présentent une concentration hématocytaire plus élevée par rapport à celles de Marennes-Oléron. L'écart de concentration entre les huîtres des deux sites est comparable à l'écart de concentration reporté entre les huîtres nourries avec les rations de 4% et 12%. Cependant, les paramètres énergétiques indiquent que le milieu naturel de la Baie des Veys apporte plus de nourriture que les 12% ; aussi, un écart plus important aurait pu être attendu. Il semblerait donc que la différence de concentration entre les huîtres de Marennes-Oléron et celles de Baie des Veys puisse découler de la différence de qualité entre les régimes alimentaires des huîtres de ces deux sites comme dans le cadre de la comparaison des GIGAREPROs. Les plus fortes concentrations relevées en Baie des Veys par rapport à celles de Marennes-Oléron ou encore celles d'Argenton pourraient être reliées aux plus forts taux en 20:5(n-3) dans les membranes des huîtres mais pourraient aussi résulter de la diminution de la proportion en 22:6(n-3) ou de l'augmentation du ratio 20:5(n-3)/20:4(n-6) (Table 3). Comme pour les autres expérimentations présentées dans ce travail, il est difficile d'attribuer un effet précis à chacun des acides gras essentiels sur la concentration hématocytaire des huîtres. La plus forte concentration des huîtres de Baie des Veys pourrait aussi être associée au fait que ces huîtres développent une plus grosse gonade que celles de Marennes-Oléron (Enriquez-Diaz, 2004).

Bien que les huîtres de la Baie des Veys aient une concentration hématocytaire supérieure à celles de Marennes-Oléron, les hématocytes des huîtres de la Baie des Veys ont

une capacité de phagocytose plus faible. L'évolution de cette activité hémostatique n'est pas reliée au statut énergétique des huîtres puisque les huîtres de Baie des Veys sont celles qui présentent les plus fortes teneurs en glucides et CEA, ce qui confirme les résultats observés au cours des expérimentations GIGAREPROs. Similairement à ce qui a été reporté dans l'expérimentation EPA, la plus forte proportion en 20:5(n-3) a pu avoir un effet négatif sur l'activité de phagocytose des huîtres de Baie des Veys. Cependant, ces huîtres ont une activité de phagocytose plus forte que les huîtres de GIGAREPRO 1 dont la proportion de 20:5(n-3) est plus faible et qui ont plus de 20:4(n-6). Aussi, les corrélations entre l'activité de phagocytose et la composition en acides gras des huîtres établies dans le cadre des expérimentations « qualité » ne sont pas valide dans cette étude.

Par conséquent, les différences d'activité de phagocytose observées entre les huîtres de Marennes-Oléron et celles de la Baie des Veys peuvent être liées à tout autre facteur environnemental pouvant influencer cette activité telles la température (Chu & La Peyre, 1993 ; Chu *et al.*, 1995 ; Carballal *et al.*, 1998 ; Genther *et al.*, 1999), la présence de pathogènes (Ford *et al.*, 1993 ; Oubella *et al.*, 1993 ; Anderson *et al.*, 1995 ; Allam *et al.*, 2000 ; Allam *et al.*, 2001 ; Cochenec-Laureau *et al.*, 2003), la proximité au sédiment (Soletchnik *et al.*, submitted) ou encore l'effort de reproduction (GIGAREPRO 1).

En ce qui concerne la capacité d'adhésion et de production d'espèces actives de l'oxygène des hémocytes, ces deux paramètres ne semblent pas être influencés ni par le statut énergétique des huîtres ni par la qualité du régime alimentaire qu'elles ont reçus. Ces deux activités sont plus soumises aux variations saisonnières.

Finalement, dans le cadre des mortalités estivales, il est intéressant de noter que les huîtres du milieu naturel ont été touchées par des mortalités au contraire des huîtres de l'expérimentation GIGAREPRO 1. Un pic de mortalité est reporté en Juillet pour les huîtres de Marennes-Oléron et début Septembre pour les huîtres de Baie des Veys. Par ailleurs, les animaux de Baie des Veys sont affectés par ces mortalités bien que leur réserves énergétiques soient élevées. Aussi, la susceptibilité des huîtres aux mortalités estivales à différentes périodes de l'année est liée à leur état de maturité sexuelle, mais ne semble pas être liée à leur statut énergétique ni à la qualité du régime algal qu'elles ont reçu au préalable (GIGAREPROs).

Table 3 : Evolution des acides gras essentiels et des ratios (n-3)/(n-6) et 20:5(n-3)/20:4(n-6) dans les lipides polaires des branchies des huîtres entre deux conditions nutritives par rapport à un contrôle négatif pour chaque expérimentation (↗ : augmentation, ↘ : diminution ou = maintien).

	BABE (MO → BDV)	GIGAREPRO (2002 → 2003)	ALGUES (T-Iso → C. calcitrans)
20:4(n-6)	=	↘	↗
20:5(n-3)	↗	=	↗
22:6(n-3)	↘	↘	↘
(n-3)/(n-6)	↗	↗	↘
20:5(n-3)/20:4(n-6)	↗	↗	↗

En conclusion, la comparaison des résultats des paramètres énergétiques et hémocytaires des huîtres de Baie des Veys et Marennes-Oléron met en évidence que la qualité nutritionnelle des régimes alimentaires de ces huîtres pourrait être en partie impliquée dans les différences observées. Cependant, de nombreux autres facteurs peuvent être aussi responsable de ces différences.

CONCLUSION GENERALE

Rappel de la problématique

Depuis son introduction, des mortalités chroniques affectent le naissain et les adultes d'huître creuse *C. gigas* (Maurer *et al.*, 1986). Les causes exactes de ce phénomène restent encore inconnues à ce jour, cependant plusieurs facteurs susceptibles d'être impliqués dans les mortalités ont été incriminés, et peuvent être concomitants à l'apparition de ces mortalités. Aussi, afin de comprendre l'implication de chacun des facteurs et leurs interactions, IFREMER a initié en 2001 un programme ayant une approche pluridisciplinaire (« MOREST » pour MORTalités ESTivales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*).

Parmi les hypothèses majeures de la communauté scientifique, l'effort de reproduction des huîtres mobiliserait la majeure partie de l'énergie disponible au détriment d'autres fonctions, parmi lesquelles sont citées comme hypothèse les fonctions de défense de l'organisme ou la réponse au stress environnementaux.

Par rapport à ces observations, la première question que l'on va tenter de répondre et de vérifier si cette déficience énergétique associée à la reproduction peut être comblée par un apport supplémentaire de nourriture, et si cette déficience énergétique peut être impliquée dans le phénomène des mortalités estivales.

La deuxième est de déterminer l'implication de la reproduction des huîtres dans la modulation des paramètres hématocytaires tels qu'on peut les décrire aujourd'hui et de déterminer si le déficit énergétique engendré par la reproduction affecte les fonctions de défenses de l'organisme.

La troisième question tentera d'élucider si la qualité lipidique de la nourriture peut aussi moduler les paramètres hématocytaires.

I. NUTRITION ET PARAMETRES ENERGETIQUES

I. 1. Effet de la quantité de nourriture sur les paramètres énergétiques et la reproduction des huîtres

Au cours de ce travail, il a tout d'abord été démontré qu'indépendamment du cycle de reproduction, les huîtres nourries avec la ration alimentaire de 12% présentent un index de condition, un poids sec de chair ou encore une teneur en glucides significativement plus élevées que les huîtres nourries avec la ration de 4%. Par ailleurs, l'excédent d'énergie apporté avec la ration de 12% a été investi dans le développement d'une gonade plus volumineuse et ce quel que soit le phénotype des huîtres (Coquard, 2003 ; Enriquez-Diaz, 2004). Etrangement, bien que la ration alimentaire de 12% ait été calculée pour se rapprocher des conditions nutritives de la Baie des Veys, les huîtres de la Baie des Veys développent trois fois plus de tissu gonadique que les huîtres nourries avec la ration de 12% (6g contre 2 g, Enriquez-Diaz, 2004). De plus, les huîtres de Baie des Veys ont aussi une teneur en glucides et des valeurs de charge énergétique (CEA) très élevées tout au long de l'année. Ainsi, le milieu naturel de la Baie des Veys semble apporter plus de nourriture que l'estimation de 12% qui en avait été faite à partir de la teneur en chlorophylle *a*. Cette estimation aurait du prendre en compte la productivité du milieu, la chlorophylle *a* n'étant que la mesure du stock résultant de la production et de la consommation instantanée.

Ce milieu de la Baie des Veys très riche permet donc à ces animaux d'emmagasiner plus d'énergie lors des blooms printaniers, de développer plus de tissu gonadique, de conserver plus d'énergie (glucides et CEA) pendant la gamétogenèse et de grandir en même temps d'où la différence importante de masse de gonade observée. Au contraire, les huîtres placés à Marennes-Oléron ont une teneur en glucides et une CEA ainsi qu'une masse gonadique comparable aux huîtres nourries avec la ration de 12%. Ces différences entre les huîtres des trois sites (Argenton, Baie des Veys et Marennes-Oléron) ne découlent pas d'une différence génétique, puisqu'il s'agit du même pool d'huître. Par conséquent, il s'agit d'une réponse adaptative des huîtres à leur milieu (Ernande, 2001).

I. 2. Variation des paramètres énergétiques au cours du cycle de reproduction

Au cours d'un cycle de reproduction, les paramètres énergétiques des huîtres varient selon trois phases (1) stockage de réserves pendant la phase automnale, (2) consommation des réserves stockées pendant la gamétogenèse active et (3) restauration du tissu de réserves pendant la résorption du tissu gonadique (Berthelin *et al.*, 2000 ; cf. Figure 9 page 33). Les résultats de ce travail ont été discutés essentiellement par rapport à ces trois phases.

Pendant la période de gamétogenèse active et d'augmentation de la température (Avril à Juillet), le développement du tissu gonadique s'accompagne d'une consommation en glucides pour toutes les huîtres, quel que soit leur origine et leur phénotype. Cette consommation d'énergie se répercute jusqu'au niveau cellulaire avec une diminution des valeurs de CEA, à l'exception des huîtres de la Baie des Veys. Ces dernières maintiennent leur niveau d'ATP au niveau cellulaire tout au long de l'année et ce malgré le développement du tissu gonadique. Cette consommation de glucides et de CEA associée à la gamétogenèse est en accord avec les études reportées dans la littérature (Mori *et al.*, 1965 ; Perdue & Erickson, 1984 ; Moal *et al.*, 1991a et b ; Ruiz *et al.*, 1992 ; Berthelin *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2000). Il est intéressant de souligner que les paramètres énergétiques mesurés sont le reflet des stocks au sein de l'animal à un moment donné et ne reflètent pas les flux de transfert d'énergie d'un compartiment vers un autre. Aussi, bien que la ration alimentaire de 12% ait permis aux huîtres de stocker initialement plus d'énergie et que la vitesse de consommation des réserves énergétiques pendant la gamétogenèse active de ces huîtres soit comparable à celles des huîtres nourries avec la ration de 4%, la consommation des réserves n'est pas représentative du flux d'énergie alloué au développement de la gonade. Celui-ci serait plus important pour les huîtres de la condition nutritive 12%. Ceci pourrait expliquer le fait que le bilan énergétique pour la croissance (Scope for Growth, SFG) de ces huîtres soit très négatif en Juillet par rapport à celui des huîtres nourries avec la ration de 4% (Enriquez-Diaz, 2004).

Le développement du tissu gonadique se traduit aussi en terme de composition lipidique par une accumulation de lipides (Gabbott, 1983 ; Ruiz *et al.*, 1992 ; Frolov & Pankov, 1992 ; Berthelin *et al.*, 2000). Ainsi, en conditions expérimentales, les huîtres nourries avec la ration de 12% et de phénotype « S », qui développent plus de tissu gonadique (Coquard, 2003 ; Enriquez-Diaz, 2004), présentent les taux de lipides les plus élevés par rapport à celles nourries à 4% ou de phénotype « R ». Dans le milieu naturel, la teneur en

lipides des huîtres est similaire quel que soit le site d'origine. Il faudrait pouvoir exprimer les résultats par rapport au poids sec de chair des huîtres pour rendre compte de la différence d'effort de reproduction des huîtres selon leurs origines. Cependant, les résultats de Enriquez-Diaz (2004) démontrent bien que les huîtres de Baie des Veys ont développé trois fois plus de gonade.

En Juillet-Août, lorsque les huîtres sont matures, l'ensemble des réserves énergétiques des huîtres est au plus bas. Les faibles valeurs de CEA des huîtres de l'expérimentation GIGAREPRO 1 et de Marennes-Oléron indiquent qu'elles sont physiologiquement très affaiblies, voire dans une situation de stress (Ivanovici, 1980). Ces résultats corroborent ceux de Soletchnik *et al.* (1997) concernant le coût énergétique de la reproduction, qui s'amplifie quand la température augmente.

Finalement, après l'été, pendant la résorption du tissu gonadique et de la restauration du tissu de réserves, les huîtres restaurent l'ensemble des compartiments énergétiques quelle que soit leur origine (glucides et CEA). L'énergie disponible est de nouveau allouée à la mise en place des réserves et à la croissance. Plus les huîtres reçoivent d'énergie, plus elles investissent cette énergie dans la mise en place de réserves et dans la croissance (index de condition, poids sec de chair). Ainsi, le poids sec des chairs entre les huîtres nourries en conditions expérimentales de façon constante tout au long de l'année augmente proportionnellement avec les rations de 4% et 12%, et s'accroît pour être le plus fort à la fin de l'expérimentation.

Pour conclure, pendant la gamétogenèse active, l'excédent d'énergie apporté par la ration alimentaire de 12% est systématiquement investi dans le développement d'une gonade plus volumineuse. La reproduction a un coût énergétique qui se traduit par une baisse des stocks en glucides et même de CEA et qui n'est pas couvert par la nutrition quelle que soit l'expérimentation (GIGAREPROs) ou le site (Baie des Veys, Marennes-Oléron). Les demandes énergétiques se développent principalement de Mars à Juillet en même temps que la gamétogenèse active et s'amplifient avec l'augmentation de la température. Après le mois d'Août, le cycle s'inverse, l'énergie redevient disponible, ce qui se traduit par un stockage proportionnel à la quantité de nourriture fournie.

I. 3. Effet de la qualité de la nourriture sur les paramètres énergétiques

La qualité de la nourriture influence aussi les paramètres énergétiques des huîtres. Deux effets se confondent : l'effet de la valeur énergétique des algues constituant les régimes algaux et la qualité lipidique de ces algues (Frolov & Pankov, 1992). Cependant, dans notre étude, ces effets n'ont pu être que partiellement distingués. Aussi, une alimentation enrichie en diatomées (ALGUES, GIGAREPRO 2, Baie des Veys), enrichie en 20:5(n-3) et 20:4(n-6), améliore les indices physiologiques des huîtres : indice de condition, poids sec de chairs, teneur en glucides et lipides, et CEA. Ceci est en accord avec les résultats de Knuckey *et al.* (2002). Ces auteurs ont démontré que l'incorporation d'une diatomée dans un régime alimentaire initialement constitué des algues *T-Iso* et *Pavlova lutheri* a augmenté le potentiel nutritionnel de ce régime algal avec une augmentation significative des différents compartiments biochimiques du naissain d'huîtres *C. gigas* (taux de glucides, protéines, lipides, et pourcentages de cendres). Ceci s'explique en partie par le fait que les diatomées apportent entre autre du 20:5(n-3) et du cholestérol qui sont indispensables à la croissance des bivalves marins (Soudant, 1995 ; Soudant *et al.*, 1998b ; Muller-Feuga *et al.*, 2003).

I. 4. Paramètres énergétiques et mortalités estivales

Dans le cadre du programme MOREST, la reproduction des huîtres est un élément central dans les épisodes de mortalités estivales. Un des objectifs de ce travail a été de déterminer si la déficience énergétique associée à la reproduction pouvait être comblée par un apport quantitatif de nourriture plus important et si cette déficience énergétique pouvait être impliqués dans les mortalités.

Les résultats présentés dans ce travail soulignent que la quantité de nourriture mise à disposition des huîtres influence principalement l'intensité de reproduction. L'excédent d'énergie apporté par la ration alimentaire de 12% est investi dans le développement d'une gonade plus volumineuse par rapport aux huîtres nourries avec la ration de 4% au détriment des réserves énergétiques. Par conséquent, la nutrition ne permet donc pas de couvrir le coût de la reproduction des huîtres malgré les quantités de nourriture fournies.

Au regard des mortalités estivales, la faiblesse physiologique des huîtres associée au développement coûteux du tissu gonadique ne semble toutefois pas être une cause suffisante pour entraîner des mortalités. En effet, aucune mortalité anormale n'a été observée lors de

l'expérimentation GIGAREPRO 1 et ce bien que les huîtres présentaient de très faibles valeurs de CEA indiquant un stress physiologique selon la table d'Ivanovici (1980). A l'inverse, bien que les huîtres de la Baie des Veys aient un statut énergétique très élevé, celles-ci sont néanmoins affectées par des mortalités. Aussi, il semblerait qu'un facteur déclenchant soit nécessaire comme le montrent les travaux du programme Morest.(stress sédimentaire, présence d'un pathogène ..) pour entraîner les mortalités. Lorsque ce stress existe et occasionne des mortalités (GIGAREPRO 2), les huîtres qui ont investi plus d'énergie dans la reproduction et qui présentent des pontes partielles se révèlent les plus sensibles. Par conséquent, la quantité de nourriture fournie aux huîtres influence positivement l'effort de reproduction des huîtres (Enriquez-Diaz, 2004), mais elle les rend en même temps plus sensibles aux mortalités lors de l'application d'un stress. La présence de la gonade semble être un facteur « handicapant » pour la survie ultérieure des huîtres. Il est supposé que cette gonade pourrait être une porte d'accès au sein de l'organisme, notamment pour les huîtres qui ont des pontes partielles. Dans ces conditions, les huîtres qui développent de petites gonades (4%, « R ») et pondent complètement ou les huîtres triploïdes sont avantagées.

II. NUTRITION ET PARAMETRES HEMOCYTAIRES

Parallèlement au suivi des paramètres énergétiques, la modulation des paramètres hématologiques des huîtres par la nourriture et au cours d'un cycle de reproduction a été étudié. Dans le cadre du programme MOREST, l'objectif a été de caractériser le système immunitaire des huîtres au cours d'un cycle de reproduction et de déterminer si le déficit énergétique engendré par la reproduction pouvait affecter les fonctions de défenses de l'organisme.

II. 1. Effet de la quantité de nourriture sur les paramètres hématologiques

La quantité de nourriture affecte directement quelques paramètres hématologiques des huîtres parmi ceux mesurés. La concentration hématologique, et en particulier la concentration en hyalinocytes, est positivement influencée par la quantité de nourriture. Ainsi, les huîtres nourries avec la ration de 12% présentent une concentration hématologique significativement supérieure à celles nourries avec la ration de 4%. Cette différence est faible pendant la période de gamétogenèse active (avant Juillet) et s'amplifie après. Compte tenu des résultats sur le peu d'énergie disponible pendant la gamétogenèse active, il semble que peu de différences

entre les niveaux nutritionnels (4% et 12%) puissent être observées à cette période. Au contraire, après le mois de Juillet, le nombre d'hémocytes devient plus relatif à l'énergie disponible. Similairement, les huîtres de Baie des Veys présentent aussi une concentration hémocytaire supérieure à celles de Marennes-Oléron. Il est envisageable que les différences de concentrations hémocytaires entre les huîtres des expérimentations GIGAREPROs (12% > 4%), ou BABE (Baie des Veys > Marennes-Oléron) résultent d'un gain énergétique pour les régimes alimentaires les plus riches, qui serait disponible pour le système de défense et pourraient favoriser la production d'hémocytes. Les activités hémocytaires (activité de phagocytose, production d'espèces actives de l'oxygène) semblent peu affectées par la quantité de nourriture fournies aux huîtres.

Cependant au cours de l'expérimentation GIGAREPRO 1, une différence inverse à la quantité de nourriture a été observée pour l'activité de phagocytose des huîtres nourries avec la ration de 12%. Celles-ci présentent une plus faible activité de phagocytose par rapport à celles nourries avec la ration de 4%. Similairement, les huîtres placées en Baie des Veys ont aussi une activité de phagocytose plus faible. Les différences semblent être liées à l'effort de reproduction des huîtres. Les huîtres qui ont investi plus d'énergie dans la reproduction ont les taux de phagocytose les plus faibles (12%, Baie des Veys). De façon comparable, Soletchnik *et al.* (en préparation) et Gagnaire *et al.* (en préparation) ont mis en évidence une plus forte activité de phagocytose pour les hémocytes d'huîtres triploïdes par rapport à des huîtres diploïdes. Les auteurs supposent que cette différence d'activité de phagocytose entre les huîtres triploïdes et diploïdes résulte d'une allocation différentielle de l'énergie disponible entre les huîtres. Les huîtres triploïdes pourraient investir plus d'énergie dans l'activité de phagocytose car elles n'investissent pas d'énergie dans la reproduction. Aussi, pour clarifier l'effet de la quantité de nourriture sur les fonctions hémocytaires, il serait intéressant de tester l'effet de différentes rations alimentaires avec des huîtres triploïdes, qui ont l'avantage d'investir peu à pas d'énergie dans la production de gamètes.

II. 2. Variation des paramètres hémocytaires au cours du cycle de reproduction

Les expérimentations GIGAREPROs nous ont aussi permis de suivre la modulation des paramètres hémocytaires au cours du cycle de reproduction. Tout d'abord, il a pu être démontré que les concentrations hémocytaires varient tout comme les paramètres énergétiques selon deux grandes phases : une première phase associée à la consommation des

réserves stockées pendant la gamétogenèse active, et une seconde concomitante avec la restauration du tissu de réserves et la résorption du tissu gonadique.

Ainsi, au cours de la gamétogenèse active, les huîtres qui ont les plus fortes concentrations hémocytaires sont celles qui développent une plus grosse gonade (12%, « S », Baie des Veys). De ce fait, il a été supposé un effet trophique direct sur la concentration d'hémocytes, ou bien indirect via leur implication dans la gonadogenèse. Il est possible en effet ces huîtres nécessitent plus d'hémocytes pour le transport de nutriments vers la gonade. C'est la première fois que cette hypothèse est avancée ; toutefois, l'implication des hémocytes dans la mise en place de la gonade est envisageable. En effet, il est souvent reporté dans la littérature que les hémocytes ont diverses fonctions, dont celle de transport de nutriments de la glande digestive vers les tissus périphériques plus profonds tel que le muscle (Yonge, 1926 ; Feng *et al.*, 1977 ; Cheng, 1996). Aussi, les hémocytes pourraient aider à la mise en place de la gonade par le transport des nutriments et de l'énergie nécessaire à ce processus. A la fin de la période estivale, les huîtres, qui ont eu plus d'énergie disponible à allouer dans le développement du tissu gonadique, ne pondent que partiellement (Enriquez-Diaz, 2004). De nombreux gamètes résiduels restent présents dans le tissu gonadique de ces huîtres en Septembre-Octobre. Parallèlement, à cette période, une forte augmentation des concentrations hémocytaires est observée, notamment pour les huîtres conditionnées à Argenton (GIGAREPROs). Mathieu *et al.* (2003) constatent aussi une infiltration hémocytaire au niveau du tissu gonadique d'huîtres de Baie des Veys. Par conséquent, l'augmentation des concentrations observées en Septembre-Octobre serait probablement liée à la nouvelle disponibilité d'énergie libérée après la forte demande de la gonadogenèse et/ou à la nécessité pour ces huîtres d'avoir plus d'hémocytes pour la phagocytose des gamètes résiduels. Cette implication des hémocytes que ce soit dans le transport de nutriments vers la gonade ou dans la résorption des gamètes est à vérifier. Elle souligne aussi la probable multi-fonctionnalité des hémocytes.

De plus, les expérimentations GIGAREPROs ont permis de mettre en évidence un phénomène d'inhibition temporaire de l'activité de phagocytose et de la capacité d'adhésion des hémocytes pendant la période de la gamétogenèse active des huîtres (Mai-Juin). Le même phénomène a aussi été reporté pour l'activité de phagocytose d'huîtres triploïdes à la même période (Soletchnik *et al.*, en préparation). Le fait d'observer ce phénomène à la même période laisser penser que ce changement pourrait être lié à un changement hormonal à cette

période. En effet, Yamaguchi *et al.* (2001) et Watanuki *et al.* (2002) ont démontré *in vitro* une inhibition de l'activité de phagocytose des macrophages de carpe *Cyprinus carpio* par les oestradiols. Un tel contrôle n'a pas encore été démontré chez l'huître et encore moins ses conséquences sur la modulation des paramètres hémycytaires.

Finalement, la production des espèces actives de l'oxygène (ROS) par les hémocytes n'est pas clairement corrélée ni à la quantité de nourriture, ni au cycle de reproduction des huîtres ni même avec l'activité de phagocytose. Cependant, au début de la gamétogenèse (Mai-Juin), des différences de production de ROS permettent de distinguer les huîtres selon leur phénotype « R » et « S ». Il est possible qu'à cette période ces huîtres « R » et « S » présentent un métabolisme différent ou que des enzymes de détoxification des ROS aient été sélectionnées en parallèle du critère de « survie » des huîtres. Il est difficile de comprendre pourquoi cette différence de production de ROS s'exprime à cette période là. Une autre hypothèse serait qu'à cette période, une pression bactérienne existerait déjà avec une infection sélective des huîtres « S ». A ce jour, il est difficile de conclure sur l'origine et la signification biologique de cette différence de production de ROS entre les huîtres « R » et « S ».

II. 3. Paramètres hémocytaires et mortalités estivales

Dans le cadre du programme MOREST, un des objectifs de ce travail a aussi été de déterminer si le déficit énergétique engendré par la reproduction pouvait affecter les fonctions de défenses de l'organisme. L'hypothèse d'une déficience immunitaire associée à la déficience énergétique engendrée par la reproduction avait été avancée.

Le suivi des paramètres hémocytaires au cours de l'expérimentation GIGAREPRO 2 nous a permis d'étudier les variations des paramètres hémocytaires des huîtres lors d'un épisode de mortalités et à une période où les huîtres sont énergétiquement affaiblies (Juillet 2003). En Juillet 2003, une recrudescence de mortalités, initialement associées à la présence de *Vibrio aestuarianus*, est observée. A la même période, les concentrations hémocytaires (granulocytes et hyalinocytes) des huîtres ont significativement augmenté. D'après la littérature, cette forte augmentation laisse supposer une réponse à une infection bactérienne (Ford *et al.*, 1993 ; Paillard *et al.*, 1996 ; Oubella *et al.*, 1996 ; Carballal *et al.*, 1998 ; Ordas *et al.*, 2000). Les huîtres les plus affectées par les mortalités, c'est-à-dire celles qui ont développé plus de tissu gonadique et eu des pontes partielles, ont une concentration hémocytaires plus élevée (12% > 4%, et « S » > « R »). Aussi, il semblerait que les huîtres

soient capable malgré leur faiblesse énergétique de mobiliser leur hémocytes ou d'en produire pour faire face à l'infection. De plus, les hémocytes présentent des activités de phagocytose et de production de ROS élevées. Ces fonctions dites de défense ne semblent pas être influencées par la faiblesse énergétique des huîtres, ni par la quantité de nourriture et ni par le phénotype des huîtres. Néanmoins, les hémocytes sont plus sensibles *in vitro* à des conditions stressantes puisqu'on observe une perte de la capacité d'adhésion des hémocytes en présence du *Vibrio* sp. 322 au moment des mortalités. Ceci souligne une certaine faiblesse des hémocytes pour faire face à ce *Vibrio* sp. 322 et par extension pour contrer une infection « naturelle ».

II. 4. Effet de la qualité lipidique de la nourriture sur les paramètres hémocytaires

La qualité lipidique de l'alimentation des huîtres, et notamment la composition en acide gras des algues, influence aussi les paramètres hémocytaires des huîtres.

Ainsi, il a pu être démontré que les huîtres nourries avec l'algue *C. calcitrans*, T-*Iso* supplémentée avec 50% d'émulsion lipidique (riche en 20:5(n-3)) ou T-*Iso* supplémentée avec les solutions d'acide arachidonique (0.25 et 0.41 µg AA /ml) présentent les plus fortes concentrations hémocytaires à la fin des conditionnements. Ces plus fortes concentrations ont été reliées à des taux forts en 20:4(n-6) et en 20:5(n-3) dans les membranes des huîtres et à une diminution du 22:6(n-3) et du ratio (n-3)/(n-6). Ce type de réponses fait penser au rôle immunodépresseur des acides gras de la série (n-3) sur la prolifération des lymphocytes observé chez les vertébrés supérieurs (cf. les revues de De Pablo & Alvarez de Cienfuegos, 2000 ; Calder, 2001 ; De Pablo *et al.*, 2002).

En ce qui concerne l'activité de phagocytose, les résultats des expérimentations « qualité » montrent que l'activité de phagocytose peut être temporairement affectée par les changements de composition en acides gras des huîtres nourries avec les différents régimes (ALGUES, EPA, AA). A partir de ces expérimentations, différentes corrélations ont pu être établies. Ainsi, l'incorporation de 20:4(n-6) dans les membranes des huîtres a un effet positif sur l'activité de phagocytose des hémocytes des huîtres. Cette relation est très intéressante puisque chez les insectes, la nodulation est positivement affecté par cet acide gras (Stanley-Samuelson & Pedibhotla, 1996 ; Stanley-Samuelson *et al.*, 1997 ; Mandato *et al.*, 1997 ; Dean

et al., 2002; Lavine & Strand, 2002 ; Tunaz *et al.*, 2003). De plus, l'implication du 20:4(n-6) et de ses métabolites dans le processus de phagocytose a été démontré chez les vertébrés supérieurs (Lennartz, 1999).

A l'inverse, les fortes proportions en 20:5(n-3) dans les membranes des huîtres semblent avoir un effet inhibiteur sur l'activité de phagocytose. Un tel effet du 20:5(n-3) a déjà été observé sur diverses cellules du système immunitaire chez les vertébrés (Virella *et al.*, 1989 ; Sipka *et al.*, 1996 ; Peterson *et al.*, 1998 ; Thies *et al.*, 2001 ; Kew *et al.*, 2004). Aussi, le 20:5(n-3) pourrait en rentrer en compétition avec l'effet du 20:4(n-6) dans la cascade des processus lié à la phagocytose d'une particule étrangère, et donc inhiber temporairement cette activité. Par conséquent, les apports conjugués de 20:5(n-3) et 20:4(n-6) par les diatomées pourraient donc avoir des effets antagonistes. Ceci pourrait expliquer en partie l'absence d'effet de l'apport de diatomées en régime monospécifique (*C. calcitrans*) ou en addition d'un régime d'algue (GIGAREPRO 2) sur la phagocytose. Aussi, comme le souligne Horrobin *et al.* (2002) et Harbige (2003), un ratio (n-3)/(n-6), et peut être plus spécifiquement un ratio 20:5(n-3)/20:4(n-6), pourrait exister et réguler cette fonction hémocytaire.

De la même manière, la production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) est aussi affectée par la qualité lipidique de l'alimentation. La forte incorporation de 20:4(n-6) dans les membranes semble avoir permis d'augmenter la mise à disposition de cet acide gras pour la production d'eicosanoïdes et l'activation de la NADPH-oxydase. Au contraire, le 20:5(n-3) semble avoir quand à lui un effet négatif sur la production de ROS. Les effets opposés relevés sur le rôle du 20:4(n-6) et 20:5(n-3) laisse suggérer que ces deux acides gras n'ont pas les mêmes fonctions au sein de membranes des huîtres. Le 20:4(n-6) aurait une action directe sur la production d'eicosanoïdes et la stimulation de la NADPH-oxydase peut être de façon similaire à ce qui est observé chez les vertébrés supérieurs (Lennartz, 1999 ; Calder, 2001). Le 20:5(n-3) aurait quant à lui un effet soit indirect, lié à la structure des membranes, soit direct, lié à la compétitivité entre cet acide gras et le 20:4(n-6) pour les enzymes de certaines voies métaboliques comme la production des eicosanoïdes.

Grâce à la nouvelle technique de supplémentation mise au point par Séguineau *et al.* (en préparation), il serait maintenant intéressant de préciser le rôle de ces deux acides gras sur un même pool d'huître et d'étudier les effets combinés de ces deux acides gras ; mais aussi tester l'effet de chacun des acides gras couplé avec le cycle de reproduction des huîtres ou tout autre facteur (température, infection) afin de mieux appréhender ce qui se passe *in situ*.

En effet, même si le rôle des acides gras restent à mieux préciser, les résultats de ce travail soulignent l'importance de la qualité lipidique sur la modulation des paramètres hématocytaires des huîtres. Aussi, la composition des blooms phytoplanctoniques qui ont lieu dans le milieu naturel peut avoir un impact non négligeable sur l'état physiologique des huîtres et sur leur survie ultérieure.

Perspectives

Ce travail nous a permis de mettre en évidence l'implication de la nourriture, tant la quantité que la qualité lipidique de cette nourriture, sur les paramètres physiologiques (reproduction, énergie et paramètres hématocytaires) des huîtres.

Cependant, d'autres études sont encore nécessaires afin de mieux discriminer les fonctions de défense et de nutrition des hématocytes notamment pendant le cycle de reproduction des huîtres.

Il serait aussi intéressant de faire un suivi plus complet des paramètres hématocytaires d'huîtres triploïdes qui n'investissent pas d'énergie dans la reproduction afin de mieux comprendre l'impact de la reproduction et voir à déterminer le rôle de certaines hormones sur l'évolution des paramètres hématocytaires.

L'utilisation des familles MOREST a permis de mettre en évidence des différences de production d'espèces actives de l'oxygène entre les huîtres de phénotype « R » et celles de phénotype « S ». Cependant pour mieux appréhender ces différences et leur signification, il est envisagé de coupler notre mesure de production des ROS avec des mesures d'activité de diverses enzymes impliquées dans ce processus de production des ROS par les hématocytes : estérase, catalase, superoxyde dismutase, glutathione peroxydase.

Pour finir, la nouvelle technique de supplémentation devrait permettre de tester spécifiquement les effets combinés de différents acides gras sur les paramètres hématocytaires sur un même pool d'huître et aussi de pouvoir combiner ces effets avec tout autre facteur environnemental.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

- Abad, M., Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G. & Sanchez, J.L., 1995. Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oysters, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Comp. Biochem. Physiol.*, (110 C) 109-118.
- Albentosa, M., Perez-camacho, A., Labarta, U., Beiras, R. & Fernandez-Reiriz, M.J., 1993. Nutritional value of algal diets to clam spat *Venerupis pullastra*. *Mar. Ecol. Prog. Series.* (97) 261-269.
- Albentosa, M., Perez-Camacho, A., Labarta, U. & Fernandez-Reiriz, M.J., 1996. Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture.* (148) 11-23.
- Alexander, J.W., 1998. Immunonutrition: the role of *w*-3 fatty acids. *Nutrition.* (14) 627-633.
- Allam, B. & Paillard, C., 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aqua. Org.*, (33) 123-128.
- Allam, B., Paillard, C. & Auffret, M., 2000. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *J. Invert. Pathol.*, (76) 63-69.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A. & Ford, S.E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Develop. Comp. Immunol.*, (25) 365-375.
- Allam, B., Ashton-alcox, K.A. & Ford, S.E., 2002. Flow cytometric measurement of hemocyte viability and phagocytic activity in the clam, *Ruditapes philippinarum*. *J. Shellfish Res.*, (21) 13-19.
- Alvarez, M.R., Friedl, F.E., Johnson, S. & Hinsch, G.W., 1989. Factors affecting *in vitro* phagocytosis by oyster hemocytes. *J. Invert. Pathol.*, (54) 233-241.
- Alvarez, M.R., Friedl, F.E., Hudson, C.M. & O'Neill, R.L., 1992. Uptake and tissue distribution of abiotic particles from the alimentary tract of the American oyster: a simulation of intracellular parasitism. *J. Invert. Pathol.*, (59) 290-294.
- Anderson, R.S., Oliver, L.M. & Bruchacher, L.L., 1992. Superoxide anion generation by *Crassostrea virginica* hemocytes as measured by nitroblue tetrazolium reduction. *J. Invert. Pathol.*, (59) 303-307.
- Anderson, R.S., 1994. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Develop. Comp. Immunol.*, (18) 89-96.
- Anderson, R.S., Burrenson, E.M. & Paynter, K.T., 1995. Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *J. Invert. Pathol.*, (66) 82-89.
- Arumugam, M., Romestand, B. & Torreilles, J., 2000a. Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aqua. Living Res.*, (13) 173-177.

Arumugam, M., Romestand, B., Torreilles, J. & Roch, P., 2000b. *In vitro* production of superoxide and nitrite oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur. J. Cell. Biol.*, (79) 513-519.

Ashton, I., Clements, K., Barrow, S.E., Secombes, C.J. & Rowley, A.F., 1994. Effects of dietary fatty acids on eicosanoid-generating capacity, fatty acid composition and chemotactic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*. (1214) 253-262.

Ashton-Alcox, K.A. & Ford, S.E., 1998. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue and Cell*. (30) 195-204.

Auffret, M., 1988. Bivalve hemocyte morphology. *Am. Fish. Soc. Special Publication*. (18) 169-177.

Auffret, M. & Oubella, R., 1995. Cytological and cytometric analysis of bivalves molluscs hemocytes, in: (Eds: Stolen, J.S., Fletcher, C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaattari, S.L., Anderson, R.S., Soderhall, K. & Weeks-Perkins, B.A.). Fair Haven: SOS Publication.

Auffret, M. & Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.*, (118 A) 705-712.

- B -

Bachère, E., Hervio, D. & Mialhe, E., 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aqua. Org.* (11) 173-180.

Bailie, M.B., Standiford, T.J., Laichalk, L.L., Coffey, M.J., Strieter, R. & Peters-Golden, M., 1996. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J. Immunol.*, 5221-5224.

Barillé, L., Haure, J., Pales-Espinosa, E. & Morançais, M., 2003. Finding new diatoms for intensive rearing of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): energy budget as a selective tool. *Aquaculture*. (217) 501-514.

Bass, D.A., Wallace Parce, J., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C. & Thomas, M., 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils : a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.*, (130) 1910-1917.

Beattie, J.H., Chew, K.K. & Hershberger, W.K., 1980. Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proceedings Nat. Shellfish. Ass.*, (70) 184-189.

Beckmann, N., Morse, M.P. & Moore, C.M., 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *J. Invert. Pathol.*, (59) 124-132.

Bell, J.G., Ashton, I., Secombes, C.J., Weitzel, B.R., Dick, J.R. & Sargent, J.R., 1995. Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids*. (54) 173-182.

- Bell, J.G., Farndale, B.M., Dick, J.R. & Sargent, J.R., 1996. Modification of membrane fatty acid composition, eicosanoid production, and phospholipase A activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) gill and kidney by dietary lipid. *Lipids*. (31) 1163-1171.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Farndale, B.M. & Sargent, J.R., 1998. Growth, mortality, tissue histopathology and fatty acid compositions, eicosanoid production and response to stress, in juvenile turbot fed diets rich in *alpha*-linolenic acid in combination with eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids*. (58) 353-364.
- Bell, J.G. & Sargent, J.R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*. (218) 491-499.
- Bell, M.V., Henderson, R.J. & Sargent, J.R., 1985. Changes in the fatty acid composition of phospholipids from turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies. *Comp. Biochem. Physiol.*, (81 B) 193-198.
- Berntsson, K.M., Jonsson, P.R., Wängberg, S.A. & Carlsson, A.S., 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. (154) 139-153.
- Berthelin, C., Kellner, K. & Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Physiol.*, (125 B) 359-369.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, (37) 911-917.
- Bogdan, C., 1997. Of microbes, macrophages and nitrite oxide. *Berhing inst. Mitt.*, (99) 58-71.
- Borda, E.S., Tenenbaum, A., Sales, M.E., Rumi, L. & Sterin-Borda, L., 1998. Role of arachidonic acid metabolites in the action of a beta- adrenergic agonist on human monocyte phagocytosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids*. (58) 85-90.
- Boudry, P., Collet, B., Cornette, F., Hervouet, V. & Bonhomme, F., 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*. (204) 283-296.
- Bramble, L. & Anderson, R.S., 1997. Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. *Develop. Comp. Immunol.*, (21) 337-348.
- Bramble, L.H. & Anderson, R.S., 1998. A comparaison of the chemiluminescent response of *Crassostrea virginica* and *Morone saxatilis* phagocytes to zymosan and viable *Listonella anguillarum*. *Develop. Comp. Immunol.*, (22) 55-61.
- Brock, T.G., McNish, R.W., Mancuso, P., Coffey, M.J. & Peters-Golden, M., 2003. Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. (71) 131-145.
- Brown, M.R., McCausland, M.A. & Kowalski, K., 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*. (165) 281-293.

Brown, M.R., 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture, in: *Avances en nutrición acuícola*. (Eds: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N.).

Bunde, T.A. & Fried, M., 1978. The uptake of dissolved free fatty acids from seawater by a marine filter feeder, *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, (60 A) 139-144.

Burke, J.R., Davern, L.B., Gregor, K.R. & Tramposch, K.M., 1997. Leukotrienes B4 stimulates the release of arachidonate in human neutrophils via the action of cytosolic phospholipase A2. *Biochem. Biophys. Acta.* (1359) 80-88.

- C -

Caers, M., Coutteau, P. & Sorgeloos, P., 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture*. (170) 307-322.

Caers, M., Coutteau, P. & Sorgeloos, P., 2000. Incorporation of different fatty acids, supplied as emulsions or liposomes, in the polar and neutral lipids of *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*. (186) 157-171.

Caers, M., Utting, S.D., Coutteau, P., Millican, P.F. & Sorgeloos, P., 2002. Impact of the supplementation of a docosahexaenoic acid-rich emulsion on the reproductive output of oyster broodstock, *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* (140) 1157-1166.

Calder, P.C., 2001. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? *Nutrition Res.*, (21) 309-341.

Carballal, M.J., Lopez, C. & Villalba, A., 1997a. Hemolymph cell type of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunol.*, (7) 403-416.

Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C. & Villalba, A., 1997b. *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish and Shellfish Immunol.*, (7) 403-416.

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*. *J. Invert. Pathol.*, (72) 304-312.

Chagot, D., 1989. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vivo* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora). *Thèse de l'Ecole Pratique de Hautes Etudes*.

Chang, H.R., Dullo, A.G., Vladoianu, I.R., Piguët, P.F., Arsenijevi, D., Girardier, L. & Pechère, J.C., 1992. Fish oil decreases natural resistance of mice to infection with *Salmonella typhimurium*. *Metabolism*. (41) 1-2.

Chavez-Villalba, J., Mingant, C., Cochard, J.C. & Le Pennec, M., 2001. Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis*. (30) 1-12.

Chavez-Villalba, J., Barret, J., Mingant, C., Cochard, J.C. & Le Pennec, M., 2002. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas* : a new approach. *Aquaculture*. (210) 171-186.

- Cheney, D.P., MacDonald, B.F. & 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., Rodrick, G.E., Foley, D.A. & Koehler, S.A., 1975. Release of lysozyme from haemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *J. Invert. Pathol.*, (25) 261-266.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves, in: Invertebrate blood cells. (Eds: Ratcliff, N.A. & Rowley, A.F.). Academic Press. 223-300.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes : forms and functions, in: The eastern oyster *Crassostrea virginica*. (Eds: Newell, R.I.E., Kennedy, V.S. & Eble, A.F.). Maryland Sea Grant College. 299-329.
- Chim, L., Lemaire, P., Delaporte, M., Le Moullac, G., Galois, R. & Martin, J.L.M., 2001. Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defences and the resistance of Penaeid prawns to environmental stress? *Aquaculture Res.*, (32) 91-94.
- Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J.L. & Paillard, C., 2003. Reduction of adhesion properties on *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis. Aqua. Org.*, (57) 109-116.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense Mechanisms of Marine Bivalves. *Mar. Biotech.*, 1-42.
- Chu, F.L.E. & Webb, K.L., 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids*. (19) 815-820.
- Chu, F.-L.E. & Greaves, J., 1991. Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* (110) 229-236.
- Chu, F.L.E. & La Peyre, J., 1993. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica* : temperature effects. *Dis. Aqua. Org.*, (16) 223-234.
- Chu, F.L.E., Volety, A.K. & La Peyre, J., 1995. Annual variation of hemolymph components and *Perkinsus marinus* infection in oysters sampled from Deep Water Shoal, James River, Virginia. *J. Shellfish Res.*, (14) 263.
- Chu, F.L.E., Volety, A.K., Hale, R.C. & Huang, Y., 2002. Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field - contaminated sediments. *Mar. Env. Res.*, (53) 17-35.
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G. & Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish and Shellfish Immunol.*, (10) 677-693.
- Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabaudan, J. & Deschaux, P., 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. *Fish and Shellfish Immunol.*, (11) 1-13.
- 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*. *J. Invert. Pathol.*, (83) 23-30.
- Collyer, D.M., 1957. Viability and glycogen reserves in the newly liberated larvae of *Ostrea edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, (36) 335-337.

Comps, M., Bonami, J.R., Vago, C. & Razet, D., 1976. La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *Science et Pêche, Pêche maritime*. (256) 13-15.

Coquard, E., 2003. Etudes des différences de gamétogenèse, d'écophysiologie et de bioénergétique de deux lignées génétiques d'huître creuse, *Crassostrea gigas* : Implication dans le phénomène des mortalités estivales. *Mémoire de fins d'études du DU science de la mer. Université de Bretagne Occidentale*.

Coutteau, P., Castell, J.D., Ackman, R.G. & Sorgeloos, P., 1996. The use of lipid emulsions as carriers for essential fatty acid in bivalves: A test case with juvenile *Placopecten magellanicus*. *J. Shellfish Res.*, (15) 259-264.

- D -

Davidson, J., Kerr, A., Guy, K. & Rotondo, D., 1998. Prostaglandin and fatty acid modulation of *Escherichia coli* O157 phagocytosis by human monocytic cells. *Immunol.*, (94) 228-234.

Dean, P., Gadsden, J.C., Richards, E.H., Edwards, J.P., Keith Charnley, A. & Reynolds, S.E., 2002. Modulation by eicosanoid biosynthesis inhibitors of immune responses by the insect *Manduca sexta* to the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* (79) 93-101

De Moreno, J.E.A., Moreno, V.J. & Brenner, R.R., 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides* : 2-Polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids*. (11) 561-566.

De Pablo, M.A., Ortega, E., Gallego, A.M., Alvarez, C., Pancorbo, P.L. & Alvarez de Cienfuegos, G., 1998. The effect of dietary fatty acid manipulation on phagocytic activity and cytokine production by peritoneal cells from Balb/c Mice. *J. Nut. Sc. Vitaminol.*, (44) 57-67.

De Pablo, M.A. & Alvarez de Cienfuegos, G., 2000. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol. Cell Biol.*, (78) 31-39.

De Pablo, M.A., Puertollano, M.A. & Alvarez de Cienfuegos, G., 2000a. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, (29) 323-328.

De Pablo, M.A., Puertollano, M.A., Galvez, A., Ortega, E., Gaforio, J.J. & Alvarez de Cienfuegos, G., 2000b. Determination of natural resistance of mice fed dietary lipids to experimental infection induced by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, (27) 127-133.

De Pablo, M.A., Puertollano, M.A. & Alvarez de Cienfuegos, G., 2002. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. *Clinic. Diagnostic Lab. Immunol.*, (9) 945-950.

Dégremont, L., 2003. Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de l'Université de Caen*.

Delaporte, M., 2001. Etude de la qualité lipidique du régime nutritif sur la composition des membranes des hémocytes de *C. gigas*. Impact sur les capacités de défense. *Mémoire de fin d'études du DEA de Biologie et Productions animales. Université de Rennes 1*.

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C. & Samain, J.-F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalves species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.*, (206) 3053-3064.

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Kraffe, E., Marty, Y. & Samain, J.F., in revision. Incorporation and modification of dietary fatty acids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comp. biochem. Physiol.*

Delaunay, F., 1992. Nutrition lipidique de la coquille saint Jacques *Pecten maximus* (L.) au cours du développement larvaire. *Thèse de l'Université de Bretagne occidentale*.

Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. & Samain, J.F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (173) 163-179.

Deslous Paoli, J.M. & Héral, M., 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes - Oléron. *Aqua. Living Res.*, (1) 239-249.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, (28) 350-356.

Dyerberg, J., Bang, H.O. & Hjerne, N., 1975. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am. J. Clinic. Nut.*, (28) 958-66.

- E -

Eder, K., Reichlmayr-Lais, A.M. & Kirchgessner, M., 1992. Simultaneous determination of amounts of major phospholipid classes and their fatty acid composition in erythrocyte membranes using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J. Chromato.*, (598) 33-42.

Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. & Castell, J.D., 1986. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (96) 1-13.

Enriquez-Diaz, M., 2004. Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale*.

Epifanio, C.E., 1979. Growth in bivalve molluscs: Nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture*. (18) 1-12.

Ernande, B., 2001. Développement, plasticité phénotypique et évolution. *Thèse de l'Université de La Rochelle*

- F -

Fabioux, C., 2004. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. *Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale*.

FAO, 2003. Aquaculture production: quantities 1950-2001. *Fishstat plus*.

FAO, 2003. Aquaculture production: values 1984-2001. *Fishstat plus*.

Farias, A., Bell, J.G., Uriarte, I. & Sargent, J.R., 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae : effects of diet and temperature. *Aquaculture*. (228) 289-305.

Farndale, B.M., Bell, J.G., Bruce, M.P., Bromage, N.R., Oyen, F., Zanuy, S. & Sargent, J.R., 1999. Dietary lipid composition affects blood leucocyte fatty acid compositions and plasma eicosanoid concentrations in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. (179) 335-350.

Feng, S.Y., Feng, J.S. & Yamasu, T., 1977. Role of *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* blood cells in defense and nutrition. *Comparative Pathobiology*. (3) 31-67.

Fernandez-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M. & Perez-camacho, A., 1998. Effect of microalgal diets and commercial wheatgerm flours on the lipid profile of *Ruditapes decussatus* spat. *Comp. Biochem. Physiol.*, (124 B) 369-377.

Fernandez-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M. & Perez-Camacho, A., 1999. Lipid profile and growth of the clam spat, *Ruditapes decussatus* (L), fed with microalgal diets and cornstarch. *Comp. Biochem. Physiol.*, (124 B) 309-318.

Ferroni, P., Basili, S., Falco, A. & Davi, G., 2004. Inflammation, insulin resistance, and obesity. *Curr. Atheroscler. Rep.*, (6) 424-431.

Fisher, M., Levine, P.H., Weiner, B.H., Johnson, M.H., Doyle, E.M., Ellis, P.A. & Hoogasian, J.J., 1990. Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte-enriched preparation of leukocytes. *Am. J. Clinic. Nut.*, (51) 804-808.

Fisher, W.S., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes, in: Immunity in invertebrates. (Eds: Brehelin, M.). Heidelberg: Springer Verlag. 25-35.

Fisher, W.S., Chintala, M.M. & Moline, M.A., 1989. Annual variation of estuarine and oceanic oyster *Crassostrea virginica* Gmelin hemocyte capacity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (127) 105-120.

Fisher, W.S., Oliver, L.M. & Edwards, P., 1996. Hematologic and serologic variability of Eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. *J. Shellfish Res.*, (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. *Aqua. Toxicol.*, (51) 115-138.

Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T. & Volety, A.K., 2003. Stimulation of defense factors for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. *Aqua. Toxicol.*, (64) 375-391.

Ford, S.E. & Ashton-Alcox, K.A., 1993. A comparison of methods for identifying molluscan hemocytes. *J. Shellfish Res.*, (12) 154.

Ford, S.E., Ashton-Alcox, K.A. & Kanaley, S.A., 1993a. *In vitro* interactions between bivalve hemocytes and the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Aquaculture*. (88) 285-301.

Ford, S.E., Kanaley, S.A. & Littlewood, D.T.J., 1993b. Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *J. Invert. Pathol.*, (61) 49-57.

Ford, S.E. & Tripp, M.R., 1996. Disease and defense mechanisms, in: The eastern oyster *Crassostrea virginica*. (Eds: Newell, R.I.E., Kennedy, V.S. & Eble, A.F.). Maryland Sea Grant College. 581-660.

Fracalossi, D.M. & Lowell, R.T., 1994. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture*. (98) 363-379.

Franchini, A., Fontanili, P. & Ottaviani, E., 1995. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. *Comp. Biochem. Physiol.*, (110 B) 403-407.

Freites, L., Labarta, U. & Fernandez-Reiriz, M.J., 2002. Evolution of fatty acid profiles of subtidal and rocky shore mussel seed (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk.). Influence of environmental parameters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (268) 185-204.

Fritsche, K.L., Shahbazian, L.M., Feng, C. & Berg, J.N., 1997. Dietary fish oil reduces survival and impairs bacterial clearance in C3H/He mice challenged with *Listeria monocytogenes*. *Clinical Science*. (92) 95-101.

Frolov, A.V. & Pankov, S.L., 1992. The reproduction strategy of oyster *Ostrea edulis* L. from the biochemical point of view. *Comp. Biochem. Physiol.*, (103 B) 161-182.

- G -

Gabbott, P.A., 1975. Storage cycle in marine bivalves molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen and gametogenesis., in: Proceedings 9th European Marine Biology symposium. (Eds: Barnes, H.). Aberdeen University Press. 191-211.

Gabbott, P.A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. in: The mollusca, Environmental biochemistry and physiology. (Eds: Hochachka, P.W.). Academic Press. 165-217.

Gagnaire, B., Soletchnik, P., Faury, N., Kerdudou, N., Le Moine, O. & Renault, T. A cytometric morpho-functional analysis of the hemocytes in the Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in two contrasted field environments. I - Effects of sampling date and oyster group. *submitted to Fish & Shellfish Immunol*.

Gatsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica*. in: *Fisheries bulletin*. p. 480.

Gay, M., Lancelot, G., Chollet, B., Renault, T., Cochenec-Laureau, N., Berthe, F., Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C., Gouy, M., Le Roux, F. & Gouletquer, P., 2003. Characterization of *Vibrio* isolated from Pacific oysters spat suffering from summer mortality outbreaks. *J. Shellfish Res.*, (22) 331.

Genthner, F.J., Volety, A.K., Oliver, L.M. & Fisher, W.S., 1999. Factors Influencing In vitro Killing of Bacteria by Hemocytes of the eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). *Applied Env. Microbiol.*, (65) 3015-3020.

Goedken, M. & De Guise, S., 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish and Shellfish Immunol.*, (16) 539-552.

Gouletquer, P., 1997. Natural reproduction cycle of the japanese oyster *Crassostrea gigas*. La reproduction Naturelle et Contrôlée des bivalves cultivés en France. *IFREMER, Nantes*.

Gouletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N. & Taillade, S., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). (CM 1998 / CC14) p.20.

Gourdon, I., Guerin, M.C., Torreilles, J. & Roch, P., 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide*. (5) 1-6.

Greger, E.A., Drum, A.S. & Elston, R.A., 1995. Measurement of oxidative activity in hemocytes of the pacific razor clam, *Siliqua patula*, and the oyster, *Crassostrea gigas*, using lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence. *J. Invert. Pathol.*, (65) 48-60.

Grizel, H., 1974. Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *C.R. Acad. Sc.*, (279) 783-785.

- H -

Halvorsen, D.S., Hansen, J.B., Grimsgaard, S., Bonaa, K.H., Kierulf, P. & Nordoy, A., 1997. The effect of highly purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on monocyte phagocytosis in man. *Lipids*. (32) 935-942.

Harbige, L.S., 2003. Fatty acids, the immune response , and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids*. (38) 323-341.

Haugland, R.P., 2002. Molecular Probes. Handbook of fluorescent probes and research products. (Eds: Molecular probes Inc.) Ninth Edition.

Hauton, C., Hawkins, L.E. & Hutchinson, S., 2000. The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella anguillarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system. *Comp. Biochem. Physiol.*, (127 B) 203-212.

Hégaret, H., Wikfors, G.H. & Soudant, P., 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (293) 249-265.

Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Delaporte, M., Alix, J.H., Smith, B.C., Dixon, M.S., Quere, C., Le Coz, J.R., Paillard, C., Moal, J. & Samain, J.F., 2004. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture*. (234) 541-560.

Helm, M.M. & Laing, I., 1987. Preliminary observations on the nutritional value of "Tahiti *Isochrysis*" to bivalve larvae. *Aquaculture*. (62) 281-288.

Helm, M.M., Holland, D.L., Utting, S.D. & East, J., 1991. Fatty acid of early non-feeding larvae of the european flat oyster, *Ostrea edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, (71) 691-705.

Hendriks, I.E., van Duren, L.A. & Herman, P.M.J., 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (296) 199-213.

Héral, M., 1989. L'ostéiculture française traditionnelle. (Eds: Barnabé, G.), Lavoisier.

Heras, H., Kean-Howie, J. & Ackman, R.G., 1994. The potential use of lipid microspheres as nutritional supplements for adults *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. (123) 309-322.

Hershberger, W.K., Perdue, J.A. & Beattie, J.H., 1984. Genetic selection and systematic breeding in Pacific oyster culture. *Aquaculture*. (39) 237-245.

Hervio, D., Bachère, E., Mialhe, E. & Grizel, H., 1989. Chemiluminescence responses of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* to *Bonamia ostreae*. *Develop. Comp. Immunol.*, (13) 449.

Hinsch, G.W. & Hunte, M., 1990. Ultrastructure of phagocytosis by hemocytes of the american oyster. *Pathol. Mar. Sc.*, 479-488.

Horrobin, D.F., Jenkins, K., Bennett, C.N. & Christie, W.W., 2002. Eicosapentanoic acid and arachidonic acid: collaboration and not antagonism is the key to biological understanding. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids*. (66) 83-90.

- I -

Ivanovici, A.M., 1980. The adenylate energy charge in the estuarine mollusc (*Pyrazus ebenimus*). Laboratory studies of responses to salinity and temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, (66 A) 43-45.

- J -

James, M.J., Gibson, R.A. & Cleland, L.G., 2000. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am. J. Clinic. Nut.*, (71) 343S-348S.

Jegaden, M., 2003. Production d'espèces oxygénées réactives par les hémocytes d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Mémoire de fin d'études du DEA de Biologie et Productions animales. Université de Rennes I*.

Jonsson, P.R., Berntsson, K.M., André, C. & Wänberg, S.-A., 1999. Larval growth and settlement of the European oyster (*Ostrea edulis*) as a function of food quality measured as fatty acid composition. *Mar. Biol.* (134) 559-570.

- K -

Kanaley, S.A. & Ford, S.E., 1990. Lectin binding characteristics of haemocytes and parasites in the oyster, *Crassostrea virginica*, infected with *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Parasite Immunol.*, (12) 633-646.

Kanazawa, A., Teshima, S. & Ono, K., 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, (63 B) 295-298.

Kanazawa, A., 1995. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish larvae, in: Larvi'95- Fish and shellfish larviculture Symposium. (Eds: Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I.). European Aquaculture Society. 105.

Kelley, D.S. & Bendich, A., 1996. Essential nutrients and immunologic functions. *Am. Soc. Clinic. Nut.*, (63) 994-996.

Kelley, D.S., Taylor, P.C., Nelson, G.J., Schmidt, P.C., Ferretti, A., Erickson, K.L., Yu, R., Chandra, R.K. & Mackey, B.E., 1999. Docohexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids*. (34) 317-324.

Kelley, D.S. & Rudolph, I.L., 2000. Effect of individual fatty acids of [omega]-6 and [omega]-3 type on human immune status and role of eicosanoids. *Nutrition*. (16) 143-145.

Kelley, D.S., 2001. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition Res.*, (17) 669-673.

Kew, S., Mesa, M.D., Tricon, S., Buckley, R., Minihane, A.M. & Yaqoob, P., 2004. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans¹⁻³. *Am. J. Clinic. Nut.*, (79) 674-681.

Kiron, V., Fuduka, H., Takeushi, T. & Watanabe, T., 1995. Essential fatty acids nutrition and defense in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, (111 A) 361-367.

Knauer, J. & Southgate, P.C., 1997. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. *Aquaculture*. (154) 293-303.

Knauer, J. & Southgate, P.C., 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*. (7) 241-280.

Knight, J. & Rowley, A.F., 1995. Immunoregulatory activities of eicosanoids in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol.*, (85) 389-393.

Knuckey, R.M., Brown, M.R., Barrett, S.M. & Hallegraeff, G.M., 2002. Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. (211) 253-274.

Kromman, N. & Green, A., 1980. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases. *Acta Med. Scand.*, (208) 401-406.

- L -

La Peyre, J., Chu, F.L.E. & Meyer, J.M., 1995. Hemocytic and humoral activities of Eastern and Pacific oyster following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish & Shellfish Immunol.*, (5) 179-190.

Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C. & Nicolas, J.L., in revision. *In vitro* effects of extracellular products (ECPs) from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on the oyster *Crassostrea gigas* cellular immune responses. *Develop. Comp. Immunol.*

Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cueff, A. & Poulet, S.A., 2001. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied Env. Microbiol.*, (67) 2304-2309.

Laing, I. & Millican, P.F., 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. *Aquaculture*. (54) 245-262.

- 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. Invert. Pathol.*, (71) 53-63.
- Lambert, C., Nicolas, J.L. & Bultel, V., 2001. Toxicity to bivalve hemocytes of pathogenic *Vibrio* cytoplasmic extract. *J. Invert. Pathol.*, (77) 165-172.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G. & Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry. A tool to evaluate pathogenic *Vibrio* inhibiting capacity. *Fish & Shellfish Immunol.*, (15) 225-240.
- Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J. & Samain, J.F. Modulation of reactive oxygen species (ROS) production in *Crassostrea gigas* hemocyte "oxidative burst": specific activity of granulocytes and hyalinocytes. submitted to *Develop. Comp. Immunol.*
- Lambert, C., Soudant, P., Degrémont, L., Choquet, G., Delaporte, M., Moal, J., Paillard, C., Soletchnik, P., Joly, J.P., Ropert, M., Bédier, E., Huvet, A. & Samain, J.-F. Hemocyte parameters in families of *Crassostrea gigas* reared under different environmental conditions and selected for differential survival during summer. submitted to *Fish & Shellfish Immunol.*
- Langdon, C., 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture*. (227) 259-275.
- Langdon, C.J. & Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, (61) 431-448.
- Langdon, C.J. & Siegfried, C.A., 1984. Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. *Aquaculture*. (39) 135-153.
- Langdon, C.J. & De Bevoise, A.E., 1990. Effect of microcapsule type on dietary delivery of protein to a marine suspension-feeder, the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* (105) 437-443.
- Langdon, C.J., Segueineau, C., Ponce, B., Moal, J. & Samain, J.F., 2000. Delivery of riboflavin to larval and adult pacific oysters, *Crassostrea gigas* thunberg by lipid spray beads. *J. Shellfish Res.*, (19) 129-132.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Molecular Biol.* (32) 1295-1309.
- Lawrence, D.R. & Scott, G.I., 1982. The determination and use of condition index in oyster. *Estuaries*. (5) 23-27.
- 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. *Dis. Aqua. Org.*, (11) 181-186.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L. & Berthe, F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aqua. Living Res.*, (15) 251-258.
- Lennartz, M.R., 1999. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Internat. J. Biochem. Cell Biol.*, (31) 415-430.
- Li, Q., Osada, M. & Mori, K., 2000. seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonad tissue during sexual maturation. *Fish. Sc.*, (66) 502-508.

Lie, O., Lied, E. & Lambertsen, G., 1989. Haematological values and fatty acid composition of erythrocyte phospholipids in cod (*Gadus morhua*) fed at different water temperatures. *Aquaculture*. (79) 137-144.

Lin, Y.H. & Shiau, S.Y., 2003. Dietary lipid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and effects on immune responses. *Aquaculture*. (225) 243-250.

Lingenfelser, J.T., Blazer, V.S. & Gay, J., 1995. Influence of fish oils in production catfish feeds on selected disease resistance factors. *J. Applied Aquaculture*. (5(2)) 37-48.

Lloret, S. & Moreno, J.J., 1996. Role of kinases and G-proteins on arachidonate release induced by zymosan in mouse peritoneal macrophages. *Internat. J. Biochem. Cell Biol.*, (28) 465-472.

Lopez, C., Carballal, M.J. & Bachère, E., 1994. Absence of generation of active oxygen radicals by the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: bivalvia) coupled with phagocytosis. *J. Invert. Pathol.*, (64) 188-192.

Lopez, C., Carballal, M.J., Azevedo, C. & Villalba, A., 1997a. Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Dis. Aqua. Org.*, (30) 209-215.

Lopez, C., Carballal, M.J., Azevedo, C. & Villalba, A., 1997b. Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J. Invert. Pathol.*, (69) 51-57.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 265-275.

Lubet, P., 1991. Bases biologiques de la culture des mollusques, in: Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. (Eds: Barnabé, G.). Lavoisier. 99-212.

Lucas, A. & Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*. (44) 187-200.

- M -

Male, D., 1999. Immunologie: Aide mémoire illustré, in: (Eds: De Boeck Université. 3^{ème} édition), p.129.

Mancuso, P., Standiford, T.J., Marshall, T. & Peters-Golden, M., 1998. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*. (66) 5140-5146.

Mandato, C.A., Diehl-Jones, W.L., Moore, S.J. & Downer, R.G.H., 1997. The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* (43) 1-8.

Martinez-Fernandez, E., Acosta-Salmon, H. & Rangel-Davalos, C., 2004. Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) larvae. *Aquaculture*. (230) 417-423.

Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J. & Samain, J.F., 1992. Change in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (163) 221-234.

- Mathieu, M., Dubois, B., Costil, K., Heude, C., Huvet, A., Kellner, K. & Pouvreau, S., 2003. Characterization of summer mortalities of *Crassostrea gigas* oyster in relation to physiological parameters. *J. Shellfish Res.* (22) p.343.
- Maurer, D. & Comps, M., 1986. Mortalités estivales de l'huitre *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques, in: Pathology in marine aquaculture. (Eds: Vivares, C.P., Bonami, J.R. & Jaspers, E.). European Aquaculture Society. 29-41.
- Maurer, D., Comps, M. & His, E., 1986. Caractéristiques des mortalités estivales de l'huitre *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis.* (15) 309-317.
- Mazière, C., Conte, M.A., Degonville, J., Ali, D. & Mazière, J.C., 1999. Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP1 and NF κ B. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (265) 116-122.
- McCausland, M.A., Brown, M.R., Barrett, S.M., Diemar, J.A. & Heasman, M.P., 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture.* (174) 323-342.
- McCormick-Ray, M.G. & Howard, T., 1991. Morphology and mobility of oyster hemocytes: evidence for seasonal variations. *J. Invert. Pathol.*, (58) 219-230.
- Metcalf, L.D. & Schmitz, A.A., 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, (33) 363-364.
- Meydani, S.N., Endres, S., Woods, M.M., Goldin, B.R., Soo, C., Morrill-Laborde, A., Dinarello, C. & Gorbach, S.L., 1991. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production, and lymphocyte proliferation : comparison between young, and older women. *J. Nut.*, (121) 547-555.
- Meydani, S.N., 1996. Effect of (n-3) polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function. *Nutrition.* (12) S8-S14.
- Miles, E.A., Banerjee, T., Dooper, M.M.B.W., M'Rabet, L., Graus, Y.M.F. & Calder, P.C., 2004. The influence of different combinations of alpha-linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *British J. Nut.*, (91) 893-903.
- Millican, P.F. & Helm, M.M., 1994. Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture.* (123) 83-94.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M. & Roch, P., 2000. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.*, (275) 12954-62.
- 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.
- Moal, J., Le Coz, J.R., Samain, J.F. & Daniel, J.Y., 1991a. Adenylate energy charge: a possible trophic index for management of oyster intensive aquaculture. *Comp. Biochem. Physiol.*, (100 C) 201-205.
- Moal, J., Le Coz, J.R., Samain, J.F., Daniel, J.Y. & Bodoy, A., 1991b. Oyster adenylate energy charge: response to levels of food. *Aqua. Living Res.*, (4) 133-138.
- Moal, J., Segueineau, C., Samain, J.F., Soudant, P., Cansell, M., Le Coz, J.R., Migaud, H., Sanles, M., Ponce, B. & Langdon, C., 1999. How to provide essential nutrients to bivalves in hatchery. *J. Shellfish Res.*, (332) p.18.

Moal, J., Bédier, E., Fleury, P.G., Langlade, A., LeCoguic, Y., Dégremont, L., Boudry, P., Le Coz, J.R., Pouvreau, S., Enriquez-Diaz, M., Lambert, C., Soudant, P. & Samain, J.F., 2003. Genetic variability in reproduction and summer mortality in *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.*, (22) p.345.

Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A., 1991. Nitrite oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Revue.* (43) 109-142.

Montagnani, C., 2002. Immunité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: caractérisation d'un inhibiteur de métalloprotéase et de facteurs de la voie de signalisation Rel/NF-KB. *Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie.*

Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M.J. & Izquierdo, M.S., 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture.* (225) 353-370.

Mori, K., Tamate, H., Imai, T. & Itikawa, O., 1965. Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima bay. V. Changes in the metabolism of lipids and glycogen of the oyster during the stages of sexual maturation and spawning. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, (25) 49-63.

Muller-Feuga, A., Moal, J. & Kaas, R., 2003. The microalgae of aquaculture, in: Live feeds in marine aquaculture. (Eds: Stottrup, J.G., McEvoy, L.A.). Blackwell publishing. 206-252.

- N -

Nakayama, K. & Maruyama, T., 1998. Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Develop. Comp. Immunol.*, (22) 151-159.

Napolitano, G.E., Ratnayake, W.M.N. & Ackman, R.G., 1988. Fatty acid components of larval *Ostrea edulis* (L.) : importance of triacylglycerols as a fatty acid reserve. *Comp. Biochem. Physiol.*, (90 B) 875-883.

Napolitano, G.E. & Ackman, R.G., 1993. Fatty acid dynamics in sea scallops *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791) from Georges Bank, Nova Scotia. *J. Shellfish Res.*, (12) 267-277.

Nell, J.A. & O'Connor, W.A., 1991. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis*, larvae. *Aquaculture.* (99) 277-284.

Nevejan, N., Saez, I., Gajardo, G. & Sorgeloos, P., 2003. Energy vs. essential fatty acids: what do scallop larvae (*Argopecten purpuratus*) need most? *Comp. Biochem. Physiol.* (134 B) 599-613.

Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R. & Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop (*Pecten maximus*) larval culture. *Dis. Aqua. Org.*, (27) 67-76.

Noël, D., Bachère, E. & Mialhe, E., 1993. Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Develop. Comp. Immunol.*, (22) 151-159.

Novoa, S., Martinez, D., Ojea, J., Soudant, P., Samain, J.F., Le Coz, J.R. & Rodriguez, J.L., 2002. Ingestion, digestion and assimilation of gelatin acacia microcapsules incorporating

deuterium -labeled arachidonic acid by larvae of the clam *Venerupis pullastra*. *J. Shellfish Res.*, (21) 649-658.

Numaguchi, K. & Nell, J.A., 1991. Effects of gelatin-acacia microcapsule and algal meal supplementation of algal diets on growth rates of Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley), larvae. *Aquaculture*. (94) 65-78.

- O -

O'Connor, W.A., Nell, J.A. & Diemar, J.A., 1992. The evaluation of twelve algal species as food for juvenile Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley). *Aquaculture*. (108) 277-283.

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. *Aqua. Toxicol.*, (55) 203-222.

Oliver, L.M., Fisher, W.S., Volety, A.K. & Malaeb, Z., 2003. Greater hemocyte bactericidal activity in oysters (*Crassostrea virginica*) from a relatively contaminated site in Pensacola Bay, Florida. *Aqua. Toxicol.* (64) 363-373.

Ordas, M.C., Novoa, B. & Figueras, A., 1999. Phagocytosis inhibition of clam and mussel haemocytes by *Perkinsus atlanticus* secretion products. *Fish & Shellfish Immunol.*, (9) 491-503.

Ordas, M.C., Ordas, A., Beloso, C. & Figueras, A., 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish & Shellfish Immunol.*, (10) 597-609.

Ottaviani, E., Paemen, L.R., Cedet, P. & Stefano, G.B., 1993. Evidence for nitrite oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, (248) 319-324.

Oubella, R., Maes, P., Paillard, C. & Auffret, M., 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. Aqua. Org.*, (15) 193-197.

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). *Aqua. Living Res.*, (9) 137-143.

- P -

Paillard, C., 2004. Rôle de l'environnement dans les interactions hôte-pathogène : développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Synthèse des travaux de recherche (1987-2004). *Rapport d'Habilitation à Diriger des Recherches. Université de Bretagne Occidentale*.

Paillard, C., Ashton-Alcox, K. & Ford, S.E., 1996. Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease. *Aqua. Living Res.*, (9) 145-158.

Pajot, R., Hennequart, F., Trintignac, P. & Glize, P., 1998. Etude de familles de naissains pour la compréhension de mortalités "anormales" chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Rapport SMIDAP, Nantes*. p. 36.

Parker, R.S. & Selivonchik, D.P., 1986. Uptake and metabolism of lipid vesicles from seawater by juvenile pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. (53) 215-228.

Parrish, C.C., Wells, J.S., Yang, Z. & Dabinett, P., 1998. Growth and lipid composition of scallop juveniles, *Placopecten magellanicus*, fed the flagellate *Isochrysis galbana* with varying lipid composition and the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Mar. Biol.* (133) 461-471.

Perdue, J., 1983. The relationship between the gametogenic cycle of the Pacific oyster *C. gigas* and the summer mortality phenomenon in strains of selectively bred oysters. *PhD Dissertation, University of Washington*.

Perdue, J. & Erickson, K.L., 1984. A comparison of the gametogenetic cycle between the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the suminoe oyster *Crassostrea rivularis* in Washington State. *Aquaculture*. (37) 231-237.

Perdue, J.A., Beattie, J.H. & Chew, K.K., 1981. Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington state. *J. Shellfish Res.*, (1) 9-16.

Pernet, F., Tremblay, R., Langdon, C. & Bourget, E., 2004. Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussels (*Mytilus sp.*) larvae. *Mar. Biol.* (144) 693-703.

Peterson, L.D., Jeffery, N.M., Thies, F., Sanderson, P., Newsholme, E.A. & Calder, P.C., 1998. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids*. (33) 171-180.

Pipe, R.K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Develop. Comp. Immunol.*, (16) 111-122.

Pipe, R.K., Farley, S.R. & Coles, J.A., 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.*, (289) 537-545.

Pouvreau, S., Enriquez-Diaz, M., Le Souchu, P., Connan, J.P., Le Roy, B., Mingant, C., Moal, J., Delaporte, M., Le Coz, J.R. & Samain, J.F., 2003. Reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas*: experimental approach. *J. Shellfish Res.*, (22) p.351.

Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T. & Watanabe, T., 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish & Shellfish Immunol.*, (16) 25-39.

- R -

Ringwood, A.H., Hoguet, J. & Keppler, C.J., 2002. Seasonal variation in lysosomal destabilization in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Env. Res.*, (54) 793-797.

Robert, R., Parisi, G., Rodolfi, L., Poli, B.M. & Tredici, M.R., 2001. Use of fresh preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*. (192) 333-346.

Robinson, A., 1992. Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* Kumamoto (Thunberg) : II Effects of glycogen; lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. *J. Shellfish Res.* (11) 443-447.

Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture.* (172) 125-145.

Ruiz, C., Abad, M., Sedano, L.O., Garcia-Martin, L.O. & Sanchez Lopez, J.L., 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (155) 249-262.

- S -

Sammon, A.M., 1999. Dietary linoleic acid, immune inhibition and disease. *The fellowship of postgraduate Medicine.* (75) 129-132.

Sampath, H. & Ntambi, J.M., 2004. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutrition Reviews.* (62) 333-339.

Santarem, M.M., Robledo, J.A.F. & Figueras, A., 1994. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aqua. Org.*, (18) 217-222.

Saout, C., Quéré, C., Donval, A., Paulet, Y.M. & Samain, J.F., 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest. *Aquaculture.* (172) 301-314.

Sasaki, T., Kanke, Y., Kudo, K., Nagahashi, M., Toyokawa, M., Matsuda, M., Shimizu, J. & Takita, T., 2000. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid and status of immunocompetent cells involved in innate immunity in female rats. *Ann. Nut. Metabolism.* (44) 38-42.

Schmidt, E.B., Varming, K., Moller, J.M., Bulow-Pederson, I., Madsen, P. & Dyerberg, J., 1996. No effect of a very low dose of n-3 fatty acids on monocyte function in healthy humans. *Scand. J. Clinic. Inv.*, (56) 87-92.

Scholz, U., Garcia Diaz, G., Ricque, D., Cruz Suarez, L.E., Vargas-Albores, F. & Latchford, J., 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementaiton of diets with differents yeast products. *Aquaculture.* (176) 271-283.

Secombes, C.J., Clements, K., Ashton, I. & Rowley, A.F., 1994. The effect of eicosanoids on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, leucocyte proliferation. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (42) 367-378.

Séguineau, C., Soudant, P., Moal, J., Delaporte, M., Miner, P., Quéré, C. & Samain, J.F., in preparation. New techniques for individual PUFA delivery to oyster *Crassostrea gigas* spat. A preliminary investigation.

Sheldon, W.M.J. & Blazer, V.S., 1991. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of Channel catfish macrophages. *J. Aqua. Animal Health.* (3) 87-93.

Sholz, A., Westley, R. & Tarr, M., 1973. Pacific oyster mass mortality studies; seasonal summary. *Washington Department of Fisheries.* (Report n°4) p. 30.

Soletchnik, P., Gouletquer, P., Héral, M., Razet, D. & Geairon, P., 1996. Evaluation du bilan énergétique de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en baie de Marennes-Oléron (France). *Aqua. Living Res.*, (9) 65-73.

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. *Aqua. Living Res.*, (10) 177-185.

Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P. & 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). *Aqua. Living Res.*, (12) 131-143.

Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Dégremont, L., Bédier, E., Bouget, J.F., Dubois, B., Martin, J.L., Enriquez-Diaz, M., Faury, N., Le Moine, O., Renault, T., Gagnaire, B. & Samain, J.F., 2003. Characterization of summer mortalities of *C. gigas* in France relation to environmental parameters. *J. Shellfish Res.*, (22) 354.

Soletchnik, P., Gagnaire, B., Madec, P., Geairon, P., Le Moine, O. & Renault, T. A cytometric morpho-functional analysis of the hemocytes in the Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in two contrasted field environments.- II - Searching for relationships between hemocyte parameters, sexual maturation and mortality. *submitted to Fish & Shellfish Immunol.*

Soudant, P., 1995. Les phospholipides et les stérols des géniteurs et des larves de Coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.). Relation avec la nutrition. *Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale.*

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J. & Samain, J.F., 1995. Separation of major polar lipids in *Pecten maximus* by high performance liquid chromatography and subsequent determination of their fatty acids using gas chromatography. *J. Chromato.*, (673) 15-26.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quéré, C., Le Coz, J.R. & Samain, J.F., 1996a. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture.* (143) 361-378.

Soudant, P., Moal, J., Marty, Y. & Samain, J.F., 1996b. Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (205) 149-163.

Soudant, P., Moal, J., Marty, Y. & Samain, J.F., 1997. Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.). Effect of nutrition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (215) 103-114.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Masski, H. & Samain, J.F., 1998a. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, (121 A) 279-288.

Soudant, P., Le Coz, J.R., Marty, Y., Moal, J., Robert, R. & Samain, J.F., 1998b. Incorporation of Microalgae Sterols by Scallop *Pecten maximus* (L.) Larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, (119 A) 451-457.

Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F. & Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, (123 B) 209-222.

Soudant, P., Chu, F.L.E. & Samain, J.F., 2000. Lipids requirements in some economically important marine bivalves. *J. Shellfish Res.*, (19) 605.

Soudant, P., Lambert, C., Choquet, G., Ford, S., Paillard, C., Dégremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Soletchnik, P., Joly, J.P., Ropert, M., Bédier, E., Huvet, A. & J.F., S., 2002. Relationships between summer mortalities and defence mechanisms in families of *Crassostrea gigas* reared in different environmental conditions. *J. Shellfish Res.*, (21) p. 407.

Soudant, P., Paillard, C., Choquet, G., Lambert, C., Reid, H.I., Marhic, A., Donaghy, L. & Birkbeck, T.H., 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*, = *Ruditapes*) *philippinarum*. *Aquaculture*. (229) 401-418.

Sipka, S., Dey, I., Buda, C., Csongor, J., Szegedi, G. & Farkas, T., 1996. The mechanism of inhibitory effect of eicosapentaenoic acid on phagocytic activity and chemotaxis of human neutrophil granulocytes. *Clinical Immunology and Immunopathology*. (79) 224-228.

Stanley-Samuelson, D.W. & Pedibhotla, V.K., 1996. What can we learn from prostaglandins and related eicosanoids in insects? *Insect Biochem. Molecular Biol.* (26) 223-234.

Stanley-Samuelson, D.W., Pedibhotla, V.K., Rana, R.L., Rahim, N.A.A., Hoback, W.W. & Miller, J.S., 1997. Eicosanoids mediate nodulation responses to bacterial infections in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* (118 A) 93-100.

- T -

Tafalla, C., Figueras, A. & Novoa, B., 2002a. Possible role of LTB₄ in the antiviral activity of turbot (*Scophthalmus maximus*) leukocyte-derived supernatants against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Develop. Comp. Immunol.*, (26) 283-293.

Tafalla, C., Novoa, B. & Figueras, A., 2002b. Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comp. Biochem. Physiol.*, (132 B) 423-431.

Tafalla, C., Gomez-Leon, J., Novoa, B. & Figueras, A., 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Develop. Comp. Immunol.*, (27) 197-205.

Thies, F., Miles, E.A., Nebe-von-Caron, G., Powell, J.R., Hurst, T.L., Newsholme, E.A. & Calder, P.C., 2001a. Influence of dietary supplementation with long chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids*. (36) 1183-1193.

Thies, F., Nebe-von-Caron, G., Powell, J.R., Yaqoob, P., Newsholme, E.A. & Calder, P.C., 2001b. Dietary supplementation with eicosapentanoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged >55y¹⁻³. *Am. J. Clinic. Nut.*, (73) 539-48.

Thompson, K.D., Tatner, M.F. & Henderson, R.J., 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition*. (2) 21-31.

Thompson, P.A. & Harrison, P.J., 1992. Effects of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Mar. Biol.* (113) 645-654.

Thompson, P.A., Guo, M.X. & Harrison, P.J., 1996. Nutritional value of diets that vary in fatty acid composition for larval pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. (143) 379-391.

Tocher, D.R. & Sargent, J.R., 1987. The effect of calcium ionophore A23187 on the metabolism of arachidonic and eicosapentaenoic acids in neutrophils from a marine teleost fish rich in (n-3) polyunsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, (87 B) 733.

Torreilles, J., Guérin, M.C. & Roch, P., 1996. Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins. *C.R. Acad. Sci. Paris*. (319) 209-218.

Torreilles, J. & Guerin, M.C., 1999. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro. *Fish & Shellfish Immunol.*, (9) 509-518.

Trider, D.J. & Castell, J.D., 1980. Effect of dietary lipids on growth tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Nut.*, (110) 1303-1309.

Tunaz, H., Park, Y., Buyukguzel, K., Bedick, J.C., Aliza, A.R. & Stanley, D.W., 2003. Eicosanoids in insect immunity: bacterial infection stimulates hemocytic phospholipase A₂ activity in Tobacco hornworms. *Archives Insect Biochem. Physiol.* (52) 1-6.

- U -

Utting, S.D. & Millican, P.F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. (155) 45-54.

Uriarte, I., Farias, A., Hernandez, J., Schafer, C. & Sorgeloos, P., 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture*. (230) 349-357.

- V -

Varming, K., Schmidt, E.B., Svaneborg, N., Moller, J.M., Lervang, H.H., Grunnet, N., Jersild, C. & Dyerberg, J., 1995. The effect of n-3 fatty acids on neutrophil chemluminescence. *Scand. J. Clinic. Lab. Inv.*, (55) 47-52.

Vaskovsky, V.E., 1987. Phospholipids, in: Marine biogenic lipids, fats, and oils. (Eds: Ackman, R.G.). CRC press. 199-242.

Virella, G., Kilpatrick, J.M., Rugeles, M.T., Hyman, B. & Russell, R., 1989. Depression of humoral responses and phagocytic functions *in vivo* and *in vitro* by fish oil and eicosapentanoic acid. *Clinical Immunology and Immunopathology*. (52) 257-270.

Volety, A.K. & Chu, F.L.E., 1995. Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Develop. Comp. Immunol.*, (19) 135-142.

Volety, A.K., Oliver, L.M., Genthner, F.J. & Fisher, W.S., 1999. A rapid tetrazolium dye reduction assay to assess the bactericidal activity of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. (172) 205-222.

Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I. & Garland, C.D., 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (128) 219-240.

Von Elert, E., 2002. Determination of limiting polyunsaturated fatty acids in *Daphnia galeata* using a new method to enrich food algae with single fatty acids. *Limnology and Oceanology*. (47) 1764-1773.

- W -

Waagbo, R., Sandnes, K., Jorgensen, J., Engstad, R., Glette, J. & Lie, O., 1993. Health aspects of dietary lipid sources and vitamin E in atlantic salmon (*Salmo salar*). II. Spleen and erythrocyte phospholipid fatty acid composition, nonspecific immunity and disease resistance. *Fisk. Dir. Skr. Ser. Ernering*. (6) 62-80.

Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.L., Marissal, E. & Berthe, F., 2002. Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huitre creuse *Crassostrea gigas*: Caractérisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *C.R. Biol.*, (325) 231-238.

Waldock, M.J. & Holland, D.L., 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas* : polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. (19) 332-336.

Walne, P.R. & Mann, R., 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Ninth European Marine Biology Symposium*. (Eds: Barnes, H.) 587-607.

Watanuki, H., Yamaguchi, T. & Sakai, M., 2002. Suppression in function of phagocytic cells in common carp *Cyprinus carpio* L. injected with estradiol, progesterone or 11-ketotestosterone. *Comp. Biochem. Physiol.*, (132 C) 407-413.

Whyte, J.N.C., Bourne, N. & Hodgson, C.A., 1989. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. *Aquaculture*. (78) 333-347.

Whyte, J.N.C., Englar, J.R. & Carswell, B.L., 1990. Biochemical composition and energy reserves of *Crassostrea gigas* exposed to different level of nutrition. *Aquaculture*. (90) 157-172.

Wikfors, G.H., Patterson, G.W., Ghosh, P., Lewin, R.A., Smith, B.C. & Alix, J.H., 1996. Growth of post-set oysters, *Crassostrea virginica*, on high-lipid strains of algal flagellates *Tetraselmis* spp. *Aquaculture*. (143) 411-419.

Wu, F.C., Ting, Y.Y. & Chen, H.Y., 2003. Dietary docosahexaenoic acid is more optimal than eicosapentaenoic acid affecting the level of cellular defence responses of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. *Fish & Shellfish Immunol.*, (14) 223-238.

- X -

Xue, Q.G., 1998. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate *Ostrea edulis*. *Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale*.

Xue, Q.G., Renault, T. & Chilmonczyk, S., 2001. Flow Cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish & Shellfish Immunol.*, (11) 557-567.

- Y -

Yamaguchi, T., Watanuki, H. & Sakai, M., 2001. Effects of estradiol, progesterone and testosterone on the function of carp, *Cyprinus carpio*, phagocytes in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.*, (129 C) 49-55.

Yaqoob, P., Pala, H.S., Cortina-Borja, M., Newsholme, E.A. & Calder, P.C., 2000. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur. J. Clin. Inv.*, (30) 260-274.

Yaqoob, P., 2003. Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends in Immunology*. (24) 639-645.

Yonge, C.M., 1926. Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, (14) 295-386.

- Z -

Zhukova, N.V., 1986. Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acid from [¹⁴C]acetate in molluscs. *Biochimica and Biophysica Acta*. (878) 131-133.

Zhukova, N.V., 1991. The pathway of the biosynthesis of the non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.*, (100 B) 801-804.

ANNEXES

Index des annexes

Annexe 1 : Généralité sur les lipides

Annexe 2 : Tables de corrélation entre la composition en acide gras des lipides polaires des hémocytes et des branchies d'huîtres *Crassostrea gigas* et de palourde *Ruditapes philippinarum* après un conditionnement en régime algal mono-spécifique.

Annexe 3 : Composition en acide gras des lipides polaires des hémocytes et des branchies d'huîtres *Crassostrea gigas* et de palourde *Ruditapes philippinarum* après un conditionnement en régime algal mono-spécifique.

Annexe 4 : Article associé à l'expérimentation ALGUES

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Kraffe, E., Marty, Y. & Samain, J.F. Incorporation and modification of dietary fatty acids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. (in press à *Comparative Biochemistry and Physiology*).

Annexe 5 : Composition en acide gras des lipides polaires des branchies des huîtres conditionnées à Argenton lors d'une expérimentation de supplémentation en acide arachidonique sur une période courte (7 jours). Trois doses d'AA ont été testées : 0.0 µg AA / ml, 0.20 µg AA / ml et 0.65 µg AA / ml .

Annexe 6 : Composition en acide gras des lipides polaires des branchies des huîtres conditionnées à Argenton dans le cadre des expérimentations GIGAREPRO 1 et 2.

Annexe 1

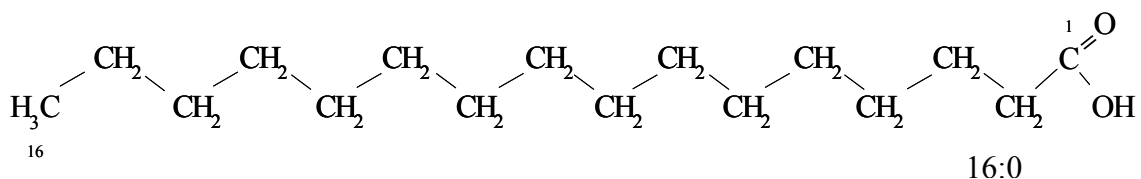
Généralité sur les lipides

A. Structure et synthèse des acides gras

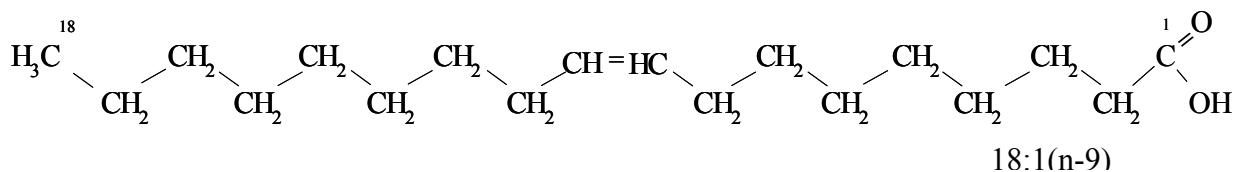
Les acides gras sont généralement constitués par une chaîne hydrocarbonée linéaire, possédant un groupement carboxyle (-COOH). Ils se distinguent par la longueur de leur chaîne, par le nombre d'insaturations (nombre de double liaison carbone-carbone) et par la position de ces doubles liaisons au sein de la chaîne hydrocarbonée. Dans ce travail, ils sont identifiés par la nomenclature suivante : C:X (n-Y) où C est le nombre de carbones, X le nombre de double liaisons et Y la position de la première double liaison comptée à partir du méthyl terminal.

On distingue généralement trois catégories d'acides gras :

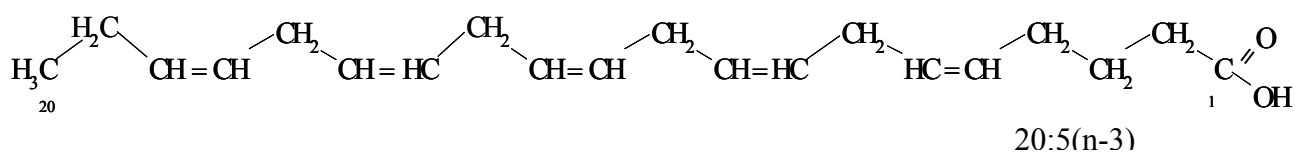
- ✓ les acides gras saturés dépourvus de doubles liaisons (AGS),



- ✓ les acides gras mono-insaturés possédant une seule double liaison (AGMI),

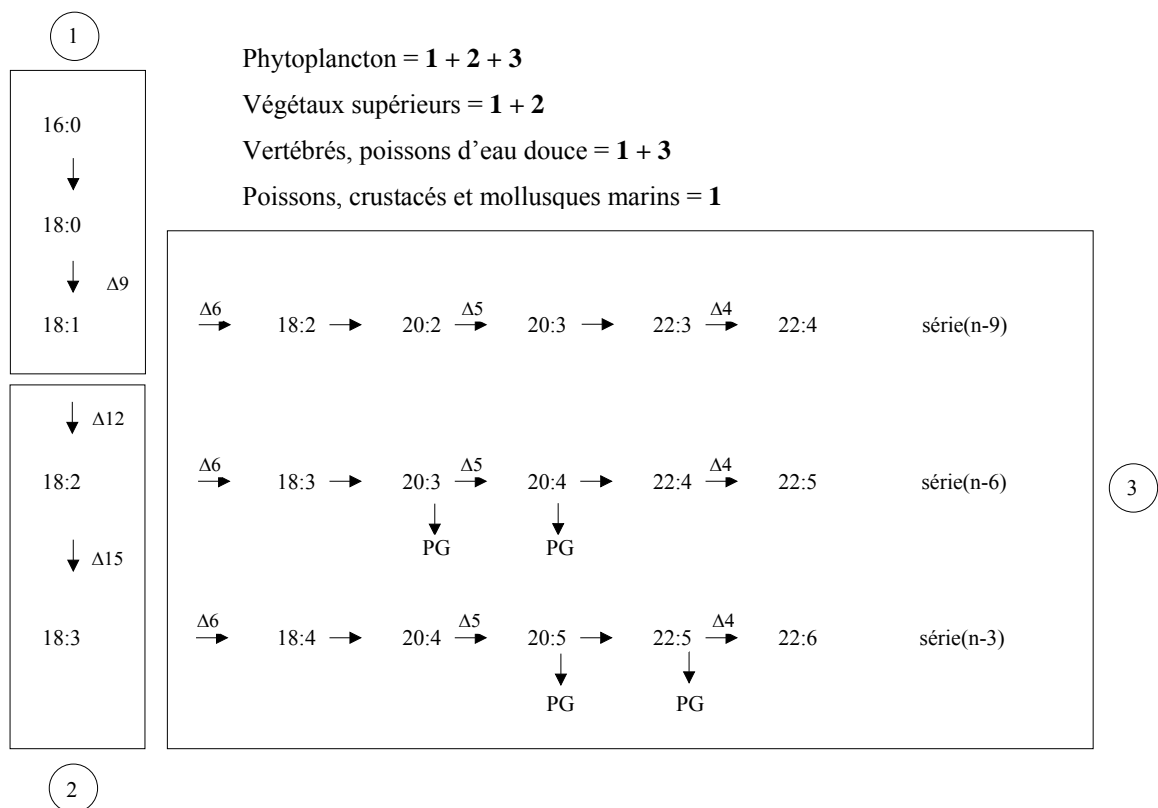


- ✓ les acides gras poly-insaturés qui portent plus d'une insaturation (AGPI).



Les propriétés physiques et chimiques des acides gras changent selon la longueur et le nombre de doubles liaisons. Ces deux paramètres sont déterminants pour la fluidité membranaire.

La synthèse de ces acides gras commence par la formation de l'acide palmitique (16:0) par condensation d'une molécule d'acetyl Coenzyme A et 7 molécules de malonyl. Cet acide palmitique est ensuite le précurseur des autres acides gras à longue chaîne par des processus d'élongation et de désaturation. Ces processus permettent d'obtenir des séries d'AGPI (n-6) et (n-3) à longues chaînes issues du 18:2(n-6) et 18:3(n-3) dont certains sont des constituants majeurs des membranes ou des précurseurs de substances régulatrices des fonctions cellulaires. Toutes les espèces animales et végétales n'ont pas les mêmes capacités de biosynthèse pour les acides gras (Figure A).



*PG = prostaglandines

* La nomenclature en Δ indique la position de chacune des doubles liaisons comptées à partir de la fonction acide

Figure A : Biosynthèse des acides gras poly-insaturés selon les espèces.

Les animaux terrestres qui ne possèdent pas les désaturases Δ12 et Δ15 sont incapables de biosynthétiser le 18:2(n-6) et le 18:3(n-3) qui sont donc considérés comme des acides gras

essentiels. Cependant, ils les trouvent dans leur alimentation et peuvent grâce aux désaturases $\Delta 6$, $\Delta 5$, $\Delta 4$ qu'ils possèdent synthétiser les autres acides gras par élongation et désaturation. Par contre, la majorité des espèces animales marines ne sont pas ou peu capables de bioconvertir l'acide linoléique (18:2(n-6)) et l'acide linoléique (18:3(n-3)) alimentaires qu'il s'agisse des poissons, des crustacés (Kanazawa *et al.*, 1979) et des mollusques (De Moreno *et al.*, 1976 ; Landgon & Waldock, 1981 ; Waldock & Holland, 1984).

Les AGPI 20:4(n-6) (acide arachidonique), 20:5(n-3) (acide eicosapentanoïque) et le 22:6(n-3) (acide docosahexanoïque) sont donc considérés comme des acides gras essentiels pour la survie, la croissance et la reproduction des espèces marines (Kanazawa *et al.*, 1979 ; Trider & Castell, 1980) et doivent impérativement être apportés par l'alimentation.

Néanmoins, il existe chez les mollusques des capacités à biosynthétiser des AGPI à longues chaîne à deux doubles liaisons non interrompus par un méthyle (NMIs)(Zhukova, 1986, 1991). Ces AGPI sont obtenus à partir du 16:1(n-7) et du 18:1(n-9) après plusieurs élongations et une désaturation en $\Delta 5$ (Figure B). Cependant on peut souligner que cette capacité de désaturation en $\Delta 5$ se limite à ces acides gras NMIs puisque la biosynthèse à partir des précurseurs marqués de 20:4(n-6) et de 20:5(n-3) n'existe pas chez ces mollusques (De Moreno *et al.*, 1976 ; Waldock & Holland, 1984).

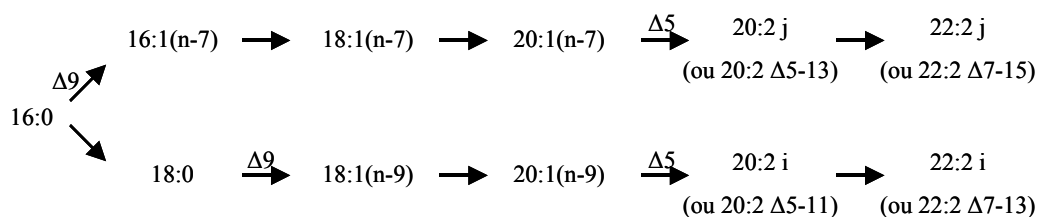


Figure B : Biosynthèse des acides gras poly-insaturés non interrompus par un méthyle (NMI).

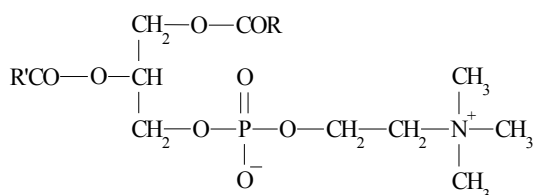
B. Structure des phospholipides

Les phospholipides sont les lipides prépondérants des membranes biologiques. Ils sont composés d'une tête hydrophile polaire et de deux queues hydrophobes (acides gras). Grâce à leur structure, les phospholipides ont tendance à s'assembler *in vivo* en une bicouche lipidique qui est l'architecture de base de toutes les membranes.

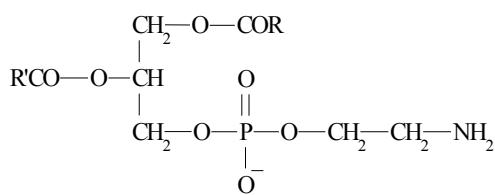
De la qualité des têtes polaires, la position et le nombre de double liaisons dans la chaîne d'acide gras constituant les queues hydrophobes, vont dépendre les propriétés viscodynamiques des membranes, la stabilité de la double couche, le fonctionnement des récepteurs et l'apparition de zones non bi-lamellaires pour les processus d'endo et exocytose. Les phospholipides se distribuent en plusieurs classes. A chaque classe de lipides polaires est associée une tête hydrophile. Les quatre principaux phospholipides sont représentés dans la Figure C.

A l'intérieur de ces classes, on peut distinguer trois sous-classes de phospholipides en fonction de la nature de la liaison reliant l'acide gras du C₁ avec le squelette du glycérol :

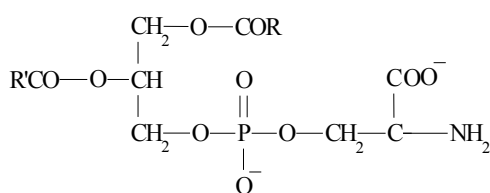
- ✓ lorsqu'on a une liaison ester (R-COO-), on parle de phospholipides,
- ✓ si c'est une liaison ether (R-CH₂-O-), on parle d'ether phospholipides,
- ✓ et enfin, on regroupe sous le terme de « plasmalogène » (PLSM), les phospholipides avec une liaison vinyl ether (R-CH=CH-O-).



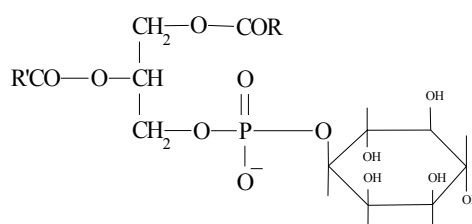
Phosphatidylcholine (PC), lécithine

1,2-Diacyl-*sn*-glycéro-3-phosphorylcholine

Phosphatidyléthanolamine (PE)

1,2 Diacyl-*sn*-glycéro-3-phosphoryléthanolamine

Phosphatidylsérine (PS)

1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphorylsérine

Phosphatidylinositol (PI)

1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphorylinositol

Figure C : Structure des principaux phospholipides.

Chez les mollusques, on trouve les quatre principales classes de phospholipides citées ci-dessus. Les « plasmalogènes » sont trouvés majoritairement dans la PE mais peuvent être également importants dans la PC et la PS chez certains mollusques (Vaskovsky, 1987).

Annexe 2

Tables de corrélation entre la composition en acide gras des lipides polaires des hémocytes et des branchies d'huîtres *Crassostrea gigas* et de palourde *Ruditapes philippinarum* après un conditionnement en régime algal mono-spécifique (n=16)

Fatty acid	<i>Crassostrea gigas</i>			<i>Ruditapes philippinarum</i>		
	R^2	p		R^2	p	
14:0	0.12	0.18	NS	0.49	<0.01	S
16:0	0.01	0.89	NS	0.04	0.46	NS
18:0	0.09	0.25	NS	0.63	<0.001	S
16:1(n-7)	0.59	0.02	S	0.31	<0.05	S
18:1(n-9)	0.90	<0.0001	S	0.91	<0.0001	S
18:1(n-7)	0.67	<0.0001	S	0.48	<0.01	S
20:1(n-11)	0.40	<0.01	S	0.40	<0.01	S
20:1(n-9)	0.56	0.001	S	0.87	<0.0001	S
20:1(n-7)	0.50	0.001	S	0.68	<0.0001	S
18:2(n-6)	0.68	<0.0001	S	0.51	<0.01	S
18:3(n-3)	0.82	<0.0001	S	0.81	<0.0001	S
18:4(n-3)	0.80	<0.01	S	0.34	0.07	NS
20:2(n-6)	0.31	0.07	NS	0.93	<0.0001	S
20:4(n-6)	0.45	<0.01	S	0.45	<0.01	S
20:4(n-3)	0.79	<0.001	S	0.81	<0.0001	S
20:5(n-3)	0.47	<0.01	S	0.89	<0.0001	S
22:2i	0.57	<0.001	S	0.47	<0.01	S
22:2j	0.15	0.13	NS	0.37	<0.05	S
22:4(n-6)	0.47	<0.01	S	0.77	<0.0001	S
22:5(n-6)	0.39	<0.01	S	0.93	<0.0001	S
22:5(n-3)	0.35	<0.05	S	0.87	<0.0001	S
22:6(n-3)	0.82	<0.0001	S	0.87	<0.0001	S
(n-3)/(n-6)	0.49	<0.01	S	0.83	<0.0001	S
22:6(n-3)/20:5(n-3)	0.83	<0.0001	S	0.91	<0.0001	S
22:5(n-6)/20:4(n-6)	0.48	<0.01	S	0.98	<0.0001	S

Annexe 3

Composition en acide gras des lipides polaires des hémocytes et des branchies d'huîtres *Crassostrea gigas* à la fin du conditionnement en régime algal mono-spécifique. Tr = pourcentage <0.5

Huitres	Gills			Hemocytes		
	<i>C. calcitrans</i> N=3	<i>T. suecica</i> N=2	<i>T-Iso</i> N=3	<i>C. calcitrans</i> N=3	<i>T. suecica</i> N=2	<i>T-Iso</i> N=3
16:0	1.6 ± 0.3	0.2 ± 0.0	2.0 ± 0.1	2.8 ± 0.3	2.7 ± 2.7	2.6 ± 1.2
18:0	9.8 ± 1.2	7.9 ± 0.8	10.1 ± 0.3	16.8 ± 3.8	19.9 ± 2.1	14.8 ± 3.9
	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.3	3.1 ± 1.0	8.2 ± 2.1	7.9 ± 0.3	5.2 ± 0.7
16:1(n-7)	1.3 ± 1.1	-	-	1.2 ± 1.1	-	1.2 ± 0.2
18:1(n-9)	Tr	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.1	Tr	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.2
18:1(n-7)	7.7 ± 0.7	2.7 ± 1.1	4.7 ± 0.4	6.8 ± 1.2	3.6 ± 0.0	4.7 ± 0.6
20:1(n-11)	2.6 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1
20:1(n-9)	Tr	3.3 ± 0.2	2.2 ± 0.1	Tr	1.5 ± 0.7	1.2 ± 0.1
20:1(n-7)	6.1 ± 0.4	3.8 ± 0.1	3.9 ± 1.3	4.8 ± 0.9	3.3 ± 0.0	3.2 ± 0.1
18:2(n-6)	Tr	1.6 ± 0.1	2.3 ± 0.1	Tr	1.7 ± 0.0	1.7 ± 0.2
18:3(n-3)	Tr	2.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	Tr	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.1
18:4(n-3)	-	-	2.7 ± 0.3	-	1.9 ± 0.8	2.4 ± 0.5
20:4(n-6)	8.9 ± 0.6	6.9 ± 0.3	5.3 ± 0.3	7.5 ± 1.6	4.4 ± 0.0	4.4 ± 0.8
20:2(n-6)	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
20:5(n-3)	16 ± 1.1	14.6 ± 1.2	4.9 ± 0.5	17.9 ± 5	13.5 ± 5.2	9.7 ± 2.1
22:2i	Tr	3.2 ± 0.1	2.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.2
22:2j	9.2 ± 0.2	6.6 ± 0.1	6.1 ± 0.6	4.8 ± 1.8	3.0 ± 0.4	3.9 ± 1.2
22:5(n-6)	Tr	0.6 ± 0.0	4.8 ± 0.6	1.8 ± 1.7	2.8 ± 1.9	4.1 ± 0.7
22:5(n-3)	1.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.1
22:6(n-3)	8.4 ± 0.7	12.8 ± 0.4	21 ± 1.7	5 ± 1.1	10.2 ± 5	18.2 ± 0.8
TO SFAs	17.2 ± 1.2	14.7 ± 0.9	17.1 ± 1.0	30.4 ± 6.2	34.6 ± 0.1	25.6 ± 5.9
TO. MUFAs	20.9 ± 1.5	16.8 ± 1.5	17.1 ± 1.7	17.6 ± 2.2	16.3 ± 2.3	17.1 ± 0.6
TO. PUFAs	51.6 ± 1.9	57.1 ± 2.4	55.7 ± 1.7	45.5 ± 2.0	43.6 ± 1.8	50.9 ± 4.2
(n-3)/(n-6)	2.9 ± 0.3	3.4 ± 0.1	2.3 ± 0.0	2.5 ± 0.2	2.8 ± 0.5	2.7 ± 0.1
22:6(n-3)/20:5(n-3)	0.5 ± 0.0	0.9 ± 0.1	4.3 ± 0.7	0.3 ± 0.0	0.9 ± 0.7	1.9 ± 0.4
22:5(n-6)/20:4(n-6)	0.03 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.4	0.9 ± 0.3

TO. SAFA = Total Saturated Fatty Acids; TO. MUFA = Total Mono-Unsaturated Fatty Acids; TO. PUFA = Total Poly-Unsaturated Fatty Acids; 20:2i = 20:2Δ5,11 ; 22:2i = 22:2Δ7,13 ; 20:2j = 20:2Δ5,13; 22:2j = 22:2Δ7,15

Annexe 3 suite

Composition en acide gras des lipides polaires des hémocytes et des branchies de palourde *Ruditapes philippinarum* à la fin du conditionnement en régime algal mono-spécifique. Tr = pourcentage <0.5.

Palourdes	Gills			Hemocytes		
	<i>C. calcitrans</i> N=3	<i>T. suecica</i> N=3	T-Iso N=3	<i>C. calcitrans</i> N=2	<i>T. suecica</i> N=2	T-Iso N=3
16:0	0.9 ± 0.1	Tr	1.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	Tr	1.1 ± 0.5
18:0	9.1 ± 1.7	8.0 ± 0.8	12.1 ± 0.8	9.7 ± 0.9	8.3 ± 0.3	11.3 ± 2.4
	6.3 ± 0.1	5.5 ± 0.5	4.6 ± 0.2	11.3 ± 0.5	9.0 ± 0.3	7.8 ± 0.8
16:1(n-7)	3.3 ± 0.9	1.0 ± 1.7	Tr	3.0 ± 1.7	Tr	0.9 ± 0.9
18:1(n-9)	1.0 ± 0.1	2.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2	1.8 ± 0.01	4.4 ± 0.3	5.8 ± 0.5
18:1(n-7)	1.4 ± 0.4	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.4	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.2
20:1(n-11)	3.5 ± 0.2	3.3 ± 0.5	2.0 ± 0.2	4.2 ± 0.1	3.7 ± 0.4	2.5 ± 0.3
20:1(n-9)	1.3 ± 0.2	3.0 ± 0.4	3.7 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.9 ± 0.01	2.9 ± 0.1
20:1(n-7)	2.3 ± 0.2	1.1 ± 0.0	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3	Tr
18:2(n-6)	Tr	Tr	0.9 ± 0.1	Tr	0.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1
18:3(n-3)	-	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.0	Tr	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.1
18:4(n-3)	-	Tr	1.4 ± 0.4	-	1.1 ± 0.02	1.4 ± 0.2
20:2(n-6)	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.2	4.3 ± 0.3	1.1 ± 0.0	1.8 ± 0.1	4.4 ± 0.2
20:4(n-6)	6.5 ± 0.5	4.7 ± 0.4	3.7 ± 0.3	10.4 ± 1.3	6.6 ± 0.4	5.0 ± 0.4
20:5(n-3)	8.7 ± 0.7	4.6 ± 0.6	1.3 ± 0.2	11.1 ± 0.3	6.4 ± 0.3	1.6 ± 0.6
22:2i	1.5 ± 0.1	4.3 ± 0.7	4.3 ± 0.5	1.6 ± 0.0	3.2 ± 0.2	2.6 ± 0.3
22:2j	7.3 ± 0.9	6.3 ± 0.8	3.3 ± 0.3	6.2 ± 0.1	4.9 ± 0.6	2.8 ± 0.6
22:5(n-6)	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1	7.0 ± 0.4	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	6.6 ± 0.7
22:5(n-3)	2.0 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2
22:6(n-3)	10.0 ± 0.8	13.9 ± 0.8	19.4 ± 1.0	9.7 ± 0.6	14.8 ± 1.2	21.3 ± 1.7
TO SFAs	17.3 ± 2.0	15.8 ± 0.7	19.7 ± 0.6	23.9 ± 0.2	20.8 ± 1.6	22.3 ± 3.7
TO. MUFAs	17.7 ± 1.1	15.8 ± 1.1	14.3 ± 0.9	16.7 ± 2.2	14.7 ± 0.9	16.8 ± 1.2
TO. PUFAs	46.9 ± 6.9	48.6 ± 4	52.3 ± 3.4	50.9 ± 2.7	54.7 ± 1.7	54.8 ± 2.1
(n-3)/(n-6)	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.1	1.5 ± 0.0	1.4 ± 0.07	2.4 ± 0.0	1.4 ± 0.2
22:6(n-3)/20:5(n-3)	1.1 ± 0.0	3.0 ± 0.3	15.2 ± 2.5	0.9 ± 0.0	2.3 ± 0.3	13.6 ± 3.2
22:5(n-6)/20:4(n-6)	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.9 ± 0.1	0.08 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1.3 ± 0.1

TO. SAFA = Total Saturated Fatty Acids; TO. MUFA = Total Mono-Unsaturated Fatty Acids; TO. PUFA = Total Poly-Unsaturated Fatty Acids; 20:2i = 20:2Δ5,11 ; 22:2i = 22:2Δ7,13 ; 20:2j = 20:2Δ5,13; 22:2j = 22:2Δ7,15

Annexe 4

"Incorporation and modification of dietary fatty acids by two bivalve species
Crassostrea gigas and *Ruditapes philippinarum*"

Cet article est accepté dans le journal : *Comparative Biochemistry and Physiology*. Il est en cours de révision.

Maryse Delaporte^a, Philippe Soudant^b, Jeanne Moal^a, Edouard Kraffe^c, Yanic Marty^c & Jean-François Samain^a

^a Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, IFREMER de Brest, 29280 Plouzané, France

^b UMR CNRS- 6539, IUEM, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, France

^c UMR CNRS 6521, Université de Bretagne Occidentale CS93837, 29238 Brest Cedex 3, France

Author for correspondance : P. Soudant, phone : + 33 (0) 2 98 49 86 23, fax. : +33 (0) 2 98 22 46 53, e-mail : Philippe.Soudant@univ-brest.fr

Running title: **Metabolisms of dietary fatty acids by bivalves**

Abstract

Two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* were fed eight weeks with three mono-specific algae diets: *T-Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*, selected on the basis of their polyunsaturated fatty acid (PUFA) composition. The incorporation and the modification of dietary fatty acids in gill polar lipids of the two species were thus analysed and compared. As expected, essential PUFA (20:4(n-6), 20:5(n-3) and 22:6(n-3)) composition of gill polar lipid of both species was greatly influenced by the dietary conditioning. Interestingly, non methylene interrupted (NMI) PUFAs, known to be synthesised from monounsaturated precursors, were also affected by the dietary conditioning. To discriminate dietary and species influences, a principal component analysis (PCA) was performed to reduce the number of fatty acid variables and was followed by a MANOVA on the two most explicative components. This analysis showed that difference in fatty acid profiles attributable to species were just as significant as the diet inputs. Specifically, oysters had higher 20:5(n-3) content in gill polar lipids and higher 22:2j / 22:i and (n-7) / (n-9) ratio than clams. These differences in the gill lipid profiles are speculated to result of an intrinsic species characteristic and perhaps of a group characteristic : Fillibranch vs Eulamellibranch.

Key words : Bivalves, Clams, Fatty acids, Mollusks, Nutrition, Oysters, Regulation

Introduction

Several studies about bivalve nutrition have established that the quality of micro-algae diet affects the growth and development of bivalve molluscs such as the King scallop *Pecten maximus* (Delaunay *et al.*, 1993; Soudant *et al.*, 1996a; Soudant *et al.*, 1998), the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Knauer & Southgate, 1997; Soudant *et al.*, 1999; Soudant *et al.*, 2000), the European flat oyster *Ostrea edulis* (Berntsson *et al.*, 1997), the Carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Albentosa *et al.*, 1996; Fernández-Reiriz *et al.*, 1998, 1999) and the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Caers *et al.*, 1999). The nutritive value of microalgae seems to depend at least partially upon the presence of essential polyunsaturated fatty acids (PUFAs) especially arachidonic acid (AA, 20:4(n-6)), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5(n-3)) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6(n-3)). Indeed, bivalves have a very limited or no capability to synthesise PUFAs (De Moreno *et al.*, 1976, 1977; Waldock & Holland, 1984; Chu & Greaves, 1991) and require them for their development (Langdon & Waldock, 1981; Chu & Webb, 1984; Knauer & Southgate, 1997). Nevertheless, bivalves have the capabilities of *de novo* synthesis for some peculiar fatty acids (FAs) called non-methylene interrupted fatty acid (NMIs) (Zhukova, 1986, 1991). NMIs can amount to 15% of fatty acids in polar lipids, but they were often overlooked in nutrition studies and occasionally mis-identified. The most abundant NMIs are those constituted with 22 carbons : the 22:2 $\Delta_{7,13}$ (or 22:2i) and 22:2 $\Delta_{7,15}$ (or 22:2j) and their functions are not well understood. It has been suggested that NMIs have a functional and structural role in membrane (Kraffe *et al.*, 2004) and may also substitute for essential fatty acids such as 20:4(n-6), 20:5(n-3) and 22:6(n-3) (Ackman & Hooper, 1973; Klingensmith, 1982). Also, as the precursors/intermediates for NMI synthesis are monoenoic acids 16:1, 18:1 and 20:1 (n-7) for the j series NMIs and 18:1 and 20:1 (n-9) for the i series NMIs (Zhukova, 1986, 1991), one may expect NMI proportions to depend on the dietary supply of their precursors, considering that 16:1(n-7) and 18:1(n-9) are abundant in diatoms and flagellates, respectively (Volkman *et al.*, 1989). To date, it is unclear whether there are common responses in bivalves to dietary changes or whether there are specific responses correlating to their feeding behaviour and phylogeny.

Oysters live intertidally, generally attached on hard substrata and belong to the Filibranch group. Clams are soft bottom burrowers and use two siphons to feed above the bottom while completely buried in the mud. They belong to the Eulamellibranch group which

possess the most specialised gills among bivalves (Ruppert & Barnes, 1996). Because of their distinct gill structure and their specific environmental adaptation, we have compared the impact of specific micro-algae diet on FA profiles of gill phospholipids of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*, would appear to be especially interesting to determine.

Consequently, our study aimed (1) to report changes in FA content of gill phospholipids of two species *C. gigas* and *R. philippinarum* simultaneously fed 8 weeks on mono-specific diets (*T-Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*), and (2) to compare retention and modification of the 22:6(n-3), 20:5(n-3), 20:4(n-6) and NMI fatty acids between the two species.

Materials and methods

Broodstock conditioning

Juveniles of *C. gigas* were provided by a French commercial hatchery (SATMAR, Lannilis, France) and grown out in Aber Wrach (Finistère, France). Eighteen month-old oysters reached an average live weight of 25 g. Clams *R. philippinarum* were collected in the bay of Marennes-Oléron (Charente, France). Oysters and clams were fed three mono-algal diets for two months as described in Delaporte *et al.* (2003). The micro-algal species were selected on the basis of their poly-unsaturated fatty acid (PUFA) composition: *Chaetoceros calcitrans* is rich in 20:5(n-3) and 20:4(n-6) and deficient in 22:6(n-3) in comparison with the two other diets. *T-Iso* (*T-Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitian) is rich in 22:6(n-3) and deficient in 20:5(n-3) and 20:4(n-6), and *Tetraselmis suecica* is deficient in 22:6(n-3), and contains only small amounts of 20:5(n-3) and 20:4(n-6) (Table 1). The daily algal supply was established to provide an equivalent dry weight (DW) of each alga: ie 0.6×10^9 cells/animal/24h of *C. calcitrans* and *T-Iso* and 0.06×10^9 cells/animal/24 h of *T. suecica*. Tanks and animals were cleaned weekly. Before sampling, animals were maintained unfed for 24 h. This protocol was adopted to provide sufficient time to remove residual algae from the gills. Three pools of five animals were used for fatty acid analysis at the initial point and after 4 weeks and 8 weeks of conditioning. Gills of five animals were dissected, pooled and frozen in liquid nitrogen. 15 other animals were sampled for flesh and shell wet weight measurements in order to assess oyster condition index at the beginning and the end of the

dietary conditioning. The condition index was calculated according to the formula: (flesh wet weight / shell wet weight) x 100.

Lipid extraction of algae and gill for fatty acid analysis

Algae – Algal samples for each diet were filtered onto pre-ignited (450°C) GF/F filters. The filters were then placed in tubes containing 3 ml of a chloroform-methanol mixture (2:1, v:v) and frozen at -20°C under nitrogen. Fatty acid analyses were performed on total lipids.

Gills – For the lipid extraction, pooled gills were ground with a Danguomeau homogeniser at -180°C and 300 mg of the ground tissue was transferred to a tube containing 6 ml of chloroform-methanol mixture (2:1,v:v). After centrifugation, lipid extract was transferred in a clean tube, sealed under nitrogen and stored at -20°C.

Polar and neutral lipid separation

Neutral and polar lipids were separated on a Silica gel micro-column according to Marty *et al.* (1992). Briefly, an aliquot of gill lipid extract was evaporated to dryness and recovered with three washings of 500µl each of chloroform-methanol mixture (98:2, v:v). This was placed on top of a silica gel microcolumn [30x5 mm I.D. Kieselgel, 70-230mesh (Merck), previously heated to 450°C and deactivated with 5% water]. The neutral lipids were eluted with 10 ml of chloroform-methanol mixture (98:2, v:v). The polar lipids were recovered with 15 ml of methanol. A known amount of 23:0 fatty acid, as internal standard, was added in both neutral and polar fractions. Neutral and polar lipid fractions were evaporated to dryness, re-suspended with 1 or 2 ml of a chloroform-methanol mixture (2:1, v:v) and stored under nitrogen atmosphere at -20°C until analysis.

Fatty acid analysis

After evaporation to dryness, lipid extract or fraction was trans-esterified with 10% BF₃ (w/w) in methanol for 15 min at 95-100 °C (Metcalf & Schmitz, 1961). After cooling, the fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted with hexane according to the method described by Marty *et al.* (1992). Separation of FAMES was carried out on a GC (HP 6890) equipped with a flame ionization detector, an on-column injector, and a DBWAX capillary column (J & W, 25 m X 0.32 mm; 0.2 µm film thickness). The column was temperature

programmed from 60 to 150 °C at 30 °C/min and 150 to 220 °C at 2 °C/min. Hydrogen was used as the carrier gas at 2.0 ml/min. Identification of FAMES was based on the comparison of their retention times with those of authentic standards. Non-methylene interrupted (NMI) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) 22:2 Δ 7,13 and 22:2 Δ 7,15 were respectively designated 22:2i and 22:2j. Fatty acid peaks were integrated and analysed using HP chemstation software. Results of fatty acid composition were expressed as weight percent of the total fatty acids of each fraction.

Statistical analysis

To compare the differences between species and the dietary conditioning, T-tests and one-way analysis of variance (ANOVA) were respectively performed using Statview (SAS institute Inc., Cary, NC, USA). Percentage data were transformed (arcsin of the square root) before ANOVA and T-test, but are presented in figure and table as untransformed percentage values. Differences were considered statistically significant if $P \leq 0.05$.

As FA analysis provide numerous variables for each sample, Principal Component Analysis (PCA) was used to characterize relationships between FA variables and was followed with a MANOVA to test the species and diet factor effects on the combined variables.

Results

Composition of the mono-specific-algal diet

The fatty acid profile of the mono-specific algal diets was determined during the dietary conditioning (Table 1). *C. calcitrans* was characterised by a high proportion of 14:0 (23%), 16:1(n-7)(20.6%) and 20:5(n-3)(17.8%) (Table 1). *C. calcitrans* had also the highest proportion of 20:4(n-6)(2%) in comparison with the two other microalgal diets. *T. suecica* presented a different FA profile with high proportions of 16:0 (24.9%), 18:1(n-9)(13.8%), 18:3(n-3)(10.5%) and 18:4(n-3)(10.7%), small proportions of 20:5(n-3)(5.4%) and traces of 20:4(n-6) and 22:6(n-3)(0.5% and 0.1%, respectively). The third microalgae tested, *T-Iso*, provided a high proportion of 14:0 (26.5%), 16:0 (11.2%), 18:1(n-9)(11.2%), 18:2(n-6)(7.1%), 18:4(n-3)(12.5%) and 22:5(n-6)(2.1%).

Table 1 : Fatty acid composition of algae used in the experiment, expressed as weight percentage of total fatty acids in microalgae lipids (n=3, Mean \pm SD).

Fatty acid composition	<i>C. calcitrans</i>	<i>T. suecica</i>	T-Iso
	23 \pm 2.6	0.5 \pm 0.1	26.5 \pm 3.0
16:0	5.7 \pm 1.5	24.9 \pm 3.6	11.2 \pm 2.5
18:0	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2
16:1(n-7)	20.6 \pm 2.5	0.1 \pm 0.3	5.5 \pm 1.8
18:1(n-9)	0.6 \pm 0.1	13.8 \pm 7.6	11.2 \pm 1.8
18:1(n-7)	0.5 \pm 0.1	1.5 \pm 0.3	0.7 \pm 0.2
16:2(n-7)	1.9 \pm 2.5	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1
16:3(n-4)	10 \pm 1.7	-	0.1 \pm 0.0
18:2(n-6)	0.7 \pm 0.1	5.7 \pm 1.2	7.1 \pm 2.7
18:3(n-3)	-	10.5 \pm 0.9	5.7 \pm 0.9
18:4(n-3)	0.7 \pm 0.2	10.7 \pm 3.3	12.5 \pm 0.9
20:4(n-6)	2 \pm 0.5	0.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0
20:5(n-3)	17.8 \pm 2.7	5.4 \pm 1.1	0.4 \pm 0.1
22:5(n-6)	0.1 \pm 0.1	1.5 \pm 2.0	2.1 \pm 0.4
22:5(n-3)	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1
22:6(n-3)	1.3 \pm 0.2	0.1 \pm 0.0	7.8 \pm 0.9
TO. SAFA	29.8 \pm 3.2	26.1 \pm 3.7	39 \pm 4.7
TO. MUFA	25.5 \pm 2.3	20.1 \pm 8.3	18.5 \pm 2.9
TO. PUFA	39.9 \pm 4.8	53.2 \pm 8.1	40.8 \pm 3.1
(n-3)/(n-6)	5.6 \pm 1.2	4.2 \pm 0.6	3.0 \pm 1.1

TO. SAFA = Total Saturated Fatty Acids; TO. MUFA = Total Mono-Unsaturated Fatty Acids; TO. PUFA = Total Poly-Unsaturated Fatty Acids

Its fatty acid profile was also characterised by a high proportion of 22:6(n-3)(7.8%) and a very small proportion of 20:5(n-3)(0.4%). A relatively high proportion of 22:5(n-6)(2.1%) was also provided by T-Iso.

Condition index

Oysters and clams maintained or increased their condition index when fed on T-Iso and *C. calcitrans* (Table 2). However, *T. suecica* feeding resulted in a lost of CI for both species.

Table 2 : Condition index of individual oysters and clams; total FAME expressed as mg of FAME per g of FW gills and percentage of polar lipids (corresponding to the proportion of FAME associated to the polar lipid fraction) of pooled oyster and clam gills at the start and after eight weeks of conditioning (Mean \pm SD). Small letter indicated significant between dietary treatments and asterisk emphasised significant difference with initial values (ANOVA and T-Test, $p < 0.05$).

	Initial	T = 8 weeks		
		<i>C. calcitrans</i>	<i>T. suecica</i>	<i>T- Iso</i>
Oysters				
Condition index (n=12-22)	13.2 \pm 2.8	18.9 \pm 7.2 ^{b*}	11.1 \pm 4.0 ^{b*}	13.4 \pm 2.8 ^a
Total FAME (mg/g FW gills) (n=3)	5.0 \pm 0.6	6.7 \pm 1.2	5.3 \pm 0.4	5.7 \pm 0.4
Percentage of polar lipids (n=3)	86.1 \pm 6.1	82.1 \pm 6.0	94.0 \pm 2.0	86.2 \pm 5.9
Clams				
Condition index (n=11-14)	25.8 \pm 4.2	28.8 \pm 4.3 ^a	21.6 \pm 3.9 ^{b*}	32.6 \pm 4.4 ^{c*}
Total FAME (mg/g FW gills) (n=3)	4.2 \pm 0.2	5.5 \pm 0.8	4.2 \pm 0.5	5.6 \pm 0.6
Percentage of polar lipids (n=3)	95.7 \pm 0.5	95.3 \pm 0.5	94.5 \pm 1.1	94.0 \pm 0.7

FAME: Fatty Acid Methyl Ester; FW: Fresh Weight

Total fatty acids and polar *vs* neutral lipid repartition in gills

At the beginning of the experiment, oysters and clams possess similar total fatty acid contents in their gills: 4 to 5.0 mg of lipids per g of gill tissue (Table 2). However, in both species, fatty acids were unequally distributed between neutral and polar lipids. Polar lipids contained 86.1% and 95.7% of the fatty acids in oysters and clams, respectively, at the beginning of the experiment.

Although total fatty acid contents tended to be affected by the dietary conditioning, especially for oysters, (Table 2), gill fatty acids were mostly remained in the polar lipids, above 80% in oyster gills and above 94% in clam gills.

Impact of the dietary conditioning on the fatty acid profiles of oyster and clam gills

The weight percentages of fatty acids in gill polar lipids were assessed for oysters and clams at the initiation of the dietary treatments and after 4 and 8 weeks of feeding with *T-Iso*, *T. suecica* and *C. calcitrans*.

The FA composition of oyster and clam gill polar lipids was greatly influenced by dietary conditioning after 4 weeks and the dietary imprint was accentuated after 8 weeks. Thus, in order to simplify data presentation, only the results at the beginning and after 8 weeks of dietary conditioning were presented in Table 3 and 4. As most of the individual FAs were significantly affected (ANOVA, $p < 0.05$) by the dietary conditioning for both species, multivariate analysis were applied to all the FA data to facilitate the interpretation of the results.

Principal Component Analysis (PCA), followed with a MANOVA, was used to characterize relationships between FA variables and to discriminate FA profiles according to food quality and bivalve species. PCA analysis examined 41 cases including FA of gill polar lipids from oysters and clams experiencing dietary treatments for 4 and 8 weeks (24 and 23 cases respectively) as well as those at the beginning of the experiment (6 cases). The % composition of 20 variables was entered into the model: 20:1(n-11), 18:1(n-9), 20:1(n-9), 22:2i, 16:1(n-7), 18:1(n-7), 20:1(n-7), 22:2j, 18:2(n-6), 18:3(n-6), 20:2(n-6), 20:4(n-6), 22:4(n-6), 22:5(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3), 20:4(n-3), 20:5(n-3), 22:5(n-3), 22:6(n-3).

This procedure generated 4 components with eigenvalues higher than 1.0. These components explained 88.3% of the variability in the original data. The first principal component (PC1) explained 47.3% of the combined variance, the second component (PC2) 24.6%, the third 10.7% and the fourth 5.6%. A correlation circle was plotted using PC1 and PC2 as axes (Fig. 1). This representation showed that the 20 variables are well explained (72%) with these combined variables. When the sample were identified on the biplot of PC1 and PC2 (the most significant combined variables), eight groups can be formed according to combinations of species and dietary treatment (Fig. 2). This representation distinguished the two species: oysters on the top left and clams on the bottom right and 4 groups within each species : 3 groups corresponding to the three mono-specific dietary treatments: *T-Iso*, *T. suecica* and *C. calcitrans* and one group corresponding to the FA profile at the initiation of the experiment (named 'natural').

As PC1 and 2 represented the strongest correlation (positive and negative) between FA variables, a MANOVA with species and diets as the independent variables and PC1 and PC2 as the dependent variables was applied. The analysis showed that differences in FA profiles attributable to species ($P < 0.001$) and diet composition ($P < 0.001$) were highly significant (Fig 3A and 3B) for both principal components.

Fig. 1 : Correlation circle of 20 fatty acid variables according the two principal components 1 and 2 obtained from the Principal Component Analysis which used 41 cases including FA compositions of gill polar lipids from oysters and clams experiencing dietary treatments for 4 and 8 weeks as well as those at the beginning of the experiment.

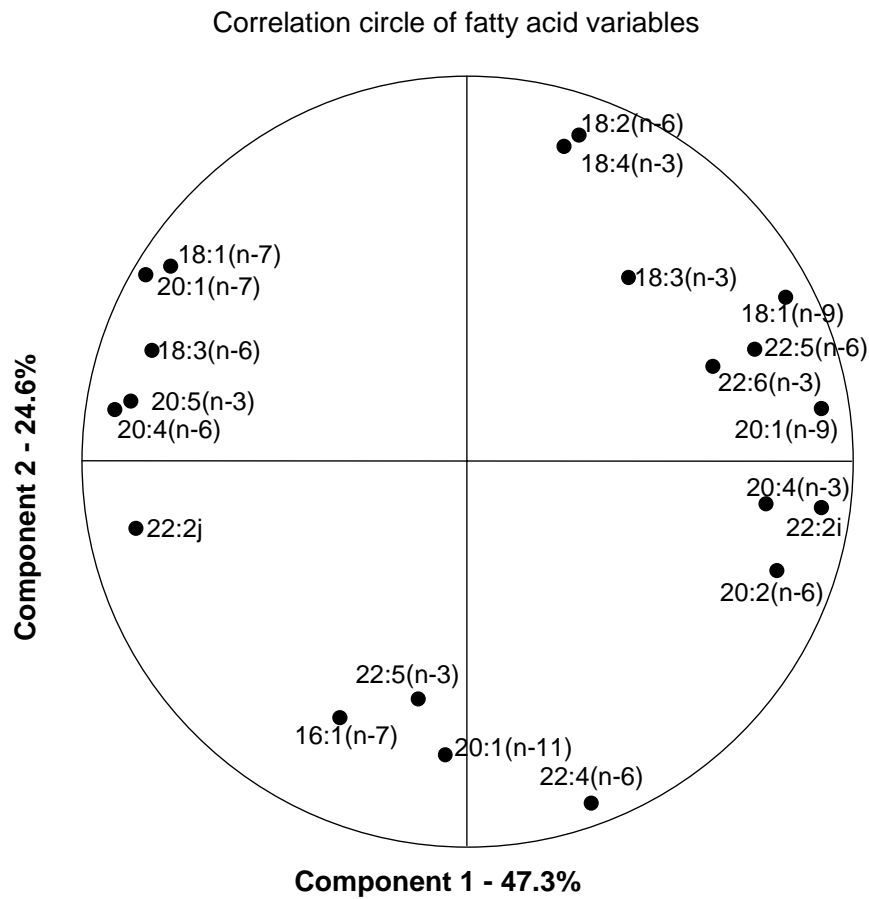


Fig. 2 : Plot of the 41 individual cases (corresponding to oysters and clams experiencing dietary treatments for 4 and 8 weeks and those at the beginning of the experiment) into the factorial plan of Principal Components 1 and 2 obtained from the Principal Component Analysis.

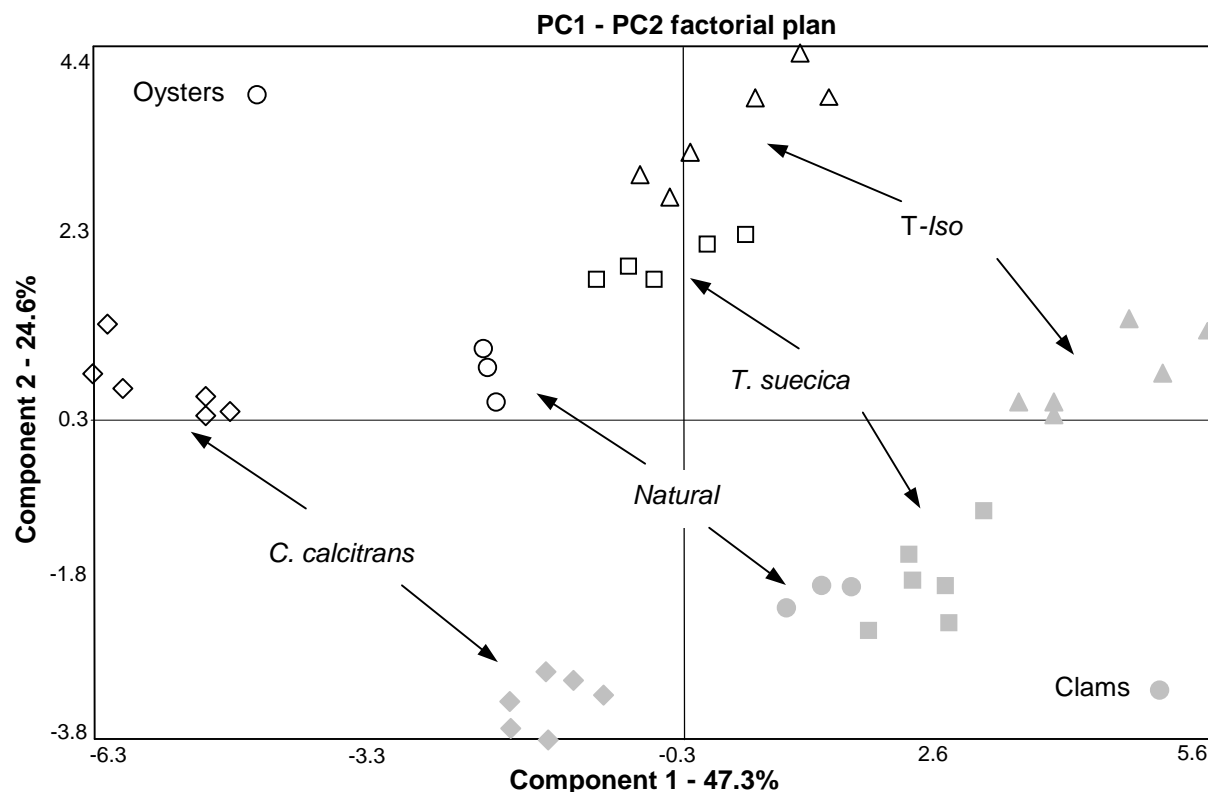


Table 3: Fatty acid composition of gill polar lipids of *Crassostrea gigas* during the dietary conditioning, expressed in weight percentage of the total fatty acids of the fraction. Different lower-case letters indicate significant differences between dietary treatment at the end of the conditioning (ANOVA, $p < 0.05$). Asterisks indicate significant differences with the initial composition (T-Test, $p < 0.05$).

Fatty acids	Initial		After 8 weeks of dietary conditioning					
			<i>C. calcitrans</i>		<i>T. suecica</i>		T-Iso	
	n=3		n=3		n=2		n=3	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
20:1(n-11)	1.8	0.2	3.0 ^{a*}	0.1	2.5 ^{b*}	0.2	2.3 ^{b*}	0.2
18:1(n-9)	1.9	0.1	0.3 ^{a*}	0.0	3.2 ^{b*}	0.2	3.0 ^{b*}	0.2
20:1(n-9)	1.9	0.1	0.6 ^{a*}	0.1	3.8 ^{b*}	0.2	2.5 ^{c*}	0.1
20:2i	0.3	0.1	0.3 ^a	0.0	0.4 ^a	0.0	0.3 ^a	0.0
22:2i	1.5	0.1	0.6 ^{a*}	0.1	3.7 ^{b*}	0.0	3.0 ^{c*}	0.2
16:1(n-7)	1.6	0.0	2.3 ^{a*}	0.0	1.1 ^{b*}	0.3	1.2 ^{b*}	0.2
18:1(n-7)	3.8	0.5	8.8 ^{a*}	0.5	3.0 ^b	1.2	5.3 ^{c*}	0.5
20:1(n-7)	6.2	0.1	7.0 ^{a*}	0.3	4.3 ^{b*}	0.2	4.3 ^{b*}	0.4
20:2j	0.4	0.1	0.6 ^{a*}	0.1	0.4 ^b	0.0	0.4 ^b	0.0
22:2j	7.5	0.0	10.6 ^{a*}	0.3	7.5 ^b	0.5	6.9 ^b	0.7
18:2(n-6)	0.5	0.1	0.4 ^a	0.0	1.8 ^{b*}	0.1	2.6 ^{c*}	0.1
18:3(n-6)	0.1	0.0	0.3 ^{a*}	0.0	0.1 ^b	0.0	0.2 ^{c*}	0.0
20:2(n-6)	0.2	0.0	0.1 ^{a*}	0.0	0.4 ^{b*}	0.0	0.6 ^{c*}	0.0
20:3(n-6)	0.1	0.0	0.1 ^{a*}	0.0	0.1 ^{a*}	0.0	0.3 ^{b*}	0.1
20:4(n-6)	7.2	0.4	10.3 ^{a*}	0.3	7.9 ^b	0.5	6.0 ^{c*}	0.2
22:4(n-6)	1.1	0.0	0.8 ^{a*}	0.0	1.0 ^b	0.1	0.7 ^{a*}	0.0
22:5(n-6)	0.8	0.1	0.3 ^{a*}	0.0	0.7 ^{b*}	0.0	5.4 ^{c*}	0.7
18:3(n-3)	0.3	0.0	0.1 ^{a*}	0.0	2.4 ^{b*}	0.1	1.2 ^{c*}	0.1
18:4(n-3)	0.5	0.1	0.7 ^a	0.4	0.9 ^a	0.4	1.7 ^{b*}	0.1
20:4(n-3)	0.1	0.0	0.1 ^{a*}	0.0	0.3 ^{b*}	0.0	0.2 ^{c*}	0.0
20:5(n-3)	17.0	0.6	18.3 ^a	0.6	16.7 ^a	0.9	5.6 ^{b*}	0.5
22:5(n-3)	2.8	0.0	1.6 ^{a*}	0.1	2.4 ^{b*}	0.1	0.9 ^{c*}	0.2
22:6(n-3)	20.8	0.6	9.6 ^{a*}	0.4	14.6 ^{b*}	0.9	23.7 ^{c*}	1.9
TO. SAFA	17.2	1.5	19.6 ^a	2.1	16.7 ^b	0.7	19.0 ^a	0.9
TO. MUFA	19.8	0.5	24.8 ^{a*}	1.5	20 ^b	1.5	20.2 ^b	1.7
TO. PUFA	63.0	1.1	55.6 ^{a*}	1.4	63.3 ^b	1.5	60.8 ^b	1.4
TO.(n-6)	10.0	0.5	12.2 ^{a*}	0.3	12.0 ^{a*}	0.6	15.8 ^{b*}	0.8
TO.(n-3)	42.8	0.8	31.1 ^{a*}	1.2	39.2 ^{b*}	0.4	34.4 ^{c*}	1.3
TO. NMIs	9.8	0.2	12.0 ^{a*}	0.3	12.0 ^{a*}	0.5	10.6 ^b	0.9

TO. SAFA = Total Saturated Fatty Acids; TO. MUFA = Total Mono-Unsaturated Fatty Acids; TO. PUFA = Total Poly-Unsaturated Fatty Acids; TO. NMIs = Total Non Methylene Interrupted Fatty Acids; 20:2i = 20:2Δ5,11 ; 22:2i = 22:2Δ7,13 ; 20:2j = 20:2Δ5,13 ; 22:2j = 22:2Δ7,15

Table 4 : Fatty acid composition of gill polar lipids of *Ruditapes philippinarum* during the dietary conditioning, expressed in weight percentage of the total fatty acids of the fraction. Different lower-case letters indicate significant differences between dietary treatment at the end of the conditioning (ANOVA $p < 0.05$). Asterisks indicate significant differences with the initial composition (T-Test $p < 0.05$).

Fatty acids	Initial		After 8 weeks of dietary conditioning					
			<i>C. calcitrans</i>		<i>T. suecica</i>		T-Iso	
	n=3		n=3		n=2		n=3	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
20:1(n-11)	2.6	0.0	3.9 ^{a*}	0.4	3.7 ^{a*}	0.5	2.2 ^b	0.3
18:1(n-9)	1.4	0.1	1.1 ^{a*}	0.1	3.0 ^{b*}	0.2	3.8 ^{c*}	0.3
20:1(n-9)	2.3	0.1	1.5 ^{a*}	0.3	3.4 ^{b*}	0.4	4.1 ^{b*}	0.3
20:2i	0.1	0.0	0.2 ^{a*}	0.0	0.2 ^{a*}	0.0	0.1 ^b	0.0
22:2i	3.1	0.2	1.7 ^{a*}	0.2	4.8 ^{b*}	0.7	4.6 ^{b*}	0.6
16:1(n-7)	2.1	0.2	3.3 ^a	1.0	2.4 ^a	0.9	1.8 ^a	0.7
18:1(n-7)	1.1	0.0	1.6 ^{a*}	0.4	1.6 ^{a*}	0.2	1.3 ^a	0.4
20:1(n-7)	1.7	0.2	2.6 ^{a*}	0.2	1.2 ^{b*}	0.1	0.7 ^{c*}	0.1
20:2j	0.6	0.2	0.8 ^{a*}	0.1	0.8 ^{a*}	0.0	0.4 ^{b*}	0.0
22:2j	7.6	0.0	8.2 ^a	1.3	7.0 ^a	0.9	3.5 ^{b*}	0.4
18:2(n-6)	0.2	0.0	0.1 ^{a*}	0.0	0.5 ^{b*}	0.1	1.1 ^{c*}	0.1
18:3(n-6)	0.1	0.0	0.1 ^{a*}	0.0	0.0 ^{b*}	0.0	0.1 ^c	0.0
20:2(n-6)	1.7	0.1	1.2 ^{a*}	0.1	2.2 ^{b*}	0.2	4.6 ^{c*}	0.3
20:3(n-6)	0.2	0.0	0.4 ^{a*}	0.1	0.2 ^b	0.0	0.3 ^{a*}	0.1
20:4(n-6)	4.8	0.1	7.2 ^{a*}	0.9	5.2 ^b	0.4	4.0 ^{c*}	0.3
22:4(n-6)	3.2	0.1	4.4 ^{a*}	0.7	3.4 ^b	0.2	1.6 ^{c*}	0.1
22:5(n-6)	2.0	0.1	1.3 ^{a*}	0.2	2.1 ^b	0.1	7.5 ^{c*}	0.6
18:3(n-3)	0.3	0.1	0.0 ^{a*}	0.0	1.1 ^{b*}	0.2	0.8 ^{c*}	0.0
18:4(n-3)	0.5	0.1	0.2 ^{a*}	0.2	0.5 ^b	0.2	0.9 ^{b*}	0.1
20:4(n-3)	0.3	0.0	0.1 ^{a*}	0.0	0.3 ^b	0.0	0.3 ^b	0.0
20:5(n-3)	6.2	0.3	9.7 ^{a*}	1.1	5.1 ^{b*}	0.6	1.4 ^{c*}	0.3
22:5(n-3)	3.2	0.2	2.3 ^{a*}	0.3	2.5 ^{a*}	0.2	0.9 ^{b*}	0.1
22:6(n-3)	26.3	0.7	11.2 ^{a*}	1.3	15.4 ^{b*}	1.0	20.9 ^{c*}	1.4
TO. SAFA	19.8	1.4	19.2 ^{ab}	1.9	17.3 ^{b*}	0.7	20.9 ^a	0.4
TO. MUFA	15.6	0.6	29.2 ^{a*}	1.1	28.4 ^{a*}	1.1	23.4 ^{b*}	0.9
TO. PUFA	64.6	1.2	51.6 ^{a*}	6.7	54.3 ^{a*}	4.6	55.7 ^{a*}	4.1
TO.(n-6)	12.2	0.2	14.8 ^{a*}	1.9	13.5 ^{a*}	1.0	19.2 ^{b*}	1.2
TO.(n-3)	40.9	0.9	25.6 ^{a*}	3.1	28.0 ^{a*}	2.0	27.9 ^{a*}	2.0
TO. NMIs	11.3	0.2	10.9 ^{ab}	1.7	12.8 ^a	1.7	8.6 ^{b*}	1.0

TO. SAFA = Total Saturated Fatty Acids; TO. MUFA = Total Mono-Unsaturated Fatty Acids; TO. PUFA = Total Poly-Unsaturated Fatty Acids; TO. NMIs = Total Non Methylene Interrupted Fatty Acids; 20:2i = 20:2Δ5,11 ; 22:2i = 22:2Δ7,13 ; 20:2j = 20:2Δ5,13 ; 22:2j = 22:2Δ7,15

Some FAs that made strong contributions to the above model are well known to be essential to bivalve development and/or specific to microalgal phylogenetic groups. Thus, more details on their specific incorporation and synthesis according to diet and bivalve species are provided in the following paragraphs: 1) changes in 22:6(n-3), 20:5(n-3) and 20:4(n-6) PUFAs; 2) changes of the 20-22 NMIs and their dietary precursors.

Changes in 22:6(n-3), 20:5(n-3) and 20:4(n-6) PUFAs in oyster and clam gills

The fatty acid profiles of gill polar lipids of both bivalve species fed *C. calcitrans* presented the highest content of 20:5(n-3) and 20:4(n-6) (Tables 3 and 4). Proportions of these two PUFAs were either maintained or greatly increased when compared to their initial values. Concomitantly, the deficiency in 22:6(n-3) of *C. calcitrans* led to a significant decrease (around 50%) of 22:6(n-3) in gill polar lipids of both species. Fatty acid profiles of oysters and clams fed *T-Iso* diet showed an inverse pattern of fatty acid changes. 22:6(n-3) contents of oyster and clam gills were maintained at the initial value whereas *T-Iso* deficiency in 20:5(n-3) and 20:4(n-6) led to a significant decrease of these fatty acids in gill polar lipids of both species. The loss of 20:4(n-6) in gill polar lipids represented 20% of their initial value for both species while the decrease of 20:5(n-3) was more marked and represented 70% and 80% of the initial value for oysters and clams respectively (Tables 3 and 4). Finally, oysters and clams fed *T. suecica* presented an intermediate fatty acid profile.

For the 20-22 carbons with more than 3 double bounds, the most noticeable difference between clams and oysters concerned the 20:5(n-3) percentage in gill polar lipids. Irrespective of diet and the duration of conditioning, oysters always had a higher 20:5(n-3) percentage, ranging from 5.6% to 18.3%, than clams, for which it ranged from 1.4% to 9.7%. Consequently, the 22:6(n-3) / 20:5(n-3) ratio was significantly higher for clams than it was in oysters, as both species have similar proportions of 22:6(n-3).

Changes of the 20-22 NMIs and their dietary precursors

20-22 NMIs accounted for a fairly high proportion of the PUFA in gill polar lipids of oysters and clams. When considering all dietary treatments, total NMI was quite stable and ranged from 9.8 to 12.0% in oysters but fluctuated more in clams where it varied from 8.6 to 12.8% of the total FAs (Table 3 and 4). 22:2j and 22:2i were the predominant NMIs in gill polar lipids of both species.

Fig. 3A and 3B : Interaction plots of species and dietary treatments with Principal Component 1 (PC1, A) and 2 (PC2, B) (Mean \pm 95% confidence interval) from the Principal Component Analysis of fatty acid percentages. MANOVA with species and diets as the independent variables showed that PC1 and PC2 can be significantly differentiated according to the species ($P < 0.001$) and to the diet composition ($P < 0.001$). Different lower-case letters indicate significant differences between dietary treatments. 4 and 8 weeks data were combined in these figures.

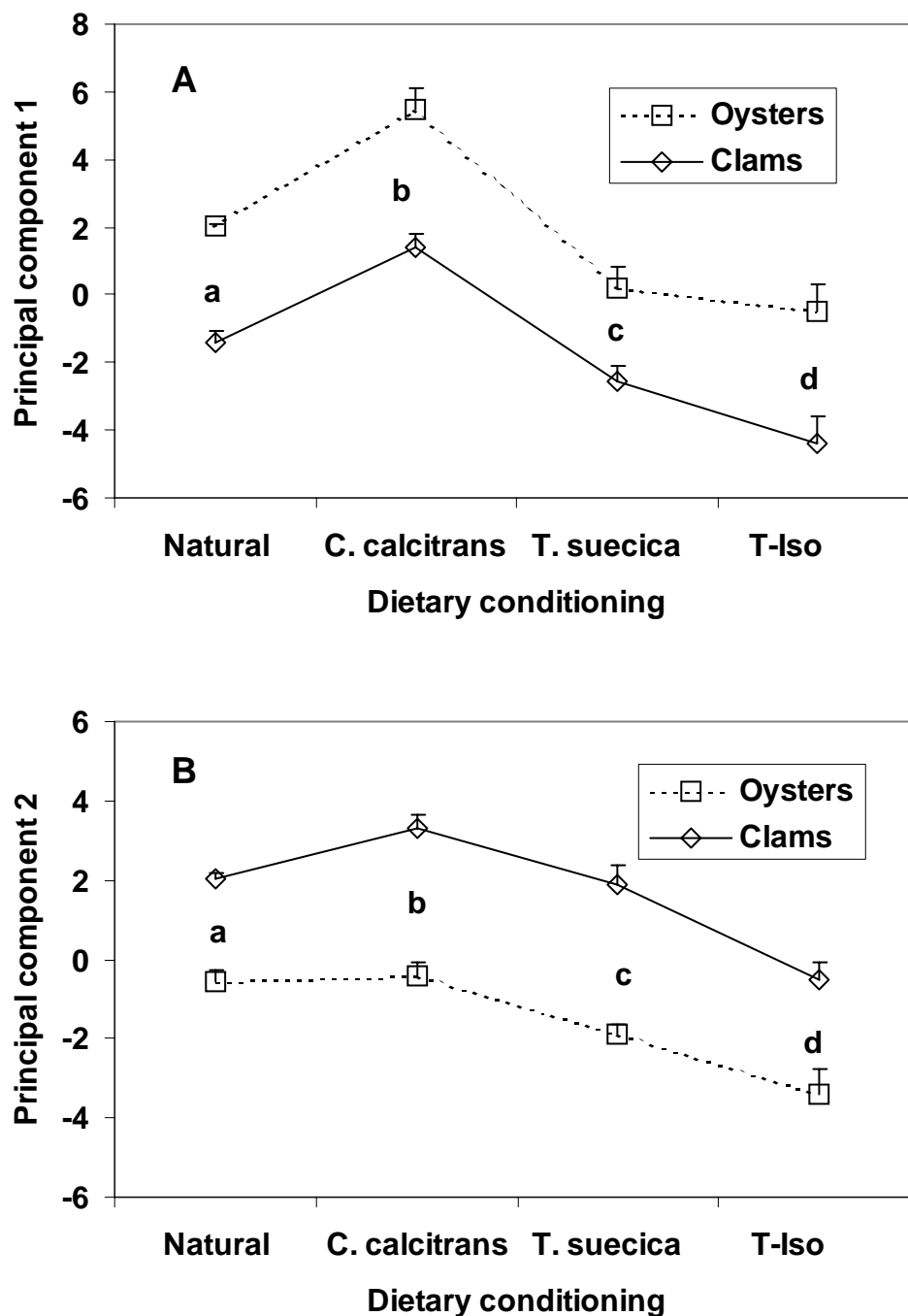
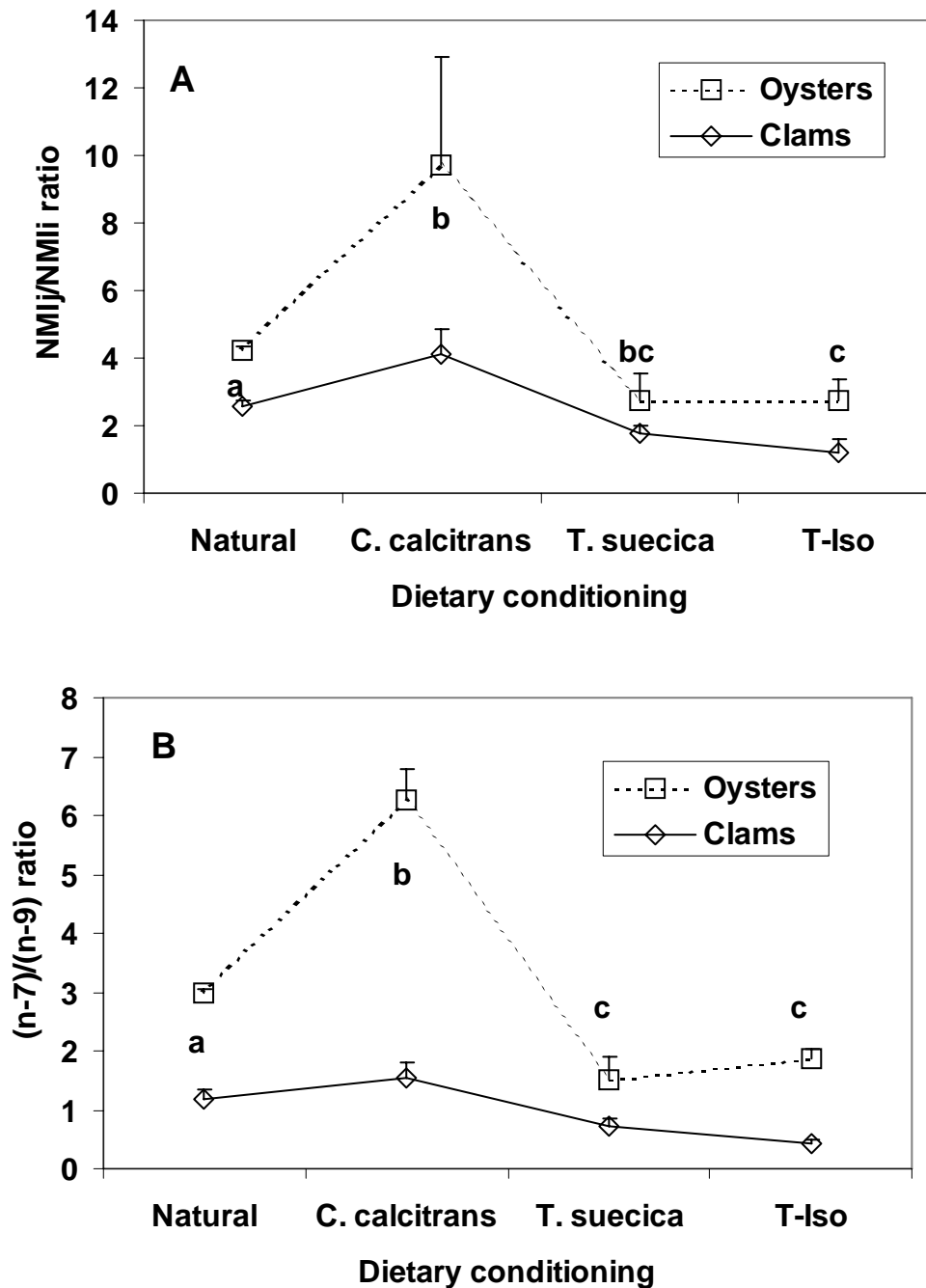


Fig. 4A and 4B : Interaction plots of species and dietary treatments with NMI_j / NMI_i ratio (A) and (n-7) / (n-9) ratio (B) (Mean \pm 95% confidence interval). MANOVA with species and diets as the independent variables showed that these ratio were significantly affected by the species ($P < 0.001$) and the dietary treatments ($P < 0.001$). Different lower-case letters indicate significant differences between dietary treatments. 4 and 8 weeks data were combined in these figures.



Considering 22:2 NMIs isomers individually, dietary conditioning affected their relative proportions. Feeding *T. suecica* and T-*Iso* resulted in an increase of the 22:2i NMI from 1.5% to above 3.0% in oysters and from 3.1% to 4.8% in clams after 8 weeks of conditioning. In contrast, feeding *C. calcitrans* decreased this NMI content from 1.5% to 0.6% in oysters and from 3.0% to 1.7% in clams. The 22:2j NMI content of gill polar lipids is differently affected by the dietary conditioning than the 22:2i. Oysters fed *C. calcitrans* for 8 weeks showed a 30% increase of 22:2j (10.6% at the end of the experiment) while clams fed the same diet did not show any changes of 22:2j content. Oysters fed *T. suecica* and T-*Iso* maintained their 22:2j content at 7.5% and 6.9%, values that are not significantly different from the initial level (7.5%). However, this NMI was observed to decrease by 50% in clams fed T-*Iso* and was maintained near its initial value when clams are fed *T. suecica*. Interestingly, 22:2i content is always higher in clams than in oysters irrespective of diet and duration of conditioning while the 22:2j content of oysters was equivalent to that of clams or higher. Consequently, the ratio NMI_j / NMI_i was consistently higher in oysters than in clams (Fig. 4A).

It is now well established that (n-7) FA series (16:1, 18:1, and 20:1) and (n-9) FA series (18:1 and 20:1) are the mono-unsaturated precursors for *de novo* synthesis of the j and i NMI series, respectively. Their proportions changed dramatically between hatchery cultivated micro-algae species. Thus, more details are provided below on these FAs according to dietary modifications and conditioned species. When clams and oysters are fed T-*Iso* or *T. suecica*, (n-9) rich diets, their content in 18:1(n-9) and 20:1(n-9) increased by about 1.5-2-fold after 8 weeks of conditioning. In contrast, 16:1(n-7), 18:1(n-7) and 20:1(n-7) contents rose significantly in oysters and clams fed *C. calcitrans*, a (n-7) rich diet. Whatever the dietary conditioning, levels of (n-7) FA were always higher in oysters than in clams while (n-9) FAs were found in higher proportions in clams than in oysters. Thus, the (n-7) / (n-9) ratio was consistently higher in oysters than in clams (Fig. 4B) and paralleled the NMI j / i ratio (Fig. 4A and 4B).

Discussion

Several studies have reported that dietary quality affects the fatty acid composition of bivalves at different developmental stages (larvae to adults), including *C. gigas* (Pazos *et al.*, 1996 ; Knauer & Southgate, 1997; Caers *et al.*, 1999; Linehan *et al.*, 1999; Soudant *et al.*, 1999), *Ostrea edulis* (Abad *et al.*, 1995; Berntsson *et al.*, 1997), *R. philippinarum* (Caers *et al.*, 1999) and *Ruditapes decussatus* (Albentosa *et al.*, 1996; Fernández-Rieriz *et al.*, 1998, 1999). However, although these species respond in a similar way to dietary changes, their ability to regulate and modify the FA dietary inputs are difficult to compare. Effectively, various parameters differed among these studies: conditioning temperature, experiment duration, experimental facilities and lipid separation. The present study aimed to report changes of gill fatty acid profiles of two species *C. gigas* and *R. philippinarum* experiencing 3 mono-specific diets (*T-Iso*, *T. suecica*, *C. calcitrans*) in the same experimental conditions, and then to compare the retention and modification of the PUFA composition by the two species.

Regulatory processes of FA composition in bivalves are especially pronounced in the phospholipid compartment when animals experience dietary modifications (Soudant *et al.*, 1996b; Soudant *et al.*, 1997; Soudant *et al.*, 1998). Since polar lipids are primarily composed of phospholipids in bivalves (Ackman, 1983), the presented results were limited to the fatty acid composition of the gill polar lipids. In addition, gills represent an interesting model as this organ maintained high levels of polar lipids in both species (80 to 95% of total lipids) during the different dietary treatments. Also the membrane of gills are especially exposed to the physiochemical changes of their environment. Their lipid composition is thought to be determinant to an efficient adaptation of the bivalves to the environmental changes.

From the present experiment, most of the individual FA of both species were significantly affected by the dietary treatments. However, comparisons of species specific responses were difficult since the initial composition of clams and oysters were different. As this point, it is impossible to determine whether these initial differences reflected species characteristics or just dietary inputs in the culture sites where animals were collected. Thus, to better discriminate the species characteristic (FA requirement and FA metabolism) and dietary impact, a principal component analysis (PCA) was performed. This analysis generated a small number of linear combinations of the 20 FA variables and extracted only 4

components. The 2 first components accounted for 72% of the variability in the data. Thus, the plot of component 1 and 2 weights separated the individual data according to species and dietary treatments. The differences in FA profiles could be attributed as much to species as to the diet inputs (MANOVA on components 1 and 2 of the PCA (Fig. 3A and 3B)). The observed differences in the gill FA profiles between the two species are likely to result from an intrinsic species difference. This strongly suggests that comparisons of FA requirements and metabolism between species have to be done with caution. The above approach could be also be of further interest to scientists intending to characterise food inputs of bivalves from natural populations as they play a major role in marine trophic chains. For example, applying such model on a new FA profile may help to determine whether the animal had previously fed on diatoms or flagellates.

This analysis identifies FAs that not only contributed significantly to the PCA but that are also well known to be regulated in bivalve phospholipids (Marty *et al.*, 1992; Delaunay *et al.*, 1993; Soudant *et al.*, 1999); namely the 22:6(n-3), the 20:5(n-3) and the 20:4(n-6) PUFAs and the NMI 22 FAs. In this study, only T-*Iso* and *C. calcitrans* dietary treatments allowed clams and oysters to grow or at least maintain their body mass. Thus, PUFA incorporation, modification and NMI *de novo* synthesis can be realistically considered for these two dietary treatments, and make possible the comparison between oysters and clams.

It is currently agreed that 22:6(n-3), 20:5(n-3), and 20:4(n-6) PUFAs originate mainly from the phytoplanktonic diet as bivalves have a limited or total inability to synthesize them (De Moreno *et al.*, 1976; Waldock & Holland, 1984). Thus, dietary conditionings with mono-specific micro-algae diet allowed for the comparison of the capabilities of oysters and clams to regulate, protect and/or convert these dietary essential PUFAs (EFAs). The results showed that 22:6(n-3), 20:5(n-3) and 20:4(n-6) contents were well regulated (up or down) in gill polar lipids of oysters and in clams fed these mono-specific diets. Briefly, oysters and clams fed *C. calcitrans* increased or maintained the proportions of 20:5(n-3) and 20:4(n-6) in their polar lipids, while a reduction in these PUFAs was noted for animals fed T-*Iso*. Conversely, T-*Iso*, which provided high amount of 22:6(n-3) in comparison with the two other diets, allowed oysters and clams to maintain this PUFA in their polar lipids. The observed regulation of EFA contents in gill polar lipids agreed with previous studies conducted on other tissues, as well as larvae and spat (Delaunay *et al.*, 1993; Soudant *et al.*, 1996a; Soudant *et al.*, 1996b; Berntsson *et al.*, 1997; Soudant *et al.*, 1997; Soudant *et al.*, 1999).

Levels of 20:5(n-3) in gill polar lipids of animals experiencing mono-specific dietary treatments appeared to be species specific. Oysters maintained their 20:5(n-3) content in their gill polar lipids during all the experiment (around 18%) while in clams after 4 weeks of dietary conditioning, the 20:5(n-3) content reached a maximum value of 10%. This content did not increase further through the duration of the experiment. Values around 10% could represent the highest possible proportion of 20:5(n-3) in clam polar lipids as these are similar to what Porteres (1991) and Caers *et al.* (1998) found in *R. philippinarum* spat undergoing dietary treatments. This differential behaviour between clams and oysters maybe also partially due to a lower initial content of 20:5(n-3) in clams. When diets were deficient in 20:5(n-3), its values fell to as low as 5.6% in oysters and 1.4% in clams fed T-*Iso*. Overall, oysters always showed a higher 20:5(n-3) content than clams. Such interspecific differences in 20:5(n-3) may reflect specific requirements in relation to their natural biotopes, specific filtration/ingestion of diatoms and flagellates and/or genetic evolutions. It is also tempting to establish some parallel between gill structures and 20:5(n-3) percentage in gill polar lipids (Ruppert & Barnes, 1996). Oysters belong to the fillibranch group in which gill filaments are bound together with some interfilamentous tissue junctions whereas in the eulamellibranch group, like clams, all the filaments are bound and gill lamellae consist of solid sheets of tissue.

Contrary to 20:5(n-3), oysters and clams presented similar levels of 22:6(n-3) and 20:4(n-6) according to the dietary supply. Indeed when 22:6(n-3) was relatively abundant in the diet (T-*Iso*), this EFA appeared to reach a maximum in the polar lipids while its percentage never went below 10% in oysters or 11% in clams fed *C. calcitrans*. This PUFA is often the major PUFA in polar lipids of bivalves and is generally well preserved when animals are starved or fed a 22:6(n-3)-deficient diet (Delaunay, 1992; Delaunay *et al.*, 1993; Soudant *et al.*, 1996a; Soudant *et al.*, 1996b). High levels of 22:6(n-3) have been associated with better reproductive success and hatching rate in *P. maximus* suggesting that 22:6(n-3) may play a prominent role at a structural and functional level in cell membranes involved in oogenesis and embryogenesis (Soudant *et al.*, 1996a; Soudant *et al.*, 1996b). This EFA has been shown to be preferentially incorporated into specific phospholipid classes, namely cardiolipid and plasmalogens in different bivalve species and at different life stages (Soudant *et al.*, 1996b; Soudant *et al.*, 1997; Soudant *et al.*, 1998 ; Kraffe *et al.*, 2002). In mammals, two recent reviews have described 22:6(n-3) as a unique fatty acid linked in a positive way to important roles in modulating the local structure and function of cell membranes (Gawrisch *et al.*, 2003; Stillwell & Wassall, 2003). It has also been shown to be unequally distributed

between phospholipid classes. Interestingly, such observations made for 22:6(n-3) appear to affect unrelated species. Since the 22:6(n-3) levels found in oysters and clams were similar, it suggests that 22:6(n-3) might optimally “function” in the gill membrane at a level around 20% of total polar lipids for bivalves. Nevertheless, the specific role of 22:6(n-3) in bivalves and its regulation remains to be understood.

Similarly, in regard to 20:4(n-6) deficiency of T-*Iso*, both species seemed to maintain their 20:4(n-6) content in gill polar lipids (above 4% of the total fatty acids for clams and above 6% for oysters). Previously, Coutteau *et al.* (1996) also observed a selective retention of 20:4(n-6) by unfed juvenile *Placopecten magellanicus*. The retention of the 20:4(n-6) in gill phospholipids certainly reflected the importance of this PUFA considered as essential for growth, reproduction as well as for eicosanoid production and for immune responses (Bell & Sargent, 2003). At this point, it is unclear whether the maintenance of the 20:4(n-6) results from a very effective retention or from bioconversion of dietary 18:2(n-6) which is a predominant PUFA in T-*Iso*. Chu and Greaves (1991) demonstrated that the oyster *C. virginica* have some capability to elongate the 18:2(n-6) to 20:2(n-6). This agrees with the significant increase of 20:2(n-6) observed in gill polar lipids of oysters and clams fed T-*Iso* in the present study. However, no desaturation activity of 20:2(n-6) to 20:4(n-6) was reported in the study by Chu and Greaves (1991). On the contrary, Waldock and Holland (1984) showed a limited capability of young oysters to bioconvert the 18:2(n-6) of *Dunaleilla tertiolecta* in 20:4(n-6). The 18:2(n-6) content of *D. tertiolecta* was first elongated to 20:2(n-6) and then desaturated to 20:4(n-6). The contradictions between these two studies may be due to difference in methodology: injection of radioactive fatty acid in the pericardium (Chu & Greaves, 1991) vs feeding ¹⁴C labelled algae to young *C. gigas* (Waldock & Holland, 1984). Therefore, in the present study, the possibility that oysters and clams maintain their 20:4(n-6) contents by converting abundant 18:2(n-6) can not be excluded.

After the 22:6(n-3), 20:5(n-3) and 20:4(n-6), NMI FAs are the other PUFAs found in fairly high proportions in the phospholipids of several bivalve species including oysters and clams and are regularly linked to structural and functional roles in membranes. They are thought to be involved in membrane properties such as phase transition, membrane fluidity or activity of membrane bound proteins (Paradis & Ackman, 1977; Klingensmith, 1982; Kraffe *et al.*, 2004). Interestingly, among organs the highest proportion of NMI FAs were reported in gills (Klingensmith, 1982; Kraffe *et al.*, 2004). As first proposed by Ackman and Hooper and

demonstrated for the bivalve mollusks *Scapharca broughtoni* and *Mytilus edulis* by Zhukova 86, , NMI FAs are *de novo* synthesized by bivalves. The major precursors/intermediates for NMI synthesis are monoenoic acids 16:1, 18:1 and 20:1 (n-7) for the j series NMIs and 18:1 and 20:1 (n-9) for the i series NMIs (Zhukova, 1986, 1991). A C₂₀Δ₅ desaturation converts the 20:1(n-7) and 20:1(n-9), respectively, into 20:2j (Δ_{5,13}-20:2) and 20:2i (Δ_{5,11}-20:2) which are finally elongated, respectively, into 22:2j (Δ_{7,15}-22:2) and 22:2i (Δ_{7,13}-22:2).

In the present study, results showed that the 22:2 NMI synthesis of both species was affected by the dietary conditioning. Oysters and clams fed *C. calcitrans* would have more (n-7) available to produce extra 22:2j NMI. On the other hand, animals fed *T-Iso* found more (n-9) available in their diet to be converted in 22:2i NMI. It was also interesting to notice that the species differ in their capacity to synthesize NMI. Oysters seemed to use FA (n-7) preferentially or more efficiently FA (n-7) as compared to clams resulting in higher proportions of 20:2j and 22:2j when animals are fed on (n-7) rich diets. Opposite patterns were observed for the 20:2i and 22:2i NMI as clams maintained higher percentage of these FA and a lower NMI_j / NMI_i ratio than oysters when they are fed *T-Iso*, a (n-9) rich microalgae. Indeed, feeding clams with *T-Iso* resulted in an inversion of the 22:2j vs 22:2i distribution, with the 22:2i becoming the predominant NMI. At this point it can be stated that 22:2j and 22:2i synthesis seemed to be regulated not only by the incorporation of their precursor but also appeared to depend on the species tested.

The difference in NMI i and j synthesis and retention capabilities between both species could be the result of a species differentiation of desaturase and elongase enzyme specificity in NMI biosynthesis between the clam *R. philippinarum* and the oysters *C. gigas*. For instance, *R. philippinarum* seemed to possess a fatty acid elongation and desaturation systems permitting the synthesis of 22:2 NMID (Δ_{7,13} and Δ_{7,15}) fatty acids with a C₂₀Δ₅ desaturase which could have developed a higher “Δ₁₃ specificity” compare to *C. gigas*. Also, it is important to notice that (n-7) / (n-9) ratio was systematically higher in oysters than clams for all the dietary treatments. These differences in (n-7) vs (n-9) may reflect specific precursor requirements for NMI synthesis or simply specific filtration/ingestion behaviours when animals are exposed to diatoms and flagellates. It is especially difficult to explain the physiological consequences of these observations as the functions of NMIs are far from being clearly understood. NMI FAs were supposed to confer resistance in tissues exposed most often to the environmental physico-chemical variations (Klingensmith, 1982) or against attack

by microbial lipases (Paradis & Ackman, 1977). The high content of NMI FAs encountered in bivalve gills was also hypothesized to be related to the above functions (Kraffe *et al.*, 2004). These authors also provided first evidences that NMIs were the predominant PUFA of the aminoplasmalogens (alkenyl-acyl-glycerophosphatidylserine and alkenyl-acyl-glycerophosphatidylethanolamine). The selective incorporation of Σ NMI in aminoplasmalogens led the authors to hypothesize the existence of possible synergistic properties of NMIs and plasmalogens implicating them in biological membrane functions.

In conclusion, when clams and oysters were conditioned with mono-specific diets of different FA composition, marked variations of their gill polar lipid composition were observed. Although a similar dietary imprint was observed for both species, the FA profile of the gills appeared to be species specific. Oysters always had higher 20:5(n-3) content in gill polar lipids and higher 22:2j / 22:i and (n-7) / (n-9) ratio than clams. These differences in the gill lipid profiles are speculated to result from intrinsic species characteristics and perhaps from a phylogenetic group characteristic: Fillibranch vs Eulamellibranch. Further studies are needed to validate this phylogenetic hypothesis by comparing the lipid profiles of more species belonging to the two groups. Moreover, it is essential to determine whether these differences reflect not only specific metabolic and biochemical pathways but also specific feeding behaviours (filtration/ingestion) when facing dietary variations.

Acknowledgements

The authors would like to thank Eric Lund for the critical review of this manuscript. This work was supported by a grant from IFREMER (Brest, France), Région Bretagne and **contribution N°XXXX of the IUEM, European Institute for Marine Studies (Brest, France).**

References

- Abad, M., Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G., Sanchez, J.L., 1995. Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oysters, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Comp. Biochem. Physiol.* 110 C, 109-118.
- Ackman, R.G., 1983. Fatty acid metabolism of bivalves. *J. Biochem.* 220, 345-360.
- Ackman, R.G., Hooper, S.N., 1973. Non-methylene-interrupted fatty acids in lipids of shallow-water marine invertebrates: a comparison of two molluscs (*Littorina littorea* and

Lunatia triseriata) with the sand shrimp (*Crangon septemspinosus*). Comp. Biochem. Physiol. 46 B, 153-165.

Albentosa, M., Perez-Camacho, A., Labarta, U., Fernandez-Reiriz, M.J., 1996. Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. Aquaculture. 148, 11-23.

Bell, J.G., Sargent, J.R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture. 218, 491-499.

Berntsson, K.M., Jonsson, P.R., Wängberg, S.A., Carlsson, A.S., 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Aquaculture. 154, 139-153.

Caers, M., Coutteau, P., Lombeida, P., Sorgeloos, P., 1998. The effect of lipid emulsion on growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* spat. Aquaculture. 162, 287-299.

Caers, M., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. Aquaculture. 170, 307-322.

Chu, F.-L.E., Greaves, J., 1991. Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. Mar. Biol. 110, 229-236.

Chu, F.L.E., Webb, K.L., 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. Lipids. 19, 815-820.

Coutteau, P., Castell, J.D., Ackman, R.G., Sorgeloos, P., 1996. The use of lipid emulsions as carriers for essential fatty acid in bivalves: A test case with juvenile *Placopecten magellanicus*. Journal of Shellfish Research. 15, 259-264.

De Moreno, J.E.A., Moreno, V.J., Brenner, R.R., 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides* : 2-Polyunsaturated fatty acid metabolism. Lipids. 11, 561-566.

De Moreno, J.E.A., Moreno, V.J., Brenner, R.R., 1977. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroide* : 3 - saturated fatty acids and acetate metabolism. Lipids. 12, 804-808.

Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain, J.-F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalves species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. Journal of Experimental Biology. 206, 3053-3064.

Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 163, 209-219.

Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 173, 163-179.

Fernandez-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M., Perez-camacho, A., 1998. Effect of microalgal diets and commercial wheatgerm flours on the lipid profile of *Ruditapes decussatus* spat. Comp. Biochem. Physiol. 124 B, 369-377.

Fernandez-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M., Perez-Camacho, A., 1999. Lipid profile and growth of the clam spat, *Ruditapes decussatus* (L), fed with microalgal diets and cornstarch. *Comp. Biochem. Physiol.* 124 B, 309-318.

Gawrisch, K., Eldho, N.V., Holte, L.L., 2003. The structure of DHA in phospholipid membranes. *Lipids.* 38, 445-452.

Klingensmith, J.S., 1982. Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). *Lipids.* 17, 976-981.

Knauer, J., Southgate, P.C., 1997. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. *Aquaculture.* 154, 293-303.

Kraffe, E., Soudant, P., Marty, Y., 2004. Fatty acid composition of serine, ethanolamine and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids.* 39, 59-66.

Kraffe, E., Soudant, P., Marty, Y., Kervarec, N., Guenot, P., 2002. Evidence of a tetradocosahexaenoic form of cardiolipin in some marine bivalves. *Lipids.* 37, 507-514.

Langdon, C.J., Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 61, 431-448.

Linehan, L.G., O'Connor, T.P., Burnell, G., 1999. Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Food Chemistry.* 64, 211-214.

Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Change in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 221-234.

Metcalf, L.D., Schmitz, A.A., 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 33, 363-364.

Paradis, M., Ackman, R.G., 1977. Potential for employing the distribution of anomalous NMI dienoic fatty acids in several marine invertebrates as part of food web studies. *Lipids.* 12, 170-176.

Pazos, A.J., Roman, G., Acosta, C.P., Abad, M., Sanchez, J.L., 1996. Influence of the gametogenic cycle on the biochemical composition of the ovary of the great scallop. *Aquaculture International.* 4, 201-213.

Porteres, G.A., 1991. Changes in fatty acid composition in *Ruditapes philippinarum* A & R (Veneridae) fed on industrial yeast. *Comp. Biochem. Physiol.* 100 A, 211-215.

Soudant, P., Chu, F.L.E., Samain, J.F., 2000. Lipids requirements in some economically important marine bivalves. *National Shellfisheries Association.* 19, 605.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Masski, H., Samain, J.F., 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 121 A, 279-288.

Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quéré, C., Le Coz, J.R., Samain, J.F., 1996 a. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture.* 143, 361-378.

Soudant, P., Moal, J., Marty, Y., Samain, J.F., 1996 b. Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 205, 149-163.

Soudant, P., Moal, J., Marty, Y., Samain, J.F., 1997. Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.). Effect of nutrition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 215, 103-114.

Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. 123 B, 209-222.

Stillwell, W., Wassall, S.R., 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. Chem. Phys. Lipids. 126, 1-27.

Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., Garland, C.D., 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 128, 219-240.

Waldock, M.J., Holland, D.L., 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas* : polyunsaturated fatty acids. Lipids. 19, 332-336.

Zhukova, N.V., 1986. Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acid from [¹⁴C]acetate in molluscs. Bioch. Biophys. Acta. 878, 131-133.

Zhukova, N.V., 1991. The pathway of the biosynthesis of the non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. Comp. Biochem. Physiol. 100 B, 801-804.

Annexe 5

Composition en acide gras des lipides polaires des branchies des huîtres conditionnées à Argenton lors d'une expérimentation de supplémentation en acide arachidonique sur une période courte (7 jours). Trois dose d'AA ont été testées : 0.0 µg AA / ml, 0.20 µg AA / ml et 0.65 µg AA / ml .

	initial		7 jours					
			0 µg AA / ml		0.20 µg AA / ml		0.65 µg AA / ml	
	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.
14:0	1.0	0.2	1.3	0.1	1.1	0.2	1.1	0.2
16:0	11.0	0.5	10.9	0.5	10.5	0.5	11.0	0.4
18:0	6.1	0.3	5.3	0.2	5.5	0.0	5.8	0.2
20:0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0
22:0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0
24:0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
16:1(n-9)	0.1	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0
16:1(n-7)	2.1	0.4	2.2	0.1	2.0	0.1	2.1	0.1
18:1(n-9)	0.9	0.0	2.1	0.0	2.1	0.1	1.4	0.1
18:1(n-7)	3.2	0.3	4.1	0.1	4.6	0.2	3.8	0.2
20:1(n-11)	3.1	0.2	2.6	0.2	2.4	0.1	2.3	0.2
20:1(n-9)	1.2	0.2	1.3	0.4	1.4	0.1	1.4	0.2
20:1(n-7)	6.9	0.3	6.4	0.1	6.3	0.5	6.9	0.1
18:2(n-6)	0.5	0.1	3.0	0.0	2.8	0.2	1.6	0.2
18:3(n-3)	0.4	0.0	0.8	0.0	0.8	0.0	0.6	0.1
18:4(n-3)	0.8	0.0	1.1	0.0	1.0	0.0	0.8	0.1
20:2(n-6)	0.3	0.0	0.6	0.0	0.7	0.0	0.5	0.0
20:4(n-6)	3.3	0.1	3.9	0.2	8.2	1.0	10.1	0.9
20:5(n-3)	17.9	0.6	13.6	0.3	12.2	0.6	13.4	0.6
22:2i	1.9	0.1	1.8	0.0	1.6	0.1	1.5	0.1
22:2j	10.7	0.4	9.3	0.1	8.7	0.4	8.9	0.3

	initial		7 jours					
			0 µg AA / ml		0.20 µg AA / ml		0.65 µg AA / ml	
	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.
22:5(n-6)	0.5	0.1	1.5	0.1	1.1	0.9	1.5 0.8	0.1 0.1
22:5(n-3)	1.7	0.1	1.5	0.1	1.4	0.1	1.6	0.0
22:6(n-3)	17.1	1.3	18.0	0.8	16.7	0.7	14.9	0.2
Total saturés	20.7	0.9	19.9	0.7	19.5	0.6	20.6	0.4
Total mono-insaturés	19.6	0.8	20.6	0.1	20.3	0.9	19.6	0.5
Total poly-insaturés	59.7	1.1	59.5	0.6	60.2	1.5	59.8	0.3
Total (n-6)	6.0	0.2	10.5	0.3	14.6	2.2	15.3	0.9
Total (n-3)	39.5	1.3	36.4	0.5	33.5	1.1	32.7	0.8
Total NMI	13.6	0.6	12.1	0.2	11.6	0.3	11.4	0.4
(n-3)/(n-6)	6.6	0.3	3.5	0.0	2.3	0.4	2.1	0.2
22:6(n-3)/20:5(n-3)	1.0	0.1	1.3	0.1	1.4	0.1	1.1	0.0

Annexe 6

Composition en acide gras des lipides polaire des branchies des huîtres conditionnées à Argenton lors des expérimentations GIGAREPRO 1 et GIGAREPRO 2.

	GIGAREPRO 1						GIGAREPRO 2					
	Avril		Juillet		Octobre		Avril		Juin		Août	
	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.
16:0	1.2	0.4	1.4	0.4	1.6	0.3	1.0	0.1	1.8	0.4	2.2	0.4
18:0	11.2	1.3	10.5	0.4	10.6	0.3	13.3	0.6	11.8	0.9	11.3	0.7
20:0	4.6	0.3	4.3	0.6	3.6	0.6	5.9	0.3	6.7	0.5	5.9	0.4
22:0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.2	0.1	0.0	1.0	0.1	0.1	0.0
24:0	0.3	0.0	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1
	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
	1.3	0.5	0.1	0.2	0.2	0.0	0.1	0.2	0.9	0.2	0.2	0.2
16:1(n-7)	1.3	0.9	2.1	0.3	1.9	0.1	2.5	0.3	1.3	0.2	1.7	0.4
18:1(n-9)	1.7	0.3	2.0	0.3	2.2	0.3	1.2	0.2	1.5	0.1	1.8	0.3
18:1(n-7)	6.0	0.5	6.9	0.7	7.0	0.4	4.0	0.2	5.1	0.6	6.2	0.5
20:1(n-11)	1.8	0.2	2.6	0.8	2.3	0.1	2.3	0.4	4.0	0.3	5.0	0.4
20:1(n-9)	1.0	0.3	1.2	0.2	1.0	0.2	0.9	0.1	1.0	0.1	1.0	0.3
20:1(n-7)	5.5	0.2	4.6	0.3	4.4	0.4	6.6	0.3	5.8	0.4	5.4	0.2
18:2(n-6)	1.6	0.2	1.8	0.4	2.9	0.6	0.5	0.1	1.7	0.3	2.4	0.4
18:3(n-3)	0.9	0.1	0.7	0.2	0.8	0.1	0.6	0.1	0.6	0.1	0.6	0.1
18:4(n-3)	1.4	0.5	1.3	0.9	0.0	0.0	1.3	0.2	0.5	0.1	0.1	0.2
20:2(n-6)	0.5	0.3	0.4	0.1	0.5	0.1	0.5	0.2	0.4	0.0	0.4	0.1
20:4(n-6)	4.7	0.1	5.3	0.5	5.6	0.3	2.4	0.2	3.4	0.3	4.2	0.5
20:5(n-3)	17.7	0.8	12.9	1.2	14.5	2.7	15.5	1.4	13.4	1.1	13.4	2.0
22:2i	1.3	0.1	1.3	0.3	1.6	0.3	1.4	0.2	1.8	0.2	1.7	0.2
22:2j	8.3	0.7	7.6	1.0	6.8	0.7	11.3	0.6	10.1	0.7	9.7	0.6

	GIGAREPRO 1						GIGAREPRO 2					
	Avril		Juillet		Octobre		Avril		Juin		Août	
	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.	Moy.	SD.
22:5(n-6)	0.0	0.0	3.4	0.2	3.8	0.7	0.4	0.0	1.8	0.3	2.1	0.4
22:5(n-3)	1.1	0.1	0.9	0.1	0.8	0.2	1.5	0.1	0.9	0.1	1.0	0.1
22:6(n-3)	18.9	1.6	17.6	1.2	18.1	1.6	14.5	1.0	12.3	1.6	10.8 ^c	1.3
Total saturés	18.4	1.9	18.3	0.8	18.9	1.2	23.2	1.1	23.8	1.6	22.4	1.0
Total mono-insaturés	19.3	0.9	22.6	0.7	21.3	0.5	20.3	1.5	21.9	1.5	23.7	0.8
Total poly-insaturés	61.2	2.6	58.2	1.3	59.6 ^a	1.0	55.0	2.5	53.2	3.0	52.9	1.3
Total (n-6)	10.8	0.1	12.3	0.4	14.1	1.7	5.2	0.3	8.8	0.7	11.0	1.2
Total (n-3)	40.5	2.0	35.0	2.4	36.3	1.1	35.6	2.6	30.8	4.1	28.5	1.7
Total NMI	10.2	0.9	10.6	1.5	9.0	0.5	13.9	0.7	13.1	0.8	12.6	0.7
(n-3)/(n-6)	5.3	0.6	2.9	0.2	2.6	0.4	6.8	0.6	3.5	0.7	2.6	0.4
22:6(n-3)/20:5(n-3)	1.1	0.1	1.4	0.1	1.3	0.4	0.9	0.1	0.9	0.1	0.8	0.2

MODULATION DES PARAMETRES HEMOCYTAIRES PAR LA NUTRITION CHEZ L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*. IMPLICATION DANS LES MORTALITES ESTIVALES.

Résumé :

Cette étude réalisée dans le cadre des mortalités estivales de l'huître *C. gigas* montre que l'effort de reproduction, associé à une montée thermique, déprime les paramètres énergétiques (glucides, CEA) et hémycytaires (concentration, phagocytose, adhésion). L'augmentation de la ration alimentaire de 4% à 12% du poids sec de l'huître ne compense pas voir aggrave ces dépressions puisque l'excédant énergétique du régime 12% est alloué en priorité à la gamétogénèse. Par contre, après la gamétogénèse, la ration 12% favorise l'acquisition de réserves et corrélativement augmente la concentration en hémycytes. Les paramètres hémycytaires sont aussi sensibles à la qualité de la nourriture. Ainsi, l'apport de 20:4n-6 et/ou de 20:5n-3 par des microalgues ou aliments artificiels tend à augmenter le nombre d'hémycytes. Lorsque ces acides gras sont apportés séparément, il a été établi que le 20:4n-6 stimule la phagocytose et la production d'espèces actives de l'O₂ tandis que le 20:5n-3 les inhibe.

Abstract :

In the context of Pacific oyster *C. gigas* summer mortality, the present study demonstrated that the reproductive effort reduced not only the energetic parameters (carbohydrates and CEA) but also the immune parameters (concentration, phagocytosis and adhesive capacity of hemocytes). Increasing food supply from 4% to 12% (of oyster dry weight) did not counteract this phenomena as most of the additional energy was dedicated to the gametogenesis processes. However, after the gametogenesis, the 12% diet clearly favored energy storage restoration and hemocyte production. Hemocyte parameters were also modulated by the food quality. Indeed, hemocyte concentration tended to increase 20:5n-3 and/or 20:4n-6 were supplied by micro-algae or artificial diets. When these fatty acids were supplied separately, it has been demonstrated that 20:4n-6 stimulated phagocytic activity and reactive oxygen species production by hemocytes while 20:5n-3 inhibited it.