



HAL
open science

Étude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Jean-Philippe Béguel

► **To cite this version:**

Jean-Philippe Béguel. Étude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Biologie animale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2012. Français. NNT : 2012BRES0042 . tel-00838503

HAL Id: tel-00838503

<https://theses.hal.science/tel-00838503>

Submitted on 25 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Mention : Biologie Marine

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Jean-Philippe Béguel

Préparée à l'Institut Universitaire Européen
de la Mer, Laboratoire des Sciences de
l'Environnement Marin

**Etude de la capacité
antioxydante en lien avec
la reproduction chez
l'huître creuse
*Crassostrea gigas***

Thèse soutenue le 20 décembre 2012

devant le jury composé de :

Jérôme LA PEYRE

Associate professor, Louisiana State University, USA / *rapporteur*

Pascal FAVREL

Professeur, Université de Caen Basse Normandie / *rapporteur*

Vianney PICHEREAU

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *examineur*

Patrice GONZALEZ

Chargé de recherche, Université de Bordeaux 1 / *examineur*

Caroline FABILOUX

Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale /
encadrant scientifique

Christophe LAMBERT

Ingénieur de recherche, Université de Bretagne Occidentale /
directeur de thèse

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer
Mention : Biologie Marine

Thèse

**Etude de la capacité antioxydante
en lien avec la reproduction
chez l'huître creuse
*Crassostrea gigas***

Institut Universitaire Européen de la Mer
Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin

Jean-Philippe Béguel
20 Décembre 2012

Remerciements

Afin de n'oublier personne, je tiens à remercier tous ceux qui ont participé, à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de cette thèse.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR) de l'Université de Bretagne Occidentale. Je suis reconnaissant à Laurent Memery, ancien directeur du laboratoire, et Olivier Ragueneau, actuel directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe de recherche.

Durant ces trois années, j'ai bénéficié d'un financement de thèse accordé par la belle Région Bretagne et je la remercie, tout comme l'Ecole Doctorale des Sciences de la Mer (Fred Jean et Elisabeth Bondu).

J'exprime toute ma gratitude à Jérôme La Peyre et Pascal Favrel qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse ainsi qu'à Vianney Pichereau et Patrice Gonzalez pour leur participation à ce jury.

Ces trois ans de travail scientifique ont été un véritable bonheur et je le dois particulièrement à mes deux chefs, Caroline Fabioux et Christophe Lambert (le vrai). Merci à vous deux ! Merci d'avoir toujours été là pour me guider, me conseiller, répondre à mes interrogations (scientifiques ou pas). Je me suis toujours senti soutenu, je n'ai manqué de rien et j'ai toujours pu compter sur vous du début jusque la fin, même le week-end et pendant les vacances. Vous m'avez donné les moyens de réaliser une thèse sur un sujet que j'affectionne particulièrement, la reproduction (et en plus au bord de la mer), de toucher à toutes sortes de techniques toutes plus intéressantes les unes que les autres et je vous en suis reconnaissant. Caro, je te remercie pour ta bonne humeur permanente, ta gentillesse, ta disponibilité, tes conseils avisés et toutes les choses que tu m'as apprises. Christophe, je te remercie également pour ta bonne humeur permanente, ta gentillesse, ta disponibilité, tes corrections avisées et de souvent t'être occupé du côté « paperasse ». Vous m'avez fait confiance et j'ai même pu présenter mes premiers résultats outre-Atlantique. Vous ne m'avez jamais laissé tombé ni laissé sans réponse ce qui a rendu cette thèse très agréable à vivre même dans les moments intenses de rédaction. Je n'oublierai jamais ce que j'ai appris grâce à vous. Je ne vous oublierai jamais non plus. Vous êtes des personnes adorables, ne changez rien.

Pour rester dans les remerciements des « adultes » du LEMAR, je remercie Nelly (prononcez Neellay) Le Goïc pour sa drolitude, sa bonne humeur et son aide dès que j'en ai eu besoin. J'espère un jour essayer la balançoire. Merci à toi Philippe Soudant, tu étais également présent tout au long de ma thèse, que ce soit au labo, en courant, au badminton, dans un jacuzzi, dans un sauna...Oups, j'en dis peut-être un peu trop. En y réfléchissant, on n'a pas beaucoup parlé science tous les deux, mais on a bien rigolé. Merci à toi Doudou Kraffe, tes idées et conseils étaient les bienvenus, mais surtout, c'était sympa le baseball et je vais m'entraîner à fond pour les 10 000 euros en jeu lors du tournoi de Janvier. J'espère que c'est pas une blague, car maintenant je sais me servir d'une batte... Merci aux drôles de dames du secrétariat : Gene Cohat, tu déchires, garde la patate, Anne-So Podeur et Marie-Line Tanguy, grâce à qui l'administratif devient presque un plaisir. Une pensée également pour Morgane Gallinari, autre partenaire de course à pied que j'ai lâchée, promis je m'y remettrai.

De l'autre côté du grillage maintenant, toujours pour les grands. Je remercie tout particulièrement Arnaud Huvet qui a toujours répondu présent lorsque j'en avais besoin. Merci de tes conseils et avis qui m'ont toujours été d'une grande aide et de ton implication dans les travaux de cette thèse. Merci également de ton soutien et d'avoir été un des seuls (avec Philippe) à ne pas t'être moqué de ma coupe de cheveux. J'espère vraiment qu'un de ces quatre on va se la faire cette partie de squash. Merci à Virgile Quillien, toujours souriant, pour tous ses conseils et pour m'avoir initié à l'histologie quantitative, au speedminton et à la pêche aux ormeaux et à Jean-Yves Daniel pour m'avoir initié à l'Agilent et pour ses conseils toujours très utiles pour la bio mol. Merci à vous deux de m'avoir aidé à injecter mes petites bêtes. Je pense également à Charlotte Corporeau, toujours au taquet, pour son aide précieuse avec son tampon « miracle ». En ce qui concerne les exilés d'Argenton, toute ma gratitude va à l'ensemble de la station : Christian Mingant, René Robert, Isabelle Quéau, Luc Lebrun et ceux que j'oublie pour avoir accueilli ma première manip et s'être occupé de mes petites huîtres. Je remercie également Marc Suquet pour les bons moments passés ensemble, notamment dans la vase, ça je n'oublierai pas.

Enfin, pour les grandes personnes de la fac, je tiens à remercier tout particulièrement Elisabeth Poirier pour sa bonne humeur et son aide lors des TP, pendant mes deux années de monitorat. Prends bien soin de ma petite qPCR. Je remercie également l'ensemble de l'équipe Orphy, particulièrement Aline Amérand et Christine Moisan pour m'avoir initié à l'HPLC.

Avant de passer aux enfants, je remercie l'ado du groupe, Adeline Bidault, pour sa gentillesse, qui était toujours là pour me dépanner d'un produit et qui m'a initiée à la demande de devis.

Ces trois années n'aurait jamais été les mêmes sans toi mon petit Tigrou (Tony Dudognon). Inventeur du jeu du « Gnoup », goth sans histoires, co-locataire de bureau, tu as su me supporter, j'ai su t'apprivoiser, une histoire d'amitié sincère est née. Grâce à toi, la bonne humeur était toujours présente dans le bureau et j'ai toujours pu compter sur ton soutien dans les manip comme dans la vie. T'es un mec bien, ne change pas et courage, c'est bientôt ton tour. Autre co-locataire de bureau plus tardif, Rominou (Romain Lavaud), tu as su t'intégrer parfaitement dans cet univers paranormal du bureau B101, tu as également toujours été là quand il le fallait, t'es un vrai pote « Thank you sooo much »! C'est à toi que reviendront les clefs du bureau, fais en bon usage et garde son âme ! Je regrette juste qu'on n'ait pas fait plus de laser game que cela ! Dans un autre bureau : Cédricou (Cédric le Bris), vrai partenaire de Koh lanta, qui sait apprécier les émissions de culture générale (tellement vrai, tous différents...) à leur juste valeur, heureusement que tu étais là pour partager ces moments forts de la télé avec moi ! La ritale, Morgana Tagliarolo, qui a essayé de me faire danser la salsa, je n'oublierai pas de sitôt tes phrases cultes, fais attention à toi dans la brousse. Maloche (Malwenn Lassudrie), je te passe le flambeau pour le dosage du glutathion, j'espère que tu vas t'en sortir avec tes gènes de réf. Le bureau du haut : mon ptit Sébi (Sébastien Artigaud), co-inventeur du Split Pong (à quand le dépôt du brevet), merci pour les stats, tu gères, et surtout pour les gros câlins qui réconfortent. Merci pour tes paroles réconfortantes, rien que pour toi « Il vit deux frères, Simon, appelé Pierre, et André, son frère. » Ne change rien, t'es un amour. Milka ou K1000 (Camille Lacroix), merci de ta bonne humeur, du coup de main très utile dans la dernière ligne droite, tu fais à présent partie du manuscrit. Ne change rien, surtout ta coupe de cheveux (sinon je serai tout seul), t'es adorable. Marco (Marcaurelio Franzetti), mon Marco, si tu n'existais pas il faudrait t'inventer, qu'aurait été la vie à l'IUEM sans toi ? Je te remercie pour ta bonne humeur constante, tes blagues douteuses mais marrantes, ton phrasé légendaire et tes répliques cultes. Heureusement que tu étais là pour nous distraire de temps en temps. Merci à tous les autres du LEMAR : Violette Marchais, Vince

(Vincent Le Garrec), Marc Long... Enfin, merci à ma padawan Mélanie Mercier, je te souhaite plein de bonnes choses et plein de réussite, courage. Tu as énormément de potentiel et je crois en toi.

Du côté LMEE, je ne saurais que dire du prophète du grand nord, le très reconnu Joonas Parikka, à part que t'es un vrai fou et un vrai copain. Je te remercie pour tous ces bons moments passés ensemble. Ta philosophie Finno-belge et ta grosse voix me manqueront. Tu as toujours été là pour mettre l'ambiance et bien plus. Courage pour la dernière ligne droite. On reste en contact mon pote. Ju (Julien Lossouarn), le Don Juan de ces dames, si si, fais pas ton modeste, tu es quelqu'un d'adorable et d'agréable, toujours souriant, ne changes pas et n'oublie pas ta promesse. Une pensée à Grégou (Grégoire Michoud), Maria Ciobanu et Frédéric Gaboyer. Et pour finir cette partie du couloir : Paupau (Pauline Vannier) la chef des chefs, je pense à toi dans ces moments pas faciles et je t'apporte tout mon soutien comme tu as su m'apporter le tien. Je te remercie pour ta gentillesse, ton sourire et tes délicieux macarons ! Je te conseille d'en ouvrir un commerce. En attendant tiens le coup copine, c'est bientôt fini. Tu me manqueras mais t'inquiètes pas on viendra te voir (sauf si on part loin aussi).

Pour la partie Ifremer, je ne saurais trouver les mots pour parler de mon jumeau, mon alter-ego, le si célèbre Bichon (Eric Guévelou dans le civil). Je ne connaissais même pas ton vrai nom que déjà nous étions amis. Tu es devenu mon confident, on s'est envoyé en l'air (en parachute) et je t'ai fait découvrir Dragon Ball Z. Je n'oublierai jamais nos folles escapades, nos délires, nos grandes parties de poilade et j'en passe ! On est allé à NY mec ! Je te remercie pour ton soutien, ton aide, tes conseils, ton amitié ! T'es comme un frère, un gros nounours, un super Baloo. Per Sempre mon ami et SPQR. Merci à Joana Sousa et Myrina Boulais (t'as pas oublié ton shampoing ?) pour nous avoir supporté.

Merci à tous ceux qui étaient là mais qui ne le sont plus (ou qui sont revenus) : Rossana Sussarellu, mon maître Elodie Fleury, Franck Brulle, Fanny Jeffroy (ma nounou du Québec), Isabelle Calves, Edouard Lavergne, Mélanie Raimonet, Caro Nérot, Criniannian (Christian Beuvarde), Mélanou... et bien sûr Mathias Lama Lama (à poil Mathias !).

J'ai une pensée toute particulière et émue pour mon Ludo, Doc (Ludovic Donaghy). Je te remercie pour ton soutien, tes conseils, nos parties de Guitar Hero endiablées, nos petites soirées tranquilles. Tu es quelqu'un que j'apprécie énormément. Tu m'as manqué mais t'inquiètes pas, on arrive bientôt !

Merci à tous pour tous les coups de main dans les manips et pour les moments de détente, les apéros, les restos, les soirées, les déguisements, les parties de ping-pong... Merci pour votre bonne humeur. Pour les prochains sur la liste : courage, pour les autres : bonne continuation. Et un remerciement spécial aux 1-κ, qu'on ne sait toujours pas qui c'est.

Merci à mes amis qui n'étaient pas avec moi physiquement pendant ces trois ans mais que je n'ai pas oublié : Aurélien, Jérôme, Nico, Claire et les potes de prépa. A mon Rocky qui ne m'a pas beaucoup vu ces derniers temps.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement Chloé Carpot, mon amour, qui a toujours été là pour me soutenir et qui m'a tant apporté et aidé. Elle a été un soutien sans faille et inconditionnel tout au long de cette aventure. C'est pourquoi, je lui dédie cette thèse ainsi qu'à ma famille qui m'a toujours poussé et soutenu dans la vie. C'est grâce à vous que j'en suis là. Pour vous : mes Grands-parents, Papa et Maman et mes frangins : Raphaël, Xavier et Geoffrey,

Trugarez

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
1 Les espèces réactives de l’oxygène et les systèmes antioxydants.....	3
1.1 Le paradoxe de l’oxygène	3
1.2 Les espèces réactives de l’oxygène.....	5
1.3 Les systèmes antioxydants	7
1.3.1 Les systèmes non-enzymatiques	7
1.3.2 Les systèmes enzymatiques.....	11
2 Le stress oxydant.....	13
2.1 Définition	13
2.2 Les causes d’un stress oxydant.....	15
2.3 Stress oxydant et reproduction	17
2.4 Les conséquences d’un stress oxydant.....	19
2.5 Stress oxydant en milieu marin	20
3 L’huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	25
3.1 Systématique, répartition et écologie	25
3.2 Anatomie	27
3.3 Les mécanismes de défense de <i>Crassostrea gigas</i>	29
3.3.1 Le système immunitaire	29
3.3.2 Production de ROS et défenses antioxydantes.....	30
3.4 Reproduction.....	33
3.4.1 L’hermaphrodisme.....	33
3.4.2 La gonade et son développement	33
3.5. <i>Crassostrea gigas</i> , enjeux commerciaux et mortalités estivales.....	37
4. Contexte de l’étude et objectifs.....	39

PREMIER CHAPITRE : Etude de la capacité antioxydante dans les branchies de <i>Crassostrea gigas</i> en fonction de son investissement reproducteur	43
1. Introduction à l'étude	45
2. Article 1	46
3. Conclusions et ouvertures	56
SECOND CHAPITRE : Etude de la capacité antioxydante de la gonade de <i>Crassostrea gigas</i>	59
1. Introduction à l'étude	61
2. Article 2	62
3. Conclusions et ouvertures	85
TROISIEME CHAPITRE : Etude de la capacité antioxydante des gamètes de <i>Crassostrea gigas</i>	87
1. Introduction à l'étude	89
2. Article 3	90
3. Conclusions et ouvertures	123
DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	125
1. Discussion générale	127
2. Conclusions et perspectives	140
BIBLIOGRAPHIE	145



Liste des tables et figures

Tableau 1 : Liste des études montrant la production de ROS <i>in situ</i> ou en laboratoire par certains composants et les marqueurs de stress oxydant utilisés chez des mollusques bivalves.	22
Figure 1 : Représentation schématique d'une mitochondrie et de la chaîne respiratoire	4
Figure 2 : Les principales enzymes antioxydantes	10
Figure 3 : Origine, régulation et effets des ROS	14
Figure 4 : Différences de production de ROS en fonction de la nature du stress	16
Figure 5 : Modèle des seuils de tolérance thermique pour les organismes marins ectothermes et leur implication dans le déclenchement des capacités antioxydantes et l'apparition d'un stress oxydant	24
Figure 6 : L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> non ouverte (à gauche) et ouverte dans sa valve gauche, valve droite enlevée (à droite).....	26
Figure 7 : Anatomie générale de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> dans sa valve gauche.	26
Figure 8 : Granulocyte (A) et hyalinocyte (B) observés en microscopie à contraste d'interférence différentielle	28
Figure 9 : Chronologie des grandes étapes du cycle de reproduction de <i>Crassostrea gigas</i> en milieu tempéré.....	32
Figure 10 : Maturation gonadique chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	34
Figure 11 : Organisation des tubules gonadiques mâles et femelles de <i>Crassostrea gigas</i> pendant la gamétogenèse.....	36

Liste des abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique
- AMPK: AMP-activated protein kinase
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- ATP : adénosine tri-phosphate
- B(a)P : benzo(*a*)pyrène
- CAT : catalase
- Cd : cadmium
- GPX : glutathion peroxydase
- GPX4 : phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxidase
- GR : glutathion réductase
- GSC : germinal stem cell = cellule souche germinale
- GSH : glutathion réduit
- GSSG : glutathion oxydé sous forme disulfide
- GST : glutathion S-transférase
- GVBD : germinal vesicle break-down = rupture de la vésicule germinative
- HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques
- HIF- α : hypoxia inductible factor α
- HPLC : chromatographie liquide de haute performance
- HSP : heat shock protein
- MDA : malondialdéhyde
- NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NOS : oxyde nitrique synthase
- NPY : neuropeptide Y
- OG : occupation gonadique
- Oyvl* : *oyster vasa-like*
- PUFA : lipides gras polyinsaturés (polyunsaturated fatty acids)
- R : huîtres des lignées sélectionnées pour leur résistance aux mortalités estivales
- RNAi : ARN interférence
- RNS : reactive nitrogen species = espèces réactives de l'azote
- ROS : reactive oxygen species = espèces réactives de l'oxygène
- S : huîtres des lignées sélectionnées pour leur sensibilité aux mortalités estivales

SOD : superoxyde dismutase

Cu/Zn SOD : SOD cuivre/zinc

cy-SOD : SOD cytoplasmique cuivre/zinc

ec-SOD : SOD extracellulaire cuivre/zinc

Mn-SOD : SOD manganèse (mitochondriale)

Juste une mise en bouche...



*T*oujours à la poursuite du lapin blanc, Alice rencontre Tweedle Dee et Tweedle Dum. Les jumeaux l'invitent à rester avec eux pour une simple question de politesse et lui racontent une histoire pour l'avertir des méfaits de la curiosité : celle des huîtres, du Morse et du Charpentier.

Au bord d'une plage, le Morse et le Charpentier devisent sur la vie, le Charpentier voulant balayer le sable de la plage, le Morse préférant manger. Le Charpentier ayant découvert un banc de jeunes huîtres, le Morse lui propose d'en faire leur dîner.

Sagement endormies dans leurs coquilles, les petites huîtres sont réveillées par le Morse qui les invite à quitter l'océan pour la terre ferme. Afin de les amadouer, il les convie à une balade et un goûter. Averties par leur mère des dangers de la surface, les petites huîtres, trop curieuses, n'écoutent pas ce conseil et suivent gaiement le Morse hors de l'eau.

Tandis que le Charpentier construit à la hâte un restaurant de bric et de broc, le Morse entraîne les huîtres avec sa canne simulant un fifre, tel le Joueur de flûte de Hamelin. Mais alors que le Charpentier apporte les condiments, il s'aperçoit avec fureur que le Morse ne l'a pas attendu pour toutes les gober. Ils se lancent alors dans une course-poursuite que même la nuit n'interrompt pas. Alice rétorque qu'elle n'est pas une huître et que la morale des jumeaux ne la concerne donc pas. Ils entament alors une seconde histoire, celle du père François, qui se solde par le départ en catimini d'Alice.

Source : adapté de Lewis Carroll et de <http://personnages-disney.com/PageHuitres.html>

La curiosité est-elle un vilain défaut ? Bien sûr que non !

Nous ne sommes pas des huîtres...

INTRODUCTION

1 Les espèces réactives de l'oxygène et les systèmes antioxydants

1.1 Le paradoxe de l'oxygène

La vie sur Terre aurait commencé il y a au moins 3,8 milliards d'années avec l'apparition de micro-organismes à l'origine des bactéries et des archées (Nisbet and Sleep, 2001). Cependant, l'atmosphère de la Terre était bien différente de celle que nous connaissons et son principal composant gazeux était le dioxyde de carbone (CO_2). L'abondance d'eau (H_2O) comme réducteur, les radiations solaires puis l'apparition des cyanobactéries capables de photosynthèse oxygénique ont ensuite entraîné une augmentation significative de la teneur atmosphérique en oxygène, ou dioxygène (O_2), sur Terre il y a environ 2,5 milliards d'années. Des processus d'endosymbioses ont alors donné naissance aux premiers eucaryotes (Falkowski et al., 2004). Cette accumulation d' O_2 dans l'atmosphère a rendu possible la respiration aérobie, essentielle au développement des organismes eucaryotes multicellulaires complexes. De ce fait, l'oxygène est essentiel à la vie aérobie en permettant notamment la respiration cellulaire et aboutissant à la formation d'adénosine tri-phosphate (ATP), réserve d'énergie de la cellule. Cependant, si l'oxygène est source de vie, il peut également être source de mort pour les organismes le consommant. C'est ce qu'on appelle le paradoxe de l'oxygène, idée déjà proposée il y a plus de 50 ans (Gerschman et al., 1954). En effet, près de 90% de l'oxygène respiré est utilisé dans la chaîne respiratoire située dans la membrane interne mitochondriale où il est réduit en H_2O par la cytochrome *c* oxydase (Storey, 1996) (Figure 1). Cependant, il est estimé que 1 à 2% de l' O_2 consommé n'est que partiellement réduit (Chance et al., 1979) et donne naissance aux espèces réactives de l'oxygène ou ROS (pour Reactive Oxygen Species en anglais). Ce sont des espèces radicalaires ou non radicalaires mais pouvant le devenir. Ces molécules sont capables de réagir avec d'autres molécules riches en site à densité électronique élevée telles que celles à forte teneur en azote (ADN, ARN, protéines) ou à forte teneur en double-liaisons carbonées (acide gras, phospholipides). Cela donne ainsi naissance à une réaction en chaîne se propageant jusqu'à élimination du radical libre. De par cette propriété, les radicaux libres ont des effets délétères en dégradant aussi bien l'ADN que les protéines et les lipides, endommageant ainsi les cellules (Cadenas, 1989). De ce fait la théorie du vieillissement par les radicaux libres (Harman, 1956) propose que le vieillissement serait dû à l'accumulation des dégâts causés par l'oxygène que nous respirons. Outre leur implication dans le vieillissement (Finkel and Holbrook, 2000), les ROS seraient la cause ou des facteurs aggravants de maladies

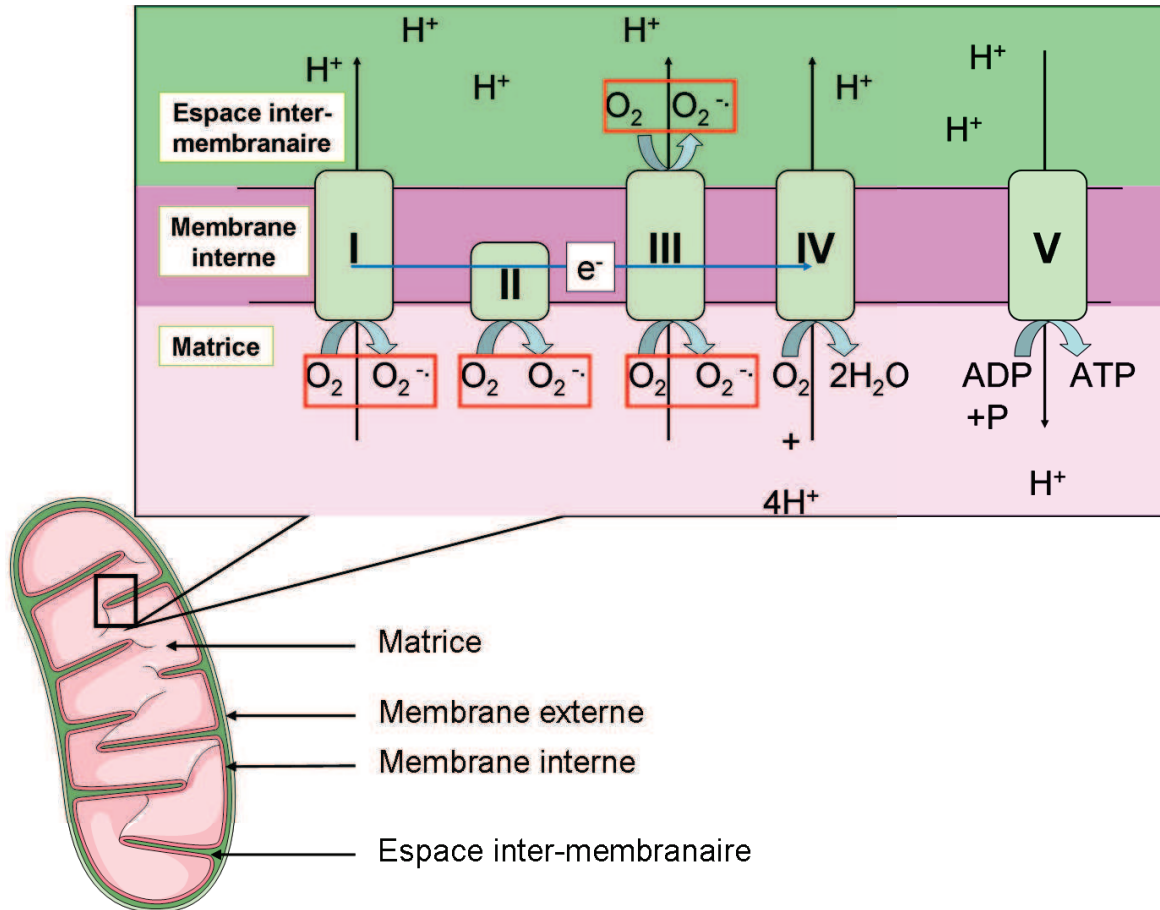


Figure 1 : Représentation schématique d'une mitochondrie et de la chaîne respiratoire. (I : NADH déshydrogénase, II : succinate déshydrogénase, III : complexe cytochrome *bc*₁, IV : cytochrome C oxydase et V : ATP synthase). Le passage d'électrons (représenté schématiquement par la flèche bleue) à travers les complexes de la chaîne respiratoire permet la translocation de protons dans l'espace inter-membranaire. Ce gradient de protons est utilisé par le complexe V pour produire l'ATP à partir de l'ADP. L'accepteur final d'électrons, le complexe IV réduit l'oxygène en eau. Encadrés en rouge : site de formation du radical superoxyde.

neurodégénératives et vasculaires chez les mammifères notamment (Simonian and Coyle, 1996; Madamanchi et al., 2005). Cependant, les organismes soumis à ces espèces réactives ont développé des systèmes de défense antioxydants capables de détoxifier la cellule des ROS produits. Ces systèmes peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques et permettent de contrer les effets nocifs des espèces pro-oxydantes. En revanche, il a été démontré que les ROS en faible quantité ont aussi un rôle régulateur et sont nécessaires à la signalisation cellulaire, notamment en tant que seconds messagers (Schreck and Baeuerle, 1991). En plus grande quantité et en réponse à une réaction du «non-soi», les ROS peuvent contribuer au système de défense contre les pathogènes (Chanock et al., 1994; Mehdy, 1994; Torreilles et al., 1996). De plus, une protection antioxydante complète aurait été contre-évolutive en empêchant notamment les altérations de la molécule d'ADN par les ROS et donc les mutations potentiellement bénéfiques à l'évolution (Harman, 1981).

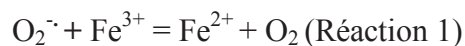
1.2 Les espèces réactives de l'oxygène

Il existe plusieurs sites de production intracellulaire de ROS tels que le réticulum endoplasmique *via* le transport d'électron NADPH-dépendant de la cytochrome P450 (Bernhardt, 1996), les chloroplastes (Asada, 1994) ou les peroxysomes (Corpas et al., 2001). Néanmoins, le principal site de production des ROS dans la cellule est la mitochondrie (Turrens, 2003) où le taux de production de ROS est directement lié au taux de consommation d'O₂ et proportionnel au nombre de mitochondries (Lesser, 2006). La réduction partielle d'oxygène dans la mitochondrie est due à la fuite d'électrons dans la chaîne respiratoire qui a lieu dans la membrane interne mitochondriale. Cette fuite se produit principalement au niveau des complexes I (NADH déshydrogénase) et III (complexe cytochrome *bc*₁) même si le complexe II (succinate déshydrogénase) semble également impliqué (Turrens, 1997; McLennan and Degli Esposti, 2000), et mène à la production du radical superoxyde (O₂⁻) le précurseur des ROS (Figure 1).

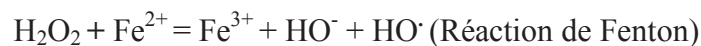
Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être radicalaires ou non radicalaires. Une espèce radicalaire R[•] est une espèce présentant un non appariement d'un ou plusieurs électrons sur sa couche externe ce qui lui confère une grande instabilité. Celle-ci peut réagir avec un groupe soufre, oxygène, carbone ou encore azote pour devenir non radicalaire mais va ainsi

créer un nouveau radical libre donnant naissance à une chaîne de propagation du radical libre jusqu'à élimination de celui-ci.

Le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est la première espèce réactive de l'oxygène formée. Il provient du fait que l'oxygène dans son état fondamental possède 2 électrons non appariés et doit recevoir un électron à la fois, ce qui est le cas lors de la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire. Le radical superoxyde peut agir comme un oxydant ou un réducteur. Cependant son taux de réaction avec les lipides, l'ADN ou les protéines est assez lent. En revanche il est capable de diffuser à travers les membranes et donc son action n'est pas restreinte à la mitochondrie. Le radical superoxyde est capable de réagir avec l'ion ferrique Fe^{3+} pour donner l'ion ferreux Fe^{2+} et de l'oxygène (voir réaction 1). D'autre part, il peut se dismuter soit spontanément soit de manière enzymatique (Fridovich, 1975) et mener à la formation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , une espèce non radicalaire.



Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 n'est pas une espèce radicalaire, il n'est pas chargé et peut donc diffuser très facilement à travers les membranes. De ce fait son action n'est pas restreinte à son lieu de production mais peut se dérouler dans différents compartiments cellulaires tel que le noyau, ce qui en fait un ROS assez toxique. C'est un oxydant impliqué notamment dans la voie de l'apoptose (Halliwell and Gutteridge, 1999). Cependant, il a été montré que les dommages attribués à H_2O_2 sont en fait causés, pour la plupart, par sa réduction en radical hydroxyle HO^{\cdot} *via* la réaction de Fenton (Fenton, 1876), par exemple, qui implique la conversion du fer Fe de sa forme ferreuse à sa forme ferrique :



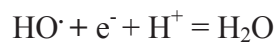
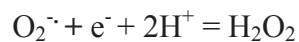
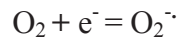
De plus cette réaction est entretenue par la réaction 1 ce qui donne la réaction de Haber-Weiss (Haber and Weiss, 1934):



Le radical hydroxyle HO^{\cdot} est le radical le plus réactif. Il réagit avec tout type de molécules et est responsable de la peroxydation des lipides (les lipides gras polyinsaturés ou

PUFA en anglais pour PolyUnsaturated Fatty Acids) dans les membranes, de l'oxydation des protéines, de l'ADN nucléaire et mitochondrial mais aussi des ARN. Son implication dans le vieillissement cellulaire par les dommages causés aux protéines et à l'ADN serait majeure.

Voici l'ensemble des réactions de production des ROS ou impliquant des ROS et permettant la réduction de l'O₂ en H₂O :



Les espèces réactives de l'oxygène formées à partir des PUFA sont issues de la peroxydation lipidique et comprennent trois ROS principaux : les alkyl hydroperoxydes (LOOH), les radicaux alkyl peroxy (LOO[·]) et les radicaux alkoxy (LO[·]). Ces espèces réagissent avec les PUFA voisins ce qui donne lieu à une chaîne de peroxydation lipidique qui affecte l'intégrité de la membrane, sa perméabilité et qui peut entraîner sa rupture.

1.3 Les systèmes antioxydants

Pour empêcher ces dommages cellulaires, ou les limiter, les organismes ont développé des systèmes de défense antioxydants très complexes faisant intervenir des espèces enzymatiques et non-enzymatiques.

1.3.1 Les systèmes non-enzymatiques

Les principaux antioxydants non-enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et l'acide urique. Ces molécules vont interrompre la chaîne de réaction radicalaire (Cadenas, 1989).

Le glutathion (GSH sous sa forme réduite) est un tri-peptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine. Sa synthèse fait intervenir la γ -glutamylcystéine synthétase et la glutathione synthétase. Il est

particulièrement important car c'est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes (Halliwell and Gutteridge, 1999). Il peut également régénérer la vitamine E (Reddy et al., 1982) et réagir avec les radicaux HO[•] et O₂^{-•} directement et ainsi casser la chaîne d'oxydation (Hermes-Lima, 2005). Il se présente alors sous la forme d'un radical GS[•] et se lie à une autre molécule de glutathion radicalaire pour former le glutathion oxydé sous forme disulfide GSSG. Le ratio GSH/GSSG est souvent utilisé comme marqueur du niveau d'oxydation d'une cellule. La maintenance d'un niveau élevé de glutathion est donc essentielle pour prévenir d'éventuels dégâts oxydatifs.

La vitamine E, particulièrement l' α -tocophérol, est un antioxydant liposoluble. De ce fait, elle est capable d'empêcher ou d'arrêter la propagation de la peroxydation lipidique. Elle réagit directement avec les ROS dérivés des PUFA ou d'autres molécules radicalaires et devient elle-même une espèce radicalaire α -Toc[•] avant d'être de nouveau réduite de manière non-enzymatique par les caroténoïdes par exemple. La vitamine E est produite dans les chloroplastes des plantes, en revanche les animaux doivent la trouver dans leur alimentation. Sa concentration est assez faible dans les membranes dans la mesure où elle est continuellement recyclée en sa forme réduite.

Les caroténoïdes sont également des molécules liposolubles produites par les organismes photoautotrophes et qui doivent être acquis par l'alimentation chez les animaux. Leur potentiel antioxydant pour lutter contre la peroxydation lipidique a été démontré très tôt (Monaghan and Schmitt, 1932) et ils sont capables de réagir avec les radicaux libres de trois manières : par le transfert d'électron, d'hydrogène ou la liaison avec le radical. Ils sont également capables de régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C (Hermes-Lima, 2005).

La vitamine C ou acide L-ascorbique est une molécule soluble dans l'eau. Elle est synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, excepté chez certains mammifères tel que l'homme. C'est une molécule antioxydante capable de réagir directement avec tous les ROS réduisant ainsi la peroxydation lipidique et les dommages aux protéines et à l'ADN. La vitamine C a également un pouvoir antioxydant indirect en recyclant les caroténoïdes et la vitamine E. D'un autre côté, la vitamine C permet le recyclage de Fe³⁺ en Fe²⁺ favorisant ainsi la réaction de Fenton et a donc de manière indirecte une action pro-oxydante.

L'acide urique est issu du métabolisme des purines et peut réagir avec HO[•] (Ames et al., 1981) et être régénéré par la vitamine C. En revanche en trop grande quantité, il peut être responsable d'arthropathies.

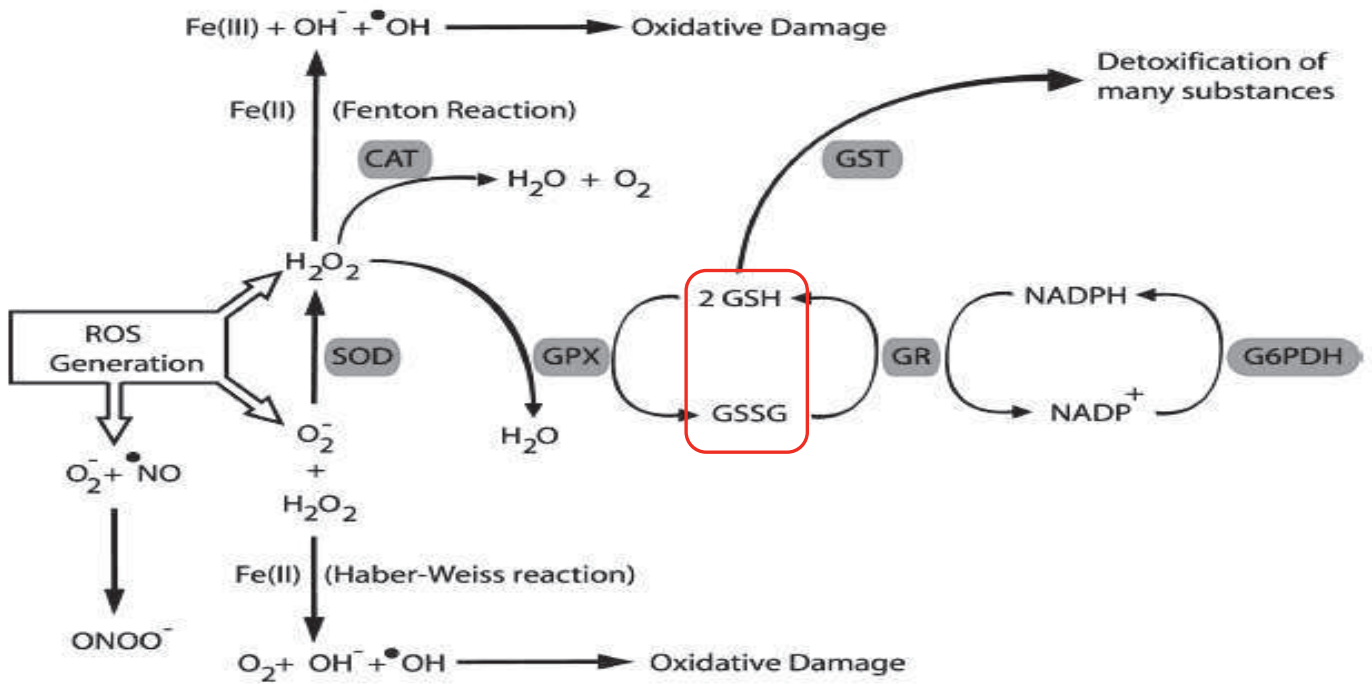


Figure 2 : Les principales enzymes antioxydantes.

La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST). En rouge est entouré le glutathion, sous sa forme réduite GSH et oxydée GSSG. D'après Hermes-Lima (2005).

1.3.2 Les systèmes enzymatiques

Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST). Ce sont des enzymes dont les séquences sont très conservées au cours de l'évolution et qui agissent de manière coordonnée (Figure 2).

La superoxyde dismutase ou SOD (McCord and Fridovich, 1969) est une métalloprotéine. Elle existe sous plusieurs formes qui diffèrent par le métal contenu dans leur site actif et leur localisation cellulaire. La SOD accélère la dismutation du radical $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 permettant ainsi à l'organisme un contrôle du taux de $O_2^{\cdot-}$ intracellulaire. Il existe deux SOD cuivre/zinc (Cu/Zn SOD), les deux sont des dimères, l'une est une enzyme cytosolique et l'autre est une enzyme extracellulaire. Ces deux formes sont retrouvées aussi bien chez les eucaryotes que chez les bactéries. L'ion cuivre est essentiel dans la réaction de dismutation tandis que l'ion zinc est nécessaire au maintien de la structure protéique (Hermes-Lima, 2005). Une troisième forme est la SOD manganèse (Mn-SOD), tétramérique chez les eucaryotes et dimérique chez les bactéries. Chez les eucaryotes, la Mn-SOD est présente dans les mitochondries et permet de protéger celles-ci des radicaux $O_2^{\cdot-}$ qu'elles génèrent. Il est estimé qu'elle représente environ 1 à 10% de l'activité SOD totale chez les mammifères. Une quatrième forme est la Fe-SOD qui est une SOD uniquement procaryotique. Les SOD sont en général les premières défenses enzymatiques contre les ROS (Figure 2).

La catalase ou CAT est une enzyme tétramérique contenant un groupe hème qui catalyse, d'où son nom, la décomposition du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Son action a été découverte au début du 19^{ème} siècle par un français (Thénard, 1818). La catalase est présente dans la plupart des organismes eucaryotes ou procaryotes. L'activité catalase est réduite par certaines conditions notamment lors de stress thermiques ou osmotiques (Hertwig et al., 1992). De hauts niveaux de H_2O_2 intracellulaires entraînent une activation préférentielle de la catalase tandis que de plus faibles niveaux seraient préférentiellement pris en charge par la GPX. Ces mécanismes redondants deviennent ainsi complémentaires (Pamplona and Costantini, 2011) (Figure 2).

La glutathion peroxydase ou GPX est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H_2O_2 . Elle agit plus lentement que la catalase mais elle a une meilleure

affinité pour le H_2O_2 que cette dernière. La GPX est donc essentielle à la décomposition du H_2O_2 produit de manière continue et à des niveaux physiologiques dans la cellule. Les GPX sont des enzymes sélénium-dépendantes ou sélénium-indépendantes et sont soit cytosoliques, comme c'est le cas de la première GPX identifiée (Mills, 1957), soit extracellulaires. Les GPX permettent la décomposition de H_2O_2 par l'oxydation de son co-substrat le GSH en GSSG qui sera réduit par la suite par l'action de la glutathion réductase (Figure 2).

La glutathion réductase ou GR n'est pas une enzyme antioxydante à proprement parler dans le sens où elle n'a pas d'action directe sur les ROS. En revanche, elle a un rôle très important dans réduction du glutathion, puissant antioxydant et co-substrat de la GPX. Elle fut identifiée la première fois chez les plantes (Conn and Vennessland, 1951; Mapson and Goddard, 1951) puis chez les animaux (Rall and Lehninger, 1952). La GR permet la régénération du glutathion sous sa forme réduite *via* la consommation de NADPH, évitant ainsi la synthèse *de novo* du glutathion qui présente un coût énergétique plus élevé, dû à la consommation d'ATP (Figure 2).

La glutathion S-transférase ou GST (Frear and Swanson, 1970) a également une action indirecte sur la détoxification des ROS puisqu'elle permet le transport du GSH vers les compartiments cellulaires subissant des dommages oxydatifs. Elle permet la liaison du GSH à certains xénobiotiques ainsi qu'aux aldéhydes issus de la peroxydation lipidique. La GST a donc un rôle de transport intermembranaire, de liaison et de détoxification des cellules (Tan et al., 1986). Avec la GR et la GPX, elle joue un rôle central dans la détoxification des ROS par le GSH (Figure 2).

Les enzymes citées ci-dessus constituent les premières défenses antioxydantes ainsi que les défenses auxiliaires qui les soutiennent *via* la régénération du GSH et son transport. Il existe également d'autres défenses antioxydantes telles que les transferrines, les ferritines, les métallothionéines. Ces dernières sont des enzymes qui en se complexant aux métaux limitent leur disponibilité dans le processus de génération des radicaux libres. Enfin, les enzymes de réparation des molécules endommagées par les ROS peuvent également être considérées comme des défenses antioxydantes (méthionine sulfoxyde réductases, endonucléases, ADN glycosylases).

2 Le stress oxydant

2.1 Définition

Dans des conditions physiologiques « normales », il existe un équilibre entre la génération et l'élimination de ROS. Comme nous l'avons vu, les ROS en quantité faible et contrôlée sont nécessaires au bon fonctionnement des cellules et interviennent dans des processus de signalisation cellulaire. En quantité trop importante, ils sont nocifs pour la cellule et participent au processus de vieillissement cellulaire et à certaines pathologies (Ames et al., 1993; Simonian and Coyle, 1996; Madamanchi et al., 2005). Une régulation fine du métabolisme oxydatif est donc nécessaire au bon fonctionnement cellulaire et *in fine* à la survie des organismes. Certaines conditions peuvent conduire à une augmentation de la production intracellulaire de ROS. Il peut s'agir de stress biotiques tels que le parasitisme, l'attaque par d'autres organismes, l'attaque par des pathogènes ou bien de stress abiotiques tels que les chocs thermiques, l'exposition aux ultraviolets (UV) ou encore les variations de disponibilité en oxygène (Figure 3). Le stress oxydant est généralement défini comme une situation de déséquilibre dans laquelle les pro-oxydants sont en large majorité par rapport aux antioxydants (Opara, 2006). Cela peut être dû à une surproduction de ROS et/ou une diminution des capacités antioxydantes. De ce fait l'analyse d'un stress oxydant se fait par la mesure des espèces participant aux deux côtés de la balance.

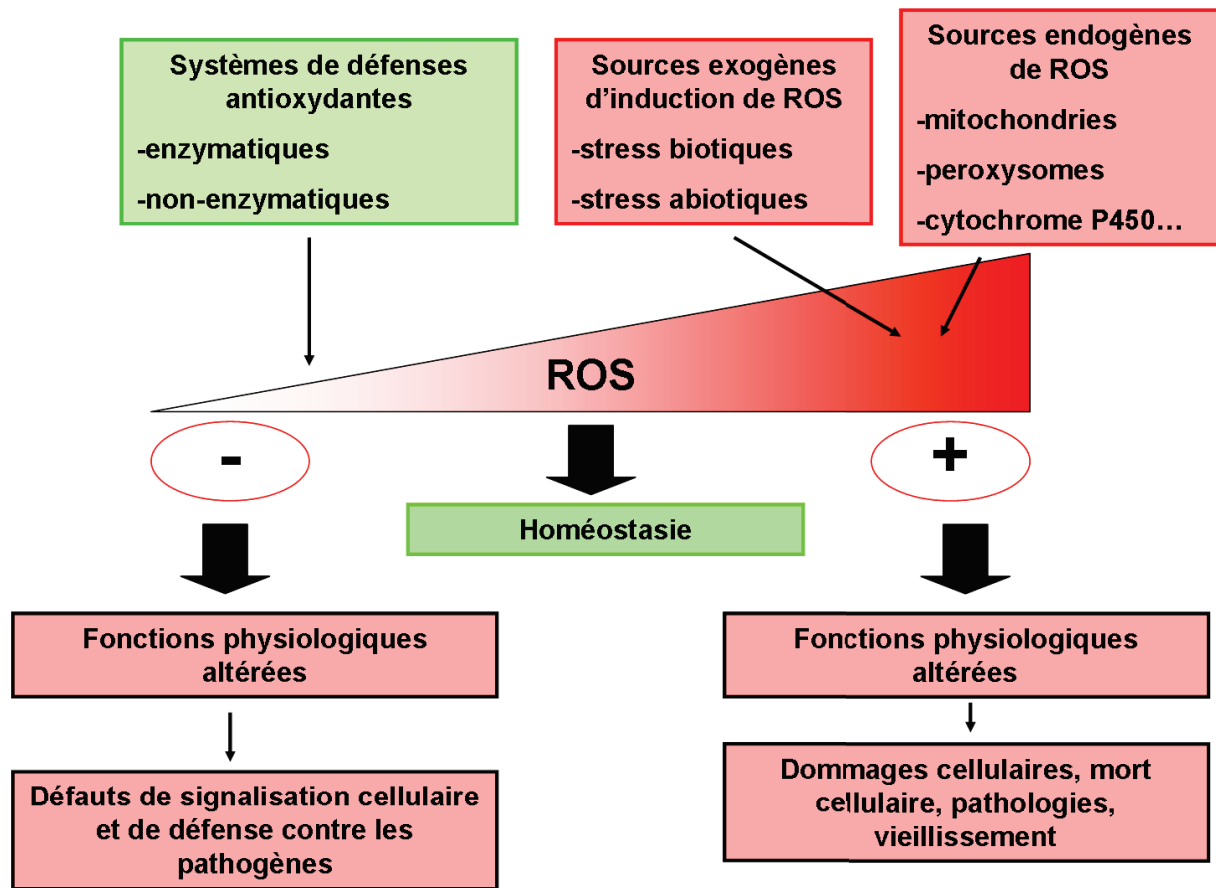


Figure 3 : Origine, régulation et effets des ROS.

La production de ROS peut être endogène par le métabolisme oxydatif dans la chaîne respiratoire mitochondriale ou par les peroxysomes ou bien déclenchée par des sources exogènes comme les stress biotiques ou abiotiques. Les défenses antioxydantes permettent de réguler la concentration des ROS afin de maintenir l'homéostasie des fonctions physiologiques. Une dérégulation de ce système altère les fonctions physiologiques et mène soit à des défauts de signalisation cellulaire ou de défense contre les pathogènes soit à des dommages cellulaires pouvant entraîner l'apoptose.

2.2 Les causes d'un stress oxydant

Diverses conditions peuvent entraîner un stress oxydant. Parmi les causes d'un stress abiotique, on peut notamment citer les UV. En effet, s'ils sont connus pour induire des dommages directs de l'ADN comme des dimères de pyrimidine pouvant mener à des mutations délétères (Ananthaswamy and Pierceall, 1990; Brash et al., 1991), les UV sont également responsables de la production de ROS dans divers compartiments cellulaires (Black, 1987). En ce qui concerne la température, il a été montré que des chocs thermiques aussi bien vers des températures élevées (Davidson et al., 1996) que des températures faibles (Prasad et al., 1994) étaient à l'origine d'une surproduction de ROS (Flanagan et al., 1998). Dans les deux cas, cela serait lié directement à la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, une augmentation de la température entraîne une augmentation du métabolisme général, selon la loi d'Arrhenius (Arrhenius, 1915), et ainsi une augmentation de l'activité respiratoire mitochondriale. Comme les mitochondries sont la principale source de ROS dans la cellule, une augmentation de leur activité entraîne une augmentation de la production de ROS. Dans le cas d'une exposition à des faibles températures, la diminution de l'activité de certaines enzymes de la chaîne respiratoire entraînerait une augmentation de la fuite d'électrons à l'origine de la production de ROS. Un des cas de variations en oxygène menant à la surproduction de ROS est l'ischémie-reperfusion (Traystman et al., 1991). En effet, lors d'une hypoxie engendrée par l'ischémie, c'est-à-dire une concentration en oxygène inférieure aux besoins cellulaires, il y a une accumulation des électrons qui seront disponibles lors de la reperfusion pour réagir avec les molécules d'oxygène et donc former des ROS (Li and Jackson, 2002). La ré-oxygénation correspond à un « burst oxydatif ».

Dans le cas de stress biotiques comme les attaques de pathogènes, les cellules du système immunitaire et notamment les cellules phagocytaires sont à l'origine d'un « burst oxydatif » consistant en une production accrue de ROS *via* la NADPH oxydase notamment et pouvant être à l'origine d'un stress oxydant (Shacter et al., 1988). Ce processus est un moyen de défense et permet l'activation de voies de défenses autant que la dégradation des pathogènes ou l'apoptose. Cependant, il pourrait devenir carcinogène dans le cas d'infections chroniques (Ames et al., 1993). Il y a donc une différence entre la réponse au stress abiotique où la production de ROS n'est pas « désirée » et doit être contrôlée et la réponse au stress biotique où la production de ROS est « délibérée ».

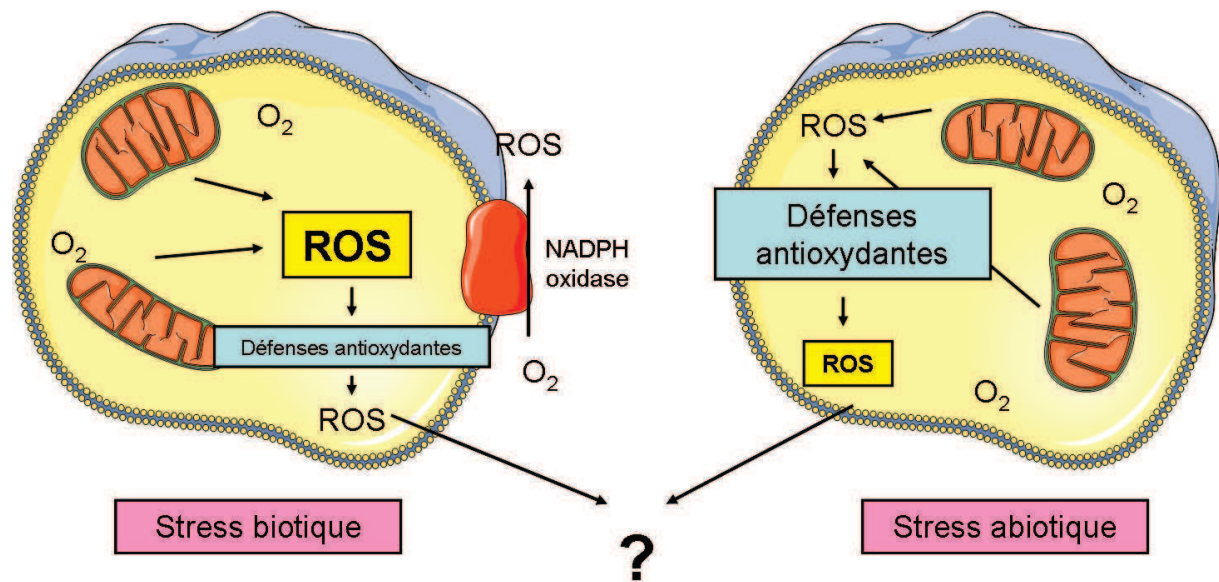


Figure 4: Différences de production de ROS en fonction de la nature du stress. Le point d'interrogation souligne le fait que la régulation de la production de ROS dans la combinaison des deux stress est limitée. Inspiré de Mittler (2002).

Les ROS sont donc un point de convergence dans les mécanismes de réponse à ces deux types de stress (Figure 4). En revanche, la régulation des ROS lorsque les deux types de stress sont combinés reste limitée comme démontré chez les plantes (Fujita et al., 2006).

Pour limiter les effets nocifs induits par un stress oxydant d'origine abiotique, les organismes disposent de trois solutions principales (Storey, 1996). La première serait de maintenir en permanence des niveaux élevés de défenses antioxydantes afin de limiter la formation de ROS suite à un stress. La deuxième serait d'augmenter de manière rapide la réponse antioxydante face à un stress pour empêcher la surproduction de ROS. La troisième serait d'endurer la production de ROS et l'accumulation de leurs dommages puis de réparer les dégâts. La troisième solution est très peu probable étant donné qu'impliquer des systèmes de réparation des dommages est énergétiquement plus coûteux que de minimiser l'apparition des dommages. Des deux solutions restantes, cela dépend des organismes et de leur fréquence d'exposition à des stress oxydants. Par exemple, il a été montré que le serpent *Thamnophis sirtalis parietalis* et la grenouille *Rana sylvatica* présentaient des capacités antioxydantes augmentées pendant les périodes d'hypoxie ou de congélation, leur permettant de contrer l'augmentation de la production de ROS lors de la réoxygénation. De son côté, la tortue *Trachemys scripta elegans*, qui a l'habitude d'endurer des périodes d'anoxie (absence d'oxygène) ou d'hibernation montre des capacités antioxydantes constitutivement élevées (Ultsch, 1989; Storey, 1996; Hermes-Lima and Zenteno-Savín, 2002).

Enfin, certains processus physiologiques majeurs requérant une activité métabolique élevée pourraient également être des sources d'une surproduction de ROS. En effet, une demande d'énergie est satisfaite par une augmentation de l'activité des mitochondries. Celles-ci étant les principaux sites de production des ROS (Turrens, 2003), une activité métabolique élevée pourrait entraîner une augmentation de la production de ROS et donc un stress oxydant.

2.3 Stress oxydant et reproduction

La théorie de l'histoire de vie basée sur le principe de l'allocation d'énergie, le modèle veut que l'organisme alloue les ressources de manière optimale entre, la maintenance, la croissance et la reproduction (Stearns, 1992). De ce fait, une augmentation de l'allocation des ressources vers une fonction ne peut se faire qu'au détriment d'une autre. C'est ce qu'on appelle un compromis ou « trade-off » en anglais. Un des compromis les plus importants dans

l'évolution est « le coût de la reproduction » (Williams, 1966) : un effort de reproduction intense à un moment donné entraînerait une diminution de la survie et des futures reproductions ainsi qu'une accélération de la sénescence (Stearns, 1992). Le coût de la reproduction a été largement étudié aussi bien chez les plantes que chez les animaux (Moberg, 1991; Roff, 1992; Ots and Hōrak, 1996; Schreck et al., 2001; Moore and Jessop, 2003) mais les mécanismes qui gouvernent ce coût sont encore méconnus. Or la reproduction est une fonction essentielle qui nécessite une importante demande en énergie satisfaite par une augmentation globale du métabolisme (Angilletta and Sears, 2000; Zera and Harshman, 2001; Nilsson, 2002). Comme énoncé plus haut, une augmentation du métabolisme est associée à une augmentation de la production de ROS, responsables de la sénescence dans la théorie du vieillissement décrite par Harman (1956). De ce fait, le coût de la reproduction pourrait être associé à une susceptibilité au stress oxydant. Cependant, très peu d'études ont été menées à ce sujet et ont mis en relation stress oxydant et reproduction (Von Schantz et al., 1999; Salmon et al., 2001; Wang et al., 2001; Alonso-Alvarez et al., 2004; Wiersma et al., 2004; Alonso-Alvarez et al., 2006). Des études menées sur la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ont montré, indirectement, qu'une augmentation de la production d'œufs était associée à une diminution de la résistance au stress oxydant menant à la mort de l'individu après exposition à des agents connus pour induire la production de ROS (Salmon et al., 2001; Wang et al., 2001). D'autres études menées sur le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*) ont également montré une diminution de la capacité antioxydante, notamment des enzymes antioxydantes SOD et GPX, chez les individus présentant les investissements reproducteurs les plus importants (Alonso-Alvarez et al., 2004; Wiersma et al., 2004). Ainsi, des fonctions physiologiques essentielles telle que la reproduction qui demandent une activité métabolique importante peuvent également mener à une augmentation de ROS et donc potentiellement à l'apparition d'un stress oxydant.

2.4 Les conséquences d'un stress oxydant

Les dommages oxydatifs, comme évoqués plus haut, affectent particulièrement les lipides, les protéines et l'ADN.

La chaîne de peroxydation lipidique initiée principalement par HO[•] affecte l'intégrité de la membrane, sa fluidité, sa perméabilité et peut entraîner sa rupture. Les produits de dégradation des lipides sont des aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) et des hydrocarbures tels que l'éthane et l'éthylène (Gutteridge and Halliwell, 1990). Le MDA est souvent dosé pour déterminer des dommages causés par les ROS lors d'un stress oxydant (Ohkawa et al., 1979). La peroxydation lipidique dans les mitochondries entraîne des dysfonctionnements de la production d'ATP mais peut également induire l'apoptose (Green and Reed, 1998).

Les dommages oxydatifs créés sur les protéines entraînent des modifications de leur chaîne peptidique telles que des ruptures, l'oxydation spécifique de certains acides aminés et des altérations de charges électriques menant souvent à leur dégradation par protéolyse. L'altération du centre Fer-Soufre par O₂^{•-} de certaines enzymes est suivi de l'inactivation de leur activité enzymatique (Freeman and Crapo, 1982). L'accumulation de protéines oxydées est également considérée comme jouant un rôle important dans le vieillissement cellulaire (Dean et al., 1993). Les principaux produits de dégradation des protéines par oxydation sont les carbonyles qui sont également très utilisés comme marqueurs des dommages liés au stress oxydant (Stadtman, 1992). Ceux-ci peuvent également être formés par l'action d'un aldéhyde (produit de peroxydation lipidique entre autre) sur les protéines.

Finalement, les dommages oxydatifs de l'ADN par les ROS ciblent les bases azotées ainsi que le groupement ose et se traduisent par des délétions, mutations, cassures simple-brin (Imlay and Linn, 1988) pouvant mener à l'apoptose. De plus, des liaisons ADN-protéines peuvent également être créées et empêcher les processus de réparation, de réplication ou encore de transcription de l'ADN. Comme la mitochondrie est le premier site de formation de ROS (Turrens, 2003) et qu'elle est particulièrement riche en Fe²⁺, son ADN, dont les systèmes de réparation sont moins efficaces que ceux de l'ADN nucléaire, est particulièrement sensible à l'attaque des ROS (Yakes and Van Houten, 1997). Ceci altère des processus bioénergétiques importants étant donné que l'ATP synthase est codée par l'ADN

mitochondrial. Le dosage du 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, produit de la réaction de HO[•] avec les bases guanines, est souvent utilisé comme marqueur de l'attaque de l'ADN par les ROS (Kasai et al., 1984).

L'ensemble de ces dommages peut être délétère et mener à la mort cellulaire. En effet, si les enzymes de réparation de l'ADN sont endommagées, elles ne peuvent pas réparer l'ADN lui-même endommagé par les ROS ce qui peut entraîner l'apoptose (Kujoth et al., 2005). Les voies de l'apoptose induite par les ROS feraient intervenir la P53 (Johnson et al., 1996; Polyak et al., 1997). La dégradation des membranes lipidiques modifie leur fluidité, leur intégrité et peut entraîner leur rupture et donc la mort cellulaire. En effet, dans le cas de la rupture des membranes mitochondriales ou des lysosomes, les enzymes déversées vont catalyser la décomposition des protéines et des acides nucléiques (Horton and Fairhurst, 1987). D'autre part, l'ADN endommagé peut coder pour des enzymes non-fonctionnelles ou des mutations de ce dernier peuvent entraîner un processus de carcinogenèse (Klaunig and Kamendulis, 2004).

2.5 Stress oxydant en milieu marin

En milieu marin, les mêmes sources de stress oxydant que celles citées précédemment sont retrouvées mais avec quelques particularités. Par exemple, l'absorption des UV par la matière organique dissoute mène à la production photochimique de ROS (Mopper and Kieber, 2000). Les sources hydrothermales de par l'abondance de sulfure d'hydrogène (H₂S) et d'O₂ à leur proximité, peuvent produire des radicaux et donc également être la source de ROS (Tapley et al., 1999). D'autre part, la concentration en oxygène par litre d'eau est trente fois moins importante et sa diffusion huit mille fois moins rapide que dans l'air (Schmidt-Nielsen, 1975). Les variations saisonnières comme les changements de température ou l'apparition de pluies importantes modifient la salinité de l'eau et réduisent la solubilité de l'oxygène. Ces changements peuvent être à l'origine d'un stress oxydant (Collén and Davison, 2001; Choi et al., 2008). Cela est particulièrement valable dans la zone de balancement des marées où les paramètres physico-chimiques du milieu marin sont beaucoup plus variables que ceux du milieu terrestre. En effet, les variations du pH, des rayonnements UV, de la salinité, de la température ou même de concentration en oxygène peuvent s'effectuer beaucoup plus rapidement qu'en milieu terrestre. Les organismes sessiles vivant dans la zone de balancement des marées doivent donc endurer des conditions environnementales très

changeantes (Denny and Paine, 1998; Helmuth et al., 2002). Mais à cela s'ajoute la pollution due aux activités anthropiques de plus en plus importantes tels que les activités industrielles, agricoles, portuaires et touristiques au niveau des bassins versants et des zones côtières qui entraîne une contamination du milieu marin en produits chimiques, hydrocarbures, pesticides, métaux lourds, engrais... Tout cela accentue les risques de stress biotiques et abiotiques et donc la possibilité pour les organismes marins de devoir faire face à des stress oxydants car tout ces xénobiotiques sont connus pour générer des ROS (Winston and Di, 1991). D'autre part, les différents stress peuvent également se cumuler ou découler l'un de l'autre. En effet, une augmentation de la température peut, par exemple, induire une plus grande sensibilité au stress oxydant chez les organismes exposés aux métaux lourds (Cherkasov et al., 2007). De ce fait, les mollusques sont souvent utilisés comme des espèces sentinelles de l'environnement dans des zones polluées (Tableau 1).

Les espèces intertidales, vivant dans la zone de balancement des marées, sont sujettes à des épisodes quotidiens d'hypoxie ou d'anoxie puis de ré-oxygénation pouvant être à l'origine de stress oxydant, particulièrement pour les organismes dits oxyconformeurs pour lesquels la consommation d'oxygène dépend de la concentration partielle d'oxygène dans le milieu (Abele et al., 1998). Ainsi, la première réponse des organismes vagiles lors d'épisodes d'hypoxie est la fuite tandis que les organismes sessiles, comme beaucoup de mollusques bivalves, n'ont d'autre choix que d'endurer. Or, il est montré que lors des transitions hypoxie/normoxie les bivalves produisent moins de ROS que d'autres organismes (Dykens and Shick, 1988) afin d'éviter un stress oxydant. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour survivre à des diminutions en oxygène dissous. La première est une réduction du métabolisme afin de réduire les processus consommant le plus d'énergie, tels que la synthèse protéique, les activités enzymatiques ou la transcription d'ARN. C'est ce qui est appelé la « dépression métabolique » (Larade and Storey, 2002). La deuxième est un transfert de la production d'ATP des voies aérobies aux voies anaérobies. En effet, lorsque la concentration d'oxygène descend sous un certain seuil ne permettant plus la production d'ATP, les voies de synthèse utilisent les réserves fermentescibles comme le glycogène et l'aspartate (Larade and Storey, 2002). Au niveau du système antioxydant, il est suggéré que le rôle du glutathion serait prépondérant en conditions d'hypoxie par rapport à l'activation des enzymes antioxydantes. En effet, la détoxification des ROS par le glutathion serait moins coûteuse en terme d'énergie (Pannunzio and Storey, 1998; Abele and Puntarulo, 2004).

Tableau 1 : Liste des études montrant la production de ROS *in situ* ou en laboratoire par certains composants et les marqueurs de stress oxydant utilisés chez des mollusques bivalves. Adapté de Manduzio et al. (2005)

Etudes de contaminations en laboratoires			
Contaminants	Organismes	Mesures	Auteurs
Menadione	<i>Mytilus edulis</i>	SOD, GPX, CAT, DT-d, MDA	(Livingstone et al., 1990)
	<i>Mytilus edulis</i>	MDA, GSH	(Ribera et al., 1991)
B(a)P	<i>Mytilus edulis</i>	SOD, GPX, CAT, DT-d, MDA	(Livingstone et al., 1990)
Paraquat	<i>Geukensia demissa</i>	SOD, CAT, GSH, MDA	(Wenning et al., 1988)
Thiram	<i>Unio tumidus</i>	GPX, GR, SOD, CAT, GSH, MDA	
Nitrofurantoin	<i>Mytilus edulis</i>	ROS	(Martinez et al., 1995; Doyotte et al., 1997)
H ₂ O ₂	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAT, SOD, GPX, GSH, MDA	(Cavaletto et al., 2000)
Aroclor 1254	<i>Chamalea gallina</i>	CAT, GR, GPX, GSH	(Rodríguez-Ariza et al., 1993)
Cuivre	<i>Mytilus edulis</i>	MDA, GSH	(Viarengo et al., 1989)
	<i>Mytilus edulis</i>	SOD	(Manduzio et al., 2003)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	SOD, GR, GPX, CAT, GSH	(Regoli and Principato, 1995)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MDA, GSH, stabilité lysosomale	(Viarengo et al., 1990)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GSH	(Canesi et al., 1999)
	<i>Unio tumidus</i>	GPX, GR, SOD, CAT, GSH, MDA	(Doyotte et al., 1997)
	<i>Ruditapes decussatus</i>	SOD, CAT, GPX, MDA	(Géret et al., 2002)
Cadmium	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MDA, GSH, stabilité lysosomale	(Viarengo et al., 1990)
Zinc	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MDA, GSH, stabilité lysosomale	(Viarengo et al., 1990)
Mercure	<i>Anadara granosa</i>	GR, GSH	(Patel et al., 1990)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GSH	(Canesi et al., 1999)
Selenium	<i>Anadara granosa</i>	GR, GSH	(Patel et al., 1990)
Contamination complexe	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GPX, CAT, SOD, GR, GSH	(Regoli and Principato, 1995)
Etudes de contamination <i>in situ</i>			
HAP	<i>Perna viridis</i>	SOD, CAT, GPX, DT-d, GSH, MDA	(Cheung et al., 2001)
	<i>Mytilus edulis</i>	SOD, CAT	(Eertman et al., 1995)
	<i>Saccostrea cucullata</i>	CAT, SOD, GPX, DT-d	(Niyogi et al., 2001)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	SOD, GPX, CAT	(Solé et al., 1995)
	<i>Unio tumidus</i>	GR, GPX, GSH, CAT, SOD, MDA	(Cossu et al., 1997), (Cossu et al., 2000)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAT, SOD, GPX, DT-d	(Porte et al., 1991)
Contamination complexe	<i>Crassostrea virginica</i>	GSH, MDA, stabilité lysosomale	(Ringwood et al., 1999)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GSH, GR, GPX, CAT, SOD	(Regoli and Principato, 1995)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAT, DT-d, SOD	(Livingstone et al., 1995)
	<i>Mytilus edulis</i>	SOD, GPX, GST	(Manduzio et al., 2004)
Métaux	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GR, GPX, GSH, CAT, SOD	(Regoli and Winston, 1998)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MDA, stabilité lysosomale	(Domouhtsidou and Dimitriadis, 2001)

La grande majorité des organismes marins sont ectothermes, c'est-à-dire que leur température corporelle dépend de la température environnante. Les fluctuations de température semblent être des sources importantes de production de ROS. Par exemple, l'élévation de la température serait impliquée dans l'apparition d'un stress oxydant chez les coraux (Lesser, 1997) puisque l'adjonction de catalase inhibe le blanchiment des coraux induit par le traitement thermique. Chez la mye, bivalve intertidal, un choc thermique entraîne une augmentation significative de l'activité catalase soulignant ainsi une augmentation de la production de ROS suite à un stress thermique (Abele et al., 2002). Cependant, cette augmentation de température ne fait pas apparaître de dégâts oxydatifs ou au moins de peroxydation lipidique, signe que le système antioxydant a pu prendre en charge la surproduction de ROS. Abele et al. (2004) proposent, d'après Pörtner (2001), qu'au dessus d'une température limite il y a une activation des enzymes antioxydantes mais qu'à partir d'une température critique, ces enzymes ne soient plus capables d'assurer leur rôle du fait d'une dénaturation. Il y aurait ainsi apparition d'un stress oxydant et activation des Heat Shock Protein (HSP), protéines chaperonnes essentielles à la stabilisation des protéines (Lindquist, 1986; Gething and Sambrook, 1992), afin de maintenir la survie de l'organisme (Figure 5).

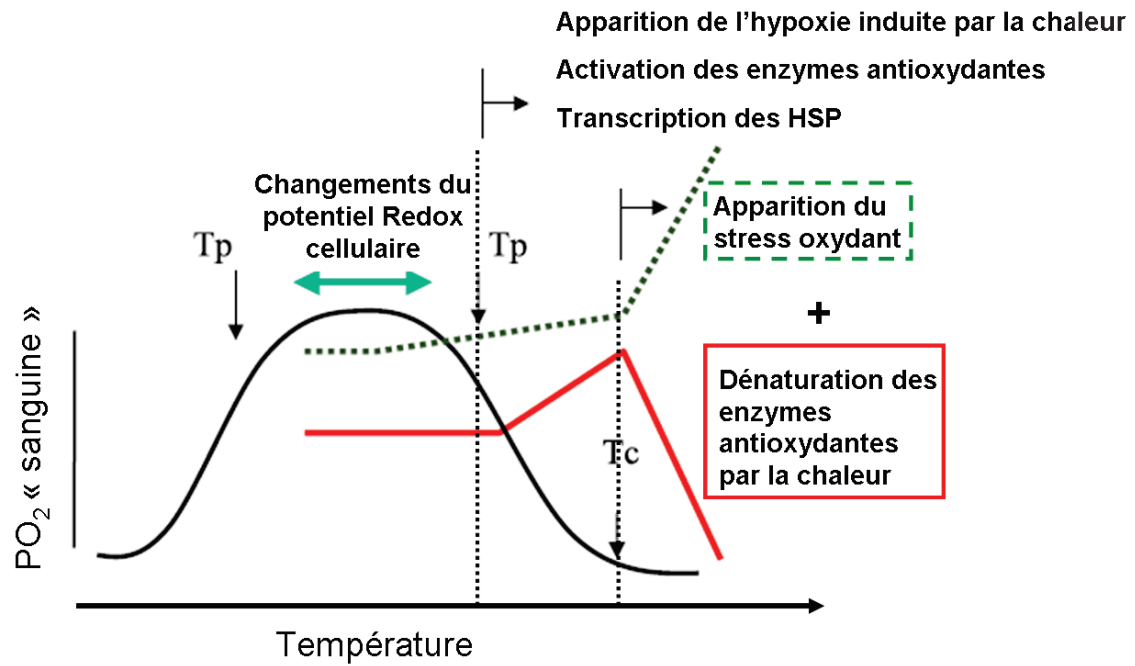


Figure 5 : Modèle des seuils de tolérance thermique pour les organismes marins ectothermes et leur implication dans le déclenchement des capacités antioxydantes et l'apparition d'un stress oxydant.

T_p : température limite qui marque les limitations d'un métabolisme aérobie optimal. Cela est accompagné de la production de ROS et de l'activation des enzymes antioxydantes. T_c : température critique à partir de laquelle les défenses antioxydantes déclinent, le métabolisme anaérobie est activé et le stress oxydant apparaît et les dommages qui lui sont dus. Basé sur Abele et Puntarulo (2004).

En revanche, en ce qui concerne la susceptibilité au stress oxydant liée à la reproduction, aucune étude n'a été menée sur les bivalves marins alors que l'investissement à la reproduction de ces derniers peut être extrêmement important. Cependant, une étude menée sur les moules intertidales *Mytilus californianus* a mis en évidence que les individus qui ont été confrontés à des stress environnementaux avaient un investissement reproducteur moins élevé afin d'allouer l'énergie vers des fonctions de défense, telle que l'accumulation de caroténoïdes (Petes et al., 2008). Il pourrait donc y avoir un lien entre reproduction et stress oxydant chez les bivalves. C'est ce que laisse penser également certains résultats obtenus chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* qui seront exposés plus loin dans l'introduction.

3 L'huître creuse *Crassostrea gigas*

3.1 Systématique, répartition et écologie

Crassostrea gigas est un mollusque bivalve de l'ordre des *Ostreoida*, de la famille des *Osteoidae* et du genre *Crassostrea*. Selon le World Register of Marine Species (marinespecies.org), plus de 20 espèces sont recensées comme appartenant au genre *Crassostrea*, certaines ayant été ou étant exploitées comme *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) l'huître creuse japonaise (Figure 6), *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) l'huître creuse portugaise, *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928), *Crassostrea ariakensis* (Fujita, 1913) ou *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) l'huître creuse américaine. *C. gigas* est originaire d'Asie mais plusieurs vagues d'importations volontaires ou accidentelles ont disséminé l'espèce dans de nombreuses régions du globe : en Europe (Grizel and Héral, 1991), au Canada, sur la côte ouest des Etats-Unis, en Afrique du sud, en Tasmanie (Thomson, 1952, 1958), en Nouvelle-Zélande et en Russie (Orlenko, 1994). Elle s'est adaptée dans ces régions notamment grâce à sa forte croissance et à sa grande tolérance aux variations de température (eurytherme), de salinité (euryhaline) et de quantité de nourriture (Coleman, 1986; Smith et al., 1986; Grizel, 1996). Les huîtres présentent deux phases différentes au cours de leur cycle de vie. Les embryons et les larves sont pélagiques, ce qui leur confère un fort potentiel de dispersion, puis après la métamorphose les post-larves se fixent sur des substrats meubles ou durs dans les zones intertidales ou zones de balancement des marées. Les juvéniles et les adultes sont alors sessiles, ce qui les expose à des conditions environnementales très changeantes. *C. gigas* est un animal ectotherme qui respire et se nourrit par filtration. Elle peut filtrer jusqu'à quinze litres d'eau par heure, ce qui en fait un animal en interaction permanente avec l'environnement et ses variations physico-chimiques.



Figure 6 : L'huître creuse *Crassostrea gigas* non ouverte (à gauche) et ouverte dans sa valve gauche, valve droite enlevée (à droite)

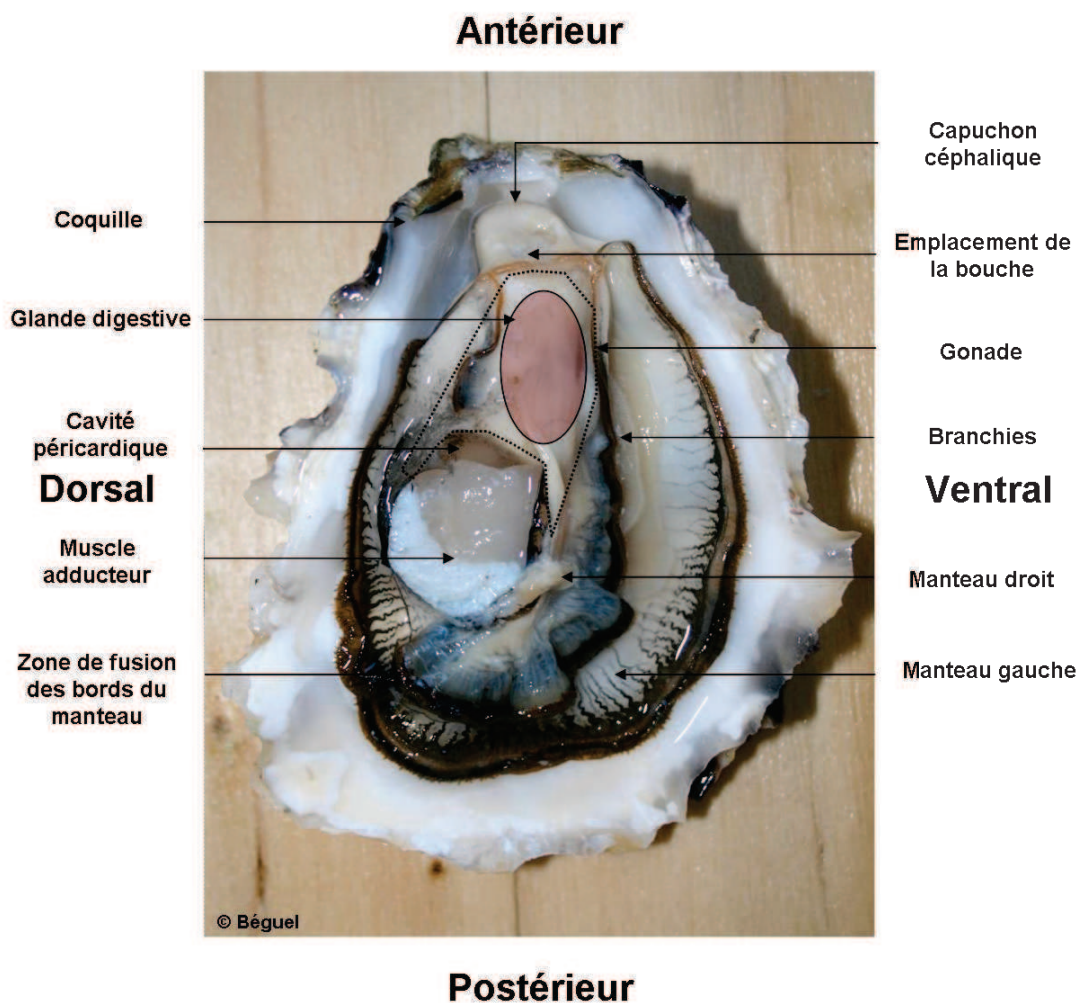


Figure 7 : Anatomie générale de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans sa valve gauche. Les axes d'orientation de l'animal sont indiqués en caractère gras.

3.2 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 en position antérieure et maintenues par un muscle adducteur puissant (Figure 7). La valve inférieure (gauche) est creuse tandis que la valve supérieure (droite) est plane (Pauley et al., 1988). Les parties molles du corps sont enveloppées dans un manteau dont les deux lobes sont soudés dorsalement près de la bouche. Le manteau délimite la cavité palléale. Dans la partie antérieure, il forme un capuchon céphalique qui recouvre les palpes labiaux et la bouche (Kennedy et al., 1996). Les huîtres sont acéphales, la bouche et les palpes labiaux sont les seuls vestiges de la partie céphalique. Le système digestif est composé de la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, la glande digestive, le rectum et l'anus. La gonade est un organe diffus et transitoire qui se développe autour de la glande digestive. Les branchies lamellaires, suspendues dans la cavité palléale, assurent la double fonction de respiration et de nutrition. Le système circulatoire des huîtres est partiellement clos. Il est composé de vaisseaux et de sinus cœlomiques. Le cœur comporte un ventricule et deux oreillettes, et est situé contre le muscle adducteur de la cavité péricardique. Le ventricule expulse le fluide circulant, appelé hémolymphe, dans les aortes antérieures et postérieures. L'hémolymphe circule ensuite dans les artères et les artérioles, puis dans des sinus de taille variable qui mettent les organes au contact direct de l'hémolymphe. Celle-ci est ensuite épurée dans le rein, puis circule vers les branchies par des vaisseaux afférents et en repart, après hématose, par les vaisseaux efférents jusqu'aux oreillettes.

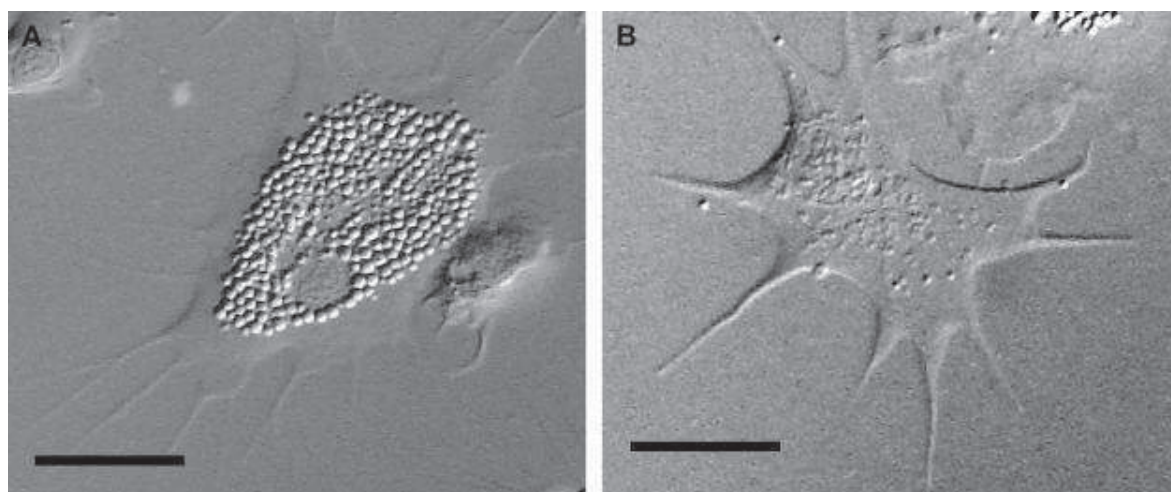


Figure 8 : Granulocyte (A) et hyalinocyte (B) de l'huître de Sydney *Saccostrea glomerata* observés en microscopie à contraste d'interférence différentielle

La barre correspond à une taille de 10 μm . Extrait de Aladaileh et al. (2007).

3.3 Les mécanismes de défense de *Crassostrea gigas*

3.3.1 Le système immunitaire

Les huîtres, ne disposent pas de cellules de l'immunité acquises permettant la production d'anticorps lors d'une infection. Ainsi, chez l'huître, les mécanismes de défense reposent sur l'immunité dite «innée» ou non-spécifique. Les barrières anatomiques et chimiques constituent la première ligne de défense empêchant les dommages aux tissus, les pertes de fluide et l'invasion par des micro-organismes. Cette ligne de défense est principalement assurée par la coquille, le manteau, les branchies et le mucus. La seconde ligne de défense met en jeu les hémocytes, cellules circulantes de l'hémolymphe (Canesi et al., 2002), l'équivalent du sang chez les arthropodes. Les hémocytes, qui peuvent également s'infiltrer dans les tissus, constituent les éléments clef de la réponse immunitaire (Xue et al., 2001; Bachère et al., 2004). Les populations hémocytaires de l'huître sont représentées par deux principaux types cellulaires : les granulocytes, les hyalinocytes (Cheng, 1996). Les granulocytes sont caractérisés par la présence de granules intracytoplasmiques, alors que les hyalinocytes, au cytoplasme transparent, n'en présentent pas ou peu (Figure 8). Peu d'éléments sont connus concernant l'origine et l'ontogenèse des hémocytes chez les mollusques marins. A ce jour, aucun site de production de l'hémolymphe n'a encore été identifié chez l'huître, et la question même de l'existence d'un tel organe différencié reste en suspens (Bachère et al., 2004). Toutefois, il a été suggéré que les hémocytes pourraient provenir de la différenciation des cellules du tissu conjonctif (Cheng, 1981). Les hémocytes jouent un rôle primordial dans la physiologie de l'huître. En effet, ils participent à de nombreux processus vitaux tels que les réactions de défense, la réparation des lésions, la recalcification de la coquille, le transport des nutriments, la digestion, les processus d'excrétion ou encore la résorption gonadique (Feng, 1988). Ces fonctions reposent en grande partie sur la capacité des hémocytes à être recrutés sur les sites d'infection ou de lésions, à s'agréger pour restreindre l'infection et à y transporter des éléments essentiels, comme le calcium pour la réparation de la coquille, ou encore les molécules de défense. Dans le système de défense, les hémocytes agissent en tant que cellules immunocompétentes lorsqu'un corps étranger (virus, bactéries, particules inorganiques, organismes pathogènes ou non) est détecté au sein ou au contact de l'organisme (Canesi et al., 2002; Bachère et al., 2004). Après une étape de reconnaissance, le corps étranger est phagocyté dans l'hémocyte et la dégradation des particules étrangères ingérées s'y effectue par la formation de ROS et/ou par la libération de molécules cytotoxiques (Bachère et al., 1995; Chu, 2000).

3.3.2 Production de ROS et défenses antioxydantes

Plusieurs études ont porté sur le rôle des défenses antioxydantes de *C. gigas* en réponse à différents stress biotiques ou abiotiques. Tout d'abord, l'élimination des pathogènes par phagocytose hémocytaire est couplée à la production de ROS (Bachère et al., 1991; Delaporte et al., 2003; Lambert et al., 2003). Ainsi, la production de ROS constitue une ligne importante de défense contre les pathogènes. Cependant, une surproduction de ROS pouvant entraîner un stress oxydant, les dommages cellulaires potentiellement induits par les ROS sont limités par l'action d'enzymes antioxydantes. Il a notamment été montré que la protéine majoritaire de l'hémolymphe était une Cu/Zn SOD extracellulaire (Gonzalez et al., 2005; Scotti et al., 2007). L'expression de cette protéine serait restreinte aux hémocytes et elle jouerait différents rôles tels que la reconnaissance et l'élimination de bactéries pathogènes mais aussi une activité de détoxification des ROS et donc de protection contre les dommages oxydatifs (Gonzalez et al., 2005). Un autre stress biotique capable d'induire un stress oxydant est le parasitisme par le ver polychète *Polydora* sp. qui induit une élévation de l'oxygénation de l'animal par une augmentation de l'activité valvaire (Chambon et al., 2007). Dans cette même étude, il a été noté une hausse de l'expression de la SOD cytoplasmique dans le cœur des huîtres, ce qui permettrait de lutter contre un éventuel stress oxydant induit par l'augmentation de l'état oxygéné.

En ce qui concerne les stress abiotiques, la pollution par les eaux d'égouts, le cadmium (Cd), les hydrocarbures sont des sources de stress oxydants ayant été étudiées chez *C. gigas*. Il a été montré que les huîtres qui sont des bio-accumulateurs de métaux lourds (Philip, 1995) étaient capables de détoxifier leurs tissus *via* une augmentation de la transcription des gènes codant la catalase, la cy-SOD et la GPX (Jo et al., 2008). Une exposition au cadmium induit également une augmentation de la concentration de metallothionéine conduisant à une diminution de la peroxydation lipidique dans les branchies de *C. gigas* (Géret et al., 2002). L'exposition aux hydrocarbures induit chez *C. gigas* une augmentation de la transcription de GST et cy-SOD dans la glande digestive afin de contrecarrer une augmentation de ROS (Boutet et al., 2004). Une augmentation de l'expression du gène codant la GST apparaît essentielle en tant que système de détoxification dans les branchies après exposition de *C. gigas* à des eaux usées (Medeiros et al., 2008). Il a également été mis en évidence une importance de la GST dans les branchies des huîtres pour lutter contre le stress oxydant induit par une déplétion du glutathion et une exposition à un pro-oxydant (Trevisan et al., 2012).

Concernant les stress environnementaux d'origine non anthropiques, il a été montré qu'un stress thermique pouvait induire une diminution de l'expression de la GPX dans les branchies et donc potentiellement induire une susceptibilité au stress oxydant chez *C. gigas* (Lang et al., 2009). En revanche, l'hypoxie induit chez *C. gigas* une augmentation des transcrits codant la ec-SOD, la cy-SOD, la GST et la GPX (David et al., 2005; Sussarellu et al., 2010). Cela pourrait être dû soit à une augmentation de la production de ROS au début de l'hypoxie (Guzy and Schumacker, 2006) ou à un mécanisme anticipatoire au «burst oxydatif» produit lors de la réoxygénation (Hermes-Lima and Zenteno-Savín, 2002). Les défenses antioxydantes semblent également suivre un profil d'expression saisonnier avec des niveaux de transcription élevés des gènes codant pour la cy-SOD et les métallothionéines en été et en hiver (Farcy et al., 2007). En été, ce profil est corrélé aux températures maximales de l'eau et à la plus grande disponibilité en nourriture et en hiver aux températures minimales de l'eau. Ces périodes pourraient ainsi favoriser l'apparition d'un stress oxydant. D'autre part, il a été montré, dans la glande digestive de *C. gigas*, un profil d'expression des enzymes antioxydantes dépendant des étapes de la gamétogenèse, activité également saisonnière (Fleury et al., en prép.).

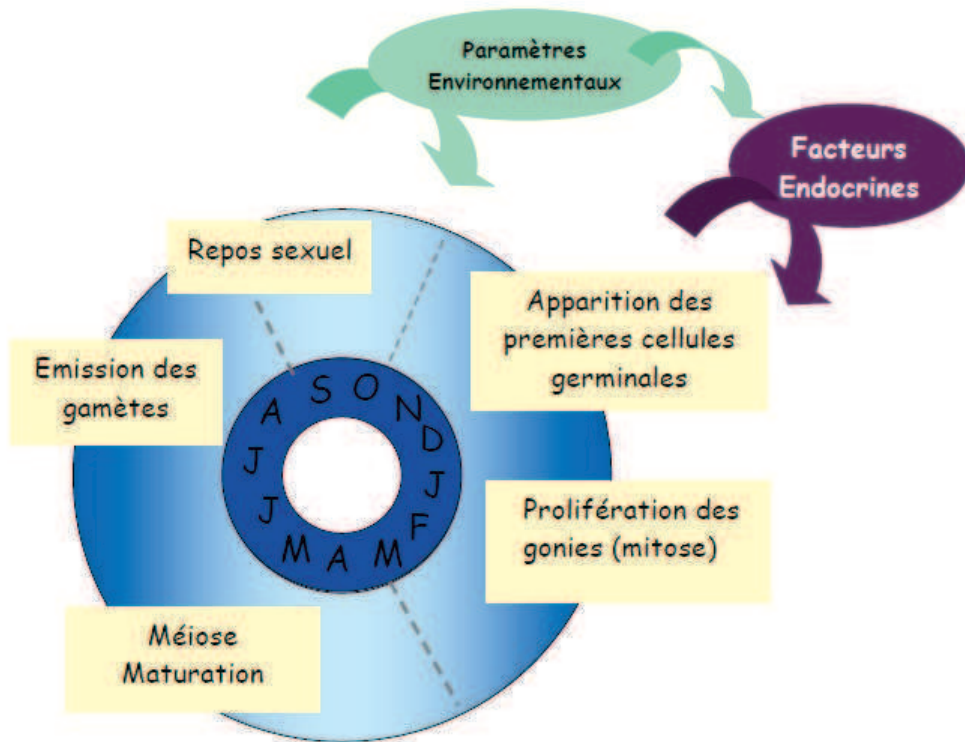


Figure 9 : Chronologie des grandes étapes du cycle de reproduction de *Crassostrea gigas* en milieu tempéré.

Les flèches indiquent l'action potentielle des facteurs internes et des paramètres environnementaux sur l'ensemble des étapes de la reproduction. Les lettres dans le disque correspondent aux mois de l'année. D'après Fabioux (2004).

3.4 Reproduction

3.4.1 L'hermaphrodisme

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est un hermaphrodite protandre de type alternatif irrégulier (Galtsoff, 1964; Gérard et al., 1995), ce qui signifie qu'elle est généralement mâle lors de la première saison de reproduction puis que les changements de sexe alternent ensuite de façon irrégulière chez un même individu (Guo et al., 1998; Lango-Reynoso, 1999). Les changements de sexe se font principalement entre deux saisons de reproduction (Buroker, 1983). Une faible proportion d'individus morphologiquement hermaphrodites, pour lesquels des cellules germinales des deux sexes sont présentes simultanément dans la gonade, est généralement trouvée dans les populations (Lango-Reynoso, 1999). Le déterminisme du sexe est encore peu connu chez *C. gigas* mais il résulterait de la combinaison de l'expression de facteurs génétiques (Naimi et al., 2009) et de l'effet des facteurs environnementaux (Guo et al., 1998).

3.4.2 La gonade et son développement

La gonade de l'huître est un organe particulier dans le sens où il n'est pas permanent et non-indépendant. En effet, la gonade suit un cycle de développement annuel calqué sur un rythme saisonnier (figure 9) qui peut-être divisé en quatre grandes phases, ou stades (figure 10), selon le déroulement de la gamétogenèse (Steele and Mulcahy, 1999; Berthelin et al., 2001).

Le long des côtes françaises, la gamétogenèse se déroule à un rythme très lent durant l'automne et au début de l'hiver (Lubet, 1991) correspondant à une phase de repos sexuel (stade 0). La gonade n'est représentée que par quelques cellules souches germinales (GSC) sexuellement indifférenciées et disséminées au sein du tissu conjonctif en périphérie de la masse viscérale (Fabioux et al., 2004a). Les GSC ont une grande capacité mitotique et elles forment une population cellulaire capable d'auto-renouvellement qui sert de source à la production de gamètes durant la vie sexuelle active des organismes (Lin, 1997).

Puis les GSC se divisent activement par mitose à la fin de l'hiver (Gouletquer, 1997; Lango-Reynoso et al., 1999) et se différencient pour donner les gonies qui sont les premières cellules germinales différenciées sexuellement (stade 1). Ce sont de petites cellules (environ 6 µm de diamètre) composées d'un gros noyau et d'une fine couche de cytoplasme granuleux (Lango-Reynoso et al., 2000).

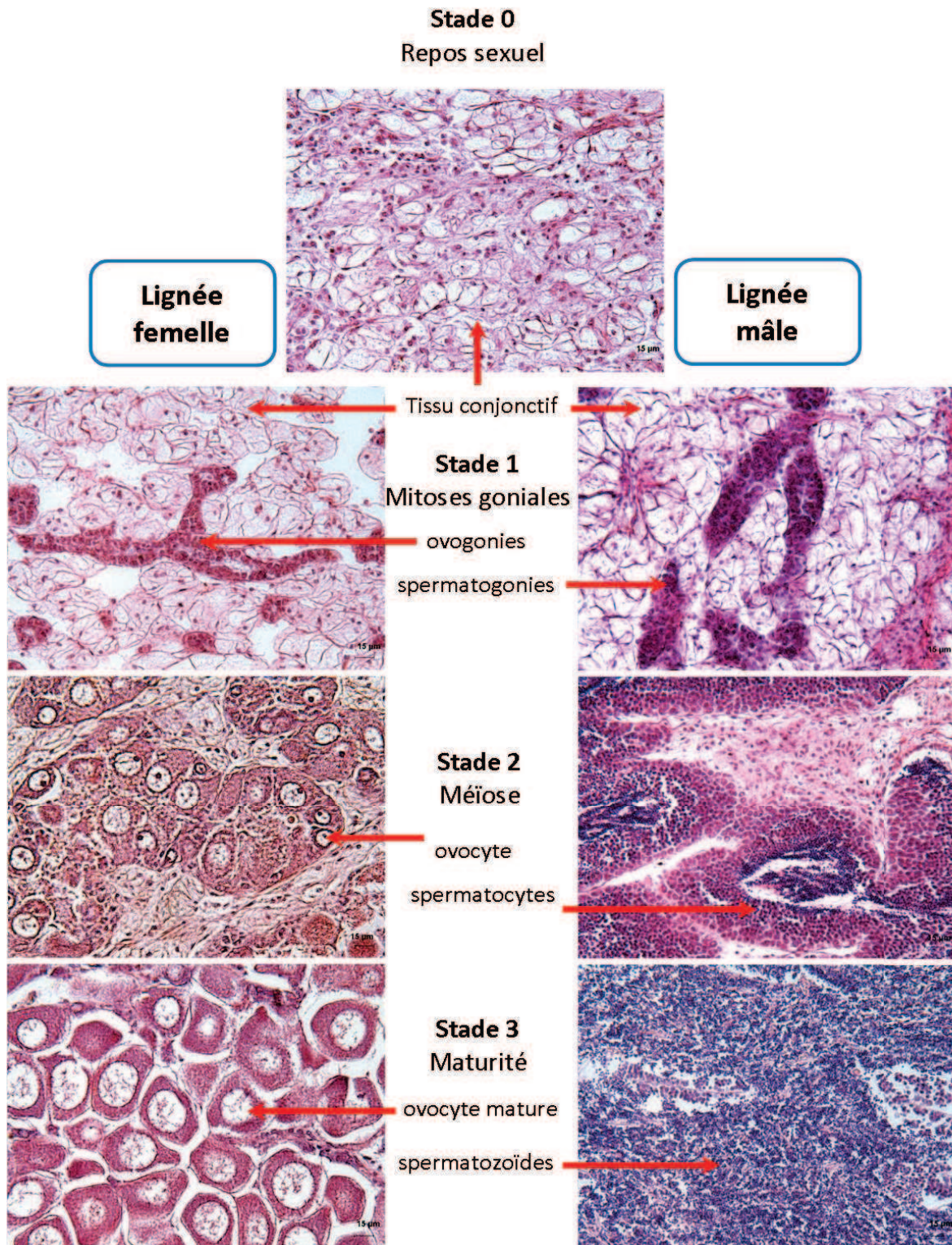


Figure 10 : Maturation gonadique chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Coupes histologiques transversales de gonade colorées à l'hématoxyline-eosine représentant les stades de gamétogenèse de 0 à 3 dans la lignée mâle et femelle (réalisées sur des individus des chapitres 1 et 2).

S'ensuit une phase de multiplication intense des gonies (Lango-Reynoso et al., 2000; Fabioux, 2004) et une différenciation de celles-ci en cytes primaires (ovocytes ou spermatocytes) qui entrent en méiose (stade 2). La gonade se développe progressivement autour de la glande digestive.

La maturation des gamètes s'effectue de manière centripète dans les tubules gonadiques (figure 11). Pour les mâles, les spermatocytes primaires poursuivent leur méiose et se différencient successivement en spermatocytes secondaires (spermatocytes II), en spermatides et en spermatozoïdes (1,5 à 3 μm de diamètre pour la tête) (Franco et al., 2008). La taille des cellules germinales mâles diminue au fur et à mesure de leur différenciation, leur noyau se condense et le cytoplasme devient quasiment inexistant. En revanche, pour les femelles, lorsque les ovogonies se différencient en ovocytes primaires (20 à 30 μm de diamètre), leur noyau s'agrandit et le cytoplasme devient plus dense et granuleux au fur et à mesure de la maturation (vitellogenèse), traduisant une accumulation d'ARN messagers, de protéines, et de lipides (Li et al., 2000). Le développement des ovocytes chez *C. gigas* est supporté par les réserves, essentiellement du glycogène, contenues dans les cellules vésiculeuses du tissu conjonctif environnant et probablement par les cellules auxiliaires des ovocytes (Matsumoto et al., 2003). Les ovocytes une fois remplis de vitellus atteignent la maturité (40 à 50 μm de diamètre) et sont bloqués en prophase I de méiose. Les gamètes arrivent à maturité à la fin du printemps ou au début de l'été (stade 3). Cette période est principalement contrôlée par la température et la quantité de nourriture (Deslous-Paoli et al., 1981). L'émission des gamètes dans l'eau de mer, puis la fécondation, déclenchent successivement la reprise de la méiose ovocytaire et la rupture de la vésicule germinative (« germinal vesicle break-down » ou GVBD), puis l'expulsion du premier globule polaire (Leclerc et al., 2000).

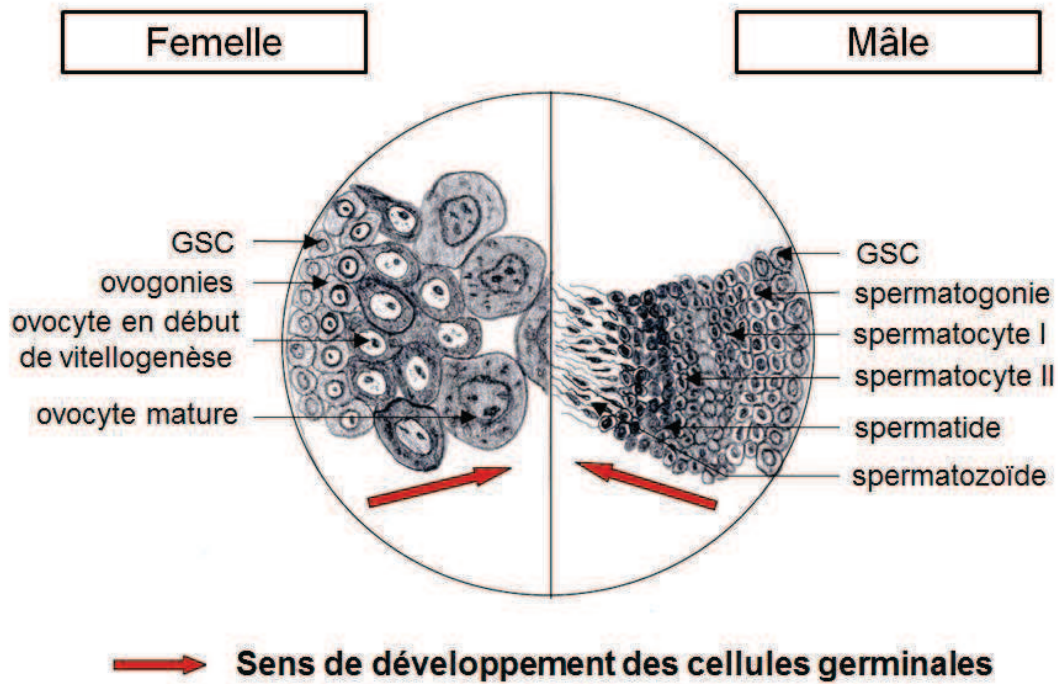


Figure 11 : Organisation des tubules gonadiques mâles et femelles de *Crassostrea gigas* pendant la gamétogenèse

Représentation schématique de la coupe transversale d'un tubule. GSC : cellule souche germinale (germinal stem cell). (Extrait de Fabioux (2004)).

La gamétogenèse peut être influencée par différents facteurs telles que la disponibilité en nourriture et la température. En effet, si la disponibilité en nourriture influe sur l'effort reproducteur *via* la quantité de gamètes produits (Raillard et al., 1993; Barille et al., 1997; Enríquez-Díaz et al., 2009), Fabioux et al. (2005) ont montré que la température influait sur la cinétique de la gamétogenèse, des températures plus élevées l'accéléralent.

Vient ensuite la phase d'émission des gamètes qui a généralement lieu pendant la période estivale, une ou plusieurs fois par an suivant la localisation géographique (Galtsoff, 1930; Gouletquer, 1997; Lango-Reynoso et al., 1999; Chavez-Villalba et al., 2001). Elle intervient souvent en réponse à un signal extérieur, essentiellement des changements de température, un bloom phytoplanctonique ou la présence dans l'eau de gamètes d'individus de la même espèce. L'émission des gamètes est totale dans les régions les plus chaudes des côtes françaises (Charentais, Méditerranée) alors qu'elle n'est que partielle voir absente dans le nord de la France où la température de l'eau est plus basse (Normandie ou Bretagne Nord) (Gouletquer, 1997). Un minimum de 19°C est requis pour l'émission des gamètes. Lorsque la ponte est partielle, les ovocytes résiduels de la gonade subissent une phase de régression au cours de laquelle le contenu cellulaire est lysé. L'énergie issue de cette résorption des gamètes pourrait être réinvestie dans le métabolisme de base des bivalves (Beninger and Le Penec, 1991; Steele and Mulcahy, 1999). Les réserves énergétiques de l'huître sont reconstituées à l'automne avant la ré-initiation d'un nouveau cycle de reproduction (Berthelin et al., 2000). Les huîtres ont une fécondité très élevée, plusieurs millions d'ovocytes sont émis en pleine eau à chaque événement de ponte (Héral, 1989; Gérard, 1998). Elles suivent une stratégie de reproduction dite de type "r" avec un cycle de développement court mais à fort potentiel de reproduction (Lubet, 1976; Takada and Nakajima, 1992). En effet, le volume de la gonade peut représenter jusqu'à 70% du volume de l'animal à maturité (Enríquez-Díaz et al., 2009), ce qui fait de la reproduction de *C. gigas* une fonction physiologique majeure (Pouvreau et al., 2006).

3.5. *Crassostrea gigas*, enjeux commerciaux et mortalités estivales

En 2010, la production mondiale de *Crassostrea gigas* représentait 662 513 tonnes pour un chiffre d'affaire d'environ 1,3 milliard de dollars (données FAO,

<ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-6.pdf>). Elle représente également la première ressource conchylicole du littoral français qui en est le premier producteur européen et quatrième au niveau mondial. Historiquement, l'ostréiculture a connu en France une succession de phases de développement, de pleine exploitation et de crises engendrées par une surexploitation des ressources naturelles et/ou par l'apparition de maladies. L'huître plate *Ostrea edulis*, seule espèce endémique des côtes françaises, a ainsi été exploitée pendant plusieurs siècles, mais la pêche intensive associée à une demande croissante du marché a conduit à une destruction des bancs naturels. De plus, des épisodes de mortalités massives provoquées par l'apparition de parasites (dont *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*) dans les gisements d'huîtres *O. edulis* au cours des années 1920, 1960 et 1970 ont précipité l'arrêt de la production de cette espèce (Grizel, 1974). Aujourd'hui, elle ne représente qu'à peine 2% de la production. Pour faire face à cette pénurie, l'huître creuse du Portugal, *Crassostrea angulata*, a été importée en France et a rapidement proliféré le long des côtes. Cependant, entre 1969 et 1973, la production d'huîtres portugaises a, à son tour, été décimée par une infection virale due à un Iridovirus, responsable de la « maladie des branchies » (Comps, 1988). Afin de relancer l'industrie ostréicole, une nouvelle espèce originaire du Japon, *C. gigas*, déjà cultivée avec succès sur la côte ouest des Etats-Unis et du Canada, a donc été introduite en France à partir de 1972. Depuis cette date, la culture de *C. gigas* a connu une expansion rapide, cette espèce représentant aujourd'hui 98% du marché ostréicole français. Ainsi, l'importance économique associée à *C. gigas* a motivé le développement de nombreuses recherches concernant la biologie de cette espèce, son génome étant désormais entièrement séquencé et disponible (Zhang et al., 2012). Les autres justifications de ces recherches sont liées au fait que l'huître creuse se révèle être une espèce sentinelle de choix pour comprendre l'évolution des écosystèmes côtiers et estuariens, milieux de plus en plus anthropisés où les populations d'huîtres sont exploitées, et où elles subissent des mortalités liées au stress et aux maladies.

En effet, depuis quelques décennies déjà, l'huître connaît en France des épisodes de mortalités estivales importants (Maurer et al., 1986; Gouletquer et al., 1998; Costil et al., 2005) ayant eut dans un premier temps un impact limité sur la production, les mortalités de juvéniles étant compensées en partie par une augmentation des quantités mises en élevage. Cependant, l'accélération des mortalités sur les juvéniles observées à partir de 2008 (Dégremont, 2011) se traduisent aujourd'hui (3 ans après, durée nécessaire pour atteindre la taille commerciale) par une baisse drastique de la production : 82 800 tonnes environ pour les années 2010/2011 contre environ 110 000 tonnes annuelles jusqu'en 2009 (Comité National de Conchyliculture). Afin d'étudier ces mortalités, le projet MOREST (MORTaliés ESTivales) a

été mis en place par l'IFREMER de 2001 à 2005 et a permis d'identifier un déterminisme multifactoriel à ces événements de mortalités faisant intervenir la physiologie de l'animal lui-même, son environnement et la présence de pathogènes opportunistes (Samain and McCombie, 2008). Des paramètres physico-chimiques, telles que la température, la salinité, la concentration en oxygène ou les ressources trophiques, seraient impliqués dans ces phénomènes. En ce qui concerne l'influence des pathogènes, aucun agent particulier n'a pu être mis en évidence systématiquement même si plusieurs bactéries de genre *Vibrio* et un virus de type herpes ont pu être corrélés aux mortalités estivales. Enfin la période de reproduction, la gestion des réserves énergétiques, l'immunité et la réponse au stress seraient des éléments clefs de la physiologie de l'huître en rapport avec les mortalités estivales. En revanche, ces éléments ne sont pas indépendants et interagissent étroitement les uns avec les autres. Même si l'apparition des mortalités semble liée au franchissement du seuil des 19°C, la température ne peut être responsable à elle seule de ces mortalités mais peut en être le point de départ. En effet, une augmentation de la température est intimement liée au processus de gamétogenèse et de ponte chez *C. gigas* se traduisant par une dépense énergétique importante. D'autre part, une augmentation de la température induit une augmentation du métabolisme et donc de la respiration alors que la concentration en oxygène diminue, pouvant ainsi induire des risques d'hypoxie métabolique. Il est également démontré qu'une augmentation de la température favorise la croissance de certaines bactéries pathogènes ainsi que leur virulence et celle des virus. De ce fait, lorsque la température augmente, l'huître se trouverait en situation de dépense d'énergie accrue pour l'investissement à la reproduction engendrant un affaiblissement de l'organisme par un déficit dans l'énergie allouable à d'autres fonctions telles que les réponses aux stress abiotiques (hypoxie) ou biotiques (prolifération et virulence des pathogènes). L'hypothèse d'un compromis physiologique entre survie et reproduction peut donc être raisonnablement posée.

4. Contexte de l'étude et objectifs

Chez *Crassostrea gigas*, l'investissement reproducteur est une fonction physiologique majeure avec une gonade pouvant représenter 70% du volume de l'animal à maturité (Pouvreau et al., 2006; Enríquez-Díaz et al., 2009). Ainsi, l'énergie fortement mobilisée pour assurer cette fonction de reproduction ne serait plus disponible pour assurer d'autres fonctions vitales telle que la réponse aux stress environnementaux et aux attaques pathogènes traduisant ainsi un « coût de la reproduction ». Dans ce contexte, la reproduction pourrait constituer un élément important de contribution aux mortalités estivales observées chez *C. gigas*

(Koganezawa, 1974; Mori, 1979; Perdue et al., 1981; Samain et al., 2007). Le projet MOREST a mis en exergue ce point à l'aide de lignées d'huîtres sélectionnées pour leur résistance « R » ou leur sensibilité « S » aux mortalités estivales. En effet, les individus des lignées R présentaient un investissement reproducteur moyen plus faible que ceux des lignées S (Huvet et al., 2010). Or la demande en énergie requise pour la reproduction est satisfaite par une augmentation globale du métabolisme *via* une augmentation de la respiration (Angilletta and Sears, 2000; Nilsson, 2002), comme vue lors de la gamétogenèse de *C. gigas* (Samain and McCombie, 2008). Etant donné qu'une augmentation du métabolisme est associée à une augmentation de la production de ROS, la reproduction pourrait, elle-même, représenter une situation de stress pour l'organisme voire causer un stress oxydant. Certains éléments semblent étayer cette hypothèse, en effet, des différences dans les voies constitutives de la défense antioxydante ont été mises en évidence entre les huîtres des lignées R et S (Delaporte et al., 2007; Samain et al., 2007; Fleury et al., 2010; Fleury and Huvet, 2012). En effet, les individus des lignées R présentent une expression plus importante de gènes impliqués dans la défense antioxydante (codant pour des SOD, CAT et GPX) que les individus des lignées S au début des événements de mortalités estivales (Fleury et al., 2010; Fleury and Huvet, 2012). De plus, des études menées sur le système immunitaire des huîtres R et S ont montré que les hémocytes des huîtres S avait un métabolisme intracellulaire oxydatif plus important que ceux des huîtres R traduisant en partie une production plus importante de ROS (Delaporte et al., 2007). A la vue de ces éléments, se pose la question de l'impact de la reproduction sur la gestion du métabolisme oxydatif chez *Crassostrea gigas*.

C'est dans cette optique que s'inscrivent les travaux réalisés durant cette thèse. Afin d'apporter des éléments de réponse à cette question, plusieurs expérimentations ont été mises en place et sont présentées dans les chapitres suivants sous forme de publications scientifiques.

Ces analyses ont visé à déterminer l'impact de l'investissement reproducteur sur la capacité antioxydante de l'huître à différents niveaux, depuis les tissus somatiques jusqu'aux gamètes isolés en passant par la gonade. Ainsi,

Dans le premier chapitre, l'influence de l'investissement reproducteur sur la capacité antioxydante de *C. gigas* est étudiée dans une vision « coût de la reproduction » et donc dans un tissu somatique. Pour ce faire des marqueurs de stress oxydant et des éléments clefs du

système antioxydant ont été analysés au niveau moléculaire et biochimique dans les branchies et ce, en lien avec l'investissement reproducteur.

Dans un second chapitre, le système antioxydant est considéré au sein même de la gonade afin de déterminer si l'activité de gamétogenèse pouvait être une source de production de ROS. Nous avons ainsi étudié le niveau de défense antioxydant du tissu gonadique de façon sexe-spécifique. Pour cela, des paramètres moléculaires et biochimiques ont également été utilisés.

Dans un troisième chapitre, nous avons analysé la capacité antioxydante propre des gamètes afin de déterminer si elle pouvait être une clef de leur survie lorsqu'ils sont émis dans un environnement aux conditions stressantes. Pour cela, le métabolisme oxydatif des gamètes isolés de la gonade a été étudié plus précisément par une approche intégrative incluant des paramètres moléculaires, biochimiques, cytologiques et physiologiques.

Enfin, la dernière partie du manuscrit est consacrée à la discussion des résultats obtenus dans cette étude ainsi qu'aux conclusions et perspectives en découlant.

PREMIER CHAPITRE :
Etude de la capacité antioxydante dans
les branchies de *Crassostrea gigas* en
fonction de son investissement
reproducteur

1. Introduction à l'étude

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des sous-produits du métabolisme aérobie capables d'induire des dommages cellulaires conséquents par la dégradation de l'ADN, des protéines et des lipides. Pour se protéger des effets nocifs des ROS, les cellules possèdent tout un arsenal de composés antioxydants (Hermes-Lima, 2005). Cela permet un équilibre physiologique entre production et élimination des ROS. Un déséquilibre dans la balance production de ROS/capacité antioxydante définit une situation de stress oxydant (Opara, 2006). Plus la production de ROS est élevée et/ou plus les défenses antioxydantes sont faibles plus le stress oxydant est important. Les ROS par leurs actions délétères sur les cellules sont vues comme des protagonistes majeurs de la sénescence. En effet, dans la théorie du vieillissement proposée par Harman (1956), le déclin des performances associé au vieillissement serait médié par l'accumulation des dommages oxydatifs induits par les ROS (Finkel and Holbrook, 2000). La sénescence n'est pas que l'apanage des ROS, la reproduction en est également une cause majeure et elle y est considérée comme un «coût de la reproduction» (Williams, 1966; Kirkwood and Austad, 2000). La reproduction est une fonction nécessitant un apport énergétique important (Zera and Harshman, 2001). Cette demande est satisfaite par une augmentation du métabolisme énergétique (Angilletta and Sears, 2000). Etant donné qu'une augmentation du métabolisme peut entraîner une surproduction de ROS, la reproduction pourrait ainsi conduire à une situation de stress oxydant par une augmentation du métabolisme. Ce lien entre reproduction et stress oxydant a été mis en évidence dans certaines études. Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) une augmentation de la production d'œufs a été associée à une diminution de la résistance au stress oxydant menant à la mort de l'individu après exposition à des agents connus pour induire la production de ROS (Salmon et al., 2001; Wang et al., 2001). D'autres études menées sur le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*) ont également montré une diminution de la capacité antioxydante, notamment des enzymes antioxydantes SOD et GPX, chez les individus dont les investissements reproducteurs avaient été manipulés pour être plus importants (Alonso-Alvarez et al., 2004; Wiersma et al., 2004). Dans le cas des oiseaux, la capacité antioxydante a été évaluée dans des tissus somatiques. En effet, d'après la théorie de l'histoire de vie, une augmentation de l'allocation des ressources vers une fonction, ici la

reproduction, ne peut se faire qu'au détriment d'une autre, ici la maintenance somatique (Stearns, 1992).

A la suite des observations obtenues au cours du projet MOREST, nous nous sommes intéressés à déterminer si un tel conflit physiologique («trade-off») existe chez *Crassostrea gigas*. Pour cela nous avons manipulé l'effort reproducteur de *C. gigas* par la technique d'ARN interférence (RNAi). Cette méthode consiste en l'inhibition spécifique de l'expression d'un gène par dégradation de son ARNm. Dans notre étude, nous avons inhibé par RNAi le gène *oyster vasa-like*, essentiel au développement gonadique. Cette technique, précédemment développée et validée (Fabioux et al., 2009), nous a permis d'obtenir des individus présentant différents niveaux d'investissement reproducteur. Un stress thermique a également été appliqué sur les huîtres afin de provoquer une augmentation de leur métabolisme et donc potentiellement exacerber les différences de capacités antioxydantes entre les individus. Les capacités antioxydantes ont ensuite été déterminées en fonction de l'investissement reproducteur par la mesure des taux de transcrits des gènes codant les SOD (cy-SOD, Mn-SOD et ec-SOD), la CAT, la GPX, la GR et la GST, par la mesure des activités enzymatiques SOD, CAT, GR et GST mais également par la mesure de la peroxydation lipidique. Ces analyses ont été effectuées dans les branchies car elles constituent l'organe responsable de la respiration mais aussi un organe clef pour l'étude de stress environnementaux (Farcy et al., 2009).

Les résultats obtenus lors de cette étude ont fait l'objet d'une publication parue dans *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* en 2012 et qui est présentée ci-après (Béguel et al., 2013).

2. Article 1

Jean-Philippe Béguel, Arnaud Huvet, Virgile Quillien, Christophe Lambert, Caroline Fabioux (2013). **Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology* **157**, 63-71.

Version officielle de l'éditeur: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.10.004>



Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment

Jean-Philippe Béguel^a, Arnaud Huvet^b, Virgile Quillien^b, Christophe Lambert^a, Caroline Fabioux^{a,*}

^a Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/IFREMER, 29280 Plouzané, France

^b Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, IFREMER, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/IFREMER, Technopole Brest-Iroise, BP70, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2012

Received in revised form 9 October 2012

Accepted 9 October 2012

Available online 13 October 2012

Keywords:

Antioxidant capacity

Crassostrea gigas

Reproduction

RNA interference

ROS

ABSTRACT

Energy allocation principle is a core element of life-history theory in which “the cost of reproduction” corresponds to an acceleration of senescence caused by an increase in reproductive investment. In the “theory of aging”, senescence is mainly due to the degradation of lipids, proteins and DNA by reactive oxygen species (ROS), by-products of oxidative metabolism. Some studies have shown that oxidative stress susceptibility could be a cost of reproduction. The present study investigates the effect of reproductive investment on antioxidant capacity in the gills of a species with a very high reproductive investment, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. We used RNA interference targeting the oyster *vasa-like gene* (*Oyvlg*) to produce oysters with contrasted reproductive investment. Antioxidant capacity was studied by measuring the mRNA levels of genes encoding major antioxidant enzymes, and the activity of these enzymes. The highest reproductive investment was associated with the highest transcript levels for glutathione peroxidase and extra-cellular and mitochondrial superoxide dismutase. In contrast, lipid peroxidation did not show any sign of oxidative damage whatever the reproductive investment. Up-regulation of certain genes encoding enzymes involved in the first step of ROS detoxification could therefore be a part of the organism's strategy for managing the pro-oxidant species produced by heavy reproductive investment.

© 2012 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Oxygen (O₂) is an essential molecule for life because it allows cellular respiration and thus the synthesis of ATP, the main energy source for cells. Most oxygen used in cellular respiration undergoes a tetravalent reduction, producing water in the inner mitochondrial membrane. However, when it forms reactive oxygen species (ROS), oxygen can also be toxic for cells. Around 2% of O₂ will experience a partial reduction leading to the production of ROS (Han et al., 2001). ROS species can be pro-oxidant radicals, such as hydroxyl radicals (·OH), superoxide radicals (O₂⁻), peroxy radicals (RO₂) or non-radical species such as hydrogen peroxide (H₂O₂). All of these molecules are highly reactive species that have deleterious effects on molecules that are rich in high electron density sites, such as molecules with high nitrogen content (DNA, RNA and proteins), or that have a large number of carbon double-bonds (fatty acids and phospholipids); ROS therefore damage cells (Cadenas, 1989). To cope with ROS production, organisms possess a complex arsenal of antioxidant defense species based on vitamins (C and E), glutathione, zinc, selenium, metallothioneins or specific enzymes (Hermes-Lima, 2005).

The principal ROS-scavenging enzymes are catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) (Hermes-Lima, 2005).

Under optimal physiological conditions, a balance exists between pro- and antioxidant species. Oxidative stress situations create an imbalance in favor of pro-oxidant species, leading to oxidative damage to cells. Several studies have demonstrated the involvement of oxidative stress in the process of cellular aging (Finkel and Holbrook, 2000). In such cases, organisms have to cope with the management of a respiration/ROS-production conflict, whose regulation involves many antioxidant species and whose efficiency ensures the survival of the organism. ROS overproduction can be induced by many stressful conditions, such as those caused by heat shock, UV exposure, pollution, oxygen availability changes or pathogens (Lesser, 2006). Essential metabolic functions requiring high metabolic activity, such as reproduction, could also be a source of oxidative stress (Alonso-Alvarez et al., 2004). Several studies have shown that increasing reproductive investment causes an acceleration of senescence, which contributes to “the cost of reproduction” (Stearns, 1992). The concept of cost of reproduction is fundamental in life-history theory models based on the principle of energy allocation: individuals should allocate resources optimally among maintenance, growth and reproduction in order to maximize their fitness (Stearns, 1992). In addition, according to the “theory of aging”, some studies (Alonso-Alvarez et

* Corresponding author at: LEMAR/UMR6539/IUEM, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France. Tel.: +33 2 98 49 87 44; fax: +33 2 98 49 86 45.

E-mail address: Caroline.Fabioux@univ-brest.fr (C. Fabioux).

al., 2004, 2006) have hypothesized that a decrease of antioxidant capacities together with or without an increase of ROS production could be considered as cost of reproduction because it accelerates senescence. Relationships that could represent physiological trade-offs between reproductive investment and antioxidant capacities have been observed in a few species. In *Drosophila melanogaster*, an increase in egg production resulted in decreased resistance to oxidative stress, leading to higher mortality rate after exposure to paraquat, a compound that generates oxygen radicals (Salmon et al., 2001). In the zebra finch (*Taeniopygia guttata*), a negative correlation was observed between reproductive investment and antioxidant defenses, with an increase of reproductive investment causing a reduction of SOD and GPX activities (Wiersma et al., 2004).

ROS production is an important component of the stress response for aquatic organisms exposed to various stressful conditions (Lesser, 2006). Sessile organisms in particular, such as the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, live in variable and potentially stressful natural ecosystems and have no choice but to endure changing environmental conditions. Over the last ten years, populations of the Pacific oyster, which is the most important aquaculture resource in France, have suffered mass mortalities during spring and summer, the period of its maximum reproductive activity. The research program MOREST (MORTalités ESTivales), led by IFREMER from 2001 to 2006, revealed that this phenomenon was determined by a multifactorial interaction between oysters, their environment and opportunistic pathogens (Samain and McCombie, 2008). The physiological status of oysters is suspected to play a major role in these interactions, and reproduction has often been viewed as a main contributing factor (Koganezawa, 1974; Mori, 1979; Perdue et al., 1981; Samain et al., 2007). Indeed, a negative correlation was found between reproductive effort and survival (Ernande et al., 2004; Huvet et al., 2010). This might be partly due to the fact that marine bivalves have a high reproductive allocation. At maturity, the volume of an oyster gonad can reach 70% of the volume of the animal (Enríquez-Díaz et al., 2009). Such an investment requires a large production of ATP and, therefore, an increase in energy metabolism during gametogenesis (Van der Veer et al., 2006). However, enhancing the activity of the energy metabolism implies an increase in cellular respiration and, therefore, an increase in ROS production. Management of oxidative metabolism could be a component of oyster survival in stressful conditions during the reproductive period. Indeed, a difference between the constitutive pathways of antioxidant defense was suggested as an underlying difference between lines of oysters that were resistant or susceptible to summer mortality (Delaporte et al., 2007; Samain et al., 2007; Fleury et al., 2010; Fleury and Huvet, 2012).

During the breeding season, there may be a conflict between the production of germ cells – which mobilizes the endogenous energy reserves of the animal – and other physiological functions, such as immunity or detoxification of pro-oxidant species. A reduction of the “hemolymph profile” (i.e. cells are fewer, smaller and less complex; phagocytosis and phenoloxidase activity are low, associated with high basal reactive oxygen species production) has previously been reported during gonad maturation in abalone (Travers et al., 2008). Similarly, reduced phagocytosis activity of hemocytes was reported during oyster gametogenesis (Delaporte et al., 2006) and a higher intra-hemocyte ROS production in oysters was found to be correlated with higher reproductive investment (Delaporte et al., 2007).

In this context, the present study aimed to determine whether antioxidant capacities of *C. gigas* are modified with reproductive effort. To achieve this goal, we used RNA interference (RNAi) to knockdown the oyster *vasa-like gene* (*Oyvlg*) (Fabioux et al., 2009), a gene known to be implicated in germ cell proliferation in *C. gigas* germline cell development (Fabioux et al., 2004). This innovative method enabled us to produce oysters with contrasted reproductive investment, which we investigated for their antioxidant defense mechanisms. We then exposed these oysters to a heat shock to provoke metabolism over-activation to observe whether this had an impact on their antioxidant

capacities according to their reproductive investment. We aimed to study the expression of genes encoding major antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPX, GR, and GST) and the activity of these enzymes. We also measured the lipid peroxidation as a marker of oxidative stress. All these tests were made in the gills, the organ not only responsible for oyster respiration but also the first in contact with the animal environment. Thus they are a key organ for studying environmental stresses such as thermal stress (Farcy et al., 2009).

2. Material and methods

2.1. Biological material

Oysters (*C. gigas*) aged two and a half years were obtained in February 2010 from stocks issued from natural spat, cultured at Plougastel-Daoulas (Rade de Brest, France). The oysters were transferred to the IFREMER experimental hatchery in Argenton (France) where they were placed in 600-L raceways filled with 20- μ m filtered seawater. All oysters were in early initiation of gametogenesis stage (stage 1) at the beginning of the experiment. They were acclimated for 1 week and then placed in optimal conditions for germ cell maturation (see Fabioux et al. (2005), for experimental procedure), fed on a diet of two algae species with a ratio equal to 12% dry weight algae/dry weight oyster per day (50% *Chaetoceros gracilis*, 50% *T-Isochrysis galbana*) and water temperature maintained at 19 ± 1 °C. Raceways were drained and cleaned twice a week.

2.2. RNA interference targeting the oyster *vasa-like gene*

2.2.1. dsRNA synthesis

Two fragments of *oyvlg* cDNA (GenBank accession no. AY423380) from positions 495 to 1020 (*oyvl4*) and 29 to 906 (*oyvl5*) were amplified by RT-PCR using total RNA extracted from female gonad as template. PCR fragments were extracted from agarose gel and purified using a QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). *Oyvl4*- and *oyvl5*-dsRNAs were produced according to the protocol previously described in Fabioux et al. (2009). To assess the quality and synthesis of non-degraded unique fragments of 525 bp (*oyvl4*) and 877 bp (*oyvl5*), dsRNA was run by electrophoresis on a 1% agarose gel. *Oyvl4*- and *oyvl5*-dsRNAs were mixed in equi-proportion and diluted in Tris/NaCl to obtain a final concentration of $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

2.2.2. dsRNA administration

Oysters were anesthetized in MgCl_2 solution (3/5 fresh water, 2/5 seawater and $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$) for 3 h. Anesthetized oysters were injected at T0 (February, beginning of conditioning) and at T19 (19 days after the beginning of the conditioning) directly into the gonad with $100 \mu\text{L}$ saline solution containing $15 \mu\text{g}$ (*Oyvl 15*, $n=20$) or $75 \mu\text{g}$ (*Oyvl 75*, $n=20$) dsRNA. On the same days, 20 oysters were injected with $100 \mu\text{L}$ saline solution without dsRNA to provide injection controls (IC, $n=20$). The remaining oysters were kept as non-injected controls (NIC, $n=40$). After injection, the oysters were maintained in raceways in optimal conditions for gonadic maturation (see Fabioux et al. (2005)).

2.2.3. Heat shock challenge and sampling

At T48 (48 days), half of the oysters from each treatment were heat-shocked by putting them in water at 28 ± 1 °C for 48 h. Two days later, at T50 (50 days), all oysters were dissected. Gills were sampled, frozen in liquid nitrogen and ground cryogenically using a mixer mill MM400 (Retsch) to obtain a homogenized powder, which was separated into three parts: 50 mg for RNA extraction, 50 mg for lipid peroxidation measurement and 125 mg for protein extraction and enzymatic assays. For 10 oysters non-injected at T0 and all the oysters at T50, a 3 mm-thick section of the visceral mass was cut above the pericardic region and fixed in modified Davidson's

solution (Latendresse et al., 2002) at 4 °C for 48 h for later histological analysis.

2.3. Histological analysis

The visceral mass sections were dehydrated in an ascending ethanol series, cleared with the xylene substitute Microclearing (DiaPath), and embedded in paraffin. Five μm -thick sections were then cut using a microtome, mounted on glass slides, stained with Harry's hematoxylin–Eosin Y (Martoja and Martoja-Pierson, 1967), and protected with a cover slip. Slides were examined under a light microscope to determine the sex and reproductive stage of the oysters according to Steele and Mulcahy's (1999) classification. The quantification of reproductive investment was measured as the occupation of the gonad relative to the total surface of the visceral mass, i.e. gonadic occupation (GO), determined by image analysis software (IMAQ Vision Builder, National Instrument) as described in Fabioux et al. (2005).

2.4. Assay of transcript level of genes coding major antioxidant enzymes

2.4.1. RNA extraction and DNase treatment

To extract total RNA, 50 mg of gill powder was homogenized in 1 mL of TRI reagent (Sigma-Aldrich) using an Ultra-Turrax® (IKA), according to the manufacturer's instructions. RNA extracts were diluted in 150 μL ultra pure water. Six μg of RNA was then treated with DNase RQI (0.5 U/ μg total RNA, Promega) to prevent DNA contamination and then diluted in 10 μL ultra pure water. RNA concentrations were measured using a Nanodrop spectrometer (Thermo Scientific) at 260 nm, using the conversion factor $1\text{OD} = 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNA. RNA quality was checked using RNA nanochips and Agilent RNA 6000 nanoreagents (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions.

2.4.2. Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction

From 1 μg of total RNA, reverse transcription was carried out in a 20 μL final volume, using the RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) with oligo(dT)₁₈ primers. A reverse transcription was also performed in the same conditions using RNA extracted from the entire tissues of 10 wild oysters to serve as a reference sample. The transcript levels of catalase (CAT), cytoplasmic SOD (cy-SOD), mitochondrial SOD (Mn-SOD), extra-cellular SOD (ec-SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), heat shock protein 70 (Hsp70) and hypoxia-inducible factor α (Hif- α) were investigated in the samples by real-time PCR, using the Applied Biosystems® 7500 Real-Time System. Amplification of oyster elongation factor 1 (EF1) (BQ426516) cDNA was made to confirm the steady-state expression of a house-keeping gene and to provide an internal control for gene expression (CV < 5%). PCR efficiency (E) was determined for each primer pair by making standard curves from serial dilutions of control cDNA (from 1/10 to 1/10 000) and using the following formula: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$.

For each gene, primer sequences, GenBank accession numbers and PCR efficiencies are listed in Table 1. Real-time PCR assays were performed in triplicate, with 3.5 μL cDNA (1/25 dilution) in a total volume of 10 μL , with 0.75 μL of each primer at 1 μM and 5 μL Absolute™ Blue QPCR SYBR® Green ROX Mix (Thermo Fisher Scientific). The cycling conditions consisted of Taq polymerase activation for 15 min at 95 °C, then 45 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/elongation at 60 °C for 1 min. For each individual sample, a melting curve program was applied from 60 °C to 95 °C by increasing temperature at a ramp rate of 1%. Each run included the reference cDNA and water controls. Negative reverse-transcription controls (each total RNA sample after DNase treatment) were run to assess the absence of DNA carryover. Calculation of the relative expression ratio (R) of a target gene made using the following formula: $[(E_{\text{target gene}})^{\text{Ct}(\text{target gene, reference cDNA}) - \text{Ct}(\text{target gene, sample})}] / [(E_{\text{EF1}})^{\text{Ct}(\text{EF1, reference cDNA}) - \text{Ct}(\text{EF1, sample})}]$ (Pfaffl, 2001).

2.5. Enzymatic analysis of the principal antioxidant enzymes

2.5.1. Total protein extraction and assay

Total protein extraction for subsequent SOD and CAT enzymatic assays was realized using 50 mg of gill powder homogenized in 25 μL lysis buffer [NaCl 150 mM, Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, phosphatase inhibitor cocktail II (Sigma) 1%, Triton® X-100 1%, CA-630 Igepal® (Sigma) 0.5% and 1 tablet/25 mL of complete EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche)] with an Ultra-Turrax® (Corporeau et al., 2011). The samples were then centrifuged for 45 min at 10000 g at 4 °C and the supernatant collected, aliquoted and stored at -80 °C. Total protein extractions for subsequent GR and GST enzymatic assays were realized using 75 mg of gill powder homogenized in 250 μL extraction buffer [phosphate buffered saline (PBS) solution, EDTA 1 mM, Triton® X-100 0.1%] with an Ultra-Turrax®. The samples were then centrifuged for 10 min at 15000 g at 4 °C and the supernatant was collected, aliquoted and stored at -80 °C. Protein assays were performed in triplicate using the DC™ protein assay (Bio-Rad), following the supplier's instructions. Samples used in SOD and CAT enzymatic assays were diluted 10 times in lysis buffer and those used in GR and GST enzymatic assays were diluted 10 times in extraction buffer. Results were expressed in mg proteins $\cdot \text{mL}^{-1}$.

2.5.2. Enzymatic assays

For SOD (EC 1.15.1.1) enzymatic assays, the Sigma-Aldrich SOD determination kit was used, following the supplier's instructions. Samples were diluted 20 times in dilution buffer and a standard solution was used to obtain results in U $\cdot \text{mL}^{-1}$. For CAT (EC 1.11.1.6) enzymatic assays, the Amplex® Red Catalase Assay Kit (Invitrogen) was used, following the supplier's instructions, and absorbance was measured at 560 nm to obtain results in U $\cdot \text{mL}^{-1}$. Samples were diluted 1000 times in dilution buffer. For GR (EC 1.8.1.7) enzymatic assays, samples were diluted 1.5 times in phosphate buffer (100 mM, pH 7.6 at 25 °C). Twenty μL of sample was added to 180 μL of reaction buffer (phosphate buffer, EDTA 1 mM, NADPH 0.1 mM, oxidized

Table 1

Sense and anti-sense sequences of primers used for real-time PCR analysis. PCR efficiencies were determined for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of the reference cDNA.

GenBank access	EST name or annotation	Abbreviation	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	PCR Efficiency %
GenBank ID: BQ426516	Elongation Factor 1	EF1	ACCACCTGGTGAGATCAAG	ACGACGATCGCAATTCTCTT	101.7
GenBank ID: AM853618	Catalase	CAT	TTCGTCATATCGGGTTTACTTCTG	CCTGTGCACGTCTGCCATT	101.9
GenBank ID: AJ496219	Superoxide dismutase	Cy-SOD	GACGATTGGCTTGTGGAGTGA	GGACCGAGTGGAGGCTAGTG	100
GenBank ID: DQ010420	Hemocyte extracellular superoxide dismutase	Ec-SOD	CTTCATGCCAGGCAACT	TGACGTTGAATCCGGTCA	100.2
GenBank ID: EU420128	Manganese-superoxide dismutase	Mn-SOD	AGTCTGGTTCGCACATTCCTGT	CATGTGCCAATCAAGATCCTC	104.7
GenBank ID: AM856731	Glutathione peroxidase	GPX	GGACTACCCGATGATGAACGA	GGAAGGAAACCCGAGAACCA	99.1
GenBank ID: CU685269	Glutathione reductase	GR	TTCGCCCTGCTGCTATGG	TGCGCCTGGGAGATGTTTG	99
GenBank ID: FP091130	Glutathione S-transferase	GST	GGATTCAAACGCCTCAAACAG	TGGGCAGTTGGCAAAAAGA	101.1
GenBank ID: AM854673	Heat shock protein 70	HSP70	CCTGCAATATGGAGTGATTCC	CTCCGGTTCATAAGCCATC	101.8
GenBank ID: AB289857	Hypoxia-inducible factor α	HIF- α	ACAGCCGACCCAGAAAC	TCAGGCTTGGATTCTCAATTCC	99.2

glutathione 1 mM, DTNB 0.75 mM). Starting immediately after mixing, absorbance was read at 412 nm every 42 s for 7 min. GR enzyme concentration was determined in $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ using the delta absorbance per minute and the DTNB molar extinction coefficient ($14.15\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). For GST (EC 2.5.1.18) enzymatic assays, samples were not diluted. Ten μL of sample was added to 190 μL of reaction buffer (D-PBS, L-glutathione reduced 2 mM, CDNB 1 mM). Starting immediately after mixing, absorbance was read at 340 nm every 41 s for 7 min. GST enzyme concentration was determined in $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ using the delta absorbance per minute and the CDNB molar extinction coefficient ($9.6\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). For each sample, assays were performed in duplicates in 96-well microplates and a blank was run. Using the protein concentration results, enzymatic results were then expressed in $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteins.

2.6. Measurement of oxidative damage using the malondialdehyde (MDA) assay

The malondialdehyde (MDA) assay method is based on the formation of a MDA/TBA (thiobarbituric acid) to measure lipid peroxidation in gill samples. Approximately 50 mg of gill powder was homogenized in 1 mL Milli-Q water containing 2% of a 1% butylhydroxytoluene methanol solution, using an Ultra-Turrax® (IKA). Then, 3 mL of a 1% phosphoric acid solution and 1 mL of a 1% thiobarbituric acid solution were added. The mix was heated for 30 min at 100 °C, cooled on ice and mixed with 5 mL of butanol before being centrifuged for 10 min at 6000 g at 4 °C. The supernatant was used to assay the MDA/TBA complex at 532 nm, and MDA quantified with a standard curve. Results were expressed in $\text{nmol MDA}\cdot\text{g}^{-1}$ wet tissue.

2.7. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using STATGRAPHICS® software. According to the Shapiro–Wilk test, results were not normally distributed. Therefore, statistical comparisons between groups of oysters were made by Kruskal–Wallis tests, followed by a Nemenyi–Damico–Wolfe–Dunn post hoc tests for histological analyses and Mann–Whitney tests for gene transcript levels, enzymatic activities and the malondialdehyde assay. The threshold of statistical significance was set at $P < 0.05$. In analyses designed to compare parameters according to reproductive investment, oysters were pooled and divided into quantiles on the basis of their GO to obtain a low GO group (the 25% of males, $n = 8$, and 25% of females, $n = 12$, with the lowest GO; mean $\text{GO} \pm \text{SD} = 17.66 \pm$

8.97%) and a high GO group (the 25% of males, $n = 8$, and 25% of females, $n = 12$, with the highest GO; mean $\text{GO} \pm \text{SD} = 69 \pm 6.69\%$).

3. Results

3.1. Production of oysters with contrasted phenotypes for reproductive investment

Analysis of the gonadic occupation rate (GO) on visceral mass sections from oysters showed that mean GO at the start of the experiment (T0; mean $\text{GO} \pm \text{SD} = 10.54 \pm 4.12\%$) was significantly lower than the mean GO at T50 for oysters injected with 15 μg *oyvl*-dsRNA (Oyvl15; $43.67 \pm 16.40\%$), injection controls (IC; $48.10 \pm 20.69\%$) and non-injected controls (NIC; $53.53 \pm 18.40\%$) (Fig. 1). At T50, oysters injected with 75 μg *oyvl*-dsRNA showed a mean GO (Oyvl75; $24.62 \pm 17.67\%$) that was statistically similar to the mean of the T0 group, but significantly lower than the mean GO of Oyvl15, NIC and IC groups ($P = 7.574\text{e-}08$). At the individual level, 12 out of 19 of the oysters injected with 75 μg *oyvl*-dsRNA showed a reduction in their GO of 50% or more compared with the average in the controls (NIC + IC; 51.63%). Only 2 out of 18 of the oysters injected with 15 μg *oyvl*-dsRNA showed such a reduction. At T50, when all of the oysters from all of the injection treatments were considered, we found that we had successfully obtained a broad range of GO, from 4.45% to 80.40%. The T50 oysters from the different treatments were therefore pooled and tested together in the subsequent analyses.

3.2. Effects of the heat shock treatment on antioxidant parameters, *Hsp70* and *Hif- α* transcripts and MDA levels

The survival rate of the oysters was 100% throughout the heat shock treatment (48 h at 28 °C). The oysters subjected to the heat shock ($n = 39$, with $n = 16$ males and $n = 23$ females) were compared with those not subjected ($n = 38$, with $n = 15$ males and $n = 23$ females) for transcript levels of *CAT*, *cy-SOD*, *Mn-SOD*, *ec-SOD*, *GPX*, *GST*, *Hif- α* and *Hsp70*; enzymatic activities of SOD, CAT, GR and GST; and malondialdehyde (MDA) level in gills. The transcript level of *ec-SOD* was 1.8-fold higher in oysters that had not been exposed to a heat shock than in those that had ($P = 0.027$). There were no significant differences in the other parameters between the oysters that had or had not been exposed to a heat shock. Because we used randomized selection to choose the oysters that were exposed to heat shock, we subsequently found that the exposed group of oysters had a significantly lower mean GO (mean $\text{GO} \pm \text{SD} = 38.05 \pm 19.83\%$)

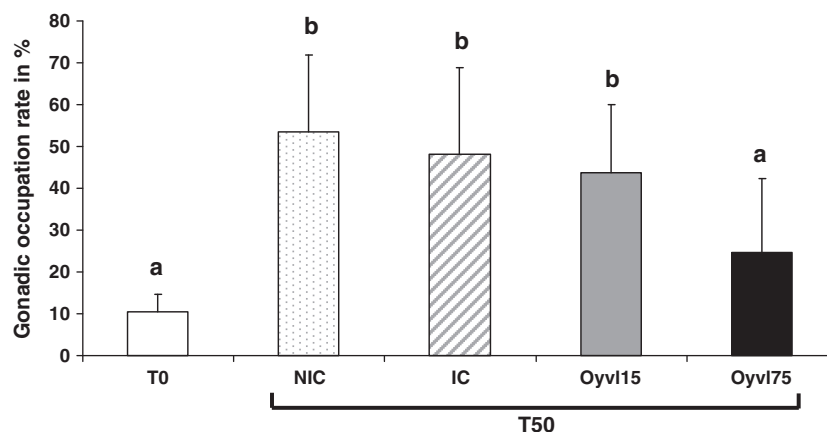


Fig. 1. Gonadic occupation rate (percentage surface occupied by the gonad/total area of the visceral mass) depending on the injection treatment (mean \pm standard deviation). T0 = oysters sampled at T0; T50 = oysters sampled at 50 days post injection: NIC = non-injected controls ($n = 26$), IC = injection controls ($n = 15$), Oyvl15 = injection with 15 μg *oyvl*-dsRNA ($n = 18$), Oyvl75 = injection with 75 μg *oyvl*-dsRNA ($n = 19$). Multiple comparisons were made between groups using a Kruskal–Wallis test followed by a Nemenyi–Damico–Wolfe–Dunn post hoc test at the 5% level; homogenous groups share letters.

than the group of oysters that had not been exposed ($48.02 \pm 21.41\%$) ($P=0.045$). In consequence, all the oysters were grouped and we divided them into quantiles on the basis of their GO to obtain a low GO group (the 25% of males, $n=8$, and 25% of females, $n=12$, with the lowest GO; mean $GO \pm SD = 17.66 \pm 8.97\%$) and a high GO group (the 25% of males, $n=8$, and 25% of females, $n=8$, with the highest GO; mean $GO \pm SD = 69 \pm 6.69\%$) (Fig. 2). Transcript levels of *CAT*, *cy-SOD*, *Mn-SOD*, *ec-SOD*, *GPX*, *GR*, *GST*, *Hif- α* and *Hsp70*, enzymatic activities and MDA level were compared between heat-shocked and non heat-shocked oysters in the low and high GO groups. No differences in the transcript levels, enzyme activities or level of MDA were observed in either the low GO group or the high GO group (Table 2). As a consequence, for the subsequent analyses, oysters were grouped, as described above, to form low GO and high GO groups.

3.3. Effects of gonadic occupation rate on antioxidant parameters and MDA level

The oysters of the low GO group were compared with the oysters of the high GO group for transcript levels of *CAT*, *cy-SOD*, *Mn-SOD*, *ec-SOD*, *GPX*, *GST*, enzymatic activities of SOD, CAT, GR and GST, and MDA level in gills. Oysters of the high GO group showed transcript levels almost 1.90-fold ($P=0.020$), 1.42-fold ($P=0.0065$) and 1.27-fold ($P=0.043$) higher than oysters of low GO group for *ec-SOD*, *Mn-SOD* and *GPX*, respectively (Fig. 3). For the other parameters, no significant differences were observed between oysters of the high and low GO groups (Table 3).

3.4. Effects of sex and gonadic occupation on antioxidant parameters and MDA level

To examine the effect of sex, we considered all the previous analyses according to sex and GO group. When males were compared with females at the same level of GO (low or high) for all the parameters, no significant differences were observed between sexes (Table 3). Males of the low GO group ($n=8$; mean $GO \pm SD = 25.41 \pm 9.23\%$) were then compared with males of the high GO group ($n=8$; mean $GO \pm SD = 71.61 \pm 5.12\%$) and females of the low GO group ($n=12$;

mean $GO \pm SD = 12.50 \pm 3.46\%$) were compared with females of the high GO group ($n=12$; mean $GO \pm SD = 67.33 \pm 7.26\%$). Only the *Mn-SOD* values for females showed a significant difference according to GO group (Fig. 3). The transcript level of *Mn-SOD* in females was 1.46-fold higher in the high GO group than in the low GO group ($P=0.040$). The transcript levels of *Mn-SOD* for males and of *GPX* and *ec-SOD* for both males and females also showed higher values in oysters of high GO groups, but without any significant difference (Fig. 3). No significant variations were observed between high and low GO groups for the transcript levels of the other genes, the enzymatic activities or the MDA level (Table 3).

4. Discussion

Many studies have shown that reproduction is an expensive function in terms of the energy expenditure needed for germ cell production and breeding (Zera and Harshman, 2001; Ernande et al., 2004; Pouvreau et al., 2006). High investment in reproduction can provoke a trade-off in the allocation of energy to the detriment of important physiological functions, such as immunity or defense to stress (Harshman and Zera, 2007). The energy demand of reproduction is satisfied by an increase in overall metabolic rate during reproductive period (Angilletta and Sears, 2000). This leads to increased cellular respiration, which results in an elevation of ROS production. If this rise is not counteracted by an equivalent rise in antioxidant capacities, a rupture in the antioxidant/pro-oxidant equilibrium can occur, leading to oxidative stress. Thus, during the reproductive period, organisms have to cope with an elevation of ROS production due to an increase in metabolic activity, and the possibility of an increased susceptibility to stress. Studies on a possible link between reproduction and sensitivity to oxidative stress are very scarce (Salmon et al., 2001; Wang et al., 2001; Alonso-Alvarez et al., 2004; Wiersma et al., 2004). The aim of the present study was to determine whether the extent of reproductive investment can influence antioxidant capacities or susceptibility to oxidative stress in the Pacific oyster *C. gigas*. For the first time, we manipulated the reproductive investment of oysters by using an *in vivo* RNA interference technique to target *Oyster vasa-like* gene, a germ-cell specific gene, according to the protocol set up by Fabioux et al. (2009). We estimated oyster

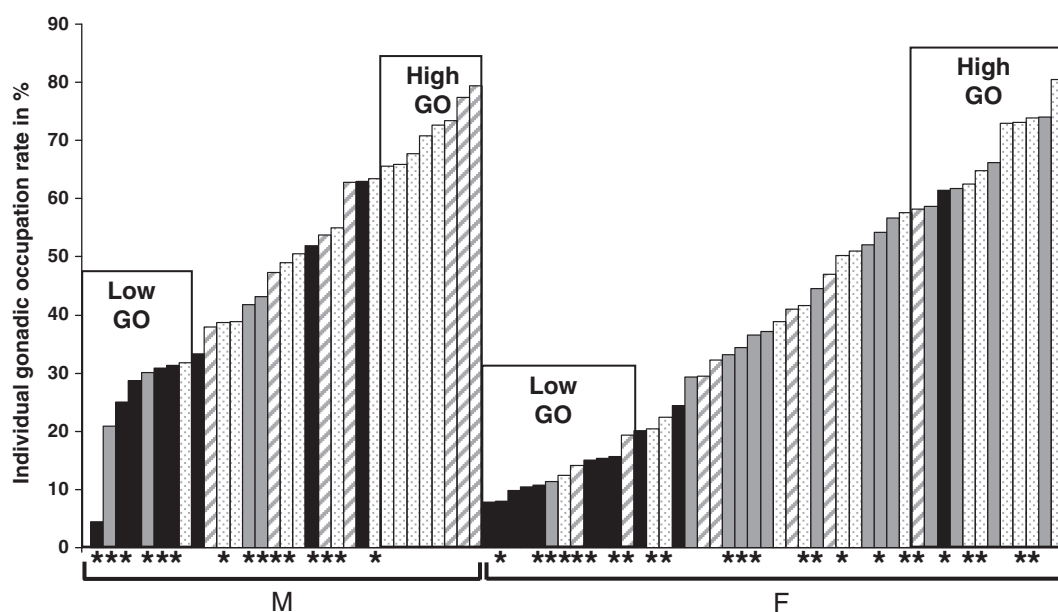


Fig. 2. Individual gonadic occupation rate (percentage surface occupied by the gonad/total area of the visceral mass) at T50 for the non injected controls (white and grey dots), injection controls (white and grey striped), oysters injected with 15 μg oyvl-dsRNA (grey) or 75 μg oyvl-dsRNA (black). M = males and F = females. Asterisks indicate oysters subjected to the heat-shock. Oysters selected on the basis of their gonadic occupation rate to form low and high GO groups are indicated by brackets.

Table 2
Comparison of relative mRNA levels, enzymatic activities and lipid peroxidation in gills (mean \pm standard error) between heat-shocked and non heat-shocked oysters for high or low gonadic occupation. P-value obtained with the Mann-Whitney test.

		Enzymatic activities											Lipid peroxidation		
		Relative mRNA levels													
		cy-SOD	ec-SOD	Mn-SOD	CAT	GPX	GR	GST	Hif- α	HSP70	SOD	CAT	GR	GST	MDA
															mmol/g of wet tissue
Low GO group	Heat shock n = 14	9.86 \pm 3.11	1.70 \pm 0.41	3.13 \pm 0.36	5.06 \pm 1.14	20.61 \pm 3.12	7.80 \pm 1.26	29.92 \pm 5.43	19.83 \pm 2.99	1.31 \pm 1.29	19.92 \pm 1.06	131.41 \pm 15.05	1.37 \pm 0.16	7.88 \pm 1.09	40.98 \pm 2.84
	No heat shock n = 6	8.74 \pm 4.75	1.32 \pm 0.62	3.20 \pm 0.55	4.93 \pm 1.74	21.48 \pm 4.77	10.49 \pm 1.92	20.85 \pm 8.30	28.28 \pm 11.64	0	22.48 \pm 1.62	133.19 \pm 22.99	1.09 \pm 0.24	6.02 \pm 1.67	44.54 \pm 4.34
		P-value	0.84	0.97	0.84	0.30	0.15	0.34	0.97	0.38	0.17	0.90	0.34	0.59	0.96
High GO group	Heat shock n = 6	9.43 \pm 4.80	1.79 \pm 0.50	4.85 \pm 0.96	5.42 \pm 0.78	21.04 \pm 4.08	6.57 \pm 1.52	27.98 \pm 2.89	16.45 \pm 3.87	5.55 \pm 5.52	21.79 \pm 1.31	91.58 \pm 13.90	0.99 \pm 0.29	5.43 \pm 1.64	37.99 \pm 4.70
	No heat shock n = 14	15.22 \pm 3.44	3.53 \pm 0.78	4.32 \pm 0.24	5.64 \pm 0.99	28.98 \pm 2.16	9.37 \pm 1.22	26.60 \pm 3.01	15.56 \pm 2.24	11.93 \pm 8.06	21.66 \pm 1.11	109.86 \pm 12.01	1.25 \pm 0.21	6.34 \pm 1.05	51.10 \pm 5.30
		P-value	0.13	0.97	0.71	0.09	0.17	0.77	0.84	0.79	0.97	0.59	0.39	0.65	0.17

reproductive investment by measuring gonadic occupation rate, estimated by examining the median part of the visceral mass (Royer et al., 2008). The dose-dependent effect and high intra-group variability we observed in response to *oyvl*-dsRNA injection allowed us to obtain oysters with a wide range of reproductive investment, corresponding to mosaic knock-down phenotypes, as shown in Fabioux et al. (2009).

To exacerbate any putative difference in pro-oxidant production and/or antioxidant capacities between oysters with contrasted reproductive investment, we performed a 48 h heat shock to increase overall metabolic activity (Bougrier et al., 1995; Gillooly et al., 2001) and thus potentially increase ROS production to stimulate the antioxidant system. The antioxidant system did not appear modulated after this heat shock, except for *ec-SOD*, which was over-expressed in control oysters compared with heat-shocked oysters. However, the level of expression of *ec-SOD* according to "heat shock treatment" cannot be dissociated from a GO effect because the oysters of the non heat-shocked group had higher GO than the oysters of the heat-shocked group due to the randomness of the experimental design. Moreover, no oxidative damage (estimated by MDA assay) was observed after heat shock, at least for lipids. Finally, no heat stress was revealed by the transcript levels of *Hif- α* and *Hsp70*, both markers of thermal stress (Hamdoun et al., 2003; Kawabe and Yokoyama, 2012), which were not up-regulated in the oyster gills in response to thermal shock. These results can be explained if the delta of temperature (from 19 °C to 28 °C) and the maximum temperature used in this study were too low to induce a real thermal stress in *C. gigas*. However, it is interesting to note that a recent paper identified 88 *Hsp70* genes in the oyster genome (Zhang et al., 2012) illustrating the complexity of studying heat shock response in *C. gigas*. It would be interesting to apply a more severe stress to oysters to investigate whether this could induce different antioxidant responses depending on reproductive investment.

Nevertheless, reproduction alone can be enough to reduce antioxidant activity. Wiersma et al. (2004) demonstrated that antioxidant protection was reduced in the pectoral muscles of birds rearing large broods compared with those rearing small broods. In our study, the transcript levels of three major antioxidant proteins, GPX, *ec-SOD* and Mn-SOD, appeared significantly higher for the group of oysters with the highest reproductive investment compared with the group of oysters with the lowest reproductive investment for both males and females, which could relate to an activation of the antioxidant system in gills of oysters with high reproductive investment. GPX catalyses glutathione oxidation, allowing the reduction of hydrogen peroxide to H₂O, and can protect cells by a ROS-scavenging action. It has been seen to be activated at transcription level after different stresses, e.g. following cadmium exposure in oysters (Jo et al., 2008) or a change of salinity in olive flounders (Choi et al., 2008). In our study, GPX activation may correspond to a mobilization of glutathione to eliminate high H₂O₂ levels. H₂O₂ may be produced directly by the rise in metabolic rate associated with gonadic maturation as a product of dismutation of O₂⁻, the precursor of most ROS, by SOD enzymes (Pamplona and Costantini, 2011). In our study, catalase, which also eliminates H₂O₂, did not appear up-regulated in oysters with high reproductive investment. The differential regulation between these two enzymes is likely due to their different properties: catalase has less affinity for H₂O₂ than GPX and is useful during peaks of H₂O₂ production, whereas GPX is most useful for the small amounts of H₂O₂ produced continuously by cell metabolic activities (Pamplona and Costantini, 2011), as may occur during active gametogenesis in oysters. In addition to GPX and CAT, SOD is the third type of direct ROS-scavenging enzyme. The expression of *ec-SOD* we measured in the gills likely represented the expression of *ec-SOD* in the infiltrated hemocytes. In fact, it has been shown that *ec-SOD* is expressed only in the hemocytes of oysters (Gonzalez et al., 2005), and gills are bathed by infiltrated hemocytes. Hemocytes are considered to be the main cellular mediators of the bivalve defense system against pathogens and environmental stressors

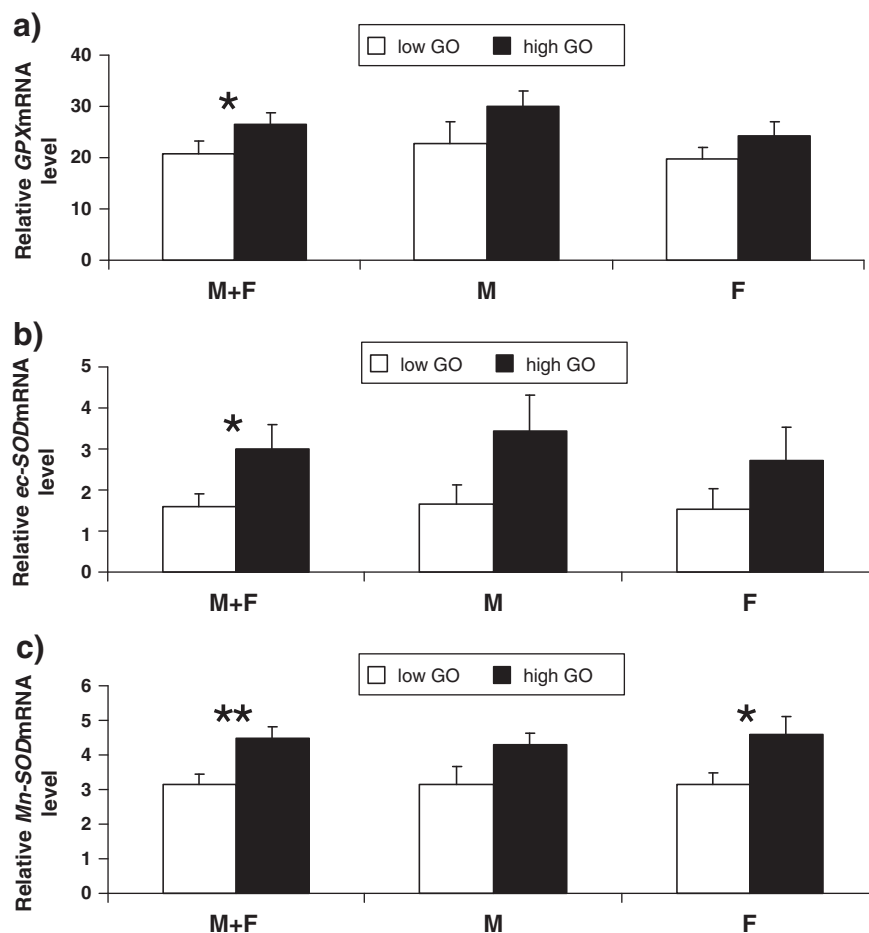


Fig. 3. Level of GPX (a), *ec-SOD* (b) and *Mn-SOD* (c) transcripts relative to *Elongation Factor 1* transcripts in the gills of oysters from the high and low gonadic occupation groups. M = males and F = females. Vertical bars represent standard errors. One asterisk indicates a P-value < 0.05, two asterisks indicate a P-value < 0.01 (Mann–Whitney test).

(Cheng, 1996). Gonzalez et al. (2005) demonstrated that *ec-SOD* protein could assume different functions, like elimination of microorganisms, and could improve the resistance of hemocytes to oxidative damage. The higher *ec-SOD* transcript levels we observed in the gills of oysters with higher reproductive investment could indicate an important role of hemocytes in ROS detoxification. The activity of the *Mn-SOD* is restricted to the mitochondria and could play an important role in cell protection in *C. gigas* under oxidative stress conditions (Park et al., 2009). In this work, the differences in *Mn-SOD* transcript levels in gills between oysters with contrasted reproductive investment is very relevant considering that, in the “theory of aging” by mitochondrial oxidative stress, mitochondria are the first targets of their ROS (Miquel, 1998). Thus, ROS are more likely to damage mitochondria first, which is why *Mn-SOD* appeared to be important in scavenging ROS. Moreover, it has been shown that mitochondria are highly solicited during reproduction in bivalves (Kraffe et al., 2008).

Finally, the apparent stimulation of expression of the direct ROS scavenging enzymes GPX, *ec-SOD* and *Mn-SOD*, at transcription level, was likely a response to elevated ROS production due to a high energetic demand associated with high reproductive investment. ROS production was not, however, measured in this study because they are very labile species with a short half-life, from microseconds to nanoseconds (Pamplona and Costantini, 2011). But no sign of oxidative stress was detected in gills by measuring lipid peroxidation, whatever the level of reproductive investment. In future studies, protein or DNA degradation could be measured to test whether any cellular damage occurred. The transcript level increase of *GPX*, *ec-SOD* and *Mn-SOD* did not lead to an increase of their enzyme activities. These results are

not in accordance with those of Wiersma et al. (2004) on birds, in which antioxidant capacities decreased with reproductive investment. Nevertheless, for SOD, we analysed the overall SOD activity rather than the different SOD isoform specific activities of *ec-SOD* and *Mn-SOD*. This is why it would be relevant to assay enzymatic activities of the different isoforms of SOD in future studies on the antioxidant system of oysters, though this will require development of specific protocols. Moreover, a transcriptional activation is not necessarily followed by a translational activation (Chen et al., 2002). We could thus hypothesize that the higher transcription rate for genes encoding antioxidant enzymes observed in gills of oysters with higher reproductive investment would result from a slightly higher production of ROS over the gametogenesis period for these oysters compared to oysters with lower reproductive investment. Nevertheless, a post-transcriptional repression or degradation of these mRNA may occur if the antioxidant activity is sufficient to offset this production of ROS. The mRNA produced would then constitute a stock of transcripts ready for translation in case of the occurrence of an additional production of ROS resulting from a stress to protect oysters with high reproductive investment from oxidative stress.

Our results suggest that oysters have developed enzymatic antioxidant system with basal levels higher enough to cope with elevated metabolism rate resulting from reproduction. As a result, the germ cell production does not seem to lead to a reduction of antioxidant capacity in oyster gills (males or females). Studies have shown that *C. gigas* protein extract was able to protect human epithelial cells against oxidative stress and elevate the level of glutathione and GST activity in several organs of rats (Gaté et al., 1998, 1999), suggesting

Table 3
Comparison of relative mRNA levels, enzymatic activities and lipid peroxidation in gills (mean \pm standard error) between oysters, depending on gonadic occupation group and/or sex. P-value obtained with the Mann–Whitney test.

		Relative mRNA levels			Enzymatic activities			Lipid peroxidation		
		cy-SOD	CAT	GR	GST	SOD	CAT	GR	GST	MDA nmol/g of wet tissue
Low GO group/ High GO group	n = 20	9.52 \pm 2.24	5.02 \pm 0.85	8.61 \pm 1.00	27.20 \pm 4.17	20.69 \pm 0.83	131.94 \pm 11.34	1.28 \pm 0.12	7.32 \pm 0.80	41.92 \pm 2.87
	n = 20	13.48 \pm 2.80	5.57 \pm 0.72	8.53 \pm 0.99	27.01 \pm 2.24	21.70 \pm 0.85	104.37 \pm 9.38	1.17 \pm 0.17	6.07 \pm 0.87	47.17 \pm 4.13
Females/ Males	P-value	0.44	0.24	0.95	0.60	0.51	0.08	0.18	0.23	0.34
	n = 12	5.72 \pm 2.27	5.77 \pm 1.29	8.42 \pm 1.55	27.61 \pm 6.07	20.51 \pm 1.32	130.59 \pm 16.14	1.33 \pm 0.18	7.75 \pm 1.20	44.37 \pm 4.41
Low GO group	n = 8	15.23 \pm 3.75	3.89 \pm 0.79	8.89 \pm 1.04	26.58 \pm 8.14	20.94 \pm 0.70	133.97 \pm 16.05	1.22 \pm 0.12	6.69 \pm 0.92	38.54 \pm 3.04
	P-value	0.10	0.15	0.97	0.67	0.73	0.79	0.97	0.67	0.53
High GO group	n = 12	13.05 \pm 3.64	6.19 \pm 1.08	8.10 \pm 1.07	24.08 \pm 2.70	21.93 \pm 1.25	100.26 \pm 11.96	0.95 \pm 0.14	4.92 \pm 0.92	46.19 \pm 5.77
	n = 8	14.12 \pm 4.69	4.65 \pm 0.75	9.19 \pm 1.97	31.41 \pm 2.84	21.34 \pm 1.09	110.55 \pm 15.85	1.51 \pm 0.35	7.79 \pm 1.54	48.63 \pm 6.06
Males	P-value	0.97	0.51	0.79	0.15	0.67	0.73	0.15	0.15	0.67
	Low GO group/high GO group	0.96	0.19	0.79	0.56	0.87	0.37	0.87	0.71	0.19
Females	P-value	0.34	0.62	0.88	0.98	0.51	0.17	0.09	0.13	0.95

that there is a high basal antioxidant level in *C. gigas* oyster. This could be due to the ecology of *C. gigas*, since this intertidal species is accustomed to daily re-oxygenation after low tide, leading to an increase of ROS production, in a manner resembling reperfusion-ischemia injury (Storey, 1996). This mechanism could explain the great resistance and adaptation of *C. gigas* to unfavorable environments that stimulate high ROS production. The recent data on oyster genome and transcriptome in response to environmental stressors have confirmed important genomic adaptations of *C. gigas* to life in highly stressful environments (Zhang et al., 2012).

To our knowledge, our study is the first that has aimed to determine a possible link between reproductive investment and management of oxidative metabolism in marine bivalves. To conclude, our data suggest that reproductive investment alone is not sufficient to significantly interfere with antioxidant capacity or susceptibility to oxidative stress in *C. gigas*.

Acknowledgments

The authors are indebted to all staff of the Argenton IFREMER station, particularly Isabelle Quéau for microalgae production and Luc Lebrun for conditioning the oysters. The authors thank Jean-Yves Daniel and Charlotte Corporeau (LPI, IFREMER, Plouzané, France), Aline Amérand and Christine Moisan (ORPHY, UEB, Brest, France), Nelly Le Goïc and Sébastien Artigaud (LEMAR UMR 6539, IUEM, Plouzané, France) for their useful help and technical assistance. This work was supported by the “Oxygènes” research program funded by the GIS Europole-Mer and by the ANR Genanimal program “Gamétogènes”. Jean-Philippe Béguel was funded by a Région Bretagne doctoral grant. We also thank Helen McCombie for improving the English.

References

- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecol. Lett.* 7, 363–368.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O., Sorci, G., 2006. An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution* 60, 1913–1924.
- Angilletta, M.J., Sears, M.W., 2000. The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Funct. Ecol.* 14, 39–45.
- Bougrier, S., Geairon, P., Deslous-Paoli, J.M., Bacher, C., Jonquieres, G., 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134, 143–154.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 79–110.
- Chen, G., Gharib, T.G., Huang, C.C., Taylor, J.M., Misek, D.E., Kardia, S.L., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M., Beer, D.G., 2002. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 304–313.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant, College Park, MD, USA, pp. 299–333.
- Choi, C.Y., An, K.W., An, M.I., 2008. Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 149, 330–337.
- Corporeau, C., Groisillier, A., Jeudy, A., Barbeyron, T., Fleury, E., Fabioux, C., Czjzek, M., Huvet, A., 2011. A functional study of transforming growth factor-beta from the gonad of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biotechnol.* 13, 971–980.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., Samain, J.-F., 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254, 571–582.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Dégremont, L., Boudry, P., Samain, J.-F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 353, 45–57.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M., 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquacult. Int.* 17, 491–506.
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., Haure, J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.* 17, 342–356.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A., 2004. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 897–904.

- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souche, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458–470.
- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., Huvet, A., 2009. *In vivo* RNA interference in oyster—*vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS J.* 276, 2566–2573.
- Farcy, E., Voiseux, C., Lebel, J.-M., Fiévet, B., 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperones* 14, 371–380.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Flcury, E., Huvet, A., 2012. Microarray analysis highlights immune response of Pacific oysters as a determinant of resistance to summer mortality. *Mar. Biotechnol.* 14, 203–217.
- Flcury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J.-Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P., Favrel, P., Huvet, A., 2010. Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. *Mar. Biotechnol.* 12, 326–339.
- Gaté, L., Schultz, M., Walsh, S., Dhalluin, S., Nguyen Ba, G., Tapiero, H., Tew, K.D., 1998. Impact of dietary supplement of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) on glutathione levels and glutathione S-transferase activity in rat tissues. *In Vivo* 12, 299–303.
- Gaté, L., Paul, J., Ba, G.N., Tew, K.D., Tapiero, H., 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed. Pharmacother.* 53, 169–180.
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., Charnov, E.L., 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293, 2248–2251.
- Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.-C., Gueguen, Y., Bachère, E., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1089–1097.
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., 2003. Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biol. Bull.* 205, 160–169.
- Han, D., Williams, E., Cadenas, E., 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.* 353, 411–416.
- Harshman, L.G., Zera, A.J., 2007. The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol. Evol.* 22, 80–86.
- Hermes-Lima, M., 2005. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Wiley-Liss, Hoboken, NJ, pp. 319–368.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P., 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: a trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 304, 95–99.
- Jo, P.G., Choi, Y.K., Choi, C.Y., 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 460–469.
- Kawabe, S., Yokoyama, Y., 2012. Role of hypoxia-inducible factor α in response to hypoxia and heat shock in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biotechnol.* 14, 106–119.
- Koganezawa, A., 1974. Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. *Proceedings of the Third US–Japan Meeting on Aquaculture at Tokyo, Japan October 15–16*, pp. 29–34.
- Kraffe, E., Tremblay, R., Belvin, S., Le Coz, J.-R., Marty, Y., Guderley, H., 2008. Effect of reproduction on escape responses, metabolic rates and muscle mitochondrial properties in the scallop *Placopecten magellanicus*. *Mar. Biol.* 156, 25–38.
- Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H., Creasy, D.M., 2002. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524–533.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 253–278.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Masson et Cie ed, Paris.
- Miquel, J., 1998. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp. Gerontol.* 33, 113–126.
- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53, 361–369.
- Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, 843–863.
- Park, M.S., Jo, P.G., Choi, Y.K., An, K.W., Choi, C.Y., 2009. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol. Res.* 5, 451–461.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington state. *J. Shellfish Res.* 1, 9–16.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29 (9), e45.
- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., Alunno-Bruscia, M., 2006. Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *J. Sea Res.* 56, 156–167.
- Royer, J., Seguineau, C., Park, K.-I., Pouvreau, S., Choi, K.-S., Costil, K., 2008. Gametogenic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture* 277, 313–320.
- Salmon, A.B., Marx, D.B., Harshman, L.G., 2001. A cost of reproduction in *Drosophila melanogaster*: stress susceptibility. *Evolution* 55, 1600–1608.
- Samain, J.F., McCombie, H., 2008. Summer Mortality Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: the Mores Project. Ed. Ifremer/Quae, p. 379.
- Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227–243.
- Stearns, S.C., 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Steele, S., Mulcahy, M.F., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 70, 673–686.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715–1733.
- Travers, M.-A., Mirella da Silva, P., Le Goïc, N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 400–411.
- Van der Veer, H.W., Cardoso, J.F.M.F., van der Meer, J., 2006. The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. *J. Sea Res.* 56, 107–124.
- Wang, Y., Salmon, A.B., Harshman, L.G., 2001. A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 36, 1349–1359.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J.R., Verhulst, S., 2004. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271, 360–363.
- Zera, A.J., Harshman, L.G., 2001. The physiology of life history trade-offs in animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32, 95–126.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Loso, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54.

3. Conclusions et ouvertures

Dans cette première partie, nous avons tout d'abord confirmé l'efficacité du RNAi et son action dose-dépendante par l'obtention d'huîtres présentant des investissements reproducteurs très contrastés. L'investissement reproducteur des huîtres est mesuré par le pourcentage d'occupation gonadique (OG) qui représente, sur une coupe histologique de la masse viscérale de l'huître, le rapport entre la surface totale de la masse viscérale et la surface occupée par les cellules germinales. Les huîtres de notre étude présentaient un large panel d'OG s'échelonnant de 4% à 80%. Nous avons donc « manipulé » l'effort reproducteur des individus. Suite à cela nous avons constitué deux groupes, celui des huîtres présentant les plus fortes OG et celui des huîtres présentant les plus faibles OG.

L'effet d'un choc thermique (de 19°C à 28°C pendant 48 heures) sur la capacité antioxydante a ensuite été analysé dans ces deux groupes. Une augmentation de la température entraîne une augmentation du métabolisme et donc potentiellement une augmentation de la production de ROS. L'analyse des transcrits de gènes codant les principales enzymes antioxydantes ainsi que leur activité enzymatique n'a pas montré de niveaux différents suite au choc thermique. Cela suppose que le choc thermique n'a pas induit de stress oxydant, ce qui a été confirmé par le fait que les niveaux de peroxydation des lipides, dommages oxydatifs, étaient également similaires entre les huîtres soumises ou non au choc thermique. Ainsi, le choc thermique appliqué dans notre étude (de 19°C à 28°C pendant 48 heures) n'était probablement pas suffisant pour induire un stress. En effet, les taux de transcrits de gènes marqueurs d'un stress thermique (HSP 70 et HIF- α) n'ont pas augmenté suite au choc thermique. Il faut cependant souligner que nous n'avons mesuré le taux de transcription que d'un seul gène sur les 88 gènes codant des HSP70 récemment identifiés (Zhang et al., 2012). Il aurait donc été intéressant de doser la quantité de protéines HSP70 par western blot pour confirmer l'absence de stress thermique.

L'étude de l'effet de l'investissement reproducteur sur la capacité antioxydante a permis de révéler une augmentation des taux de transcrits codant la Mn-SOD, la cy-SOD et la GPX dans la branchie des huîtres à forte OG. En revanche, ni l'activité des enzymes antioxydantes, ni la peroxydation des lipides n'ont montré de niveaux différents en fonction de l'OG. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces résultats. La première

est que l'investissement reproducteur représente un stress pour l'individu mais pas suffisant pour induire un stress oxydant. La deuxième est que les huîtres présentant un fort investissement reproducteur ont une capacité antioxydante plus élevée.

L'huître creuse semblait une excellente candidate pour l'étude d'un trade-off entre reproduction et résistance au stress oxydant. En effet, son investissement à la reproduction est conséquent avec une gonade pouvant représenter jusqu'à 70% du volume de l'animal à maturité (Pouvreau et al., 2006; Enríquez-Díaz et al., 2009). Ensuite, une corrélation négative a été démontrée entre l'effort reproducteur de *C. gigas* et sa survie aux mortalités estivales (Samain and McCombie, 2008). Pour finir, les individus issus du projet MOREST présentant les efforts reproducteurs les plus faibles présentaient, dans leurs branchies, des taux de transcrits pour la cy-SOD, ec-SOD et la GPX plus importants (Fleury and Huvet, 2012). Cependant, les résultats obtenus dans notre étude suggèrent que la reproduction seule n'est pas suffisante pour induire un stress oxydant dans les branchies de *C. gigas*.

Enfin, l'analyse sexe-spécifique réalisée dans cette première partie révèle que la capacité oxydante des branchies des mâles ne diffère pas de la capacité oxydante des branchies des femelles. Le fait que *C. gigas* soit un hermaphrodite alternatif, capable de changer de sexe entre deux événements de gamétogenèse, pourrait en partie expliquer l'absence d'une capacité antioxydante sexe-spécifique dans les tissus somatiques. En revanche, il pourrait en être tout autrement dans la gonade où des marqueurs moléculaires spécifiques du développement gonadique mâle ou femelle ont été récemment identifiés (Dheilly et al., 2012).

SECOND CHAPITRE :
Etude de la capacité antioxydante de la
gonade de *Crassostrea gigas*

1. Introduction à l'étude

Le paradoxe de l'oxygène qui concerne toutes les cellules vivant de la respiration aérobie provient des deux « visages » de l'oxygène. D'un côté il est essentiel à la vie par la respiration cellulaire et de l'autre il est toxique lorsqu'il est partiellement réduit en ROS, sous-produits du métabolisme oxydatif. La reproduction est une fonction énergétiquement très coûteuse, satisfaite par une augmentation du métabolisme et qui pourrait potentiellement causer une situation de stress oxydant. Cependant, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, il ne semble pas y avoir de trade-off entre reproduction et résistance au stress oxydant dans les branchies de *Crassostrea gigas*. Dans cette deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la capacité antioxydante de la gonade de *C. gigas*. Celle-ci pouvant représenter une part importante du volume de l'animal à maturité et en prenant en compte le fait que la production de gamètes nécessite un apport important d'énergie (Zera and Harshman, 2001; Pouvreau et al., 2006), la gonade de *C. gigas* pourrait représenter un site de production de ROS conséquent. D'autre part, des gènes codant des enzymes antioxydantes (cy-SOD, Mn-SOD et CAT) ont été observés différenciellement exprimés dans le tissu gonadique entre les huîtres résistantes et sensibles aux mortalités estivales (Fleury et al., 2010; Fleury and Huvet, 2012). Les huîtres résistantes, qui présentent également un effort reproducteur plus faible, ont des taux de transcrits plus élevés dans leur gonade que les huîtres sensibles juste avant le pic de mortalité.

Dans ce contexte, une partie des analyses effectuées dans la première étude a été réalisée dans la gonade avec le même matériel biologique. Cela nous a permis d'étudier la capacité antioxydante de la gonade en fonction de l'investissement reproducteur des individus, mais également en relation avec le genre des cellules germinales. Seuls les individus matures (stade 3) ont été analysés. Cela a permis de ne pas induire de biais dû à des différences de développement des cellules germinales et d'autre part, le stade 3 correspond au climax du développement gonadique des huîtres. L'effet du choc thermique a également été pris en compte dans ces analyses.

Cette étude a en partie fait l'objet d'un stage réalisé par Mademoiselle Mélanie Mercier en vue de l'obtention du diplôme de Master 2 « Sciences de la Mer et du Littoral » de l'Université de Bretagne Occidentale. Ce stage s'est déroulé de Janvier à Juin 2012 sous

l'encadrement du Dr Caroline Fabioux et moi-même. Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés ci-après sous forme d'article en vue d'une publication.

2. Article 2

Jean-Philippe Béguel, Mélanie Mercier, Arnaud Huvet, Virgile Quillien, Christophe Lambert, Caroline Fabioux. **Antioxydant capacity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* gonadic tissue.**

N.B. : Le matériel et méthode utilisé est le même que pour le chapitre 1.

Antioxidant capacity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* gonadic tissue

Author names:

Jean-Philippe Béguel^a, Mélanie Mercier^a, Arnaud Huvet^b, Virgile Quillien^b, Christophe Lambert^a, Caroline Fabioux^{a*}

Addresses:

^a Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS / UBO / IRD / IFREMER, 29280 Plouzané, France

^b Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, IFREMER, UMR 6539 CNRS / UBO / IRD / IFREMER, Technopole Brest-Iroise, BP70, 292800 Plouzané, France

*** Corresponding author's address:**

LEMAR/UMR6539/IUEM, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

Tel.: +33 (0)2 98 49 87 44; Fax: +33 (0)2 98 49 86 45

Email address: Caroline.Fabioux@univ-brest.fr

ABSTRACT

Reproduction is a highly energy consuming function. This energetic demand is satisfied by an overall metabolic increase that could potentially lead to an increase production of reactive oxygen species (ROS), by-products of aerobic metabolism. ROS have deleterious effects on DNA, proteins and lipids and have been shown to be implicated in males and females infertility, especially in mammals. Nevertheless, organisms possess a set of antioxidant defenses to cope with ROS production. The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is a high reproductive investor species, since the gonad can reach 70% of the animal visceral mass at maturity, and the energetic demand for its germ cell production is consequent. Thus, *C. gigas* gonad could be an important source of ROS for the organism and this could have an impact on gamete integrity. Effective antioxidant capacity of the gonad could be an asset to protect germ cells. In this context, we aimed to study the expression and activity of some major antioxidant enzymes in ripe gonad of oysters, in relation with their reproductive investment, submitted or not to a heat shock. Results showed a gender-specific expression of the glutathione reductase (GR): in males, GR activity increased after a heat shock, not in females, indicating activation of antioxidant defense following heat treatment. In the females, transcript levels of GR encoding gene was positively correlated to reproductive investment, probably indicating maternal mRNA accumulation. Neither reproductive investment nor heat shock had an effect on lipid peroxidation, a marker of oxidative damage, and on the other antioxidant enzyme transcript levels studied. These results suggest that oysters possess a high antioxidant capacity in their gonad probably through the glutathione metabolism.

Key words: antioxidant capacity, *Crassostrea gigas*, marine bivalve, gonad, glutathione reductase, RNA interference

1. INTRODUCTION

The oxygen paradox, concerning all the cells living under aerobic conditions, comes from the two “faces” of oxygen molecule. On one hand oxygen is essential to life through the cellular respiration but on the other hand it can also be toxic when partially reduced and transformed into ROS (Reactive Oxygen Species). These by-products of normal cellular respiration are highly reactive radical species such as hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), superoxide radicals (O_2^-), peroxy radicals ($\text{RO}_2\cdot$) or non-radical species such as hydrogen peroxide (H_2O_2) (Chance et al., 1979; Cadenas, 1989). These pro-oxidant species have adverse effects by altering DNA, proteins and lipids that may affect the membrane integrity and function of cells and organelles, and lead to cell death (Gutteridge and Halliwell, 1990; Green and Reed, 1998). To cope with ROS production, organisms possess an antioxidant defence system based on non-enzymatic species (vitamins C and E, glutathione, zinc, selenium, metallothioneins etc) and specific antioxidant enzymes (Hermes-Lima, 2005). The principal ROS-scavenging enzymes are catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) (Hermes-Lima, 2005). An excessive ROS production overwhelming antioxidant capacity results in an oxidative stress supposed to be implicated in the process of ageing and in many diseases (Finkel and Holbrook, 2000; Evans et al., 2004; Gibson and Huang, 2004; Madamanchi et al., 2005)

The impacts of ROS have been widely studied in biology of reproduction, especially in mammals, where they play a major role in infertility (Agarwal et al., 2005; Sheweita et al., 2005). Indeed, spermatozoa are very susceptible to attacks by ROS *via* lipid peroxidation (Alvarez et al., 1987; Alvarez and Storey, 1995), a major cause of infertility demonstrated in human (Dandekar et al., 2002). Inhibition of oocytes development, meiotic arrest and increase number of degenerated oocytes have also been reported as consequence of high levels of ROS (Tarin et al., 1998; Tatemoto et al., 2000; Guérin et al., 2001). Moreover, all the ROS coming from spermatozoa and oocytes can also impact the offspring by altering embryo development (Nasr-Esfahani et al., 1990; Noda et al., 1991). Nevertheless, ROS in low concentrations can be beneficial and are needed for maturation of oocytes (Blondin et al., 1997; Takami et al., 1999) and for the process of sperm capacitation, hyperactivation, acrosome reaction and then oocyte fertilization (de Lamirande and Gagnon, 1993; de Lamirande et al., 1997; Griveau and

Lannou, 1997). These results confirm the need for an optimal regulation of oxidative metabolism in the gonad to ensure good quality of the gametes.

Reproduction is an energetically costly physiological function requiring an elevation of overall metabolic rate (Angilletta and Sears, 2000; Nilsson, 2002). As the rate of ROS generation is closely related to oxygen consumption (Storey, 1996), reproduction could potentially lead to an oxidative stress. The cost of reproduction designates a classical trade-off in which substantial reproductive investment decreases future reproduction success and accelerates senescence (Williams, 1966; Stearns, 1992). In this context a susceptibility to oxidative stress could be proposed as a cost of reproduction, where energy allocated for reproduction would not be available for somatic maintenance such as antioxidant defense. Some studies have indeed associated a susceptibility to oxidative stress as a cost of reproduction (Salmon et al., 2001; Wang et al., 2001; Alonso-Alvarez et al., 2004; Wiersma et al., 2004; Alonso-Alvarez et al., 2006). For example, in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*) males and females, reproductive investment was negatively correlated to antioxidant defences, with an increase of reproductive investment causing a reduction of SOD and GPX activities in the pectoral muscle (Wiersma et al., 2004).

As reproduction needs energy for gametes production (Zera and Harshman, 2001), the gonad could represent an important source of ROS in the organism and impair the gametes. In this study, we aimed to determine if germ cell production activity itself was a source of oxidative stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* gonadic tissue. *C. gigas* is a sessile marine bivalve mollusc living in stressful aquatic environments in which ROS production is an important component of the stress response (Lesser, 2006). Moreover, gonad of *C. gigas* is a transient organ being absent in winter and reaching maturity in summer with a volume that can attain 70% of the animal volume (Fabioux et al., 2005; Enríquez-Díaz et al., 2009). Such an investment requires a large production of ATP and, therefore, an increase in energy metabolism during gametogenesis (Pouvreau et al., 2006). Thus, *C. gigas* provides an excellent model for studying reproductive investment as a potential source of oxidative stress in the gonad. In this context, we studied the antioxidant capacity of *C. gigas* gonadic tissue for both males and females in relation with their reproductive investment. We also tried to determine whether a heat shock, performed to provoke metabolism over-activation, could have an impact on gonad antioxidant capacities according to reproductive investment. In this goal, we measured the expression of genes encoding major antioxidant enzymes: cytoplasmic Cu/Zn SOD (cy-SOD), CAT, GPX, GR, and GST and the activity of GR and GST in the gonad. The lipid peroxidation was also measured as a marker of oxidative stress. These

analyses were led in gonads of oysters displaying contrasted reproductive investment previously obtained using RNA interference (RNAi) (Béguel et al., 2013). RNAi technique was performed to inhibit the *oyster vasa-like gene* (*oyvlg*), essential to *C. gigas* germline cell development (Fabioux et al., 2009).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Biological material

Oysters aged two and a half years were obtained in February 2010 from stocks issued from natural spat, cultured at Plougastel-Daoulas (Rade de Brest, France). The oysters were transferred to the IFREMER experimental hatchery in Argenton (France) where they were placed in 600-L raceways filled with 20- μ m filtered seawater. All the oysters were in early initiation of gametogenesis at the beginning of the experiment. They were acclimated for one week and then placed in optimal conditions for germ cell maturation (see Fabioux et al., (2005) for experimental procedure), fed on a diet of two algae species with a ratio equal to 12% dry weight algae/dry weight oyster per day (50% *Chaetoceros gracilis*, 50% *T-Isochrysis galbana*) and water temperature maintained at $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Raceways were drained and cleaned twice a week.

2.2 RNA interference targeting the oyster vasa-like gene

2.2.1 dsRNA synthesis

Two fragments of *oyvlg* cDNA (GenBank accession n° AY423380) from positions 495 to 1020 (*oyvl4*) and 29 to 906 (*oyvl5*) were amplified by RT-PCR using total RNA extracted from female gonad as template. PCR fragments were extracted from agarose gel and purified using a QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). *Oyvl4* and *oyvl5* dsRNA were produced according to the protocol previously described in Fabioux et al. (2009). To assess the quality and synthesis of non-degraded unique fragments of 525 bp (*oyvl4*) and 877 bp (*oyvl5*), dsRNA were run by electrophoresis on a 1% agarose gel. *Oyvl4*- and *oyvl5*-dsRNAs were mixed in equi-proportion and diluted in Tris/NaCl to obtain a final concentration of $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

2.2.2 dsRNA administration

Oysters were anesthetized in $MgCl_2$ solution (3/5 fresh water, 2/5 seawater and 50 g.L^{-1} $MgCl_2$) for 3 hours. Anesthetized oysters were injected at T0 (February, beginning of conditioning) and at T19 (19 days after the beginning of the conditioning) directly into the gonad with $100\ \mu\text{L}$ saline solution (Tris/NaCl) containing $15\ \mu\text{g}$ (Oyvl 15, $n = 20$) or $75\ \mu\text{g}$ (Oyvl 75, $n = 20$) dsRNA. On the same days, 20 oysters were injected with $100\ \mu\text{L}$ Tris/NaCl without dsRNA to provide injection controls (IC, $n = 20$). The remaining oysters were kept as non-injected controls (NIC, $n = 40$). After injection, the oysters were maintained in raceways in optimal conditions for gonadic maturation (see Fabioux et al.(2005)).

2.2.3 Heat shock challenge and sampling

At T48 (48 days), half of the oysters from each treatment were heat-shocked by putting them in water at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h. Two days later, at T50 (50 days), all oysters were dissected. Gonads were sampled, frozen in liquid nitrogen and ground cryogenically using a mixer mill MM400 (Retsch) to obtain a homogenized powder, which was separated into three parts: 50 mg for RNA extraction, 50 mg for lipid peroxidation measurement and 125 mg for protein extraction and enzymatic assays. For 10 oysters non-injected at T0 and all the oysters at T50, a 3 mm-thick section of the visceral mass was cut above the pericardic region and fixed in modified Davidson's solution (Latendresse et al., 2002) at 4°C for 48 h for later histological analysis.

2.3 Histological analysis

The visceral mass sections were dehydrated in an ascending ethanol series, cleared with the xylene substitute Microclearing (DiaPath), and embedded in paraffin. Five μm -thick sections were then cut using a microtome, mounted on glass slides, stained with Harry's hematoxylin-Eosin Y (Martoja and Martoja-Pierson, 1967), and protected with a cover slip. Slides were examined under a light microscope to determine the sex and reproductive stage of the oysters according to Steele and Mulcahy's (1999) classification. The quantification of reproductive investment was measured as the occupation of the gonad relative to the total

surface of the visceral mass, i.e. gonadic occupation (GO), determined by image analysis software (IMAQ Vision Builder, National Instrument) as described in Fabioux et al. (2005).

2.4 Assay of transcript level of genes coding major antioxidant enzymes

2.4.1 RNA extraction and DNase treatment

To extract total RNA, 50 mg of gonad powder was homogenized in 1 mL of TRI reagent (Sigma-Aldrich) using an Ultra-Turrax[®] (IKA), according to manufacturer's instructions. RNA extracts were diluted in 150 μ L ultra pure water. Six μ g RNA were then treated with DNase RQI (0.5 U/ μ g total RNA, Promega) to prevent DNA contamination and then diluted in 10 μ L ultra pure water. RNA concentrations were measured using a Nanodrop spectrometer (Thermo Scientific) at 260 nm, using the conversion factor 1OD = 40 μ g.mL⁻¹ RNA. RNA quality was checked using RNA nanochips and Agilent RNA 6000 nanoreagents (Agilent Technologies), according to manufacturer's instructions.

2.4.2 Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction

From 1 μ g of total RNA, reverse transcription was carried out in a 20 μ L final volume, using the RevertAid[™] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) with Oligo(dT)₁₈ Primers. A reverse transcription was also performed in the same conditions using RNA extracted from the entire tissues of 10 wild oysters to serve as a reference sample. The transcript levels of *Catalase (CAT)*, cytoplasmic *SOD (cy-SOD)*, *Glutathione peroxidase (GPX)*, *Glutathione reductase (GR)* and *Glutathione S-transferase (GST)* were investigated in the samples by real-time PCR, using the Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time System. Amplification of oyster *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* cDNA was made to confirm the steady-state expression of a housekeeping gene and to provide an internal control for gene expression (CV < 6%). PCR efficiency (E) was determined for each primer pair by making standard curves from serial dilutions of control cDNA (from 1/10 to 1/10000) and using the following formula: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. For each gene, primer sequences, GenBank accession numbers and PCR efficiencies are listed in Table 1. Real-time PCR assays were performed in triplicate, with 3.5 μ L cDNA (1/25 dilution) in a total volume of 10 μ L, with 0.75 μ L of each primer at 1 μ M and 5 μ L Absolute[™] Blue QPCR SYBR[®] Green ROX Mix (Thermo Fisher Scientific). The cycling conditions consisted of Taq polymerase activation for 15 min at 95°C, then 45 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing/elongation at 60°C for 1 min. For each individual sample, a melting curve program

Table 1

Sense and anti-sense sequences of primers used for real-time PCR analysis. PCR efficiencies were determined for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of the reference cDNA.

GenBank access	EST name or annotation	Abbreviation	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	PCR Efficiency %
GenBank ID: AJ544886	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	GGAGACAAGCGAAGCAGCAT	CACAAAATTGTCATTCAAGGCAAT	95.2
GenBank ID: AM853618	Catalase	CAT	TTCGTCATATCGGGTTTACTTCTG	CCTTGTCACGTCCTGCCATT	100.1
GenBank ID: AJ496219	Cytoplasmic superoxide dismutase	Cy-SOD	GACGATTGGCTTGTGGAGTGA	GGACCGAGTGGAGGCTAGTG	101.2
GenBank ID: AM856731	Glutathione peroxidase	GPX	GGACTACCCGATGATGAACGA	GGAAGGAAACCCGAGAACCA	100.6
GenBank ID: CU685269	Glutathione reductase	GR	TTCGCCCTGCTGCTATGG	TTGCCCTGGGAGATGTTTG	100.3
GenBank ID: FP091130	Glutathione S-transferase	GST	GGATTCAAACGCCTCAAACAG	TGGGCAGTTGGCAAAAAGA	98.4

was applied from 60°C to 95°C by increasing temperature at a ramp rate of 1%. Each run included the reference cDNA and water controls. Negative reverse-transcription controls (each total RNA sample after DNase treatment) were run to assess the absence of DNA carryover. Calculation of the relative expression ratio (R) of a target gene made using the following formula: $[(E_{\text{target gene}})^{(\text{Ct}(\text{target gene, reference cDNA})-\text{Ct}(\text{target gene, sample}))}]/[(E_{\text{EFI}})^{(\text{Ct}(\text{EFI, reference cDNA})-\text{Ct}(\text{EFI, sample}))}]$ (Pfaffl, 2001).

2.5 Enzymatic analysis of the principal antioxidant enzymes

2.5.1 Total protein extraction and assay

Total protein extractions for subsequent GR and GST enzymatic assays were realised using 75 mg of gonad powder homogenized in 250 μL extraction buffer [Phosphate Buffer Saline (PBS) solution, EDTA 1 mM, Triton® X-100 0.1%] with an Ultra-Turrax®. The samples were then centrifuged for 10 min at 15 000 g at 4°C and the supernatant was collected, aliquoted and stored at -80°C. Protein assays were performed in triplicate using the DC™ protein assay (Bio-Rad), following the supplier's instructions. Samples used in GR and GST enzymatic assays were diluted 10 times in extraction buffer. Results were expressed in mg proteins.mL⁻¹.

2.5.2 Enzymatic assays

For GR enzymatic assays, samples were diluted 1.5 times in phosphate buffer (100 mM, pH 7.6 at 25°C). Twenty μL of sample were added to 180 μL of reaction buffer (phosphate buffer, EDTA 1 mM, NADPH 0.1 mM, oxidized glutathione 1 mM, dithionitrobenzoic acid (DTNB) 0.75 mM). Starting immediately after mixing, absorbance was read at 412 nm every 42 sec for 7 min. GR enzyme concentration was determined in U.mL⁻¹ using the delta absorbance per minute and the DTNB molar extinction coefficient (14.15 mM⁻¹.cm⁻¹). For GST enzymatic assays, samples were not diluted. Ten μL of sample were added to 190 μL of reaction buffer (D-PBS, L-glutathione reduced 2 mM, chlorodinitrobenzene (CDNB) 1 mM). Starting immediately after mixing, absorbance was read at 340 nm every 41 sec for 7 min. GST enzyme concentration was determined in U.mL⁻¹ using the delta absorbance per minute and the CDNB molar extinction coefficient (9.6 mM⁻¹.cm⁻¹). In our study, GST activity appeared to low to be measured efficiently. For each sample, assays were performed in duplicates in 96-well microplates and a blank was run. Using the protein concentration results, enzymatic results were then expressed in U.mg⁻¹ proteins.

2.6 Measurement of oxidative damage using the malondialdehyde (MDA) assay

The malondialdehyde (MDA) assay method is based on the formation of a MDA/TBA (thiobarbituric acid) to measure lipid peroxidation in gonad samples. Approximately 50 mg of gonad powder were homogenized in 1 mL Milli-Q water containing 2% of a 1% butylhydroxytoluene methanol solution, using an Ultra-Turrax[®] (IKA). Then, 3 mL of a 1% phosphoric acid solution and 1 mL of a 1% thiobarbituric acid solution were added. The mix was heated for 30 min at 100°C, cooled on ice and mixed with 5 mL of butanol before being centrifuged for 10 min at 6000 g at 4°C. The supernatant was used to assay the MDA/TBA complex at 532 nm, and MDA quantified using a standard curve. Results were expressed in nmol MDA.g⁻¹ wet tissue.

2.7 Statistical analyses

Sample normality was checked using the Shapiro–Wilk test. Homoscedasticity of variances was tested with the Levene's test. Two-way ANOVA was performed, with the factor “GO level” (high or low) and factor “temperature” (oysters kept at 19°C or submitted to a heat shock at 28°C for 2 days). Percentage values were transformed using arcsine (square root (value in %)). If samples followed normal distribution and homoscedasticity of variances, a parametric ANOVA was performed. When data did not follow normal distribution, a non-parametric two-way ANOVA based on random permutations was performed. When significant differences due to factors (GO level and temperature) were observed, ANOVA was followed by post hoc Fisher's LSD test (Least Significant Difference). For each test, significant threshold was determined as $P < 0.05$. Analyses for normality, homoscedasticity, parametric ANOVA and post hoc tests were performed with STATGRAPHICS[®]. Non-parametric two-way ANOVA was performed with R software (R Development Core Team, 2011). Linear regressions were calculated using a correlation matrix in order to investigate possible relationships between mRNA levels, MDA, enzymatic activities and gonadic occupation rate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

As described in Béguel et al. (2013), thanks to the RNAi technique and the conditioning, we obtained mature oysters showing a wide range of reproductive investment in term of gonadic occupation rate (GO). For this study, we excluded none mature oysters (with no mature germ cells) in order to take into account the effect of reproductive effort but not the effect of gametogenesis stage on gonad antioxidant capacity. In this context, only oysters in ripe stage, corresponding to the climax period of gametogenesis where gametes are mature and reproductive investment is maximal, were kept for analyses. Prior to examine the effects of reproductive investment and/or temperature treatment on transcript levels (*cy-SOD*, *CAT*, *GPX*, *GR*, and *GST*), enzymatic activities (*GR*) and lipid peroxidation (MDA level), the absence of injection condition effects on these parameters was tested. For this, the values of these parameters were compared between injection conditions. The results obtained for females showed no injection condition effect on the parameters (data not shown). Concerning the males, the number of samples in 15 µg dsRNA injected oysters (Oyvl 15) and injection controls (IC) was too low to test injection condition effects. Nevertheless, when non-injected controls (NIC) were compared to 75 µg dsRNA injected oysters (Oyvl 75), no injection condition effect on the parameters was observed (data not shown). These results confirmed that the RNAi did not imply any modifications of MDA level, nor of the enzymatic activities and expression of genes studied, excepted expression of the RNAi targeted gene (*oyvlg*) as shown in Fabioux et al. (2009). Considering these results, we assumed that Oyvl 15 and IC male oysters did not differ from the other males for all the parameters studied.

Oysters exposed to a heat shock were then divided into two groups according to their GO level (high GO = half of oysters showing the highest reproductive investments and low GO = half oysters showing the lowest reproductive investments) whatever their injection condition for both males and females. The same groups were made for oysters not exposed to a heat shock and analyses were performed. No effect of GO level or heat shock was observed on transcripts levels of *cy-SOD*, *CAT*, *GPX*, and *GST* for both males and females. However, transcript and enzymatic activity levels concerning glutathione reductase (*GR*) appeared

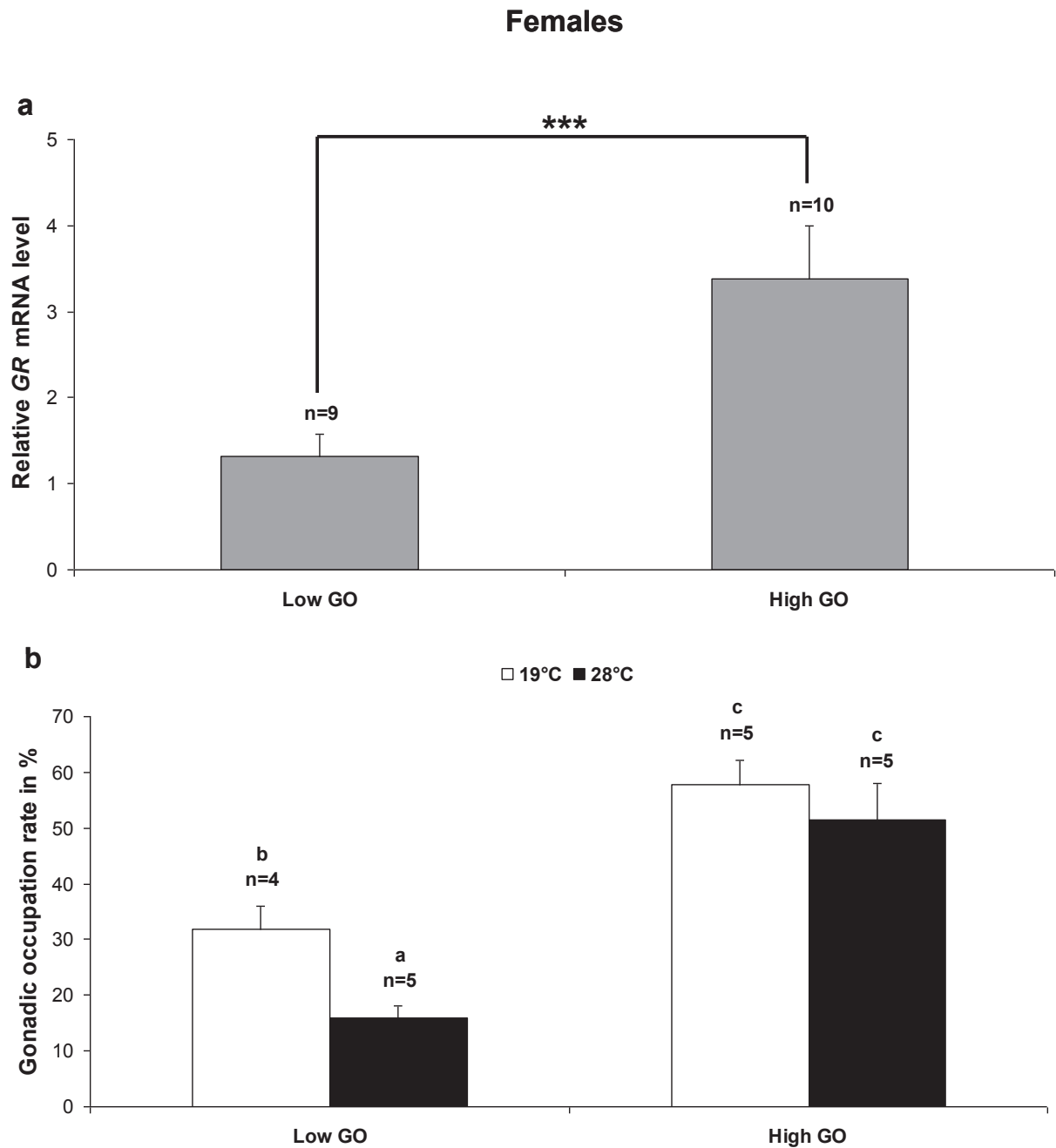


Fig. 1. Glutathione reductase (GR) transcripts relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) transcripts in the gonad of oysters (a) and gonadic occupation (GO) rate (percentage surface occupied by the gonad/ total area of the visceral mass) (b) depending on the GO level (low or high) and temperatures (oysters kept at 19°C and oysters submitted to a heat treatment at 28°C for 2 days) for females. Level of significance $P < 0.001 = \text{“***”}$ to the Homogenous group to the post hoc Fisher LSD test share letters. Bars represent standard error.

different according to GO level or heat shock. Especially, the *GR* expression condition differed according to gender (Table 2).

Indeed, for females, results indicated a significant GO level effect on *GR* transcript level, with higher values in the high GO group (Fig. 1a), whereas GR enzymatic activity was the same in both low and high GO groups. As females were all at the same reproductive stage, the only difference between high and low GO group gonads was the quantity of oocytes they contained. At the ripe stage, oocytes are mature and vitellogenesis is over. Thus, they contain all maternal mRNAs and proteins necessary for the future embryo development until embryo becomes transcriptionally active through the maternal-zygotic transition (Schier, 2007). In mammals, it has been suggested that embryo protection against ROS could be dependent of an endogenous antioxidant enzymes pool coming from a mRNA pool stored by the oocyte during oogenesis (Guérin et al., 2001). In our study, we could then attribute the transcript level of *GR* observed to oocytes as a mRNA stock. The increase of *GR* transcript level in high GO group could therefore be due to an increase of oocyte number rather than reflect the expression of somatic gonadic cells (connective tissue cells, auxiliary cells of oocytes and infiltrated hemocytes). That assumption was confirmed by a significant positive correlation between GR transcript level and GO rate (correlation coefficient = 0.68 and P = 0.0014). It has been shown in the *Spisula* clam that some mRNA could be preferentially repressed before fertilization (Rosenthal et al., 1983). We could then suppose that the translation of mRNA encoding antioxidant enzyme might occur after fertilization in order to protect the future embryo. The GR enzyme contributes to antioxidant protection by reducing the glutathione, a powerful non-enzymatic antioxidant (Hermes-Lima, 2005). Moreover, glutathione has been shown to be essential for embryo development where its quantity decrease by 90% between oocyte and blastocyst stage in the mouse (Gardiner and Reed, 1994). Thus, our results suggest that GR enzyme might play an important role in the oocyte for future embryo development maybe through its action of glutathione recycling. In the rat, GR was measured in important quantity in oocytes and authors suggest that recycling reduced glutathione is more beneficial, in term of energy consumption, than its *de novo* synthesis (Kaneko et al., 2001).

There was also a significant temperature treatment effect on transcript levels of *GR* with females exposed to a heat shock having lower *GR* transcript level than females not exposed to a heat shock. As the groups of heat-shocked females had lower mean GO than the groups of non heat-shocked females (Fig. 1b), due to the randomness of experimental design, we can't separate the heat shock effect and the GO effect, as confirmed by the interaction of these two factors on *GR* transcript level (Table 2). Nevertheless, we could also hypothesize that the heat

Table 2

Summary of the two-way ANOVA results for mRNA levels, MDA and GR activity for males (♂) and females (♀). Non-parametric parameters are marked with F. The two factors are: factor “GO level” (high or low), factor “temperature” (oysters kept at 19°C or submitted to a heat shock at 28°C for 2 days), and their interaction. NS = not significant.

Two-way ANOVA				
		GO level	Temperature	GO level + Temperature
Relative mRNA levels	% OG ♂		*	NS
	% OG ♀		*	NS
	CAT ♂ F	NS	NS	NS
	CAT ♀	NS	NS	NS
	cy-SOD ♂ F	NS	NS	NS
	cy-SOD ♀ F	NS	NS	NS
	GPX ♂ F	NS	NS	NS
	GPX ♀ F	NS	NS	NS
	GR ♂	NS	NS	NS
	GR ♀	***	***	*
	GST ♂ F	NS	NS	NS
	GST ♀ F	NS	NS	NS
	MDA ♂	NS	NS	NS
	MDA ♀	NS	NS	NS
	GR Act ♂	NS	*	NS
	GR Act ♀ F	NS	NS	NS

Levels of significance: P<0.05 =‘*’, P<0.001 =‘***’. % GO = gonadic occupation rate in %, CAT = catalase, cy-SOD = cytoplasmic superoxide dismutase, GPX = glutathione peroxidase, GR = glutathione reductase, GST = glutathione-S-transferase, MDA = malondialdehyde and GR act = glutathione reductase activity.

shock induced a translation of the stored *GR* mRNA as a response to protect oocytes from a potential oxidative stress. In ectothermal animals, the respiration increases at high temperatures (Bougrier et al., 1995; Abele et al., 2002). As ROS production is closely related to oxygen consumption (Storey, 1996), we can suppose that high temperatures could trigger antioxidant response to balance this production. But, there was no elevation in the other genes transcript levels (*cy-SOD*, *CAT*, *GPX* and *GST*), no more than in GR activity and the level of MDA was similar in heat-shocked than in non heat-shocked oyster groups indicating no differential oxidative damages to female gonads. Thus, our first hypothesis explaining the heat shock effect on *GR* transcript level by a difference in the mean GO seem to be more accurate.

Concerning the males, results indicated a significant temperature effect on GR activity with higher values in heat-shocked males than in non heat-shocked ones (Table 2 and Fig. 2a). Males submitted to heat shock also displayed lower GO rate than non heat-shocked males but no GO level effect on GR activity was observed (Fig. 2b and Table 2). The heat shock could then have triggered antioxidant defense such as an increase of GR activity to counteract the potential ROS over production induced by an increase of metabolism at 28°C. ROS are considered as the major cause of human infertility in human by damaging spermatozoa through lipid peroxidation of their membrane (Jones et al., 1979). In our study, the level of MDA was, as for females, similar in heat-shocked than in non heat-shocked males suggesting that the activation of antioxidant activity was sufficient to prevent ROS overproduction potentially induced by the heat treatment at 28°C. Thus, the GR could play an important role in male gonad by reducing glutathione to make it available for ROS detoxifying action by GPX to protect spermatozoa against oxidative damages. But the cell origin of this GR enzymatic activity stays undetermined; it could be due to spermatozoa or to gonadic somatic cells. Some clues would suggest that the increase in GR activity originates from spermatozoa. First, in our study, the increase of GR activity in heat-shocked males was not associated to an increase of *GR* transcript level (no more than in the other gene transcript levels *cy-SOD*, *CAT*, *GPX* and *GST*). This suggests that the increase of GR enzymatic activity would rather be due to post-transcriptional regulation than transcriptional activation. This is in accordance with studies describing spermatozoa as transcriptionally silent cells (Grunewald et al., 2005) but carrying a pool of mRNAs they are able to translate *de novo* in some conditions to replace degraded proteins (Gur and Breitbart, 2006; Miller and Ostermeier, 2006). Second, it has been shown in human spermatozoa that the GPX/GR couple is of great importance in protecting them against oxidative stress (Storey, 1997). Nevertheless, other clues suggest that the

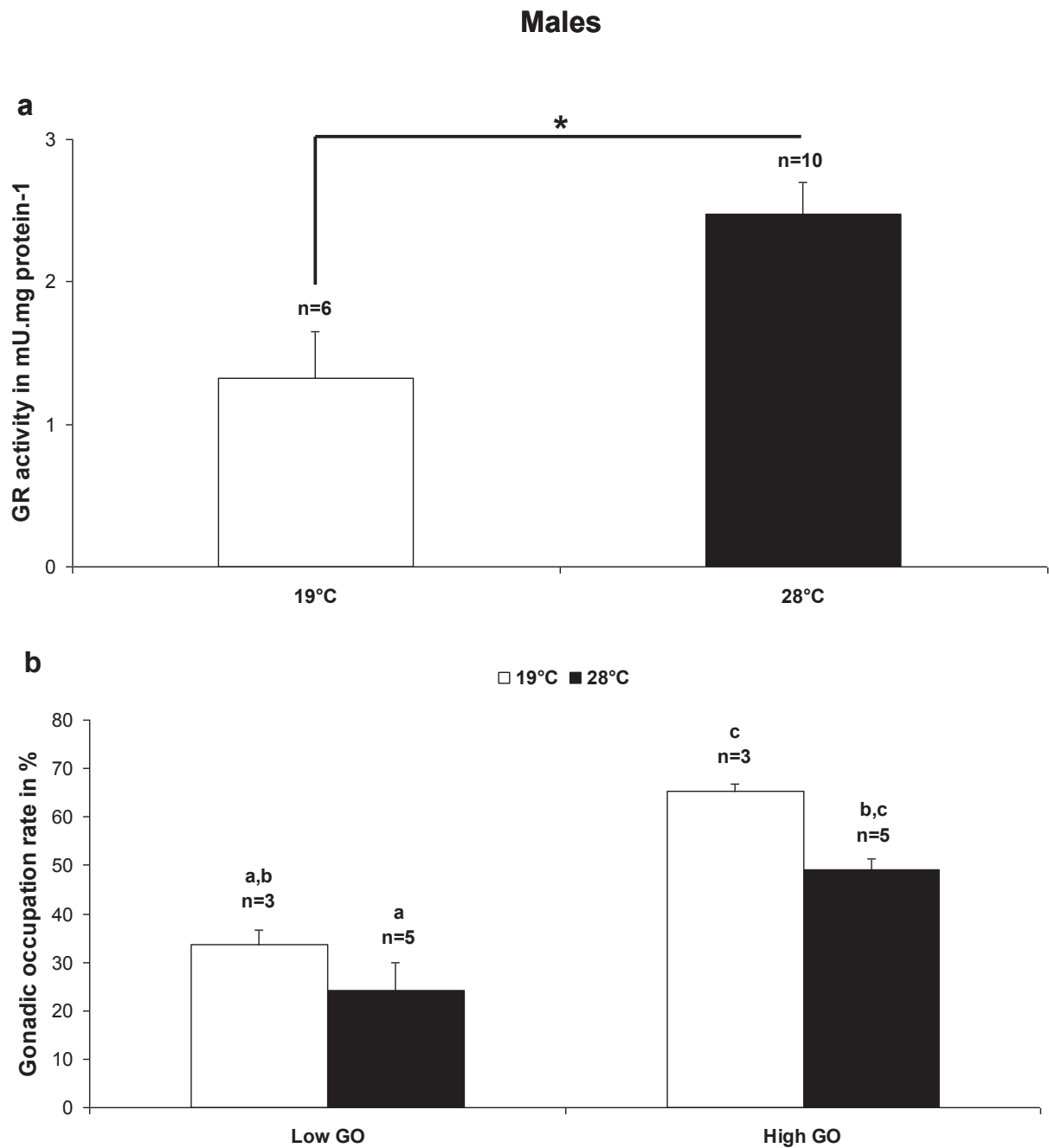


Fig. 2. Glutathione reductase (GR) activity in mU.mg protein⁻¹ in the gonad of oysters (a) and gonadic occupation (GO) rate (percentage surface occupied by the gonad/ total area of the visceral mass) (b) depending on the GO level (low or high) and temperatures (oysters kept at 19°C and oysters submitted to a heat treatment at 28°C for 2 days) for males. Level of significance $P < 0.05 = "*"$. Homogenous group to the post hoc Fisher LSD test share letters. Bars represent standard error.

increase of GR activity is due to somatic gonadic cells. Indeed, the GR activity of the heat-shocked oysters was not correlated to their GO rate suggesting that this activity might also partially be due to somatic gonadic cells. Little is known about intratubular somatic cells in male oyster gonads and further investigations are needed to use the term of “Sertoli cells” (Eckelbarger and Davis, 1996; Franco et al., 2008). Nevertheless, these auxiliary cells could act in supporting germ cell development and protect them against oxidative stress. Indeed, it has been shown that Sertoli cells provide reduced glutathione to spermatogenic cells in the xenope (Li et al., 1989).

These data emphasize the importance of glutathione pathway for antioxidant protection of gonadic tissue in mature *C. gigas* oysters. Glutathione metabolism has also been thought to protect gonad against oxidative stress associated with gametogenesis, through an increase of GST activity, in the clam *Megapitaria squalida* (Cantú-Medellín et al., 2009). Nevertheless, in our study, GST activity was too low to be successfully measured, suggesting that antioxidant defense might differ among bivalves. The present work also provides evidence of a gender-specific antioxidant capacity and response to heat stress in the gonad of *C. gigas*. Finally, no increase in lipid peroxidation was observed according to reproductive investment or heat shock (Table 2). This indicates that antioxidant capacity in the oyster gonad was sufficient to cope with potential ROS production induced by high energetic demand for reproduction. This is in agreement with previous study giving *C. gigas* elevated basal antioxidant capacity in its gills (Béguel et al., 2013). Other non-enzymatic antioxidant species could also be implied in this gonad antioxidant capacity, such as taurine. Indeed, protein extracts of *C. gigas* have been shown to be very rich in taurine and using them as dietary supplement has been shown to increase glutathione level and consequent antioxidant capacity rat liver cells or human blood plasma (Gaté et al., 1998; Tapiero et al., 1998). Moreover, taurine has an antioxidative role by neutralizing peroxidation cascade reaction (Ogasawara et al., 1994), and is also present in gametes where it is needed for gamete maturation, fertilisation and early embryonic development (Guérin and Ménézo, 1995). Finally these results together with those obtained by Béguel et al. (2013) suggest that antioxidant capacity of *C. gigas* is tissue specific and even cell-specific within the same tissue. Thus, a perspective of the present study would be to analyse antioxidant capacity of *C. gigas* somatic gonadic cells and gametes separately using immunodetection of antioxidant enzymes and laser microdissection (Franco et al., 2010).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to all staff of the Argenton IFREMER station, particularly Isabelle Quéau for microalgae production and Luc Lebrun for conditioning the oysters. The authors thank Jean-Yves Daniel and Charlotte Corporeau (LPI, IFREMER, Plouzané, France), Aline Amérand and Christine Moisan (ORPHY, UEB, Brest, France), Nelly Le Goïc and Sébastien Artigaud (LEMAR UMR 6539, IUEM, Plouzané, France) for their useful help and technical assistance. This work was supported by the “Oxygènes” research program funded by the GIS Europole-Mer and by the ANR Genanimal program “Gamétogènes”. Jean-Philippe Béguel was funded by a Région Bretagne doctoral grant.

REFERENCES

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J Exp Biol* 205, 1831-1841.
- Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R., 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 1-21.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecol Lett* 7, 363-368.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O., Sorci, G., 2006. An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution* 60, 1913-1924.
- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L., Storey, B.T., 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8, 338-348.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 42, 334-346.
- Angilletta, M.J., Sears, M.W., 2000. The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Funct Ecol* 14, 39-45.
- Béguel, J.-P., Huvet, A., Quillien, V., Lambert, C., Fabioux, C., 2013. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. *Comp Biochem Phys C* 157, 63-71.

- Blondin, P., Coenen, K., Sirard, M.A., 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 18, 454-460.
- Bougrier, S., Geairon, P., Deslous-Paoli, J.M., Bacher, C., Jonquière, G., 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134, 143-154.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58, 79-110.
- Cantú-Medellín, N., Olguín-Monroy, N.O., Méndez-Rodríguez, L.C., Zenteno-Savín, T., 2009. Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico. *Arch Environ Con Tox* 56, 60-66.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.
- Dandekar, S.P., Nadkarni, G.D., Kulkarni, V.S., Punekar, S., 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J Postgrad Med* 48, 186-189.
- de Lamirande, E., Gagnon, C., 1993. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 16, 21-25.
- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C., 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2, 48-54.
- Eckelbarger, K.J., Davis, C.V., 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Testis and spermatogenesis. *Mar Biol* 127, 89-96.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M., 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquacult Int* 17, 491-506.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567, 1-61.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458-470.
- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., Huvet, A., 2009. *In vivo* RNA interference in oyster—*vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS J* 276, 2566-2573.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdaire, P., Mathieu, M., 2008. Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue Cell* 40, 251-260.

- Franco, A., Jouaux, A., Mathieu, M., Sourdain, P., Lelong, C., Kellner, K., Heude Berthelin, C., 2010. Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. *Cell Tissue Res* 340, 201-210.
- Gardiner, C.S., Reed, D.J., 1994. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 51, 1307-1314.
- Gaté, L., Schultz, M., Walsh, S., Dhalluin, S., Nguyen Ba, G., Tapiero, H., Tew, K.D., 1998. Impact of dietary supplement of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) on glutathione levels and glutathione S-transferase activity in rat tissues. *In Vivo* 12, 299-303.
- Gibson, G.E., Huang, H.-M., 2004. Mitochondrial enzymes and endoplasmic reticulum calcium stores as targets of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Bioenerg Biomembr* 36, 335-340.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Griveau, J.F., Lannou, D.L., 1997. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 20, 61-69.
- Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H.J., Anderegg, U., 2005. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 37, 69-71.
- Guérin, P., Ménézo, Y., 1995. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: *de novo* synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. *Zygote* 3, 333-343.
- Guérin, P., El Mouatassim, S., Ménézo, Y., 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7, 175-189.
- Gur, Y., Breitbart, H., 2006. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Gene Dev* 20, 411-416.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biol Sci* 15, 129-135.
- Hermes-Lima, M., 2005. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, In K. B. Storey (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, 319-368.
- Jones, R., Mann, T., Sherins, R., 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *31*, 531-537.
- Kaneko, T., Iuchi, Y., Kawachiya, S., Fujii, T., Saito, H., Kurachi, H., Fujii, J., 2001. Alteration of Glutathione Reductase Expression in the Female Reproductive Organs During the Estrous Cycle. *65*, 1410-1416.

- Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H., Creasy, D.M., 2002. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol* 30, 524-533.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68, 253-278.
- Li, L.Y., Seddon, A.P., Meister, A., Risley, M.S., 1989. Spermatogenic cell-somatic cell interactions are required for maintenance of spermatogenic cell glutathione. *Biol Reprod* 40, 317-331.
- Madamanchi, N.R., Vendrov, A., Runge, M.S., 2005. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscl Throm Vas* 25, 29-38.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, Masson et Cie ed, Paris.
- Miller, D., Ostermeier, G.C., 2006. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gyn Obstet Fertil* 34, 840-846.
- Nasr-Esfahani, M.H., Aitken, J.R., Johnson, M.H., 1990. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development* 109, 501-507.
- Nilsson, J.A., 2002. Metabolic consequences of hard work. *P Roy Soc Lond B Bio* 269, 1735-1739.
- Noda, Y., Matsumoto, H., Umaoka, Y., Tatsumi, K., Kishi, J., Mori, T., 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 28, 356-360.
- Ogasawara, M., Nakamura, T., Koyama, I., Nemoto, M., Yoshida, T., 1994. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. *Adv Exp Med Biol* 359, 71-78.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45.
- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., Alunno-Bruscia, M., 2006. Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *J Sea Res* 56, 156-167.
- R Development Core Team, 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rosenthal, E.T., Tansey, T.R., Ruderman, J.V., 1983. Sequence-specific adenylations and deadenylations accompany changes in the translation of maternal messenger RNA after fertilization of *Spisula* oocytes. *J Mol Biol* 166, 309-327.
- Salmon, A.B., Marx, D.B., Harshman, L.G., 2001. A cost of reproduction in *Drosophila melanogaster*: stress susceptibility. *Evolution* 55, 1600-1608.

- Schier, A.F., 2007. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 316, 406-407.
- Sheweita, S.A., Tilmisany, A.M., Al-Sawaf, H., 2005. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 6, 495-501.
- Stearns, S.C., 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Steele, S., Mulcahy, M.F., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J Mar Biol Assoc UK* 70, 673-686.
- Storey, B.T., 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 3, 203-213.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29, 1715-1733.
- Takami, M., Preston, S.L., Toyloy, V.A., Behrman, H.R., 1999. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol* 276, E684-688.
- Tapiero, H., Gaté, L., Dhalluin, S., Nguyen Ba, G., Soupramanien, V., Kouyate, J., Tew, K.D., 1998. The antioxidant effects of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) in human volunteers. *In vivo* 12, 305-309.
- Tarin, J.J., Ten, J., Vendrell, F.J., Cano, A., 1998. Dithiothreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability *in vitro*. *Hum Reprod* 13, 381-386.
- Tatemoto, H., Sakurai, N., Muto, N., 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 63, 805-810.
- Wang, Y., Salmon, A.B., Harshman, L.G., 2001. A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 36, 1349-1359.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J.R., Verhulst, S., 2004. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proc R Soc Lond B* 271, 360-363.
- Williams, G.C., 1966. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *Am Nat* 100, 687-690.
- Zera, A.J., Harshman, L.G., 2001. The Physiology of Life History Trade-Offs in Animals. *Annu Rev Ecol Syst* 32, 95-126.

3. Conclusions et ouvertures

Les résultats obtenus dans cette seconde partie ont souligné l'importance du métabolisme du glutathion déjà observé dans le premier chapitre (taux de transcrits de GPX). Dans cette deuxième étude c'est la GR qui semble particulièrement importante dans la protection antioxydante de la gonade. Cependant, ses conditions d'expression semblent différentes selon que les gonades soient mâles ou femelles.

Les résultats obtenus dans la gonade des femelles indiquent que la transcription de GR est corrélée positivement à l'effort reproducteur. Etant donné que la différence d'effort reproducteur entre les femelles de faibles OG et celles de forte OG est le nombre de cellules germinales, les taux de transcrits de la GR mesurés dans la gonade représenteraient ceux des ovocytes. Il a été suggéré que la protection de l'embryon contre les ROS dépendrait d'un pool d'ARNm codant des enzymes antioxydantes stockés durant la vitellogenèse (Guérin et al., 2001). Compte tenu du rôle de la GR dans le recyclage du glutathion, cela permettrait de fournir au futur embryon un système de détoxification des ROS jusqu'à la transition maternelle-zygote (moment où l'embryon devient transcriptionnellement actif). D'autant plus que le recyclage du glutathion serait énergétiquement moins coûteux que sa synthèse *de novo* (Kaneko et al., 2001). Ainsi les taux de transcrits de GR mesurés dans notre étude pourraient refléter des ARNm stockés dans les ovocytes lors de la vitellogenèse et réprimés traductionnellement jusqu'à la fertilisation.

Les résultats obtenus dans la gonade des mâles n'indiquent pas d'effet de l'effort reproducteur mais plutôt un effet du choc thermique sur l'expression de la GR. En effet, chez les mâles soumis au choc thermique, l'activité enzymatique de la GR a été mesurée en quantité plus importante que chez les mâles non soumis au choc thermique. Etant donné que l'activité enzymatique de la GR n'a pas été corrélée à l'effort reproducteur, il apparaît plus probable que son expression soit attribuable aux cellules somatiques gonadiques.

L'absence de peroxydation lipidique différentielle en fonction de l'effort reproducteur ou du choc thermique suggère que la gonade dispose de systèmes de détoxification des ROS efficaces. Ces résultats corroborent ceux obtenus dans la première étude à savoir que l'investissement reproducteur n'est pas suffisant à lui seul pour induire un stress oxydant chez

C. gigas, même dans la gonade. Cependant, il serait intéressant de déterminer la part de capacité antioxydante attribuable aux gamètes et celle attribuable aux cellules somatiques gonadiques.

TROISIEME CHAPITRE :
Etude de la capacité antioxydante des
gamètes de *Crassostrea gigas*

1. Introduction à l'étude

Les résultats obtenus dans la seconde partie de ce travail soulèvent la question de la capacité antioxydante des gamètes en dehors de la gonade. En effet, le système antioxydant de la gonade semble suffisamment efficace pour protéger les gamètes des effets nocifs des ROS. Ce système antioxydant pourrait notamment faire intervenir les hémocytes qui sont des cellules assurant plusieurs fonctions physiologiques tels que la défense contre les pathogènes, le transport de nutriment et la réparation tissulaire (Cheng, 1996; Chu, 2000). Il a notamment été montré que les hémocytes pouvaient avoir un rôle de détoxification des ROS dans l'hémolymphe mais aussi dans les tissus environnants en les infiltrant (Anderson et al., 1999). De plus, la protéine majeure de l'hémolymphe de *C. gigas* a été identifiée comme une ec-SOD (Gonzalez et al., 2005; Itoh et al., 2011). Même si son activité SOD reste discutée, elle pourrait jouer un rôle de défense antioxydante dans les tissus infiltrés comme la gonade. Cependant après leur émission dans la colonne d'eau, les gamètes sont soumis à divers stress environnementaux pouvant provoquer un stress oxydant et ne disposent plus de cellules auxiliaires prodiguant potentiellement une action détoxifiante. Un bon système antioxydant pourrait ainsi être une des clefs de la survie des gamètes.

Dans ce contexte, le métabolisme oxydatif des gamètes a été étudié *in vitro* par une approche intégrative incluant des analyses moléculaires (mesure des taux de transcrits de gènes antioxydants), biochimiques (mesures des activités enzymatiques antioxydantes et de la peroxydation lipidique) et physiologiques (mesure de la respiration cellulaire, de la viabilité, de la production de ROS intracellulaire, du potentiel membranaire mitochondrial, du taux de larves D et de la motilité des spermatozoïdes). En parallèle, et sur les mêmes huîtres dont les gamètes ont été étudiés, l'étude du métabolisme oxydatif des hémocytes a également été effectuée par des paramètres moléculaires (mesure des taux de transcrits de gènes antioxydants) et physiologiques (mesure de la taille et de la complexité, de la viabilité, de la production de ROS intracellulaire et du potentiel membranaire mitochondrial). Ces analyses ont été effectuées après incubation *in vitro* des gamètes et des hémocytes à deux températures différentes, celles utilisées dans les deux premiers chapitres (19°C et 28°C).

Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés ci-après sous forme d'article en vue d'une publication.

2. Article 3

Jean-Philippe Béguel, Christophe Lambert, Philippe Soudant, Nelly Le Goïc, Myrina Boulais, Tony Dudognon, Marc Suquet, Caroline Fabioux. ***In vitro* effects of temperature on antioxidant capacity of germ cells and hemocytes from the Pacific oyster *Crassostrea gigas***

In vitro* effects of temperature on antioxidant capacity of germ cells and hemocytes from the Pacific oyster *Crassostrea gigas

Author names:

Jean-Philippe Béguel^a, Christophe Lambert^a, Philippe Soudant^a, Nelly Le Goïc^a, Myrina Boulais^b, Tony Dudognon^a, Marc Suquet^b, Caroline Fabioux^{a*}

Addresses:

^a Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS / UBO / IRD / IFREMER
Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

^b IFREMER, UMR 6539 CNRS / UBO / IRD Laboratoire de Physiologie des Invertébrés,
Station expérimentale d'Argenton, 29840 Argenton, France

*** Corresponding author's address:**

LEMAR/UMR6539/IUEM, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

Tel.: +33 (0)2 98 49 87 44; Fax: +33 (0)2 98 49 86 45

Email address: Caroline.Fabioux@univ-brest.fr

ABSTRACT

Many studies have shown that situations of oxidative stress could irreversibly impair gamete integrity and fertilization ability. Nevertheless, gametes have an arsenal of antioxidant defenses to prevent the damages of reactive oxygen species (ROS) and their antioxidant capacity contributes to gamete quality. In aquaculture, some protocols have been set to assess *Crassostrea gigas* quality gametes. Thus, studying antioxidant capacity *via* an integrative approach using molecular, biochemical and physiological parameters was expected to lead to identify markers of gamete quality or cell damage in order to improve breeding protocols in hatcheries. In this study, we examined *in vitro* the oxidative metabolism of oocytes and spermatozoa after incubation in filtrated sea water at 19°C or 28°C for 2.5 hours. The results showed an increase of respiration rate (not significant for spermatozoa) and production of ROS (not significant for oocytes) of gametes at elevated temperature without triggering an elevation of their antioxidant defense. Fertilization success was equivalent at the two temperatures suggesting that gametes were not particularly submitted to oxidative stress. Nevertheless, oocytes seemed to be more sensitive (higher lipid peroxidation) than spermatozoa toward high temperatures. As hemocytes could also play the role of ROS-scavengers in hemolymph and tissues and are hypothesized to be an indicator of physiological status and health of oysters, their oxidative metabolism was also measured *in vitro*. For the first time, a gender-specific hemolymph composition and a gender-specific regulation of the oxidative metabolism (ROS production and antioxidant gene transcript levels) probably link with the reproduction was reported. The present study allows identification of potential molecular and cytological markers of gamete quality and optimization of the Pacific oyster hatchery conditions.

Key words: oxidative metabolism, antioxidant capacity, *Crassostrea gigas*, marine bivalve, gametes, hemocytes, gender differences, flow cytometry

1. INTRODUCTION

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is the first shellfish resource of the French littoral but for several decades now massive summer mortalities events (Maurer et al., 1986; Gouletquer et al., 1998; Costil et al., 2005) affect the industry and reduce the available stocks (tons produced per year :138 000 in 1997 and 82 800 tons in 2010/11; Comité National de Conchyliculture). These mortalities were demonstrated to result from a complex interaction between environment, pathogen occurrence and the physiological status of the oysters (Samain et al., 2007). A transcriptome study of gonads from oyster lines selected for their resistance or susceptibility to summer mortalities, pointed out genes of the antioxidant system over-expressed in resistant lines compared to susceptible ones (Fleury et al., 2010). The antioxidant defense of organisms is based on non-enzymatic molecules such as vitamins (C and E), glutathione, zinc, selenium, metallothioneins and on specific enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) (Hermes-Lima, 2005). This antioxidant arsenal has to cope with Reactive Oxygen Species (ROS) production. In fact, ROS are by-products of normal cellular respiration (Han et al., 2001) and are highly reactive molecules able to damage cells (Cadenas, 1989). They have deleterious effects on molecules rich in high electron density sites, such as molecules with high nitrogen content (DNA, RNA and proteins), or molecules that have a large number of carbon double-bonds (fatty acids and phospholipids). Under optimal physiological conditions, pro- and antioxidant species are balanced. However, environmental stressors like heat shock, UV exposure, pollution, oxygen availability changes or pathogens (Storey, 1996; Torreilles et al., 1996; Lesser, 2006), provoke ROS over-production and create an imbalance in favour of pro-oxidant species, leading to oxidative damage to cells.

Effects of ROS on germ cells are especially worrying as it can impact the offspring. Indeed, spermatozoa are rich in polyunsaturated fatty acids very susceptible to lipid peroxidation, considered as major cause of human infertility (Jones et al., 1979). ROS are not only able to damage spermatozoa DNA but also inhibit their motility, sperm-oocyte fusion and then fertilization success (Aitken et al., 1998; Dietrich et al., 2005). It has also been shown in mammals that ROS can inhibit oocyte development, cause their meiotic arrest and increase the number of degenerated oocytes (Tarin et al., 1998; Tatemoto et al., 2000; Guérin et al., 2001). Moreover, ROS-induced DNA damages were correlated with low fertilisation

rates of human oocytes (Seino et al., 2002). Finally, all the ROS coming from spermatozoa and oocytes or embryos themselves can impair the development of embryos. ROS-induced lipid peroxidation is responsible of 2-cell blocked division as observed in mouse embryos (Nasr-Esfahani et al., 1990; Noda et al., 1991). ROS-induced mitochondrial DNA damage may alter embryo development due to dysfunction of mitochondria (Kowaltowski and Vercesi, 1999; Guérin et al., 2001). It has also been shown that an accumulation of ROS in embryos can lead to their apoptosis (Pierce et al., 1991; Yang et al., 1998; Liu et al., 2000). Nevertheless, ROS are also essential at low concentrations for maturation of oocytes (Blondin et al., 1997; Takami et al., 1999) and for the process of sperm capacitation, hyperactivation, acrosome reaction and then oocyte fertilization (de Lamirande and Gagnon, 1993; de Lamirande et al., 1997; Griveau and Lannou, 1997). Whereas high concentrations of antioxidant inhibit these processes (Bize et al., 1991; Griveau et al., 1994; de Lamirande and Gagnon, 1995). Therefore, a fine regulation of oxidative metabolism in gametes is needed to ensure normal gametes function and fertilization as well as normal embryo development.

Fleury et al. (2010) identified the expression of *catalase* and *SOD* in the Pacific oyster gonad as potential marker of resistance toward summer mortalities and GST activity in the gonad of the clam *Megapitaria squalida* is thought to protect this tissue against oxidative stress associated with gametogenesis (Cantú-Medellín et al., 2009). We suggest that hemocytes could be a part of the antioxidant system in gonadic tissue. Indeed, hemocytes are involved in many physiological functions such as the transportation, distribution and digestion of nutrients but also shell and tissue repair, detoxification processes and could have a role in the elimination of ROS in hemolymph but also in surrounding tissues (Cheng, 1996; Anderson et al., 1999; Chu, 2000). Thus, gametes would be quite protected against oxidative stress in the gonad. Nevertheless, gametes and embryos of molluscs, such as the Pacific oyster, with external fertilization and development are exposed to highly stressful environment and would need a very effective defense system to survive. A good antioxidant system could be a key of survival for gametes, embryos and adult oysters. But antioxidant capacity of bivalve germ cells has not yet been explored. The Pacific oyster has a worldwide repartition and has to cope with a wide range of water and air temperature as in Mexico with water temperature variations from above 10°C to more than 30°C (Chávez-Villalba et al., 2007). Released gametes may thus be exposed to elevated temperatures or heat shocks which were demonstrated to be an important source of ROS production and oxidative stress in marine organisms (Lesser, 1997; Abele et al., 2002). Moreover, released gametes do not

dispose auxiliary cells or micro-environment to protect them against ROS as in mammalian for example. In human, ejaculate contains extracellular antioxidants to scavenge ROS and protect spermatozoa (Moilanen et al., 1993; Lewis et al., 1995) and so does oviductal fluids and cumulus cells surrounding the oocytes (Guérin and Ménézo, 1995; Lapointe et al., 1998; Cetica et al., 2001). The great resistance of the Pacific oyster gametes toward oxidative stress could be an adaptation for fertilization success in highly stressful environments.

In this context, we aimed to study, *in vitro*, the antioxidant capacity of stripped gametes (oocytes and spermatozoa) of the Pacific oyster after incubation at two temperatures (19°C and 28°C). Antioxidant defense of gametes was evaluated by measuring the transcription levels of genes encoding the principal ROS-scavenging enzymes: CAT, SOD (cytoplasmic (cy) and extra-cellular (ec) forms of Cu/Zn-SOD and mitochondrial Mn-SOD), GPX, GR and GST and the activities of these enzymes. Their susceptibility to oxidative stress was assessed by measuring lipid peroxidation level, *via* the determination of malondialdehyde (MDA). Their intracellular oxidative metabolism (IOM) and mitochondrial membrane potential (MMP) (except for oocytes) was estimated using flow cytometry and respiration rate was also assessed. Finally, ability of gametes to fertilize and the motility of spermatozoa were also measured after the incubation period. Temperatures were tested according to physiological data on oyster gametogenesis and zootechnical practices. Indeed, 19°C appeared as the minimal temperature required for the Pacific oyster to spawn (Mann, 1979) whereas 27°C to 32°C is considered to be an optimal range of temperature for growth of the Pacific oyster larvae (Rico-Villa et al., 2009).

In parallel, antioxidant capacity of hemocytes of the same oysters was also assessed in the same conditions to serve as reference somatic cells. Their antioxidant defense was evaluated by measuring the transcription levels of genes encoding the same principal ROS-scavenging enzymes as for gametes. The analysis of their IOM and MMP together with their size and complexity was performed using flow cytometry. Activity of the principal ROS-scavenging enzyme, such as lipid peroxidation level and respiration rate could not be performed due to a low quantity of hemocytes obtained

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals

Three years old adult oysters, issued from natural spat, were collected from culture stocks at the Aber Benoît estuary (North Brittany, France) in July 2012. They were transferred to the IFREMER experimental hatchery of Argenton (Brittany, France) and placed overnight in 600-L raceways filled with 20- μ m filtered seawater until the experiment. Water temperature was maintained at $19 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2 Hemolymph and gamete collection

Hemolymph from more than 100 oysters was withdrawn from the adductor muscle, through a notch ground in the oyster shell, using a 2 mL plastic syringe fitted with a 25-gauge needle. Hemolymph from each oyster (approximately 1 to 1.5 mL) was individually held on ice to limit clumping and filtered on a 80 μ m-mesh to eliminate aggregates or large pieces of debris. Only samples confirmed to be clean of contaminating particles by microscope observation were kept. Oysters were then opened and sex determined by microscopic observation of a smear of the gonad. Forty eight oysters were selected to constitute 4 pools (6 oysters each) of spermatozoa and 4 pools (6 oysters each) of oocytes. The corresponding hemolymph samples were pooled to constitute 8 pools of hemolymph (from 6 oysters each), 4 pools for males and 4 pools from females. Gametes of selected oysters were collected by a stripping method according to Song et al. (2009). Spermatozoa concentration of each pool was then determined using a flow cytometer (EasyCyte Plus, Guava Millipore) and concentration of each pool was adjusted to 5×10^7 cells.mL⁻¹ with 1 μ m-filtered seawater for a final volume of 220 mL. Oocyte concentration of each pool was assessed by microscopic count (50 μ l samples in triplicate) and adjusted to 3×10^3 cells.L⁻¹ with 1 μ m-filtered seawater for a final volume of 4 L. This concentration allow a good conservation of oocytes (Song et al., 2009).

2.3 *In vitro* incubation at 19°C or 28°C

Each pool of spermatozoa and oocyte was separated by half and dispatched in 2 L glass beakers. One beaker was incubated for 2.5 h at 19°C in temperature regulated room and the other one at 28°C in an incubator. In parallel, two subsamples of each hemolymph pools (~200µL) were incubated in 5 ml polystyrene tubes (BD Falcon™) for analysis of cellular parameters (see § Flow cytometry analyses of hemolymph) for 2.5 h at 19°C and 28°C. The rest of hemolymph (6 to 8 mL per pool) was incubated at 19°C and 28°C in 15 mL Falcon tubes for 2.5 h. At the end of incubation, samples of spermatozoa and oocyte suspensions from each pool and each incubation temperature were used for cellular parameters using flow cytometry, oxygen consumption rate, sperm motility, D larvae yield (for quantities, see corresponding §). Tubes containing the rest of hemolymph and tubes containing 20 mL spermatozoa suspension at around 1×10^7 cell.mL⁻¹ were centrifuged at 1000 g and at 4°C for 10 min and 5 min respectively. Tubes containing 1.5 mL oocyte suspension, after concentration on a 20 µm mesh at around 2.5×10^5 cell.mL⁻¹, were centrifuged at 100g and at 4°C for 2 min. The supernatant of each tube was discarded and the pellets were frozen in liquid nitrogen for molecular and biochemical analysis.

2.4 Flow cytometry analyses

2.4.1 Hemolymph

Hemocyte parameters of each pool and condition were analysed using a flow cytometer (FACScalibur, Becton-Dickinson) equipped with a 488 nm argon laser : hyalinocyte and granulocyte concentrations (cells.mL⁻¹), size and complexity, percentage of dead cells using double staining methods (Sybr-green and propidium iodide) as previously described (Delaporte et al., 2007) and phagocytosis activity as percentage hemocytes able to engulf more than two beads in an hour (2µm fluorescent beads, Fluoresbrite, YG Microspheres, Polysciences) (Labreuche et al., 2006). Additionally intracellular oxidative metabolism (IOM) of hyalinocytes and granulocytes was evaluated by measuring the fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF, Sigma) directly linked to the level of production of reactive oxygen species (ROS) and expressed in arbitrary units (Lambert et al., 2003). Mitochondrial membrane potential (MMP) was also assessed using JC-10 aggregate/monomer fluorescence

ratio (Interchim) assumed to be proportional to mitochondrial membrane potential intensity (Donaghy et al.). Results are expressed as the JC-10 aggregate/monomer fluorescence ratio.

2.4.2 Oocytes and spermatozoa

Flow-cytometry analysis of oocytes and spermatozoa of each pool and condition were done using an EasyCyte Plus flow cytometer (Guava Millipore) equipped with a 488 nm argon laser. Mortality and IOM were measured on both spermatozoa and oocytes. MMP was only measured on spermatozoa. Analysis were carried out on 200 μL of a 10^6 cell.mL^{-1} spermatozoa suspension (1.10^7 cell.mL^{-1} for MMP) or 200 μL of a 5×10^4 cell.mL^{-1} oocyte suspension in seawater. Percentage of dead oocytes was evaluated after 10 min of propidium iodide (PI) staining (Sigma P4170, final concentration $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) while percentage of dead spermatozoa was measured after 10 min of a double staining method: SYBR 14 (Live/dead® Sperm Viability kit, Molecular Probes, final concentration $1 \mu\text{M}$) and propidium iodide PI (final concentration $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) according to Le Goïc et al. (pers. com.). Results were expressed as % of dead cells. IOM was evaluated in the same manner as for hemocytes. PMM was assessed according to Le Goïc et al. (pers. com.). Briefly, spermatozoa suspension at around 10^7 cell.mL^{-1} was incubated 10 min with JC-1 (Interchim FP-52314A, final concentration $5 \mu\text{M}$). Suspension was diluted ten times dilution in sea water to stop JC-1 reincorporation and then analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the JC-1 aggregate/monomer fluorescence ratio.

2.5 Assay of oxygen consumption rate

Oocyte suspensions, after concentration on a $20 \mu\text{m}$ mesh at around 2.5×10^5 cell.mL^{-1} , and spermatozoa suspensions, at around 10^7 cells.mL^{-1} , of each pool and condition were used for oxygen consumption measures. Three polarographic cells (OX1LP-1 mL Dissolved O_2 Package Qubit System, Kingston, Ontario, Canada) were connected in series to a thermostatic bath (Julabo F25). After stabilization of the circulating water temperature (19°C or 28°C), polarographic cells were calibrated by fixing two points (1) the 0% of dissolved oxygen (0 mg.L^{-1}) was performed with a calibration solution of Na_2SO_3 at 2 M and (2) after rinsing, the 100% dissolved oxygen was determined with $1 \mu\text{m}$ filtrated seawater. The value (in mg.L^{-1}) of dissolved oxygen was determined taking into account atmospheric pressure and water temperature (19°C or 28°C). After calibration, $500 \mu\text{L}$ of sample (spermatozoa or oocytes)

were introduced in each of the three chambers, which were closed with a plug to prevent air exchange with the outside. Oxygen consumption was recorded for approximately 7 min. The rate of oxygen consumption was assayed by calculating the decrease of dissolved oxygen in the chambers as a function of time. This rate was then normalised to number of living cells, determined by flow cytometry. Hemocytes and spermatozoa suspension concentrations were too low to measure their respiration rate.

2.6 Assay of sperm motility

To estimate sperm motility, 50 μL of spermatozoa suspension at around 10^7 cell.mL⁻¹ from each pool and each incubation temperature was diluted in 50 μL seawater (SW: pH 7.80, 19°C) at a concentration of 2 g.L⁻¹ Bovine Serum Albumin, avoiding sperm sticking to the surface of the glass slide. Sperm samples of 7 μL were transferred in Thomas cell and movement characteristics were observed under a phase contrast microscope (Olympus BX51, X 20 magnification), connected to a camera (Qicam Fast 1394). The percentage of motile spermatozoa was visually estimated in triplicate by counting 30 cells for each replicate. Sperm VAP (Velocity of the Average Path) was assessed using a CASA plug-in developed for the Image J software (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007). Calibration settings were adapted to the Pacific oyster spermatozoa (frame rate: 25 frames sec⁻¹, sperm size range: 1 to 8 pixels, minimum VAP for motile spermatozoa: 1 $\mu\text{m s}^{-1}$).

2.7 Assay of D-larvae yield

Pools containing oocytes and spermatozoa previously incubated at 19 or 28°C were used in this assay. To estimate the fertilization success of each pool of sperm or oocytes at 19°C and 28°C, the D-larval yield [(the number of D-larvae/the total number of embryos)×100] was estimated 48 h post-fertilization. To estimate the spermatozoa “quality”, spermatozoa from each pool were put in contact in 2 L beakers with 25×10^3 oocytes from 3 females freshly stripped to obtain a spermatozoa:oocytes ratio of 40:1. To estimate the oocytes “quality”, around 10^4 oocytes from each pool were put in contact with a spermatozoa mix of 3 males freshly stripped to obtain a spermatozoa:oocyte ratio of 2000:1 in 2 L beakers. After 30 min of contact between spermatozoa and oocytes, beakers were completed to 1.8 L with FSW at 19 °C for embryo development. All the experiments were carried out in duplicate. After 48 h, the content of the beakers was filtrated with a 20 μm -mesh and the embryos were resuspended

Table 1

Sense and anti-sense sequences of primers used for real-time PCR analysis. PCR efficiencies were determined for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of the reference cDNA.

GenBank access	EST name or annotation	Abbreviation	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	PCR Efficiency %
GenBank ID: BQ426516	Elongation Factor 1	EFI	ACCACCCTGGTGAGATCAAG	ACGACGATCGCATTCTCTT	101.7
GenBank ID: AM853618	Catalase	CAT	TTCGTCATATCGGGTTTACTTCTG	CCTTGTCACGTCCTGCCATT	101.9
GenBank ID: AJ496219	Superoxide dismutase	Cy-SOD	GACGATTGGCTTGTGGAGTGA	GGACCGAGTGGAGGCTAGTG	100
GenBank ID: DQ010420	Hemocyte extracellular superoxide dismutase	Ec-SOD	CTTCATGCCAGGCAACCT	TGACGTTGAATCCGGTCA	100.2
GenBank ID: EU420128	Manganese-superoxide dismutase	Mn-SOD	AGTCTGGTCGCACATTCTTGT	CATGTGCCAATCAAGATCCTC	104.7
GenBank ID: AM856731	Glutathione peroxidase	GPX	GGACTACCCGATGATGAACGA	GGAAGGAAACCCGAGAACCA	99.1
GenBank ID: CU685269	Glutathione reductase	GR	TTCGCCCTGCTGCTATGG	TTGCCCTGGGAGATGTTTG	99
GenBank ID: FP091130	Glutathione S-transferase	GST	GGATTCAAACGCCTCAAACAG	TGGGCAGTTGGCAAAAAGA	101.1

in 10 mL. D-larval yield was assessed by microscopic count of triplicate 50 μ L samples. Non-viable larvae (translucent or non D-shaped) were not included in the D-larvae count.

2.8 Assay of transcript levels by real-time PCR

2.8.1 RNA extraction and DNase treatment

Frozen pellets of spermatozoa, oocytes and hemocytes were first resuspended in 1.5 mL of TRI reagent (Sigma-Aldrich), homogenized using an Ultra-Turrax[®] (IKA) and total RNA was extracted, according to manufacturer's instructions. RNA extracts were diluted in 20 μ L ultra pure water for hemocytes, in 50 μ L for spermatozoa and in 150 μ L for oocytes. Seventeen μ L of each RNA extract were then treated with RTS DNase (MO BIO Laboratories) according to manufacturer's instructions to prevent DNA contamination. RNA concentrations were measured using a Nanodrop spectrometer (Thermo Scientific) at 260 nm, using the conversion factor 1OD = 40 μ g/mL RNA. RNA quality was checked using RNA nanochips and Agilent RNA 6000 nanoreagents (Agilent Technologies), according to manufacturer's instructions. The RNA Integrity Number (RIN) of samples was comprised between 6.30 and 8.70.

2.8.2 Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction

From 0.77 μ g of total RNA, reverse transcription was carried out for each sample in a 20 μ L final volume, using the RevertAid[™] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) with Oligo(dT)₁₈ Primers. A reverse transcription was also performed in the same conditions for a mix of RNA extracted from different pools of spermatozoa and oocytes used in the present study to serve as a reference cDNA. The transcript levels of genes coding Catalase (CAT), cytoplasmic SOD (cy-SOD), mitochondrial SOD (Mn-SOD), extra-cellular SOD (ec-SOD), Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione reductase (GR) and Glutathione S-transferase (GST) were investigated in samples by real-time PCR, using the Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time System. Amplification of oyster *Elongation Factor I (EFI)* (BQ426516) cDNA was made to confirm the steady-state expression of a housekeeping gene and to provide an internal control for gene expression (CV < 5%). PCR efficiency (E) was determined for each primer pair by making standard curves from serial dilutions of reference cDNA (from 1/10 to 1/10000) and using the following formula: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. For each gene, primer sequences, GenBank accession numbers and PCR efficiencies are listed in Table 1.

Table 2

Summary of the t-test results for paired samples at 19°C or 28°C for spermatozoa and oocytes. Levels of significance: P<0.5 = “*”; P<0.01 = “**”; P<0.001 = “***”. NA = Not Analysed and NS = Not Significant.

	Parameters	Sperm	Oocytes
Gene transcript levels	<i>CAT</i>	NS	NS
	<i>GPX</i>	NS	NS
	<i>GR</i>	NS	NS
	<i>GST</i>	NS	NS
	<i>cy-SOD</i>	NS	NS
	<i>ec-SOD</i>	NS	NS
	<i>Mn-SOD</i>	NS	NS
Enzymatic activities	CAT	NS	NS
	SOD	NS	NS
	GR	NS	NS
	GST	NS	NS
	MDA	NS	**
	O ₂ consumption rate	NS	***
	D-larvae yield	NS	NS
	% of motile spermatozoa	NS	NA
	VAP of spermatozoa	*	NA
Flow cytometry parameters	Mortality	NS	NS
	Intracellular oxidative metabolism	*	NS
	Mitochondrial membrane potential	NS	NA

Real-time PCR assays were performed in triplicate, with 3.5 μL cDNA (1/22 dilution) in a total volume of 10 μL , with 0.75 μL of each primer at 1 μM and 5 μL ABsolute™ Blue QPCR SYBR® Green ROX Mix (Thermo Fisher Scientific). The cycling conditions consisted of Taq polymerase activation for 15 min at 95°C, then 45 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing/elongation at 60°C for 1 min. For each individual sample, a melting curve program was applied from 60°C to 95°C by increasing temperature at a ramp rate of 1%. Each run included the reference cDNA and water controls. Negative reverse-transcription controls (each total RNA sample after DNase treatment) were run to assess the absence of DNA carryover. Calculation of the relative expression ratio (R) of a target gene made using the following formula: $[(E_{\text{target gene}})^{(\text{Ct}(\text{target gene, reference cDNA})-\text{Ct}(\text{target gene, sample}))}]/[(E_{\text{EFI}})^{(\text{Ct}(\text{EFI, reference cDNA})-\text{Ct}(\text{EFI, sample}))}]$ (Pfaffl, 2001).

2.9 Activity analysis of the main antioxidant enzymes

2.9.1 Total protein extraction and assay

Total protein extraction for subsequent enzymatic assays was realised on pellets from each spermatozoa and oocyte pool conserved in liquid nitrogen by an homogenization in 200 μL of extraction buffer [Phosphate Buffer Saline (PBS) solution, EDTA 1 mM, Triton® X-100 0.1%] with an Ultra-Turrax®. The samples were then centrifuged for 10 min at 15 000 g at 4°C and the supernatant was collected, aliquoted and stored at -80°C. Protein assays were performed in triplicate using the DC™ protein assay (Bio-Rad), following the supplier's instructions. Results were expressed in mg proteins.ml⁻¹.

2.9.2 Enzymatic assays

For SOD enzymatic assays, the Sigma-Aldrich SOD determination kit was used, following the supplier's instructions. Samples were diluted in dilution buffer and a standard solution was used to obtain results in U.mL⁻¹. For CAT enzymatic assays, the Amplex® Red Catalase Assay Kit (Invitrogen) was used, following the supplier's instructions, and absorbance was measured at 560 nm to obtain results in U.mL⁻¹. Samples were diluted in dilution buffer. For GR enzymatic assays, samples were diluted in phosphate buffer (100 mM, pH 7.6 at 25°C). Twenty μL of sample were added to 180 μL of reaction buffer (phosphate buffer, EDTA 1 mM, NADPH 0.1 mM, oxidized glutathione 1 mM, DTNB 0.75 mM). Starting immediately after mixing, absorbance was read at 412 nm every 42 sec for 7 min. GR

Table 3

Summary of the t-test results for paired samples at 19°C or 28°C for hemocytes from males or females. Levels of significance: P<0.5 = “*”; P<0.01 = “**”; P<0.001 = “***”. NS = Not Significant.

		Parameters	Hemocytes from males	Hemocytes from females
Flow cytometry parameters		Mortality	NS	NS
		Hemocytes Intracellular oxidative metabolism (IOM)	NS	NS
		Mitochondrial membrane potential	*	NS
		Total hemocytes count	NS	NS
		% of hyalinocytes	*	NS
		Hyalinocytes size	*	***
		Hyalinocytes complexity	**	**
		Hyalinocytes IOM	NS	NS
		% of Granulocytes	NS	NS
		Granulocytes size	NS	NS
		Granulocytes complexity	NS	NS
		Granulocytes IOM	NS	NS
		Phagocytosis rate	NS	NS
		Phagocytosis Capacity	NS	NS

enzyme concentration was determined in $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ using the delta absorbance per minute and the DTNB molar extinction coefficient ($14.15 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). For GST enzymatic assays, samples were not diluted. Twenty μL of sample were added to $180\mu\text{L}$ of reaction buffer (D-PBS, L-glutathione reduced 2 mM, CDNB 1 mM). Starting immediately after mixing, absorbance was read at 340 nm every 41 sec for 7 min. GST enzyme concentration was determined in $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ using the delta absorbance per minute and the CDNB molar extinction coefficient ($9.6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). For each sample, assays were performed in duplicates in 96-well microplates and a blank was run. Using the protein concentration results, enzymatic results were then expressed in $\text{U}\cdot\text{mg proteins}^{-1}$.

2.10 Measurement of lipid peroxidation

The malondialdehyde (MDA) assay method is based on the formation of a MDA/TBA (thiobarbituric acid) complex to measure lipid peroxidation in gill samples. Pellets from each spermatozoa and oocyte pool conserved in liquid nitrogen were homogenized in 1 mL Milli-Q water containing 2% of a 1% butylhydroxytoluene methanol solution, using an Ultra-Turrax[®] (IKA). Then, 3 mL of a 1% phosphoric acid solution and 1 mL of a 1% thiobarbituric acid solution were added. The mix was heated for 30 min at 100°C , cooled on ice and mixed with 5 mL of butanol for pools of oocytes and 10 mL of butanol for pools of spermatozoa before being centrifuged for 10 min at 6000 g at 4°C . The supernatant was used to assay the MDA/TBA complex at 532 nm, and MDA was quantified using a standard curve. Results were expressed in $\text{nmol MDA}\cdot 10^6 \text{ cells}^{-1}$.

2.11 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using STATGRAPHICS[®] software. To compare the effects of incubation temperature on the different parameters of the same pools, we performed t-test for paired samples. Two-way ANOVA with factor “sex” and factor “incubation temperature” were performed to compare the hemocytes coming from males to those coming from females for all the parameters. When significant differences due to factors (sex and incubation temperature) were observed, ANOVA was followed by post hoc Tukey's HSD test (Honestly Significant Difference). The homoscedasticity of variances was checked with the Levene's test. For each test, significant threshold was determined as $p\text{-value} < 0.05$.

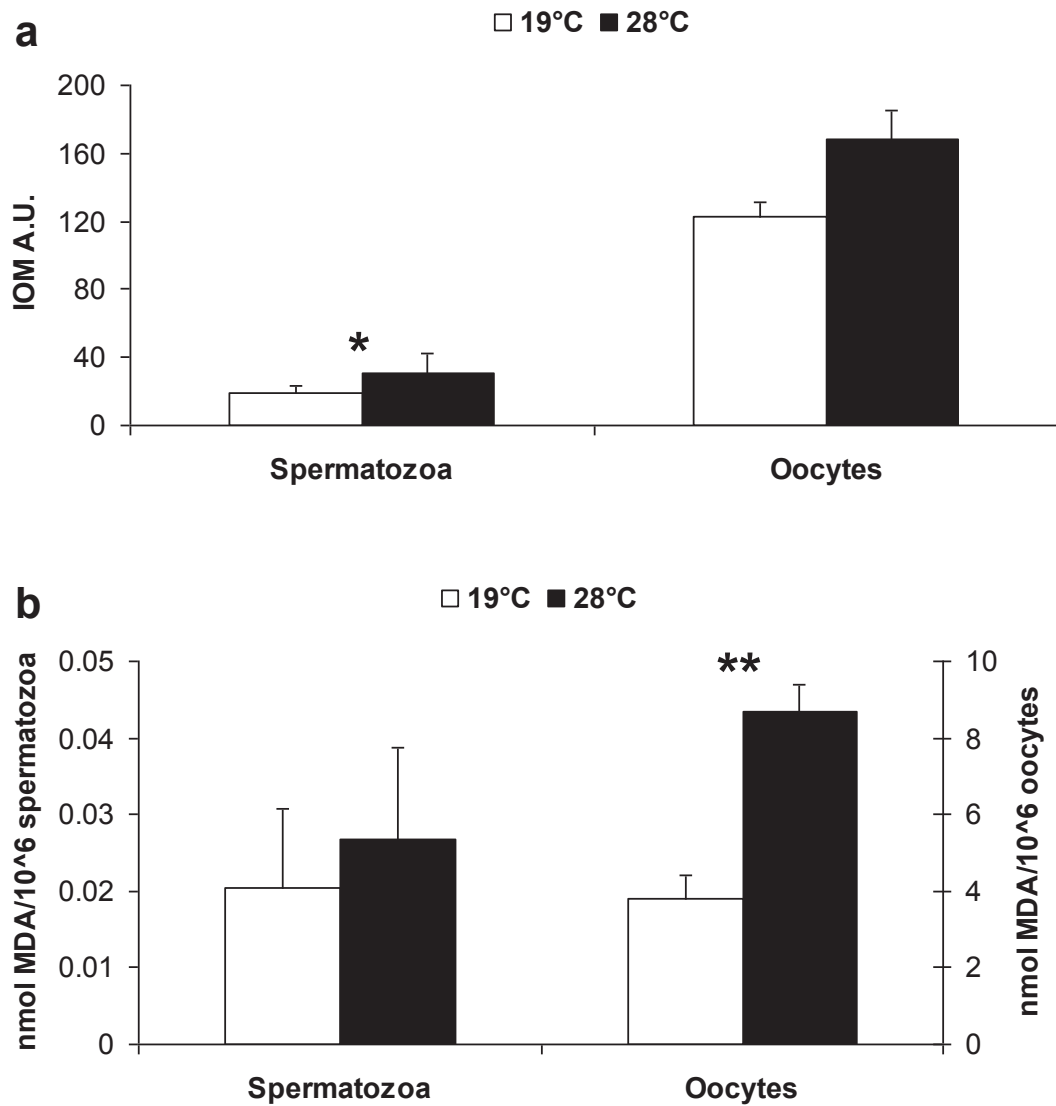


Fig. 1. Impact of temperature incubation on intracellular oxidative metabolism (IOM) of spermatozoa or oocytes expressed as fluorescence intensity in arbitrary units (A.U.) (a) and on levels of MDA in spermatozoa or oocytes expressed in nmol of MDA/ 10⁶ cells (b). P<0.05= “*”; P<0.01 = “**” to the t-test. Bars represent standard error. For each temperature of incubation n=4.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Gamete antioxidant capacity and subsequent ability to fertilize according to incubation temperature

3.1.1 Spermatozoa antioxidant capacity

The intracellular oxidative metabolism (IOM), represented by all the molecules with an oxidizing capacity including ROS, was significantly higher (1.6 fold) for spermatozoa at 28°C than those at 19°C (Fig.1). In this study the spermatozoa suspension concentrations were too low to measure their respiration rate. Thus, a separated experiment was performed in the same conditions using spermatozoa suspensions from 4 males at around 50×10^7 cell.mL⁻¹. The cellular respiration of spermatozoa was forced using carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP, 20 μM), an uncoupling agent which disrupts mitochondrial membrane potential. Respiration rate of spermatozoa was higher (2.4 fold) at 28°C than at 19°C, even though the difference was not statistically significant (P=0.11). An increase of respiration rate could partly explain the IOM increase at 28°C. Indeed, an increase of the cellular respiration translates an increase of mitochondrial activity, the primary source of ROS in cells (Turrens, 2003). Moreover, the rate of ROS generation is closely related to oxygen consumption (Storey, 1996). A high level of IOM at 28°C could potentially lead to a situation of oxidative stress damaging the spermatozoa and altering their function (Alvarez et al., 1987; Alvarez and Storey, 1995). In our study, there was no statistical difference in percentage of motile spermatozoa between the two incubation temperatures but their motility was significantly higher (2 fold) at 19°C than at 28°C. Duru et al. (2000) showed that oxidative stress lead to a loss of motility possibly because a degradation of membrane integrity. In this study, we measured the amount of MDA, an indicator of lipid peroxidation which is the main damage caused to spermatozoa by oxidative stress (Dandekar et al., 2002). Nevertheless, MDA level in spermatozoa was similar in both temperature conditions (Fig.1) indicating that no lipid peroxidation occurred even at 28°C where IOM was higher than at 19°C. Mitochondrial membrane potential (MMP) was shown to decrease when ROS production increase (Wang et al., 2003), but in our study, it did not reveal a significant change between 19°C and 28°C. This may indicate that the antioxidant system defense of the male germ cells was sufficient to protect them against potential oxidative metabolism injuries due to an elevation of IOM or that this elevation of IOM was not enough to provoke an oxidative stress. Even though

Table 4

Summary of the two-way ANOVA results for hemocytes. The two factors are “sex” accounting for samples sex (hemocytes coming from pools of males or females oysters) and “incubation temperature” for the temperature of incubation of samples. Levels of significance: $P < 0.5 = “*”$; $P < 0.01 = “**”$; $P < 0.001 = “***”$. NS = Not Significant.

	Parameters	Sex	Temperature of incubation	Sex+Temperature of incubation
Gene transcript levels	<i>CAT</i>	NS	NS	NS
	<i>GPX</i>	NS	NS	NS
	<i>GR</i>	**	NS	NS
	<i>GST</i>	NS	NS	NS
	<i>cy-SOD</i>	***	NS	NS
	<i>ec-SOD</i>	**	NS	NS
	<i>Mn-SOD</i>	**	NS	NS
Cytometry parameters	Mortality	NS	NS	NS
	Intracellular oxidative metabolism (IOM)	*	NS	NS
	Mitochondrial membrane potential	NS	***	NS
	Total hemocytes count	*	NS	NS
	% of hyalinocytes	NS	NS	NS
	Hyalinocytes size	NS	***	NS
	Hyalinocytes complexity	NS	***	NS
	Hyalinocytes IOM	NS	NS	NS
	% of Granulocytes	**	NS	NS
	Granulocytes size	NS	NS	NS
	Granulocytes complexity	NS	NS	NS
	Granulocytes IOM	NS	NS	NS
	Phagocytosis rate	NS	NS	NS
	Phagocytosis Capacity	NS	NS	NS

spermatozoa have been described to be transcriptionally silent cells (Grunewald et al., 2005), they transport a pool of mRNAs that they are able to translate *de novo* in some conditions to replace degraded proteins (Gur and Breitbart, 2006; Miller and Ostermeier, 2006). As both transcript levels and activities of antioxidant enzymes were similar at 19°C and 28°C (Table 2), this suggests that incubation temperatures used did not modulate the translation of the spermatozoa mRNAs encoding antioxidant enzymes.

3.1.2 Oocytes antioxidant capacity

Concerning oocytes, the respiration rate increased with temperature and was 1.4 fold significantly higher at 28°C than at 19°C (Fig. 2). As stated previously, an increase of cellular respiration can also increase the quantity of ROS produced and even though the IOM was not statistically different ($P=0.11$), it was higher (1.4 fold) in oocytes at 28°C (Fig. 1). An increase of the IOM could reflect an increase of ROS with potential subsequent damages. Indeed, the MDA levels were significantly higher (2.4 fold) for oocytes incubated at 28°C (Fig.1) indicating lipid peroxidation due to a possible oxidative stress. Both transcript levels and activities of antioxidant enzymes were similar at 19°C and 28°C suggesting that no antioxidant response was induced at 28°C (Table 2). The fact that MDA levels increase at 28°C whereas antioxidant defense studied stay constant suggest that incubation temperature at 28°C should promote the occurrence of an oxidative stress in oocytes. Unlike spermatozoa, oocytes contain all mRNAs and proteins necessary for the future embryo development until embryo becomes transcriptionally active through the maternal-zygotic transition (Schier, 2007). Guérin et al. (2001) suggest that embryo protection against ROS could be dependent of an endogenous pool of antioxidant enzymes coming from a pool of mRNAs stored by the oocyte during oogenesis. Rosenthal et al. (1983) have shown that in oocytes of the *Spisula* clam, translatability of mRNA was preferentially activated or repressed before or after fertilization depending of their adenylation state. Thus, we could also hypothesize that the translation of the oocytes mRNAs encoding antioxidant enzymes could occur after fertilization in order to protect the future embryo.

3.1.3 Effects of the temperature on gamete fertilization ability

Finally, we examined D-larvae yield for each pool of spermatozoa and oocytes incubated at 19°C or 28°C as this parameter can be considered as a quality indicator for gametes (Corporeau et al., 2012). Even though motility of spermatozoa was higher at 19°C, the D-larvae yield did not show a significant difference according to incubation temperatures

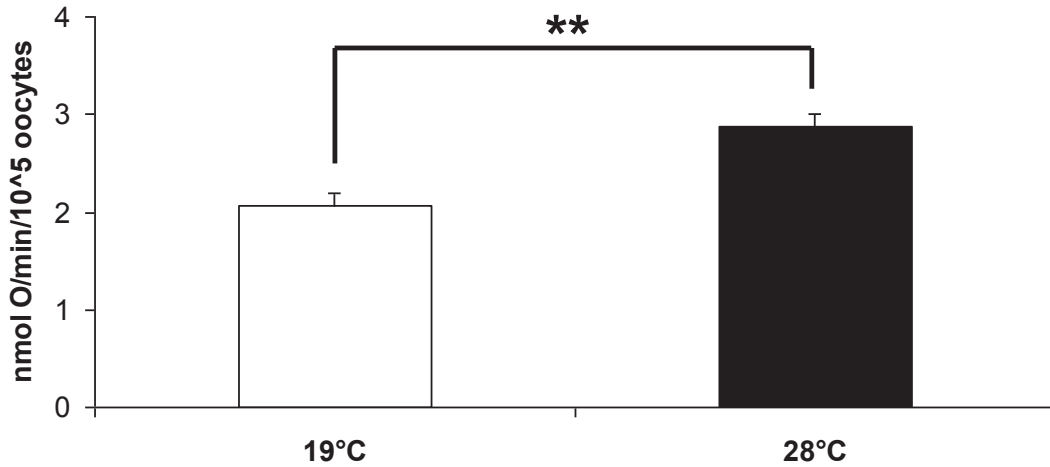


Fig. 2. Impact of temperature incubation on oxygen consumption rate of oocytes expressed in nmol of oxygen/min/ 10⁵ cells. P<0.01 = “**” to the t-test. Bars represent standard error. For each temperature of incubation n=4.

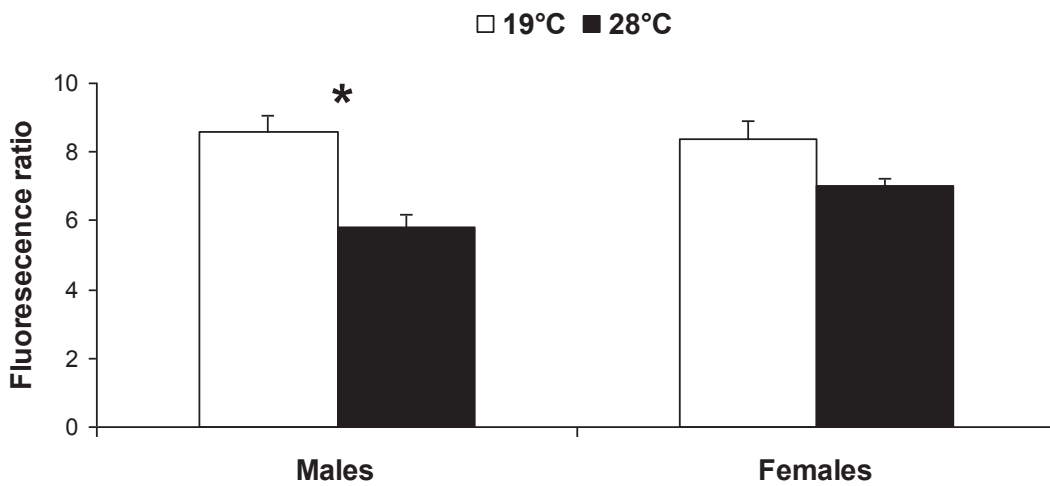


Fig. 3. Mitochondrial membrane potential in hemocytes coming from males or females expressed as a fluorescent ratio. P<0.05= “*” to the t-test. Bars represent standard error. For each temperature of incubation n=4.

confirming spermatozoa quality and function were not affected through an oxidative stress (Table 2). Surprisingly, the D-larvae yield of oocytes seemed to be higher (1.2 fold) at 28°C than at 19°C ($P=0.052$). Better D-larvae yield in 28°C-incubated oocytes may be due to a higher respiration rate and related higher ROS production. Respiration rate has already been proposed to be a marker of the Pacific oyster oocytes good quality (Valdez Ramirez et al., 1999). Moreover, some studies suggest that ROS could improve the subsequent development competence of oocytes and induce the resumption of meiosis (Blondin et al., 1997; Tatemoto et al., 2000). However, higher D-larvae yield in 28°C-incubated oocytes appeared contradictory to observed higher lipid peroxidation in these oocytes. Indeed, it has been shown that the rate of production of good embryos quality is negatively correlated with the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine index (not measured here), an index of DNA damages due to oxidative stress (Seino et al., 2002).

3.2 Antioxidant capacity of hemocytes

3.2.1 According to incubation temperature

Morphological and functional parameters of hemocytes were compared according to incubation temperature (Table 3 and Table 4). Percentage of hyalinocytes as well as their complexity and size were all significantly higher (1.1 fold) at 19°C than at 28°C for hemocytes from males. Similarly, complexity and size of hyalinocytes were both significantly higher (1.10 fold) at 19°C than at 28°C for hemocytes from females. “Shrinkage” of the same magnitude of hyalinocytes has already been observed in *Crassostrea virginica* after a heat treatment at 28°C suggesting a general response to stress according to the authors (Hégaret et al., 2003a). Mitochondrial membrane potential (MMP) was higher for both hemocytes from males (1.5 fold, $P<0.05$) and from females (1.2 fold, $P=0.061$) at 19°C than at 28°C (Fig. 3). Similar observations were previously reported using the same dye (JC-10) in hemocytes of the Pacific oyster (S. Artigaud, pers. com.) and in hemocytes of the green mussel *Perna viridis* (Donaghy and Volety, 2011). In ectothermal animals, the respiration rate increases at high temperatures (Abele et al., 2002; Sommer et al., 2002), we could thus hypothesise that it should have led to an increase of the MMP. Donaghy et Volety (2011) hypothesised that the MMP is not sufficient alone to explain mitochondrial changes occurring during an increase of temperature or, taking into account that MMP is used to produce ATP, high temperatures increase the need for ATP and therefore decrease the MMP. In our study, the IOM was higher at 19°C (1.3 fold) and decrease at 28°C even though that was not statistically different

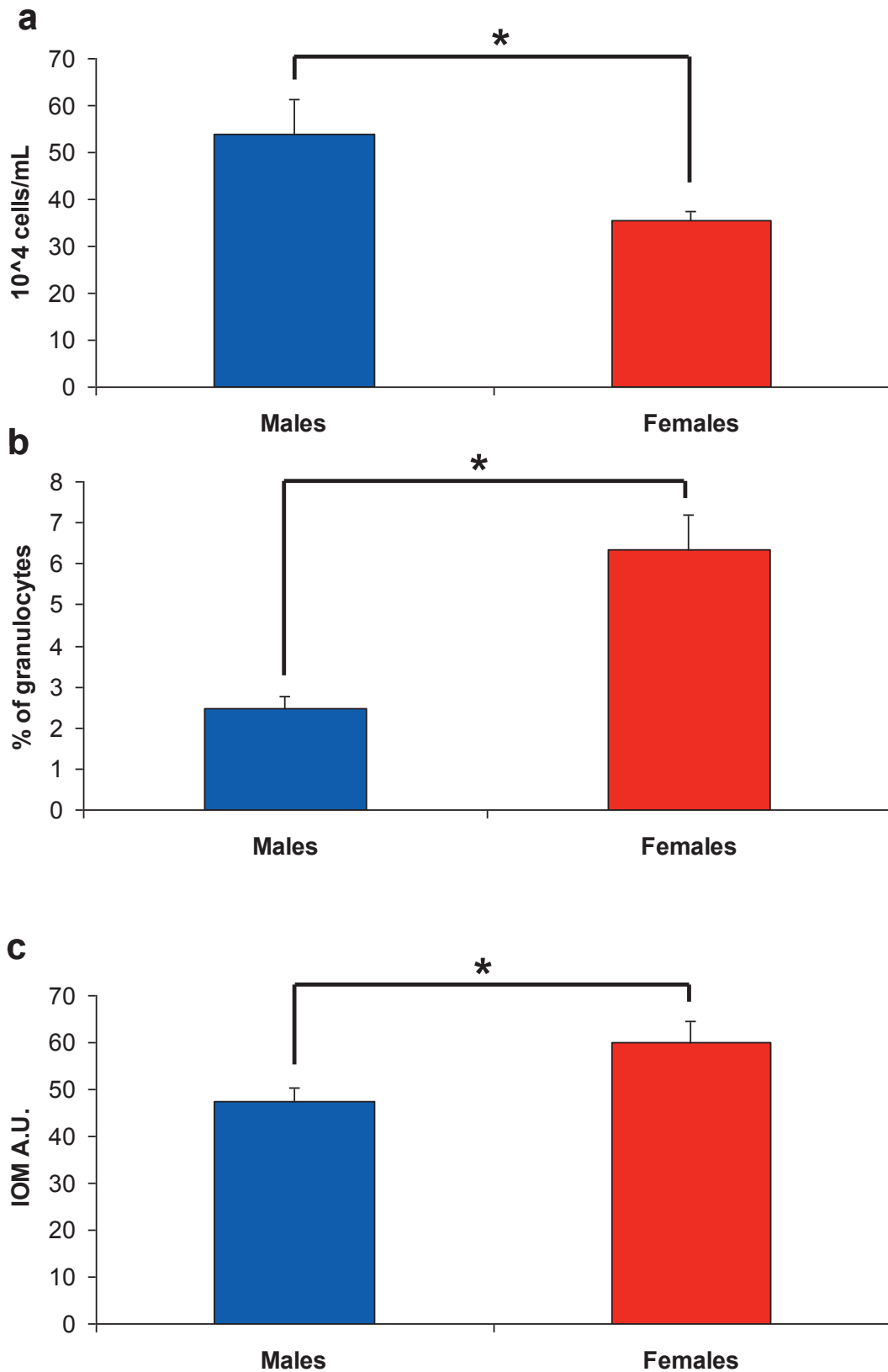


Fig. 4. Total hemocyte count expressed in 10^4 cells/mL (a), % of granulocytes (b) and intracellular oxidative metabolism (IOM) expressed as fluorescence intensity in arbitrary units (A.U.) (c) in hemocytes coming from males or females. $P < 0.05 = “*”$ to the t-test. Bars represent standard error. For each analysis $n=8$.

($P=0,07$) for hemocytes from males. This suggests that incubation at 19°C could promote the production of ROS probably due to an increased MMP. The same results were observed in the green mussel (Donaghy and Volety, 2011). This is contradictory with other studies showing that an increase of temperature increased ROS production (Hégaret et al., 2003b; Cheng et al., 2004; Chen et al., 2007). Together, the present results do not allow us concluding about the occurrence of an oxidative stress upon temperature rise in hemocytes. It would highlight a stability and thermo tolerance of the Pacific oyster immune defense system, constituted by hemocytes, in a wide range of temperatures. Accordingly, transcript levels of the antioxidant genes measured in hemocytes were not influenced by the temperature (Table 4) as observed for the gametes.

3.2.1 According to gender

A significant sex effect was found for total hemocyte counts (THC), percentage of granulocytes and IOM (Table 4). THC was higher (1.5 fold) in males whereas the percentage of granulocytes and IOM were significantly higher (2.6 fold and 1.3 fold respectively) in females (Fig. 4). Gender differences in hemocytes were already reported in bivalves with THC slightly higher in males and percentage of granulocytes higher in females of *Ruditapes philippinarum* (Matozzo and Marin, 2010) and with differences in hemocyte subpopulation proportions in *Saccostrea glomerata* and *Pinctada fucata* (Dang et al., 2012). Concerning IOM, our results are contradictory to the results obtained in *S. glomerata* and *P. fucata* (Dang et al., 2012) in which IOM was higher in males. Nevertheless, we can hypothesise that hemocytes from females could have a higher metabolic rate than those from males due to a possible higher energy cost for gametogenesis as proposed by Matozzo and Marin (2010). However, an increase of IOM might not represent an oxidative stress if antioxidant defenses of hemocytes from females are able to cope with it. In our study, we observed a significant sex effect on transcript levels of *GR*, *cy-SOD*, *Mn-SOD* and *ec-SOD*. mRNA levels of *GR*, *cy-SOD* and *Mn-SOD* were significantly higher (1.91 fold, 2.74 fold and 2.28 fold respectively) for pools of hemocytes from females than from males (Fig. 5). These results are in favour of a better enzymatic defense against oxidative stress in hemocytes coming from females. Matozzo and Marin (2010) also observed more efficient defenses against oxidative stress (SOD and catalase activities) in hemocytes from females and suggested that female clams reach the spawning period with a higher degree of immunosurveillance than males. This could allow them to counteract stressful conditions during critical period of their reproductive cycle.

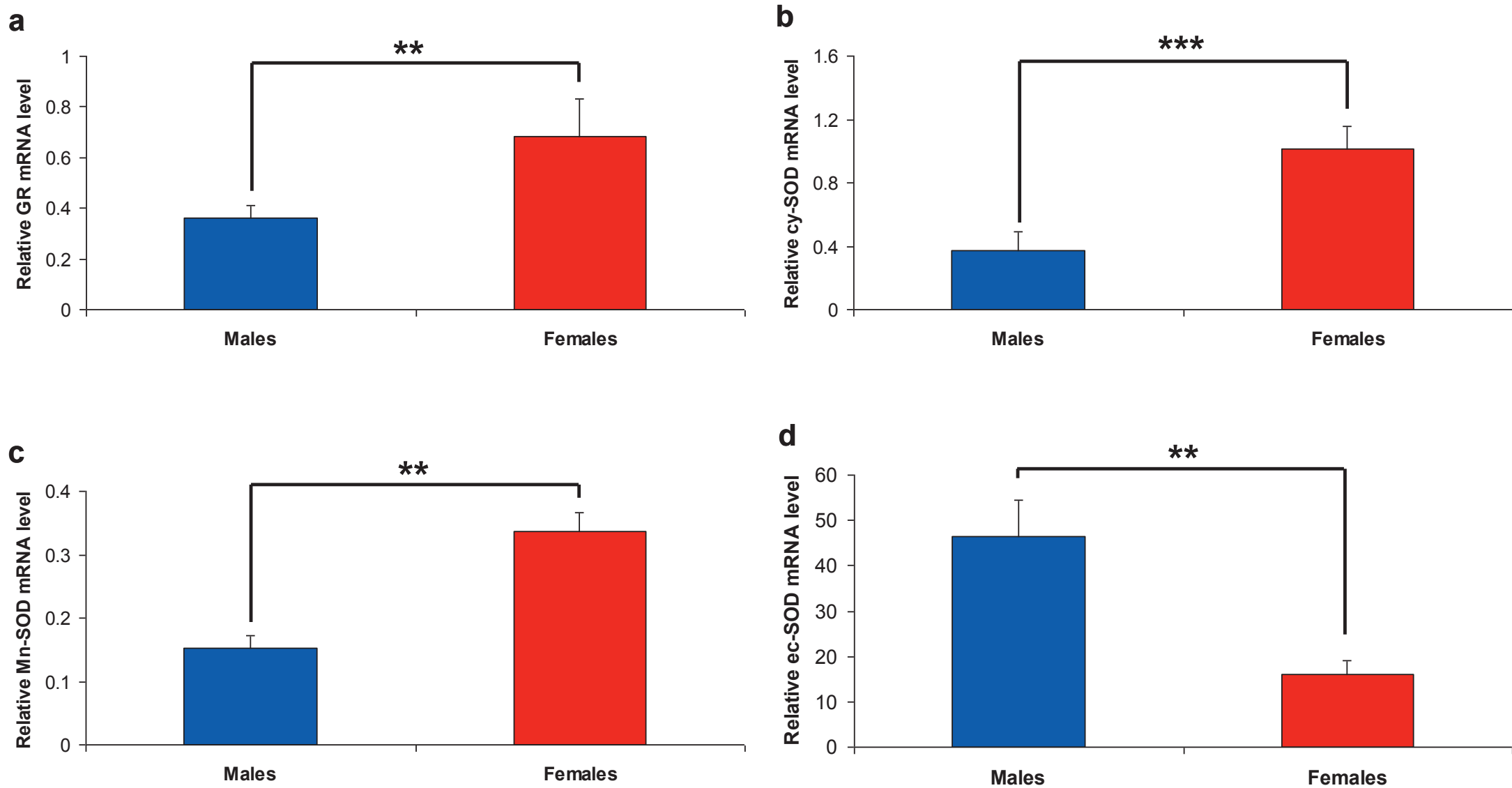


Fig. 5. Level of *GR* (a), *cy-SOD* (b), *Mn-SOD* (c) and *ec-SOD* (d) transcripts relative to *Elongation Factor I* transcripts in hemocytes coming from males or females. $P < 0.01 = "**"$ and $P < 0.001 = "***"$ to the t-test. Bars represent standard error. For males $n=5$ and for females $n=6$.

Regarding the transcripts levels of *ec-SOD*, which expression and secretion is specific to hemocytes (Gonzalez et al., 2005), it was significantly higher (3.2 fold) for hemocytes from males. This higher transcript of *ec-SOD* could protect spermatozoa within the gonad against the superoxide radical by catalyzing it in oxygen and hydrogen peroxide (H_2O_2). Then H_2O_2 could be selectively degraded by spermatozoa catalase which has been shown to be the only scavenger conferring complete protection to spermatozoa (Aitken et al., 1993; Griveau et al., 1995). This is the first report of a gender-specific regulation of the oxidative metabolism in the Pacific oyster. Indeed, a previous study examining antioxidant defenses in gills of the Pacific oyster in link with its reproduction did not show such a regulation (Béguel et al., 2013). Moreover, this is also the first study, as far as we know, that presents a gender-specific composition of hemolymph in the Pacific oyster. This indicates that gender-related differences in hemocyte parameters should be taken into account when studying the impact of environmental variables on hemocytes of the Pacific oyster, especially when pools are used.

4. CONCLUSIONS

To our knowledge, this study is the first one which aimed to compare the antioxidant capacity of the Pacific oyster gametes at two temperatures, 19°C and 28°C, by an integrative approach using molecular, biochemical and cellular assays.

For both oocytes and spermatozoa, the pro-oxidant metabolism (respiration rate, IOM) was higher at 28°C than at 19°C. This resulted in higher MDA for oocytes but no for spermatozoa, indicating that oocytes are more prone to lipid peroxidation in response to the highest temperature tested (28°C). However, this oxidation did not impact fertilization capacity. We hypothesize that this resistance of the Pacific oyster gametes toward oxidative stress could be an adaptation of this species to live and reproduce in a highly stressful environment. Interestingly, we observed a gender-specific regulation of antioxidant enzymes in hemocytes, potentially in response to the specific gametogenetic activity in males and females during reproductive period.

The present study identifies potential molecular and cytological markers of quality for the gametes. Indeed, proteins involved in oxidative stress response have been shown to be a marker of gamete quality in the Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) (Castets et al., 2012).

Moreover, it could help optimizing the hatchery conditions of the Pacific oyster by monitoring the effects of physico-chemical parameters on oxidative metabolism of gametes during their incubation prior to fertilization.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to all staff of the Argenton IFREMER station and Camille Lacroix (LEMAR UMR 6539, IUEM, Plouzané, France) for their useful help and technical assistance. Jean-Philippe Béguel was funded by a Région Bretagne doctoral grant.

REFERENCES

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J Exp Biol* 205, 1831-1841.
- Aitken, R.J., Buckingham, D., Harkiss, D., 1993. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 97, 441-450.
- Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z., Irvine, D.S., 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59, 1037-1046.
- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L., Storey, B.T., 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8, 338-348.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 42, 334-346.
- Anderson, R.S., Patel, K.M., Roesijadi, G., 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev Comp Immunol* 23, 443-449.
- Béguel, J.-P., Huvet, A., Quillien, V., Lambert, C., Fabioux, C., 2013. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. *Comp Biochem Phys C* 157, 63-71.
- Bize, I., Santander, G., Cabello, P., Driscoll, D., Sharpe, C., 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol Reprod* 44, 398-403.

- Blondin, P., Coenen, K., Sirard, M.A., 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 18, 454-460.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58, 79-110.
- Cantú-Medellín, N., Olguín-Monroy, N.O., Méndez-Rodríguez, L.C., Zenteno-Savín, T., 2009. Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico. *Arch Environ Con Tox* 56, 60-66.
- Castets, M.D., Schaerlinger, B., Silvestre, F., Gardeur, J.N., Dieu, M., Corbier, C., Kestemont, P., Fontaine, P., 2012. Combined analysis of *Perca fluviatilis* reproductive performance and oocyte proteomic profile. *Theriogenology* 78, 432-442.e413.
- Cetica, P.D., Pintos, L.N., Dalvit, G.C., Beconi, M.T., 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. *IUBMB life* 51, 57-64.
- Chávez-Villalba, J., Villelas-Ávila, R., Cáceres-Martínez, C., 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México. *Aquac Res* 38, 268-278.
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture* 271, 479-487.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions, in: V.S. Kennedy, Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Ed.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant, College Park, MD, USA, 299-333.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Hsu, C.-H., Chen, J.-C., 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immun* 17, 235-243.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology. Immuno-Biology and Pathology*, vol. 5. Science Publishers, Enfield (NH), USA, 1-42.
- Corporeau, C., Vanderplancke, G., Boulais, M., Suquet, M., Quéré, C., Boudry, P., Huvet, A., Madec, S., 2012. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Proteomics* 75, 5554-5563.
- Costil, K., Royer, J., Ropert, M., Soletchnik, P., Mathieu, M., 2005. Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Helgol Mar Res* 59, 286-300.
- Dandekar, S.P., Nadkarni, G.D., Kulkarni, V.S., Punekar, S., 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J Postgrad Med* 48, 186-189.
- Dang, C., Tan, T., Moffit, D., Delamare Deboutteville, J., Barnes, A.C., 2012. Gender differences in hemocyte immune parameters of bivalves: The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* and the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immun* 33, 138-142.

- de Lamirande, E., Gagnon, C., 1993. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 16, 21-25.
- de Lamirande, E., Gagnon, C., 1995. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radical Bio Med* 18, 487-495.
- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C., 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2, 48-54.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Dégremont, L., Boudry, P., Samain, J.-F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J Exp Mar Biol Ecol* 353, 45-57.
- Dietrich, G.J., Szpyrka, A., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Zakowski, L., Ciereszko, A., 2005. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 64, 1809-1822.
- Donaghy, L., Volety, A.K., 2011. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: *in vitro* impacts of temperature. *Fish Shellfish Immun* 31, 808-814.
- Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A.K., Soudant, P., 2012. Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Mitochondrial Involvement. *PLOS ONE* 7, e46594.
- Duru, N.K., Morshedi, M., Oehninger, S., 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 74, 1200-1207.
- Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J.-Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P., Favrel, P., Huvet, A., 2010. Microarray-Based Identification of Gonad Transcripts Differentially Expressed Between Lines of Pacific Oyster Selected to Be Resistant or Susceptible to Summer Mortality. *Mar Biotechnol* 12, 326-339.
- Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.-C., Gueguen, Y., Bachère, E., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Bioph Res Co* 338, 1089-1097.
- Gouletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). *Counc. Meet. of the Int. Counc. for the Exploration of the Sea, Cascais (Portugal)*, 16-19 Sep 1998.
- Griveau, J.F., Renard, P., Le Lannou, D., 1994. An *in vitro* promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 17, 300-307.

- Griveau, J.F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J.P., Le Lannou, D., 1995. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 103, 17-26.
- Griveau, J.F., Lannou, D.L., 1997. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 20, 61-69.
- Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H.J., Anderegg, U., 2005. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 37, 69-71.
- Guérin, P., Ménézo, Y., 1995. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: *de novo* synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. *Zygote* 3, 333-343.
- Guérin, P., El Mouatassim, S., Ménézo, Y., 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7, 175-189.
- Gur, Y., Breitbart, H., 2006. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Gene Dev* 20, 411-416.
- Han, D., Williams, E., Cadenas, E., 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 353, 411-416.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003a. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: I. Haemocyte types and morphology. *J Exp Mar Biol Ecol* 293, 237-248.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003b. 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.
- Hermes-Lima, M., 2005. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, In K. B. Storey (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, 319-368.
- Jones, R., Mann, T., Sherins, R., 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31, 531-537.
- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Bio Med* 26, 463-471.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.L., 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect* 8, 2715-2724.

- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immun* 15, 225-240.
- Lapointe, S., Sullivan, R., Sirard, M.A., 1998. Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 58, 747-753.
- Lesser, M.P., 1997. Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs* 16, 187-192.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68, 253-278.
- Lewis, S.E., Boyle, P.M., McKinney, K.A., Young, I.S., Thompson, W., 1995. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 64, 868-870.
- Liu, L., Trimarchi, J.R., Keefe, D.L., 2000. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 62, 1745-1753.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J Mar Biol Assoc UK* 59, 95-110.
- Matozzo, V., Marin, M., 2010. First evidence of gender-related differences in immune parameters of the clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia). *Mar Biol* 157, 1181-1189.
- Maurer, D., Comps, M., His, E., 1986. Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis* 15, 309-317.
- Miller, D., Ostermeier, G.C., 2006. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gyn Obstet Fertil* 34, 840-846.
- Moilanen, J., Hovatta, O., Lindroth, L., 1993. Vitamin E levels in seminal plasma can be elevated by oral administration of vitamin E in infertile men. *Int J Androl* 16, 165-166.
- Nasr-Esfahani, M.H., Aitken, J.R., Johnson, M.H., 1990. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development* 109, 501-507.
- Noda, Y., Matsumoto, H., Umaoka, Y., Tatsumi, K., Kishi, J., Mori, T., 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 28, 356-360.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45.
- Pierce, G.B., Parchment, R.E., Lewellyn, A.L., 1991. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation* 46, 181-186.

- Rico-Villa, B., Pouvreau, S., Robert, R., 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 287, 395-401.
- Rosenthal, E.T., Tansey, T.R., Ruderman, J.V., 1983. Sequence-specific adenylations and deadenylations accompany changes in the translation of maternal messenger RNA after fertilization of *Spisula* oocytes. *J Mol Biol* 166, 309-327.
- Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227-243.
- Schier, A.F., 2007. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 316, 406-407.
- Seino, T., Saito, H., Kaneko, T., Takahashi, T., Kawachiya, S., Kurachi, H., 2002. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 77, 1184-1190.
- Sommer, A. M., Rtner, H. O., 2002. Metabolic cold adaptation in the lugworm *Arenicola marina*: Comparison of a North Sea and a White Sea population. *Mar Ecol Progr Ser* 240, 171-182.
- Song, Y.-P., Suquet, M., Queau, I., Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Aquaculture* 287, 311-314.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29, 1715-1733.
- Takami, M., Preston, S.L., Toyloy, V.A., Behrman, H.R., 1999. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol* 276, E684-688.
- Tarin, J.J., Ten, J., Vendrell, F.J., Cano, A., 1998. Dithiothreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability *in vitro*. *Hum Reprod* 13, 381-386.
- Tatemoto, H., Sakurai, N., Muto, N., 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 63, 805-810.
- Torreilles, J., Guérin, M.C., Roch, P., 1996. Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. *C R Acad Sci III* 319, 209-218.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.

- Valdez Ramirez, M.E., Le Pennec, M., Dorange, G., Devauchelle, N., Nonnotte, G., 1999. Assessment of female gamete quality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Inver Rep Dev* 36, 73-78.
- Wang, X., Sharma, R.K., Gupta, A., George, V., Thomas, A.J., Falcone, T., Agarwal, A., 2003. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril* 80 Suppl 2, 844-850.
- Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661-672.
- Yang, H.W., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, H.S., Choi, K.W., Oh, K.S., 1998. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 13, 998-1002.

3. Conclusions et ouvertures

Les résultats obtenus dans cette dernière partie ont permis d'observer qu'un choc thermique vers des températures plus élevées entraînait une augmentation du métabolisme oxydatif chez les gamètes avec notamment une augmentation de la respiration cellulaire et de la production intracellulaire de ROS. Cependant, cela n'a engendré de dommages oxydatifs que chez les ovocytes. Ainsi, les ovocytes seraient mieux protégés du stress oxydant dans la gonade, et ce probablement en partie par l'action antioxydante des cellules somatiques gonadiques dont les hémocytes. En effet, les transcrits codant la cy-SOD, la Mn-SOD et la GR ont été mesurés en quantité plus importante dans les hémocytes provenant des femelles que dans les hémocytes provenant des mâles. De ce fait, les femelles pourraient atteindre la maturité avec un plus grand degré d'immuno-surveillance (*via* les activités antioxydantes) que les mâles. D'autre part, aucune augmentation des activités enzymatiques antioxydantes n'a été observée suite au choc thermique dans les ovocytes, semblant confirmer l'hypothèse émise dans la deuxième partie, à savoir que les transcrits de la GR stockés dans les ovocytes sont réprimés traductionnellement jusqu'à la fertilisation.

En ce qui concerne les spermatozoïdes, l'augmentation de la production intracellulaire de ROS à 28°C n'a été suivie ni d'une augmentation de la peroxydation lipidique, ni d'une augmentation de l'expression des gènes antioxydants (taux de transcrits plus activités enzymatiques). Une des hypothèses est que l'augmentation de la production de ROS observée ne serait pas suffisante pour induire un stress oxydant. D'autre part, cela semble également suggérer que l'augmentation de l'activité GR observée dans les gonades mâles de la deuxième étude serait due aux cellules somatiques gonadiques.

Malgré l'augmentation de la production intracellulaire de ROS observée dans les gamètes et la plus grande peroxydation lipidique des ovocytes incubés à 28°C, le taux de larves D, pouvant être utilisé comme marqueur de qualité des gamètes, était similaire après incubation aux deux températures. Cela renforce l'idée d'une résistance au stress oxydant particulièrement élevée chez *C. gigas*. Cette résistance a été observée tout au long de nos études et dans différents tissus et cellules (branchies, gonades, et gamètes), et permet de confirmer que *C. gigas* est un animal spécialement adapté à la vie dans des conditions environnementales stressantes comme en atteste le nombre important de gènes impliqués dans

la réponse au stress identifiés dans son génome (Zhang et al., 2012). Finalement, cette dernière étude fournit des marqueurs du métabolisme oxydatif qui pourraient être analysés plus en détail afin de permettre l'amélioration des techniques d'élevage de *C. gigas* en éclosion.

**DISCUSSION GENERALE,
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

1. Discussion générale

Lors des études menées pour comprendre les causes des mortalités estivales concernant l'huître creuse *Crassostrea gigas* en France (projet MOREST, 2001-2005), il a été observé une corrélation négative entre effort reproducteur et survie (Samain and McCombie, 2008). De plus, les individus des lignées résistantes (R) à ces mortalités investissaient moins en reproduction et présentaient des expressions de gènes antioxydants plus élevées que les huîtres des lignées sensibles (S) à ces mortalités (Huvet et al., 2004; Fleury et al., 2010; Fleury and Huvet, 2012). D'autre part, la production intra-hémocytaire de ROS des huîtres S apparaissait également plus élevée que celle des huîtres R (Delaporte et al., 2007). Or la reproduction est une fonction essentielle qui nécessite une importante demande en énergie, notamment pour des espèces à forte fécondité comme *C. gigas* (Pouvreau et al., 2006; Enríquez-Díaz et al., 2009), satisfaite par une augmentation globale du métabolisme (Angilletta and Sears, 2000; Zera and Harshman, 2001; Nilsson, 2002). Etant donné qu'une augmentation du métabolisme est généralement associée à une augmentation de la production de ROS, la susceptibilité au stress oxydant pourrait représenter un coût de la reproduction chez *C. gigas*.

Partant de cette hypothèse, l'un des premiers objectifs de cette thèse a ainsi été d'analyser la susceptibilité au stress oxydant comme coût potentiel de la reproduction chez *Crassostrea gigas*. Il existe principalement trois méthodes pour étudier le coût de la reproduction. La première est la mesure des corrélations phénotypiques *in situ* sur des individus non manipulés. Cette mesure a déjà été effectuée chez les écureuils montrant que plus la portée était importante plus les génitrices présentaient de dommages oxydatifs (Bergeron et al., 2011). Cependant, les mesures *in situ* impliquent une absence de contrôle des variables environnementales, ce qui peut masquer d'éventuels compromis « trade-off » physiologiques ou en réduire l'amplitude. Ce type d'approche est donc moins pertinent pour l'étude des mécanismes physiologiques sous-jacents (Reznick, 1992). Une deuxième approche concerne les analyses de co-variations génétiques et la sélection artificielle. C'est le cas de l'approche utilisée sur des campagnols sélectionnés pour leur taux métabolique élevé et dont les dommages oxydatifs subis pendant la reproduction ont été comparés à ceux d'individus contrôles sans montrer de différence (Oldakowski et al., 2012). Cependant, ce type d'analyse induit un biais du fait de la sélection des individus sur un caractère donné, ce qui peut altérer les bases d'un « trade-off » potentiel et ses causes physiologiques (Rose et al., 1998). De plus, cette approche nécessite des espèces qui ont des temps de génération

suffisamment courts pour obtenir des lignées ou des familles sélectionnées, ce qui est un frein chez certaines espèces (Stearns, 1977). La troisième méthode consiste à manipuler une variable phénotypique particulière afin d'étudier son impact sur un potentiel trade-off. Dans ce cas, l'ablation d'un organe ou la stimulation hormonale s'avèrent particulièrement puissantes pour étudier les aspects fonctionnels de compromis physiologiques (Zera and Harshman, 2001). En ce qui concerne l'étude du coût de la reproduction, les manipulations du phénotype d'investissement à la reproduction telle que la castration sont particulièrement utiles pour étudier l'existence possible d'un « trade-off » entre reproduction et longévité (Rose et al., 1998). Il est alors question de « phenotypic engineering » ou production de phénotype. Cette méthode permet, de plus, d'utiliser des individus de même fond génétique. C'est notamment ce qui a été réalisé chez la drosophile où la stimulation hormonale de la production d'œufs a mis en évidence une susceptibilité au stress oxydant comme coût de la reproduction (Salmon et al., 2001). C'est cette approche qui a été choisie dans le cadre de notre étude.

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, la gonade étant un organe transitoire et non isolé des autres organes, son ablation n'était pas envisageable. L'utilisation d'hormones (voies insuline, transforming growth factor β , neuropeptide Y, gonadotropin-releasing hormone) ou de l'AMP-activated protein kinase (AMPK), récemment étudiées chez *C. gigas* et qui pourraient être impliquées dans la fonction de reproduction aurait également pu être envisagée pour manipuler l'investissement reproducteur (Gricourt et al., 2006; Fleury et al., 2008; Bigot, 2012; Bigot et al., 2012; Guévelou, 2012; Huvet et al., 2012). Cependant, le mode d'action de ces molécules sur la reproduction n'est pas encore suffisamment bien connu, et leur action impliquerait également des modifications directes du métabolisme énergétique. Ainsi, une technique innovante, l'ARN interférence (RNAi), a été utilisée comme outil afin de produire le matériel nécessaire pour répondre à la problématique posée. L'ARN interférence est une approche de génétique inverse permettant d'étudier la fonction d'un gène par la dégradation spécifique de ses ARNm empêchant ainsi la synthèse de la protéine correspondante. Sa force réside dans le fait qu'elle permet la création de phénotypes « knock down » mosaïques allant généralement d'un phénotype proche des contrôles jusqu'à une inhibition presque totale de la fonction du gène. De plus, l'expression du gène peut être inhibée de manière réversible et au moment souhaité. En effet, le gène est toujours présent, sa transcription peut toujours s'effectuer mais son expression est inhibée par dégradation spécifique de son ARNm. Contrairement au « knock out » qui correspond à la production de mutants présentant une perte complète de la fonctionnalité du gène supprimé, dont l'action

n'est pas réversible et surtout ne permet pas l'inhibition de l'expression du gène au moment souhaité. Le RNAi a été utilisé dans notre étude afin d'inhiber spécifiquement le gène *oyster vasa-like (Oyvl)*, gène essentiellement exprimé dans les cellules germinales et indispensable au développement du tissu gonadique chez *C. gigas* (Fabioux et al., 2004b). L'utilisation du RNAi sur le gène *Oyvl*, mise au point par Fabioux et al. (2009), a permis l'obtention d'huîtres au développement gonadique partiellement ou totalement inhibé, ce qui nous a permis, *in fine*, d'obtenir des huîtres présentant des investissements reproducteurs contrastés. Ce matériel biologique était donc bien adapté à l'étude de l'impact de l'investissement reproducteur sur la capacité antioxydante. En effet, cette technique a permis d'utiliser un même lot d'animaux, de même âge, conditionnés exactement dans les mêmes circonstances. De plus, la modification de l'effort reproducteur de certains d'entre eux s'est faite en ne changeant l'expression que d'un seul gène et aucun autre paramètre. C'est la première fois que l'ARN interférence est utilisé en tant qu'outil pour «produire» du matériel biologique présentant des investissements reproducteurs contrastés. L'utilisation de l'ARN interférence nous a donc permis d'isoler et d'étudier l'influence potentielle d'un seul facteur sur la capacité antioxydante : l'investissement reproducteur. Un conditionnement expérimental avec un régime alimentaire différentiel aurait pu être une solution de manipulation phénotypique. En effet, un apport nutritif important permet d'augmenter l'investissement reproducteur, mais cela aurait entraîné d'autres changements physiologiques que le seul investissement reproducteur (Chavez-Villalba et al., 2003). Une autre méthode était d'augmenter l'échantillonnage et de sélectionner (mesure de corrélations phénotypiques) les individus sur la base de leur taux d'occupation gonadique (faible ou fort). Mais, il est très peu probable que les investissements reproducteurs obtenus aient été aussi contrastés que ceux obtenus par RNAi.

L'investissement reproducteur de *C. gigas* tel que nous l'avons considéré dans cette étude dépend directement du nombre de gamètes produits et est mesuré par le pourcentage d'occupation gonadique (OG) sur coupe histologique. Notre étude de la capacité antioxydante de l'huître en lien avec l'investissement reproducteur a été réalisée dans la branchie dans un premier temps et ce pour plusieurs raisons. La théorie du « soma jetable » de Kirkwood (1977), qui tente de répondre à une question incontournable : « Pourquoi la mort ? », explique que la sénescence est due à un détournement des ressources indispensables à la maintenance somatique vers la fonction non moins primordiale de reproduction qui est la seule permettant la pérennité de l'espèce. De ce fait, l'impact de l'effort reproducteur est plus intéressant à étudier dans un tissu somatique. La seconde raison est que les branchies servent à la respiration, ce qui en fait un organe de choix pour l'étude du métabolisme oxydatif et que

c'est le premier organe en contact avec l'environnement de l'animal ce qui en fait un tissu clef pour étudier la réponse aux stress environnementaux tel que le stress thermique (Farcy et al., 2009). Les analyses effectuées ont montré des taux de transcrits codant pour la GPX, la SOD mitochondriale (Mn-SOD) et la SOD extracellulaire (ec-SOD) significativement plus élevés chez les individus présentant un investissement reproducteur plus important. Ces enzymes sont des enzymes clefs du système antioxydant (voir figure 2 page 10) et sont nécessaires à la régulation de la quantité de ROS afin d'empêcher ou de freiner l'occurrence d'un stress oxydant. L'activité SOD permet la dismutation du radical O_2^- en H_2O_2 et agit donc au tout début de la chaîne antioxydante. La GPX intervient juste après en permettant la décomposition du H_2O_2 en H_2O . Cette augmentation du nombre de transcrits n'était pas couplée à une augmentation des activités antioxydantes chez ces mêmes individus et aucun dommage oxydatif n'y a été révélé par la mesure de la peroxydation lipidique. Des auteurs (Spirin, 1996; Ruan, 1997) proposent la possibilité de séquestration de certains transcrits dans des complexes ribonucléoprotéiques empêchant leur traduction et constituant ainsi un « stock » d'ARNm prêts pour traduction rapide. Une des hypothèses pour expliquer l'élévation du niveau de transcrits observée au cours de ce travail, sans modification de l'activité antioxydante, pourrait être leur accumulation « préventive » en vue d'une traduction ultérieure en cas d'élévation critique du niveau de ROS. Cette hypothèse a déjà été proposée comme un moyen de lutter contre la surproduction de ROS durant le passage de l'hypoxie à la normoxie chez *C. gigas* (Sussarellu et al., 2010). Elle peut être soutenue par le fait qu'une des SOD surexprimées dans notre étude est la SOD mitochondriale, or la mitochondrie est la première cible des ROS qu'elle produit (Miquel, 1998).

Des niveaux différentiels de taux de transcrits d'enzymes antioxydantes, telles que la CAT, cy-SOD, ec-SOD et la GPX, ont déjà été observés chez *C. gigas*, confirmant un lien entre investissement reproducteur et capacité antioxydante. Ces observations ont été faites dans les branchies des lignées résistantes (R) et sensibles (S) aux mortalités estivales (Fleury and Huvet, 2012). Cependant, à l'inverse de notre étude, une surexpression des transcrits a été observée chez les individus R qui présentaient un investissement reproducteur moins important. Ceci ne remet toutefois pas en cause les résultats obtenus au cours de ce travail puisque, d'une part notre étude a été réalisée en milieu contrôlé et que d'autre part la reproduction était le seul facteur différentiel permettant d'expliquer une potentielle susceptibilité au stress oxydant. Au contraire, dans leur étude (Fleury and Huvet, 2012), les huîtres ont été élevées en milieu naturel et ont subi un fort épisode de mortalités au cours du suivi. En effet, Fleury et Huvet (2012) ont observé des différences de niveaux de transcrits

d'enzymes antioxydantes, supérieurs chez les lignées R vs S, qu'à une seule date de leur suivi, le 20 Juin 2005, date qui correspond au début de la période des mortalités estivales (maximum le 7 Juillet 2005). Cette augmentation des taux de transcrits antioxydants chez les huîtres R est vraisemblablement attribuable à un phénomène multi-factoriel plus complexe que la simple différence dans l'investissement reproducteur. Pour les lignées R, cette surexpression pourrait leur conférer une meilleure protection contre le «burst oxydatif» induit par la présence de pathogènes dans le milieu, et sans doute en partie responsables des mortalités estivales. Nous savons également qu'un challenge par des pathogènes effectué chez *Crassostrea virginica* a entraîné une surexpression de gènes impliqués dans la régulation du stress oxydant, confirmant ainsi l'importance des systèmes antioxydants comme moyen de protection contre les attaques pathogènes (Wang et al., 2010). En regardant maintenant les résultats obtenus par Fleury et Huvet (2012) avant la période de déclenchement des mortalités (25 Mai et 6 Juin 2005), une tendance à l'augmentation du taux de transcrits des huîtres de la lignée S (à l'investissement reproducteur élevé) par rapport aux huîtres de la lignée R a été observée, notamment pour la cy-SOD. Ainsi avant l'apparition des mortalités estivales (potentielle absence de pathogènes), la capacité antioxydante dans les branchies d'huîtres irait dans le même sens (mais avec un différentiel moins marqué) que dans notre étude, à savoir des taux de transcrits d'enzymes antioxydantes (pour la cy-SOD au moins) plus élevés dans les huîtres à l'effort reproducteur plus intense. Ce différentiel moins marqué dans l'étude de Fleury et Huvet (2012) pourrait être expliqué par le fait que les huîtres des lignées R et S présentent en général des différentiels d'investissement reproducteur moins contrastés, de 35% OG moyenne pour les R à 47% OG moyenne pour les S (Huvet et al., 2010), que les huîtres utilisées dans notre étude, 18% OG moyenne (Low GO group) à 70% OG moyenne (High GO group).

Les résultats obtenus dans notre étude suggèrent que la reproduction seule n'est pas suffisante pour induire un stress oxydant chez *C. gigas*. De plus, les huîtres présentant un investissement reproducteur plus important pourraient potentiellement avoir des capacités antioxydantes plus élevées ou «sur-stimulées». Cela peut être corroboré par l'analyse des taux de transcrits des principales enzymes antioxydantes effectuée dans la glande digestive des huîtres au cours d'un cycle de reproduction (Fleury et al., en prép.). En effet, cette étude montre globalement un niveau de taux de transcrits plus important chez les individus matures. Elle souligne aussi le fait que la capacité antioxydante augmente avec l'activité de reproduction.

Les résultats obtenus sur d'autres modèles, dans des études visant à analyser un lien possible entre reproduction et stress oxydant, laissent apparaître des conclusions variables. Tout d'abord, certaines études ne révèlent aucun lien entre effort de reproduction et susceptibilité au stress oxydant, chez les femelles tout du moins. Ceci a été montré lors d'analyses du sang du mouton de Soay (*Ovis aries*) (Nussey et al., 2009). Cependant, seuls les dommages oxydatifs représentés par la peroxydation lipidique (MDA) ont été mesurés et non les capacités antioxydantes. D'autres études témoignent effectivement d'un lien entre effort de reproduction et susceptibilité au stress oxydant chez les femelles mais avec des corrélations négatives. Par exemple, en ce qui concerne le campagnol (*Myodes glareolus*), une augmentation de l'investissement reproducteur n'a pas été corrélée à une susceptibilité au stress oxydant dans les tissus comme les reins, le foie ou le cœur (Oldakowski et al., 2012). De plus, il s'avère que les femelles qui se reproduisent présentent moins de dommages oxydatifs que les femelles ne se reproduisant pas. Là encore seules la peroxydation des lipides ou l'oxydation des protéines ont été mesurées et non la capacité antioxydante. Une étude menée chez un autre rongeur, *Mus musculus domesticus*, apporte des conclusions similaires : les femelles reproductrices présentent également moins de peroxydation lipidique que les femelles non reproductrices, mais chez les premières, l'augmentation de la taille de la portée a été corrélée positivement à l'oxydation des protéines dans le mollet et le foie (Garratt et al., 2010). Finalement d'autres études soulignent un lien entre effort de reproduction et stress oxydant avec cette fois des corrélations positives. Chez l'écureuil (*Tamias striatus*), l'augmentation de la taille de la portée était corrélée positivement à la peroxydation lipidique dans le sang ainsi qu'à la dépense énergétique journalière des femelles, traduisant une activité métabolique plus importante (Bergeron et al., 2011). Des études sur les oiseaux femelles (*Taeniopygia guttata* et *Alectoris rufa*) montrent qu'une augmentation de la taille de la couvée est corrélée à une augmentation de la peroxydation lipidique, des dépenses énergétiques journalières et à une diminution des capacités antioxydantes telle qu'une diminution de l'activité de la SOD et de la GPX (Wiersma et al., 2004; Alonso-Alvarez et al., 2010). Ces derniers travaux illustrent bien le fait que le stress oxydant peut constituer un coût de la reproduction chez certaines espèces.

Chez ces espèces de vertébrés précédemment citées, la stratégie de reproduction est de type « K ». De ce fait l'effort reproducteur est relié directement à la taille de la portée ou de la couvée et repose davantage sur les soins apportés à la descendance qu'à la production de cellules germinales. Chez *C. gigas* qui a une stratégie de reproduction de type « r » et une fécondation externe, aucun soin n'est apporté à la descendance, en revanche, l'effort lié à la

reproduction correspond principalement à la production de gamètes et à leur émission. Dans notre étude, le coût de la reproduction a été étudié par rapport à la production des gamètes plutôt qu'à leur émission. Dans les études menées sur la mouche du fruit (*Drosophila melanogaster*), l'augmentation de la production d'œufs, qu'il est possible de rapprocher de l'investissement reproducteur de *C. gigas*, est corrélée à une plus grande susceptibilité au stress oxydant (Salmon et al., 2001; Wang et al., 2001). Cette susceptibilité est mesurée par un taux de mortalité suite à une exposition à un agent générant des ROS. Ainsi, chez les oiseaux, la reproduction est suffisante à elle seule pour induire un stress oxydant, tandis que chez la drosophile c'est l'addition d'un stress supplémentaire qui permet de visualiser le trade-off entre résistance au stress oxydant (*via* la survie) et reproduction. C'est pourquoi, dans notre étude nous avons également appliqué un choc thermique aux huîtres afin de déterminer si coupler un « stress » thermique à l'effort reproducteur modifiait la capacité antioxydante.

L'augmentation de température permet d'accroître le métabolisme général de l'animal et donc potentiellement la production de ROS. Néanmoins, dans notre étude aucune différence au niveau de la capacité antioxydante ou du dommage oxydatif entre les huîtres soumises ou non au choc thermique n'a été mise en évidence et ce, quelque soit le taux d'OG. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'amplitude de température utilisée (19°C à 28°C) et la température maximale étaient insuffisantes pour induire un réel stress, ce que laisse penser la non modulation des taux de transcrits codant la HSP 70 (Heat Shock Protein) et le HIF- α (Hypoxia Inducible Factor α) alors que ce sont des gènes connus pour répondre à un stress thermique (Hamdoun et al., 2003; Kawabe and Yokoyama, 2012). Il faut cependant souligner que nous n'avons mesuré le taux de transcription que d'un seul gène sur les 88 gènes codant des HSP70 récemment identifiés chez *C. gigas* (Zhang et al., 2012). Ceci illustre la complexité des études de la réponse au stress thermique chez cette espèce. De plus hautes températures (autour de 35°C) auraient sans doute été plus efficaces pour induire un stress thermique (Clegg et al., 1998; Farcy et al., 2009). Mais ce n'était pas envisageable dans notre étude car une telle augmentation de la température aurait certainement déclenché l'émission des gamètes des huîtres matures, ce qui aurait modifié l'état physiologique des huîtres. L'application d'un autre type de stress, tel que l'utilisation d'H₂O₂, pourrait être une solution pour étudier la capacité antioxydante de *C. gigas* en fonction de son investissement reproducteur, en condition favorisant l'apparition d'un stress oxydant.

Enfin, dans notre première étude, les résultats ont été analysés de manière sexe-spécifique et ne semblent pas indiquer de capacité antioxydante différentielle entre les mâles

et les femelles. Jusqu'à présent tous les travaux réalisés sur cette thématique ont été réalisés presque exclusivement sur les femelles mis à part chez le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*) où la capacité antioxydante des mâles a également été testée (Wiersma et al., 2004). Les résultats de cette étude sur les oiseaux montrent que chez les femelles la capacité antioxydante diminue avec un nombre d'œufs dans la couvée plus élevé du fait d'une légère diminution des activités SOD et GPX mais surtout par une forte augmentation du métabolisme basal. En revanche, chez les mâles, la capacité antioxydante diminue avec un nombre d'œufs dans la couvée plus élevé du fait d'une importante diminution des activités SOD et GPX tandis que le métabolisme basal reste constant. Cela pourrait être dû aux soins différentiels apportés à la progéniture par les parents. Chez les huîtres, les géniteurs aussi bien mâles que femelles ne s'occupent pas des descendants, ainsi leur consommation d'énergie pour la reproduction n'est nécessaire que pour la synthèse des gamètes et leur émission. Si l'on considère que les gamétogenèses mâles et femelles sont équivalentes en termes de dépense énergétique comme déjà proposé par Pouvreau et al. (2006), ceci pourrait expliquer en partie l'absence de régulation sexe-spécifique de la capacité antioxydante dans les branchies. Enfin, l'étude de l'émission des gamètes sur la capacité antioxydante serait intéressante à prendre en compte. En effet, chez la moule *Mytilus edulis*, la ponte pourrait être un facteur plus aggravant que la production de cellules germinales dans le cas de mortalités estivales (Myrand et al., 2000).

Alors que la capacité antioxydante de l'huître a été étudiée dans un organe somatique et qu'elle ne semble pas affectée par un fort investissement reproducteur, il nous est apparu important (1) d'analyser si la production de cellules germinales elle-même pouvait être source de stress oxydant dans la gonade et (2) d'estimer la capacité antioxydante du tissu gonadique. La gonade est le seul organe où un dimorphisme sexuel est réellement visible chez *C. gigas* et une récente étude a permis d'y identifier des marqueurs moléculaires spécifiques du développement gonadique mâle et femelle (Dheilly et al., 2012). Ainsi, nous avons posé l'hypothèse que les gonades mâles et femelles pouvaient avoir des capacités antioxydantes différentes et dépendantes du genre des cellules germinales. Pour cela, nous avons réalisé une partie des analyses précédemment décrites sur des échantillons de gonade prélevés sur les mêmes animaux que ceux utilisés dans le premier chapitre. Si de nombreuses études traitent de l'origine et de l'impact des ROS sur les cellules germinales dans la gonade, principalement chez l'humain, dans le but d'élucider des possibles causes d'infertilité, aucun travail n'a, à notre connaissance, analysé l'impact de l'effort reproducteur, en terme de production de

cellules germinales, sur la gestion de ces ROS. Notre étude est rendue possible par le fait que la gonade de l'huître est un organe transitoire, à la différence des mammifères notamment, et que son développement suit un cycle annuel. De ce fait, la variabilité interindividuelle du % OG combinée à l'utilisation du RNAi a permis sa réalisation. Afin d'éviter un biais dû aux stades de développement des cellules germinales, seuls les individus de stade 3 (maturité) ont été utilisés pour les analyses. Les résultats mettent en évidence un rôle important de la GR dans la gonade aussi bien pour les mâles que pour les femelles. Cependant, les conditions d'expression de la GR semblent différentes en fonction du sexe. En effet, en ce qui concerne les femelles, celles dont le % OG était plus conséquent présentaient un taux de transcrits de la GR également plus important. Cela peut s'expliquer par le fait que lors de la vitellogenèse, des ARNm et des protéines sont stockés dans l'ovocyte pour permettre le développement précoce du futur embryon avant la transition maternelle-zygote (Schier, 2007). Le taux de transcrits de GR présents dans la gonade des femelles matures reflèterait l'expression de la GR surtout dans les ovocytes et moins dans les cellules somatiques gonadiques. Même si les analyses de Dheilly et al. (2012) n'ont pas identifié la GR comme différentiellement exprimée entre la gonade femelle et les ovocytes seuls, nos résultats ont confirmé une corrélation positive entre les taux de transcrits de la GR et l'OG. Chez l'huître, la GR pourrait avoir un rôle important dans le recyclage du glutathion des ovocytes, comme cela a été montré dans les ovocytes de rates (*Rattus norvegicus*). En effet, l'activité GR y serait moins coûteuse énergétiquement que la synthèse *de novo* du glutathion (Kaneko et al., 2001). De plus, il a été démontré chez d'autres animaux que le glutathion est essentiel à la maturation des ovocytes et à la formation du pronucléus mâle après la fertilisation. Il permet également la protection des ovocytes contre le stress oxydant (Yoshida et al., 1993; Rzucidlo and Brackett, 2000). Ainsi, l'accumulation de transcrits de GR dans les ovocytes permettrait d'une part, de « contrer » les ROS produits par leur propre métabolisme et d'autre part, un pool de ces transcrits serait stocké pour la protection antioxydante du futur embryon.

En ce qui concerne les gonades mâles de l'étude, ni la transcription ni l'activité de la GR ne semblent être influencées par l'effort reproducteur. En revanche, il a été observé une augmentation de l'activité enzymatique de la GR chez les mâles soumis au choc thermique qui pourrait correspondre à une activation de la réponse antioxydante. Cette augmentation de l'activité enzymatique de la GR pourrait être due aux cellules somatiques gonadiques comme aux spermatozoïdes. En effet, même si ces derniers sont transcriptionnellement inactifs (Grunewald et al., 2005), ils transportent un pool d'ARNm qu'ils sont capables de traduire dans certaines conditions, au moins chez les mammifères, pour remplacer des protéines

dégradées par exemple (Gur and Breitbart, 2006). Il a été montré que les ROS sont impliqués dans de nombreuses causes d'infertilité chez l'homme *via* la dégradation de la membrane lipidique des spermatozoïdes riche en acide gras insaturés (cibles privilégiées des ROS). De ce fait, chez l'huître, la GR pourrait être une enzyme importante dans la détoxification des ROS dans la gonade mâle afin de protéger les spermatozoïdes de dégâts oxydatifs, lors d'un choc thermique par exemple, comme nous l'avons observé dans notre étude. Ceci a été confirmé par des niveaux similaires de peroxydation lipidique entre les mâles soumis au choc thermique et ceux non soumis au choc thermique. Nos résultats mettent en évidence que le métabolisme du glutathion est un élément central dans la protection des gamètes de *C. gigas* chez les mâles comme chez les femelles. Le métabolisme du glutathion a également montré son importance dans la protection de la gonade contre le stress oxydant *via* l'activité GST chez la palourde (*Megapitaria squalida*) (Cantú-Medellín et al., 2009). Dans nos analyses, l'activité GST n'était pas suffisamment élevée pour être mesurée.

Enfin, chez les mâles comme chez les femelles, la quantité de peroxydation lipidique ne semble pas différente entre les niveaux d'investissements reproducteurs. Les résultats obtenus dans ce deuxième chapitre suggèrent que les cellules germinales, dans la gonade, disposent d'une protection antioxydante efficace en stade 3. La gonade de l'huître étant un organe composé de plusieurs types cellulaires (cellules germinales, cellules auxiliaires, cellules du tissu conjonctif, hémocytes...), il est difficile de savoir quel est le type cellulaire qui participe majoritairement à la défense antioxydante, s'il y en a un. Ceci soulève alors la question de la capacité antioxydante propre aux gamètes, donc en dehors de la gonade, notamment dans un contexte de manipulation des gamètes isolés pour la zootechnie en aquaculture (fécondation *in vitro*, par exemple).

L'effet des pratiques zootechniques d'écloserie pour la production du naissain de *C. gigas* n'a, à notre connaissance pas été décrit d'un point de vue métabolisme oxydatif des gamètes. Or, en considérant les effets délétères que peuvent avoir les ROS sur les gamètes et les embryons qui en sont issus, cela pourrait être un critère de qualité des gamètes (Castets et al., 2012). Cela pourrait notamment s'avérer d'une grande utilité pour l'optimisation de la production de naissain et notamment pour les projets de cryoconservation des gamètes afin de connaître les effets de la zootechnie sur la qualité des gamètes. Jusqu'à présent, c'est principalement le taux de larves-D, calculé après fertilisation des gamètes, qui permet d'évaluer l'impact de facteurs physiques tels que la concentration à laquelle est effectuée l'incubation des gamètes, le temps d'incubation, le volume de fertilisation, le temps de mise

en contact des gamètes, le ratio spermatozoïdes/ovocytes employé, etc. (Song et al., 2009). En revanche, comme il a été montré un impact négatif des ROS sur la capacité de fertilisation des gamètes, chez la truite par exemple (Dietrich et al., 2005), une approche intégrative *in vitro* de la capacité antioxydante des gamètes d'huître a été effectuée. L'approche intégrative a regroupé des analyses moléculaires, biochimiques et physiologiques et a été effectuée après deux heures et demie d'incubation des gamètes à deux températures différentes : 19°C et 28°C. L'utilisation de ces deux températures présente un double avantage: ce sont les mêmes températures que celles utilisées dans les deux premières études et la valeur de 19°C correspond à la température minimale requise pour l'émission des gamètes chez *C. gigas* (Mann, 1979), tandis que 28°C correspond à la température optimale de croissance de ses larves (Rico-Villa et al., 2009). Les résultats montrent une augmentation du métabolisme oxydatif *via* une augmentation de la respiration cellulaire et de la production de ROS chez les gamètes mâles et femelles après incubation à 28°C. De plus, cette augmentation de la production de ROS dans les ovocytes a été associée à des dommages oxydatifs (peroxydation lipidique). En revanche, aucune augmentation de la transcription des gènes codant les différentes SOD, CAT, GPX, GR et GST ainsi que de leur activité enzymatique associée n'a été observée à 28°C par rapport à 19°C. De ce fait, les cellules germinales isolées seraient plus sensibles au stress oxydant que dans la gonade où elles ne sont pas exposées directement au milieu extérieur potentiellement stressant. D'autre part, dans la gonade, les gamètes disposeraient d'un environnement cellulaire qui pourrait leur fournir une protection antioxydante plus efficace. Cela suggère que la capacité antioxydante de la gonade étudiée dans le deuxième chapitre proviendrait en grande partie des cellules somatiques gonadiques mais aussi des hémocytes infiltrés.

En effet, en parallèle de l'analyse effectuée sur les gamètes, l'étude du métabolisme oxydatif des hémocytes des mêmes individus a été réalisée dans les mêmes conditions. Les hémocytes sont en général considérés comme reflétant l'état physiologique des bivalves affectés par les variables environnementales comme la température (Chu, 2000; Donaghy et al., 2009; Donaghy et al., 2012). Ils sont également impliqués dans de nombreuses fonctions comme le transport et la distribution des nutriments (Cheng, 1996; Beninger et al., 2003), la réparation tissulaire (Sparks, 1988; Mount et al., 2004) et dans les processus de détoxification. Les résultats obtenus dans notre étude ne semblent pas indiquer une situation de stress oxydant à aucune des deux températures testées, corroborant ainsi ce qui a été observé dans la première partie de cette thèse dans les branchies. En revanche, un effet sexe-spécifique a pu être mis en évidence aussi bien au niveau de la composition des hémocytes qu'au niveau du

taux de transcrits des principales enzymes antioxydantes. Il avait déjà été observé une composition sexe-spécifique de l'hémolymphe chez certains mollusques bivalves (Matozzo and Marin, 2010; Dang et al., 2012) mais pas chez *C. gigas*. Dans nos travaux, l'analyse des taux de transcrits suggère que la capacité antioxydante des hémocytes provenant des femelles est plus élevée que celle des hémocytes provenant des mâles. En effet, les hémocytes provenant des femelles présentent des taux de transcrits codant la GR, la cy-SOD et la Mn-SOD plus élevés que chez les mâles. Matozzo et Marin (2010) ont observé chez la palourde (*Ruditapes philippinarum*) des activités SOD et CAT plus importantes dans les hémocytes femelles que dans les hémocytes mâles et proposent l'hypothèse que les femelles disposent d'un degré de surveillance immunitaire plus élevé que les mâles. Néanmoins, la mesure de l'activité de ces enzymes s'avèrerait nécessaire dans notre étude afin de corroborer cette hypothèse. Celle-ci pourrait contribuer à expliquer, en partie, la meilleure protection antioxydante des ovocytes dans la gonade par rapport aux cellules isolées. Les hémocytes provenant des mâles présentent, quant à eux, des transcrits codant la ec-SOD en quantité plus importante que chez les hémocytes provenant des femelles.

La ec-SOD est une SOD extracellulaire exprimée uniquement par les hémocytes. Elle constitue la protéine majeure de l'hémolymphe des huîtres. Elle porte différents noms : cg-ecSOD ou cavortin chez *Crassostrea gigas* (Gonzalez et al., 2005; Scotti et al., 2007) ou dominin chez *Crassostrea virginica* (Itoh et al., 2011) et jouerait un rôle important dans le système immunitaire des huîtres. Cependant, leur mode d'action reste discuté. Gonzalez et al. (2005) proposent que cette ec-SOD joue un rôle dans la reconnaissance et l'élimination des pathogènes ainsi que dans la détoxification des ROS *via* une activité SOD. En revanche, Scotti et al. (2007) et Itoh et al. (2011) n'ont pas retrouvé d'activité SOD associée à leur ec-SOD mais ils lui trouvent néanmoins une capacité antioxydante *via* une liaison au fer empêchant ainsi la disponibilité de ce métal dans la production de ROS par la réaction de Fenton. Dans les deux cas, la ec-SOD aurait des capacités anti-oxydantes, que celles-ci soient de nature enzymatique ou non. Les taux de transcrits codant la ec-SOD ont à chaque fois montré des expressions différentielles dans les travaux présentés dans cette thèse, que ce soit dans les branchies (expression plus importante pour les huîtres avec des investissements reproducteurs plus importants) ou dans les hémocytes (expression plus importante dans les hémocytes provenant de mâles). Or, comme son expression est spécifique des hémocytes, il est probable que les taux de transcrits relevés dans les branchies représentent en fait ceux des hémocytes infiltrés dans les branchies ou dans la gonade. La ec-SOD semble donc être une enzyme importante du système de défense de *C. gigas*. D'autre part, les résultats obtenus dans

cette troisième partie indiquent l'importance de la prise en compte du sexe de *C. gigas* pour l'analyse de paramètres hémolymphatiques. Cela devrait particulièrement être appliqué dans le cadre d'études de l'impact des modulations de l'environnement, de l'action de pathogènes ou de polluants afin de ne pas biaiser les résultats obtenus par un effet sexe. Ces observations soulignent également, pour la première fois, une expression sexe-spécifique de gènes antioxydants dans des cellules somatiques de *C. gigas*.

Pour revenir aux gamètes, le succès de fertilisation, mesuré par le taux de larves D, ne semble pas différer entre les deux températures (environ 60% de larves D), ceci malgré des dommages oxydatifs observés chez les ovocytes et une diminution de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes à 28°C. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette apparente contradiction dans les résultats. La première est que l'augmentation du métabolisme oxydatif observée à 28°C n'est pas suffisante pour induire un stress oxydant chez les spermatozoïdes. D'autre part, l'augmentation de la peroxydation lipidique dans les ovocytes pourrait être bénéfique en les rendant plus compétents à la fertilisation puisque le taux de larves D montrait une tendance à l'augmentation à 28°C. En effet, certaines études ont souligné l'importance des ROS dans la maturation et l'activation des ovocytes chez le bœuf par exemple (Blondin et al., 1997). La deuxième hypothèse est que les ovocytes ne peuvent augmenter leur quantité de protéines antioxydantes à cause d'une inhibition de la traduction des ARNm codant ces enzymes. En effet, il a été montré chez la palourde *Spisula* que des transcrits sont spécifiquement activés ou inhibés avant ou après la fertilisation des ovocytes et qu'une diminution du taux général de transcrits sous un certain seuil peut être néfaste pour le développement de l'embryon (Rosenthal et al., 1983; Guérin et al., 2001). De ce fait, l'inhibition de traduction des ARNm codant les principales enzymes antioxydantes avant la fertilisation ne servirait qu'à mieux protéger le futur embryon contre le stress oxydant. Une troisième hypothèse prend en compte le fait que les résultats ont été obtenus sur des pools de spermatozoïdes et d'ovocytes provenant d'individus différents. De ce fait l'effet pool pourrait masquer la part des résultats attribuables à un (ou des) individu(s) isolé(s). Ainsi certains résultats comme la plus grande peroxydation lipidique dans les ovocytes ou la diminution de la vitesse des spermatozoïdes ne concerneraient qu'une portion de ces pools provenant d'un ou plusieurs mêmes individus. Cette portion pourrait notamment expliquer les 40 % d'ovocytes ne s'étant pas développés en larves D. Ainsi, les mêmes analyses réalisées sur des individus isolés pourraient être envisagées afin de vérifier cette hypothèse et permettraient de sélectionner des individus produisant des gamètes ayant une plus grande résistance au stress oxydant.

2. Conclusions et perspectives

Un nombre croissant d'études est observé depuis ces dix dernières années afin d'analyser un lien potentiel entre reproduction et stress oxydant à travers la théorie du vieillissement. Il apparaît que les résultats varient sensiblement selon l'espèce modèle. Chez *C. gigas*, les études menées jusqu'à présent ont mis en évidence l'investissement reproducteur et le stress oxydant comme des facteurs pouvant participer aux mortalités estivales. Il était donc légitime de poser l'hypothèse d'un lien entre ces deux facteurs *via* un trade-off physiologique. Ces travaux de thèse ont ainsi étudié de manière isolée l'impact de la production de gamètes sur la capacité antioxydante des huîtres.

Nous avons analysé le système antioxydant ou le métabolisme oxydatif de manière assez complète. En effet, celui-ci a été étudié au niveau moléculaire, biochimique et physiologique pour les gamètes. Cependant, si les activités enzymatiques de la CAT, GR, GST et SOD ont été mesurées, celle de la GPX reste à mettre au point. De même, il serait nécessaire de développer au laboratoire le dosage spécifique des différentes formes de SOD (Mn-SOD et Cu/Zn-SOD) et de vérifier une éventuelle activité SOD pour la ec-SOD hémocytaire. D'autre part, il serait également judicieux de coupler l'analyse des activités enzymatiques à un dosage de ces enzymes par western blot. En effet, les disparités entre taux de transcrits et activités enzymatiques peuvent s'expliquer soit par une régulation traductionnelle soit par une régulation post-traductionnelle. Ces mesures complémentaires permettraient d'apporter un complément de réponse.

Lors de ces travaux de thèse nous nous sommes particulièrement focalisés sur le système antioxydant enzymatique et il apparaît que le métabolisme du glutathion ressort dans chacune de nos études (taux de transcrits codant la GR ou la GPX et activité GR). Ce métabolisme s'avère particulièrement important dans tous les tissus étudiés : branchies, gonade ainsi que pour les cellules germinales où il pourrait jouer un rôle majeur dans la protection antioxydante de *C. gigas*. L'analyse du taux de transcrits codant la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxidase (GPX4) pourrait être envisagée car elle représente la forme majeure de GPX dans les spermatozoïdes (Ursini et al., 1999). Son rôle serait double : la protection des cellules germinales mâles contre le stress oxydant durant leur maturation et en tant que protéine de structure dans le spermatozoïde mature. De ce fait, l'étude du métabolisme du glutathion en tant que marqueur de potentiel antioxydant pourrait être

complémentaire de l'identification de marqueurs de qualité des gamètes initiée par Corporeau et al. (2012) au niveau du protéome.

Le dosage des capacités antioxydantes non enzymatiques comme le glutathion pourrait également permettre une vue d'ensemble plus précise de la capacité antioxydante de *C. gigas*. Cela pourrait notamment confirmer l'importance de la voie du glutathion pour la détoxification des ROS dans cette espèce. Le glutathion est souvent étudié car la mesure de son rapport GSH/GSSG permet d'estimer l'état oxydé/réduit des cellules et tissus (Jones, 2002). De ce fait, une seule mesure permet d'apprécier l'équilibre pro-oxydant et antioxydant même si Jones (2006) précise que le rapport GSH/GSSG devrait être analysé en association avec d'autres mesures tel que le rapport Cystéine/Cystine (rapport de l'acide aminé sous sa forme réduite et oxydée). Au laboratoire, nous avons commencé à développer la mesure du rapport GSH/GSSG par spectrophotométrie selon la méthode de Rahman et al. (2006). Cependant, le dosage du glutathion sous sa forme oxydée ne s'est pas révélé pertinent puisque les résultats obtenus étaient aussi élevés que les résultats obtenus par dosage du taux de glutathion total. Ceci est probablement dû au fait que le glutathion réduit s'oxyde très vite lors des manipulations. Des mises au point seront nécessaires par la suite pour la mesure du taux GSH/GSSG, même si le taux total de glutathion pourrait être une indication du potentiel antioxydant des tissus. Il est notamment démontré que la concentration de glutathion pourrait diminuer dans certaines conditions de stress oxydant (Jonas et al., 2000).

Le dosage d'autres espèces antioxydantes pourraient, de plus, être envisagé. En effet, de nombreuses études ont montré que des extraits protéiques de *C. gigas* en tant que compléments alimentaires avaient de forts potentiels antioxydants dans les cellules de foies de rat ou même dans le plasma sanguin humain *via* notamment une augmentation du niveau de glutathion ou de l'activité GST (Gaté et al., 1998; Tapiero et al., 1998). Cela pourrait provenir de la très grande concentration en taurine présente dans ces extraits dont l'action antioxydante permet de lutter contre les stress oxydants induits par l'ischémie-reperfusion ou la contamination au plomb chez le rat (Gürer et al., 2001; Oriyanhan et al., 2005). Le dosage de la taurine mais aussi des caroténoïdes pourrait s'avérer utile chez *C. gigas* pour compléter l'étude du système antioxydant non enzymatique. En effet, Petes et al. (2008) ont mis en évidence une corrélation entre concentration en caroténoïdes dans la gonade et investissement reproducteur chez les moules (*Mytilus californianus*). Dans leur étude, les moules vivant dans les conditions les plus stressantes investissent moins en reproduction mais assimilent plus de caroténoïdes et les auteurs suggèrent que cela leur permettrait de mieux protéger leurs gamètes du stress oxydant.

Pour l'étude de « l'autre côté de la balance », les pro-oxydants, nous avons choisi de ne pas mesurer directement les ROS car ceux-ci sont des espèces extrêmement labiles avec des demi-vies allant de la micro-seconde à la nanoseconde (Pamplona and Costantini, 2011) et les techniques actuelles pour les mesurer ne sont pas toujours optimisées (manque de spécificité, contaminations possibles...) comme cela est discuté dans la revue de Dikalov et al. (2007). C'est pourquoi, nous avons choisi d'analyser les dommages causés par les ROS telle la peroxydation des lipides considérée comme la principale cause de lésions aux cellules et de mort cellulaire (Halliwell and Gutteridge, 1999). Pour cela, la mesure par spectrophotométrie du MDA (produit de peroxydation lipidique) contenu dans les échantillons a été développée au laboratoire dans le cadre de cette thèse. Avant de pouvoir valider la méthode, il était important de vérifier qu'aucun autre élément que le complexe MDA/TBA (acide thiobarbiturique) n'absorbait à la longueur d'onde requise ($\lambda=532$ nm) dans nos échantillons afin de ne pas biaiser le dosage de la peroxydation lipidique. Pour cela, ce dosage a d'abord été effectué par chromatographie liquide de haute performance (HPLC), qui permet d'isoler spécifiquement le complexe MDA/TBA par rapport à un standard des potentiels complexes contaminants. La méthode HPLC nous a permis de confirmer l'absence de ces contaminants dans nos échantillons et de valider un protocole de mesure du MDA par spectrophotométrie en routine au laboratoire. L'analyse des dommages effectués par les ROS sur l'ADN et particulièrement l'ADN mitochondrial pourrait également être appropriée étant donné que la mitochondrie est non seulement le premier site de production des ROS mais également leur première cible (Miquel, 1998). De ce fait, la « théorie du vieillissement par la mitochondrie », proposée Linnane et al. (1989), énonce que les dommages de l'ADN mitochondrial par les ROS entraînent des mutations qui compromettent la fonction et l'intégrité des mitochondries notamment par une augmentation de la production de ROS. Cette surproduction de ROS affecterait encore plus l'ADN mitochondrial initiant ainsi un cercle vicieux participant au processus de sénescence. Un moyen de mesurer les dommages à l'ADN est le dosage de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine qui est un produit de la réaction de HO \cdot avec les bases guanines (Kasai et al., 1984) et pourrait être développée au laboratoire. L'oxydation des protéines est également un marqueur du stress oxydant et la mise au point de son dosage par la mesure des carbonyles a été initiée au laboratoire (Lama et al., communication personnelle).

De plus, aux ROS peuvent également s'ajouter les espèces réactives de l'azote ou RNS (de l'anglais Reactive Nitrogen Species). Ces espèces, comme les ROS, peuvent avoir un rôle de signalisation comme l'oxyde nitrique NO \cdot qui est un neurotransmetteur synthétisé par des

oxyde nitrique synthase (NOS), un rôle de défense contre les pathogènes mais également des implications dans l'apparition du stress oxydant (Halliwell and Gutteridge, 1999; Fang, 2004). De plus, NO^\cdot peut réagir avec O_2^\cdot pour former le peroxy-nitrite ONOO^- qui diffuse rapidement à travers les membranes et qui est très réactif avec les molécules organiques, particulièrement les lipides. Sa décomposition produit le radical hydroxyle (HO^\cdot) et l'espèce radicalaire du dioxyde d'azote (NO_2^\cdot) (Marla et al., 1997; Szabo et al., 2007). Comme les ROS, ils participeraient à l'apparition ou à l'aggravation de maladies neurodégénératives ou l'athérosclérose chez les mammifères (Lipton et al., 1993; White et al., 1994). Des concentrations importantes de NO^\cdot peuvent créer une compétition entre celui-ci et la SOD pour la réaction avec O_2^\cdot et ainsi favoriser l'apparition du stress oxydant. Les RNS seraient également une bonne cible d'étude pour l'étude du stress oxydant puisqu'ils sont aussi produits par les hémocytes de *C. gigas* (Torreilles and Romestand, 2001; Lambert et al., 2007).

La quantité d'espèces antioxydantes reflète la multitude des voies impliquées dans la régulation des ROS, et de ce fait, ces voies pourraient agir en synergie ou indépendamment les unes des autres dans un contexte bien particulier (selon le type de stress, le tissu...). Ainsi, une étude plus complète des antioxydants (enzymatiques et non-enzymatiques) ainsi que des marqueurs du stress oxydant permettrait une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans la régulation des ROS et ce, en fonction de l'investissement reproducteur. Les résultats de cette thèse suggèrent aussi une capacité antioxydante tissu-spécifique de même que cellule-spécifique au sein d'un même tissu comme pour la gonade. Ainsi, il serait judicieux de mesurer l'expression d'enzymes antioxydantes dans les cellules somatiques gonadiques isolées du reste de la gonade, par microdissection laser par exemple (Franco et al., 2010), ce qui permettrait de préciser le rôle de ces cellules dans la défense antioxydante chez *C. gigas*. De plus, maintenant que le génome de *Crassostrea gigas* a été entièrement séquencé (Zhang et al., 2012), de nouvelles enzymes antioxydantes pourraient être identifiées et étudiées de manière spécifique en fonction des tissus et cellules. Pour cela, il sera utile de combiner les analyses transcriptionnelles aux analyses de protéomiques. Des approches de génomique fonctionnelle pourraient notamment être appliquées pour étudier le rôle de chacune de ces enzymes dans la défense antioxydante à différents moments du développement gonadique. Dans un premier temps, l'utilisation du RNAi pour inhiber l'expression de la GR permettrait d'étudier si l'huître est capable de compenser cette perte par la mise en place d'autres systèmes antioxydants. De même, l'inhibition par RNAi de gènes de

défense spécifiquement exprimés par les hémocytes comme la ec-SOD serait intéressante pour analyser leur rôle dans les différents tissus au cours d'un cycle de gamétogenèse chez *C. gigas* et ce de manière sexe-spécifique. Ceci permettrait de corroborer une immuno-surveillance spécifique de la gamétogenèse mâle ou femelle comme il a été suggéré dans le troisième chapitre.

Pour finir, les résultats obtenus dans cette thèse semblent indiquer que le stress oxydant n'est pas un coût de la reproduction chez *C. gigas*. Le système antioxydant enzymatique étudié serait même en faveur d'une meilleure protection au stress oxydant chez les individus avec le plus fort investissement reproducteur et ce contrairement à ce qui a été montré chez la drosophile, certains oiseaux ou certains mammifères (avec la nuance que l'investissement reproducteur n'est pas calculé de la même manière selon les modèles). Les gamètes eux-mêmes semblent également bien protégés contre le stress oxydant que ce soit dans la gonade ou *in vitro* pour les spermatozoïdes. Cette protection antioxydante efficace au moment de la reproduction, additionnée au fort potentiel reproducteur de *C. gigas*, pourrait constituer une stratégie adaptative efficace pour augmenter la dissémination de l'espèce vers de nouveaux habitats. Cependant, étant donné que les mortalités estivales de ces dernières années affectent plutôt les juvéniles, l'utilisation d'huîtres plus jeunes que celles utilisées dans la première étude (deux ans et demi) serait opportune afin d'élucider une capacité antioxydante potentiellement âge-dépendante. En effet, Ivanina et al. (2008) ont mis en évidence chez *Crassostrea virginica* une activité déclinante de la CAT avec l'âge tandis que l'activité SOD reste constante. Enfin, une étude récente sur le génome de l'huître et son transcriptome en réponse à différents stress a mis en évidence une adaptation génomique de *C. gigas* à la vie dans des environnements aux conditions stressantes. Cette étude a notamment permis l'identification de 88 gènes codant des HSP 70, mais aussi des familles de gènes codant des SOD très étendues dont six ec-SOD (Zhang et al., 2012). De ce fait, il serait intéressant d'exposer les huîtres à des stress multiples tout en ajoutant le facteur investissement reproducteur. Ces stress pourraient être l'exposition au peroxyde d'hydrogène ou à l'air, puisque l'exposition à l'air est la condition qui semble provoquer la modification transcriptomique d'un plus grand nombre de gènes chez *C. gigas* (Zhang et al., 2012) ou l'exposition à des pathogènes. Cela permettrait d'observer si la reproduction peut induire une susceptibilité au stress oxydant en cas de « multistress ».

BIBLIOGRAPHIE

- Abele, D., Großpietsch, H., Pörtner, H.O., 1998. Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental PO₂, temperature, H₂O₂ and H₂S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm *Heteromastus filiformis*. *Mar Ecol-Prog Ser* 163, 179-191.
- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J Exp Biol* 205, 1831-1841.
- Abele, D., Puntarulo, S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp Biochem Phys A* 138, 405-415.
- Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R., 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 1-21.
- Aitken, R.J., Buckingham, D., Harkiss, D., 1993. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 97, 441-450.
- Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z., Irvine, D.S., 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59, 1037-1046.
- Aladaileh, S., Nair, S.V., Raftos, D.A., 2007. Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns. *Fish Shellfish Immun* 23, 1196-1208.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecol Lett* 7, 363-368.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O., Sorci, G., 2006. An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution* 60, 1913-1924.
- Alonso-Alvarez, C., Pérez-Rodríguez, L., Garcia, J.T., Vinuela, J., Mateo, R., 2010. Age and breeding effort as sources of individual variability in oxidative stress markers in a bird species. *Physiol Biochem Zool* 83, 110-118.
- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L., Storey, B.T., 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8, 338-348.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 42, 334-346.
- Amemiya, I., 1928. On the sex-change of the Japanese common oyster, *Ostrea gigas* Thunberg. *Proc Imp Acad (Tokyo)* 5, 284-286.

- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P., 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 6858-6862.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7915-7922.
- Ananthaswamy, H.N., Pierceall, W.E., 1990. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol* 52, 1119-1136.
- Anderson, R.S., Patel, K.M., Roesijadi, G., 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev Comp Immunol* 23, 443-449.
- Angilletta, M.J., Sears, M.W., 2000. The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Funct Ecol* 14, 39-45.
- Arrhenius, S., 1915. *Quantitative Laws in Biological Chemistry*. Bell, London.
- Asada, K., 1994. Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress, In: Baker NR, Bowyer JR, eds. *Photoinhibition of photosynthesis. From molecular mechanisms to the field*. Oxford: Bios Scientific Publishers, 129-142.
- Bachère, E., Boulo, V., Godin, P., Goggin, L., Hervio, D., LeGall, G., Morvan, A., Mialhe, E., 1991. *In vitro* chemiluminescence studies of marine bivalve defence mechanisms and responses against specific pathogens. *Dev Comp Immunol* 15, S 102.
- Bachère, E., Mialhe, E., Noël, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodriguez, J., 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132, 17-32.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* 198, 149-168.
- Barille, L., Prou, J., Heral, M., Razet, D., 1997. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Exp Mar Biol Ecol* 212, 149-172.
- Béguel, J.-P., Huvet, A., Quillien, V., Lambert, C., Fabioux, C., 2013. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. *Comp Biochem Phys C* 157, 63-71.
- Beninger, P.G., Le Pennec, M., 1991. Reproductive system, in: S.E. Shumway (Ed.), *Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier Press, Amsterdam, 177-223.
- Beninger, P.G., Le Pennec, G., Le Pennec, M., 2003. Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *Biol Bull* 205, 10.

- Bergeron, P., Careau, V., Humphries, M.M., Reale, D., Speakman, J.R., Garant, D., 2011. The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. *Funct Ecol* 25, 1063–1071.
- Bernhardt, R., 1996. Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev Physiol Bioch P* 127, 137-221.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar Biotechnol* 2, 136-145.
- Berthelin, C.H., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M., Kellner, K., 2001. Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Inver Rep Dev* 40, 79-86.
- Bigot, L., 2012. Caractérisation de voies impliquées dans la régulation neuroendocrine du métabolisme énergétique et de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, Thèse de doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie.
- Bigot, L., Zatylny-Gaudin, C., Rodet, F., Bernay, B., Boudry, P., Favrel, P., 2012. Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peptides* 34, 303-310.
- Bize, I., Santander, G., Cabello, P., Driscoll, D., Sharpe, C., 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol Reprod* 44, 398-403.
- Black, H.S., 1987. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem Photobiol* 46, 213-221.
- Blondin, P., Coenen, K., Sirard, M.A., 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 18, 454-460.
- Bougrier, S., Geairon, P., Deslous-Paoli, J.M., Bacher, C., Jonquières, G., 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134, 143-154.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. 329, 147-157.
- Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., Halperin, A.J., Pontén, J., 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10124-10128.
- Buroker, N.E., 1983. Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia* 23, 271-279.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58, 79-110.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat Toxicol* 46, 67-76.

- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Techniq* 57, 469-476.
- Cantú-Medellín, N., Olguín-Monroy, N.O., Méndez-Rodríguez, L.C., Zenteno-Savín, T., 2009. Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahia de La Paz, Mexico. *Arch Environ Con Tox* 56, 60-66.
- Castets, M.D., Schaerlinger, B., Silvestre, F., Gardeur, J.N., Dieu, M., Corbier, C., Kestemont, P., Fontaine, P., 2012. Combined analysis of *Perca fluviatilis* reproductive performance and oocyte proteomic profile. *Theriogenology* 78, 432-442.e413.
- Cavaletto, M., Ghezzi, A., Burlando, B., Ceratto, N., Evangelisti, V., Viarengo, A., 2000. Effect of hydrogen peroxide on oxidative stress and metallothionein level in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Phys A* 126, Supplement 1, 24.
- Cetica, P.D., Pintos, L.N., Dalvit, G.C., Beconi, M.T., 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. *IUBMB life* 51, 57-64.
- Chambon, C., Legeay, A., Durrieu, G., Gonzalez, P., Ciret, P., Massabuau, J.C., 2007. Influence of the parasite worm *Polydora* sp. on the behaviour of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. *Mar Biol* 152, 329-338.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.
- Chanock, S.J., el Benna, J., Smith, R.M., Babior, B.M., 1994. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 269, 24519-24522.
- Chavez-Villalba, J., Cochard, J.C., LePennec, M., Barret, J., Enriquez-Diaz, M., Cáceres-Martinez, C., 2003. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *J Shellfish Res* 22, 721-731.
- Chávez-Villalba, J., Villelas-Ávila, R., Cáceres-Martínez, C., 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México. *Aquac Res* 38, 268-278.
- Chavez-Villalba, J.E., Mingant, C., Cochard, J.C., Le Pennec, M., 2001. Gamétogenèse chez l'hôte *Crassostrea gigas* de l'Aber benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis* 30, 1-12.
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture* 271, 479-487.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. Academic press, London, 23.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions, in: V.S. Kennedy, Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Ed.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant, College Park, MD, USA, 299-333.

- Cheng, W., Hsiao, I.S., Hsu, C.-H., Chen, J.-C., 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immun* 17, 235-243.
- Cherkasov, A.A., Overton, R.A., Sokolov, E.P., Sokolova, I.M., 2007. Temperature-dependent effects of cadmium and purine nucleotides on mitochondrial aconitase from a marine ectotherm, *Crassostrea virginica*: a role of temperature in oxidative stress and allosteric enzyme regulation. *J Exp Biol* 210, 46-55.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat Toxicol* 52, 189-203.
- Choi, C.Y., An, K.W., An, M.I., 2008. Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp Biochem Physiol A* 149, 330-337.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology. Immuno-Biology and Pathology*, vol. 5. Science Publishers, Enfield (NH), USA, 1-42.
- Clegg, J.S., Uhlinger, K.R., Jackson, S.A., Cherr, G.N., Rifkin, E., Friedman, C.S., 1998. Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol Mar Biol Biotech* 7, 21-30.
- Coleman, N., 1986. A review of introductions of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around the world and a discussion of the possible ecological consequences of introducing the species into Victoria, Australia. Marine Resources Management Branch, Fisheries and Wildlife Service, Department of Conservation, Forests and Lands, Queescliff, Victoria, Australia, 39.
- Collén, J., Davison, I.R., 2001. Seasonality and thermal acclimation of reactive oxygen metabolism in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). *J Phycol* 37, 474-481.
- Comps, M., 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. Fisher, W. S. (ed.) *Disease processes in marine bivalve molluscs*. American Fisheries Society Spec. Publ. 18, Bethesda, MD, 23-37.
- Conn, E.E., Vennesland, B., 1951. Glutathione reductase of wheat germ. *J Biol Chem* 192, 17-28.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., del Río, L.A., 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 6, 145-150.
- Corporeau, C., Vanderplancke, G., Boulais, M., Suquet, M., Quéré, C., Boudry, P., Huvet, A., Madec, S., 2012. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Proteomics* 75, 5554-5563.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid

- peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotox Environ Safe* 38, 122-131.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxidant Biomarkers in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, in Response to Different Contamination Profiles of Aquatic Sediments. *Ecotox Environ Safe* 45, 106-121.
- Costil, K., Royer, J., Ropert, M., Soletchnik, P., Mathieu, M., 2005. Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Helgol Mar Res* 59, 286-300.
- Dandekar, S.P., Nadkarni, G.D., Kulkarni, V.S., Punekar, S., 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J Postgrad Med* 48, 186-189.
- Dang, C., Tan, T., Moffit, D., Delamare Deboutteville, J., Barnes, A.C., 2012. Gender differences in hemocyte immune parameters of bivalves: The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* and the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immun* 33, 138-142.
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J* 272, 5635-5652.
- Davidson, J.F., Whyte, B., Bissinger, P.H., Schiestl, R.H., 1996. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5116-5121.
- de Lamirande, E., Gagnon, C., 1993. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 16, 21-25.
- de Lamirande, E., Gagnon, C., 1995. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radical Bio Med* 18, 487-495.
- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C., 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2, 48-54.
- Dean, R.T., Gieseg, S., Davies, M.J., 1993. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci* 18, 437-441.
- Dégremont, L., 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317, 94-98.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain, J.F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species--*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J Exp Biol* 206, 3053-3064.

- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Dégremont, L., Boudry, P., Samain, J.-F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J Exp Mar Biol Ecol* 353, 45-57.
- Denny, M.W., Paine, R.T., 1998. Celestial mechanics, sea-level changes, and intertidal ecology. *Biol Bull* 194, 108-115.
- Deslous-Paoli, J.M., Heral, M., Berthome, J.P., Razet, D., Garnier, J., 1981. Natural reproduction of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oleron basin in 1979 and 1981: Biochemical and energetic aspects. *Rev Trav Inst Peches Marit Nantes* 45, 319-327.
- Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Kellner, K., Dubos, M.-P., Riviere, G., Boudry, P., Favrel, P., 2012. Gametogenesis in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Microarrays-Based Analysis Identifies Sex and Stage Specific Genes. *PLoS ONE* 7, e36353.
- Dietrich, G.J., Szyrka, A., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Zakowski, L., Ciereszko, A., 2005. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 64, 1809-1822.
- Dikalov, S., Griendling, K.K., Harrison, D.G., 2007. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49, 717-727.
- Domouhtsidou, G.P., Dimitriadis, V.K., 2001. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environ Pollut* 115, 123-137.
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.-S., Soudant, P., 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture* 297, 10-24.
- Donaghy, L., Volety, A.K., 2011. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: *in vitro* impacts of temperature. *Fish Shellfish Immun* 31, 808-814.
- Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A.K., Soudant, P., 2012. Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Mitochondrial Involvement. *PLOS ONE* 7, e46594.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.-C., Babut, M., Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat Toxicol* 39, 93-110.
- Duru, N.K., Morshedi, M., Oehninger, S., 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 74, 1200-1207.

- Dykens, J.A., Shick, J.M., 1988. Relevance of purine catabolism to hypoxia and recovery in euryoxic and stenoxic marine invertebrates, particularly bivalve molluscs. *Comp Biochem Phys C* 91, 35-41.
- Eckelbarger, K.J., Davis, C.V., 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Testis and spermatogenesis. *Mar Biol* 127, 89-96.
- Eertman, R.H.M., Groenink, C.L.F.M.G., Sandee, B., Hummel, H., Smaal, A.C., 1995. Response of the blue mussel *Mytilus edulis* L. following exposure to PAHs or contaminated sediment. *Mar Environ Res* 39, 169-173.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M., 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquacult Int* 17, 491-506.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567, 1-61.
- 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 doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 219.
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Mingant, C., Le Pennec, M., 2004a. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 592-598.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A., 2004b. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 897-904.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458-470.
- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., Huvet, A., 2009. *In vivo* RNA interference in oyster-*vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS J* 276, 2566-2573.
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., Taylor, F.J., 2004. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305, 354-360.
- Fang, F.C., 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2, 820-832.
- Farcy, E., Voiseux, C., Lebel, J.-M., Fievet, B., 2007. Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *Sci Total Environ* 374, 328-341.

- Farcy, E., Voiseux, C., Lebel, J.-M., Fiévet, B., 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperon* 14, 371-380.
- Feng, S.Y., 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *Am Fish Soc Spec Publ* 18, 153-168.
- Fenton, H.J.H., 1876. On a new reaction of tartaric acid. *Chem News* 33, 190.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Flanagan, S.W., Moseley, P.L., Buettner, G.R., 1998. Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS lett* 431, 285-286.
- Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P., Huvet, A., 2008. Characterization of a gonad-specific transforming growth factor- β superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. 410, 187-196.
- Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J.-Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P., Favrel, P., Huvet, A., 2010. Microarray-Based Identification of Gonad Transcripts Differentially Expressed Between Lines of Pacific Oyster Selected to Be Resistant or Susceptible to Summer Mortality. *Mar Biotechnol* 12, 326-339.
- Fleury, E., Huvet, A., 2012. Microarray Analysis Highlights Immune Response of Pacific Oysters as a Determinant of Resistance to Summer Mortality. *Mar Biotechnol* 14, 203-217.
- Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdaire, P., Mathieu, M., 2008. Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue Cell* 40, 251-260.
- Franco, A., Jouaux, A., Mathieu, M., Sourdaire, P., Lelong, C., Kellner, K., Heude Berthelin, C., 2010. Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. *Cell Tissue Res* 340, 201-210.
- Frear, D.S., Swanson, H.R., 1970. Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazine) glutathione: partial purification and properties of glutathione-S-transferase from corn. *Phytochemistry* 9, 2123-2132.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47, 412-426.
- Fridovich, I., 1975. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44, 147-159.

- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* 9, 436-442.
- Galtsoff, P.S., 1930. The role of chemical stimulation in the spawning reactions of *Ostrea virginica* and *Ostrea gigas*. *Proc Nat Acad Sci* 16, 555-559.
- Galtsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica*, Fisheries bulletin. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 480.
- Gardiner, C.S., Reed, D.J., 1994. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 51, 1307-1314.
- Garratt, M., Vasilaki, A., Stockley, P., McArdle, F., Jackson, M., Hurst, J.L., 2010. Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 278, 1098-1106.
- Gaté, L., Schultz, M., Walsh, S., Dhalluin, S., Nguyen Ba, G., Tapiero, H., Tew, K.D., 1998. Impact of dietary supplement of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) on glutathione levels and glutathione S-transferase activity in rat tissues. *In Vivo* 12, 299-303.
- Gérard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launay, S., Heurtebise, C., Ledu, C., Phelipot, P., 1995. Controlling gametogenesis in flat and japanese oysters. Relationship between reproduction and genetics, La Reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves Cultivés en France. IFREMER, Plouzane (France), 99-112.
- Gérard, A., 1998. Avancées récentes sur la reproduction des huîtres. *Eur Aquac Soc Spec Publ* 26, 115-119.
- Géret, F., Jouan, A., Turpin, V., Bebianno, M.J., Cosson, R.P., 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat Living Resour* 15, 61-66.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn, W.O., 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119, 623-626.
- Gething, M.J., Sambrook, J., 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Gibson, G.E., Huang, H.-M., 2004. Mitochondrial enzymes and endoplasmic reticulum calcium stores as targets of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Bioenerg Biomembr* 36, 335-340.
- Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.-C., Gueguen, Y., Bachère, E., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Bioph Res Co* 338, 1089-1097.

- Gouletquer, P., 1997. Natural reproduction cycle of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*, La Reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves Cultivées en France. IFREMER, Nantes.
- Gouletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). Counc. Meet. of the Int. Counc. for the Exploration of the Sea, Cascais (Portugal), 16-19 Sep 1998.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Gricourt, L., Mathieu, M., Kellner, K., 2006. An insulin-like system involved in the control of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reproduction: hrIGF-1 effect on germinal cell proliferation and maturation associated with expression of an homologous insulin receptor-related receptor. 251, 85-98.
- Griveau, J.F., Renard, P., Le Lannou, D., 1994. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 17, 300-307.
- Griveau, J.F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J.P., Le Lannou, D., 1995. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 103, 17-26.
- Griveau, J.F., Lannou, D.L., 1997. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 20, 61-69.
- Grizel, H., 1974. Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *Compt Rend Acad Sci* 279, 783-785.
- Grizel, H., Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J Cons CIEM* 47, 399-403.
- Grizel, H., 1996. Quelques exemples d'introductions et de transferts de mollusques. *Rev Sci Tech Oie* 15, 401-408.
- Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H.J., Anderegg, U., 2005. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 37, 69-71.
- Guérin, P., Ménézo, Y., 1995. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: *de novo* synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. *Zygote* 3, 333-343.
- Guérin, P., El Moutassim, S., Ménézo, Y., 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7, 175-189.
- Guévelou, E., 2012. Étude fonctionnelle de l'AMP-activated protein kinase chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale.

- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K., 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolution* 52, 394-402.
- Gur, Y., Breitbart, H., 2006. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Gene Dev* 20, 411-416.
- Gürer, H., Özgünes, H., Saygin, E., Ercal, N., 2001. Antioxidant Effect of Taurine Against Lead-Induced Oxidative Stress. *Arch Environ Con Tox* 41, 397-402.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biol Sci* 15, 129-135.
- Guzy, R.D., Schumacker, P.T., 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 91, 807-819.
- Haber, F., Weiss, J., 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *P Roy Soc Lond A Mat* 147 332-351.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press.
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., 2003. Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biol Bull* 205, 160-169.
- Han, D., Williams, E., Cadenas, E., 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 353, 411-416.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300.
- Harman, D., 1981. The aging process. *P Natl Acad Sci USA* 78, 7124-7128.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003a. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: I. Haemocyte types and morphology. *J Exp Mar Biol Ecol* 293, 237-248.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003b. 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.
- Helmuth, B., Harley, C.D., Halpin, P.M., O'Donnell, M., Hofmann, G.E., Blanchette, C.A., 2002. Climate change and latitudinal patterns of intertidal thermal stress. *Science* 298, 1015-1017.

- Héral, M., 1989. L'ostréiculture française traditionnelle, Techniques et Documentations ed. Lavoisier, Paris.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Phys C* 133, 537-556.
- Hermes-Lima, M., 2005. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, In K. B. Storey (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, 319-368.
- Hertwig, B., Streb, P., Feierabend, J., 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol* 100, 1547-1553.
- Horton, A.A., Fairhurst, S., 1987. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* 18, 27-79.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.-F., Cunningham, C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. 343, 211-220.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P., 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 304, 95-99.
- Huvet, A., Fleury, E., Corporeau, C., Quillien, V., Daniel, J.-Y., Riviere, G., Boudry, P., Fabioux, C., 2012. *In Vivo* RNA Interference of a Gonad-Specific Transforming Growth Factor- β in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol* 14, 402-410.
- Imlay, J.A., Linn, S., 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302-1309.
- Itoh, N., Xue, Q.-G., Schey, K.L., Li, Y., Cooper, R.K., La Peyre, J.F., 2011. Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. *Comp Biochem Phys B* 158, 9-22.
- Ivanina, A.V., Sokolova, I.M., Sukhotin, A.A., 2008. Oxidative stress and expression of chaperones in aging mollusks. *Comp Biochem Phys B* 150, 53-61.
- Jo, P.G., Choi, Y.K., Choi, C.Y., 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp Biochem Phys C* 147, 460-469.
- Johnson, T.M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Lowenstein, R.A., Finkel, T., 1996. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11848-11852.

- Jonas, C.R., Puckett, A.B., Jones, D.P., Griffith, D.P., Szeszycki, E.E., Bergman, G.F., Furr, C.E., Tyre, C., Carlson, J.L., Galloway, J.R., Blumberg, J.B., Ziegler, T.R., 2000. Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. *Am J Clin Nutr* 72, 181-189.
- Jones, D.P., 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *Method Enzymol Volume* 348, 93-112.
- Jones, D.P., 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8, 1865-1879.
- Jones, R., Mann, T., Sherins, R., 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31, 531-537.
- Kaneko, T., Iuchi, Y., Kawachiya, S., Fujii, T., Saito, H., Kurachi, H., Fujii, J., 2001. Alteration of Glutathione Reductase Expression in the Female Reproductive Organs During the Estrous Cycle. 65, 1410-1416.
- Kasai, H., Tanooka, H., Nishimura, S., 1984. Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation. *Gann* 75, 1037-1039.
- Kawabe, S., Yokoyama, Y., 2012. Role of Hypoxia-Inducible Factor α in Response to Hypoxia and Heat Shock in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol* 14, 106-119.
- Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F., 1996. The Eastern oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, Maryland.
- Kirkwood, T.B., 1977. Evolution of ageing. *Nature* 270, 301-304.
- Kirkwood, T.B., Austad, S.N., 2000. Why do we age? *Nature* 408, 233-238.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol* 44, 239-267.
- Koganezawa, A., 1974. Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. Proceedings of the Third US-Japan Meeting on Aquaculture at Tokyo, Japan October 15-16, 1974, 29-34.
- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Bio Med* 26, 463-471.
- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., Morrow, J.D., Van Remmen, H., Sedivy, J.M., Yamasoba, T., Tanokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C., Prolla, T.A., 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481-484.

- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.L., 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect* 8, 2715-2724.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immun* 15, 225-240.
- Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J., Samain, J.-F., 2007. *In vitro* modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. *Aquaculture* 270, 413-421.
- Lang, R.P., Bayne, C., Camara, M., Cunningham, C., Jenny, M., Langdon, C., 2009. Transcriptome Profiling of Selectively Bred Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Families that Differ in Tolerance of Heat Shock. *Mar Biotechnol* 11, 650-668.
- Lango-Reynoso, F., 1999. Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 139.
- Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Pennec, M., Hatt, P.-J., 1999. Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest", France. *Inver Rep Dev* 36, 141-144.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Pennec, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, 183-199.
- Lapointe, S., Sullivan, R., Sirard, M.A., 1998. Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 58, 747-753.
- Larade, K., Storey, K.B., 2002. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates, in: K.B. Storey, J.M. Storey (Eds.), *Cell and Molecular Response to Stress*. Elsevier, Amsterdam, 27-46.
- Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H., Creasy, D.M., 2002. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol* 30, 524-533.
- Leclerc, C., Guerrier, P., Moreau, M., 2000. Role of dihydropyridine-sensitive calcium channels in meiosis and fertilization in the bivalve molluscs *Ruditapes philippinarum* and *Crassostrea gigas*. *Biol Cell* 92, 285-299.
- Lesser, M.P., 1997. Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs* 16, 187-192.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68, 253-278.

- Lewis, S.E., Boyle, P.M., McKinney, K.A., Young, I.S., Thompson, W., 1995. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 64, 868-870.
- Li, C., Jackson, R.M., 2002. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Ame J Physiol Cell Physiol* 282, C227-241.
- Li, K., Osada, M., Mori, K., 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Sci* 66, 502-508.
- Li, L.Y., Seddon, A.P., Meister, A., Risley, M.S., 1989. Spermatogenic cell-somatic cell interactions are required for maintenance of spermatogenic cell glutathione. *Biol Reprod* 40, 317-331.
- Lin, H., 1997. The Tao of stem cells in the germline. *Annu Rev Genet* 31, 455-491.
- Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151-1191.
- Linnane, A.W., Marzuki, S., Ozawa, T., Tanaka, M., 1989. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1, 642-645.
- Lipton, S.A., Choi, Y.-B., Pan, Z.-H., Lei, S.Z., Chen, H.-S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., Stamler, J.S., 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626-632.
- Liu, L., Trimarchi, J.R., Keefe, D.L., 2000. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 62, 1745-1753.
- Livingstone, D.R., Garcia Martinez, P., Michel, X., Narbonne, J.F., O'Hara, S., Ribera, D., Winston, G.W., 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Funct Ecol* 4, 415-424.
- Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L.D., Porte, C., Fitzpatrick, P.J., Förlin, L., Nasci, C., Fossato, V., Wootton, N., Goldfarb, P., 1995. Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy: Biochemical studies. *Mar Environ Res* 39, 235-240.
- Lubet, P., 1976. Ecophysiologie de la reproduction chez les mollusques lamellibranches. *Haliotis* 7, 49-55.
- Lubet, P., 1991. Bases biologiques de la culture des mollusques, in: G. Barnabé (Ed.), Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Lavoisier, Tec&Doc, 99-212.
- Madamanchi, N.R., Vendrov, A., Runge, M.S., 2005. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscl Throm Vas* 25, 29-38.

- Manduzio, H., Monsinjon, T., Rocher, B., Leboulenger, F., Galap, C., 2003. Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol* 64, 73-83.
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat Toxicol* 70, 83-93.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, C., Galap, F., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. 2, 91-104.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J Mar Biol Assoc UK* 59, 95-110.
- Mapson, L.W., Goddard, D.R., 1951. The reduction of glutathione by plant tissues. *Biochem J* 49, 592-601.
- Marla, S.S., Lee, J., Groves, J.T., 1997. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *P Natl Acad Sci USA* 94, 14243-14248.
- Martinez, P.G., Winston, G.W., Metashdickey, C., Ohara, S.C.M., Livingstone, D.R., 1995. Nitrofurantoin-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Genotoxicity in Digestive Gland Microsomes and Cytosol of the Common Mussel (*Mytilus edulis* L.). *Toxicol Appl Pharm* 131, 332-341.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, Masson et Cie ed, Paris.
- Matozzo, V., Marin, M., 2010. First evidence of gender-related differences in immune parameters of the clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia). *Mar Biol* 157, 1181-1189.
- Matsumoto, T., Nakamura, A., Mori, K., Kayano, T., 2003. Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zool Sci* 20, 37-42.
- Maurer, D., Comps, M., His, E., 1986. Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis* 15, 309-317.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem* 244, 6049-6055.
- McLennan, H.R., Degli Esposti, M., 2000. The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr* 32, 153-162.

- Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Toledo-Silva, G., Rodrigues, T.B., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2008. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. *Environ Toxicol Phar* 26, 362-365.
- Mehdy, M.C., 1994. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol* 105, 467-472.
- Miller, D., Ostermeier, G.C., 2006. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gyn Obstet Fertil* 34, 840-846.
- Mills, G.C., 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229, 189-197.
- Miquel, J., 1998. An Update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 33, 113-126.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7, 405-410.
- Moberg, G.P., 1991. How Behavioral Stress Disrupts the Endocrine Control of Reproduction in Domestic Animals. *J Dairy Sci* 74, 304-311.
- Moilanen, J., Hovatta, O., Lindroth, L., 1993. Vitamin E levels in seminal plasma can be elevated by oral administration of vitamin E in infertile men. *Int J Androl* 16, 165-166.
- Monaghan, B.R., Schmitt, F.O., 1932. The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linoleic acid. *J Biol Chem* 96, 387-395.
- Moore, I.T., Jessop, T.S., 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Horm Behav* 43, 39-47.
- Mopper, K., Kieber, D.J., 2000. Marine photochemistry and its impact on carbon cycling. In: deMora, S., Demers, S., Vernet, M. (Eds.), *The Effects of UV Radiation in the Marine Environment*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol* 53, 361-369.
- Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P., Snider, D., 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304, 297-300.
- Myrand, B., Guderley, H., Himmelman, J.H., 2000. Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. *Mar Ecol Prog Ser* 197.
- Naimi, A., Martinez, A.S., Specq, M.L., Mrac, A., Diss, B., Mathieu, M., Sourdain, P., 2009. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Phys A* 152, 189-196.

- Nasr-Esfahani, M.H., Aitken, J.R., Johnson, M.H., 1990. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development* 109, 501-507.
- Nilsson, J.A., 2002. Metabolic consequences of hard work. *P Roy Soc Lond B Bio* 269, 1735-1739.
- Nisbet, E.G., Sleep, N.H., 2001. The habitat and nature of early life. *Nature* 409, 1083-1091.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G., 2001. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *Sci Total Environ* 281, 237-246.
- Noda, Y., Matsumoto, H., Umaoka, Y., Tatsumi, K., Kishi, J., Mori, T., 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 28, 356-360.
- Nussey, D.H., Pemberton, J.M., Pilkington, J.G., Blount, J.D., 2009. Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Funct Ecol* 23, 809-817.
- Ogasawara, M., Nakamura, T., Koyama, I., Nemoto, M., Yoshida, T., 1994. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. *Adv Exp Med Biol* 359, 71-78.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358.
- Ołdakowski, Ł., Piotrowska, Ż., Chrzęścik, K.M., Sadowska, A.T., Koteja, P., Taylor, J.R.E., 2012. Is reproduction costly? No increase of oxidative damage in breeding bank voles. *J Exp Biol* 215, 1799-1805.
- Opara, E.C., 2006. Oxidative stress. *Dis Mon* 52, 183-198.
- Oriyanhan, W., Yamazaki, K., Miwa, S., Takaba, K., Ikeda, T., Komeda, M., 2005. Taurine prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and apoptosis in prolonged hypothermic rat heart preservation. *Heart Vessels* 20, 278-285.
- Orlenko, A.N., 1994. Giant oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia, Mytiliformes, Crassostreidae) as an acclimatizable species and stages of its transplantation to the Black Sea. *Zoologiceskij Zurna* 73, 51-54.
- Ots, I., Hõrak, P., 1996. Great tits *Parus major* trade health for reproduction. *P Roy Soc Lond B Bio* 263, 1443-1447.
- Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301, 843-863.
- Pannunzio, T.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J Exp Mar Biol Ecol* 221, 277-292.

- Patel, B., Chandy, J.P., Patel, S., 1990. Effects of mercury, selenium and glutathione on sulphhydryl levels and glutathione reductase in blood clam *Anadara granosa* (L). Indian J Mar Sci 19, 4.
- Pauley, G.B., Van Der Raay, B., Troutt, D., 1988. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) - Pacific oyster. United States Fish Wildlife Service. Biological Report 82.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington state. J Shellfish Res 1, 9-16.
- Petes, L.E., Menge, B.A., Harris, A.L., 2008. Intertidal mussels exhibit energetic trade-offs between reproduction and stress resistance. Ecol Monogr 78, 387-402.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29(9):e45.
- Philip, S.R., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Mar Pollut Bull 31, 183-192.
- Pierce, G.B., Parchment, R.E., Lewellyn, A.L., 1991. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. Differentiation 46, 181-186.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1997. A model for p53-induced apoptosis. Nature 389, 300-305.
- Porte, C., Sole, M., Albaigés, J., Livingstone, D.R., 1991. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus sp.* to organic pollution. Comp Biochem Phys C 100, 183-186.
- Pörtner, H., 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. Naturwissenschaften 88, 137-146.
- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., Alunno-Bruscia, M., 2006. Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. J Sea Res 56, 156-167.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R., 1994. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. Plant Cell 6, 65-74.
- R Development Core Team, 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rahman, I., Kode, A., Biswas, S.K., 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nat Protocols 1, 3159-3165.

- Raillard, O., Deslous-Paoli, J.M., Héral, M., Razet, D., 1993. Modelling growth and feeding of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in Marennes Oleron Bay (France). *Oceanol Acta* 16, 73-82.
- Rall, T.W., Lehninger, A.L., 1952. Glutathione reductase of animal tissues. *J Biol Chem* 194, 119-130.
- Reddy, C.C., Scholz, R.W., Thomas, C.E., Massaro, E.J., 1982. Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Sci* 31, 571-576.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat Toxicol* 31, 143-164.
- Regoli, F., Winston, G.W., 1998. Applications of a new method for measuring the total oxyradical scavenging capacity in marine invertebrates. *Mar Environ Res* 46, 439-442.
- Reznick, D., 1992. Measuring the costs of reproduction. *Trends Ecol Evol* 7, 42-45.
- Ribera, D., Narbonne, J.F., Michel, X., Livingstone, D.R., O'Hara, S., 1991. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp Biochem Phys C* 100, 177-181.
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S., Robert, R., 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 287, 395-401.
- Ringwood, A.H., Conners, D.E., Keppler, C.J., Dinovo, A.A., 1999. Biomarker studies with juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) deployed *in-situ*. *Biomarkers* 4, 400-414.
- Rodríguez-Ariza, A., Martínez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J.R., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Bárcena, J.A., Peinado, J., Pueyo, C., López-Barea, J., 1993. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci Total Environment* 134, Supplement 1, 109-116.
- Roff, D.A., 1992. The evolution of life histories: theory and analysis. Chapman and Hall, New York.
- Rose, M. R., Bradley, T. J., 1998. Evolutionary physiology of the cost of reproduction. Blackwell, Oxford, ROYAUME-UNI.
- Rosenthal, E.T., Tansey, T.R., Ruderman, J.V., 1983. Sequence-specific adenylations and deadenylations accompany changes in the translation of maternal messenger RNA after fertilization of *Spisula* oocytes. *J Mol Biol* 166, 309-327.
- Ruan, H., Heider, H., Hohfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E., Nover, L., 1997. Analysis of ribosome loading onto mRNA species: implications for translational control, in: mRNA Formation and Function. Academic Press New York.

- Rzucidlo, S.J., Brackett, B.G., 2000. Developmental patterns of zygotes from transgenic female mice with elevated tissue glutathione. *J Exp Zool* 286, 173-180.
- Salmon, A.B., Marx, D.B., Harshman, L.G., 2001. A cost of reproduction in *Drosophila melanogaster*: stress susceptibility. *Evolution* 55, 1600-1608.
- Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227-243.
- Samain, J.F., McCombie, H., 2008. Summer mortality Pacific oyster *Crassostrea gigas*: The Morest Project. Ed. Ifremer/Quae, 379.
- Schier, A.F., 2007. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 316, 406-407.
- Schmidt-Nielsen, K., 1975. Animal physiology. Adaptation and Environnement. Cambridge University Press Cambridge.
- Schreck, C.B., Contreras-Sanchez, W., Fitzpatrick, M.S., 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197, 3-24.
- Schreck, R., Baeuerle, P.A., 1991. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol* 1, 39-42.
- Scotti, P.D., Dearing, S.C., Greenwood, D.R., 2007. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zeal J Mar Fresh* 41, 91-101.
- Seino, T., Saito, H., Kaneko, T., Takahashi, T., Kawachiya, S., Kurachi, H., 2002. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 77, 1184-1190.
- Shacter, E., Beecham, E.J., Covey, J.M., Kohn, K.W., Potter, M., 1988. Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis* 9, 2297-2304.
- Sheweita, S.A., Tilmisany, A.M., Al-Sawaf, H., 2005. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 6, 495-501.
- Simonian, N.A., Coyle, J.T., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol* 36, 83-106.
- Smith, P.J., Ozaki, H., Fujio, Y., 1986. No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *New Zeal J Mar Freshwater Res* 20, 569-574.

- Solé, M., Porte, C., Albaiges, J., 1995. Seasonal-Variation in the Mixed-Function Oxygenase System and Antioxidant Enzymes of the Mussel *Mytilus Galloprovincialis*. Environ Toxicol Chem 14, 157-164.
- Sommer, A. M., Rötter, H. O., 2002. Metabolic cold adaptation in the lugworm *Arenicola marina*: Comparison of a North Sea and a White Sea population. Mar Ecol Progr Ser 240, 171-182.
- Song, Y.-P., Suquet, M., Queau, I., Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. Aquaculture 287, 311-314.
- Sparks, A.K., and Morado, J. F. , 1988. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. Am Fish Soc Spec Publ 18, 139–152.
- Spirin, A., 1996. Masked and translatable messenger ribonucleoproteins in higher eukaryotes, in: Translational Control. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Stadtman, E.R., 1992. Protein oxidation and aging. Science 257, 1220-1224.
- Stearns, S.C., 1977. The Evolution of Life History Traits: A Critique of the Theory and a Review of the Data. Annu Rev Ecol Syst 8, 145-171.
- Stearns, S.C., 1992. The Evolution of Life Histories. Oxford University Press, Oxford.
- Steele, S., Mulcahy, M.F., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. J Mar Biol Assoc UK 70, 673-686.
- Storey, B.T., 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. Mol Hum Reprod 3, 203-213.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz J Med Biol Res 29, 1715-1733.
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E., Moraga, D., 2010. Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. Mar Genomics 3, 133-143.
- Szabo, C., Ischiropoulos, H., Radi, R., 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. Nat Rev 6, 662–680.
- Takada, T., Nakajima, H., 1992. An Analysis of Life History Evolution in Terms of the Density-Dependent Lefkovich Matrix Model. Math Biosci 112, 155-176.
- Takami, M., Preston, S.L., Toyloy, V.A., Behrman, H.R., 1999. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. Am J Physiol 276, E684-688.
- Tan, K.H., Meyer, D.J., Coles, B., Ketterer, B., 1986. Thymine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes. FEBS Lett 207, 231-233.

- Tapiero, H., Gaté, L., Dhalluin, S., Nguyen Ba, G., Soupramanien, V., Kouyate, J., Tew, K.D., 1998. The antioxidant effects of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) in human volunteers. *In vivo* 12, 305-309.
- Tapley, D.W., Buettner, G.R., Shick, J.M., 1999. Free Radicals and Chemiluminescence as Products of the Spontaneous Oxidation of Sulfide in Seawater, and Their Biological Implications. *Biol Bull* 196, 52-56.
- Tarin, J.J., Ten, J., Vendrell, F.J., Cano, A., 1998. Dithiothreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability *in vitro*. *Hum Reprod* 13, 381-386.
- Tatemoto, H., Sakurai, N., Muto, N., 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 63, 805-810.
- Thénard, L.J., 1818. Academie des Sciences, Paris Traite de Chimie 1, 6th Ed.
- Thomson, J.M., 1952. The acclimatization and growth of the Pacific oyster (*Gryphaea gigas*) in Australia. *Aust J Mar Freshwater Res* 3, 64-73.
- Thomson, J.M., 1958. The naturalization of the pacific oyster in Australia. *Aust J Mar Freshwater Res* 10, 144-149.
- Torreilles, J., Guérin, M.C., Roch, P., 1996. Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. *C R Acad Sci III* 319, 209-218.
- Torreilles, J., Romestand, B., 2001. *In vitro* production of peroxynitrite by haemocytes from marine bivalves: C-ELISA determination of 3-nitrotyrosine level in plasma proteins from *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas*. *BMC Immunol* 2, 1.
- Traystman, R.J., Kirsch, J.R., Koehler, R.C., 1991. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 71, 1185-1195.
- Trevisan, R., Arl, M., Sacchet, C.L., Engel, C.S., Danielli, N.M., Mello, D.F., Brocardo, C., Maris, A.F., Dafre, A.L., 2012. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. *Aquat Toxicol* 108, 85-93.
- Turrens, J.F., 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Rep* 17, 3-8.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Ultsch, G.R., 1989. Ecology and Physiology of hibernation and overwintering among freshwater fishes, turtles and snakes. *Biol Rev* 64, 435-515.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohé, L., 1999. Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation. *Science* 285, 1393-1396.

- Valdez Ramirez, M.E., Le Pennec, M., Dorange, G., Devauchelle, N., Nonnotte, G., 1999. Assessment of female gamete quality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Inver Rep Dev 36, 73-78.
- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Accomando, R., Mancinelli, G., Orunesu, M., 1989. Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions. Mar Environ Res 28, 291-295.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M., 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam. Comp Biochem Phys C 97, 37-42.
- Von Schantz, T., Bensch, S., Grahn, M., Hasselquist, D., Wittzell, H., 1999. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. P Roy Soc Lon B Bio 266, 1-12.
- Wang, S., Peatman, E., Liu, H., Bushek, D., Ford, S.E., Kucuktas, H., Quilang, J., Li, P., Wallace, R., Wang, Y., Guo, X., Liu, Z., 2010. Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge. Fish Shellfish Immun 29, 921-929.
- Wang, X., Sharma, R.K., Gupta, A., George, V., Thomas, A.J., Falcone, T., Agarwal, A., 2003. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. Fertil Steril 80 Suppl 2, 844-850.
- Wang, Y., Salmon, A.B., Harshman, L.G., 2001. A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. Exp Gerontol 36, 1349-1359.
- Wenning, R.J., Di Giulio, R.T., Gallagher, E.P., 1988. Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. Aquat Toxicol 12, 157-170.
- White, C.R., Brock, T.A., Chang, L.Y., Crapo, J., Briscoe, P., Ku, D., Bradley, W.A., Gianturco, S.H., Gore, J., Freeman, B.A., 1994. Superoxide and peroxy nitrite in atherosclerosis. P Natl Acad Sci USA 91, 1044-1048.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J.R., Verhulst, S., 2004. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. Proc R Soc Lond B 271, 360-363.
- Williams, G.C., 1966. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. Am Nat 100, 687-690.
- Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology 67, 661-672.
- Winston, G.W., Di, G., R. T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat Toxicol 19.

- 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 Immun* 11, 557-567.
- Yakes, F.M., Van Houten, B., 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 514-519.
- Yang, H.W., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, H.S., Choi, K.W., Oh, K.S., 1998. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 13, 998-1002.
- Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M., Pursel, V.G., 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* 49, 89-94.
- Zera, A.J., Harshman, L.G., 2001. The Physiology of Life History Trade-Offs in Animals. *Annu Rev Ecol Syst* 32, 95-126.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Loso, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49-54.

Résumé / Abstract

Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse

Crassostrea gigas

Le “coût de la reproduction” est un concept qui définit qu’un investissement à la reproduction élevé a un prix qui se paye ultérieurement par une accélération de la sénescence. Cela peut notamment traduire des compromis entre la reproduction et d’autres fonctions physiologiques comme la défense antioxydante. Chez l’huître creuse *Crassostrea gigas*, la reproduction représente une fonction physiologique majeure. Dans le cadre des études effectuées pour comprendre les mortalités estivales affectant cette espèce, une corrélation négative entre effort reproducteur et survie a été observée. D’autre part, des gènes antioxydants ont été mis en évidence comme différentiellement exprimés entre les lignées d’huîtres sélectionnées pour leur résistance ou leur sensibilité aux mortalités estivales. Certaines études proposent que la susceptibilité au stress oxydant puisse représenter un coût de la reproduction participant au processus de sénescence. Dans ce contexte, nous avons analysé la capacité antioxydante des huîtres en fonction de leur investissement reproducteur. Pour cela, la technique d’ARN interférence a été utilisée pour manipuler l’effort reproducteur des huîtres. L’expression des principales enzymes antioxydantes (taux de transcrits et activités enzymatiques) et le dosage de dommages oxydatifs ont ensuite été mesurés dans différents tissus et cellules de l’organisme (branchies, gonade, hémocytes et gamètes). Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse suggèrent que la capacité antioxydante de *C. gigas* est particulièrement efficace et que la reproduction seule n’est pas suffisante pour induire un stress oxydant. Cette capacité antioxydante apparaît comme tissu-spécifique voire cellule-spécifique et le métabolisme du glutathion semble jouer un rôle majeur dans cette protection. Cette grande résistance au stress oxydant contribuerait à faire de *C. gigas* une espèce particulièrement adaptée à la vie dans des environnements stressants.

Mots clefs : *Crassostrea gigas*, investissement reproducteur, ROS, stress oxydant, capacité antioxydante, ARN interférence, manipulation phénotypique.

Study of the antioxidant capacity in link with reproduction in the Pacific oyster

Crassostrea gigas

The “cost of reproduction” is a concept defining that a high reproductive investment has a price that is paid later by an acceleration of senescence. That may translate tradeoff between reproduction and other physiological functions such as antioxidant defense. In the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, reproduction is a major physiological function. In a study led to understand the summer mortalities affecting this species, a negative correlation between reproductive effort and survival was observed. Moreover, some antioxidant genes were identified as differentially expressed between lines of oysters selected for resistance or susceptibility to summer mortalities. Some studies suggest that the susceptibility to oxidative stress may represent a cost of reproduction taking part to the process of senescence. In this context, we analyzed the antioxidant capacity of oysters according to their reproductive investment. For this, the technique of RNA interference was used to manipulate the reproductive effort of oysters. The expression of the main antioxidant enzymes (transcript levels and enzyme activities) and the dosage of oxidative damages were then measured in different tissues and cells of the organism (gills, gonad, hemocytes and gametes). The results obtained in this thesis suggest that the antioxidant capacity of *C. gigas* is particularly effective and that reproduction alone is not sufficient to induce oxidative stress. This antioxidant capacity appears to be tissue-specific even cell-specific and glutathione metabolism would to play a major role in this protection. This resistance to oxidative stress would make *C. gigas* be a species particularly adapted to life in stressful environments.

Keywords : *Crassostrea gigas*, reproductive investment, ROS, oxidative stress, antioxidant capacity, RNA interference, phenotypic manipulation.