



**HAL**  
open science

# Relations entre la structure des lipides membranaires de mitochondries et l'activité d'enzymes associées chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Tony Dudognon

► **To cite this version:**

Tony Dudognon. Relations entre la structure des lipides membranaires de mitochondries et l'activité d'enzymes associées chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Biologie animale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0036 . tel-00969121

**HAL Id: tel-00969121**

**<https://theses.hal.science/tel-00969121>**

Submitted on 2 Apr 2014

**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.

The logo of the University of Brittany Occidental (UBO) consists of the letters 'UBO' in a stylized, white, sans-serif font. The 'U' and 'B' are connected, and the 'O' is a simple circle.

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

**Tony Dudognon**

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

Relations entre la structure  
des lipides membranaires  
de mitochondries et  
l'activité d'enzymes  
associées chez l'huître  
creuse *Crassostrea gigas*

**Thèse soutenue le 31 Janvier 2013**

devant le jury composé de :

**Christopher PARRISH**

Research professor, Memorial University, Canada / *rapporteur*

**Patrice GONZALEZ**

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

**Vianney PICHEREAU**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest /  
*examineur*

**Elodie FLEURY**

Chercheur IFREMER, Station IFREMER de la Trinité-sur-Mer /  
*examineur*

**Fabrice PERNET**

Chercheur IFREMER, Centre IFREMER de Brest / *membre invité*

**Edouard KRAFFE**

Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale, Brest /  
*encadrant scientifique*

**Michel AUFFRET**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest / *directeur  
de thèse*





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

Thèse

Relations entre la structure des lipides  
membranaires de mitochondries et l'activité  
d'enzymes associées chez l'huître creuse  
*Crassostrea gigas*

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

Tony Dudognon  
31 Janvier 2013





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Christopher Parrish et Patrice Gonzalez pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi qu'à Vianney Pichereau, Fabrice Pernet et Elodie Fleury pour leur participation au jury.

Un grand merci à mon directeur de thèse, Michel Auffret, ainsi qu'à mes deux co-encadrants, Philippe Soudant et Edouard Kraffe. Merci à vous de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Bien qu'assez complexe, ce sujet a été traité sous différents aspects (écologique, biochimique) et m'a initié à diverses techniques (mesures de respiration en cellules polarographiques, analyses de lipides, activités enzymatiques), ce qui correspondait tout à fait à mes attentes et a rendu le sujet d'autant plus intéressant. Malgré les difficultés rencontrées et mon air peut-être détaché parfois (souvent ?), c'est néanmoins avec un réel plaisir que j'ai pu effectuer ce travail. Merci pour votre soutien, votre gentillesse, vos discussions toujours intéressantes qui savaient me motiver, merci pour votre patience également (il en a fallu !). Bref, merci pour tout.

Merci également aux autres lemariens, en particulier Nelly Le Goïc, Christophe Lambert et Caroline Fabioux, pour leur gentillesse, leurs conseils et leur précieuse aide lors de ma première expérimentation. Parmi ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ces travaux, un grand merci à Rossana Sussarellu ainsi qu'à Ludovic Donaghy. Chez les plus jeunes, merci à El Yogurin, aka Marc Long, et à Doriane Combot, pour leur aide plus que bienvenue. Je suis sincèrement content d'avoir fait partie d'une équipe où les qualités scientifiques allaient de pair avec une bonne humeur permanente.

Du côté d'IFREMER, je tiens à remercier la station d'Argenton, et en particulier René Robert et Christian Mingant, pour le prêt des locaux et pour s'être occupé des huîtres lors de ma première manipe. Un grand merci au Laboratoire de Physiologie des Invertébrés pour m'avoir permis d'utiliser leur matériel. En particulier, un grand merci à Catherine Segueineau pour son concernant les activités enzymatiques et à Claudie Quéré pour les analyses de lipides. Merci également à Charlotte Corporeau pour ses conseils et sa pêche, dommage que le projet de manipe en commun, faute de temps, n'ait pu aboutir. Merci aussi à Marc Suquet, pour ses échanges toujours intéressants, et pour m'avoir permis, avec Myrina Boulais, d'avoir pris part un instant à leur expérimentation qui promet de belles perspectives.

Merci au GIS Europôle Mer, dont la subvention a permis d'exposer mes travaux à l'étranger, et merci à Nadine Réniers qui a géré le projet. En parlant de pays étrangers, je suis très reconnaissant à Gary Wikfors de m'avoir accueilli pendant deux mois dans son laboratoire à Milford. Merci également à toute son équipe et aux gens adorables que j'ai rencontré là-bas. Bien que l'expérimentation prévue n'ait pas fonctionné, je garde de ce séjour d'inoubliables souvenirs. J'en profite pour remercier Franck Brulle, sans qui ce périple américain n'aurait pas eu le même charme. Merci pour m'avoir aidé à m'intégrer, à me déplacer, merci pour tous les souvenirs là-bas et merci également de m'avoir fait découvrir le Welsh et la Belgique ! Et tant qu'on est de l'autre côté de l'Atlantique, merci à Helga Guderley pour ses remarques et conseils, et pour son implication dans mes travaux de recherche.

Merci au secrétariat : Geneviève Cohat, Anne-Sophie Podeur et Marie-Line Tanguy, toujours prêtes à répondre aux questions administratives avec une bonne humeur des plus

communicatives. Merci également à Elisabeth Bondu pour ses réponses à mes questions, assez nombreuses ces derniers temps.

Au cours de ces trois ans, j'ai eu la chance de pouvoir travailler avec d'autres doctorants qui, plus que de simples collègues, ont été de véritables amis. Je pense tout d'abord au fameux, à l'unique, à l'incomparable JP. Jean-Philippe Béguel de son vrai nom, mon compagnon de bureau depuis le début de la thèse (ou presque). Toujours la forme, toujours le mot pour rire, toujours une parole réconfortante dans les moments difficiles. Poète des temps modernes, adepte des séries télé bizarres et des coupes de cheveux pas banales (désolé, je devais la faire), ta présence a vraiment été très importante pour moi, particulièrement les jours où les difficultés rencontrées ne donnaient pas forcément envie d'aller au boulot. Bon, je ne vais pas non plus te consacrer un chapitre entier de ma thèse, mais je voulais simplement te remercier d'avoir été là, et d'avoir été toi. Merci à Romain Lavaud pour avoir partagé tous ces moments riches en émotions de notre bureau B101. Merci également à toi, à Malwenn « Maloche » Lassudrie, à Fabienne Le Grand et à Marc Long (ouais, je te re-cite) pour tous ces supers souvenirs hispaniques à l'occasion de Physiomar 2012. Merci au lion (avec l'accent marseillais s'il vous plaît), Mathias Lama Lama, pour avoir partagé les soirées de manipes qui ne paraissaient jamais longues avec toi. Merci à Marco, Marcaurelio Franzetti, pour ta générosité, parce que tu es toujours prêt à aider. Merci à toi et à ta chérie Morgana Tagliarolo, qui êtes désormais abonnés à venir me secourir quand ma voiture fait des siennes. Merci à Eric Guévelou (Bichon pour les intimes et pour les autres aussi d'ailleurs) pour sa bonne humeur, son humour, mais aussi ses bons conseils lorsqu'il s'agit de parler plus sérieusement (oui, ça arrive). Merci à Cédric Le Bris pour avoir régulièrement pris des nouvelles de ma mononucléose, mais aussi pour toutes les supers soirées chez toi (mention spéciale au Jardin des Explorateurs). Merci à Sébastien Artigaud pour ses citations du Nouveau Testament, pas souvent compréhensibles mais qui apportaient une touche de sagesse dans le bureau B101 (ou pas). Merci à Mélanie Mercier pour toutes les bonnes soirées passées ensemble et encore bravo pour ton imitation incomparable du bruit du radiateur. Merci à Camille Lacroix pour ses encouragements et pour avoir été aussi la souffre-douleur de JP, on se sent moins seul à deux ! Merci à Violette Marchais, avec toi également je me sentais moins seul quand à midi je finissais de manger en dernier. Vive les mâchoires lentes ! Merci à Joonas Parikka d'avoir fait partager tout son savoir et ses découvertes fort intéressantes. Merci à Joana Sousa d'avoir supporté mes morceaux de Moonspell quand je faisais genre que je connaissais la musique portugaise. Merci aux deux autres étudiants de Doudou, Antoine Perhirin et Nicolas Martin, pour leurs discussions concernant la science ou la musique (Antoine, j'espère t'entendre très bientôt). Merci également à Adeline Bidault, Aurélie Lelong, Isabelle Calves, Edouard Lavergne, Claire Sabourin, et tous les gens avec qui j'ai partagé des instants de cette thèse et qui m'ont encouragé.

Trois ans de thèse, ce sont aussi des rencontres à l'extérieur du labo avec des gens que l'on n'est pas prêt d'oublier. Un grand merci à ma Popo, à Adèle « Krevet », à Ma et Guillaume, à Jimmy, à Val, à Aster Svart pour tous les excellents moments passés ensemble. Merci également à Kain, Zaal, JP, Thomas et Pierre pour les répètes musicales et pour tout le reste.

Enfin, un merci tout particulier à ma famille qui a toujours été derrière moi, a accepté mes choix sans me juger, m'a toujours soutenu dans tout ce que j'entreprenais et en particulier dans la réalisation de cette thèse. Je leur en suis très reconnaissant et leur dédie cette thèse.

Toutes mes excuses à ceux que j'ai oubliés. Une dernière fois, pour eux comme pour tous les autres, merci d'avoir contribué à faire de ces trois ans un réel plaisir.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	9
<b>I. BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DE L’HUITRE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i></b> .....	11
I.1 - Origine et intérêt du modèle .....	11
I.2 - Reproduction et cycle de vie .....	11
I.3 - Anatomie .....	12
I.4 - Nutrition.....	13
I.5 - Système immunitaire .....	14
<i>I.5.1 - Présentation</i> .....	14
<i>I.5.2 - Production des ERO : généralités, production mitochondriale et cellulaire</i> ....	15
<b>II. LA MITOCHONDRIE ET SON ROLE AU SEIN DE LA CELLULE</b> .....	17
II.1 - Caractéristiques .....	17
II.2 - Structure et organisation.....	17
II.3 - La respiration cellulaire.....	18
<i>II.3.1 - Le cycle de Krebs</i> .....	19
<i>II.3.2 - La chaîne de transfert des électrons</i> .....	20
<i>II.3.3 - La production d’ATP</i> .....	22
<b>III. STRUCTURE ET FONCTIONS DES LIPIDES</b> .....	24
III.1 - Définition .....	24
III.2 - Distinction entre lipides neutres et lipides polaires .....	24
<i>III.2.1 - Lipides neutres</i> .....	24
<i>III.2.2 - Lipides polaires</i> .....	25
III.3 - Les acides gras .....	26
<i>III.3.1 - Structure</i> .....	26
<i>III.3.2 - Biosynthèse</i> .....	27
<i>III.3.3 - Biosynthèse des acides gras NMI chez les bivalves</i> .....	29
III.4 - Les phospholipides.....	30
<i>III.4.1 - Structure et principales classes</i> .....	30
<i>III.4.2 - Composition dans les membranes</i> .....	31
<i>III.4.3 - Biosynthèse des glycérophospholipides</i> .....	33
<b>IV. STRUCTURE DES MEMBRANES ET ACTIVITES ENZYMATIQUES</b> .....	35
IV.1 - Structure des membranes cellulaires .....	35
IV.2 - Rôle structurale des phospholipides et conformations protéiques.....	36
IV.3 - Relation entre composition en lipides et activités enzymatiques .....	37
<i>IV.3.1 - Principe</i> .....	37
<i>IV.3.2 - Effets de la nutrition : adaptations à l’échelle cellulaire</i> .....	38
<i>IV.3.3 - Effets de la nutrition : adaptations à l’échelle subcellulaire</i> .....	39



<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	41
<b>I. MATERIEL BIOLOGIQUE</b> .....	43
<b>II. CONDITIONNEMENT DES HUITRES</b> .....	43
II.1 - Effets de différents régimes alimentaires et comparaison entre le conditionnement en milieu naturel et en éclosérie.....	43
II.2 - Comparaison des effets de l'émersion et de l'immersion.....	44
<b>III. ANALYSE DES PARAMETRES HEMOCYTAIRES</b> .....	45
III.1 - Prélèvement d'hémolymphe.....	45
III.2 - Mesure des variables hématocytaires en cytométrie en flux.....	45
III.2.1 - Variables descriptives.....	45
III.2.2 - Variables fonctionnelles.....	46
III.2.2.1 - Activité oxydante.....	46
III.2.2.2 - Production mitochondriale d'anions superoxydes.....	46
III.2.2.3 - Potentiel membranaire mitochondrial.....	47
<b>IV. ACTIVITE REPRODUCTRICE</b> .....	47
IV.1 - Prélèvement des tissus et inclusion en paraffine.....	47
IV.2 - Coloration des coupes et montage.....	48
IV.3 - Analyse qualitative du stade de la gamétogenèse.....	48
IV.4 - Analyse quantitative de l'aire d'occupation de la gonade.....	49
<b>V. PARAMETRES FONCTIONNELS MITOCHONDRIAUX</b> .....	49
V.1 - Isolement des mitochondries.....	50
V.2 - Mesure de la consommation d'oxygène.....	50
V.3 - Flux maximal à travers les complexes I à IV, II à IV, et à travers le complexe IV.....	52
<b>VI. CONCENTRATIONS EN CYTOCHROMES ET EN PROTEINES</b> .....	55
VI.1 - Mesure de la concentration des cytochromes.....	55
VI.2 - Mesure de la concentration en protéines.....	55
<b>VII. PRODUCTION D'ATP</b> .....	55
VII.1 - Mises au point.....	55
VII.1.1 - Vérification des blancs de mesure.....	56
VII.1.2 - Recherche d'une consommation d'ATP.....	56
VII.1.3 - Essais de mesures après inhibition de la réaction.....	57
VII.1.4 - Mise au point d'une mesure en cinétique.....	57
VII.1.5 - Inhibition de la production d'ATP.....	57
VII.2 - Protocole.....	58
<b>VIII. ACTIVITES ENZYMATIQUES</b> .....	59
VIII.1 - Cytochrome <i>c</i> oxydase (CCO).....	59
VIII.2 - Citrate synthase (CS).....	60
<b>IX. ANALYSES LIPIDIQUES</b> .....	61
IX.1 - Extraction des lipides.....	61
IX.2 - Séparation des lipides sur microcolonnes.....	61
IX.3 - Analyses d'acides gras.....	61
IX.4 - Séparation des classes de lipides membranaires.....	62
<b>X. ANALYSES STATISTIQUES</b> .....	62

<b>CHAPITRE I : ACTIVITE MITOCHONDRIALE, PARAMETRES HEMOCYTAIRES ET MODULATION DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE EN REPONSE A DIFFERENTS REGIMES ALIMENTAIRES CHEZ <i>CRASSOSTREA GIGAS</i></b> .....	65
<b>INTRODUCTION</b> .....	67
<b>PREMIER ARTICLE</b> .....	71
<b>CONCLUSION</b> .....	101
<b>CHAPITRE II: DIFFERENCES D'ACTIVITE MITOCHONDRIALE ENTRE DES SPECIMENS DE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> ELEVES SUR LE TERRAIN OU EN ECLOSERIE</b> .....	105
<b>INTRODUCTION</b> .....	107
<b>DEUXIEME ARTICLE</b> .....	111
<b>CONCLUSION</b> .....	133
<b>CHAPITRE III : CAPACITES FONCTIONNELLES DES MITOCHONDRIES DE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> PENDANT UN CYCLE TIDAL D'EMERSION ET D'IMMERSION</b> .....	137
<b>INTRODUCTION</b> .....	139
<b>TROISIEME ARTICLE</b> .....	143
<b>CONCLUSION</b> .....	165
<b>DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	167
<b>DISCUSSION</b> .....	169
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	177
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	183
<b>ANNEXE</b> .....	205



## Liste des abréviations

$\Delta\psi_m$  : potentiel membranaire mitochondrial  
AASH : anti-aggregant solution for hemocytes  
ACC : acetyl-CoA carboxylase  
acétyl-CoA : acétyl-coenzyme A  
ACP : acyl carrier proteins  
ADP : adenosine diphosphate  
AG : acides gras  
AGPI : acides gras poly-insaturés  
AK : adénylate kinase  
ANT : adenine nucleotide translocase  
ATP : adenosine triphosphate  
ARA : arachidonic acid (acide arachidonique)  
BHT : butylated hydroxytoluene (hydroxytoluène butylé)  
BSA : bovine serum albumin (sérum d'albumine bovine)  
CAEP : ceramide aminoethylphosphonate  
CAT : carboxyatractyloside  
CL : cardiolipin (cardiolipide)  
CS : citrate synthase  
CCO : cytochrome *c* oxidase  
cyt *c* : cytochrome *c*  
DCFH-DA : 2,7-dichlorofluorescein diacetate  
DHA : docosahexaenoic acid (acide docosahexaénoïque)  
DMSO : dimethyl sulfoxide  
EPA : eicosapentaenoic acid (acide eicosapentaénoïque)  
ETC : electron transfert chain  
ERN : espèces réactives de l'azote  
ERO : espèces réactives de l'oxygène  
FA : fatty acid  
FAD : flavine adénine dinucleotide  
FAME : fatty acid methyl ester  
FAS : fatty acid synthetase

FCM : flow cytometer  
FSC : forward scatter  
FSSW : filtered sterile seawater  
 $H^+$  : proton  
HPTLC : high-performance thin-layer chromatography  
MUFA : monounsaturated fatty acid  
NAD : nicotinamide adenine dinucleotide  
NMI : non-methylene interrupted  
NMID : non-methylene interrupted dienoic  
PC : phosphatidylcholine  
PE : phosphatidylethanolamine  
PI : phosphatidylinositol  
 $P_i$  : phosphate inorganique  
PS : phosphatidylserine  
PUFA : polyunsaturated fatty acid  
Q : ubiquinone  
QH $\cdot$  : ubisemiquinone  
QH $_2$  : ubiquinol  
RCR : respiratory control ratio (ratio du contrôle respiratoire)  
RNS : reactive nitrogen species  
ROS : reactive oxygen species  
S.E. : standard error  
SFA : saturated fatty acid  
SOD : superoxyde dismutase  
SSC : side scatter  
TMPD : *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylene-diamine  
UCP : uncoupling protein (protéine découplante)

# **INTRODUCTION**



Les bivalves sont des mollusques dont le corps mou est protégé par une coquille constituée de deux parties distinctes attachées l'une à l'autre (les valves). Bien qu'également présents dans les eaux douces, la majorité des bivalves sont des espèces marines et subissent des conditions environnementales particulières. Par exemple, l'huître creuse *Crassostrea gigas* est une espèce sessile : à l'état adulte, elle reste définitivement fixée sur le substrat et subit donc directement les variations biotiques et abiotiques de son environnement. Ces variations peuvent être importantes dans le cas de *C. gigas*. En effet, cette espèce vit au niveau de l'estran, la partie du littoral située entre les limites des plus hautes et des plus basses marées, et se retrouve donc alternativement en immersion et en émergence. Ces deux conditions sont entre autres associées à de fortes différences de températures, de ressources en nourritures et de disponibilité en oxygène. En plus de ces variations à l'échelle d'un cycle de marée, les bivalves peuvent subir des événements saisonniers (comme la reproduction, qui constitue une période nécessitant un important investissement énergétique) ou plus ponctuels (variations de températures, conditions d'hypoxie ou au contraire d'hyperoxie). Les animaux subissant ces variations doivent donc développer certaines adaptations afin de préserver leur intégrité physiologique.

La cellule est considérée comme étant l'unité structurelle et fonctionnelle de tout être vivant. Elle est délimitée par une membrane et contient un cytoplasme dans lequel baignent des organites, structures spécialisées assurant des fonctions cellulaires variées. Ces organites sont également séparés du milieu extérieur par une (ou deux dans certains cas) membrane(s), dont l'organisation est similaire à celle de la membrane plasmique. Les membranes biologiques sont constituées de lipides, dont les propriétés permettent une organisation en bicouche. Cette bicouche constitue une barrière relativement imperméable de façon à isoler le compartiment interne du milieu environnant. Les échanges avec le milieu extérieur peuvent s'effectuer grâce à des protéines traversant intégralement la membrane, organisées en canaux et assurant le transfert sélectif de composés de part et d'autre de la membrane. Ces protéines ne sont toutefois pas les seules à être intégrées aux membranes. D'autres protéines, transmembranaires ou périphériques, sont également associées aux lipides membranaires et remplissent des fonctions variées. Plus qu'un simple filtre, les membranes biologiques constituent donc le lieu d'organisation de nombreux systèmes fonctionnels importants (Fyfe et al. 2001), dont la nature peut dépendre du type cellulaire ou de l'organite considéré. Les mitochondries sont des organites responsables de la production de l'énergie nécessaire à la cellule sous forme de molécules d'adénosine triphosphate (ATP). Les mitochondries sont



entourées de deux membranes bien distinctes. La membrane interne constitue l'une des membranes biologiques les plus riches en protéines puisque ces dernières représentent de 60 à 70% du poids total de la membrane. La plupart de ces protéines sont des composants des complexes de la chaîne respiratoire ou de la  $F_0F_1$ ATP-synthase, impliqués dans la production d'ATP (Becker et al. 2009). La membrane interne des mitochondries constitue donc le siège d'une importante activité enzymatique.

Les premières conceptions des membranes cellulaires présentaient les lipides comme n'ayant qu'un rôle de barrière physique inerte, sans aucun rôle biologique précis. La comparaison évoquée par la théorie de la mosaïque fluide, émise par Singer and Nicolson (1972), est celle d'une mer de lipides dans laquelle flotte des icebergs protéiques. Cette image fait référence à la relative mobilité des différents constituants membranaires mais ne prend pas en compte leurs interactions, en particulier l'influence de la nature des lipides sur la fonctionnalité des protéines. Plus tard, Hulbert and Else (1999) ont amélioré cette représentation dans leur théorie du pacemaker. Celle-ci soutient que l'insaturation globale des acides gras (la partie hydrophobe des lipides membranaires) influence l'activité des enzymes et détermine donc la vitesse des processus membranaires. En particulier, les phospholipides riches en acides gras poly-insaturés oméga 3 entraînerait une activité moléculaire importante des protéines membranaires associées.

Toutefois, les activités enzymatiques ne sont pas uniquement sensibles aux caractéristiques globales de la membrane telles que son degré d'insaturation. Les phospholipides sont représentés par plusieurs classes. De part la nature de leurs chaînes d'acides gras, mais également de leur tête polaire, ceux-ci peuvent former un microenvironnement autour des protéines membranaires, nécessaire à leur activité optimale (Spector and Yorek 1985 ; Tillman and Cascio 2003 ; Holmes et al. 2012). La phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC) constituent les deux phospholipides les plus abondants dans les membranes. L'importance du ratio PC/PE dans la régulation des propriétés physiques et physiologiques des biomembranes a été mise en évidence (Hazel 1995). Des modifications de ce ratio en réponse à une adaptation à la température peuvent par exemple permettre de maintenir la dynamique membranaire et l'activité mitochondriale (Senault et al. 1990). Les processus mitochondriaux peuvent également être régulés par un phospholipide particulier, le cardiolipide (CL). Le CL est spécifiquement localisé au sein de la membrane interne des mitochondries, où sa présence est nécessaire pour la fonctionnalité de plusieurs enzymes de la chaîne respiratoire et de la

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATP-synthase (Eble et al. 1990 ; Robinson 1993 ; Schlame et al. 2000 ; Haines and Dencher 2002 ; Zhou et al. 2011 ; Böttinger et al. 2012).

L'adaptation aux variations environnementales peut impliquer des modifications dans la composition lipidique des membranes afin de préserver la fonctionnalité des enzymes membranaires. Chez les ectothermes, dont la température corporelle est la même que celle du milieu extérieur, une telle relation a été décrite dans les membranes de mitochondries lors des processus d'adaptation à la température (Dahlhoff and Somero 1993 ; Guderley 2004 ; Kraffe et al. 2007 ; Grim et al. 2010). Dans ces études, une augmentation de la proportion d'acides gras poly-insaturés (AGPI) en réponse au froid a été mise en évidence. Chez les ectothermes, la température du milieu extérieur influence en effet la structure des membranes. Les températures élevées diminuent la viscosité des membranes et les rendre ainsi plus fluide, tandis que de basses températures induisent au contraire une forte viscosité des membranes. De telles modifications de la viscosité peuvent altérer la fonctionnalité des enzymes membranaires. L'adaptation homéovisqueuse propose que l'adaptation des animaux ectothermes à la température est en partie due aux lipides membranaires, ceux-ci présentant davantage d'insaturations à de faibles températures afin de stabiliser la structure des lipides et ainsi les fonctions cellulaires qui en dépendent (Hazel 1995). L'adaptation à la température peut également impliquer une modification des proportions de phospholipides. Avec sa forme cylindrique, la PC stabilise la structure des membranes, tandis que la forme conique de la PE la déstabilise. Afin de réduire la viscosité membranaire, une augmentation de la proportion de lipides déstabilisant la structure des membranes (et donc une diminution du ratio PC/PE) est observée en réponse à une diminution de la température (Chapelle et al. 1977 ; Wodtke 1981 ; Hazel and Landrey 1988 ; Logue et al. 2000). Chez les bivalves, l'adaptation aux cycles des marées (Williams and Somero 1996), à la température (Pernet et al. 2007a ; Pernet et al. 2007b ; Pernet et al. 2008) ou à la salinité (Glémet and Ballantyne 1995 ; Fokina et al. 2007), passe également par un remodelage des membranes, mais peu d'études ont toutefois lié cette modification de composition lipidique à l'activité des enzymes qui y sont enchassées. A cause des importants changements environnementaux auxquels ils sont exposés, les bivalves constituent donc des modèles intéressants pour les études des relations entre la structure des membranes cellulaires, directement corrélée à leur composition lipidique, et des activités d'enzymes associées.

Un certain nombre d'études menées à Brest se sont intéressées à l'influence de la nutrition sur la composition lipidique des membranes chez les bivalves (Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1996a ; Soudant et al. 1996b ; Soudant et al. 1996c ; Delaporte et al. 2003 ; Delaporte et al. 2005 ; Delaporte et al. 2006 ; Delaporte et al. 2007 ; González-Araya et al. 2011), mais peu ont mis en relation cette observation avec une modification d'activité cellulaire et/ou subcellulaire. Seules les expériences de nutrition réalisées au laboratoire par Delaporte et al. (2003 ; 2006 ; 2007) ont corréler des relations entre la structure membranaire et les fonctions des cellules immunitaires, les hémocytes, chez *C. gigas*. Cependant, le niveau subcellulaire n'a pas été étudié dans ces travaux.

La mitochondrie est un organite de grand intérêt pour ce genre d'études. Elle détient en effet un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire puisqu'elle constitue la principale source de production de l'énergie nécessaire à l'organisme. Sa membrane interne présente une forte densité en protéines, dont la majorité est représentée par les enzymes impliquées dans la production d'énergie (Becker et al. 2009). La spécificité en lipides y est importante car le cardiolipide est particulièrement associé à ces enzymes (Eble et al. 1990 ; Robinson 1993 ; Schlame et al. 2000 ; Haines and Dencher 2002 ; Zhou et al. 2011 ; Böttinger et al. 2012). Des mécanismes adaptatifs passant par un remodelage de la composition lipidique associé à des changements d'activités enzymatiques ont été mis en évidence chez les poissons en réponse au froid (Guderley 2004 ; Kraffe et al. 2007 ; Grim et al. 2010). L'effet de l'alimentation sur les mitochondries a aussi été étudié chez les poissons, mais seuls de mineurs changements s'opèrent au niveau des fonctions mitochondriales malgré d'importantes modifications de composition en lipides membranaires (Guderley et al. 2008 ; Martin et al. 2012). Chez les mammifères, les résultats sont contradictoires, certaines études montrant une modification des activités enzymatiques mitochondriales en réponse à un changement de composition de lipides membranaires induit par l'alimentation (Divakaran and Venkataraman 1977 ; Yamaoka et al. 1988), alors que d'autres n'observent pas cette relation (Astorg and Chevalier 1991 ; Larqué et al. 2003 ; Lemieux et al. 2008).

La thèse présentée ici a pour objectif d'apporter quelques éléments pour une meilleure compréhension des relations entre la structure lipidique des membranes cellulaires et leurs fonctions chez l'huître. Pour ce faire, la composition lipidique des membranes de *C. gigas* a été modifiée lors d'une expérience de nutrition semblable à celle réalisée par Delaporte et al. (2003). La composition lipidique des membranes de branchies a été déterminée au niveau

cellulaire (cellules entières de branchies) et au niveau subcellulaire (mitochondries des cellules branchiales). Le choix des branchies s'explique par le rôle de ses dernières dans la nutrition. De plus, de part ses fonctions, cet organe est directement en interaction avec le milieu environnemental et est donc plus susceptible d'être affecté par des modifications s'y produisant. Afin de comparer les effets des changements structuraux aux niveaux cellulaire et subcellulaire, l'étude de paramètres fonctionnels mitochondriaux a été mis en parallèle de l'étude de fonctions hémocytaires.

Cette thèse s'articule autour de trois études tentant d'établir les liens entre structure (composition lipidique) et fonction (activités cellulaires et enzymatiques) dans les membranes de *C. gigas* :

- Une comparaison entre trois lots d'huîtres nourries en éclosion pendant quatre semaines, chacun ayant reçu un régime alimentaire différent.
  
- Une comparaison entre un lot d'huîtres nourries pendant quatre semaines en éclosion avec un régime « équilibré » en acides gras, et un lot d'huîtres laissé dans le milieu naturel pendant la même période de temps.
  
- Une expérimentation visant à expliquer les résultats de la deuxième étude, où des huîtres situées au niveau d'une même zone de l'estran sont analysées à la fin d'une période d'immersion ou à la fin d'une période d'émersion.



# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**



## **I. Biologie et physiologie de l'huître *Crassostrea gigas***

### **I.1 - Origine et intérêt du modèle**

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), aussi appelée huître creuse du Pacifique ou huître japonaise, est un mollusque bivalve originaire d'Asie. Comme toutes les huîtres du genre *Crassostrea*, *C. gigas* vit au niveau de l'estran, c'est-à-dire sur la partie du littoral qui découvre à chaque marée, contrairement aux genres *Pycnodonta* et *Ostrea* qui rassemblent des espèces ne vivant que dans des zones toujours immergées. Elle a été introduite massivement dans les fermes ostréicoles françaises afin d'y remplacer l'huître portugaise (*Crassostrea angulata*), dont l'espèce fut décimée par une maladie virale au début des années 70. La provenance de *C. gigas*, dont l'importation s'est effectuée de 1971 à 1975, était du Canada pour les géniteurs et du Japon pour le naissain (Grizel and Heral 1991). L'espèce est cultivée dans de nombreux pays du monde et constitue un des bivalves les plus économiquement importants (production mondiale de 4,6 millions de tonnes en 2006, représentant une valeur de 3,07 milliards de dollars (FAO 2008)). De par sa prolifération, *C. gigas* est maintenant considérée comme une espèce invasive. Ce potentiel invasif a pour origine une plasticité phénotypique ainsi qu'une grande capacité d'adaptation (Meistertzheim 2008). C'est cette capacité d'adaptation qui fait de l'huître un organisme modèle intéressant pour les études de réponses physiologiques aux stress environnementaux, et notamment des études de relations entre modifications structurelles – comme celles observées au sein des membranes biologiques lors d'une modification en composition lipidique – et fonctionnalité cellulaire.

### **I.2 - Reproduction et cycle de vie**

*Crassostrea gigas* est une espèce hermaphrodite protandre de type irrégulier alternatif, ce qui signifie qu'elle a généralement des tissus mâles fonctionnels durant la première année de reproduction, avant que ceux-ci ne cessent leur activité et soient remplacés par des tissus femelles fonctionnelles. Elle change ainsi de sexe entre chaque saison de reproduction, pendant la phase de repos sexuel, mais de façon irrégulière (Lango-Reynoso et al. 1999). La gamétogenèse et la ponte se produisent en été et dépendent de la température de l'eau, en principe lorsque celle-ci est supérieure à un seuil d'environ 18 – 20°C (Mann 1979). Pendant cette période, la demande énergétique est à son maximum (Delaporte 2005). Après émission

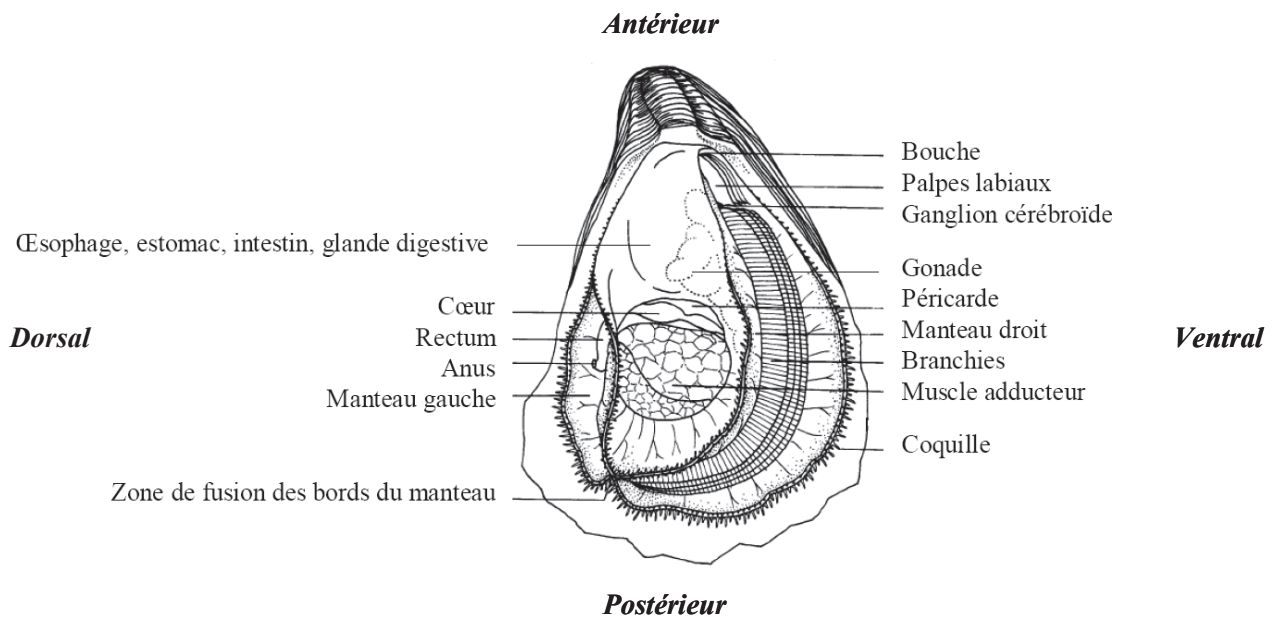


des gamètes et libération de celles-ci directement dans le milieu, la fécondation, externe, donne naissance à des larves planctoniques dérivant avec la masse d'eau pendant environ trois semaines. A cause de la présence d'un velum, une sorte de voile cilié déployable hors de la coquille pour capturer sa nourriture, cette larve est appelée véligère. Par la suite, la larve pédivéligère se caractérise par l'apparition d'un pied, permettant sa fixation à un substrat dur et mettant ainsi fin à sa vie pélagique. La métamorphose s'achève par la résorption du velum et du pied, et par la sécrétion d'une coquille définitive. Ce stade plantigrade correspond à des huîtres de 3 cm environ également appelées naissain. Les huîtres adultes quant à elles mesurent à peu près 8 cm (Auby and Maurer 2004 ; Lejart 2009).

### **I.3 - Anatomie**

Comme tous les bivalves, l'huître est composée de deux valves formant une coquille, qui enferme un corps mou. Les deux valves, asymétriques, sont jointes par un ligament charnière et sont maintenues par le muscle adducteur postérieur. Ce muscle sert à l'ouverture et à la fermeture de la coquille, et est composé de 2 parties : un muscle strié permettant une fermeture rapide des valves, et un muscle lisse maintenant la fermeture de celles-ci. Le corps de l'animal est enveloppé dans le manteau qui délimite la cavité palléale, assure la croissance et le développement de la coquille, et contribue à la fabrication de la nacre qui en recouvre l'intérieur (Figure 1). Le système digestif est composé de la bouche, l'oesophage, l'estomac, la glande digestive, l'intestin, le rectum et l'anus. La gonade de l'huître n'est pas un organe permanent. Elle se développe autour de la glande digestive à chaque cycle de reproduction lors de la gamétogenèse active au printemps, et peut atteindre à maturité de 65 à 70% de la masse viscérale totale (Enríquez-Díaz et al. 2009). La gonade régresse ensuite après l'émission estivale des gamètes. Le coeur, situé entre la masse viscérale et le muscle, est simple et est composé d'un ventricule et de deux oreillettes. Le ventricule propulse l'hémolymphe, le fluide incolore circulant, dans les vaisseaux mais celui-ci peut également s'insinuer librement au sein de tous les tissus. Le système circulatoire de l'huître est ainsi qualifié de semi-ouvert. Le système nerveux est réduit à quelques ganglions difficilement observables. Les branchies comprennent quatre feuillets de forme lamellaire constitués de filaments ciliés, et s'étendent le long du manteau sur la partie dorsale. Elles assurent une double fonction de respiration et de nutrition. Les filaments ciliés assurent en effet une circulation de l'eau qui permet ainsi un apport en oxygène, transporté sous forme dissoute

dans l'hémolymphe, des branchies vers les organes. Ces filaments permettent aussi l'acheminement des particules alimentaires des branchies vers la bouche.



**Figure 1** : Anatomie générale d'une huître dans sa valve gauche (exemple de *C. virginica*). Les axes orientaux de l'animal sont indiqués en caractère gras et en italique. Adapté par Naimi (2009), d'après Galtsoff (1964).

## I.4 - Nutrition

Les huîtres sont des organismes filtreurs, microphages et suspensivores, ce qui signifie qu'elles se nourrissent de petites particules en suspension dans la colonne d'eau (organismes planctoniques et principalement algues phytoplanctoniques). La filtration de 25 à 150 litres d'eau par jour assure la capture des particules alimentaires par les branchies (Acosta 2010). Ces dernières sécrètent également un mucus permettant de piéger les particules alimentaires. Les particules de trop grande taille ou de trop faible valeur nutritive, comme les détritiques, sont englobées de mucus et rejetées sous la forme de pseudo-fécès, expulsées hors de l'organisme avant même d'avoir été digérées. Les branchies participent ainsi à l'élimination de certains déchets. Les autres particules sont ensuite dirigées vers les palpes labiaux. Ceux-ci participent au tri et au guidage des particules nutritives vers le tractus digestif. Les particules pénètrent dans celui-ci par la bouche, située entre les palpes labiaux, à laquelle fait suite un court oesophage. Elles atteignent ensuite l'estomac où commence la digestion grâce à l'action du stylet cristallin, animé de mouvements de rotation et libérant des enzymes digestives. Les

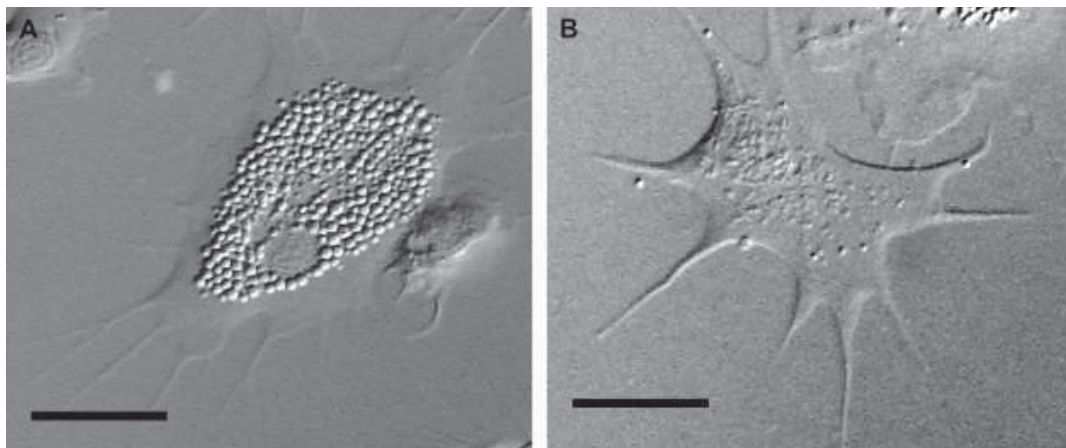
éléments non assimilables sont directement évacués via l'intestin et le rectum, puis débouchent sur l'anus d'où ils sont expulsés.

## I.5 - Système immunitaire

### I.5.1 - Présentation

Contrairement aux vertébrés chez qui il existe deux types de réponse immunitaire (la réponse immunitaire innée, non spécifique, et la réponse immunitaire acquise, spécifique), le système immunitaire des invertébrés repose principalement sur la réponse immunitaire innée. Chez les bivalves, ce système de défense est assuré essentiellement par des cellules appelées hémocytes (immunité cellulaire) et des molécules véhiculées par l'hémolymphe et les fluides extra-palléaux, tels que les peptides anti-microbiens (immunité humorale) (Chu 1988 ; Allam and Paillard 1998 ; Bachère et al. 2004 ; Schmitt et al. 2012a).

Chez l'huître, on considère en principe deux grands types d'hémocytes : les granulocytes et 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 2).



**Figure 2 :** Granulocyte (A) et hyalinocyte (B) de l'huître *Saccostrea glomerata* observés en microscopie à contraste d'interférence différentielle (DIC). La barre correspond à une taille de 10  $\mu\text{m}$ . Extrait de Aladaileh et al. (2007).

Les hémocytes jouent un rôle dans de multiples fonctions. Ils sont par exemple impliqués dans la réparation tissulaire et coquillière, le transport et la digestion des nutriments, ou

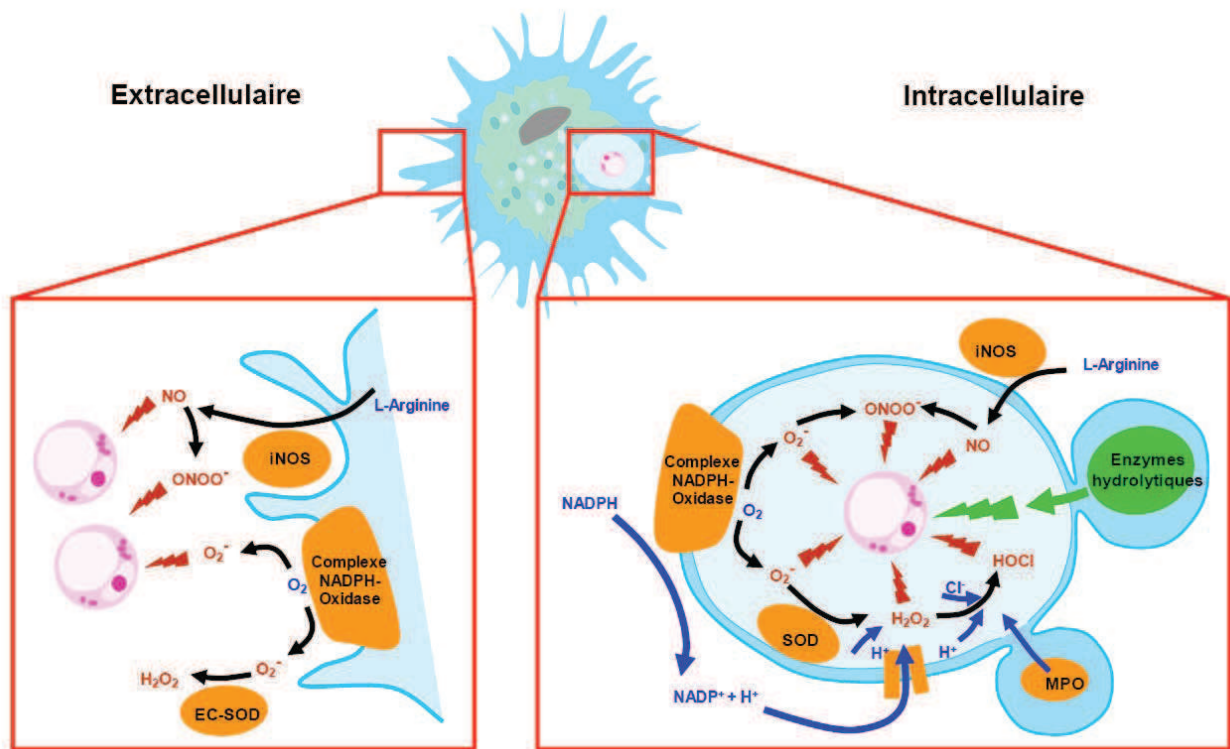
encore l'excrétion et la résorption gonadique (Sparks and Morado 1988 ; Cheng 1996 ; Donaghy et al. 2009). Mais surtout, les hémocytes peuvent s'infiltrer dans les tissus pour rejoindre les sites d'infections et assurer la défense immunitaire de l'individu. L'isolement et la destruction de l'organisme étranger s'effectuent notamment par des mécanismes de phagocytose et de production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Cheng 1981 ; Hine 1999). La phagocytose débute par la reconnaissance et l'adhésion de la particule étrangère (virus, bactéries, organismes pathogènes ou non, particules organiques ou inorganiques) par l'hémocyte. La membrane cytoplasmique de celui-ci englobe ensuite la particule, avant d'être internalisée dans le cytoplasme sous forme d'un phagosome, lequel va fusionner avec des lysosomes, organites riches en enzymes digestives, afin de former un phagolysosome. C'est à l'intérieur de cette structure que s'effectue la dégradation de la particule, par l'action des enzymes lysosomales ou des ERO (Bachère et al. 1995 ; Torreilles et al. 1996 ; Roch 1999 ; Schmitt et al. 2012b).

#### I.5.2 - Production des ERO : généralités, production mitochondriale et cellulaire

Dans une cellule en situation physiologique normale, les ERO constituent des produits secondaires du métabolisme. Le taux de production d'ERO est étroitement relié à la consommation d'oxygène, et peut être proportionnel à la quantité de mitochondries dans un tissu (Storey 1996). En effet, la cytochrome *c* oxydase mitochondriale réduit la plupart de l'oxygène respiré en eau (voir section II), et le transfert d'électrons qui y est associé induit une réduction de l'oxygène au niveau de plusieurs autres complexes enzymatiques, générant ainsi des ERO (Nathan and Singer 1999). Ces composés, dont le terme regroupe principalement le radical oxygène  $\cdot\text{O}_2$ , l'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$ , le radical hydroxyle  $\cdot\text{OH}$ , l'oxyde nitrique  $\cdot\text{NO}$  et la molécule de peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sont toxiques pour la cellule elle-même, et doivent donc être neutralisés par des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques. Il a récemment été mis en évidence que, dans des hémocytes non stimulés, les mitochondries constituent la principale source d'ERO chez *C. gigas* (Donaghy et al. 2012).

Dans le cas de la phagocytose, l'augmentation de la production des ERO est associée à une augmentation de la consommation en oxygène par les hémocytes et fait suite à la stimulation de ceux-ci par des produits microbiens. La production des ERO débute par la réduction d'une molécule d'oxygène en anion superoxyde par la NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase), complexe enzymatique localisé au niveau de la membrane des phagolysosomes. Par la suite, l'anion superoxyde est converti en peroxyde d'hydrogène

par la SOD (superoxyde dismutase), une enzyme antioxydante, et en d'autres radicaux oxygénés pouvant eux-mêmes réagir avec d'autres composés pour former des molécules encore plus toxiques. Ainsi, en présence d'ions chlorure ( $\text{Cl}^-$ ), la myéloperoxydase permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène en hypochlorite ( $\text{HOCl}$ ). De même, l'oxyde nitrique, produit par l'oxyde nitrique synthase (NOS) à partir de L-arginine, peut réagir avec l'anion superoxyde et générer du peroxyde nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Ces dernières espèces, formées à partir de l'azote, font partie des espèces réactives de l'azote (ERN). Les ERO et les ERN sont très instables, très réactifs et hautement microbicides, et jouent un rôle essentiel dans l'élimination des particules phagocytées (Le Grand 2010).



**Figure 3** : Mécanismes supposés impliqués dans la production des principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote dans les hémocytes, au niveau extracellulaire (à gauche) ou dans le phagosome (à droite). \*NO: oxyde nitrique;  $\text{ONOO}^-$ : peroxyde nitrite;  $\text{O}_2^-$ : anion superoxyde;  $\text{HOCl}$ : hypochlorite; iNOS: oxyde nitrique synthase inductible; SOD: superoxyde dismutase; EC-SOD: superoxyde dismutase extracellulaire; MPO: myéloperoxydase. Adapté par Le Grand (2010), d'après Soudant et al. (2008).

## **II. La mitochondrie et son rôle au sein de la cellule**

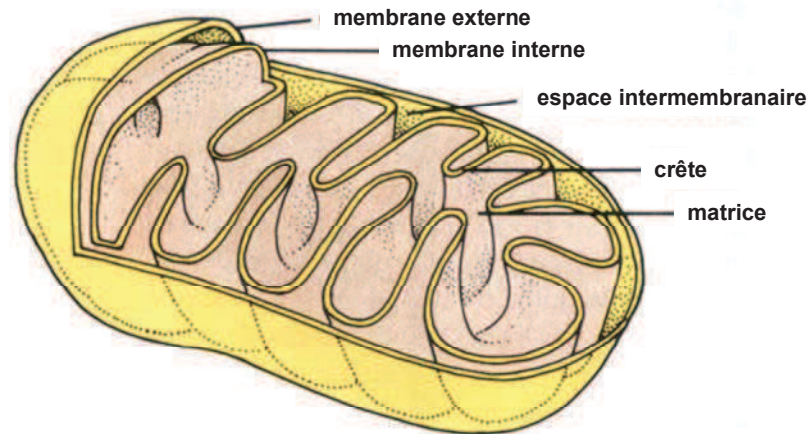
### **II.1 - Caractéristiques**

Les cellules eucaryotes sont caractérisées par l'isolement de leur matériel génétique du reste du cytoplasme à l'intérieur d'une structure particulière appelé noyau. Tout comme celui-ci, les autres organites de la cellule, chacun ayant une fonction bien différenciée, sont délimités et séparés du cytoplasme par une membrane. Une telle compartimentation du cytoplasme permet une régulation du métabolisme beaucoup plus efficace que chez les organismes procaryotes. Parmi ces organites, la mitochondrie détient un rôle primordial. Elle constitue en effet le principal lieu de la production d'énergie nécessaire à l'organisme. Cette énergie se présente sous la forme de molécules d'adénosine triphosphate (ATP), qui sont indispensables à la plupart des réactions chimiques de la cellule.

### **II.2 - Structure et organisation**

Les mitochondries se présentent habituellement sous une forme cylindrique d'environ 1 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur pour 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, bien que leur taille et leur forme dépendent du tissu étudié (Spira Afchain 2007). De même, leur nombre au sein d'une cellule est proportionnel aux besoins énergétiques, et varie de quelques unités (une seule mitochondrie chez les animaux unicellulaires trypanosomatides (Schneider 2001)) à plusieurs milliers (dans le foie ou le muscle des mammifères par exemple). Contrairement à la plupart des autres organites comme le réticulum endoplasmique ou les lysosomes, qui sont isolés du cytoplasme par une seule membrane, la mitochondrie possède deux membranes (Figure 4). Celles-ci sont de composition très différente et délimitent un espace intermembranaire. La membrane externe est très perméable aux petits composés, tandis que la membrane interne, riche en protéines, constitue une véritable barrière que seules des molécules lipophiles peuvent franchir librement. C'est dans cette membrane interne que sont situées les enzymes responsables de la synthèse d'ATP. La membrane interne est repliée sous forme d'invaginations appelées crêtes, qui augmentent considérablement sa surface d'échange. C'est ainsi que le nombre de crêtes mitochondriales semble corrélé aux besoins énergétiques de la cellule. Une augmentation de la densité des crêtes mitochondriales est par exemple observée durant l'acclimatation au froid chez le poisson (Kilarski et al. 1996 ; St-Pierre et al. 1998 ; Guderley 2004), permettant ainsi d'augmenter la quantité d'enzymes impliquées dans la phosphorylation oxydative afin de fournir plus d'énergie aux cellules et compenser les

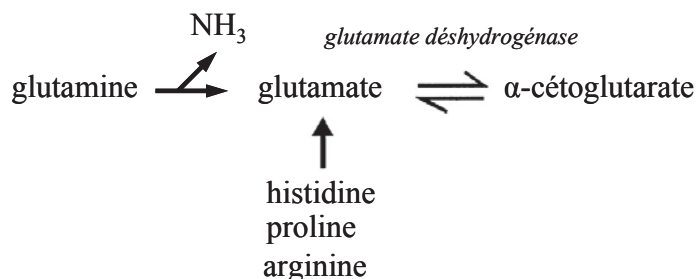
limitations cinétiques réactionnelles associées aux basses températures. La membrane interne délimite un compartiment appelé matrice, qui contient le génome mitochondrial et constitue le lieu de processus tels que la  $\beta$ -oxydation des lipides ou le cycle de Krebs.



**Figure 4 :** Structure d'une mitochondrie vue en coupe. D'après <http://animalcellbiology.wordpress.com>

### II.3 - La respiration cellulaire

Du point de vue biochimique, la respiration cellulaire, ayant lieu chez tous les organismes vivant en aérobiose, fait référence aux processus moléculaires par lesquels la cellule consomme de l'oxygène et produit du dioxyde de carbone afin de produire l'ATP par un processus appelé phosphorylation oxydative. Ces mécanismes impliquent une oxydation de la matière organique, qui peut se présenter sous la forme de glucose et autres sucres, d'acides gras ou d'acides aminés, ces derniers représentant chez les bivalves une importante source d'énergie (Ballantyne and Storey 1983 ; Ballantyne 2004). La première étape de la respiration cellulaire consiste en la dégradation du squelette carboné des sucres et des acides gras en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). C'est sous cette forme que le substrat va pouvoir entrer dans le cycle de Krebs. Les acides aminés peuvent aussi entrer sous cette forme, mais également sous d'autres formes d'intermédiaires du cycle. C'est par exemple le cas du glutamate, pouvant lui-même venir de l'oxydation d'autres acides aminés comme la proline, et qui peut subir une désamination oxydative afin de former l' $\alpha$ -cétoglutarate (Figure 5).



**Figure 5 :** Production d' $\alpha$ -cétoglutarate à partir du glutamate par la glutamate déshydrogénase. D'après Owen et al. (2002).

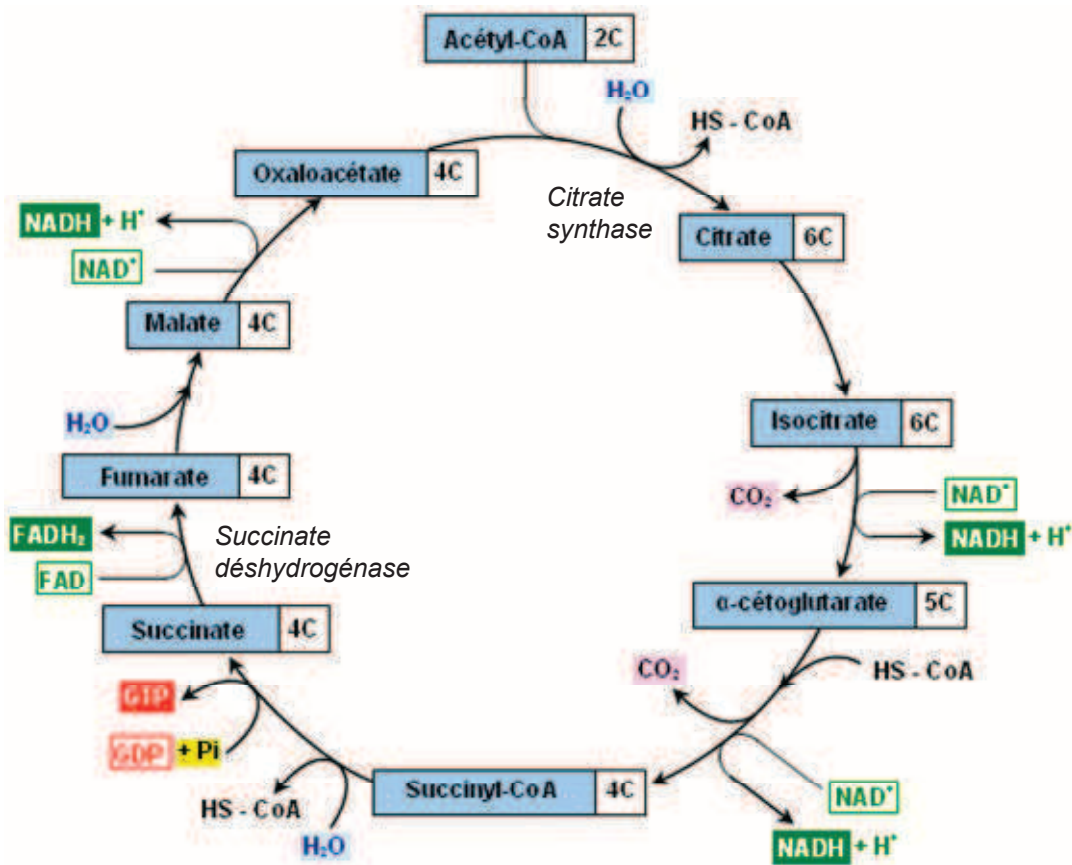
### II.3.1 - Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, aussi appelé cycle de l'acide citrique, est la seconde étape de la respiration cellulaire. L'acétyl-CoA formé lors de la première étape y est alors oxydé. La première réaction du cycle est la condensation de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate pour former le citrate. Cette réaction est catalysée par la citrate synthase, une enzyme également utilisée comme biomarqueur de la quantité de mitochondries dans les tissus (López-Lluch et al. 2006 ; Brown and Stuart 2007 ; Yin et al. 2008 ; Cayci et al. 2012). Le citrate est ensuite transformé en isocitrate, lui-même converti en  $\alpha$ -cétoglutarate (appelé aussi oxoglutarate). Celui-ci va donner le succinyl-CoA, puis le succinate au cours d'une réaction produisant de la guanosine triphosphate (GTP) à partir de guanosine diphosphate (GDP) et de phosphate inorganique ( $P_i$ ). Le succinate va par la suite être converti en fumarate, puis en malate, et enfin en oxaloacétate, qui va pouvoir réagir avec une nouvelle molécule d'acétyl-CoA pour donner du citrate. Ainsi, à chaque tour du cycle, un groupement acétyl (deux carbones) entre sous la forme acétyl-CoA, et deux molécules de  $CO_2$  sont libérées (Figure 6).

Sur les huit étapes du processus, quatre sont des oxidations, dans lesquelles l'énergie est très efficacement conservée sous la forme de coenzymes réduites NADH et  $FADH_2$ . En effet, les conversions de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate, de l' $\alpha$ -cétoglutarate en succinyl-CoA, et du malate en oxaloacétate nécessitent les accepteurs d'électrons nicotinamide adénine dinucléotide ( $NAD^+$ ), qui se retrouvent réduits en NADH. La conversion du succinate en fumarate quant à elle s'effectue grâce à l'enzyme succinate déshydrogénase. Cette enzyme fait partie du complexe II de la chaîne respiratoire, située dans la membrane interne de la mitochondrie, et est liée par une liaison covalente à une molécule de flavine adénine



dinucléotide (FAD). Lors de la conversion du succinate en fumarate, le cofacteur FAD se retrouve réduit en FADH<sub>2</sub>. Les coenzymes réduites NADH et FADH<sub>2</sub> sont ensuite recyclées en transférant leurs électrons aux complexes de la chaîne respiratoire.



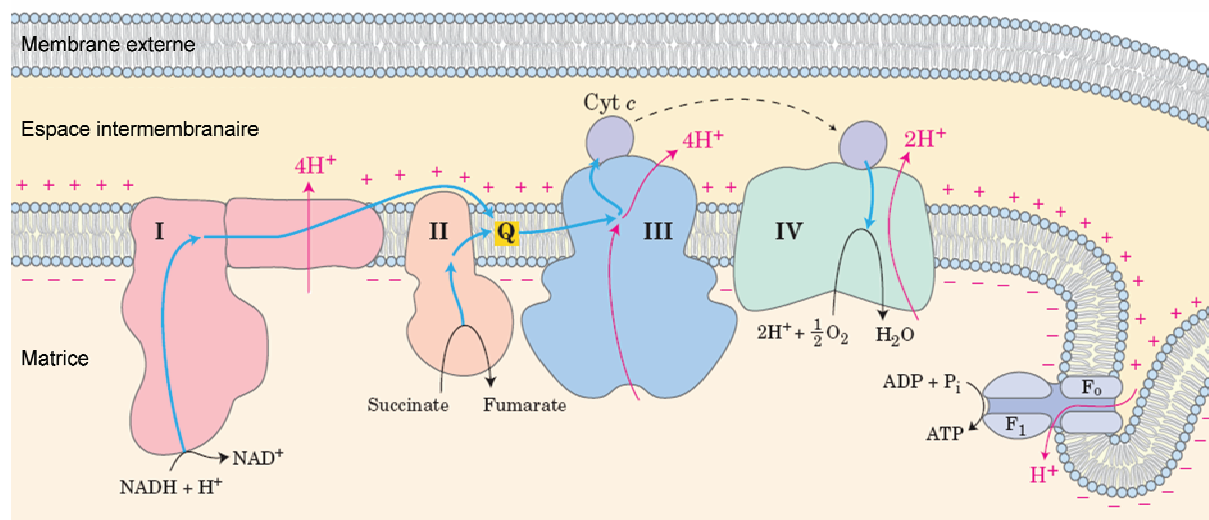
**Figure 6 :** Le cycle de Krebs. Le nom de chaque intermédiaire est suivi du nombre de carbones de sa molécule. Seules les enzymes citrate synthase et succinate déshydrogénase ont été placées sur le cycle, au niveau des réactions qu'elles catalysent. Modifié de <http://svt.ac-dijon.fr>.

### II.3.2 - La chaîne de transfert des électrons

La troisième et dernière étape de la respiration cellulaire est l'oxydation des coenzymes réduites, conduisant à la production d'énergie par un processus appelé phosphorylation oxydative. Cette étape s'effectue au niveau de la chaîne de transfert des électrons, constituée de quatre complexes enzymatiques et se situant dans la membrane interne des mitochondries. Ces complexes sont codés par le génome nucléaire et mitochondrial, et reçoivent les électrons des coenzymes réduites NADH et FADH<sub>2</sub>. Le complexe I, la NADH déshydrogénase, reçoit les électrons provenant du NADH, tandis que le complexe II, la succinate déshydrogénase,

reçoit les électrons du  $\text{FADH}_2$  acquis dans le cycle de Krebs lors de l'oxydation du succinate. Ces deux complexes transfèrent ensuite leurs électrons à l'ubiquinone (Q), qui se réduit en ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ) et se réoxyde en donnant ces électrons au complexe III, le complexe cytochrome  $bc_1$ , transférant lui-même les électrons au cytochrome  $c$ . Deux molécules de cytochrome  $c$  sont ainsi réduites par molécule d'ubiquinol. Le cytochrome  $c$  transfère enfin les électrons au quatrième et dernier complexe de la chaîne, la cytochrome  $c$  oxydase. Celle-ci transfère les électrons à l'oxygène moléculaire ( $\text{O}_2$ ), l'accepteur final, qui se trouve de ce fait réduit en eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

Ce transfert d'électrons est possible grâce au potentiel réducteur des complexes, de plus en plus élevé au fil de la chaîne. Les électrons ont ainsi tendance à passer spontanément d'un transporteur à faible potentiel réducteur (le NADH par exemple) à un transporteur à fort potentiel réducteur comme l'oxygène. En fonction du substrat, on distingue donc deux flux d'électrons possibles le long de cette chaîne : un flux passant par le complexe I (flux I-IV) et un flux passant par le complexe II (flux II-IV) (Figure 7).



**Figure 7 :** La chaîne de transfert des électrons, avec la représentation du trajet des électrons (flèches bleues) à travers les quatre complexes (I, II, III et IV), l'ubiquinone (Q) et le cytochrome  $c$  (Cyt  $c$ ). En flèches roses sont indiquées les pompes de protons ( $\text{H}^+$ ) à travers la membrane interne, et le retour de ceux-ci dans la matrice via la  $\text{F}_0\text{-F}_1$  ATP-synthase induisant la synthèse d'ATP. A cause de la différence de concentration en protons de part et d'autre de la membrane interne, celle-ci devient donc chargée négativement (-) du côté de la matrice, et chargée positivement (+) du côté de l'espace intermembranaire. Adapté de Nelson and Cox (2008).

### II.3.3 - La production d'ATP

Dans la chaîne respiratoire, le transfert d'électrons décrit précédemment est couplé à un pompage de protons ( $H^+$ ) à travers la membrane mitochondriale interne, de la matrice à l'espace intermembranaire. Ce pompage s'effectue au niveau du complexe I (quatre  $H^+$  pompés par molécule de NADH oxydée), au niveau du complexe III (quatre  $H^+$  pompés par molécule de  $QH_2$  oxydée) et du complexe IV (deux  $H^+$  pompés par dimère de cytochrome *c* oxydée), soit un total de dix  $H^+$  par molécule d'eau formée pour le flux I-IV. Aucun  $H^+$  n'étant pompé au niveau du complexe II, le flux II-IV ne permet un pompage que de six  $H^+$ . La membrane interne étant imperméable aux protons, ceux-ci s'accumulent dans l'espace intermembranaire, créant ainsi une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane interne. C'est l'existence de ce potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\psi_m$ ) qui permet la synthèse d'ATP. En effet la  $F_0F_1$ -ATP synthase, une enzyme transmembranaire responsable de la majeure production de l'énergie dans la cellule, contient un pore (domaine  $F_0$ ) emprunté par les protons pour retourner dans la matrice (Figure 7). L'énergie produit par le passage des protons est utilisée par le domaine catalytique  $F_1$ , situé du côté de la matrice, pour générer de l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de  $P_i$ . Ainsi, quatre  $H^+$  sont nécessaires à la synthèse d'une molécule d'ATP, qui est ensuite transporté à l'extérieur de la mitochondrie par l'adénine nucleotide translocase (ANT), un système transmembranaire couplant l'apport d'ADP à l'export d'ATP.

Cependant, le couplage entre le transfert d'électrons et la production d'ATP n'est pas parfait. Il existe une fuite de  $H^+$  basale, dont le maintien est responsable de la consommation d'une quantité d'énergie non négligeable (entre 20 et 25% du taux métabolique standard, Brand et al. 1999). Cette fuite de  $H^+$  pourrait être dépendante de la composition lipidique de la membrane interne mitochondriale (Brookes et al. 1998) ou de l'activité de certaines enzymes comme l'ANT (Andreyev et al. 1989) et pourrait contribuer à la diminution de la production de superoxyde et d'autres ERO (Brand 2000).

La mitochondrie est la principale source intracellulaire d'ERO, notamment au niveau des complexes I et III (Nohl et al. 2005). La fuite d'électrons provenant de l'ubisemiquinone ( $QH\cdot$ ), généré lorsque l'ubiquinol transfère ces électrons au complexe III, permet le gain d'un électron par l'oxygène moléculaire, conduisant ainsi à la formation de superoxyde. Le superoxyde va lui-même générer d'autres ERO. D'abord converti en  $H_2O_2$  par la SOD, il est

ensuite transformé en radical  $\cdot\text{OH}$  et va pouvoir créer des dommages cellulaires tels que l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides, et la dégradation de l'ADN. La force protomotrice affecte la production des ERO en altérant le statut redox de Q. Lorsque la concentration en  $\text{H}^+$  est forte dans l'espace intermembranaire, cette force est élevée et la respiration diminue, donc les électrons s'accumulent dans Q au lieu de passer la chaîne de transport d'électrons jusqu'à l'oxygène. Ceci augmente la concentration en  $\text{QH}\cdot$  et augmente donc par conséquent le taux de production d'ERO mitochondriaux. La fuite de protons a tendance à diminuer cette force protomotrice, ce qui amène à une plus faible concentration en  $\text{QH}\cdot$ . En parallèle, le taux de consommation d'oxygène est augmenté, ce qui diminue la tension en oxygène autour des mitochondries. Puisque la production de superoxyde est une réaction de second ordre, dépendant à la fois des concentrations en  $\text{QH}\cdot$  et en  $\text{O}_2$ , de faibles concentrations en  $\text{QH}\cdot$  et en oxygène conduisent à de plus faibles taux de production d'ERO et apportent une protection contre les dommages oxydatifs (Brand 2000).

Le découplage peut également être inductible et s'effectuer grâce à des protéines découplantes (UCP, pour « uncoupling proteins »). Celles-ci, situées dans la membrane interne des mitochondries, forment un pore que peuvent emprunter les  $\text{H}^+$  pour retourner dans la matrice, offrant ainsi une voie alternative à l'ATP synthase. La fuite de  $\text{H}^+$  ne génère donc pas d'ATP mais permet de diminuer le potentiel membranaire. Les UCP sont moins bien caractérisées chez les invertébrés que chez les mammifères où elles ont plusieurs rôles physiologiques, mais leur présence a toutefois été mise en évidence chez l'huître (Sokolova and Sokolov 2005 ; Kern et al. 2009).

### **III. Structure et fonctions des lipides**

#### **III.1 - Définition**

Les lipides sont des composés biologiques définis en fonction d'une propriété physique : la solubilité. Ils présentent en effet une solubilité nulle ou faible dans l'eau mais élevée dans les solvants organiques tels que le méthanol, le chloroforme, le cyclohexane, l'éther éthylique ou l'acétone. Formés principalement de longues chaînes composées de carbone et d'hydrogène, ils peuvent également contenir d'autres éléments comme l'oxygène, le phosphore, le soufre ou l'azote. Les lipides sont des molécules biologiques ayant des structures et des fonctions diverses, pouvant par exemple être impliqués dans la défense immunitaire (cas des eicosanoïdes), la constitution de réserves énergétiques (triglycérides et esters de stérol) ou la structuration des membranes (phospholipides et stérols).

#### **III.2 - Distinction entre lipides neutres et lipides polaires**

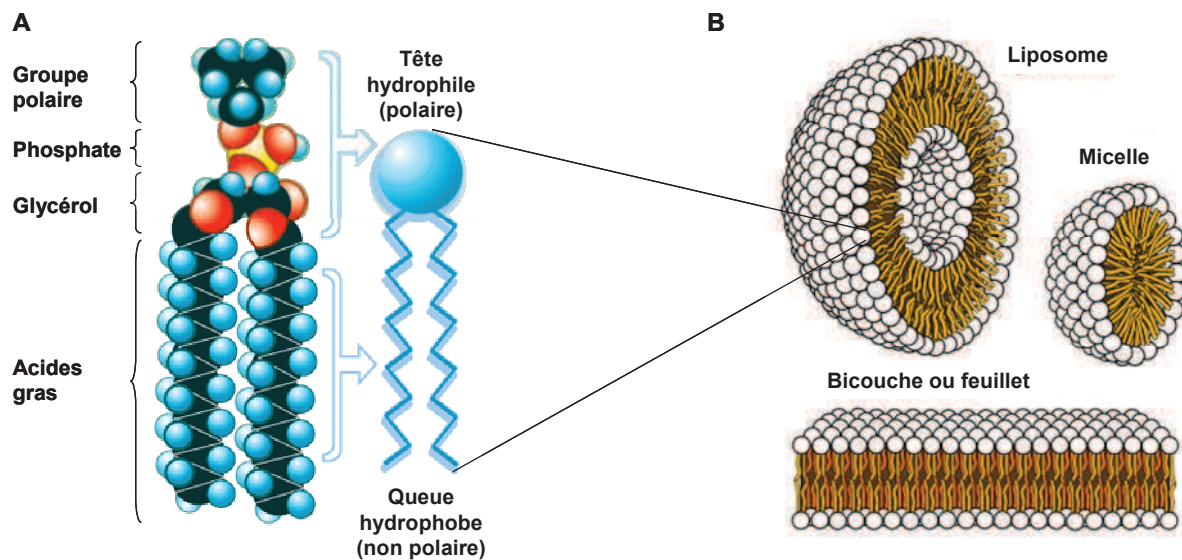
Ces deux grandes classes ont des polarités différentes et il est donc possible de les séparer d'un mélange en utilisant des solvants ou des mélanges de solvants différents. Cette propriété est utilisée par des séparations méthodologiques telles que la chromatographie en micro-colonne. Les lipides neutres et les lipides polaires sont distinguables par leur polarité, c'est-à-dire la répartition des charges négatives et positives au sein de la molécule.

##### **III.2.1 - Lipides neutres**

Les lipides neutres sont apolaires et ont un rôle de lipides de réserves. Ils sont principalement représentés par les triglycérides et les esters de stérols, mais les diglycérides, les monoglycérides, les esters d'alcools gras (cires), les alcools gras et les acides gras libres font également partie de cette catégorie. Dans la cellule, les lipides de réserves peuvent être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques, lesquelles peuvent occuper jusqu'à 95% du volume cellulaire dans les adipocytes (Puri and Czech 2008). Les acides gras de ces lipides neutres peuvent être utilisés pour la production d'énergie grâce au processus de la  $\beta$ -oxydation, mais peuvent également servir de substrats à la synthèse de phospholipides (Athenstaedt and Daum 2006).

### III.2.2 - Lipides polaires

Les lipides dits « polaires », comprenant les phospholipides, les glycolipides et les sphingolipides, sont composés d'une tête polaire, hydrophile (comportant un groupement polaire dont la nature définit la classe du lipide, un groupement phosphate et un glycérol), liée à une queue fortement apolaire, hydrophobe, constituée en général de deux acides gras (Figure 8A). Ce caractère amphiphile permet aux lipides polaires de s'agréger spontanément, de façon à mettre leurs têtes polaires en contact avec l'eau et en isoler leurs chaînes hydrophobes, conduisant ainsi à la formation de structures telles que les micelles, les liposomes ou les bicouches lorsqu'ils se trouvent en milieu aqueux (Figure 8B). Les bicouches lipidiques sont à l'origine de la formation des membranes biologiques et les lipides polaires représentent les constituants majoritaires, l'ossature, des membranes cellulaires dans lesquelles sont insérées des protéines. La structure des membranes cellulaires dépend donc à la fois des propriétés des acides gras formant la queue hydrophobe, et de la nature du groupe polaire.

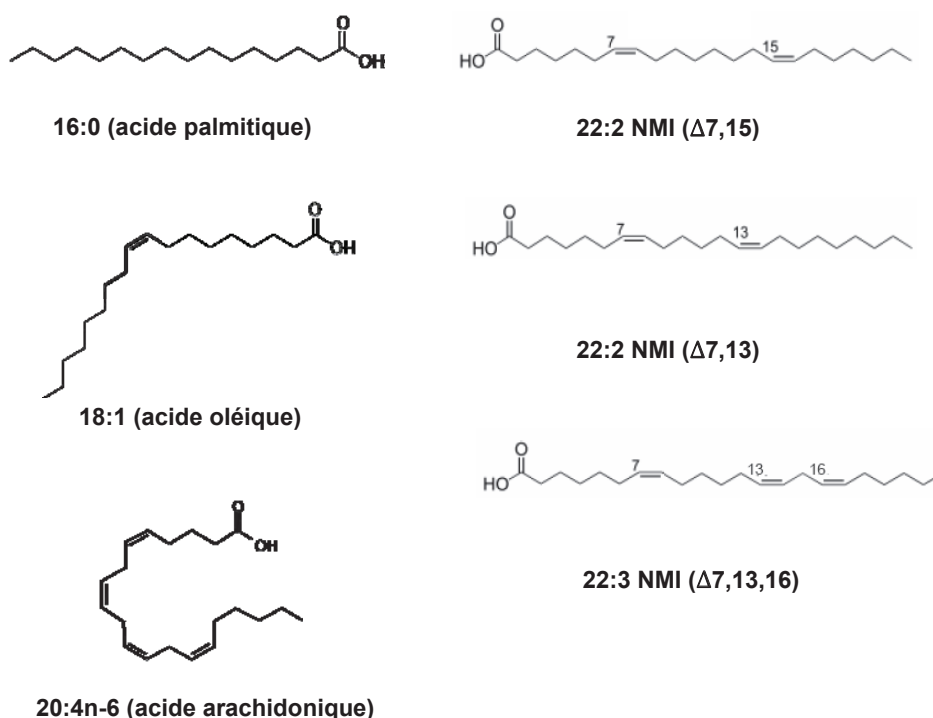


**Figure 8 :** Structure des lipides polaires (A) et modes d'arrangement spontané de ceux-ci en environnement aqueux : liposome, micelle et bicouche ou feuillet (B).

### III.3 - Les acides gras

#### III.3.1 - Structure

Les acides gras sont généralement constitués par une chaîne hydrocarbonée linéaire, possédant un groupement carboxyle (-COOH) terminal. Ils se distinguent par la longueur de leur chaîne et par le nombre et la position des doubles liaisons (insaturations) présentes. Dans ce travail, ils sont identifiés par la formule C:Xn-Y où C est le nombre de carbones, X le nombre d'insaturations et Y la position de la première double liaison, comptée à partir du méthyle (groupement -CH<sub>3</sub>) terminal. Les doubles liaisons sont supposées être de configuration *cis* (les deux hydrogènes H du même côté, configuration créant un coude dans la chaîne carbonée) et se succéder, en alternance avec un groupement CH<sub>2</sub>. Cependant, il existe chez les bivalves des acides gras particuliers, dits « non-methylene-interrupted » (NMI), qui se distinguent par la présence de plus d'un groupement méthyle entre chaque double liaison (Paradis and Ackman 1975) (Figure 9).



**Figure 9** : Exemples d'acide gras saturé (acide palmitique), d'acide gras mono-insaturé (acide oléique), d'acide gras poly-insaturé (acide arachidonique), et d'acides gras NMI (22:2 NMI ( $\Delta$ 7,15), 22:2 NMI ( $\Delta$ 7,13), 22:3 NMI ( $\Delta$ 7,13,16)).

Les acides gras peuvent être classés en trois catégories en fonction du nombre d'insaturations qu'ils comportent. On distingue ainsi les acides gras saturés, ne comportant aucune insaturation (AGS) ; les acides gras mono-insaturés, ne comportant qu'une seule insaturation (AGMI) ; et les acides gras poly-insaturés, comportant plus d'une double liaison (AGPI) (Figure 9). Le nombre et la disposition des insaturations, induisant une courbure plus ou moins prononcée de la molécule, de même que la longueur de la chaîne carbonée confèrent aux acides gras des propriétés physiques et chimiques différentes. Par exemple, le point de fusion augmente avec la longueur de la chaîne et diminue avec le nombre d'insaturations. Ces deux paramètres sont déterminants pour la fluidité et les propriétés physiques des membranes biologiques.

### III.3.2 - Biosynthèse

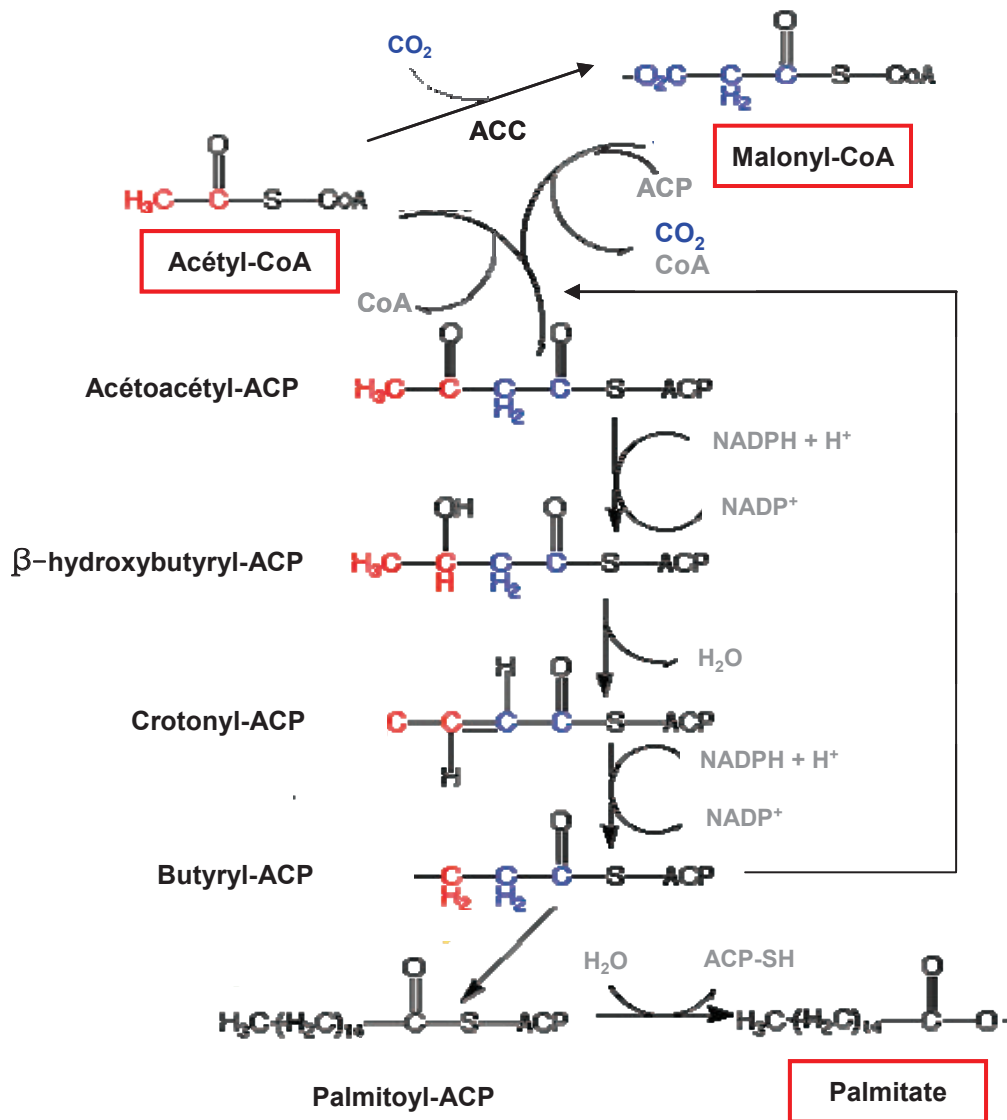
La synthèse des acides gras commence par la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Une molécule d'acide palmitique (C16:0) est formée par condensation d'une molécule d'acétyl-CoA et de 7 molécules de malonyl (Figure 10). Ce processus est catalysé par un complexe multi-enzymatique, l'acide gras synthétase (fatty acid synthetase, FAS), et fait intervenir des acyl carrier proteins (ACP) dont le rôle est de transporter les unités acétyl.

L'acide palmitique (C16:0) est le précurseur des autres acides gras par élongation et désaturation. L'élongation se fait dans les mitochondries par des élongases, ajoutant une paire de carbones à partir de la fonction carboxyle. Les désaturations s'effectuent quant à elles dans le réticulum endoplasmique, par des enzymes désaturases. La première double liaison est mise en place entre le 9<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> atome de carbone, par l'action d'une  $\Delta 9$  désaturase. Le 18:1n-9 et le 16:1n-7 peuvent être ainsi obtenus à partir du 18:0 et du 16:0 (Figure 11). Seuls les végétaux possèdent les enzymes  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  désaturases permettant la synthèse du 18:2n-6 et du 18:3n-3 à partir du 18:1n-9. Les microalgues marines, qui constituent la nourriture de base des animaux filtreurs que sont les bivalves, peuvent en plus synthétiser l'ensemble des acides gras à longues chaînes des séries n-6 et n-3, ces derniers étant généralement prépondérants. En revanche, la majorité des espèces animales marines ne sont pas ou peu capables de bioconvertir le 18:2n-6 et le 18:3n-3 alimentaires, qu'il s'agisse des poissons (Owen et al. 1975 ; Tocher et al. 1995), des crustacés (Kanazawa et al. 1979) ou des mollusques (De Moreno et al. 1976 ; Waldock and Holland 1984). Les AGPI 20:4n-6 (acide

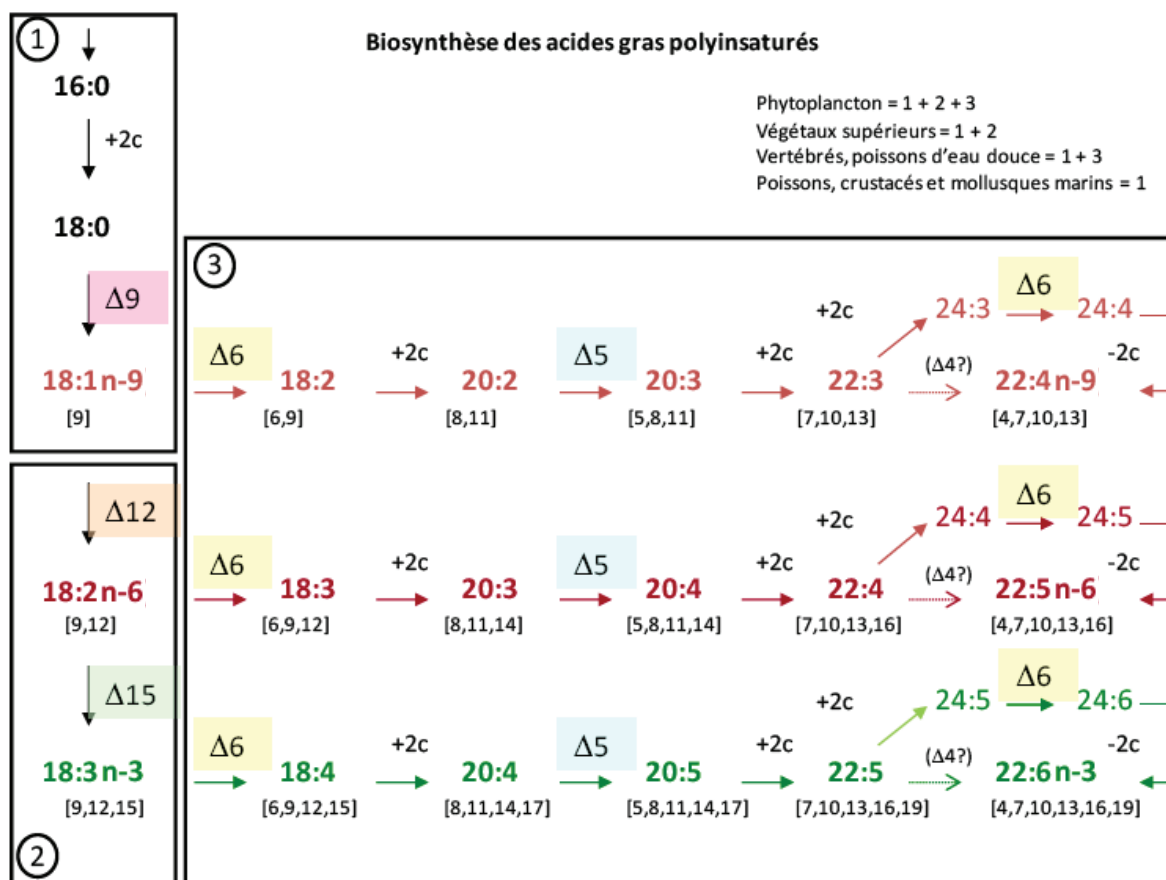


arachidonique, ARA), 20:5n-3 (acide eicosapentaénoïque, EPA) et 22:6n-3 (acide docosahexaénoïque, DHA) sont considérés comme des acides gras essentiels pour la survie, la croissance et la reproduction des espèces marines (Trider and Castell 1980 ; Uki et al. 1986), qui doivent donc les obtenir de par leur nourriture.

Cependant, il est à noter qu'il existe des voies de biosynthèse des AGPI ne nécessitant pas d'élongations ni de désaturations des AGS. Ces voies sont médiées par les polyketides synthases, lesquelles conduisent aux mêmes séquences mais de façon abrégée (Metz et al. 2001).



**Figure 10** : Biosynthèse du palmitate, ou acide palmitique (16:0). ACC : acétyl-CoA carboxylase ; ACP : acyl carrier protein.

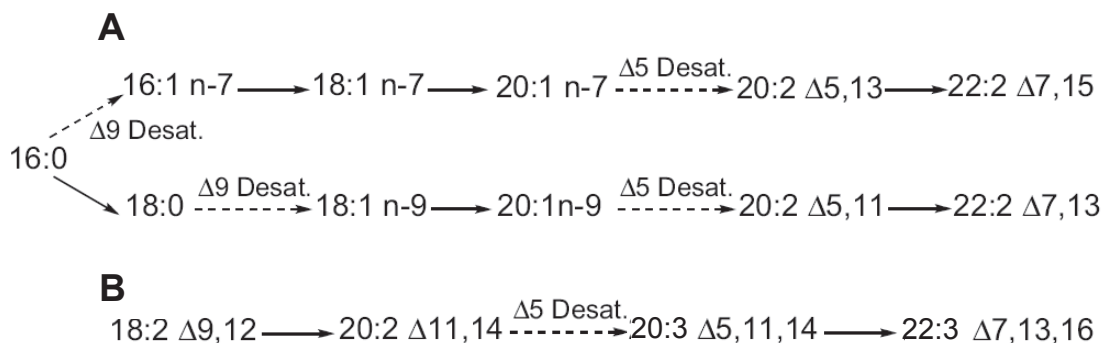


**Figure 11 :** Biosynthèse des acides gras poly-insaturés chez les plantes et les animaux. Les chiffres entre crochets indiquent la position de chacune des doubles liaisons comptée à partir de la fonction acide. L'action des désaturases ( $\Delta$ ), de même que celle des élongases (+2c) est indiquée à chaque étape. Tiré de Le Grand (2010).

### III.3.3 - Biosynthèse des acides gras NMI chez les bivalves

La synthèse de ces acides gras particuliers a été décrite chez les bivalves (Zhukova 1986 ; Zhukova 1991). Les NMID (NMI diénoïques, à deux doubles liaisons) sont obtenus à partir du 16:0 et du 18:0 après plusieurs étapes d'élongation et deux étapes de désaturation, en  $\Delta 9$  puis en  $\Delta 5$  (Figure 12). La capacité de désaturation en  $\Delta 5$  se limite cependant à ces acides gras NMI puisque la biosynthèse de 20:4n-6 (ARA) et de 20:5n-3 (EPA), qui nécessite cette capacité (Figure 11), n'existe pas ou est considérée comme très peu active chez ces mollusques (De Moreno et al. 1976 ; Waldock and Holland 1984). Le NMI triénoïque (à trois doubles liaisons) 22:3 proviendrait d'élongations et de désaturations semblables à partir du 20:2n-6 (Dunstan et al. 1993).

Ces acides gras sont présents en quantité importante dans les phospholipides. Leurs proportions sont inversement corrélées à celles du DHA et de l'EPA, et leur synthèse pourrait être associée à une déficience en acides gras essentiels (Klingensmith 1982). Le rôle des NMI est encore mal connu, mais ils ont néanmoins été associés à plusieurs fonctions biologiques (pour une revue, voir Barnathan 2009), notamment au sein des membranes cellulaires (Ackman and Hooper 1973 ; Klingensmith 1982). Les insaturations particulières des NMI donneraient à ces acides gras des caractéristiques similaires aux AGMI (dans le cas des NMID), leur conférant ainsi plus de résistance aux attaques microbiennes et à l'oxydation que les autres AGPI (Ackman and Hooper 1973 ; Takagi and Miyashita 1987), ce qui pourrait représenter chez les bivalves une adaptation biochimique à leur condition de vie particulière. Dans le cas du NMIT 22:3, seules les insaturations en position 13 et 16 confèreraient cette résistance, l'insaturation en position 7 étant une double liaison classique. Au final, cela donne au NMIT des caractéristiques similaires à un acide gras di-insaturé. Rabinovich et Ripatti (1991) émettent au contraire l'hypothèse que ces NMI seraient le résultat de l'activité de désaturases peu spécifiques et peu spécialisées chez ces animaux primitifs, et dont le rôle serait limité au maintien de la fluidité membranaire.



**Figure 12 :** Voies de synthèse des NMID (A) et des NMIT (B) chez les mollusques. Tiré de Barnathan (2009).

### III.4 - Les phospholipides

#### III.4.1 - Structure et principales classes

Les acides gras décrits précédemment interviennent rarement sous forme libre et sont en fait constitutifs de molécules plus importantes dans lesquelles ils jouent le rôle de partie hydrophobe. Dans le cas des phospholipides, un ou plusieurs acides gras sont liés soit par

l'intermédiaire d'une liaison ester à un glycérol dans le cas des glycérophospholipides, soit par l'intermédiaire d'une liaison amide à une base azotée à longue chaîne, principalement la sphingosine, dans le cas des sphingophospholipides.

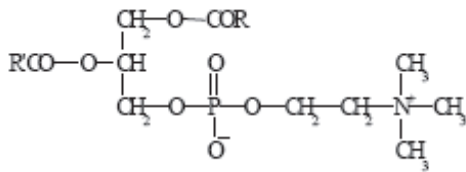
Ces composés sont ensuite reliés à une tête polaire, composée d'un groupement phosphate lié ou non à d'autres structure chimiques variées. Ces phospholipides membranaires se distribuent ainsi en plusieurs classes, à chaque tête polaire correspondant une classe de phospholipides (Figure 13).

#### III.4.2 - Composition dans les membranes

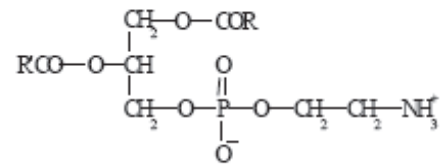
Les principales classes de phospholipides observées chez les mammifères, PC, PE, PI et PS sont également retrouvées chez les mollusques. Néanmoins, il existe chez ces derniers des variations selon les espèces, au niveau de l'individu entier, mais aussi au niveau des organes différenciés (Vaskovsky 1989 ; Kostetsky and Velansky 2009). Les facteurs qui influencent la composition en phospholipides peuvent être endogènes (sexe, reproduction) ou exogènes (salinité, température, saison, nutrition) (Vaskovsky 1989).

Tout comme chez les mammifères, il semble exister chez les bivalves une asymétrie de la distribution des phospholipides dans les membranes cellulaires (Chelomin and Zhukova 1981), la PC étant localisée en grande partie dans le feuillet externe tandis que la PS, la PE et la PI se retrouvent généralement dans le feuillet interne. Le DPG, plus communément appelé cardiolipide (CL), est considéré comme presque totalement localisé dans la membrane interne des mitochondries, y compris chez les bivalves marins (Glémet and Ballantyne 1995 ; Gillis and Ballantyne 1999). Cette asymétrie entraîne une différence de charge significative entre les deux monocouches de la membrane, puisqu'au pH physiologique la PS, la PI et le CL présentent des têtes polaires chargées négativement.

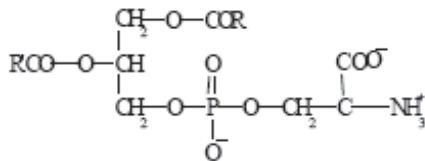
Contrairement aux mammifères et aux poissons, la sphingomyéline n'existe pas chez les bivalves, à quelques exceptions près (Sargent 1989). En revanche, ceux ci peuvent posséder dans leurs membranes des quantités importantes de CAEP (Chelomin and Zhukova 1981). A cause de leur structure très proche (Figure 13), on suppose que le CAEP remplace la sphingomyéline chez les invertébrés, même si certains mollusques semblent posséder les deux (Vaskovsky 1989).



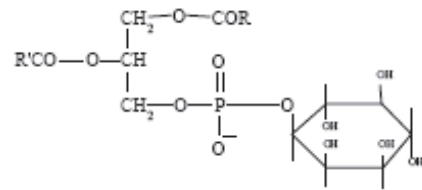
Phosphatidylcholine (PC), lécithine  
1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine



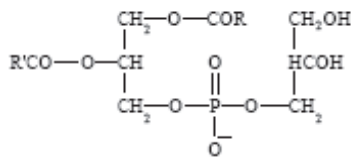
Phosphatidyléthanolamine (PE)  
1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphoryléthanolamine



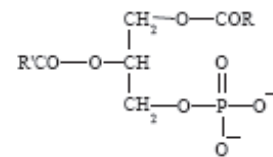
Phosphatidylsérine (PS)  
1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphorylsérine



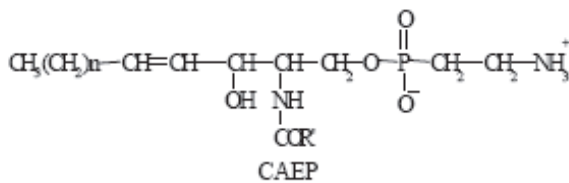
Phosphatidylinositol (PI)  
1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphorylinositol



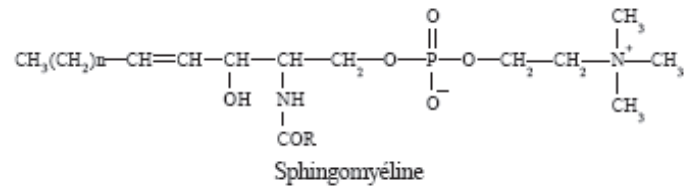
Phosphatidylglycérol (PG)  
1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphorylglycérol



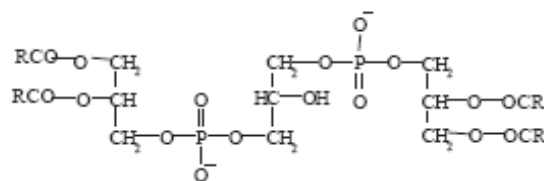
Acide phosphatidique (PA)  
1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphate



Céramide aminoéthylphosphonate



Céramide phosphorylcholine



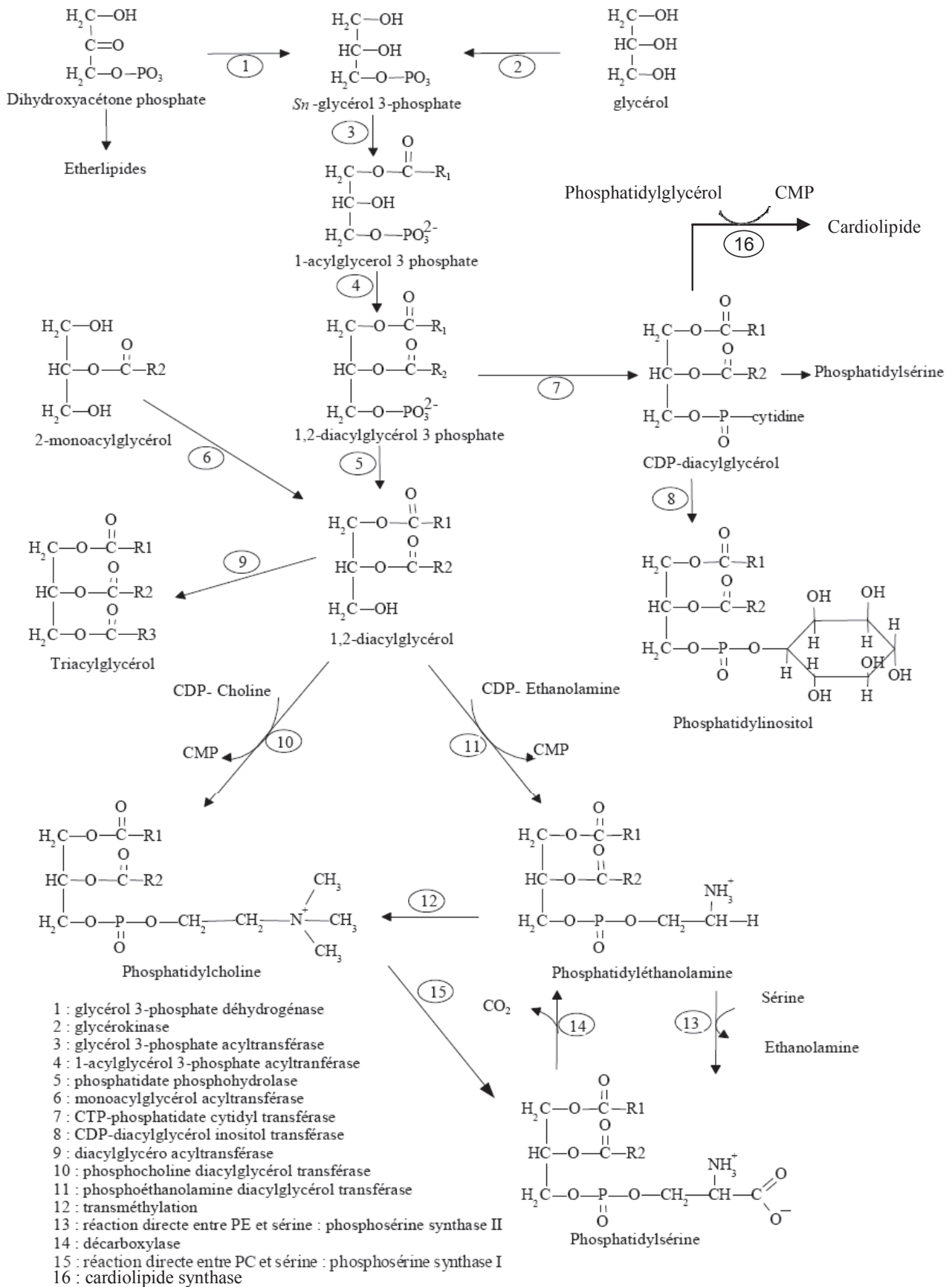
Cardiolipide, Diphosphatidylglycérol (DPG)  
1,2-bis-(3-*sn*-phosphatidyl)-glycérol

Figure 13 : Structure des principales classes de phospholipides. Tiré de Kraffe (2003).

### III.4.3 - Biosynthèse des glycérophospholipides

Le point de départ de cette biosynthèse est le glycerol 3-phosphate formé essentiellement par réduction du phosphohydroacétone et, à un moindre degré, par phosphorylation du glycérol (Figure 14). L'acide phosphatidique est obtenu par deux acylations successives catalysées par une glycérol phosphate acyl transférase. La chaîne en position *sn*-1 (c'est-à-dire greffée sur le premier carbone de la molécule de glycérol lorsque celle-ci est représentée en projection de Fischer, *sn* correspondant au terme *stereospecific numbering*) est généralement saturée et celle en *sn*-2 (sur le deuxième atome de carbone du glycérol) insaturée. L'acide phosphatidique (diacylglycérol 3-phosphate) est un intermédiaire commun à la synthèse des phosphoglycérides et triglycérides (TAG). Dans la synthèse des triglycérides, l'acide phosphatidique est hydrolysé pour donner du diacylglycérol (DAG). Le DAG est acylé en TAG par une diacylglycéride acyl transférase. La biosynthèse *de novo* de la PI commence par la formation de CDP-diacylglycérol (cytidine diphosphodiacylglycérol). Cette forme activée réagit avec l'inositol pour former la PI. La PC et la PE peuvent être synthétisées par une voie qui utilise respectivement la choline (alimentaire) et l'éthanolamine. La PS provient d'une réaction directe entre la PE ou la PC et la sérine. La PE peut être reformée par décarboxylation de la PS. La PC peut être également formée à partir de la PE par transméthylation. Les mollusques bivalves peuvent utiliser la biosynthèse *de novo* mais ils ne sont pas capables de décarboxyler la PS en PE (Shieh 1968). Chez eux la synthèse des glycérolipides se fait plutôt par le biais de transacylation à partir des lipides alimentaires que par biosynthèse *de novo* (Parker and Selivonchick 1986).

La voie de biosynthèse du CL commence également par les intermédiaires communs à la synthèse des autres phosphoglycérides. Ce n'est que l'étape finale de la synthèse du CL qui est une réaction unique. Chez les eucaryotes, elle passe par un intermédiaire, le phosphatidylglycérol, ce dernier réagissant à nouveau avec la CDP-diacylglycérol pour former le CL. La majorité des études ont montré que les enzymes catalysant ces réactions sont uniquement présentes dans la membrane interne de la mitochondrie (Daum 1985 ; Hatch and McClarty 1998) alors que toutes les autres classes de phospholipides sont totalement synthétisées dans le réticulum endoplasmique ou les microsomes (Daum 1985 ; Berger et al. 1993).

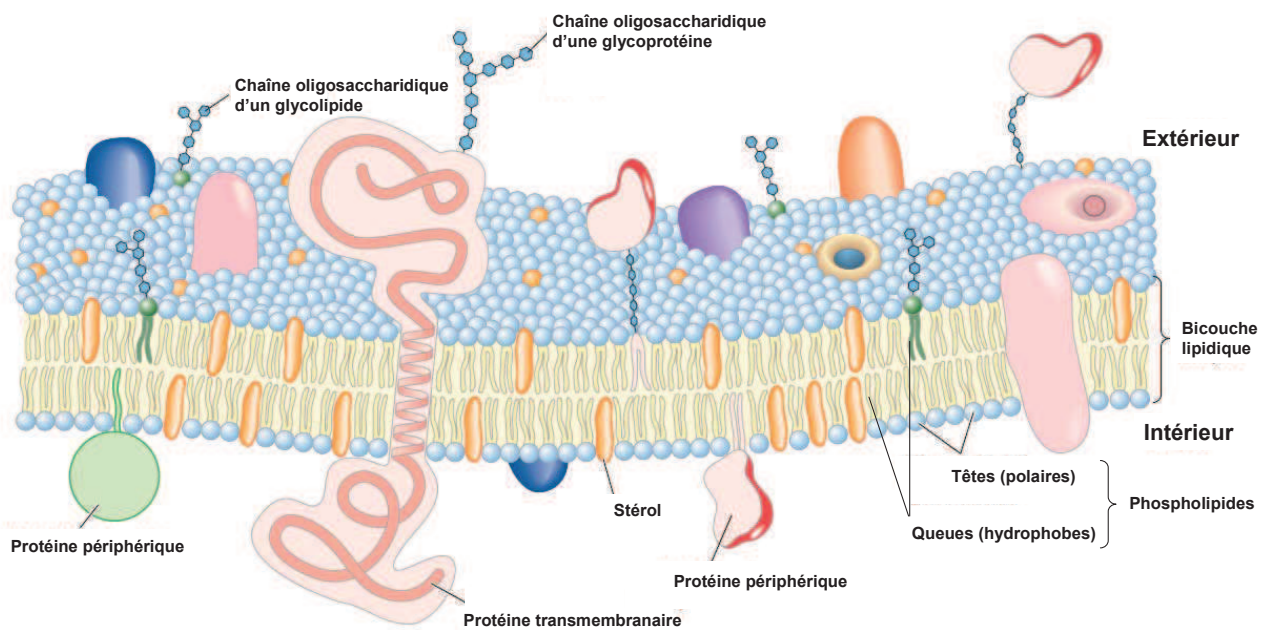


**Figure 14 :** Biosynthèse des glycérophospholipides. Tiré de Stryer (1997), modifié d'après Nelson et Cox (2008).

## IV. Structure des membranes et activités enzymatiques.

### IV.1 - Structure des membranes cellulaires

Les membranes cellulaires partagent une structure commune (Figure 15). Avec le cholestérol (phytostérols (au sens large) chez les mollusques, c'est-à-dire tous les stérols présents dans les algues et captés par ces animaux, cholestérol compris), qui permet de consolider la membrane sans la rigidifier, les phospholipides forment une barrière relativement imperméable aux composés polaires ou chargés. Ceux-ci peuvent en revanche traverser la membrane via des pores constitués par des protéines transmembranaires. D'autres protéines, transmembranaires ou périphériques, sont associées aux lipides et ont des rôles divers (récepteurs membranaires, coenzymes, transduction des signaux cellulaires, etc.). Tout comme les lipides, les protéines membranaires peuvent être couplées à des glucides se présentant sous la forme de chaînes oligosaccharidiques. Ces glucides ont un rôle dans les processus de reconnaissance cellulaire et protègent la cellule contre les agressions mécaniques, chimiques et enzymatiques. Ils se trouvent toujours dans la moitié externe de la double couche lipidique. Plus généralement, l'orientation des protéines dans la bicouche est asymétrique, les domaines protéiques exposés n'étant pas les mêmes des deux côtés de la membrane. Ceci reflète une asymétrie fonctionnelle des membranes.



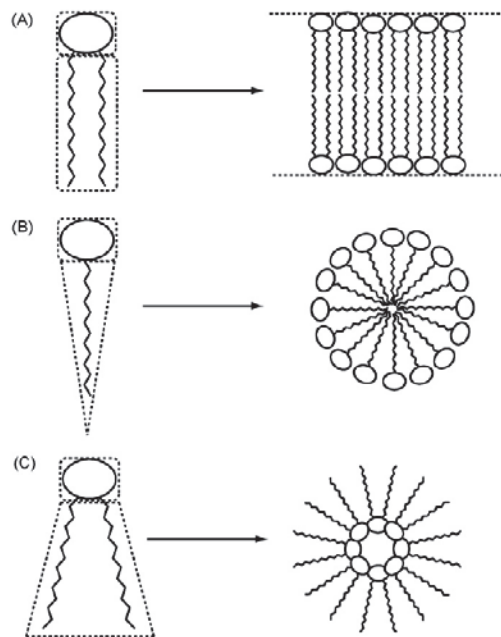
**Figure 15 :** Structure des membranes biologiques. Adapté de Nelson et Cox (2008).



Le modèle développé par Singer et Nicolson (1972) est celui de la mosaïque fluide. Le terme de mosaïque fait référence à la diversité des lipides et des protéines présentes au sein de la membrane. Celle-ci est décrite comme étant fluide à cause de la relative mobilité de ses composants. En effet, la plupart des interactions entre lipides et protéines sont non covalentes, ce qui leur rend possible d'effectuer des mouvements latéraux dans le plan de la membrane.

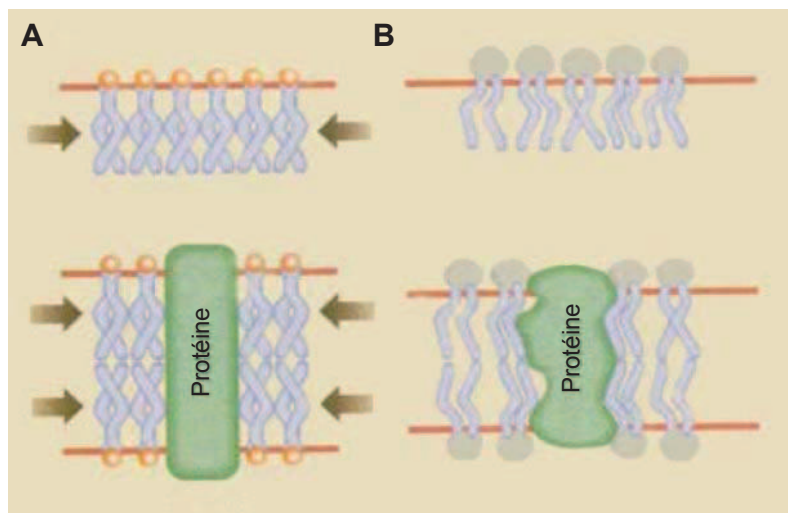
#### IV.2 - Rôle structurale des phospholipides et conformations protéiques

En fonction de leur forme, les lipides vont influencer la courbure de la membrane. La forme d'un lipide dépend de la taille relative de sa tête polaire et de la section de la zone occupée par ses chaînes d'acides gras, elle-même définie par le nombre de chaînes de même que par leur taille et leur degré d'insaturation (Figure 16). Lorsque ces tailles sont identiques, le lipide a une forme cylindrique, comme c'est le cas pour la PC. Ces lipides forment des phases lamellaires. Certains phospholipides ne possèdent qu'une seule chaîne d'acides gras, le deuxième ayant été hydrolysé par une phospholipase : les lysophospholipides. Ces lipides ont une forme conique et forment des régions membranaires ayant une courbure dite positive. A l'inverse, les lipides coniques inversés comme la PE forment des régions ayant une courbure dite négative.



**Figure 16 :** Influence de la forme des lipides sur les structures formées en environnement aqueux. Les lipides cylindriques (A) forment des phases lamellaires, structure des bicouches lipidiques. Les lipides coniques (B) forment des micelles ou des régions membranaires ayant une courbure positive. Les lipides coniques tronqués inversés (C) forment eux des micelles inversées ou des régions membranaires ayant une courbure négative. Tiré de Haney et al. (2010).

L'activité d'une protéine est liée à sa conformation spatiale. En fonction de leur nature, les phospholipides peuvent influencer la conformation des protéines membranaires. Comme il l'est illustré par la Figure 17, la propension de certains phospholipides à adopter une structure non-lamellaire créerait dans la membrane des pressions latérales des chaînes grasses qui stabiliseraient les protéines membranaires intrinsèques dans une orientation et une structure spatiale fonctionnelle (Giorgione et al. 1995 ; de Kruijff 1997). De même, la longueur et le degré d'insaturations des chaînes d'acides gras peuvent déterminer la structuration spatiale des protéines transmembranaires en influençant sur l'épaisseur de la bicouche lipidique, ce qui peut modifier l'exposition des sites actifs des enzymes (Zuniga et al. 1989).



**Figure 17 :** Influence de l'environnement lipidique sur la conformation des protéines transmembranaires. Une même protéine dans un environnement lipidique donné (A) n'a pas la même conformation spatiale dans une bicouche composée de lipides de nature différente (B). Dans le cas illustré ici, outre une épaisseur différente de la bicouche, la pression latérale exercée par les chaînes d'acides gras (représentée par les flèches) est également modifiée. Tiré de Kraffe (2003).

### IV.3 - Relation entre composition en lipides et activités enzymatiques

#### IV.3.1 - Principe

L'importance du rôle structurale des acides gras membranaires dans le contrôle des activités enzymatiques est une idée qui a été développée par Hulbert et Else dans leur théorie du pacemaker membranaire (Hulbert and Else 1999), à partir du modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson (1972). La théorie du pacemaker soutient que l'insaturation globale des acides gras influence l'énergie cinétique des protéines et détermine donc la vitesse des

processus membranaires (Hulbert 2007 ; Hulbert 2008). Une augmentation de la longueur des chaînes d'acides gras et une diminution de l'insaturation de celles-ci diminue la fluidité membranaire. La diminution de la fluidité membranaire est connue pour diminuer l'activité des enzymes transmembranaires et affecter la maintenance des gradients ioniques à travers les membranes (Else and Hulbert 2003 ; Munro and Blier 2012). Mais les chaînes d'acides gras ne sont pas les seules à influencer l'activité des enzymes. La modulation des classes de phospholipides dans l'environnement des protéines membranaires peut être un des mécanismes pour leur régulation (Robinson 1993 ; Stuart et al. 1998 ; Frick et al. 2010). Les deux phénomènes peuvent toutefois se produire simultanément. Par exemple, durant l'adaptation thermique des animaux poïkilothermes (animaux ne contrôlant pas leur température corporelle), des changements métaboliques induisent des modifications de la composition lipidique par des restructurations des têtes polaires des phospholipides et des modifications de l'insaturation des chaînes d'acides gras. Cette adaptation homéovisqueuse permet d'assurer le maintien des fonctions membranaires (Hazel 1995 ; Kraffe et al. 2007 ; Pernet et al. 2007a ; Pernet et al. 2007b ; Pernet et al. 2008).

#### IV.3.2 – Effets de la nutrition : adaptations à l'échelle cellulaire

Outre l'adaptation à la température précédemment évoquée, l'alimentation est un facteur pouvant fortement influencer la composition lipidique des membranes. Une proportion des acides gras ingérés sont intégrés aux phospholipides membranaires, et peuvent donc moduler les activités enzymatiques et les fonctions cellulaires (Senault et al. 1990 ; Leonard et al. 2001 ; Hirunpanich et al. 2007), de même que la prolifération des cellules immunitaires (Pompos and Fritsche 2002 ; Petursdottir and Hardardottir 2007). En particulier, l'effet des acides gras oméga 3 (n-3) a fait l'objet de nombreuses études chez les mammifères, dont les résultats sont parfois contradictoires. Ainsi, Lammi-Keefe et al. (1982) ne signalent aucun effet sur la production de superoxydes dans des granulocytes humains suite à un apport important en EPA, alors que les leukocytes de rats alimentés avec une nourriture riche en EPA et en DHA montrent une diminution de cette production de superoxydes (Carbonell et al. 1997).

Chez les bivalves, on sait aujourd'hui que l'alimentation influence également beaucoup la composition lipidique des tissus, comme l'ont montré un certain nombre d'études réalisées précédemment à Brest (Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1996a ; Soudant et al. 1996c ; Delaporte et al. 2003 ; Delaporte et al. 2005 ; Delaporte et al. 2006 ; Delaporte et al. 2007 ;

González-Araya et al. 2011). Cependant, peu d'études ont mis en relation cette observation avec une modification d'activité cellulaire et/ou subcellulaire. Les travaux de Delaporte (2003) avaient toutefois mis en évidence un lien entre l'alimentation des huîtres et l'activité oxydante dans leurs hémocytes.

#### IV.3.3 - Effets de la nutrition : adaptations à l'échelle subcellulaire

Au niveau subcellulaire, les résultats sont également parfois divergents. Dans des expérimentations de nutrition, Astorg et Chevalier (1991), Lemieux et al. (2008) et Khairallah et al. (2012) n'observent pas de différence d'activité mitochondriale chez le rat malgré d'importants changements dans la composition lipidique des mitochondries, contrairement aux études de Divakaran et Venkataraman (1977), de Yamaoka et al. (1988), et de Barzanti et al. (1994). Dans ces dernières études, les modifications de composition en acides gras dans les mitochondries isolées de foie ou de coeur de rats sont associées à des modifications de phosphorylation oxydative et à des changements d'activités ATPase et de la CCO. La diminution de l'activité de la CCO peut s'expliquer par une modification de composition en acides gras du CL (Yamaoka et al. 1988). Dans la membrane interne de mitochondries, le CL est spécifiquement associé à la CCO et aux autres enzymes de la chaîne respiratoire (Eble et al. 1990 ; Haines and Dencher 2002). Des modifications dans la quantité ou l'intégrité de ce lipide, ou dans la nature de ses chaînes d'acides gras, sont corrélées à des changements d'activité de ces enzymes (Goormaghtigh et al. 1982 ; Robinson 1993 ; Paradies et al. 1997 ; Musatov 2006).

Les expériences de nutrition menées chez le poisson montrent également un fort impact de la composition en acides gras de la nourriture sur la composition lipidique des mitochondries (Guderley et al. 2008 ; Martin et al. 2012). Cependant, seules de mineures modifications d'activité mitochondriale globale (consommation d'oxygène) ou d'activités enzymatiques isolées (complexes de la chaîne respiratoire) sont associées à ces changements de composition lipidique. D'un point de vue écologique, cette stabilité des propriétés fonctionnelles mitochondriales avaient été supposées par les auteurs comme pouvant représenter une adaptation à la nourriture disponible, dont la composition en lipides peut varier en fonction des saisons mais également en fonction de la répartition spatiale. En maintenant leurs fonctions mitochondriales par des modifications régulées de composition en acides gras des phospholipides, les truites préserveraient ainsi leur capacité métabolique contre la variabilité d'acides gras disponibles dans le milieu (Martin et al. 2012).



# **MATERIEL ET METHODES**



## **I. Matériel biologique**

Les huîtres utilisées au cours de ce travail sont des huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) provenant de deux origines différentes. Dans les deux premières expérimentations sur l'effet de différents régimes alimentaires et sur la comparaison entre un conditionnement en éclosérie et en milieu naturel, les huîtres ont été obtenues en Mai 2010 et proviennent d'un même lot dont le naissain a été produit à Arcachon (33120). Pour la troisième étude, sur la comparaison entre l'effet de l'immersion et l'effet de l'émersion, les huîtres ont directement été récoltées sur le lieu de l'expérimentation, à Plouzané (29280), sur le site du Grand Dellec (48° 21'N, 4° 34'W).

## **II. Conditionnement des huîtres**

### **II.1 - Effets de différents régimes alimentaires et comparaison entre le conditionnement en milieu naturel et en éclosérie**

Pour les deux premières expérimentations, 150 huîtres, mesurant de 6 à 8,5 cm de long (moyenne de  $7,3 \pm 0,2$ ) ont été également distribuées dans trois bacs d'une contenance de 800 l chacun alimentés par un flux continu d'eau de mer d'un débit de  $120 \text{ l.h}^{-1}$ , à la station expérimentale d'Argenton (29840 Landunvez, IFREMER, France). Ces bacs ont été alimentés par l'eau de mer partiellement filtrée sur poche ( $10 \mu\text{m}$ ) pompée à mi-profondeur dans le bassin de marée situé à côté du laboratoire, de façon à ce que la température de l'eau dans les bacs soit la même que celle du terrain ( $12^\circ\text{C}$  le 20 Mai et  $16^\circ\text{C}$  le 22 Juin). Les huîtres ont été nourries *ad libitum* avec trois régimes alimentaires différents; *Isochrysis* aff. *galbana*, (clone T-Iso), *Chaetoceros gracilis*, et un mélange de ces deux espèces de microalgues, fournies en volume cellulaire équivalent. Les cultures ont été produites dans des cylindres de 300 l contenant de l'eau de mer passée sur filtre de  $1 \mu\text{m}$  et enrichie avec un milieu de Conway à  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , brassées et aérées avec un mélange air- $\text{CO}_2$  (3%), et sous lumière continue. Les microalgues ont été récupérées en phase exponentielle de croissance (au bout de 6 à 8 jours) afin de nourrir les huîtres soumises aux expérimentations sur les effets de la nutrition (Haberkorn et al. 2010). Ces algues ont été délivrées dans les bacs au moyen de pompes péristaltiques. Pour chaque régime, la concentration en algues a été déterminée une fois par



jour en utilisant un compteur à particules Coulter (Multisizer 3) à l'entrée et à la sortie de chaque bac, comme décrit par González-Araya et al. (2011). La consommation en algues a été calculée en appliquant la formule:  $C = ((C_i - C_o)/C_i) * 100$ , où  $C_i$  = concentration en algues de l'eau entrant dans le tank et  $C_o$  = concentration en algues de l'eau sortant du tank.  $C_i$  et  $C_o$  ont été exprimées en  $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , et  $C$  a été exprimée en pourcentage d'algues consommées. Le débit des pompes a été ajusté de manière à avoir environ  $1500 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$  à la sortie des bacs. Les bacs ont été vidés et nettoyés trois fois par semaine.

En parallèle, 50 huîtres provenant du même lot d'origine ont été placées dans une poche à huîtres, déposée sur un plateau situé au niveau de l'Aber Benoît ( $48^\circ 32'N$ ,  $4^\circ 30'W$ ).

Les échantillonnages ont été effectués au début de l'expérimentation (Mai 2010) et après quatre semaines de conditionnement (June 2010). Le poids des animaux entiers (chaire et coquille) a été mesuré avant d'effectuer les prélèvements d'hémolymphe, les dissections et les préparations mitochondriales.

## **II.2 - Comparaison des effets de l'émersion et de l'immersion**

Quatre-vingt huîtres, mesurant de 6 à 11 cm de long (moyenne de  $8,5 \pm 0,2$ ) ont été ramassées sur une plage située à 10 min du laboratoire, sur le site du Grand Dellec ( $48^\circ 21'N$ ,  $4^\circ 34'W$ ) en Janvier 2012. Les huîtres, encore attachées à leurs pierres, ont été déplacées et rassemblées un peu plus haut sur l'estran, à un point permettant un temps d'immersion d'environ 8 heures, et un temps d'émersion d'environ 4 heures. Ce point de l'estran correspond à la limite supérieure de la répartition des huîtres. De cette façon, à chaque cycle de marée les huîtres subissent un temps d'émersion maximal mais correspondant aux conditions naturelles du milieu.

Un mois plus tard, les huîtres (15 par jour, réparties en 3 pools de 5 huîtres) ont été ouvertes et disséquées sur place, soit à la fin des périodes d'émersion (juste avant que l'eau ne les recouvre), ou d'immersion (juste avant qu'elles ne se retrouvent à l'air libre). Les prélèvements ont été effectués en une semaine : 3 jours pour l'émersion et 2 jours pour l'immersion. Les branchies ont été excisées, transférées dans des tubes en plastique de 50 ml maintenus sur glace et immédiatement transportées au laboratoire pour préparer les suspensions mitochondriales.

### **III. Analyse des paramètres hématocytaires**

Six pools, contenant l'hémolymphe de 5 individus, ont été utilisés pour l'analyse des paramètres hématocytaires.

#### **III.1 - Prélèvement d'hémolymphe**

L'hémolymphe des huîtres a été prélevée grâce à une seringue en plastique de 1 ml équipée d'une aiguille de calibre 25, insérée dans une ébréchure de la coquille réalisée près du muscle adducteur. Les seringues ont été maintenues dans la glace afin d'éviter l'agrégation des hématocytes. Tous les échantillons ont été examinés au microscope pour déceler toute contamination (par des gamètes ou des débris tissulaires par exemple) et ensuite stockés dans des tubes placés dans la glace. Tous les échantillons ont été filtrés à travers une soie de 80 µm avant d'effectuer les analyses afin d'éliminer tous les plus gros débris (>80 µm) qui peuvent potentiellement boucher le cytomètre.

#### **III.2 - Mesure des variables hématocytaires en cytométrie en flux**

La caractérisation des sous-populations d'hématocytes, de leur nombre et de leurs fonctions a été réalisée en utilisant un cytomètre en flux Easy-Cyte-Plus (Guava-Millipore, Billerica, MA, USA) équipé d'un laser argon 488 nm. Deux types de variables hématocytaires ont été évaluées par cytométrie en flux : des variables descriptives (viabilité des hématocytes et comptage des hématocytes totaux et de chaque sous-population), et des variables fonctionnelles (potentiel membranaire mitochondrial, production mitochondriale de superoxyde, production totale d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)).

##### **III.2.1 - Variables descriptives**

Un aliquot de 100 µl d'hémolymphe a été transféré dans un tube contenant une mixture de 200 µl d'une solution anti-aggrégante pour hématocytes, la AASH (Auffret and Oubella 1995) et de 100 µl d'eau de mer filtrée stérile (EMFS). L'ADN des hématocytes a été détecté avec deux colorants fluorescents spécifiques de l'ADN et de l'ARN, le SYBR-Green I (Sigma, St Quentin Fallavier, France, dilué dans du DMSO et utilisé à une concentration finale au 1/1000<sup>ème</sup> de la solution commerciale), et l'iodure de propidium (IP, Sigma, St Quentin Fallavier, France, utilisé à une concentration finale de 10 µg.ml<sup>-1</sup>). Les tubes ont été incubés à l'obscurité pendant 120 min à 18°C avant analyse en cytométrie en flux. L'IP pénètre seulement dans les hématocytes ayant perdu leur intégrité membranaire et étant considérés

comme des cellules mortes, alors que le SYBR-Green I pénètre aussi bien dans les cellules mortes que vivantes. La fluorescence du SYBR-Green et de l'IP ont été mesurées à des longueurs d'onde de  $525\pm 15$  nm (vert) et de  $680\pm 15$  nm (rouge) respectivement, par cytométrie en flux. En comptant les cellules colorées par l'IP et celles colorées par le SYBR Green, il a ainsi été possible d'estimer le pourcentage de viabilité dans chaque échantillon. Toutes les cellules colorées au SYBR Green ont été visualisées sur un cytogramme faisant apparaître le Forward Scatter (FSC, correspondant à la taille des cellules) et le Side Scatter (SSC, correspondant à la complexité cellulaire). Deux sous-populations ont été identifiées en fonction de leur taille et de leur complexité cellulaire (ou granularité). Les granulocytes sont caractérisés par un haut FSC et un haut SSC, tandis que les hyalinocytes ont un haut FSC mais un SSC bas. La concentration des hémocytes totaux, des granulocytes et des hyalinocytes ont été estimés par le débit de mesure du cytomètre en flux (Marie et al. 1999) étant donné que tous les échantillons ont été passés pendant 30 s.

### III.2.2 - Variables fonctionnelles

*III.2.2.1 - Activité oxydante:* la méthode utilise le diacétate de 2',7'-dichlorofluorescéine (DCFH-DA, D6883 Sigma) en accord avec Lambert et al. (2003). Un aliquot de 100  $\mu$ l d'hémolymphe a été dilué avec 300  $\mu$ l d'EMFS. La solution de DCFH-DA (concentration finale de 10  $\mu$ M) a ensuite été ajoutée à chaque tube, maintenus sur glace, puis les tubes ont été incubés à 18°C pendant 120 min à l'obscurité. Après la période d'incubation, la fluorescence du DCF, quantitativement relié à la production des ERO des hémocytes, a été mesurée à  $525\pm 15$  nm par cytométrie en flux. Pendant l'incubation, le DCFH-DA diffuse à l'intérieur des hémocytes, où le groupe acétate (-DA) est éliminé par les enzymes estérases, ce qui a pour conséquence de piéger le DCFH à l'intérieur de la cellule. Le DCFH intracellulaire est oxydé par les hémocytes en une molécule très fluorescente, la 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF, qui émet une fluorescence à 530 nm). L'oxydation intracellulaire du DCFH est quantitativement reliée à l'activité oxydante des cellules et est dans un premier temps médié par le  $H_2O_2$  mais aussi par d'autres molécules oxydantes comme l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical peroxy ( $ROO^\cdot$ ) et l'anion peroxydrite ( $ONOO^-$ ) (Haugland 2002). L'oxydation du DCFH en DCF a été mesurée par cytométrie en flux à 530 nm.

*III.2.2.2 - Production mitochondriale d'anions superoxydes:* le MitoSOX™ (Molecular Probes, Invitrogen), utilisé à une concentration finale de 5  $\mu$ M, a été ajouté à un aliquot de 100  $\mu$ l d'hémolymphe et a été dilué avec 300  $\mu$ l d'EMFS pour mesurer la

production d'anions superoxydes ( $O_2^-$ ) dans les mitochondries. Le MitoSOX™ pénètre dans les cellules vivantes et entre rapidement et sélectivement dans les mitochondries. Une fois dans les mitochondries, le MitoSOX™ est oxydé par le  $O_2^-$  et émet une fluorescence jaune/orange (max 580 nm). Le MitoSOX™ est spécifiquement oxydé par le  $O_2^-$  mais pas par les autres espèces réactives de l'oxygène (ERO), ni par les espèces réactives de l'azote (ERN) (Mukhopadhyay et al. 2007). Les échantillons ont ensuite été incubés à 18°C pendant 120 min à l'obscurité et ont été analysés à  $583\pm 13$  nm par cytométrie en flux.

*III.2.2.3 - Potentiel membranaire mitochondrial:* l'estimation du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\psi_m$ ) a été réalisé à partir de 100  $\mu$ l d'hémolymphe, dilué avec 100  $\mu$ l d'EMFS, et mélangé sur glace à du JC-10 (Interchim) ajouté à une concentration finale de 5  $\mu$ M. Le JC-10 est une sonde fluorescente pouvant diffuser librement à travers les membranes et qui entre spécifiquement dans les mitochondries. En fonction du  $\Delta\psi_m$  – mais pas du  $\Delta$ pH – il existe sous deux formes, en monomères ou en agrégats. La forme monomérique prédomine dans les mitochondries ayant un  $\Delta\psi_m$  bas, et émet dans le vert (525-530 nm) tandis que les agrégats se forment et s'accumulent dans les mitochondries ayant un fort  $\Delta\psi_m$ , et émettent dans l'orange (590 nm). Les deux formes (monomères et agrégats) peuvent changer de manière réversible. Après 30 min d'incubation à 18°C dans l'obscurité, l'intensité de fluorescence des monomères ou des agrégats du JC-10 est quantifiée, respectivement, par les détecteurs Green ( $525\pm 15$  nm) et Yellow ( $583\pm 13$  nm) du cytomètre en flux. Le ratio agrégats/monomères est proportionnel au potentiel membranaire mitochondrial (Donaghy et al. 2012).

## **IV. Activité reproductrice**

### **IV.1 - Prélèvement des tissus et inclusion en paraffine**

Pour chaque huître, une tranche de masse viscérale d'environ 2-3 mm d'épaisseur a été découpée, juste en amont du muscle adducteur. Celle-ci a ensuite été placée dans une cassette d'inclusion, laquelle a été plongée immédiatement dans une solution de Davison modifiée (pour 1 litre : 500 ml d'eau DEPC (1 l d'eau distillée + 1 ml DEPC, puis autoclavage du mélange 24 h après), 300 ml de formol (formaladéhyde 40% - CarloErba – 415682), 150 ml d'éthanol absolu (VWR – 20.820.464), et 50 ml d'acide acétique glacial (CarloErba –

401422) ajouté extemporanément) pendant 48 h. Cette solution est un fixateur, qui permet la conservation des structures et le durcissement des pièces. L'inclusion des coupes ainsi fixées s'est faite grâce à un automate à inclusion (histokinette) programmable. Les coupes ont d'abord été déshydratées par passage dans des bains successifs d'alcool de degré croissant (éthanol 80 % pendant 1h, puis trois bains successifs d'éthanol 95% pendant 2 h, 2 h et 1 h, et trois bains successifs d'éthanol 100% pendant 2 h, 2 h et 1 h), puis passées dans deux bains successifs (1 h et 2 h) d'un agent clarifiant, le Claral<sup>®</sup>. Enfin, les coupes ont été plongées dans deux bains de 2 h chacun dans de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide. Après refroidissement, un bloc de paraffine, dur, a été obtenu, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées au microtome, montées sur des lames de microscope et incubées à 37°C pendant une nuit afin que les coupes adhèrent bien aux lames de verre.

#### **IV.2 - Coloration des coupes et montage**

Les coupes ont ensuite été colorées par la coloration hématoxyline–éosine Y (Martoja-Pierson and Martoja-Pierson 1967), qui fait agir successivement un colorant nucléaire basique, l'hématoxyline, et un colorant cytoplasmique acide, l'éosine. Les noyaux apparaissent alors en bleu à bleu noir et les cytoplasmes rose à rouge. Les colorants ont été conservés à l'abri de la lumière et filtrés avant chaque utilisation. Les coupes ont d'abord été plongées dans deux bains successifs de Claral<sup>®</sup> (5 min chacun), puis dans deux bains successifs d'éthanol 100% (5 min chacun), dans un bain d'éthanol 96% (5 min), d'éthanol 70% (5 min), puis d'eau distillée (5 min), avant d'être colorées à l'hématoxyline (2 min 30). Les coupes ont ensuite été lavées dans un bain d'eau courante (3 min), puis plongées dans un bain d'eau acétifiée 1% (2 min), colorées à l'éosine (3 min), et plongées dans un bain d'éthanol 96% (5 min), d'éthanol 100% (5 min), puis dans deux bains successifs de Claral<sup>®</sup> (5 min chacun).

#### **IV.3 - Analyse qualitative du stade de la gamétogenèse**

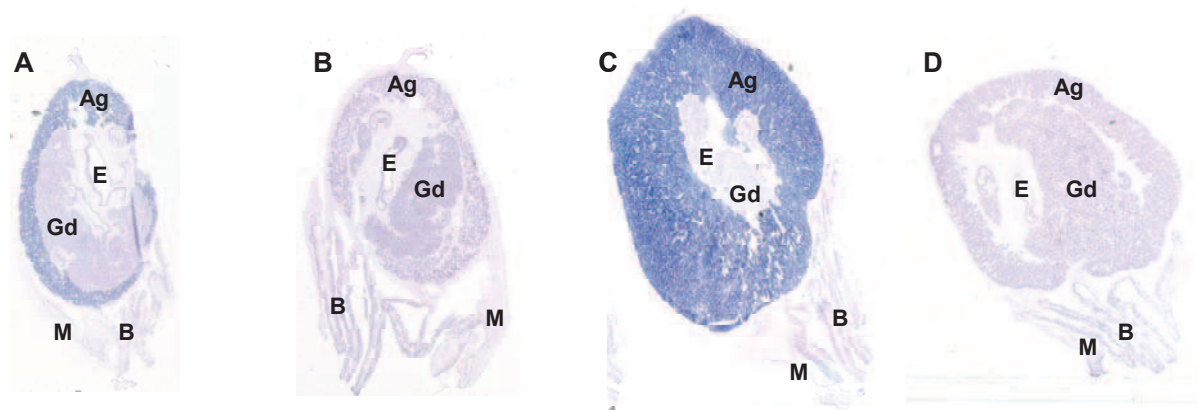
Après séchage, les lames ont été examinées en microscopie optique pour déterminer le sexe et le stade de développement gonadique des individus, selon l'échelle de reproduction rapportée par Mann (1979). Dans cette échelle, cinq stades sont définis:

- stade 0 (inactif) : aucune trace de sexualité; follicules absents ou allongés et consistant en un épithélium germinale indifférencié.

- stade 1 (gamétogenèse précoce) : les follicules sont petits et isolés avec de nombreuses spermatogonies ou oogonies.
- stade 2 (gamétogenèse tardive) : les follicules se développent activement, présence de gamètes primaires et de quelques spermatozoïdes et oocytes libres (secondaires).
- stade 3 (maturité) : follicules matures ou presque, densément tassés, avec des gamètes matures; présence d'oocytes avec un noyau et un nucléole distincts, les spermatozoïdes sont orientés avec leurs queues tournées vers le lumen du follicule.

#### IV.4 - Analyse quantitative de l'aire d'occupation de la gonade

Le pourcentage d'occupation gonadique a été déterminé sur chaque section histologique comme décrit par Enríquez-Díaz et al. (2009). Les lames ont été scannées avec un scanner digital (hp scanjet 7400c). L'aire de la gonade a été mesurée en utilisant un logiciel d'analyse d'images (Imaq Vision Builder, National Instruments Corp.).



**Figure 18** : Coupes histologiques de *C. gigas* mâles (A et C) et femelles (B et D) après coloration à l'hématoxyline-éosine Y, et correspondant à des individus au stade 2 de la gamétogenèse (A et B) ou au stade 3 de la gamétogenèse (C et D). Ag : aire gonadique ; E : estomac ; Gd : glande digestive ; B : branchies ; M : manteau.

#### V. Paramètres fonctionnels mitochondriaux

L'isolement des mitochondries s'est faite à partir des branchies car celles-ci ont un rôle majoritaire dans la capture de la nourriture et de l'oxygène, et ont une fonction métabolique importante dans la régulation des échanges d'ions. Chaque pool de branchies (5 individus par pool) contenaient en moyenne  $2,5 \pm 0,1$  g de tissu (pour les deux premières expérimentations) ou  $3,2 \pm 0,2$  g de tissu (pour la troisième expérimentation).

## **V.1 - Isolement des mitochondries**

Les procédures d'isolement et de mesures mitochondriales ont été adaptées de Kraffe et al. (2008). Toutes les manipulations ont été faites sur glace et les centrifugations ont été faites à 4°C, l'ensemble prenant environ 1 h. Les branchies des huîtres ont été excisées, séchées sur papier absorbant, poolées et pesées. Une partie a été plongée dans l'azote liquide puis stockée à -80°C pour d'ultérieures analyses de lipides et mesures d'activité de la citrate synthase. Le reste a été haché aux ciseaux, et rincé deux fois sur soie de 80 µm avec 2 ml de tampon d'isolement contenant 300 mM de sucrose, 30 mM d'HEPES, 100 mM de KCl, 8 mM d'EGTA et 1% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma - P2714), le tout ajusté à pH 7,5. Le jour de l'expérimentation, 0,5% d'albumine de serum bovin dépourvue d'acides gras (BSA fraction V fatty acid free, Sigma - A6003) a été extemporanément ajouté au tampon. Les branchies ainsi hachées ont ensuite été homogénéisées avec trois séries de trois passages dans un broyeur de tissu Potter motorisé (Heidolph, Kelheim, Germany), à vitesse 3 et avec un pilon lâche, dans 10 volumes de tampon d'isolement froid conservé sur glace. L'homogénat a été centrifugé à 900 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été collecté, filtré sur soie de 80 µm, et centrifugé une nouvelle fois à 900 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant résultant, considéré comme étant dépourvu de cellules entières ou de débris cellulaires, a été centrifugé à 10 000 g. Le culot mitochondrial a été remis en suspension dans un volume de tampon de réaction (400 mM de sucrose, 10 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM d'HEPES, 90 mM de KCl, 50 mM de taurine, 50 mM de β-alanine, ajusté à pH 7,5, avec 0,5% de BSA ajoutée extemporanément le jour de l'expérimentation) correspondant au dixième de la masse de tissu branchial (soit un volume de tampon compris entre 250 µl et 300 µl en moyenne), et a été utilisé immédiatement pour mesurer la consommation d'oxygène et la production d'ATP. Une partie a été congelée à -80°C pour d'ultérieures mesures d'activités enzymatiques.

## **V.2 - Mesure de la consommation d'oxygène**

La consommation d'oxygène mitochondriale a été mesurée à l'aide de chambres polarographiques (Qubit System, Kingston, Ontario, Canada). La température a été maintenue à 10°C par la circulation d'eau réfrigérée générée par un bain thermostaté (Julabo F25). Pour chaque mesure, environ 0,8 mg de protéines mitochondriales (correspondant à 40 µl de préparation mitochondriale) a été ajouté à 0,4 ml de tampon de réaction contenant 400 mM de sucrose, 30 mM d'HEPES, 90 mM de KCl, 10 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM de taurine et 50 mM

de  $\beta$ -alanine, ajusté à pH 7,5. Le jour de l'expérimentation, 0,5% de BSA a été extemporanément ajouté au milieu réactionnel.

Du glutamate (40 mM) ou du succinate (20 mM) a été utilisé afin de mesurer les capacités oxydatives maximales. Le glutamate permet de mesurer la consommation d'oxygène correspondant à un flux d'électrons passant par les complexes I, III et IV, tandis que le succinate permet de créer un flux d'électrons passant par les complexes II, III et IV. Néanmoins, avec ce substrat, des électrons passant par le complexe II peuvent également se diriger vers le complexe I (Liu et al. 2002). L'ajout de roténone, un inhibiteur du complexe I, empêche ce retour en arrière du flux d'électrons. Toutefois, des études comme celles de Sommer and Pörtner (2004) et de Frick et al. (2008) ont montré que l'addition de roténone n'avait que peu ou pas d'influence sur la consommation mitochondriale en oxygène lorsque le succinate était utilisé comme substrat. De même, Pichaud et al. (2010) n'utilisent pas de roténone pour plus de cohérence avec les études antérieures réalisées sur les invertébrés marins. C'est pourquoi, dans notre étude, nous n'avons pas utilisé de roténone lors des mesures d'oxydation du succinate. Des essais préliminaires ont montré que le glutamate seul stimule la respiration via le complexe I, comme précédemment montré chez *Crassostrea virginica* (Burcham et al. 1983). Ces essais ont également montré que 40 mM de glutamate et 20 mM de succinate représentent des concentrations saturantes dans les conditions d'expérimentation de cette étude (données non montrées).

Le taux de respiration maximale (stade 3) a été obtenu après addition d'ADP à une concentration finale de 600  $\mu$ M.

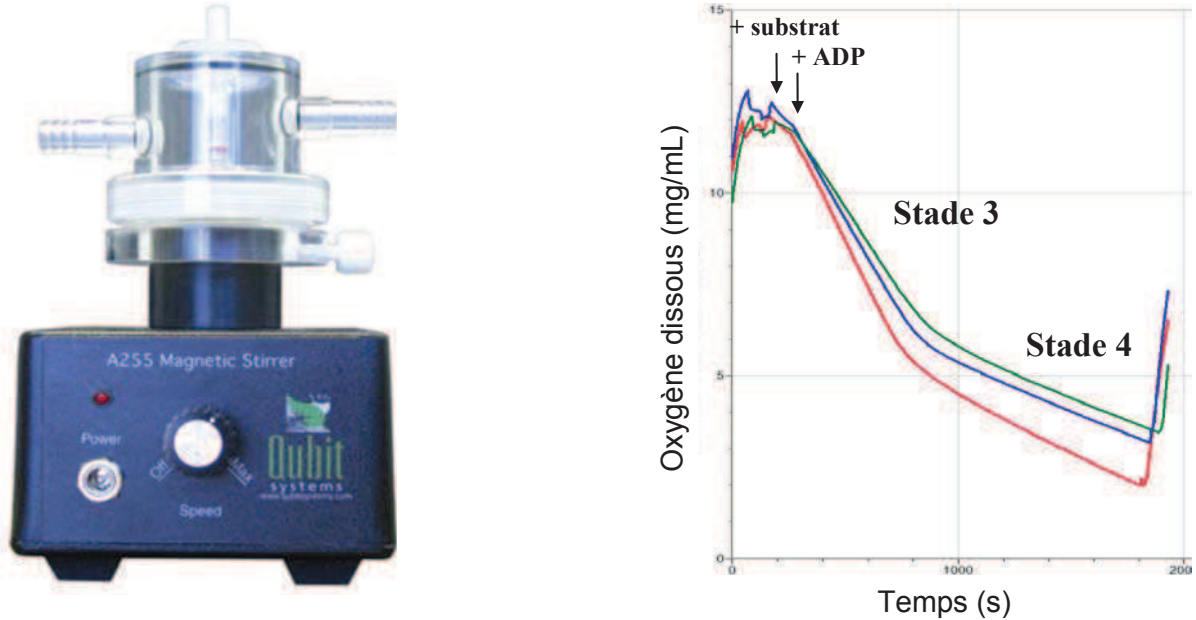
Le taux de consommation d'oxygène non phosphorylante (stade 4) a été mesuré après la consommation de tout l'ADP.

Dans le cadre de la dernière expérimentation, de l'oligomycine (concentration finale de 6,3  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>), un inhibiteur spécifique de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATP-synthase, a été ajoutée afin d'évaluer la consommation d'oxygène en absence de phosphorylation oxydative (state 4<sub>oligo</sub>) (Nesci et al. 2012).

Chaque mesure a été faite en triplicat (pour les expérimentations sur l'effet de différents régimes alimentaires et sur la comparaison entre un conditionnement en éclosérie et en milieu naturel) ou en duplicat (pour la comparaison entre l'effet de l'immersion et l'effet de l'émersion) avec trois chambres polarographiques. Le RCR (ratio du contrôle respiratoire) a



été défini comme étant le ratio entre le stade 3 et le stade 4. L'efficacité de phosphorylation oxydative (relation entre l'ADP ajouté et l'oxygène consommé) a été calculée avec le ratio ADP/O en accord avec Estabrook (1967).



**Figure 19** : Chambre polarographique utilisée dans cette étude (à gauche) et exemple de tracés obtenus lors du suivi de la consommation en oxygène d'une préparation mitochondriale, suite à l'ajout de substrat (glutamate ou succinate) et d'ADP (à droite). Les trois tracés correspondent à un même essai réalisé dans trois chambres polarographiques en simultané.

### V.3 - Flux maximal à travers les complexes I à IV, II à IV, et à travers le complexe IV

La consommation d'oxygène correspondant au flux d'électrons maximal à travers les complexes I à IV, II à IV, et à travers le complexe IV, a été mesurée le jour même de l'isolement des mitochondries à l'aide des mêmes chambres polarographiques. La température a également été maintenue à 10°C. Pour chaque mesure, environ 0,8 mg de protéines mitochondriales (correspondant à 40 µl de préparation mitochondriale) a été ajouté à 0,4 ml de tampon de réaction décrit dans la section V.2.

Le carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) est un agent découplant qui agit comme un ionophore (pore pour les ions). Lorsqu'il se trouve dans la membrane interne des mitochondries, celui-ci permet le retour des protons dans la matrice mitochondriale sans passer par la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATP-synthase, ce qui a pour conséquence de dissiper le potentiel

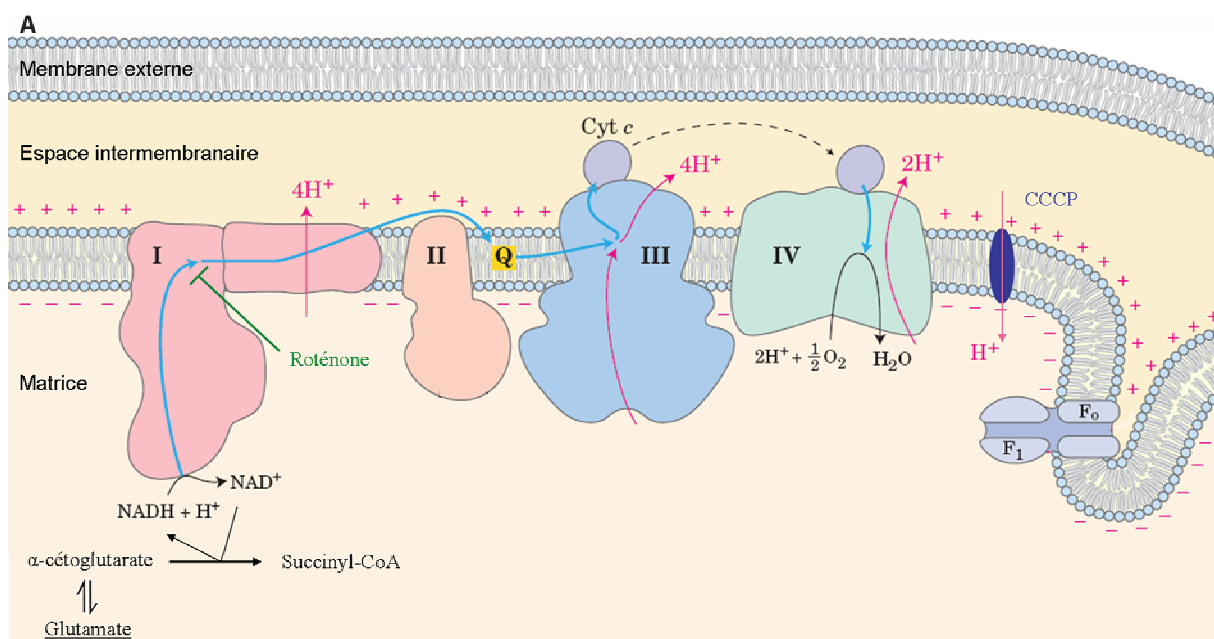
membranaire mitochondrial sans induire de production d'énergie. Cependant, le CCCP n'affecte pas directement l'oxydation des substrats de la chaîne respiratoire (Ivanina et al. 2012). Ce découplage entre le transfert des électrons et la production d'ATP par la  $F_0F_1$ ATP-synthase permet un flux maximal d'électrons à travers les complexes de la chaîne respiratoire (Goldsby and Heytler 1963). Le CCCP (20  $\mu$ M) a donc été utilisé afin de mesurer la consommation d'oxygène liée à ce flux maximal. Les mesures ont été effectuées en absence d'ADP.

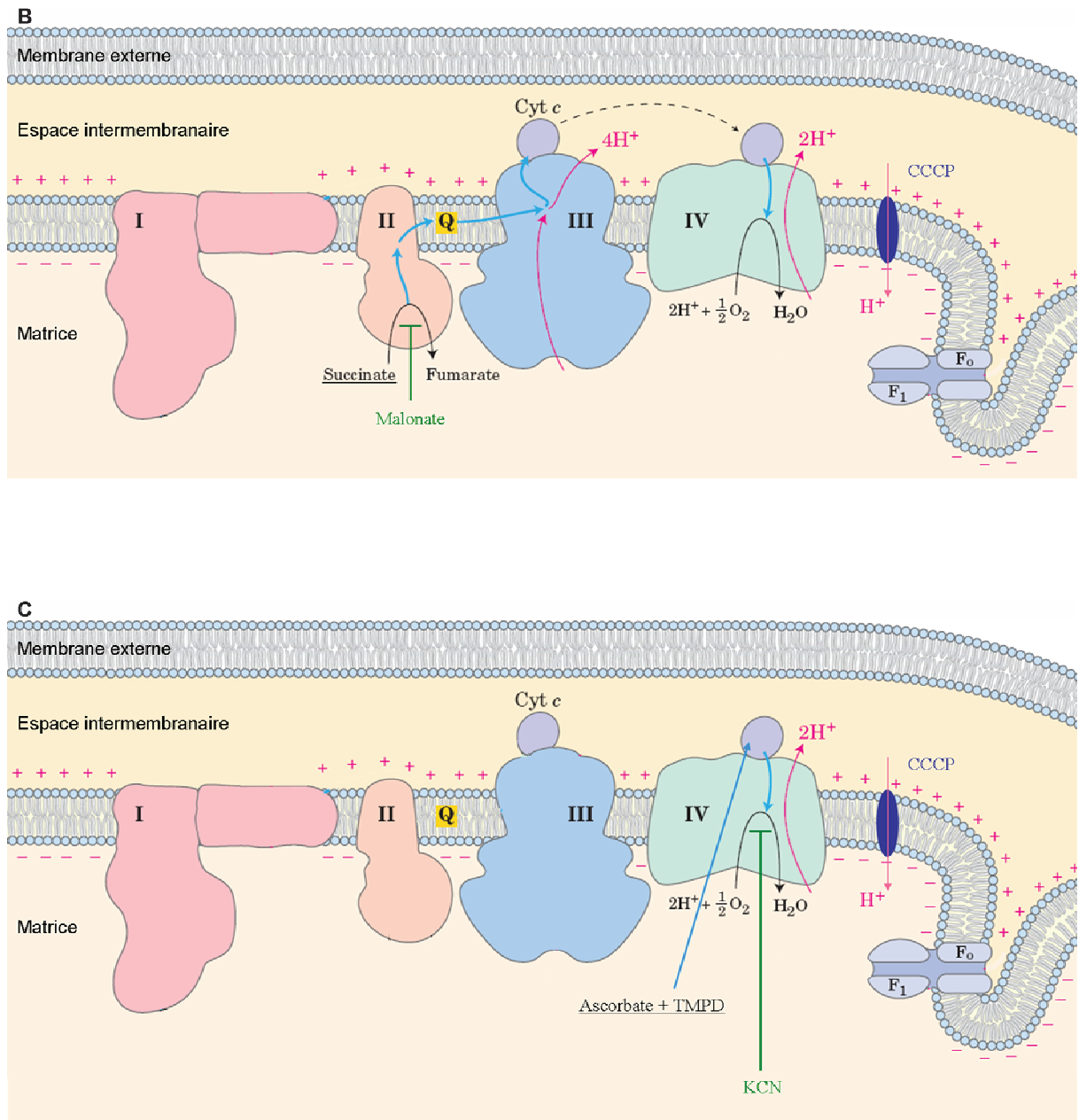
La consommation due au flux à travers les complexes I à IV a été estimée à partir de l'oxydation du glutamate (40 mM) (Figure 20A).

Après inhibition du complexe I par la roténone (2  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>), du succinate (20 mM) a été ajouté pour stimuler un flux d'électrons à travers les complexes II à IV (Figure 20B).

Le complexe II a ensuite été inhibé par du malonate (1 mg.ml<sup>-1</sup>), puis, comme illustrée par la Figure 20C, le flux d'électrons à travers le complexe IV (CCO) a été mesuré suite à l'ajout d'ascorbate (10 mM) et de *N,N,N',N'*-tetraméthyl-*p*-phénylène-diamine (TMPD, 2 mM) (Martin et al. 2012). L'ajout de cyanure (KCN, 32  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) inhibe totalement la consommation d'oxygène par la CCO, ce qui prouve qu'il n'y a pas d'auto-oxydation du TMPD en présence d'ascorbate.

La roténone inhibe environ 65% de la consommation d'oxygène lorsque le glutamate est utilisé comme substrat, et le malonate inhibe 90% de la consommation d'oxygène quand le succinate est ensuite utilisé comme substrat (données non montrées).





**Figure 20 :** Substrats (en soulignés) et inhibiteurs (en vert) utilisés au cours de cette étude, et leurs actions au niveau de la chaîne respiratoire. Le transfert des électrons à travers les quatre complexes (I, II, III et IV), l'ubiquinone (Q) et le cytochrome *c* (Cyt *c*) est schématisé en flèches bleues. En flèches roses sont indiquées les pompes de protons (H<sup>+</sup>) à travers la membrane interne, et le retour de ceux-ci dans la matrice via le pore formé par le CCCP.

L'oxydation du glutamate permet de créer un flux d'électrons à travers les complexes I, III et IV (A). La roténone bloque ce flux. L'oxydation du succinate permet de créer un flux d'électrons à travers les complexes II, III et IV, flux pouvant être bloqué par le malonate (B). L'ascorbate et le TMPD fournissent directement des électrons au complexe IV et permettent donc de mesurer le flux d'électrons à travers ce complexe (C). Le KCN bloque le flux d'électrons au niveau du complexe IV. Adapté de Nelson and Cox (2008).

## **VI. Concentrations en cytochromes et en protéines**

### **VI.I - Mesure de la concentration des cytochromes**

La concentration des cytochromes *a*, *b*, *c*<sub>1</sub>, et *c* a été quantifiée par différents spectres en accord avec Leary et al. (2003), excepté qu'ici 40 µl de suspension mitochondriale (environ 0.8 mg de protéines mitochondriales) ont été dilués dans 960 µL de tampon phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 50 mM, pH 7,8 à 25°C) sans ajout de Triton-X. Les complexes de la chaîne de transfert d'électrons ont été réduits en ajoutant quelques grains de dithionite (Sigma - 15,795-3) directement dans la cuve de spectrophotométrie et en incubant celle-ci 15 min à température ambiante. Le spectre des échantillons ainsi réduits a été soustrait à celui des échantillons oxydés à l'air libre, tous deux obtenus après lecture entre 400 et 630 nm. La concentration individuelle de chaque cytochrome a été déterminée à partir d'équations simultanées en accord avec Williams Jr. (1964).

### **VI.II - Mesure de la concentration en protéines**

Des aliquots de 20 µl de préparations mitochondriales ont été mis en suspension dans du tampon de réaction ne contenant pas de BSA et ont été centrifugés à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot remis en suspension, lavé et centrifugé encore deux fois de suite afin d'éliminer complètement la BSA. Les culots ont été maintenus dans 0,5 ml d'eau milli Q et stockés à -80°C pour une analyse ultérieure. La concentration en protéines a été déterminée avec le RC DC Protein Assay Kit (BIORAD) en utilisant la BSA comme standard.

## **VII. Production d'ATP**

### **VII.1 - Mises au point**

La production d'ATP a été déterminée grâce au kit ATP LITE-M 300 Assay Kit (6016943 Perkin Elmer), en utilisant un protocole légèrement différent de celui indiqué par le fabricant. Une étape de mises au point a été nécessaire afin de mesurer au mieux cette production d'ATP et est détaillée ci-après.

### VII.1.1 - Vérification des blancs de mesure

Tout d'abord, il a été vérifié que la turbidité des échantillons induite par la forte concentration des mitochondries n'avait pas d'influence sur la détermination de la quantité d'ATP produit. Malgré une luminescence plus élevée lorsque le blanc de mesure comprend des mitochondries, celle-ci n'est pas assez importante pour biaiser les valeurs d'ATP produit. De même, des blancs de mesure avec substrat ou ADP ont été comparés à des blancs réalisés avec du tampon. Là aussi, malgré une luminescence plus élevée avec le substrat et l'ADP, les valeurs correspondent à une quantité d'ATP – déterminée grâce à une gamme étalon – négligeable.

### VII.1.2 - Recherche d'une consommation d'ATP

Nous avons cherché à savoir si l'ATP produit pouvait être immédiatement consommé par les mitochondries. Les résultats de la production d'ATP pourraient être sous-estimés par la présence d'une activité ATPase (menant à une hydrolyse d'ATP). En effet, il n'est pas exclu que la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ou d'autres ATPases non-mitochondriales soient présentes dans les préparations mitochondriales, même s'il a été démontré que ces enzymes ont une très faible activité dans des préparations similaires réalisées à partir de rein ou de cerveau de rat (Malis and Bonventre 1986 ; Zheng and Ramirez 1999). Les ATPases non-mitochondriales peuvent être inactivées par l'EDTA (Rustin et al. 1994). Nous avons donc voulu ajouter ce produit au tampon de réaction des mitochondries afin d'inhiber les ATPases contaminantes. Avec EDTA, la quantité d'ATP produit est apparue huit fois inférieure comparée au même échantillon sans EDTA. Toutefois, la présence d'EDTA dans le tampon de réaction ne permet pas de mesurer correctement la consommation d'oxygène. Il semblerait en effet qu'il y ait un découplage entre la respiration et la production d'ATP dans ces échantillons. Ceci nous amener à abandonner l'idée d'utiliser l'EDTA afin d'inhiber de possibles ATPases contaminantes.

Outre les éventuels systèmes consommant de l'ATP dans les préparations mitochondriales, la  $\text{F}_0\text{F}_1$ ATP-synthase est connue pour disposer d'un mécanisme moléculaire rotatif bifonctionnel, capable de ré-énergiser la membrane par hydrolyse d'ATP (Nesci et al. 2012). De plus, la production et la consommation d'ATP sont régulées par le ratio ATP/ADP (Drew and Leeuwenburgh 2003), paramètre difficilement contrôlable dans ce genre de mesures. Ceci nous a amené à considérer la production d'ATP mesurée comme étant un résultat global de la production et de la consommation d'énergie.

### VII.1.3 - Essais de mesures après inhibition de la réaction

Pour savoir si la production d'ATP des échantillons pouvait être stoppée et analysée ultérieurement, des essais ont été réalisés en stimulant la production d'ATP dans une préparation mitochondriale (ajout de succinate 20 mM et d'ADP 0,3 mM) et en stoppant la réaction deux minutes après en plongeant l'échantillon dans l'azote liquide ou en ajoutant du sulfoxyde de diméthyle (DMSO), comme suggéré par Tardy et al. (2008). Mais les valeurs obtenues montrent quelques problèmes de reproductibilité. D'autres résultats ont de plus montré que le DMSO et l'azote liquide n'inhibent pas, du moins pas complètement, la production d'ATP. En effet, un mélange composé de préparation mitochondriale et de succinate mis dans du DMSO ou congelé dans l'azote liquide montre quand même une production d'ATP lorsqu'on lui ajoute de l'ADP. L'ensemble de ces résultats nous a suggéré d'utiliser un protocole plus adapté à nos mesures.

### VII.1.4 - Mise au point d'une mesure en cinétique

Contrairement au fabricant, qui préconise une utilisation en point final, nous avons cherché à voir comment évoluait la production d'ATP au cours du temps. Nous avons donc ajouté les mitochondries avec du substrat (du succinate à 20 mM a été utilisé pour toutes les mesures de production d'ATP) à l'ensemble des produits du kit nécessaire à la détermination de la quantité d'ATP, mais le tampon de lyse a été remplacé par du tampon de réaction afin de préserver l'intégrité des mitochondries. La luminescence a été suivie pendant cinq minutes, au cours desquelles aucune production d'ATP n'a été observée, puis l'ADP (0,6 mM) a été ajouté aux échantillons afin de stimuler la phosphorylation oxydative. Suite à cet ajout d'ADP, la quantité d'ATP augmente très rapidement pendant trois à quatre minutes, avant d'arriver à un plateau. Il a été montré une bonne proportionnalité entre la vitesse de production d'ATP et la quantité de préparation mitochondriale dans les échantillons.

### VII.1.5 - Inhibition de la production d'ATP

Des inhibiteurs ont ensuite été testés afin de différencier la production d'ATP liée à la phosphorylation oxydative de la mitochondrie (dépendante de l'activité de la  $F_0F_1$ ATP-synthase et de l'ANT, le transporteur ADP/ATP) de celle due à l'activité d'autres mécanismes mitochondriaux ou de contaminants cellulaires. Lorsqu'ils sont ajoutés aux échantillons, l'oligomycine (inhibiteur de la  $F_0F_1$ ATP-synthase) et le carboxyatractyloside (CAT, inhibiteur de l'ANT), ne bloquent que partiellement la synthèse d'ATP. Ceci a déjà été observé pour

l'oligomycine (Drew and Leeuwenburgh 2003), qui ne bloque que le domaine responsable du pompage de protons ( $F_0$ ), et non le domaine catalytique ( $F_1$ ).

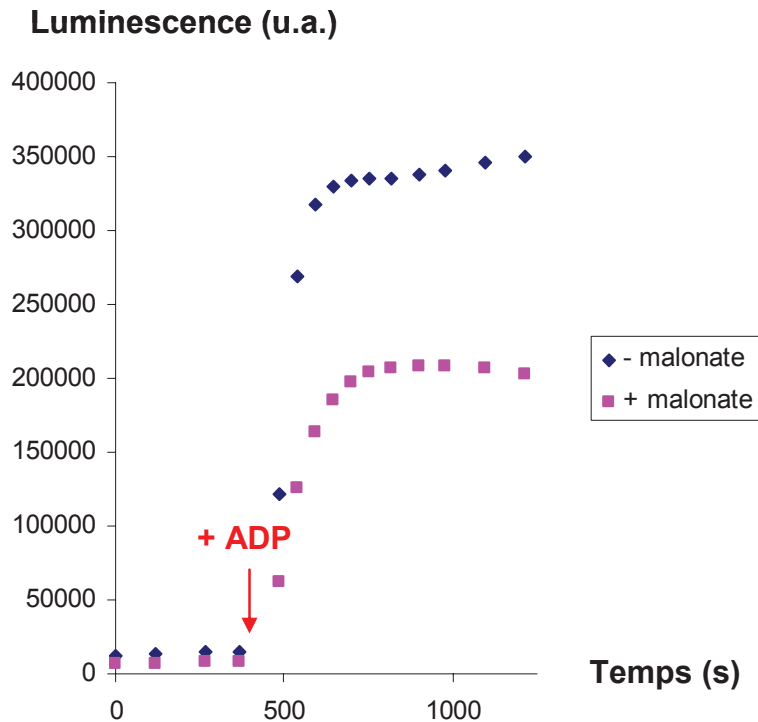
En complément, nous avons testé l'effet du malonate. Le malonate est un inhibiteur spécifique du complexe II, lequel reçoit des électrons provenant de l'oxydation du succinate. Le potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\psi_m$ ), représentant la force nécessaire à la synthèse d'ATP par la  $F_0F_1$ ATP-synthase, peut être inhibé par le malonate *via* l'inhibition de l'oxydation du substrat au niveau du complexe II (Hinkle et al. 1991 ; Ivanina et al. 2012). Dans nos mesures, une inhibition de la consommation d'oxygène supérieure à 90% a été observée en stade 3 (ADP 0,6 mM) en ajoutant du malonate (10 mM) aux préparations mitochondriales lorsque le succinate (20 mM) est utilisé comme substrat. Là aussi, on obtient avec ce produit une inhibition partielle de la production d'ATP, de même ordre de grandeur que l'inhibition avec le CAT.

L'inhibition seulement partielle de la production d'ATP avec tous les inhibiteurs testés indique qu'une partie de l'ATP produit dans nos préparations mitochondriales provient de mécanisme(s) non lié(s) à la phosphorylation oxydative (voir Chapitre III). L'utilisation du malonate permet d'inhiber la production d'ATP spécifiquement dépendante de la phosphorylation oxydative.

## VII.2 - Protocole

Ces mises au point nous ont permis de définir un protocole qui nous semblait le mieux adapté pour mesurer la production d'ATP dans les préparations mitochondriales à partir du kit ATP LITE-M 300 Assay Kit (6016943 Perkin Elmer). Les préparations mitochondriales, gardées sur glace, ont d'abord été pré-incubées pendant une minute avec ou sans malonate (10 mM). Du succinate (20 mM) a ensuite été ajouté aux échantillons. Dans une microplaque 96 puits, 100  $\mu$ l de cette préparation ont été ajoutés à 50  $\mu$ l de tampon de réaction décrit précédemment (voir section V.2) et à 50  $\mu$ l de la solution substrat fournie par le kit. En parallèle, une gamme étalon a été préparée à partir d'une série de dilutions d'une solution mère d'ATP comme indiqué par le fabricant, excepté que la solution de lyse a été remplacée par du tampon de réaction. La luminescence des échantillons a été suivie à 25°C toutes les 2 min pendant 8 min. Après ajout d'ADP 0,6 mM, la luminescence a été enregistrée toutes les 50 s pendant 15 min. Toutes les mesures (gamme étalon et échantillons) ont été faites en triplicats. Le taux de production d'ATP a été déterminé dans la partie linéaire de la courbe, en reportant la quantité d'ATP produit par unité de temps. Les valeurs obtenues avec les échantillons incubés sans

malonate correspondent à la production d'ATP totale des échantillons, tandis que les valeurs de ceux incubés avec le malonate correspondent à une production d'ATP non dépendante de la phosphorylation oxydative. La quantité d'ATP produit par les mitochondries au niveau de la  $F_0F_1$ ATP-synthase se calcule donc en faisant la différence de ces deux valeurs.



**Figure 21 :** Production d'ATP dans une préparation mitochondriale incubée avec succinate 20 mM, et avec (carrés roses) ou sans (losanges bleus) malonate 10 mM, suite à l'ajout d'ADP 0,6 mM.

## VIII. Activités enzymatiques

### VIII.1 - Cytochrome *c* oxydase (CCO)

La mesure de l'activité de la CCO à partir des préparations mitochondriales a été adaptée de Bouchard and Guderley (2003) et de Kraffe et al. (2008). Les préparations mitochondriales ont été soumises à deux cycles de congélation (à  $-80^{\circ}\text{C}$ ) et de décongélation. Les mitochondries ainsi fragmentées ont été diluées dans un tampon de réaction phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$  à 50 mM, pH 7,8 à  $25^{\circ}\text{C}$ ). Le cytochrome *c* bovin (cyt *c* Sigma - C2037) a été employé comme substrat pour stimuler l'activité maximale de la CCO. La solution de cyt *c* réduite a été préparée en ajoutant quelques grains de dithionite (Sigma - 15,795-3) à une solution de cyt *c* 600  $\mu\text{M}$ . Pour éviter l'excès de dithionite, de petites quantités d'une solution mère de cyt *c* réduit ont été ajoutées à une solution de cyt *c* oxydée et l'absorbance a été mesurée à 550 nm afin d'obtenir une absorbance comprise entre 90% et



95% de l'absorbance de la solution mère de cyt *c* réduit. La réaction a été faite en microplaque, en mettant 20  $\mu\text{l}$  d'échantillon en présence de 180  $\mu\text{l}$  de la solution de cyt *c* réduite diluée neuf fois dans du tampon phosphate. La décroissance de l'absorbance, qui correspond à la diminution de l'état réduit du cyt *c*, celui-ci transférant ces électrons à la CCO, a été suivie à 550 nm pendant 10 min à 25°C.

Toutes les mesures ont été faites en triplicat. Les activités ont été calculées en utilisant un coefficient d'extinction de 19,6  $\text{mmol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  pour le cyt *c*, et ont été exprimées en  $\mu\text{mol}$  de cyt *c* transformé par min ( $U_{\text{CCO}}$ ,  $\mu\text{mol}$  cytochrome *c* réduit  $\text{min}^{-1}$ , réaction de premier ordre).

### VIII.2 - Citrate synthase (CS)

L'activité de la citrate synthase a été mesurée à partir d'un pool de 100 mg de branchies (5 huîtres par pool, pour les expérimentations sur l'effet de différents régimes alimentaires et sur la comparaison entre un conditionnement en écloserie et en milieu naturel) ou des préparations mitochondriales (pour la comparaison entre l'effet de l'immersion et l'effet de l'émersion). Toutes les manipulations ont été effectuées sur glace. Les branchies ont été broyées pendant 10 s avec un homogénéiseur Ultra Turrax dans 1 ml de tampon de lyse (150 mM de NaCl, 10 mM de Tris HCl, 1 mM d'EDTA, 1 mM d'EGTA, 1% de Triton X100, 0,5% d'Igepal, et 10% (v/v) d'un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (Sigma - P5726)). Le jour de l'expérimentation, un cocktail d'inhibiteurs de protéases ne contenant pas d'EDTA (Roche - 11873580001) a été ajouté au tampon (2 tablettes pour 50 ml de tampon). Les échantillons ont ensuite été incubés 20 min sur glace, vortexés, et centrifugés à 10 000 g pendant 45 min à 4°C. Le surnageant a été collecté, puis dilué 10 fois dans le tampon de lyse. La réaction a été initiée en ajoutant 20  $\mu\text{l}$  d'oxaloacétate 5 mM à 20  $\mu\text{l}$  d'échantillon (broyat de branchies ou préparation mitochondriale diluée au 100<sup>ème</sup> dans du tampon de lyse) et à 160  $\mu\text{l}$  de tampon de réaction (100 mM de Tris-HCl pH 8, 2 mM d'acétyl-coenzyme A, et 10 mM de DTNB), et a été enregistrée dans un lecteur de microplaques à 412 nm pendant 10 min à 25°C. Au cours de cette réaction, la CS transfère le groupe acyl de l'acétyl-coenzyme A à l'oxaloacétate, formant ainsi le citrate. Le DTNB (réactif d'Ellman) réagit avec le groupement thiol -SH du coenzyme A libre. Le produit ainsi formé, le NTB, est de couleur jaune et absorbe à 412 nm.

Toutes les mesures ont été faites en triplicat et les activités ont été calculées en utilisant un coefficient d'extinction de 13,6  $\text{mM}.\text{cm}^{-1}$  ( $U_{\text{CS}} = \mu\text{mol}$  citrate formé. $\text{min}^{-1}$ ).

## **IX. Analyses lipidiques**

### **IX.1 - Extraction des lipides**

Avant l'extraction lipidique des suspensions mitochondriales, un aliquot de 60 µl de préparation mitochondriale (environ 1,2 mg de protéines mitochondriales) a été remis en suspension dans du tampon de réaction sans BSA et centrifugé à 9000 g à température ambiante pendant 10 min. Le surnageant a été jeté et le culot remis en suspension, lavé dans du tampon de réaction sans BSA et centrifugé deux autres fois. Les lipides membranaires des suspensions mitochondriales ont ensuite été extraits selon le protocole de Folch et al. (1957) en remettant les culots en suspension dans un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v). Les lipides de branchies ont été extraits suivant le protocole de Kraffe et al. (2004). Les extraits de mitochondries et de branchies ont ensuite été stockés à -80°C après addition de 0,01% (p/v) d'hydroxytoluène butylé (BHT, antioxidant).

### **IX.2 - Séparation des lipides sur microcolonnes**

Les extraits lipidiques ont été évaporés à sec sous azote, et les lipides ont été récupérés avec trois lavages successifs de 500 µl d'un mélange CHCl<sub>3</sub>:méthanol (98:2, v/v) et déposés en tête d'une microcolonne de silice (30 mm de hauteur sur 5 mm de diamètre, remplie avec du gel de silice 60 (mailles de 70–230, Merck, Darmstadt, Germany) préalablement chauffé à 450°C et désactivé avec 6 % d'eau (Marty et al. 1992)). Les lipides neutres ont été élués avec 10 ml de CHCl<sub>3</sub>:méthanol (98:2, v/v). Les lipides polaires ont ensuite été récupérés avec 15 ml de méthanol, et 10 µl d'une solution de C23 à 0,23 µg.ml<sup>-1</sup> ont été ajoutés comme standard interne dans chaque fraction. Ces fractions ont ensuite été stockées à -20°C pour des analyses ultérieures.

### **IX.3 - Analyses d'acides gras**

Les lipides polaires ont été évaporés à sec sous azote, puis 1 ml d'un mélange BF<sub>3</sub>-méthanol (10%) a été ajouté. Les tubes ont été bien agités et placés sur une plaque chauffante à 95-100°C pendant 10 min. Après refroidissement à température ambiante, 1 ml d'eau ultra-pure et 1 ml d'hexane ont été ajoutés. Les tubes ont été bien agités pendant 2 min et centrifugés à 1000 rpm pendant 10 min. Les échantillons ont ensuite été stockés à -20°C toute une nuit, et le jour suivant la couche supérieure a été transférée dans un tube Chromacol™ et analysée en

chromatographie en phase gazeuse. Les acides gras ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux des standards, et leurs quantités ont été déterminées à partir de leurs spectres relatifs.

#### **IX.4 - Séparation des classes de lipides membranaires**

Les différentes classes de phospholipides ont été séparées par chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC) comme décrit par Haberkorn (2009). La plaque de silice (HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Darmstadt, Germany) a tout d'abord subi une incubation préliminaire avec 10 ml d'un mélange de solvants polaires (acétate de méthyl:isopropanol:chloroforme:méthanol:KCl, 10:10:10:4:3,6), afin d'éliminer les éventuelles impuretés. La plaque a ensuite été séchée et activée sur plaque chauffante à 120°C pendant 30 min. Les échantillons de lipides ont été déposés sur la plaque par un échantillonneur automatique CAMAG. La plaque de silice a ensuite été placée dans une cuve de chromatographie et a été incubée avec le mélange de solvants polaires décrit plus haut. Les classes de lipides sont apparues sous forme de bandes noires après avoir plongé la plaque dans une solution de sulfate de cuivre, et chauffé à 160°C sur plaque chauffante pendant 20 min. Les plaques ont été lues par scannage à 370 nm, et les bandes noires ont été quantifiées avec le logiciel Wincats. Les quantités de chaque classe de lipides ont été déterminées à partir de leurs spectres relatifs, en comparaison avec les standards ajoutés et dont les quantités sont connues. La sphingomyéline est absente chez les vertébrés, mais le standard sphingomyéline a été utilisé afin de déterminer la quantité de CAEP, qui a une structure commune (Le Grand et al. 2011). La technique utilisée ne permettant pas de séparer correctement la phosphatidylinositol (PI) et le CAEP, les proportions de ces deux phospholipides ont donc été présentées dans cette thèse comme la somme PI + CAEP.

### **X. Analyses statistiques**

Pour la comparaison entre les trois régimes (première expérimentation), des ANOVA ont été effectuées lorsque la normalité et l'homogénéité des variances ont été respectées. Les ANOVA ont ensuite été suivies par des tests LSD de Fisher (Fisher's least significant difference). Pour les données ne suivant pas une normalité, des ANOVA non paramétriques de Kruskal-Wallis ont été effectuées. Des tests non paramétriques de Mann-Whitney ont été

utilisés pour chaque régime alimentaire afin de comparer les capacités oxydatives mitochondriales mesurées avec le glutamate et avec le succinate, pour comparer les huîtres laissées dans leur milieu naturel et celles élevées en éclosion (deuxième expérimentation), et pour comparer les effets de l'immersion et de l'émersion (troisième expérimentation). Pour cette dernière expérimentation, une MANOVA suivie de tests LSD de Fisher a été réalisée afin de comparer la consommation d'oxygène liée aux flux d'électrons à travers les complexes I à IV, II à IV, et IV (facteur 1) entre les huîtres prélevées durant l'émersion ou durant l'immersion (facteur 2). Pour chaque test, le seuil significatif a été déterminé pour  $P < 0.05$ . Les données exprimées en pourcentages ont été transformées (arcsinus de la racine carrée) avant d'effectuer les ANOVA, mais sont présentées dans les figures et les tables sous forme de pourcentages non transformés. Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel Statgraphics, version Plus 5.1. (Manugistics, Inc, Dallas, USA).



## **CHAPITRE I :**

**Activité mitochondriale, paramètres  
hémocytaires et modulation de la  
composition lipidique en réponse à  
différents régimes alimentaires chez  
*Crassostrea gigas***



## Introduction

L'alimentation joue un rôle essentiel dans la physiologie des organismes. Outre les apports en protéines, glucides et vitamines et minéraux, les aliments fournissent les acides gras (AG) nécessaires au bon fonctionnement des cellules. Après avoir été assimilés par l'organisme, ces AG vont avoir différents rôles et peuvent ainsi servir de réserves d'énergie, comme c'est le cas dans les adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage des lipides neutres, ou peuvent être intégrés au sein des membranes des cellules ou de leurs organites. De par leur nombre d'atomes de carbone ou leur nombre d'insaturations, les chaînes d'AG participent à la structure tridimensionnelle des membranes biologiques. Comme expliqué par Hulbert et Else (1999), cette composition en AG aurait une importance dans le métabolisme cellulaire, l'insaturation globale des AG influençant l'énergie cinétique des protéines et déterminant la vitesse des processus membranaires. Toutefois, la composition des membranes est régulée et permet certainement le maintien d'une fluidité membranaire optimale, généralement obtenu en modifiant le degré d'insaturation des chaînes d'AG lors d'un mécanisme connu sous le nom d'« adaptation homéovisqueuse » chez les vertébrés ectothermes, un mécanisme important pour le bon fonctionnement des processus membranaires (Hazel and Williams 1990 ; Hazel 1995). En revanche, il est généralement admis que la composition en AG de l'alimentation peut modifier la composition des lipides membranaires pour la plupart des organismes hétérotrophes (Divakaran and Venkataraman 1977 ; Murphy 1990 ; Soudant et al. 1997 ; Delaporte et al. 2005 ; Martin et al. 2012).

Les modifications de composition en AG membranaires en réponse à la nourriture s'observent également à l'échelle subcellulaire. Plusieurs études réalisées chez les mammifères ont montré des modifications de la composition en AG des membranes de mitochondries induites par des régimes spécifiques (Divakaran and Venkataraman 1977 ; Yamaoka et al. 1988 ; Astorg and Chevalier 1991 ; Barzanti et al. 1994 ; Lemieux et al. 2008 ; Khairallah et al. 2012). Les mitochondries sont des organites contenant une forte densité de protéines dans leur membrane interne, dont la plupart sont représentées par les enzymes de la chaîne respiratoire, responsables de la production d'énergie cellulaire (Becker et al. 2009). Cette production d'énergie nécessite une oxydation de la matière organique et une consommation d'oxygène au sein même de la mitochondrie. Les résultats sont contradictoires quant aux effets des modifications de composition en AG membranaires sur les processus membranaires mitochondriaux. Certaines études montrent une modification de la



phosphorylation oxydative ainsi que de l'activité ATPase et de la CCO (Divakaran and Venkataraman 1977 ; Yamaoka et al. 1988 ; Barzanti et al. 1994). D'autres en revanche ne détectent aucun changement de capacité mitochondriale malgré les modifications de composition en AG dans les membranes de mitochondries (Astorg and Chevalier 1991 ; Lemieux et al. 2008 ; Khairallah et al. 2012). Chez les espèces aquatiques, les travaux réalisés sur les poissons ont indiqué de mineures modifications d'activité mitochondriale associées au changement de composition lipidique membranaire induit par la nutrition, ce qui semble indiquer une relative indépendance entre ces deux paramètres (Guderley et al. 2008 ; Martin et al. 2012).

Peu de travaux ont été réalisés chez les bivalves aux niveaux cellulaire et subcellulaire, mais de précédentes études réalisées à Brest ont clairement mis en évidence l'effet de l'alimentation sur la composition en AG membranaires et sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Delaporte et al. 2003 ; Delaporte 2005). Dans ces travaux, des huîtres ont été nourries en écloserie pendant deux mois avec trois régimes différents. Il a été montré que la membrane des branchies avait une composition en AG reflétant celle des algues avec lesquelles les huîtres avaient été nourries. Associées à ces changements de composition lipidique, des modifications au niveau de l'activité oxydante des hémocytes ainsi que du pourcentage de granulocytes et de hyalinocytes (les deux sous-populations principales d'hémocytes) ont également été observées. Néanmoins, ces études n'ont pas mis en relation d'éventuelles modifications au niveau subcellulaire susceptibles d'expliquer les modifications cellulaires observées.

Le but de cette première étude a été de comparer les modifications cellulaires et subcellulaires induites par différents régimes sur *C. gigas*. Pour ce faire, trois lots d'huîtres ont été conditionnés en écloserie pendant un mois, chacun d'eux ayant reçu un régime spécifique quant à leur composition en AG. La composition lipidique des membranes des hémocytes et des mitochondries a été comparée à celle des algues ingérées, afin de mettre en évidence l'empreinte du régime alimentaire sur la composition en AG des membranes. Des paramètres hématocytaires (mortalité, proportion et concentration des granulocytes et des hyalinocytes, taille, complexité, production hémocytaire d'ERO, production mitochondriale de superoxyde et potentiel membranaire mitochondriale) ont été mesurés afin de déterminer l'influence des modifications structurales membranaires sur les caractéristiques des cellules immunitaires. En parallèle, la consommation d'oxygène mitochondriale, l'activité d'enzymes

mitochondriales telles que la CCO et la CS, et la concentration des cytochromes *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c* ont été mesurées dans des préparations mitochondriales afin d'évaluer l'impact du changement de composition en AG sur la fonctionnalité des mitochondries.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication soumise au Journal of Comparative Physiology Part B (« **Mitochondrial activity, hemocyte parameters and lipid composition modulation by dietary conditioning in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*** »), en cours d'évaluation. Ils sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique, dont le résumé est également traduit en français ci-après.

### Résumé

Plusieurs paramètres peuvent affecter la composition lipidique des membranes chez les bivalves, y compris l'alimentation. Les deux AG 22:6n-3 et 20:5n-3 sont des composants essentiels de leurs membranes, mais ne sont que peu synthétisés par les bivalves qui doivent se les procurer à partir de leur alimentation, principalement constituée de phytoplancton. Ici, les effets d'une modification du régime alimentaire sur la composition lipidique des membranes ont été étudiés aux niveaux cellulaire et subcellulaire chez l'huître *Crassostrea gigas*. Dans ce but, nous avons comparé des huîtres nourries avec deux régimes monospécifiques, qui diffèrent nettement dans leur composition en AG, ou avec un mélange des deux algues utilisées. Les lipides des membranes de branchies et de mitochondries ont été analysés pour leurs AG et pour la composition des classes de phospholipides. Comme prévu, une différence significative dans les proportions en 22:6n-3 et en 20:5n-3 a été trouvée entre les groupes d'huîtres, ce qui reflète les différences de composition en AG des microalgues. En revanche, la composition en phospholipides n'a été que légèrement modulée par les régimes. Les mesures réalisées dans les hémocytes ont indiqué que seul le potentiel membranaire mitochondriale a été affecté par les régimes. Il n'y avait aucune différence de taux de consommation d'oxygène ou d'activité de la cytochrome *c* oxydase dans les mitochondries isolées, quel que soit le régime. De même, ni la concentration en protéines mitochondriales, ni l'activité de la citrate synthase n'ont été modifiées, ce qui suggère que le nombre et la morphologie des mitochondries n'ont pas été affectés par le traitement alimentaire. Ces résultats suggèrent que les huîtres pourraient posséder de fortes capacités homéostatiques, tant au niveau cellulaire que subcellulaire, afin de réduire les effets des modifications de composition en AG membranaires par la nutrition sur les fonctionnalités mitochondriales. Ces capacités pourraient être un moyen de faire face aux variations biotiques et abiotiques

régulièrement rencontrées par les huîtres dans leur milieu naturel, et ainsi maintenir leurs fonctions physiologiques.

## **Mitochondrial activity, hemocyte parameters and lipid composition modulation by dietary conditioning in the Pacific oyster *Crassostrea gigas***

Tony DUDOGNON<sup>a</sup>, Christophe LAMBERT<sup>a</sup>, Claudie QUERE<sup>b</sup>, Michel AUFFRET<sup>a</sup>,  
Philippe SOUDANT<sup>a</sup> and Edouard KRAFFE<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 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

<sup>b</sup> Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, IFREMER, UMR 6539 CNRS / UBO / IRD / IFREMER, 29280 Plouzané, France

### **Abstract**

Several parameters can affect membrane lipid composition in bivalves, including diet. Although two fatty acids (FA) 22:6n-3 and 20:5n-3 are essential membrane components, they are sparingly synthesized by bivalves and must be obtained from their diet. Here, effects of dietary modifications of membrane lipid composition were studied at both cellular and subcellular levels in the oyster *Crassostrea gigas*. To this end, we compared oysters fed two monoalgal diets that differed markedly in their FA composition or a mix of both. Membrane lipids of gills and mitochondria were analysed for their FA and phospholipid class composition. As expected, a significant difference in 22:6n-3 and 20:5n-3 contents between oyster groups was found, reflecting differences of dietary microalgae FA composition. Meantime, phospholipid class composition was only slightly affected by diet. Measures made in hemocytes indicated that only mitochondrial membrane potential was affected by diet. There was no difference in oxygen consumption rates or in cytochrome *c* oxidase activity of isolated mitochondria between the three diets. Similarly, neither protein content nor citrate synthase activity of mitochondria were changed, suggesting that number and morphology of mitochondria was not affected by dietary treatment. These results suggest that oysters could possess high homeostatic capabilities, at both cellular and subcellular levels, to minimize the effect of dietary FA and related membrane lipid FA modifications on mitochondrial function. These capabilities would allow oysters to maintain their physiological functions when faced with biotic and abiotic variations in their natural environment.

## Introduction

Sessile animals that live on the foreshore undergo tidal cycles, and have to cope with large variations in oxygen concentration, temperature and food availability, on hourly, daily and seasonal basis. Among invertebrates, bivalves show a great capacity to adapt physiologically to their changing natural environment. This adaptation relies at least partially on modification of membrane lipid composition. All biological membranes, surrounding cells and their organelles, share a common structure. They are composed of a lipid bilayer associated with various proteins. Composition of fatty acids (FA) of this lipid bilayer could affect membrane structure and mechanisms, as described in the Membrane Pacemaker Theory (Hulbert and Else 1999). In particular, length and degree of unsaturation (number of double bonds) of phospholipid hydrophobic tails can act on membrane structural and functional properties.

Because of its FA composition, diet can greatly influence the FA profile of membrane lipids and modulate enzyme activities and cellular functions, as it has been demonstrated in mammals (Divakaran and Venkataraman 1977 ; Yamaoka et al. 1988 ; Senault et al. 1990 ; Leonard et al. 2001 ; Hirunpanich et al. 2007) and fish (Moya-Falcón et al. 2004). Bivalves undergo seasonal variations in food availability that are known to modify FA composition of membrane lipids (Silina and Zhukova 2007). Experimental studies on bivalves performed in hatchery have shown that the FA profile of membrane lipids is greatly influenced by dietary conditioning (Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1999 ; Pennarun et al. 2003 ; Delaporte et al. 2003 ; Delaporte et al. 2005 ; Delaporte et al. 2006). Among these FA, eicosapentaenoic acid (EPA ; 20:5n-3), docosahexaenoic acid (DHA ; 22:6n-3) and arachidonic acid (20:4n-6) are of particular importance in bivalves development. They are essential FA for survival, growth and reproduction, but bivalves are not able to synthesize them *de novo* and have to acquire them in their diet (Soudant et al. 1996a). In an earlier study on *C. gigas*, Delaporte et al. (2003) showed that modifications of FA composition using different dietary regimes were associated with differences in cellular immune functions of hemocytes. Indeed, greater oxidative activity was found in oysters fed a diet rich in EPA, compared to oysters fed a diet rich in DHA. In a subsequent study, supplementation of diet with 20:4n-6 increased haemocyte numbers and phagocytosis, and led to a higher oxidative activity in hemocytes of *C. gigas* (Delaporte et al. 2006). Similarly, it has been reported that 20:5n-3 affected oyster

hemocytes which showed a higher concentration, morphological changes (lower size and complexity), lower phagocytic index and lower ROS production (Delaporte et al. 2007).

To better understand how dietary modifications of membrane FA affects oysters' physiological functions, it is necessary to expand the observations at the cellular levels with studies on subcellular compartments as each possesses its own mechanism regulating membrane composition and function. Mitochondria are of special interest since they fuel energy to cells and are involved with many cellular mechanisms and responses. Mitochondria consume almost all the oxygen used by an organism. The ability to control mitochondrial oxidative capacities is critical to energy production and metabolic state of an organism. In the inner membrane of mitochondria, enzymes of the electron transport chain (ETC) couple electron and trans-membrane proton transfers. This creates an electrochemical gradient in the intermembrane space, used by  $F_0F_1$ ATP-synthase to generate chemical energy in the form of adenosine triphosphate (ATP). Oxygen is utilised by a single enzyme, cytochrome *c* oxidase (CCO), the last complex (complex IV) of the ETC. Oxygen consumed during respiration is not completely reduced to water but instead can be partially reduced at complexes I, and III of the ETC to form superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), which can be converted to other reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and the highly reactive hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) (Nathan and Singer 1999). Oxidative processes in mitochondria appears therefore to be controlled by membrane related processes and considerable evidences exist for a regulatory role of membrane lipid composition on mitochondrial functional properties in ectotherms (Wodtke 1981 ; Guderley et al. 1997 ; Kraffe et al. 2007 ; Frick et al. 2010). Interestingly, in mammals and in fish, FA of mitochondrial membrane lipids are markedly influenced by diet (Guderley et al. 2008 ; Morash et al. 2009 ; Rohrbach 2009 ; Martin et al. 2012) but effects of dietary FA on mitochondrial functions have given contradictory results. In mammals, some studies described changes in mitochondrial enzyme activities in response to dietary modifications of lipid structure (Divakaran and Venkataraman 1977 ; Yamaoka et al. 1988), while other studies reported no effect of a modified membrane FA composition on mitochondrial activity (Astorg and Chevalier 1991 ; Larqué et al. 2003 ; Lemieux et al. 2008). Studies on aquatic ectotherms are scarcer. In rainbow trout, dietary modifications of mitochondrial membrane FA composition had only minor effects on mitochondrial oxidative capacities (Guderley et al. 2008 ; Martin et al. 2012) as well as on the activity of specific membrane bound enzymes (Morash et al. 2009 ; Martin et al. 2012).

Overall, although dietary lipids typically modify membrane FA composition, functional properties of membrane processes are not consistently affected. This prompted us to compare the functional impact of dietary modifications of membrane FA composition in hemocytes and mitochondria. To this end, we evaluated effects of three different diets varying in FA composition on the Pacific oyster *Crassostrea gigas* at both cellular and subcellular levels. The two microalgae used in this study were chosen because of their differences in FA composition: T-*Iso* is relatively rich in DHA whereas it contains small quantities of EPA. On the contrary, *C. gracilis* is rich in EPA, but poor in DHA. FA composition and functional parameters of mitochondria and hemocyte variables were determined after dietary conditioning. Cellular changes were estimated through measurements of hemocyte variables (mortality, subpopulation proportions, concentration, size, complexity, ROS production, mitochondrial superoxide production and mitochondrial membrane potential). In parallel, subcellular changes were assessed on gill mitochondria by measuring mitochondrial respiratory parameters, cytochrome *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c* contents as well as CCO and citrate synthase (CS) activities.

## Materials and methods

### *Chemicals*

All chemicals were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), unless otherwise mentioned.

### *Sampling procedures*

Pacific oysters *C. gigas*, of 6 to 8.5 cm shell length ( $7.3 \pm 0.2$ , mean value  $\pm$  standard error) came from the same origin (spat batch from Arcachon). Hundred fifty oysters were obtained in May 2010 and were equally distributed in three 800 l flow-through seawater tanks at Argenton experimental station (IFREMER, France), with a water flow of  $120 \text{ l.h}^{-1}$ . Tanks were supplied with seawater pumped at mid-depth in a tidal dock supplied by partly filtered (10  $\mu\text{m}$  bag filter) natural water, so that the temperature in the experimental tanks was the field temperature ( $12^\circ\text{C}$  on May 20<sup>th</sup>,  $16^\circ\text{C}$  on June 22<sup>nd</sup>). Oysters were fed *ad libitum* with three different diets: *Isochrysis* aff. *galbana* clone Tahiti (T-*Iso*), *Chaetoceros gracilis*, and a mix of both, supplied in equal cell volume. Characteristic FA composition of algae used is shown in Table 1 and was obtained from González-Araya et al. (2011). Cultures were produced in 300 l cylinders containing 1  $\mu\text{m}$  filtered seawater enriched with Conway medium at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , air-CO<sub>2</sub> (3%) mix aerated, and with continuous light. Microalgae were harvested

at exponential growth phase (6–8 days). For each diet, algal concentration was determined once a day using a Coulter counter (Multisizer 3) at the tank inlet and outlet according to González-Araya et al. (2011). Algal consumption was calculated as:  $C = ((C_i - C_o)/C_i) \cdot 100$ , where  $C_i$  = food concentration of inlet seawater and  $C_o$  = food concentration of outlet seawater.  $C_i$  and  $C_o$  were expressed as  $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , and  $C$  was expressed as percentage of algae consumed. Pump debit was adjusted to have about  $1500 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$  at the outlet. Tanks were drained and cleaned three times a week. Samplings were performed after 4 weeks of conditioning (June 2010). Total weight was measured on whole animals (flesh and shells) before hemolymph sampling, dissections and mitochondrial preparation.

**Table 1** : Fatty acid composition of the two microalgae used in this study. The results are expressed as percentages of total fatty acids (adapted from González-Araya et al. (2011)).

% mol	<i>T-Iso</i>		<i>C. gracilis</i>	
	Mean	S.E.	Mean	S.E.
14:0	19.0	8.8	10.1	1.1
16:0	9.4	0.2	11.1	0.7
18:0	0.2	0.5	0.0	0.0
16:1n-7	5.1	0.4	25.4	0.6
18:1n-9	12.1	0.5	0.8	0.2
18:1n-7	1.2	0.1	0.5	0.1
18:2n-6	11.6	3.5	1.2	0.4
18:4n-3	12.0	3.2	0.9	0.1
20:4n-6	0.2	0.2	1.4	0.1
20:5n-3	0.3	0.2	22.7	0.1
22:5n-6	1.7	1.0	0.0	0.0
22:5n-3	0.1	0.1	0.0	0.0
22:6n-3	10.2	2.5	1.1	0.5
Total SAT.	29.5	9.4	22.0	0.5
Total MONO	20.5	1.2	28.2	0.2
Total n-9	12.9	0.3	0.9	0.3
Total n-7	7.3	1.1	26.4	0.5
Total POLY	48.4	8.0	47.1	1.4
Total n-4	0.8	0.4	15.0	1.8
Total n-6	15.2	7.2	4.0	0.6
Total n-3	32.1	0.7	25.3	0.7

SAT. : saturated FA; MONO : monounsaturated FA; POLY : polyunsaturated FA



### ***Reproductive activity***

#### *Qualitative analysis of gametogenic stage*

A visceral mass slice of about 2-3 mm thick was cut upstream of adductor muscle, put in a histology cassette and transferred into a modified Davidson's fixative (Latendresse et al. 2002) for 48 h. Fixed tissues were dehydrated in ascending ethanol solutions, cleared with Claral<sup>®</sup> and embedded in paraffin wax. Five micrometer thick sections were cut, mounted on glass slides, and stained with Harry's hematoxylin–eosin Y (Martoja-Pierson and Martoja-Pierson 1967). Slides were examined under a light microscope to determine gametogenic stage according to the reproductive scale reported by Mann (1979) : stage 0 (inactive), stage 1 (early gametogenesis), stage 2 (late gametogenesis) and stage 3 (ripe).

#### *Quantitative analysis of gonad occupation area*

Percentage of gonad occupation area was determined on each histological section as described by Enríquez-Díaz et al. (2009). Briefly, slides were scanned with a digital scanner (HP Scanjet 7400c). Gonad area was measured by using an image analysis software (Imaq Vision Builder, National Instruments Corp.).

### ***Hemolymph variables***

Six pools containing hemolymph of 5 individuals were used for hemocyte parameter analysis.

#### *Hemolymph sampling*

Hemolymph was then withdrawn from oysters using a 1 ml plastic syringe fitted with a 25-gauge needle inserted through a notch made adjacent to the adductor muscle just prior to bleeding.

All hemolymph samples were examined microscopically for contamination (e.g., gametes, tissue debris) and then stored in micro-tubes held on ice. All samples were filtered through 80 µm mesh prior to analysis to eliminate any large debris (>80 µm) which could potentially clog the flow cytometer.

#### *Measurements of hemocyte variables by flow cytometry*

Characterization of hemocyte sub-populations, number and functions were performed using an Easy-Cyte-Plus (Guava-Millipore, Billerica, MA, USA) flow cytometer (FCM) equipped with a 488 nm argon laser. Two kinds of hemocyte variables were evaluated by FCM: descriptive variables (hemocyte viability, total and hemocyte sub-population counts), and

functional variables (mitochondrial membrane potential, mitochondrial superoxide production, total reactive oxygen species (ROS) production).

#### *Descriptive variables*

An aliquot of 100  $\mu\text{l}$  of hemolymph was transferred into a tube containing 200  $\mu\text{l}$  of a mixture of Anti-Aggregant Solution for Hemocytes, AASH (Auffret and Oubella 1995) and 100  $\mu\text{l}$  filtered sterile seawater (FSSW). Hemocyte DNA was stained with two fluorescent DNA/RNA specific dyes, SYBR-Green I (Sigma, St Quentin Fallavier, France, final concentration of 1/1000 of the DMSO commercial solution), and propidium iodide (PI, Sigma, St Quentin Fallavier, France, final concentration of 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) in the dark at 18°C for 120 min before flow cytometric analysis. PI permeates only hemocytes that lose membrane integrity and are considered to be dead cells, whereas SYBR-Green I permeates both dead and live cells. SYBR-Green and PI fluorescences were measured at 525 $\pm$ 15 nm (green) and at 680 $\pm$ 15 nm (red) wavelengths, respectively. Thus, by counting the cells stained by PI and cells stained by SYBR Green, it was possible to estimate the percentage of viable cells in each sample. All non aggregated SYBR Green-stained cells were visualized on a Forward Scatter (FSC, size) and Side Scatter (SSC, cell complexity) cytogram. Two sub-populations were distinguished according to size and cell complexity (granularity). Granulocytes are characterized by high FSC and high SSC, while hyalinocytes have high FSC and low SSC. Total hemocyte, granulocyte and hyalinocyte concentrations (cell per ml) were estimated using absolute count of the analysed volume given by the flow-cytometer.

#### *Functional variables*

Oxidative activity: The method used 2,7-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA (D6883 Sigma) according to Lambert et al. (2003). A 100  $\mu\text{l}$  aliquot of pooled hemolymph was diluted with 300  $\mu\text{l}$  of FSSW. DCFH-DA solution (final concentration of 10  $\mu\text{M}$ ) was added to each tube maintained on ice. Tubes were then incubated at 18°C for 120 min in the dark. After the incubation period, DCF fluorescence, quantitatively related to the ROS production of hemocytes, was measured at 525 $\pm$ 15 nm by flow cytometry. During incubation with hemocytes, DCFH-DA diffused into the cell, where the acetate groups (-DA) are removed by esterase, thereby trapping DCFH within the cell. The intracellular DCFH, a non-fluorescent fluorescein analogue, was oxidized to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF; emitted a maximum of fluorescence at 530 nm) by hemocytes. Intracellular DCFH oxidation to DCF is quantitatively related to cell oxidative activity and primarily mediated by  $\text{H}_2\text{O}_2$  but

also by other oxidant molecules such as superoxide anion, peroxy radical and peroxy nitrite anion (Haugland 2002).

Mitochondrial superoxide production: MitoSOX™ (Molecular Probes, Invitrogen), used at a final concentration of 5  $\mu\text{M}$ , was added to a 100  $\mu\text{l}$  aliquot of hemolymph diluted with 300  $\mu\text{l}$  FSSW to measure superoxide production in mitochondria. MitoSOX™ is live-cell permeant and is rapidly and selectively targeted to mitochondria. Once in mitochondria, MitoSOX™ is oxidized by superoxide and exhibits yellow/orange fluorescence (max 580 nm). MitoSOX™ is readily oxidized by superoxide but not by other ROS- or reactive nitrogen species (RNS)-generating systems (Mukhopadhyay et al. 2007). After incubation at 18°C for 120 min in the dark, samples were analysed at 583 $\pm$ 13 nm.

Mitochondrial membrane potential: Estimation of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi\text{m}$ ) in hemocytes was performed on 100  $\mu\text{l}$  hemolymph diluted with 100  $\mu\text{l}$  of FSSW, and mixed on ice with JC-10 (Interchim) at a final concentration of 5  $\mu\text{M}$ . JC-10 is a membrane permeable fluorescent probe which enters selectively into mitochondria and exists as two forms, monomeric or aggregate, depending upon  $\Delta\psi\text{m}$  and not  $\Delta\text{pH}$ . The JC-10 monomer form predominates in mitochondria with low  $\Delta\psi\text{m}$  and emits in the green wavelength (525-530 nm). The JC-10 aggregate form accumulates in mitochondria with high  $\Delta\psi\text{m}$  and emits in the orange wavelength (590 nm). JC-10 forms (monomer/aggregate) can change reversibly. After 30 min of incubation at 18°C in the dark, fluorescence intensities of JC-10 monomers and aggregates were quantified, respectively, by Green (525 $\pm$ 15 nm) and Yellow (583 $\pm$ 13 nm) detectors of the flow cytometer. The JC-10 aggregate/monomer ratio is assumed to be proportional to mitochondrial membrane potential (Donaghy et al. 2012).

### ***Mitochondrial analysis***

For each group, six pools containing gills of 5 individuals were used (each pool contained 2.4 $\pm$ 0.1 g of gill tissue). Gills were chosen for isolation of mitochondria because they have major roles in food and dissolved oxygen intake and play a central role in ionic regulation.

### ***Isolation of mitochondria***

Procedures of mitochondria isolation and assay were adapted from Kraffe et al. (2008). Oyster gills were removed, dried with paper towels and weighted. A part was frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C for subsequent analyses, and the rest was minced with

scissors and rinsed twice on 80  $\mu\text{m}$  mesh with 2 ml of isolation buffer containing 300 mM sucrose, 30 mM HEPES, 100 mM KCl, 8 mM EGTA and 1% of protease inhibitor cocktail (P2714 Sigma), pH 7.5. On the day of sampling, 0.5% fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) was added. All manipulations were carried out on ice. The minced gills were homogenized with three series of three passes in a motorised Potter tissue grinder (Heidolph, Kelheim, Germany) with a loosely fitting pestle, in 10 volumes of ice-cold isolation buffer. The homogenate was centrifuged at 900 g at 4°C for 10 min. The supernatant was collected, filtered on 80  $\mu\text{m}$  mesh, and again centrifuged at 900 g at 4°C for 10 min. The resulting supernatant, considered free of unbroken cells or cell debris, was centrifuged at 10,000 g. The mitochondrial pellet was re-suspended in a volume of reaction buffer (400 mM sucrose, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30 mM HEPES, 90 mM KCl, 50 mM taurine, 50 mM  $\beta$ -alanine, pH 7.5, with 0.5% fatty acid-free BSA added on the day of the experiment), corresponding to one-tenth of the mass of tissue used. A sample of this suspension was stored at -80°C for subsequent assays of enzymatic activities, cytochrome concentrations and lipid extraction.

#### *Measurement of oxygen consumption*

Oxygen consumption by the mitochondrial preparation was measured polarographically using a water-jacketed  $\text{O}_2$  monitoring system (Qubit System, Kingston, Ontario, Canada). Temperature was controlled by a circulating refrigerated water bath. For each assay, around 0.8 mg of mitochondrial protein (40  $\mu\text{l}$  mitochondrial preparation) was added to 0.4 ml reaction buffer containing 400 mM sucrose, 30 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM taurine and 50 mM  $\beta$ -alanine, pH 7.5. On the day of sampling, 0.5% BSA was added to the assay medium. For measurement of maximal oxidative capacities, glutamate (40 mM) or succinate (20 mM) was added to fuel oxygen consumption through complex I or II, respectively. The maximal respiration rate (state 3) was obtained after addition of ADP to a final concentration of 600  $\mu\text{M}$ . Our pilot studies showed that 40 mM glutamate and 20 mM succinate are saturating concentrations under our assay conditions (data not shown). Non-phosphorylating oxygen consumption (state 4) rate was measured after ADP depletion. Each measurement was performed in simultaneous triplicates using three polarographic chambers. RCR (respiratory control ratio) was defined as the ratio between state 3 and state 4. Oxidative phosphorylation efficiency (relation between ADP added and oxygen consumption) was calculated as ADP/O ratio according to Estabrook (1967).

*Enzymatic activities*

Our measurement of cytochrome *c* oxidase activity in mitochondrial preparations was adapted from Bouchard and Guderley (2003) and Kraffe et al. (2008). Mitochondrial preparations were submitted to two cycles of freezing and thawing. The disrupted mitochondria were diluted in the assay buffer containing  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM pH 7.8 at 25°C. Bovine cytochrome *c* (cyt *c* C2037 Sigma) was employed as substrate to stimulate CCO activity. Reduced cyt *c* solution was prepared by adding few grains of sodium dithionite. To avoid dithionite excess, small amounts of a stock solution of reduced cyt *c* were added to an oxidized solution of cyt *c* and absorbance was followed at 550 nm to obtain 95% absorbance of the reduced cyt *c* stock solution. Assays were run at 25°C in microplates using a UV/Vis spectrophotometer (Bio-Tek Synergy HT, Bio Tek Instrument, USA), in presence of a final cyt *c* concentration of 60  $\mu\text{M}$ . The decrease in absorbance was followed at 550 nm for 10 min and all assays were run in triplicate. Activities were calculated using an extinction coefficient of  $19.6 \text{ mmol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  for cyt *c* and are expressed as  $\mu\text{mol cyt } c \text{ transformed min}^{-1}$  ( $U_{\text{CCO}}$ , first order reaction).

Citrate synthase activity was measured on 100 mg gill tissue. All manipulations were carried out on ice. Gills were ground for 10 s with an Ultra Turrax homogeneizer in 1 ml of lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% of Triton X100, 0.5% of Igepal, and 10% (v/v) of phosphatase inhibitor cocktail II (P5726 Sigma)). On the day of the experiment, complete EDTA free protease inhibitor cocktail (11873580001 Roche) was added to the buffer (2 tablets for 50 ml). Samples were then incubated 20 min on ice, vortexed, and centrifuged at 10,000 g for 45 min at 4°C. The supernatant was collected and diluted 10 times in the lysis buffer. The reaction was initiated by adding 20  $\mu\text{l}$  of oxaloacetate 5 mM to 20  $\mu\text{l}$  of samples and 160  $\mu\text{l}$  of assay buffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM acetyl coA, 10 mM DTNB) and was monitored in a microplate reader at 412 nm for 10 min at 25°C. All assays were run in triplicate and activities were calculated using an extinction coefficient of  $13.6 \text{ mM.cm}^{-1}$ .

*Cytochrome concentrations*

The concentrations of cytochromes *a*, *b*, *c*<sub>1</sub>, and *c* were quantified by difference spectra according to Leary et al. (2003) except that mitochondrial suspensions (around 0.8 mg of mitochondrial protein) were diluted into phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mmol pH 7.8 at 25°C) without Triton-X. Accordingly, the electron transport chain complex was

reduced by adding few grains of sodium dithionite and incubated 15 min at room temperature. The reduced samples were read against air-oxidized samples between 400 and 630 nm. We used the solution to the simultaneous equations required to assess individual cytochrome concentrations (Williams Jr. 1964).

#### *Protein concentration*

Aliquots of 20  $\mu$ l of mitochondrial preparations were suspended in reaction buffer without BSA and centrifuged for 10 min at 12,000 g at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended, washed and centrifuged two times again to remove the BSA. Pellets were maintained in 0.5 ml of ultra-pure water and frozen at -80°C until protein analysis. The protein concentration was determined with the RC DC Protein Assay Kit (BIORAD) using BSA as standard.

#### *Membrane lipid analysis*

The membrane lipids of mitochondrial suspensions were extracted from a 60  $\mu$ l aliquot of mitochondrial preparation (around 1.2 mg of mitochondrial protein) according to Folch et al. (1957) and modified by Kraffe et al. (2007). Before lipid extraction of mitochondrial suspensions, the aliquot of mitochondrial preparation was resuspended in the reaction buffer minus BSA and centrifuged at 9000 g at room temperature for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet resuspended, washed in reaction buffer and centrifuged a further two times. According to Delaporte et al. (2003), dietary changes in fatty acid composition of hemocyte and gill membranes are parallel in oysters. Therefore, as we had insufficient material for hemocyte lipid analysis, lipid analysis was performed on gills rather than on hemocytes. Gill lipids were extracted according to Kraffe et al. (2004). The final extracts for mitochondria and gills were stored at -80°C under nitrogen after adding 0.01% w/v butylated hydroxytoluene (BHT, antioxidant).

#### *Isolation of polar lipids on silica gel microcolumn*

Lipid extracts were evaporated to dryness under nitrogen and lipids were recovered with three washings of 500  $\mu$ l of CHCl<sub>3</sub>:methanol (98:2, v/v) and deposited at the top of silica gel microcolumns (30 mm x 5 mm i.d.), packed with Kieselgel 60 (70–230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany) previously heated at 450°C and deactivated with 6 % H<sub>2</sub>O (Marty et al. 1992). Neutral lipids were eluted with 10 ml of CHCl<sub>3</sub>:methanol (98:2, v/v). The polar lipid fraction

was recovered with 15 ml methanol, and 10  $\mu\text{l}$  of a C23:0 solution at 0.23  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  was added as internal standard for further fatty acid analysis.

#### *Fatty acid analysis of membrane lipids*

The polar lipid fraction was evaporated to dryness under nitrogen and then 1 ml of methanol- $\text{BF}_3$  (10%) was added. Tubes were mixed thoroughly and placed on a heating plate at 95-100°C for 10 min. After cooling at ambient temperature, 1 ml of ultra-pure water and 1 ml of hexane were added. Tubes were mixed thoroughly for 2 min and centrifuged at 1,000 g for 10 min. The organic phase containing fatty acid methyl esters (FAME) was washed three times with 1 ml of water. FAME obtained were quantified by gas chromatography and identified by comparing their retention times with those of a standard mixture containing 37 FAME (SUPELCO/Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France), and other known standard mixtures from marine bivalves. A total of 40 FA were quantified and expressed as the molar percentage of the total FA content.

#### *Separation of membrane lipid classes*

Phospholipid classes were analyzed by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) as described by Haberkorn et al. (2010). A preliminary run was carried out on silica glass plate (HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Darmstadt, Germany) with a polar solvent mix (methyl acetate:isopropanol:chloroform:methanol:KCl, 10:10:10:4:3.6). The plate was then dried and activated on a heating plate at 120°C for 30 min. Lipid samples were spotted on the plate by the CAMAG automatic sampler. The silica plate was then placed into the TLC developing chamber and incubated with the polar solvent mix described above. Lipid classes appeared as black bands after dipping plates in a cupric-sulfate solution, and heating at 160°C for 20 min. The charred plates were read by scanning at 370 nm, and black bands were quantified by Wincats software. The quantities of each phospholipid class were determined by comparison with standards of known amounts. Although sphingomyelin is absent in bivalves, its standard was used to quantify ceramide aminoethylphosphonate (CAEP) which has a similar structure (Le Grand et al. 2011). The technique used did not allow separating properly PI and CAEP, so proportions of these two phospholipids were presented as the sum PI + CAEP.

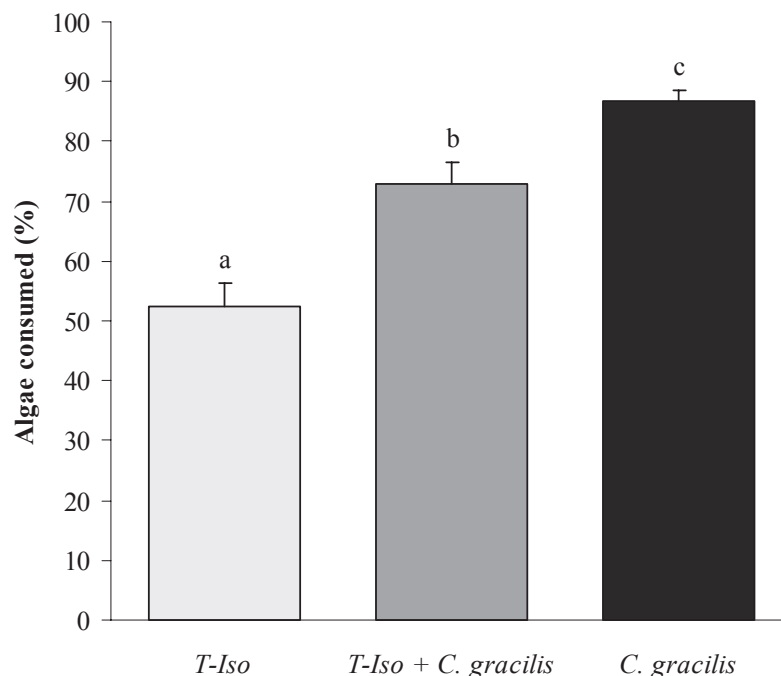
### Statistical analysis

ANOVA was performed if normality and homogeneity of variances was respected. ANOVA was followed by post hoc Fisher's least significant difference (LSD) test. For data analysis which did not follow normality and meet homoscedasticity, non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA was performed. Non-parametric Mann-Whitney test was used for each diet to compare mitochondrial oxidative capacities measured with succinate and with glutamate. For each test, the significance threshold was determined at  $P < 0.05$ . Percentage data were transformed (arcsin of the square root) before ANOVA but are presented in figures and tables as untransformed percentage values. All analyses were performed with the Statgraphics software, version Plus 5.1. (Manugistics, Inc, Dallas, USA). Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (S.E.).

## Results

### Algal consumption

There was a significant difference between the three diets (Figure 1,  $P < 0.05$ ). *T-Iso* was less ingested ( $52\% \pm 4$ ) as compared to *C. gracilis* ( $87\% \pm 2$ ). The mixed diet had an intermediate value of  $73\% \pm 4$ .



**Figure 1 :** Algal consumption expressed as % ((inlet concentration (expressed as  $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) – outlet concentration (expressed as  $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ))/inlet concentration\*100) of oysters fed three different diets for 4 consecutive weeks. Values are mean  $\pm$  S.E. Different superscript letters indicate values that differ between oyster groups (n = 19 days of measurements, ANOVA and *a posteriori* test,  $P < 0.05$ ).

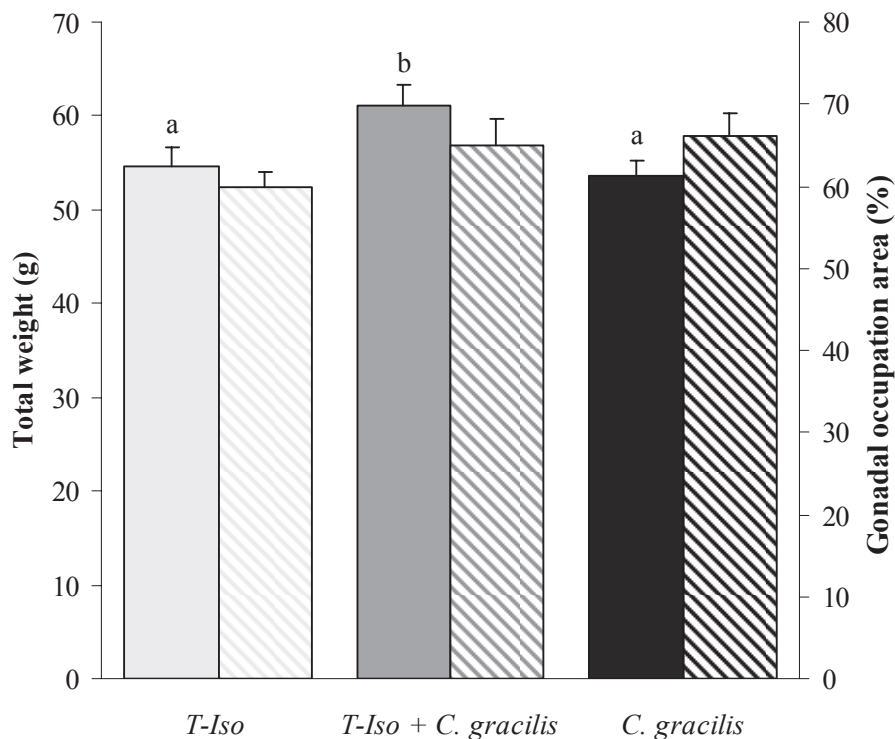


*Oyster weight*

Oyster weight was  $41.7 \pm 2.6$  g prior to dietary conditioning (data not shown). A significant difference between the mixed diet and monospecific diets ( $P = 0.019$ ) was found. Oysters fed a mixture of the two microalgae were 12% heavier than oysters fed *T-Iso*, and 14% heavier than oysters fed *C. gracilis*. However, there was no difference between oysters fed the two monospecific diets, *T-Iso* and *C. gracilis* (Figure 2, mean values of  $54.6 \pm 1.9$  and  $53.6 \pm 1.7$ , respectively).

*Gonad maturation stages and gonad occupation area*

There was no difference in gonad maturation according to diets (data not shown). All dietary conditionings resulted in about 90% reproductively ripe individuals (stage 3). Neither stage 0 nor stage 1, corresponding to inactive and early gametogenesis, respectively, was observed in any oyster group. Percentage of gonad occupation area was  $43.4 \pm 3.5$  prior to dietary conditioning and increased during dietary conditioning (data not shown). However, there was no significant difference in gonad occupation area according to diets (Figure 2, mean percentages of  $59.9 \pm 1.9$ ,  $65.1 \pm 3.1$  and  $66.2 \pm 2.7$  for *T-Iso*, the mix and *C. gracilis*, respectively).



**Figure 2** : Total weight (expressed as g, full bars) and gonad occupation area (% , hatched bars) of oysters ( $n = 30$ ) fed three different diets. Values are mean  $\pm$  S.E. Different superscript letters indicate values that differ between oyster groups (ANOVA and *a posteriori* test,  $P < 0.05$ ).

*Fatty acid composition of gill tissue and mitochondrial membrane*

The relative abundance of most major FA (>1%) in total phospholipids of gill tissue and mitochondria was modified by diet (Tables 2 and 3). The proportion of 20:5n-3 in gill tissue and mitochondria was higher in oysters fed *C. gracilis* as compared to those fed T-*Iso*. On the other hand, the proportion of 22:6n-3 was lower in oysters fed *C. gracilis* than in those fed T-*Iso*. Levels of 20:4n-6 and 22:5n-6 were higher in oysters fed T-*Iso* than in oysters fed *C. gracilis*. Those FA in the mixed diet had intermediate proportions as compared to the two monospecific diets.

Levels of 22:2NMI(7,13) were higher in oysters fed T-*Iso* as compared to those fed *C. gracilis*. In the mixed diet, this FA had intermediate proportions as compared to the two other diets. Levels of 22:3NMI(7,13,16) were higher in oysters fed T-*Iso* as compared to those fed *C. gracilis*. In mitochondria, levels of this FA were lower in oysters fed the mixed diet. On the other hand, 22:2NMI(7,15) was more abundant in oysters fed *C. gracilis* and the mixed diet as compared to those fed T-*Iso* in both gills and mitochondria phospholipids. In spite of these individual changes, the level of total NMI (non-methylene interrupted) FA was not affected by diet in gill tissue and was only slightly higher in mitochondria for oysters fed T-*Iso* and the mixed diet than in oysters fed *C. gracilis*.

The level of 18:1n-7 (NMI FA precursor) was respectively 2 and 2.3 times higher in gill tissue and mitochondria of oysters fed *C. gracilis*, as compared to those fed T-*Iso*. The monounsaturated FA (MUFA) 16:1n-7 and 20:1n-7 were also more abundant in oysters fed *C. gracilis* and the mixed diet as compared to those fed T-*Iso*, in both gills and mitochondria phospholipids. On the contrary, levels of n-9 FA such as 18:1n-9 and 20:1n-9 were higher in oysters fed T-*Iso* as compared to oysters fed *C. gracilis*. Those FA in the mixed diet had intermediate proportions as compared to the two monospecific diets.

Proportions of saturated FA (SFA), MUFA, and polyunsaturated FA (PUFA) changed little with diet. Within PUFA, in both gill tissue and mitochondria, the proportion of n-6 PUFA was higher in oysters fed T-*Iso* as compared to those fed *C. gracilis*. Consequently, the n-3/n-6 ratio was higher in gill tissue and mitochondria of oysters fed *C. gracilis*.

**Table 2 :** Fatty acid composition of gill phospholipids of oysters fed three diets (T-Iso, *C. gracilis*, a mix of T-Iso and *C. gracilis*). The results are expressed as percentages of total fatty acids. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups (n = 6 pools of 5 oysters, ANOVA and *a posteriori* test,  $P < 0.05$ ).

% mol	T-Iso		T-Iso + <i>C. gracilis</i>		<i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
14:0	1.9	0.1	1.9	0.1	1.9	0.0	NS
16:0	12.7 <sup>a</sup>	0.4	13.0 <sup>a</sup>	0.2	13.8 <sup>b</sup>	0.0	S
18:0	5.8 <sup>a</sup>	0.2	6.2 <sup>a</sup>	0.2	6.8 <sup>b</sup>	0.1	S
16:1n-7	2.2 <sup>a</sup>	0.1	2.6 <sup>b</sup>	0.0	3.1 <sup>c</sup>	0.1	S
18:1n-9	3.0 <sup>a</sup>	0.1	1.9 <sup>b</sup>	0.1	0.8 <sup>c</sup>	0.1	S
18:1n-7	3.3 <sup>a</sup>	0.1	5.3 <sup>b</sup>	0.3	6.8 <sup>c</sup>	0.2	S
20:1n-11	3.2 <sup>a</sup>	0.1	3.8 <sup>b</sup>	0.1	3.9 <sup>b</sup>	0.1	S
20:1n-9	2.0 <sup>a</sup>	0.1	1.3 <sup>b</sup>	0.1	0.5 <sup>c</sup>	0.1	S
20:1n-7	5.1 <sup>a</sup>	0.1	6.0 <sup>b</sup>	0.1	6.2 <sup>b</sup>	0.1	S
18:2n-6	1.8 <sup>a</sup>	0.1	1.3 <sup>b</sup>	0.1	0.3 <sup>c</sup>	0.1	S
18:4n-3	1.2 <sup>a</sup>	0.1	0.9 <sup>b</sup>	0.1	0.5 <sup>c</sup>	0.0	S
20:4n-6	5.9 <sup>a</sup>	0.2	4.5 <sup>b</sup>	0.1	3.6 <sup>c</sup>	0.2	S
20:5n-3	10.0 <sup>a</sup>	0.3	14.0 <sup>b</sup>	0.7	20.8 <sup>c</sup>	0.7	S
22:2NMI(7,13)	3.7 <sup>a</sup>	0.2	2.6 <sup>b</sup>	0.2	1.4 <sup>c</sup>	0.1	S
22:2NMI(7,15)	7.9 <sup>a</sup>	0.2	9.4 <sup>b</sup>	0.3	10.0 <sup>c</sup>	0.1	S
22:3NMI(7,13,16)	1.4 <sup>a</sup>	0.0	1.0 <sup>b</sup>	0.0	1.0 <sup>b</sup>	0.0	S
22:4n-6	0.7 <sup>a</sup>	0.0	0.6 <sup>b</sup>	0.0	0.4 <sup>c</sup>	0.0	S
22:5n-6	3.0 <sup>a</sup>	0.1	2.0 <sup>b</sup>	0.2	0.3 <sup>c</sup>	0.1	S
22:5n-3	1.2 <sup>a</sup>	0.0	1.1 <sup>b</sup>	0.0	1.5 <sup>c</sup>	0.0	S
22:6n-3	18.4 <sup>a</sup>	0.4	15.6 <sup>b</sup>	0.4	11.4 <sup>c</sup>	0.1	S
Others*	5.3 <sup>a</sup>	0.1	4.6 <sup>b</sup>	0.1	4.9 <sup>b</sup>	0.1	S
Total BR.	0.4 <sup>a</sup>	0.0	0.3 <sup>b</sup>	0.0	0.2 <sup>c</sup>	0.0	S
Total SAT.	21.6 <sup>a</sup>	0.3	21.3 <sup>a</sup>	0.2	22.8 <sup>b</sup>	0.1	S
Total MONO	19.3 <sup>a</sup>	0.3	21.7 <sup>b</sup>	0.2	22.2 <sup>b</sup>	0.3	S
Total n-9	5.3 <sup>a</sup>	0.1	3.7 <sup>b</sup>	0.2	2.0 <sup>c</sup>	0.1	S
Total n-7	10.7 <sup>a</sup>	0.2	14.0 <sup>b</sup>	0.2	16.3 <sup>c</sup>	0.2	S
Total POLY	58.7 <sup>a</sup>	0.1	56.7 <sup>b</sup>	0.3	54.8 <sup>c</sup>	0.3	S
Total n-4	0.2 <sup>a</sup>	0.0	0.3 <sup>b</sup>	0.0	0.6 <sup>c</sup>	0.0	S
Total n-6	12.8 <sup>a</sup>	0.1	9.3 <sup>b</sup>	0.3	5.2 <sup>c</sup>	0.3	S
Total n-3	32.1 <sup>a</sup>	0.4	33.3 <sup>a</sup>	0.8	35.5 <sup>b</sup>	0.6	S
Total NMI	13.7	0.4	13.8	0.4	13.2	0.2	NS
UI	12.1 <sup>a</sup>	0.1	11.9 <sup>a</sup>	0.2	10.8 <sup>b</sup>	0.1	S

\*Others : total of 21 fatty acids detectable (20:0, 22:0, 24:0, 18:1n-11, 22:1n-9, 16:2n-7, 16:2n-6, 16:2n-4, 16:3n-6, 16:3n-4, 16:4n-3, 18:2n-4, 18:3n-6, 18:3n-3, 18:5n-3, 20:2NMI(5,11), 20:2NMI(5,13), 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:5n-3), none of which were more than 1%.

BR. : branched FA; SAT. : saturated FA; MONO : monounsaturated FA; POLY : polyunsaturated FA; NMI : non-methylene-interrupted FA; UI : unsaturation index

**Table 3** : Fatty acid composition of gill mitochondria phospholipids of oysters fed three diets (T-Iso, *C. gracilis*, a mix of T-Iso and *C. gracilis*). The results are expressed as percentages of total fatty acids. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups (n = 6 pools of 5 oysters, ANOVA and *a posteriori* test,  $P < 0.05$ ).

% mol	T-Iso		T-Iso + <i>C. gracilis</i>		<i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
14:0	1.8	0.1	1.8	0.1	1.7	0.1	NS
16:0	11.6	0.2	11.1	0.1	11.6	0.4	NS
18:0	5.8 <sup>ab</sup>	0.2	5.5 <sup>a</sup>	0.0	6.5 <sup>b</sup>	0.5	S
16:1n-7	1.8 <sup>a</sup>	0.1	2.1 <sup>b</sup>	0.1	2.7 <sup>c</sup>	0.1	S
18:1n-9	2.8 <sup>a</sup>	0.1	2.0 <sup>b</sup>	0.1	0.9 <sup>c</sup>	0.0	S
18:1n-7	3.3 <sup>a</sup>	0.1	5.6 <sup>b</sup>	0.1	7.5 <sup>c</sup>	0.3	S
20:1n-11	2.7 <sup>a</sup>	0.1	2.6 <sup>ab</sup>	0.1	2.5 <sup>b</sup>	0.1	S
20:1n-9	2.1 <sup>a</sup>	0.1	1.4 <sup>b</sup>	0.1	0.4 <sup>c</sup>	0.0	S
20:1n-7	4.4 <sup>a</sup>	0.1	5.0 <sup>b</sup>	0.0	4.9 <sup>b</sup>	0.1	S
18:2n-6	1.6 <sup>a</sup>	0.1	1.2 <sup>b</sup>	0.1	0.3 <sup>c</sup>	0.0	S
18:4n-3	1.3 <sup>a</sup>	0.1	1.0 <sup>b</sup>	0.0	0.6 <sup>c</sup>	0.0	S
20:4n-6	5.6 <sup>a</sup>	0.1	4.4 <sup>b</sup>	0.1	3.3 <sup>c</sup>	0.1	S
20:5n-3	10.3 <sup>a</sup>	0.2	14.9 <sup>b</sup>	0.5	23.7 <sup>c</sup>	0.5	S
22:2NMI(7,13)	3.1 <sup>a</sup>	0.1	2.2 <sup>b</sup>	0.1	1.0 <sup>c</sup>	0.1	S
22:2NMI(7,15)	6.5 <sup>a</sup>	0.1	7.4 <sup>b</sup>	0.1	7.4 <sup>b</sup>	0.2	S
22:3NMI(7,13,16)	1.3 <sup>a</sup>	0.0	0.9 <sup>b</sup>	0.0	1.1 <sup>c</sup>	0.0	S
22:4n-6	0.7 <sup>a</sup>	0.0	0.5 <sup>b</sup>	0.0	0.3 <sup>c</sup>	0.0	S
22:5n-6	2.9 <sup>a</sup>	0.1	2.1 <sup>b</sup>	0.2	0.2 <sup>c</sup>	0.0	S
22:5n-3	1.1 <sup>a</sup>	0.0	1.0 <sup>b</sup>	0.0	1.4 <sup>c</sup>	0.0	S
22:6n-3	21.3 <sup>a</sup>	0.4	20.1 <sup>b</sup>	0.3	14.4 <sup>c</sup>	0.3	S
Others*	4.1 <sup>a</sup>	0.1	3.7 <sup>b</sup>	0.1	3.9 <sup>a</sup>	0.1	S
Total BR.	0.4	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	NS
Total SAT.	19.2	0.3	18.5	0.2	20.0	1.0	NS
Total MONO	17.7 <sup>a</sup>	0.2	19.1 <sup>b</sup>	0.1	19.7 <sup>b</sup>	0.4	S
Total n-9	5.3 <sup>a</sup>	0.1	3.7 <sup>b</sup>	0.2	2.0 <sup>c</sup>	0.1	S
Total n-7	9.5 <sup>a</sup>	0.1	12.7 <sup>b</sup>	0.1	15.4 <sup>c</sup>	0.3	S
Total POLY	62.7 <sup>a</sup>	0.4	62.1 <sup>a</sup>	0.3	60.0 <sup>b</sup>	0.8	S
Total n-4	0.1 <sup>a</sup>	0.0	0.2 <sup>b</sup>	0.0	0.5 <sup>c</sup>	0.0	S
Total n-6	12.5 <sup>a</sup>	0.2	9.5 <sup>b</sup>	0.3	5.1 <sup>c</sup>	0.1	S
Total n-3	38.5 <sup>a</sup>	0.4	41.1 <sup>b</sup>	0.5	43.9 <sup>c</sup>	0.6	S
Total NMI	11.7 <sup>a</sup>	0.2	11.2 <sup>a</sup>	0.2	10.4 <sup>b</sup>	0.3	S
UI	14.2	0.4	15.0	0.3	13.6	0.7	NS

\*Others : total of 19 fatty acids detectable (20:0, 22:0, 24:0, 18:1n-11, 22:1n-9, 16:2n-7, 16:2n-4, 16:3n-6, 16:4n-3, 18:2n-4, 18:3n-6, 18:3n-3, 20:2NMI(5,11), 20:2NMI(5,13), 18:5n-3, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:5n-3), none of which were more than 1%.

BR. : branched FA; SAT. : saturated FA; MONO : monounsaturated FA; POLY : polyunsaturated FA; NMI : non-methylene-interrupted FA; UI : unsaturation index

*Phospholipid classes of gill tissue and mitochondrial membranes*

Phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) were the two main phospholipid classes in gill tissue and mitochondrial membranes of oysters (Tables 4 and 5). In gills, phosphatidylinositol (PI) and ceramide amino ethyl phosphonate (CAEP) represented together 25%, followed by phosphatidylserine (PS) (around 12%), and cardiolipin (CL) (3%) in gills. In mitochondria, PI + CAEP accounted for 22%, PS for about 10%, and CL represented 5% of the total phospholipids. The proportion of PI + CAEP was slightly but significantly lower only in mitochondrial membranes of oysters fed *C. gracilis* as compared to those fed T-*Iso* and the mixed diet. Proportions of PS and CL were unchanged between the dietary groups of oysters in both gill tissues and mitochondria. The proportion of PE was slightly but significantly higher in gills of oysters fed *C. gracilis*, as compared with those fed T-*Iso*. This proportion was unchanged in mitochondria. The proportion of PC was similar in both gill mitochondria and tissues of oysters fed T-*Iso* or *C. gracilis*, but it was slightly but significantly higher in gill tissue of oysters fed the mixed diet. The ratio PC/PE was similar between dietary groups of oysters, in both gill tissue and mitochondrial membrane. The proportion of CL was higher in mitochondria than in gills (from 1.5 to 1.8 times more according to diets), which demonstrated that the technique used to isolate mitochondria had permitted a mitochondria enrichment of the fraction, in accordance with the mitochondrial localization of this FA.

**Table 4** : Proportion of phospholipid classes in gills of oysters fed three diets (T-*Iso*, *C. gracilis*, a mix of T-*Iso* and *C. gracilis*). The results are expressed as percentages of total phospholipids. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups (n = 6 pools of 5 oysters, ANOVA and *a posteriori* test,  $P < 0.05$ ).

	T- <i>Iso</i>		T- <i>Iso</i> + <i>C. gracilis</i>		<i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
PE	30.3 <sup>a</sup>	0.4	31.1 <sup>ab</sup>	0.4	32.1 <sup>b</sup>	0.5	S
PI + CAEP	26.9	0.2	25.0	0.4	25.9	0.3	NS
CL	3.2	0.1	3.0	0.2	3.0	0.1	NS
PC	27.2 <sup>a</sup>	0.3	29.1 <sup>b</sup>	0.7	27.2 <sup>a</sup>	0.6	S
PS	12.4	0.3	11.8	0.2	11.8	0.1	NS
PC/PE	0.90	0.02	0.94	0.03	0.87	0.03	NS

PE : phosphatidylethanolamine; PI : phosphatidylinositol; CL : cardiolipin; CAEP : ceramide aminoethylphosphonate; PC : phosphatidylcholine; PS : phosphatidylserine

**Table 5** : Proportion of phospholipid classes in gill mitochondria of oysters fed three diets (T-Iso, *C. gracilis*, a mix of T-Iso and *C. gracilis*). The results are expressed as percentages of total phospholipids. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups (n = 6 pools of 5 oysters, ANOVA and *a posteriori* test,  $P < 0.05$ ).

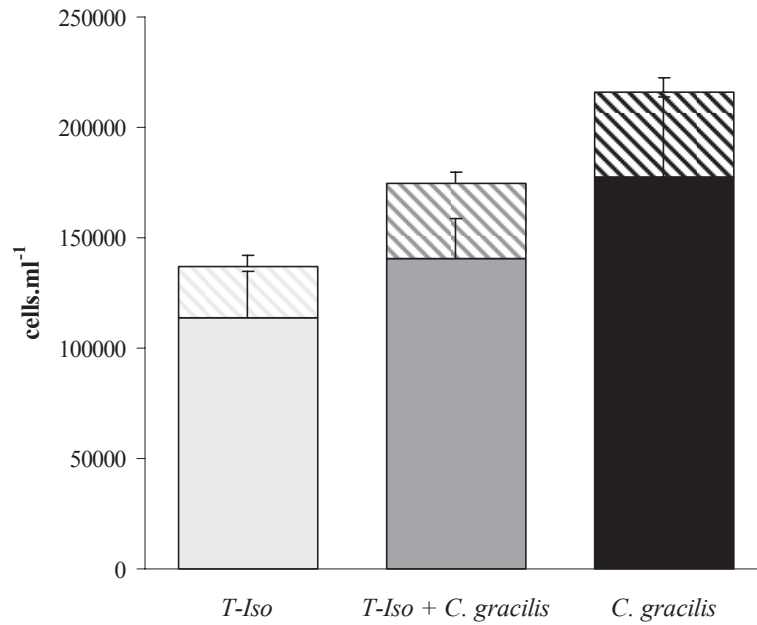
	T-Iso		T-Iso + <i>C. gracilis</i>		<i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
PE	31.3	0.2	30.6	0.3	31.3	0.4	NS
PI + CAEP	22.0 <sup>a</sup>	0.3	21.9 <sup>a</sup>	0.4	20.9 <sup>b</sup>	0.3	S
CL	4.7	0.2	5.0	0.2	5.4	0.2	NS
PC	32.3	0.8	33.4	0.9	34.2	0.5	NS
PS	9.6	0.6	9.0	1.0	8.2	0.3	NS
PC/PE	1.03	0.03	1.09	0.02	1.09	0.02	NS

PE : phosphatidylethanolamine; PI : phosphatidylinositol; CL : cardiolipin; CAEP : ceramide aminoethylphosphonate; PC : phosphatidylcholine; PS : phosphatidylserine

#### *Hemocyste variables*

Hemocytes of the Pacific oyster *C. gigas* comprised two sub-populations: hyalinocytes and granulocytes, with hyalinocytes representing the main sub-population (Figure 3). Albeit not statistically significant ( $P = 0.203$  and  $0.164$  respectively), hyalinocytes and granulocytes tended to be more abundant in oysters fed *C. gracilis* than in those fed T-Iso. In oysters fed the mixed diet, granulocytes showed an intermediate value whereas hyalinocytes concentration was slightly, but not significantly, lower than in oysters fed monospecific diets (data not shown).

Hyalinocytes showed lower basal levels of oxidative activity (DCFH oxidation), mitochondrial superoxide and  $\Delta\psi_m$  than granulocytes (Table 6). Among all measured parameters in both cell sub-populations, only mitochondrial membrane potential in hyalinocytes was significantly affected by diets and was 1.5 times higher in oysters fed T-Iso than for those fed diet *C. gracilis*. In hyalinocytes of oysters fed the mixed diet, mitochondrial membrane potential had an intermediate value and was not statistically different from oysters fed monospecific diets. When MitoSOX™ was used to evaluate superoxide production in mitochondria, mean values in both granulocytes and hyalinocytes tended to be lower in oysters fed the mixed diet but differences were not significant ( $P > 0.2$ ).



**Figure 3 :** Hyalinocyte concentration (full bars) and granulocyte concentration (hatched bars), expressed in cells.ml<sup>-1</sup>, in oysters fed three different diets. Values are mean ± S.E. (n = 6 pools of 5 oysters).

**Table 6 :** Hemocyte parameters of oysters fed three diets (T-Iso, C. gracilis and the mix T-Iso + C. gracilis). Proportions of dead hemocytes are expressed in percentage. Mitochondrial membrane potential is expressed as a fluorescence ratio. The other parameters (size, complexity, oxidative activity and mitochondrial superoxide production) are expressed in arbitrary units (A.U.). Different superscript letters indicate values that differ significantly between diets (n = 6 pools of 5 oysters, ANOVA and *a posteriori* test,  $P < 0.05$ ).

	T-Iso		T-Iso + C. gracilis		C. gracilis		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
percentage of dead hemocytes	4.3	0.8	4.4	0.5	4.7	0.8	NS
<b>granulocytes</b>							
size (A.U.)	249	9	248	9	252	6	NS
complexity (A.U.)	672	31	688	28	646	27	NS
oxidative activity (A.U.)	106	20	113	24	113	15	NS
mitochondrial superoxide production (A.U.)	167	14	118	26	157	21	NS
mitochondrial membrane potential (ratio)	13	2	12	1	13	2	NS
<b>hyalinocytes</b>							
size (A.U.)	214	4	224	2	215	12	NS
complexity (A.U.)	103	7	102	4	89	6	NS
oxidative activity (A.U.)	56	14	58	13	58	10	NS
mitochondrial superoxide production (A.U.)	123	14	75	19	106	27	NS
mitochondrial membrane potential (ratio)	10 <sup>a</sup>	1	9 <sup>ab</sup>	1	7 <sup>b</sup>	1	S

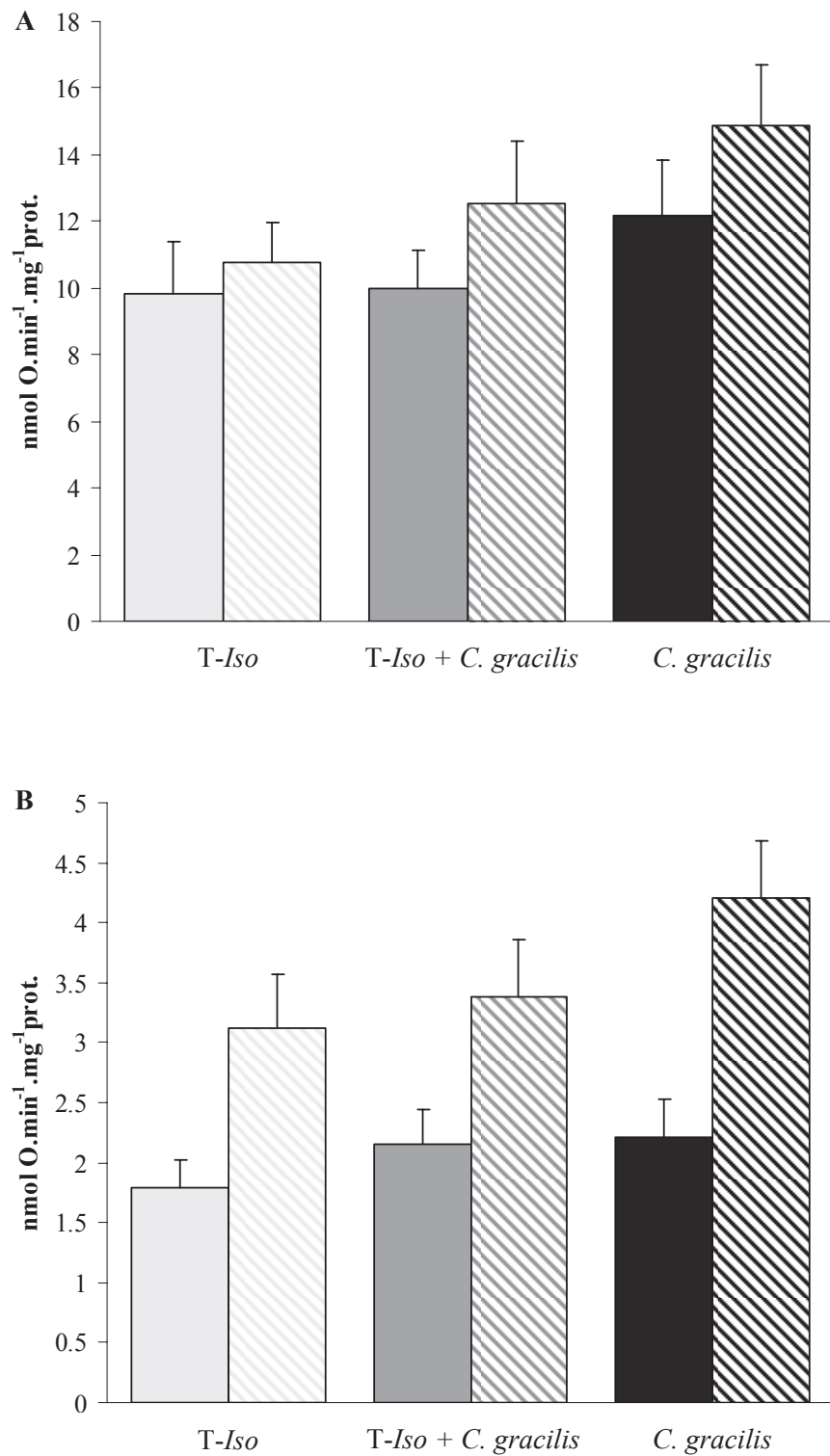
*Mitochondrial oxidative capacities*

Oxidative capacities of mitochondria isolated from oyster gills were assessed using glutamate or succinate. Maximal state 3 rates of glutamate and succinate oxidation were not affected by dietary conditioning (Figure 4A). Although not statistically significant, oxidative phosphorylation with succinate tended to be higher in oysters fed *C. gracilis* than in oysters fed T-*Iso* (Figure 4A,  $P = 0.093$ ). The same trend was observed with state 4 when succinate was used as substrate (Figure 4B). Maximal state 3 respiration fuelled with glutamate was not different from state 3 with succinate (Figure 4A). However, the non-phosphorylating rate (state 4) was significantly higher with succinate as substrate than with glutamate (Figure 4B,  $P < 0.05$ ). RCR and ADP/O were significantly higher with glutamate as substrate as compared to succinate (Table 7,  $P < 0.05$ ). RCR  $> 4.8$  for glutamate and  $> 3.3$  for succinate indicated mitochondrial preparations with tightly coupled mitochondria. RCR and ADP/O were not modified by dietary conditioning.

**Table 7 :** Respiratory control ratio (RCR) and oxidative phosphorylation efficiency (ADP/O), with glutamate 40 mM or succinate 20 mM as substrate and ADP 0.6 mM of oysters fed three diets (T-*Iso*, *C. gracilis* and the mix T-*Iso* + *C. gracilis*, n = 6 pools of 5 oysters).

	T- <i>Iso</i>		T- <i>Iso</i> + <i>C. gracilis</i>		<i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
RCR glutamate	5.4	0.5	4.8	0.4	5.6	0.2	NS
RCR succinate	3.4	0.0	3.3	0.2	3.5	0.1	NS
ADP/O glutamate	2.3	0.3	2.3	0.3	2.4	0.3	NS
ADP/O succinate	1.8	0.2	1.8	0.2	1.8	0.2	NS





**Figure 4** : Phosphorylating (state 3, A) and non-phosphorylating oxygen consumption (state 4, B) with glutamate 40 mM (full bars) or succinate 20 mM (hatched bars), measured at 10°C on mitochondria isolated from oysters fed three different diets. State 3 (expressed as  $\text{nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot.}$ ), was determined after adding of ADP 0.6 mM (A), whereas state 4 (expressed as  $\text{nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot.}$ ) was measured after ADP depletion (B). Values are mean  $\pm$  S.E. ( $n = 6$  pools of 5 oysters).

*Cytochrome c oxidase activity*

CCO activity in mitochondrial suspension, expressed in  $\text{U.mg}^{-1}$  mitochondrial protein, was not different between dietary groups (Table 8). CCO activity was expressed using either the amount of mitochondrial protein or the amount of *cyt a* (nmol). As *cyt a* is located in complex IV (CCO) of the respiratory chain, the activity of CCO expressed per nmole of cytochrome *a* units reflects its catalytic activity. Oysters fed *T. Iso* tended to have a higher catalytic activity of CCO than those fed *C. gracilis* and the mixed diet, but differences were not significant ( $P = 0.400$ ).

*Citrate synthase activity*

CS activity, measured on isolated gill tissue and expressed in  $\text{U.mg}^{-1}$  gill tissue, did not differ between dietary groups (Table 8).

**Table 8 :** CCO activity, expressed per mg of mitochondrial proteins or per nmol of cytochrome *a*, and CS activity, expressed per mg of gill tissue of oysters fed three diets (*T-Iso*, *C. gracilis* and the mix *T-Iso* + *C gracilis*,  $n = 6$  pools of 5 oysters).

	<i>T-Iso</i>		<i>T-Iso</i> + <i>C. gracilis</i>		<i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
CCO activity ( $\text{U.mg}^{-1}\text{prot.}$ )	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	NS
( $\text{U.nmol}^{-1}\text{cyt.a}$ )	4.1	0.6	3.2	0.4	3.7	0.2	NS
CS activity ( $\text{U.mg}^{-1}\text{tissue}$ )	4.7	0.2	5.0	0.2	5.1	0.1	NS

*Mitochondrial cytochrome concentrations*

There was no difference in concentrations of cytochromes *a*, *b*, *c*<sub>1</sub>, and *c* between dietary groups (Table 9). Similarly, there was no difference between diets when cytochrome concentrations were expressed relative to cytochrome *c*<sub>1</sub>.

**Table 9 :** Concentrations of mitochondrial cytochromes *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*, expressed as nmol of cytochrome per mg of mitochondrial proteins, and relative cytochrome ratios related to cytochrome *c*<sub>1</sub> of oysters fed three diets (T-*Iso*, *C. gracilis* and the mix T-*Iso* + *C. gracilis*, n = 6 pools of 5 oysters).

	T- <i>Iso</i>		T- <i>Iso</i> + <i>C. gracilis</i>		<i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
<b>Cyt. concentrations (nmol.mg<sup>-1</sup>prot.)</b>							
<i>a</i>	0.05	0.006	0.05	0.007	0.05	0.007	NS
<i>b</i>	0.16	0.016	0.16	0.009	0.19	0.021	NS
<i>c</i> <sub>1</sub>	0.11	0.014	0.12	0.016	0.12	0.018	NS
<i>c</i>	0.05	0.005	0.06	0.010	0.07	0.012	NS
<b>Relative ratios</b>							
<i>a/c</i> <sub>1</sub>	0.46	0.07	0.46	0.08	0.49	0.09	NS
<i>b/c</i> <sub>1</sub>	1.55	0.18	1.48	0.15	1.77	0.20	NS
<i>c/c</i> <sub>1</sub>	0.47	0.05	0.48	0.07	0.61	0.09	NS

## Discussion

To assess the influence of dietary conditioning at cellular and subcellular levels, oysters were fed for four weeks two monospecific diets and a mix of them. The two microalgae used in this study were chosen because of their differences in FA composition, with *T-Iso* rich in 22:6n-3 but relatively poor in 20:5n-3, whereas *C. gracilis* is rich in 20:5n-3 but poor in 22:6n-3 (González-Araya et al. 2011). After four weeks of dietary conditioning, FA compositions of gill tissue and mitochondria phospholipids were markedly imprinted by diets. However, these dietary modifications of membrane lipid FA composition resulted in only subtle functional impacts on either hemocyte or mitochondrial parameters.

Delaporte et al. (2003) demonstrated that a similar marked impact of algal diets on FA composition of phospholipids was linked to a higher oxidative activity in both sub-populations of hemocytes in oysters fed *C. calcitrans*, as compared to those fed *T-Iso*. However, our results showed no significant difference in oxidative activity between dietary groups. It has been demonstrated that, in unstimulated hemocytes of *C. gigas*, mitochondria are the major source of oxidative activity (Donaghy et al. 2012), as evaluated through DCFH oxidation. This suggests that, in the present study, diets did not affect oxidative activity in mitochondria of hemocytes. A shorter experimental duration, (one month rather than two) may explain the differences in these observations. In the present study, measures conducted with MitoSOX™, a probe which specifically detects superoxide production in mitochondria (Mukhopadhyay et al. 2007), showed no difference between dietary treatments, and confirmed results obtained with DCFH-DA. The only hemocyte parameter that varied significantly between dietary treatments was the mitochondrial membrane potential, which was higher with *T-Iso* than with *C. gracilis*. Effects of n-3 and n-6 PUFA on mitochondrial membrane potential were reported by Rohrbach (2009) and Watkins et al. (1998), who demonstrated that there was an increase in mitochondrial membrane potential in live human colonic adenocarcinoma cells enriched with 22:6n-3, underlining the importance of this fatty acid in modulating mitochondrial functions. Oysters fed *T-Iso* accumulated 22:6n-3 in their membranes. We found a good correlation between 22:6n-3 content in gill membrane and values of mitochondrial membrane potential in hemocytes ( $P = 0.002$  and  $R^2 = 0.46$ , data not shown).

Although algal dietary treatment markedly changed mitochondrial membrane FA composition, no changes was observed in phosphorylating (state 3) and non-phosphorylating

(state 4) rates of oxygen consumption fueled by glutamate through complexes I or succinate through complex II. Feeding oysters on *C. gracilis* tended to increase both phosphorylating and non-phosphorylating oxygen consumption as compared to T-*Iso* dietary treatment. Astorg and Chevalier (1991), Lemieux et al. (2008) and Khairallah et al. (2012) observed that, in rat heart and liver mitochondria, oxidative capacities were unchanged with dietary treatments despite major changes in mitochondrial membrane FA composition. A similar pattern occurs in muscle mitochondria of rainbow trout, except that state 4 rates are affected by diet (Martin et al. 2012).

Specific enzymes of the ETC could be more sensitive to changes in membrane FA composition than overall mitochondrial properties (Martin et al. 2012). In this context, the activity of CCO has been investigated in oysters as CCO activity was previously shown to be modulated by diet in rats heart mitochondria (Yamaoka et al. 1988) and in ground squirrel liver mitochondria (Gerson et al. 2008). CCO activity was reduced for rats fed an n-3 rich diet, compared to those fed an n-6 rich (Yamaoka et al. 1988). However, CCO activity of *C. gigas* gill mitochondria (present study) was not significantly modified according to algal diet, which is in accordance with the results of mitochondrial oxygen consumption. Similarly, CCO activity of muscle mitochondria in rainbow trout fed two diets differing in FA composition, and especially in 22:6n-3 content, was not affected by diet (Martin et al. 2012).

Effect of dietary PUFA on immune cell proliferation was reported in mice (Pompos and Fritsche 2002 ; Petursdottir and Hardardottir 2007), and chicks (Wang et al. 2000). In clams and oysters, concentrations of circulating hemocytes were also modulated by PUFA dietary composition (Delaporte et al. 2003 ; Delaporte et al. 2006). In oysters, increase of circulating hemocyte could be explained by changes in production of eicosanoid metabolites, which regulate immune functions (Delaporte et al. 2006). Similar to the results of Delaporte et al. (2003) with the *C. calcitrans* diet, oysters fed *C. gracilis* in our study tend to have a higher number of total circulating hemocytes as compared to oysters fed T-*Iso* and the mixed diet ( $P = 0.166$ ). Again, this may be due to the higher levels of 20:5n-3, a precursor for eicosanoids (Lands 1992), which could have stimulated hemocyte production.

Changes in mitochondrial abundance could impact tissue aerobic capacity (Guderley 2004), and in mammals, mitochondrial abundance can be modulated by supplementation of n-3 PUFA via induction of genes involved in mitochondria biogenesis (Rohrbach 2009). Here, the mass specific activities of CS were measured to detect whether diet could have induced changes in the overall tissue aerobic capacity and mitochondria concentration (Brown and

Stuart 2007). No significant differences were seen between dietary groups, suggesting that diets have limited impact on mitochondrial density and mitochondria biogenesis in oyster gills. In the scallop *Argopecten purpuratus*, CS in muscle was found to be higher when scallops are fed T-Iso than *C. calcitrans* (Guderley et al. 2011). In oysters, those fed T-Iso also tended to have a lower activity compared to those fed *C. gracilis*, but differences were not significant. Additionally, as previously reported in rainbow trout red muscle fed a diet rich in 22:6n-3 (Guderley et al. 2008 ; Martin et al. 2012), concentrations of cytochromes in oyster gill mitochondria did not change with diet. This suggests that there was no modification in the mitochondrial cristae density.

A clear dietary imprint of diets can be seen in FA composition of mitochondrial membrane as well as of gill phospholipids. Relative abundance of almost all FA differed significantly between diets for both tissue and mitochondrial compartments. Oysters fed *C. gracilis* showed higher levels of 20:5n-3 compared to oysters fed T-Iso; whereas oysters fed T-Iso incorporated more 22:6n-3 compared to oysters fed *C. gracilis*. The same observations were made in gonad, digestive gland and muscle of flat oysters exposed to the same dietary conditioning (González-Araya et al. 2011). Despite a marked imprint of FA composition of microalgae, regulation of essential FA incorporation was also apparent. Proportion of 20:5n-3 in gill tissue and mitochondrial membranes was 2 times higher in oysters fed *C. gracilis* compared to oysters fed T-Iso, while 20:5n-3 was about 70 times more abundant in *C. gracilis* than in T-Iso. Similarly, 22:6n-3 was 1.5 times more abundant in gill and mitochondrial membranes of oysters fed T-Iso compared to oysters fed *C. gracilis*, whereas 22:6n-3 was 9 times more abundant in T-Iso than in *C. gracilis*. The maintenance of high levels of 20:5n-3 in oysters fed T-Iso could be explained by the important energetic role of this FA as a substrate in oysters (Delaporte et al. 2003). Some others FA showed more specific regulations, such as 20:4n-6, for which the proportion in mitochondria changed in the opposite direction to the algal FA profiles. Oysters fed T-Iso showed a relatively high content in 22:5n-6 in their gill and mitochondrial membranes (3% of total FA) as compared to the algal content of this FA (1.7%). Intermediate values for oysters fed the mixed diet (~ 2%) would indicate a specific and selective incorporation of this FA in phospholipids. The same observation was made in phospholipids of trout red muscle mitochondria, suggesting that 22:5n-6 is central in the maintenance of total PUFA (Martin et al. 2012). It has previously been hypothesized that in scallops 22:5n-6 is essential for growth and for the maintenance of membrane structure and fluidity (Soudant et al. 1996a ; Milke et al. 2006). It is interesting to

note that the sum of 20:5n-3+22:6n-3+22:5n-6 in gills membrane was similar (25% of total FA) in oysters fed the three diets. The same trend was observed in mitochondrial membranes (values between 28% and 32% of total FA).

Some other FA such as 18:1n-7 (3.3-7.5%), which represents 0.5% in *C. gracilis* and 1.1% of total FA in T-Iso, were more abundant in oysters than in their respective diets. Despite the low capacity of bivalves to synthesize PUFA, our results indicated elongation of 16:1n-7. Similarly, *de novo* synthesis of NMI FA 22:2NMI(7,13) and 22:2NMI(7,15), was associated with the high levels of their n-9 FA precursors (18:1 and 20:1, more abundant in oysters fed T-Iso) and n-7 FA precursors (16:1, 18:1, and 20:1, more abundant in oysters fed *C. gracilis*) as reported by Delaporte et al. (2005). However, despite these differences in relative proportions of individual NMI FA between oysters fed the different diets, total NMI was maintained in gills and mitochondria. This observation further supports the structural and functional importance of these FA which may serve to adjust membrane fluidity or to reduce susceptibility to membrane peroxidation (Kraffe et al. 2004 ; Pirini et al. 2007 ; Ventrella et al. 2008 ; Le Grand et al. 2011 ; Munro and Blier 2012). In the same way, while individual FA showed major modifications in gill tissue and mitochondria phospholipids, the observed regulation of FA composition led total SFA, MUFA and PUFA (including NMI) to be quite equivalent between oysters fed the three diets as reported in feeding experiments on mammals (Astorg and Chevalier 1991 ; Lemieux et al. 2008), fish (Guderley et al. 2008 ; Martin et al. 2012) and bivalves (Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1996a ; Soudant et al. 1996c ; Delaporte et al. 2005). On one hand, this confirms the important role of overall characteristics of membrane FA in controlling enzymatic activities, as suggested by Hulbert and Else in their Membrane Pacemaker Theory (Hulbert and Else 1999). Pacemaker theory argues that overall FA unsaturation influences the kinetic energy of membrane proteins thereby setting rates of membrane processes (Hulbert 2007 ; Hulbert 2008). On the other hand, despite the marked changes of the FA composition of total phospholipids, specific regulation of the level of individual FA imply that molecular species are selected from the available pool of FA for specific structural roles and regulation of mitochondrial and hemocyte function in *C. gigas*. This would support the importance of specific lipid binding sites on membrane proteins that control their activity (Zhou et al. 2011 ; Martin et al. 2012 ; Khairallah et al. 2012).

Modulation of phospholipid classes in the environment of membrane-bound proteins offers another regulatory mechanism (Robinson 1993 ; Stuart et al. 1998 ; Frick et al. 2010).

In our study, proportions of phospholipids were only slightly modified by diet in gill and mitochondria. It has been reported that the ratio PC/PE can be changed in conditions of thermal adaptation or essential fatty acids deficiency to maintain membrane dynamics and mitochondrial activity (Senault et al. 1990). In our study, this ratio was not changed by diet indicating that oysters would not use this strategy to maintain activity and counterbalance FA modifications induced by dietary conditioning.

During the four week experiment, oysters fed the mixed diet gained significantly more weight than those fed monospecific diets. This could not be explained by algal consumption as *C. gracilis* was much more consumed than T-*Iso*, and the mix of these two microalgae showed intermediate values. Better growth with mixed algae diets as compared to monospecific diet has already been reported in oysters (Calabrese and Davis 1970), clams (Calabrese and Davis 1970 ; Helm and Laing 1987 ; Albentosa et al. 1993), and sea scallops (Milke et al. 2004). Nutrient diversity, higher in a mixed than in a monospecific diet, is an important factor facilitating growth, as hypothesized by Vickery and McClintock (2000). We sought to identify if difference in growth between oysters fed monospecific diets and mixed diet can be explained by difference in mitochondrial activities. However, there was no relationship between growth and rates of oxidative phosphorylation ( $P = 0.594$  and  $R^2 = 0.02$  for succinate;  $P = 0.213$  and  $R^2 = 0.09$  for glutamate, data not shown).

In bivalves, diet can influence the reproductive process and output. Because of its rich content in 22:6n-3, T-*Iso* is more favourable than *C. calcitrans* for vitellogenesis and embryogenesis in *P. maximus* (Soudant et al. 1996a ; Soudant et al. 1996b ; Soudant et al. 1996c). However, we found no difference either in gonad occupation area, or in gametogenic stage (most of animals were in stage 3, data not shown) between dietary treatments. Thus diets had no effect on oyster gonad maturation despite major differences in algal contents of three FA, 22:6n-3, 20:5n-3 and 20:4n-6, known for their importance in scallop reproduction (Soudant et al. 1996a). Oysters, as many marine invertebrates, have a very high fecundity, leading gametogenesis to generate major energetic costs that can impact several physiological functions. Given its role as oxidative powerhouse of the cell, mitochondria are highly solicited during reproduction in oysters and other marine invertebrates (Keller et al. 2004 ; Kraffe et al. 2008). The homeostasis of functional characteristics of mitochondria observed between dietary treatments may be of importance in supporting gonadal maturation under a range of feeding conditions.



## Conclusion

Diet had a clear imprint on FA composition of both gill tissue and mitochondria membranes, in agreement with previous feeding studies. Proportions of almost all FA differed significantly between oysters fed T-*Iso*, oysters fed *C. gracilis*, and oysters fed a mix of both. In spite of these drastic changes in membrane FA composition, few changes were observed at the cellular (hemocytes) or at subcellular (mitochondria) levels. However, total SFA, total MUFA, total PUFA, total NMI proportions and other individual FA appeared tightly regulated upon dietary changes. This suggests a control of key structural parameters within membrane lipid structures to maintain mitochondrial function as well as most measured hemocyte parameters. Overall the present study suggests that the impact of individual FA content of diet on physiological characteristics and enzymatic activities at both cellular and subcellular levels, is limited. Cellular and mitochondrial homeostasis in spite of modification of membrane FA composition could be a means to face variations in diet composition, and to maintain oyster physiological functions.

## Acknowledgements

We are grateful to all co-workers from the Argenton hatchery for taking care of oysters during the experimental conditioning. Many thanks to Nelly Le Goïc for helping in hemolymph sampling and for explanations of histochemistry techniques, to Marc Long for helping in tissue grinding and lipid analysis, to Caroline Fabioux and Jean-Philippe Beguel for helping in dissections, to Rossana Sussarellu for helping with mitochondrial preparations, to Catherine Segueineau for explanations on enzymatic activities, and to Helga Guderley for English revisions. Tony Dudognon fellowship was funded by the French Research Ministry. Funding for the experiment was provided by the project in Europole Mer (research consortium on marine science and technology in Brittany, France): LIPIDOMITO.

## Conclusion

L'objectif de cette étude était d'éclaircir les relations entre les modifications structurales des membranes biologiques – c'est-à-dire leur composition en lipides – induites par des régimes alimentaires différents dans leur composition en AG, l'activité des cellules hématocytaires et le métabolisme subcellulaire mitochondrial, chez l'huître *Crassostrea gigas*. Les résultats ont montré qu'il semble y avoir une faible interaction entre les importantes différences de composition en AG des lipides membranaires et les activités cellulaires et subcellulaires mesurées.

Des différences notables sont observées au niveau de la consommation des algues. *C. gracilis* est beaucoup plus consommée que *T-Iso*, et le mélange de ces deux algues présente des valeurs intermédiaires. Un taux d'ingestion et une efficacité d'absorption plus faibles avec *T-Iso* comparés à *C. gracilis* ont déjà été reportés chez *Ostrea edulis* (González-Araya et al. 2011). Rico-Villa et al. (2006) ont également observé que *T-Iso* n'est que faiblement ingérée lorsqu'elle est utilisée seule. Néanmoins, les trois lots d'huîtres montrent un développement (poids total et volume occupé par la gonade) et une croissance similaires, ce qui indique que les différences d'ingestion observées entre les trois régimes n'ont pas d'influence sur les développements somatique et germinale des animaux. Les trois régimes semblent donc avoir une valeur nutritive semblable.

En accord avec de précédents travaux (Delaporte et al. 2003 ; Delaporte et al. 2005 ; González-Araya et al. 2011), le régime alimentaire de *C. gigas* a une forte empreinte sur la composition en AG des lipides membranaires de branchies. Toutefois, malgré ces différences, il est apparu une régulation dans l'incorporation de ces AG. Par exemple, l'AG essentiel 20:5n-3 est presque 70 fois plus abondant dans l'algue *C. gracilis* que dans l'algue *T-Iso*, alors qu'il n'est seulement que deux fois plus abondant dans les membranes de branchies des huîtres nourries avec *C. gracilis*, comparées à celles nourries avec *T-Iso*. Malgré les importants changements de composition lipidique, les propriétés fonctionnelles apparaissent très régulées. Les paramètres hématocytaires étudiés sont restés similaires entre les trois régimes, sauf pour le potentiel membranaire mitochondrial, significativement plus élevé chez les huîtres nourries avec *T-Iso*. Bien que les différences ne soient pas significatives, les résultats de notre étude présentent les mêmes tendances que ceux de Delaporte et al. (2003 ;

2006), où les changements de composition en AG membranaires sont associés à des différences de concentrations en hémocytes circulants.

Au niveau subcellulaire, les changements de composition en AG des lipides membranaires observés dans la membrane des mitochondries de branchies sont globalement les mêmes que ceux observés dans la membrane des branchies. Là aussi, malgré les différences marquées de composition lipidique en AG des phospholipides entre les trois groupes d'huîtres, aucune différence de paramètres mitochondriaux n'a été enregistrée, que ce soit au niveau de la consommation en oxygène, des activités enzymatiques, ou de la concentration en cytochromes.

Cette étude montre donc une faible interaction entre les importantes différences de composition lipidique membranaire et les activités enzymatiques, au niveau cellulaire comme au niveau subcellulaire. Ceci confirme les résultats de Martin et al. (2012) effectués chez la truite, mais aussi des travaux chez les mammifères dans lesquels l'activité mitochondriale n'est pas modifiée en dépit d'une modification de composition de lipides membranaires induite par des régimes alimentaires différents (Astorg and Chevalier 1991 ; Larqué et al. 2003 ; Lemieux et al. 2008 ; Khairallah et al. 2012). Des questions se sont posées quant à des composants membranaires spécifiques pouvant permettre de maintenir/contrôler les mécanismes membranaires étudiés face à de telles modifications en AG des phospholipides membranaires. Une des hypothèses serait que la stabilité des activités enzymatiques pourrait être due au maintien des proportions des AG saturés, mono-insaturés et poly-insaturés totaux entre les conditions alimentaires. De précédentes études sur l'effet de la nutrition chez les bivalves ont déjà montré que ces paramètres ne variaient pas ou très peu entre les régimes (Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1996a ; Soudant et al. 1996b ; Delaporte et al. 2005). La régulation de l'homéostasie membranaire pourrait également se faire par des modulations de proportions de classes de phospholipides, ou par des AG minoritaires (Guderley et al. 2008 ; Martin et al. 2012). Dans notre étude, certains AG présentent d'importantes modifications de proportions entre les régimes (20:1n-9, 18:2n-6, et surtout 22:5n-6). En revanche, les proportions d'AG insaturés, mono-insaturés ou poly-insaturés, de même que la proportion de NMI totaux varient peu entre les régimes. De la même façon, les proportions de classes de phospholipides ne sont pas modifiées par l'alimentation.

L'homéostasie cellulaire et mitochondriale, malgré les modifications de composition en AG membranaires, pourrait être un moyen de faire face aux variations de nourriture disponible dans le milieu, et de maintenir les fonctions physiologiques des huîtres. En effet, contrairement aux conditions d'écloserie, la quantité et la qualité (dont sa composition en AG) de la nourriture disponible dans le milieu naturel peut présenter de grandes variations, même à de petites échelles temporelles et spatiales (Wilson-Ormond et al. 1997).



## **CHAPITRE II:**

**Différences d'activité mitochondriale entre  
des spécimens de *Crassostrea gigas* élevés  
sur le terrain ou en éclos**



## Introduction

Les microalgues, et notamment celles utilisées en écloserie, n'ont pas toutes la même valeur nutritionnelle et mènent à des différences de survie, de croissance, de gamétogenèse, de fécondité, de taux d'éclosion, d'embryogenèse et de métamorphose chez les bivalves (Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1996a ; Soudant et al. 1996b ; Rico-Villa et al. 2006). Ces différences sont dues en partie à la composition des algues en AG. Outre leur rôle énergétique, les AG peuvent réguler des fonctions physiologiques par des modifications structurelles des membranes (Murphy 1990). Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, les membranes des bivalves gardent l'empreinte de leur nourriture, leur composition en AG reflétant celle de leur nourriture (Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1999 ; Pennarun et al. 2003 ; Delaporte et al. 2003 ; Delaporte et al. 2005 ; Delaporte et al. 2006). Ces différences de composition en AG membranaires semblent cependant avoir des conséquences limitées et contrôlées au niveau des paramètres hématocytaires de *C. gigas* tandis que les propriétés fonctionnelles mitochondriales ne semblent pas être affectées par des changements de composition en AG membranaires induites par la nutrition.

Le conditionnement artificiel des bivalves présente plusieurs avantages quant au contrôle des facteurs physio-chimiques par rapport aux études réalisées sur le terrain. En effet, les conditions expérimentales simplifient la complexité de l'environnement en la réduisant à une situation artificielle, et dont un nombre limité de facteurs présente une variation contrôlée (Suquet et al. 2005). Parmi les facteurs à prendre en compte, l'alimentation représente un paramètre majeur que nous avons donc voulu prendre en compte lors de ces travaux de thèse. Les bivalves sont des animaux filtreurs capables d'ingérer des particules vivantes (principalement du phytoplancton) ou inertes en suspension dans la colonne d'eau. Ces particules sont responsables de l'apport en énergie nécessaire à leur développement. Mais la physiologie des bivalves dépend également de la qualité de cette nourriture, dont l'impact est modulé par l'environnement où ces bivalves se trouvent (Rosas et al. 2011).

Il a été démontré qu'un mélange des deux microalgues *Isochrysis* aff. *galbana* clone Tahiti (T-Iso) et *Chaetoceros calcitrans* représente un bon apport d'AG essentiels, et mène à de meilleures performances (survie, croissance, reproduction) chez les huîtres (Rico-Villa et al. 2006). Toutefois, des études de performances en milieu contrôlé complétées par des études



comparant des animaux maintenus dans leur environnement naturel ont pu mettre en évidence des différences physiologiques et d'activité mitochondriale en fonction du conditionnement des animaux (Guderley et al. 2011 ; Guerra et al. 2012). La survie plus importante, l'index de condition plus élevé et la plus grande croissance coquillière de pétoncles collectés dans leur milieu naturel par rapport à ceux élevés en éclosérie suggèrent que les conditions contrôlées en éclosérie ne sont pas optimales par rapport au statut physiologique des pétoncles. Malgré un régime alimentaire constitué d'un mélange 1:1 d'*I. galbana* et de *C. calcitrans* et distribué *ad libitum*, cette nourriture standardisée ne présente pas les mêmes qualités nutritives que la communauté d'algues rencontrées dans le milieu naturel, et ceci indique que la variabilité et la diversité de la nourriture sont plus importantes pour la condition physiologique des pétoncles que la quantité de nourriture (Guerra et al. 2012). De telles différences sont également observables au niveau subcellulaire. Les capacités oxydatives des mitochondries de gonades de pétoncles collectés dans le milieu naturel sont plus importantes (jusqu'à deux fois plus élevées) que celles des mitochondries de gonades de pétoncles nourries 8 semaines en éclosérie avec T-*Iso* ou *C. calcitrans*, ce qui souligne les déficiences induites par des régimes monospécifiques comparés au régime alimentaire trouvé par les pétoncles dans leur milieu naturel (Guderley et al. 2011).

En lien avec ces précédentes études comparant le statut physiologique des bivalves élevées en éclosérie ou dans leur milieu naturel, et en continuité de notre problématique sur l'effet de la nutrition sur les capacités mitochondriales, nous avons comparé dans cette étude un lot d'huîtres nourries dans leur environnement naturel avec un lot d'huîtres nourries en éclosérie avec un mélange T-*Iso* + *C. gracilis* pendant quatre semaines. Au début et à la fin de l'expérimentation, nous avons mesuré des paramètres physiologiques tels que le poids total des huîtres et le développement de leur gonade pour voir l'effet du régime sur l'animal entier. La composition des membranes de mitochondries en AG et en phospholipides a été analysée, et la fonctionnalité de ces mêmes membranes a été évaluée en mesurant la consommation d'oxygène mitochondriale, l'activité de la CCO et de la CS, et le contenu en cytochromes *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> et *c*.

Les résultats de cette étude devant faire l'objet d'une publication dont la soumission se fera auprès du journal *Comparative Biochemistry and Physiology* (« **Modified gills mitochondrial properties in the Pacific oysters *Crassostrea gigas* grown in the field or in hatchery** »), ils sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique, dont le résumé est également traduit en français ci-après.

### Résumé

Bien qu'il présente plusieurs avantages par rapport aux études réalisées sur le terrain, le conditionnement artificiel des bivalves a également quelques inconvénients. Les conditions expérimentales doivent être contrôlées de manière à correspondre au mieux aux conditions naturelles, au risque d'introduire des biais dans l'expérimentation. L'alimentation est un facteur important car il peut directement influencer sur la physiologie des bivalves. Malgré l'utilisation d'algues ayant de bonnes qualités nutritives en éclosion, des études comparant les performances de bivalves nourris en éclosion et dans leur milieu naturel ont révélé de nettes différences au niveau de la physiologie de l'animal entier et des activités mitochondriales. Ceci peut s'expliquer par le fait que la variabilité et la diversité de la nourriture dans le milieu naturel ne peut pas être remplacée par un régime standardisé artificiel en éclosion. Comme il l'a été démontré dans une précédente étude (voir chapitre I), les capacités mitochondriales de l'huître creuse *Crassostrea gigas* montrent une grande régulation malgré des régimes alimentaires très différents dans leur composition en AG. Le régime bispécifique T-Iso + *C. calcitrans* représentant un bon apport d'AG essentiels et menant à de bonnes performances physiologiques chez les huîtres, nous avons cherché à savoir si des huîtres nourries avec ce mélange en éclosion présentaient les mêmes capacités mitochondriales que des huîtres nourries dans leur milieu naturel. Après quatre semaines d'expérimentation, les mitochondries ont été isolées des branchies afin de mesurer leur capacité fonctionnelle. Malgré de mineures différences en composition d'AG membranaires entre les deux lots d'huîtres, la consommation mitochondriale d'oxygène et l'activité de la CCO sont significativement plus faibles chez les huîtres nourries en éclosion. Chez ces dernières, une diminution de la quantité de CL et de la concentration en cytochrome *b* a également été observée. Ces résultats semblent donc indiquer que le conditionnement en éclosion, et notamment la nourriture utilisée, ne mime que partiellement les conditions rencontrées par *C. gigas* dans son milieu naturel.



## **Modified gills mitochondrial properties in the Pacific oysters *Crassostrea gigas* grown in the field or in hatchery**

Tony DUDOGNON<sup>a</sup>, Philippe SOUDANT<sup>a</sup> Claudie QUERE<sup>b</sup>, Michel AUFFRET<sup>a</sup>, Helga GUDERLEY<sup>c</sup> and Edouard KRAFFE<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 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

<sup>b</sup> Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, IFREMER, UMR 6539 CNRS / UBO / IRD / IFREMER, 29280 Plouzané, France

<sup>c</sup> Département de Biologie, Université Laval, QC, G1K 7P4, Canada

### **Abstract**

Although experimental conditions have several advantages related to the control of the environment compared to field studies, they also have several drawbacks. Experimental conditions must be controlled to match the natural conditions to not introduce bias into the experiment. Diet is an important factor because it can directly influence the physiology of bivalves. Despite the use of algae with good nutritional quality in hatchery, studies comparing the performance of bivalves fed in hatchery and in the field have revealed clear differences in the physiology and mitochondrial activities of these animals. This can be explained by the fact that food variability and diversity in the natural environment can not be fully replaced by a standardized artificial diet in hatchery. As it has been shown in a previous study (see Chapter I), mitochondrial capacities of the oyster *Crassostrea gigas* show great stability despite major differences in diet fatty acid composition. Bispecific diet T-Iso + *C. calcitrans* represents a good essential fatty acids input and leads to good physiological performances in oysters, and we investigated whether oysters fed this mix in hatchery showed the same mitochondrial capacities than those fed in their natural environment. After four weeks of experiment, mitochondria were isolated from gills to measure their functional capacities. Despite minor differences in membrane fatty acid composition between the two batches of oysters, mitochondrial oxygen consumption and CCO activity were significantly lower in oysters fed in hatchery. In these oysters, a decrease in the amount of CL and in the concentration of cytochrome *b* was also observed. These results seem to indicate that hatchery conditioning, especially food used, only partially mimics the conditions encountered by *C. gigas* in its natural environment.

## Introduction

Although experimental conditions have several advantages related to the control of the environment compared to field studies, they also have several drawbacks, including rearing conditions and realism of experimental design. Indeed, experimental conditions simplify natural complexity within an artificial situation with a controlled variation in a limited number of factors (Suquet et al. 2005). Diet is a major parameter to take into account and feeding experiments have underlined the importance of the choice of diet for bivalves. Bivalves are filter feeders ingesting living (mainly phytoplankton) and inert particles suspended in the water column. The quality of the diet and the environment in which they inhabit is an important parameter for bivalve's physiology and the energetic input it represents (Rosas et al. 2011). Microalgae used to rear bivalves in hatchery do not have the same nutritional value and lead to different performances in growth, survival, gametogenesis, embryogenesis, hatching rate and metamorphosis in bivalves (Epifanio 1979 ; Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1996a ; Soudant et al. 1996b ; Utting and Millican 1997 ; Rico-Villa et al. 2006 ; Pronker et al. 2008). Algal shape, size, toxicity, digestibility and biochemical composition are parameters of algae that affect their nutritional value (Brown et al. 1997).

The differences in biochemical compositions are due in part to the lipid composition of algae and their fatty acid (FA) content which affect membrane lipid composition (Abbott et al. 2012). Many previous studies have established that diet affects tissue cell membrane FA composition in bivalves, with their PUFA composition susceptible to change dependent upon the FA composition of the microalgae (Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1999 ; Pennarun et al. 2003 ; Delaporte et al. 2003 ; Delaporte et al. 2005 ; Delaporte et al. 2006 ; see also Chapter I). Because of their structural role in membranes, modifications of cell membrane FA composition of tissue can modulate membrane protein activities and modulate physiologic functions in mammals (Divakaran and Venkataraman 1977 ; Yamaoka et al. 1988 ; Senault et al. 1990 ; Hulbert and Else 1999 ; Leonard et al. 2001 ; Hirunpanich et al. 2007), fish (Moya-Falcón et al. 2004 ; Hamza et al. 2008), and bivalves (Soudant et al. 1996a ; Soudant et al. 1996b ; Delaporte et al. 2003 ; Delaporte et al. 2006). Given the compositional variety in FA of microalgae, a mixture of the two microalgae *Isochrysis* aff. *galbana* clone Tahiti (*T-Iso*) and *Chaetoceros calcitrans* represents a good essential FA input and leads to the best performances in oysters under controlled conditions (Rico-Villa et al. 2006 ; see also Chapter I).

To understand and predict the capabilities of oysters to modify and adapt its energetic metabolism and cellular respiration systems according to dietary changes, mitochondria are of particular interest. In a former study where we compared adult oysters fed two monoalgal diets (*T-Iso* and *C. gracilis*) differing markedly in their FA composition and a mixture of both, we found that although the FA composition of mitochondrial membranes is strongly modified by diet, membrane-bound processes and protein–lipid interactions seem to be protected as very few functional parameters are modified (see Chapter I). When maintained in experimental tanks, environmental conditions (temperature and oxygen level for examples) of the flow through filtered seawater delivered to the tanks are controlled and often maintained at constant levels. This might prove to be useful for some purposes, but fail to shed light on the actual responses in the field (Folguera et al. 2011 ; Niehaus et al. 2012). Indeed, oyster *C. gigas* is a sessile animal that live on the foreshore and undergo tidal cycles, and have to cope with large variations in oxygen concentration, temperature and food availability and quality, on hourly, daily and seasonal basis. In aquatic ectotherms, many demonstrations exist for regulated changes in mitochondrial functions and membrane compositions with physiological transitions such as thermal acclimation, hypoxia, salinity and desiccation (Glémet and Ballantyne 1995 ; Gillis and Ballantyne 1999 ; Guderley 2004 ; Sussarellu 2011 ; see also Chapter III). This ability to adjust mitochondrial oxidative capacity is critical to controlling energy production under changing environmental conditions (Guderley 2004 ; Bremer and Moyes 2011). Thus, food potential would not be the only factor regulating animal physiology and cellular/subcellular functions, and the natural variability of environmental parameters in the field may support optimal conditions for organisms as compared to experimental conditions (Guerra et al. 2012).

To examine these questions, we compared oysters grown in their natural environment and in controlled hatchery conditions fed with an equilibrated diet composed of a mix of algae *T-Iso* + *C. gracilis*. We measured physiological parameters as weight gain and gonad development. In parallel, we compared membrane lipid composition and oxidative capacities of mitochondria isolated from gills tissue. Cytochrome *c* oxidase (CCO) and citrate synthase (CS) activities, as well as cytochrome *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c* contents were also examined for these two groups of oysters.

## Materials and methods

### *Chemicals*

All chemicals were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), except otherwise mentioned.

### *Sampling procedures*

Pacific oysters *C. gigas*, of 6 to 8.5 cm shell length ( $7.3 \pm 0.2$ , mean value  $\pm$  standard error) were issued from the same origin (spat batch from Arcachon). Hundred oysters were obtained in May 2010. Half was placed in a 800 l flow-through seawater tank at Argenton experimental station (IFREMER, France), with a water flow of  $120 \text{ l.h}^{-1}$ . The tank was supplied with seawater pumped at mid-depth in a tidal dock supplied by natural water partly filtered ( $10 \mu\text{m}$ ) on bag filter, so that water salinity and temperature in experimental tanks was kept similar to those in the field ( $12^\circ\text{C}$  on May 20<sup>th</sup>,  $16^\circ\text{C}$  on June 22<sup>nd</sup>). Oysters were fed *ad libitum* with a mix of two microalgae: *Isochrysis* aff. *galbana* clone Tahiti (T-Iso) and *Chaetoceros gracilis*, supplied in equal cell volume. Cultures were produced in 300 l cylinders containing  $1 \mu\text{m}$  filtered seawater enriched with Conway medium at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , air-CO<sub>2</sub> (3%) mix aerated, and with continuous light. Microalgae were harvested at exponential growth phase (6–8 days). The tank was drained and cleaned three times a week. In parallel, the other half of oysters was placed in a mesh bag stocked on a tray at Aber Benoît (North Brittany,  $48^\circ 32'\text{N}$ ,  $4^\circ 30'\text{W}$ ) situated near to Argenton experimental station. Samplings were performed before the experiment (T0, May 2010) and after 4 weeks of conditioning (Tf, June 2010). Total weight was measured on whole animals (flesh + shells) before dissections and mitochondria preparation.

### *Reproductive activity*

#### *Qualitative analysis of gametogenic stage*

A visceral mass slice of about 2-3 mm thick was cut upstream of adductor muscle, put in a histology cassette and transferred into a modified Davidson's fixative (Latendresse et al. 2002) for 48 h. Fixed tissues were dehydrated in ascending ethanol solutions, cleared with Claral<sup>®</sup> and embedded in paraffin wax. Five micrometer thick sections were cut, mounted on glass slides, and stained with Harry's hematoxylin–eosin Y (Martoja-Pierson and Martoja-Pierson 1967). Slides were examined under a light microscope to determine gametogenic

stage according to the reproductive scale reported by Mann (1979): stage 0 (inactive), stage 1 (early gametogenesis), stage 2 (late gametogenesis) and stage 3 (ripe).

#### *Quantitative analysis of gonad occupation area*

Percentage of gonad occupation area was determined on each histological section as described by Enríquez-Díaz et al. (2009). Briefly, slides were scanned with a digital scanner (hp scanjet 7400c). Gonad area was measured by using an image analysis software (Imaq Vision Builder, National Instruments Corp.).

#### *Mitochondrial analysis*

For each group, six pools containing gills of 5 individuals were used (each pool contained  $2.5 \pm 0.1$  g of gill tissue). Gills were chosen for isolation of mitochondria because they represent major sensors to oxygen fluctuations and have important metabolic function in regulating ion exchange (Sokolova et al. 2005 ; Piontkivska et al. 2011).

#### *Isolation of mitochondria*

Procedures of mitochondria isolation and assay were adapted from Kraffe et al. (2008). All manipulations were carried out on ice and centrifugations were performed at 4°C, taking about 1 h to be completed. Oyster gills were excised, dried with paper towels and weighted. A part was frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C for subsequent analyses, and the rest was initially chopped with scissors and rinsed two times on 80 µm mesh with 2 ml of isolation buffer containing 300 mM sucrose, 30 mM HEPES, 100 mM KCl, 8 mM EGTA and 1% of protease inhibitor cocktail (P2714 Sigma), pH 7.5. On the day of the experiment, 0.5% fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) was extemporaneously added to the buffer. The minced gills were then homogenized with three series of three passes in a motorised Potter tissue grinder (Heidolph, Kelheim, Germany) with a loosely fitting pestle, in 10 volumes of ice-cold isolation buffer. The homogenate was centrifuged at 900 g at 4°C for 10 min. The supernatant was collected, filtered on 80 µm mesh, and again centrifuged at 900 g at 4°C for 10 min. The resulting supernatant, considered free of unbroken cells or cell debris, was centrifuged at 10,000 g. The mitochondrial pellet was re-suspended in a volume of reaction buffer (400 mM sucrose, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM HEPES, 90 mM KCl, 50 mM taurine, 50 mM β-alanine, pH 7.5, with 0.5% fatty acid-free BSA added on the day of the experiment), corresponding to one-tenth of the mass of tissue used, and was used to immediately perform



oxygen uptake. A subsample was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent assays of enzymatic activities.

#### *Measurement of oxygen consumption*

Mitochondrial oxygen consumption was measured polarographically using a water-jacketed  $\text{O}_2$  monitoring system (Qubit System, Kingston, Ontario, Canada). Temperature was controlled at  $10^{\circ}\text{C}$  by a circulating refrigerated water bath. For each assay, around 0.8 mg of mitochondrial protein (40  $\mu\text{l}$  mitochondrial preparation) was added to 0.4 ml reaction buffer containing 400 mM sucrose, 30 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM taurine and 50 mM  $\beta$ -alanine, pH 7.5. On the day of the experiment, 0.5% BSA was extemporaneously added to the assay medium. For measurement of maximal oxidative capacities, glutamate (40 mM) or succinate (20 mM) was added to fuel oxygen consumption through complex I or II, respectively. The maximal respiration rate (state 3) was obtained after addition of ADP to a final concentration of 600  $\mu\text{M}$ . Preliminary experiments showed that glutamate alone stimulates respiration through complex I as previously found in *Crassostrea virginica* (Burcham et al. 1983). Our pilot studies showed that 40 mM for glutamate and 20 mM for succinate are saturating concentrations under the assay conditions of this study (data not shown). Non-phosphorylating oxygen consumption (state 4) rate was measured after ADP depletion. Each measurement was performed in simultaneous triplicates using three polarographic chambers. RCR (respiratory control ratio) was defined as the ratio between state 3 and state 4. Oxidative phosphorylation efficiency (relation between ADP added and the oxygen consumption) was calculated as ADP/O ratio according to Estabrook (1967).

#### *Enzymatic activities*

Cytochrome *c* oxidase activity measured on mitochondrial preparations was adapted from Bouchard and Guderley (2003) and from Kraffe et al. (2008). Mitochondrial preparation was submitted to two cycles of freezing and thawing. The disrupted mitochondria were diluted in the assay buffer containing  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM pH 7.8 at  $25^{\circ}\text{C}$ . Bovine cytochrome *c* (cyt *c* C2037 Sigma) was employed as substrate to stimulate maximal CCO activity. Reduced cyt *c* solution was prepared by adding few grains of sodium dithionite. To avoid dithionite excess, small amounts of a stock solution of reduced cyt *c* were added to a cyt *c* oxidized solution. Absorbance was followed at 550 nm in order to obtain 95%

absorbance of the reduced cyt *c* stock solution. The reaction was performed in microplates at 25°C in presence of an initial cyt *c* concentration of 60 µM. The decrease in absorbance was followed at 550 nm for 10 min and all assays were run in triplicate. Activities were calculated using an extinction coefficient of 19.6 mmol.l<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> for cyt *c* and are expressed as µmol cyt *c* transformed min<sup>-1</sup> ( $U_{CCO} = \mu\text{mol cytochrome } c \text{ reduced min}^{-1}$ , first order reaction).

Citrate synthase activity was measured on 100 mg gill tissue. All the manipulations were carried out on ice. Gills were grinded for 10 s with an Ultra Turrax homogeneizer in 1 ml of lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% of Triton X100, 0.5% of Igepal, and 10% (v/v) of phosphatase inhibitor cocktail II (P5726 Sigma)). On the day of the experiment, complete EDTA free protease inhibitor cocktail (11873580001 Roche) was added to the buffer (2 tablets for 50 ml). Samples were then incubated 20 min on ice, vortexed, and centrifuged at 10,000 g for 45 min at 4°C. The supernatant was collected and diluted 10 times in the lysis buffer. The reaction was initiated by adding 20 µl of oxaloacetate 5 mM to 20 µl of samples and 160 µl of assay buffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM acetyl coA, 10 mM DTNB) and was monitored in a microplate reader at 412 nm for 10 min at 25°C. All assays were run in triplicate and activities were calculated using an extinction coefficient of 13.6 mM.cm<sup>-1</sup> ( $U_{CS} = \mu\text{mol citrate formed.min}^{-1}$ ).

#### *Cytochrome concentrations*

Cytochromes *a*, *b*, *c*<sub>1</sub>, and *c* concentrations were quantified by different spectra according to Leary et al. (2003) except that mitochondrial suspension (around 0.8 mg of mitochondrial protein) were diluted into of phosphate buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mmol pH 7.8 at 25°C) without Triton-X. Accordingly, the electron transport chain complex was reduced by adding few grains of sodium dithionite and incubated 15 min at room temperature. The reduced samples were read against air-oxidized samples between 400 and 630 nm. We used the solution to the simultaneous equations required to assess individual cytochrome concentrations (Williams Jr. 1964).

#### *Protein concentration*

Aliquots of 20 µl of mitochondria preparations were suspended in reaction buffer without BSA and centrifuged for 10 min at 12,000 g at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended, washed and centrifuged two times again to remove the BSA. Pellets were maintained in 0.5 ml of ultra-pure water and frozen at -80°C until protein analysis. The protein concentration was determined with the RC DC Protein Assay Kit (BIORAD) using BSA as standard.

### *Membrane lipid analysis*

Before lipid extraction of mitochondrial suspensions, a 60  $\mu\text{l}$  aliquot of mitochondrial preparation (around 1.2 mg of mitochondrial protein) was resuspended in the reaction buffer minus BSA and centrifuged at 9000 g at room temperature for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet resuspended, washed in reaction buffer and centrifuged a further two times. The membrane lipids of mitochondrial suspensions were then extracted according to Folch et al. (1957) by resuspending pellets in chloroform/methanol (2:1, vol/vol). The final extracts for gill mitochondria were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  under nitrogen after adding 0.01% w/v butylated hydroxytoluene (BHT, antioxidant).

### *Isolation of polar lipids on silica gel microcolumn*

Lipid extract was evaporated to dryness under nitrogen and lipids were recovered with three washings of 500  $\mu\text{l}$  of  $\text{CHCl}_3$ :methanol (98:2, v/v) and deposited at the top of a silica gel micro-column (30 mm x 5 mm i.d.), packed with Kieselgel 60 (70–230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany) previously heated at  $450^{\circ}\text{C}$  and deactivated with 6 %  $\text{H}_2\text{O}$  (Marty et al. 1992). Neutral lipids were eluted with 10 ml of  $\text{CHCl}_3$ :methanol (98:2, v/v). The polar lipid fraction was recovered with 15 ml methanol, and 10  $\mu\text{l}$  of a C23:0 solution at  $0.23 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  was added as internal standard for further fatty acid analysis.

### *Fatty acids analysis of membrane lipids*

The polar lipid fraction was evaporated to dryness under nitrogen and then 1 ml of methanol- $\text{BF}_3$  (10%) was added. Tubes were mixed thoroughly and placed on a heating plate at  $95$ – $100^{\circ}\text{C}$  for 10 min. After cooling at ambient temperature, 1 ml of ultra-pure water and 1 ml of hexane were added. Tubes were mixed thoroughly for 2 min and centrifuged at 1,000 g for 10 min. The organic phase containing fatty acid methyl esters (FAME) was washed three times with 1 ml of water. FAME obtained were quantified by gas chromatography and identified by comparing their retention times with those of a standard mixture containing 37 FAME (SUPELCO/Sigma–Aldrich, St-Quentin Fallavier, France), and other known standard mixtures from marine bivalves. A total of 40 FA were quantified and expressed as the molar percentage of the total FA content.

*Separation of membrane lipid classes*

Phospholipid classes were analyzed by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) as described by Haberkorn et al. (2010). A preliminary run was carried out on silica glass plate (HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Darmstadt, Germany) with a polar solvent mix (methyl acetate:isopropanol:chloroform:methanol:KCl, 10:10:10:4:3.6). The plate was then dried and activated on a heating plate at 120°C for 30 min. Lipid samples were spotted on the plate by the CAMAG automatic sampler. The silica plate was then placed into the TLC developing chamber and incubated with the polar solvent mix described above. Lipid classes appeared as black bands after dipping plates in a cupric-sulfate solution, and heating at 160°C for 20 min. The charred plates were read by scanning at 370 nm, and black bands were quantified by Wincats software. The quantities of each phospholipid class were determined by comparison with standards of known amounts. Although sphingomyelin is absent in bivalves, its standard was used to quantify ceramide aminoethylphosphonate (CAEP) which has a similar structure (Le Grand et al. 2011). The technique used did not allow separating properly phosphatidylinositol (PI) and CAEP, so proportions of these two phospholipids were presented as the sum PI + CAEP.

*Statistical analysis*

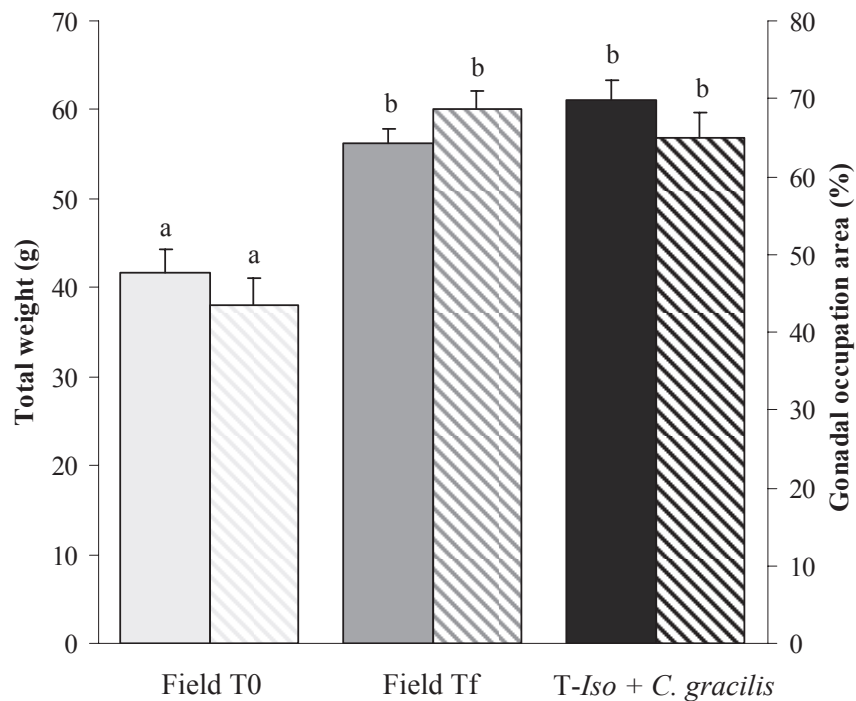
Non-parametric Mann-Whitney test was used. For each test, significant threshold was determined at  $P < 0.05$ . Percentage data were transformed (arcsin of the square root) for statistical analysis but are presented in figures and tables as untransformed percentage values. All analyses were performed with the Statgraphics software, version Plus 5.1. (Manugistics, Inc, Dallas, USA). Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (S.E.).

**Results***Oyster weight*

Oyster weight was  $41.7 \pm 2.6$  g prior to dietary conditioning and increased significantly after 4 weeks for both field and hatchery conditionings (Figure 1). There was no difference between the two groups of oysters sampled in June (mean values of  $56.2 \pm 1.7$  g and  $61.0 \pm 2.3$  g for oysters from the field and the hatchery, respectively).

*Gonad maturation stages and gonad occupation area*

There was a significant difference in gonad maturation according to time of sampling (data not shown). Oysters sampled in May were in late gametogenesis (stage 2), whereas those sampled in June were mainly (about 80%) reproductively ripe individuals (stage 3). Similarly, percentage of gonad occupation area was significantly different between oysters sampled in May and those sampled in June ( $P<0.01$ ). Percentage of gonad occupation area was  $43.4\pm 3.5$  prior the experiment and increased during the four weeks conditioning, to reach  $65.1\pm 3.1\%$  and  $68.8\pm 2.1\%$  in oysters from hatchery and field, respectively. There was no difference in gonad occupation area between hatchery and field oysters (Figure 1).



**Figure 1 :** Total weight (expressed as g, full bars) and gonad occupation area (expressed as %, hatched bars) of oysters ( $n = 30$ ) grown on their natural environment or in hatchery, and sampled at the beginning of the experiment and after 4 weeks of conditioning. Values are mean  $\pm$  S.E. Different superscript letters indicate values that differ significantly ( $P<0.05$ ) between oyster groups.

*Fatty acid composition of mitochondrial membranes*

Overall FA composition of mitochondrial membrane lipids were impacted by the rearing conditions.

The proportion of 20:5n-3 was higher in mitochondria of oysters from the field, especially at T0, as compared to hatchery conditioned oysters. The proportion of 22:6n-3 was 20.9% at the start of the experiment and was lower in mitochondria of oysters from the field sampled in June. Level of 22:6n-3 was not found different between the two groups of oysters sampled in June. Level of 20:4n-6 was not different between hatchery and field oysters after the 4 weeks conditioning, but was higher in oysters at T0. Proportion of 22:5n-6 was 0.4% at the start of the experiment and was not different in oysters after 4 weeks in the field. However, it was more than 5 times higher in oysters from the hatchery at the same time.

After 4 weeks conditioning, level of 22:2NMI(7,15) was increased in mitochondria of hatchery conditioned oysters and decreased in oysters from the field. Total NMI (non-methylene interrupted FA) was not different between the two groups of oysters from the field, sampled in May or in June. In hatchery conditioned oysters, total NMI were more abundant as compared to oysters from the field at the end of the experiment.

Proportion of 18:1n-7 (NMI FA precursor) was 4.2% at the beginning of the experiment and reached higher levels (5.6%) in mitochondria of oysters after 4 weeks in the hatchery. Proportion of this FA was lower (3.4%) in oysters from the field at the same time. There was no difference in the proportion of the monounsaturated FA (MUFA) 16:1n-7 between the three groups of oysters. Level of 18:1n-9 was lower at T0, but was similar between hatchery and field oyster at Tf. The 20:1n-9 showed the opposite trend. Proportion of 20:1n-7 was higher in mitochondria of oysters sampled at the start of the experiment but was similar between field and hatchery oysters after 4 weeks conditioning.

Proportion of total monounsaturated FA (MUFA) was increasing in oysters reared in the hatchery while it decreased in oysters from the field. At Tf, MUFA were higher in mitochondria of hatchery oysters as compared to field oysters. Total saturated FA (SFA) represented 17.6% at the beginning of the experiment, and increased after 4 weeks of conditioning for both hatchery and field oysters. At Tf, SFA were higher in mitochondria of oysters from the field as compared to those in hatchery. Total polyunsaturated FA (PUFA) were more abundant in oysters sampled at T0, but there was no difference between the two groups sampled in June. Within PUFA, mitochondria of oysters from the hatchery showed the highest proportion of n-6 PUFA but the lowest proportion of n-3 PUFA at the end of the experiment.

**Table 1** : Fatty acid composition of gill mitochondria phospholipids of oysters grown on their natural environment or in hatchery, and sampled at the beginning of the experiment and after 4 weeks of conditioning. The results are expressed as percentages of total fatty acids. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups (n = 6 pools of 5 oysters,  $P < 0.05$ ).

% mol	Field T0		Field Tf		T-Iso + <i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
14:0	1.4 <sup>a</sup>	0.0	1.5 <sup>a</sup>	0.1	1.8 <sup>b</sup>	0.1	S
16:0	10.3 <sup>a</sup>	0.1	12.2 <sup>b</sup>	0.4	11.1 <sup>c</sup>	0.1	S
18:0	5.7 <sup>a</sup>	0.1	9.5 <sup>b</sup>	0.6	5.5 <sup>c</sup>	0.0	S
16:1n-7	2.2	0.1	1.9	0.1	2.1	0.1	NS
18:1n-9	1.3 <sup>a</sup>	0.0	1.6 <sup>b</sup>	0.1	2.0 <sup>b</sup>	0.1	S
18:1n-7	4.2 <sup>a</sup>	0.1	3.4 <sup>b</sup>	0.1	5.6 <sup>c</sup>	0.1	S
20:1n-11	1.5 <sup>a</sup>	0.0	2.1 <sup>b</sup>	0.0	2.6 <sup>c</sup>	0.1	S
20:1n-9	1.7 <sup>a</sup>	0.0	1.4 <sup>b</sup>	0.0	1.4 <sup>b</sup>	0.1	S
20:1n-7	5.4 <sup>a</sup>	0.0	4.7 <sup>b</sup>	0.1	5.0 <sup>b</sup>	0.0	S
18:2n-6	0.6 <sup>a</sup>	0.0	0.8 <sup>b</sup>	0.0	1.2 <sup>c</sup>	0.1	S
18:4n-3	1.3 <sup>a</sup>	0.1	2.1 <sup>b</sup>	0.3	1.0 <sup>c</sup>	0.0	S
20:4n-6	5.6 <sup>a</sup>	0.1	4.6 <sup>b</sup>	0.1	4.4 <sup>b</sup>	0.1	S
20:5n-3	19.4 <sup>a</sup>	0.2	16.4 <sup>b</sup>	0.3	14.9 <sup>c</sup>	0.5	S
22:2NMI(7,13)	1.9	0.1	1.9	0.1	2.2	0.1	NS
22:2NMI(7,15)	5.9 <sup>a</sup>	0.2	5.5 <sup>b</sup>	0.1	7.4 <sup>c</sup>	0.1	S
22:3NMI(7,13,16)	1.2 <sup>a</sup>	0.0	1.0 <sup>b</sup>	0.1	0.9 <sup>b</sup>	0.0	S
22:4n-6	0.6 <sup>a</sup>	0.0	0.5 <sup>b</sup>	0.0	0.5 <sup>b</sup>	0.0	S
22:5n-6	0.4 <sup>a</sup>	0.0	0.4 <sup>a</sup>	0.0	2.1 <sup>b</sup>	0.2	S
22:5n-3	1.7 <sup>a</sup>	0.0	1.7 <sup>a</sup>	0.0	1.0 <sup>b</sup>	0.0	S
22:6n-3	20.9 <sup>a</sup>	0.3	18.7 <sup>b</sup>	0.6	20.1 <sup>ab</sup>	0.3	S
Others*	3.8 <sup>a</sup>	0.1	4.9 <sup>b</sup>	0.2	3.7 <sup>a</sup>	0.1	S
Total BR.	0.5 <sup>a</sup>	0.0	0.5 <sup>a</sup>	0.0	0.3 <sup>b</sup>	0.0	S
Total SAT.	17.6 <sup>a</sup>	0.2	23.4 <sup>b</sup>	1.0	18.5 <sup>c</sup>	0.2	S
Total MUFA	16.5 <sup>a</sup>	0.1	15.5 <sup>b</sup>	0.3	19.1 <sup>c</sup>	0.1	S
Total n-9	3.2 <sup>a</sup>	0.1	3.1 <sup>a</sup>	0.2	3.7 <sup>b</sup>	0.2	S
Total n-7	11.7 <sup>a</sup>	0.1	10.0 <sup>b</sup>	0.2	12.7 <sup>c</sup>	0.1	S
Total PUFA	65.4 <sup>a</sup>	0.3	60.6 <sup>b</sup>	0.8	62.1 <sup>b</sup>	0.3	S
Total n-4	0.3 <sup>a</sup>	0.0	0.3 <sup>a</sup>	0.0	0.2 <sup>b</sup>	0.0	S
Total n-6	8.4 <sup>a</sup>	0.1	7.7 <sup>b</sup>	0.2	9.5 <sup>c</sup>	0.3	S
Total n-3	47.3 <sup>a</sup>	0.3	43.7 <sup>b</sup>	0.7	41.1 <sup>c</sup>	0.5	S
Total NMI	9.4 <sup>a</sup>	0.2	9.0 <sup>a</sup>	0.1	11.2 <sup>b</sup>	0.2	S
UI	17.0 <sup>a</sup>	0.2	11.6 <sup>b</sup>	0.7	15.0 <sup>c</sup>	0.3	S

\*Others : total of 19 fatty acids detectable (20:0, 22:0, 24:0, 18:1n-11, 22:1n-9, 16:2n-7, 16:2n-4, 16:3n-6, 16:4n-3, 18:2n-4, 18:3n-6, 18:3n-3, 20:2NMI(5,11), 20:2NMI(5,13), 18:5n-3, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:5n-3), none of which were more than 1%.

BR. : branched FA; SAT. : saturated FA; MUFA : monounsaturated FA; PUFA : polyunsaturated FA; NMI : non-methylene-interrupted FA; UI : unsaturation index

*Phospholipid classes of mitochondrial membranes*

Phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) were the two main phospholipid classes in mitochondrial membranes of oysters (Table 2). In mitochondria, phosphatidylinositol (PI) and ceramideaminoethylphosphonate (CAEP) represented together around 20%, phosphatidylserine (PS) accounted for about 8% of the total phospholipids. Proportions of PE and PS were unchanged. PC content was not modified for oyster reared in the field but was significantly lower in mitochondria of oysters from the hatchery. Proportion of PI + CAEP slightly but significantly increased in mitochondrial membranes of oysters after 4 weeks of experimentation. Moreover, mitochondrial membranes of oysters from the hatchery showed a significant higher proportion of PI + CAEP as compared to oysters from the field. While proportion of CL was not modified in oysters kept in the field, it was significantly lower (about -25%) in mitochondria of hatchery oysters.

PC/PE ratio decreased after 4 weeks experimentation and reached lower values in hatchery oysters as compared to field oysters. The ratio PE/CL was not changed in oyster kept in the field, while it was higher in mitochondria of oysters from the hatchery.

Albeit no significant, phospholipid-to-protein ratio (i.e. total phospholipid content expressed per mg of mitochondrial proteins) tended to be lowered in hatchery compared to field oysters at Tf ( $P = 0.298$ ).

**Table 2** : Content of total phospholipids and proportion of phospholipid classes in gill mitochondria of oysters grown on their natural environment or in hatchery, and sampled at the beginning of the experiment and after 4 weeks of conditioning. The results are expressed as percentages of total phospholipids. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups (n = 6 pools of 5 oysters,  $P < 0.05$ ).

	Field T0		Field Tf		T-Iso + <i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
PE	29.8	0.3	30.3	0.2	30.6	0.3	NS
PI + CAEP	19.3 <sup>a</sup>	0.2	20.1 <sup>b</sup>	0.2	21.9 <sup>c</sup>	0.4	S
CL	6.8 <sup>a</sup>	0.3	6.4 <sup>a</sup>	0.2	5.0 <sup>b</sup>	0.2	S
PC	37.0 <sup>a</sup>	0.5	35.2 <sup>ab</sup>	0.6	33.4 <sup>b</sup>	0.9	S
PS	7.1	0.3	8.0	0.7	9.0	1.0	NS
PC/PE	1.24 <sup>a</sup>	0.02	1.16 <sup>b</sup>	0.03	1.09 <sup>c</sup>	0.02	S
PE/CL	4.4 <sup>a</sup>	0.2	4.8 <sup>a</sup>	0.2	6.1 <sup>b</sup>	0.2	S
Total phospho. content ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot.}$ )	471.3	39.2	450.4	7.9	394.7	32.5	NS

PE : phosphatidylethanolamine; PI : phosphatidylinositol; CL : cardiolipin; CAEP : ceramide aminoethylphosphonate; PC : phosphatidylcholine; PS : phosphatidylserine



*Mitochondrial oxidative capacities*

Oxidative capacities of mitochondria isolated from oyster gills were assessed using glutamate or succinate. Maximal state 3 rates of glutamate and succinate oxidation were not changed between May and June in oysters from the field (Figure 2A). However, rates were 43% lower in hatchery conditioned oysters as compared to field oysters at Tf for both substrates. The same pattern was observed with state 4 when succinate was used as substrate (Figure 2B). With glutamate, state 4 was significantly lower in hatchery oysters as compared to T0 (-29%), but there was no significant difference between the field and hatchery oysters at the end of the experiment. Non-phosphorylating rate (state 4) was significantly higher with succinate as substrate when compared to rates obtained with glutamate (Figure 2B,  $P<0.05$ ).

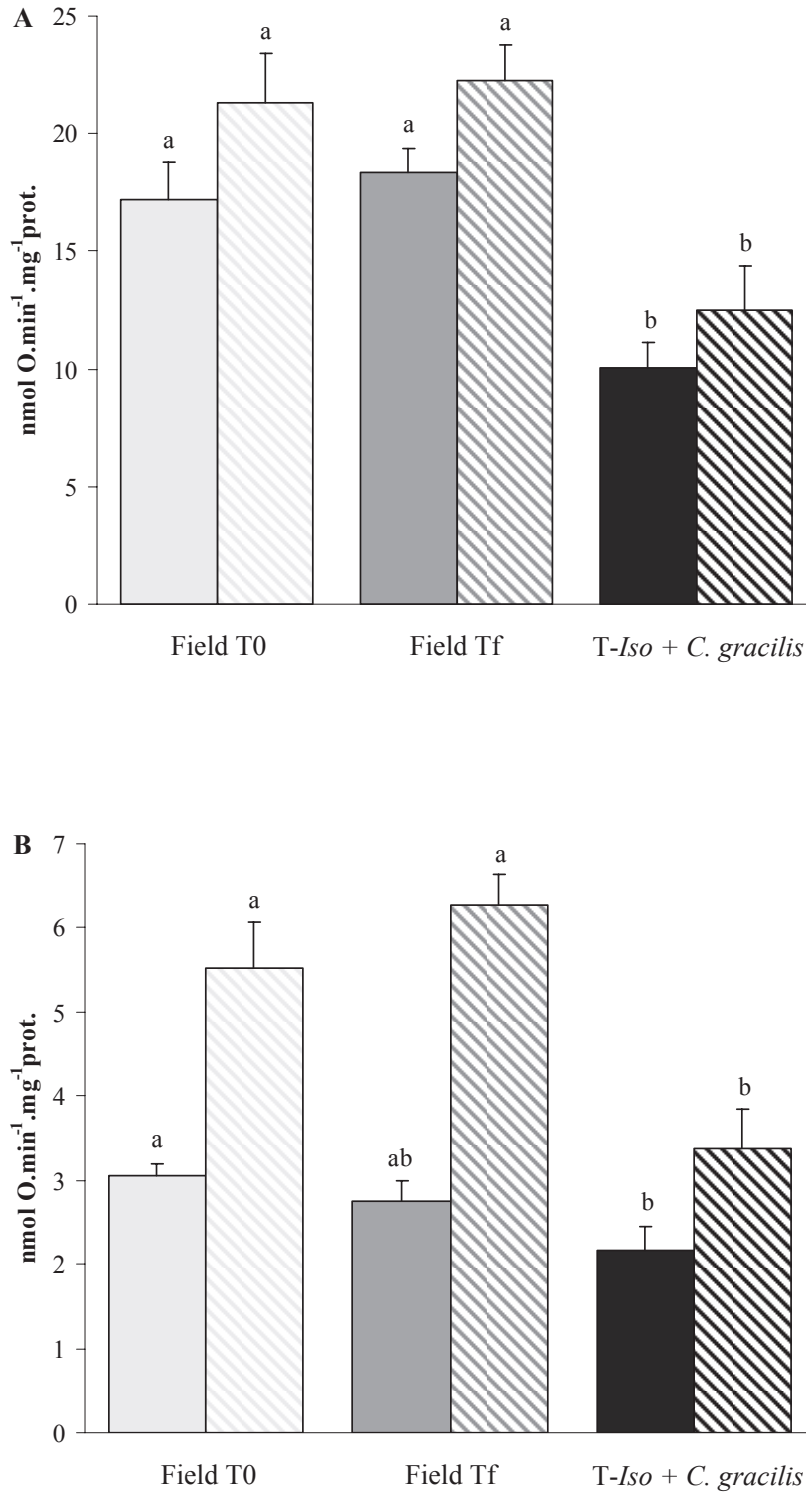
As a consequence of specific modifications of state 3 and state 4 rates between glutamate and succinate, RCR with glutamate was significantly lowered in hatchery oysters as compared to field oysters at the end of the experiment (- 25%). With succinate, no significant differences were found at Tf between field and hatchery oysters.

ADP/O showed no difference between field and hatchery oyster gill mitochondria for glutamate and succinate, but values were significantly higher for field oysters at T0 compared to Tf for both substrates.

RCR and ADP/O were significantly higher with glutamate as substrate as compared to succinate (Table 3,  $P<0.05$ ).

**Table 3 :** Respiratory control ratio (RCR) and oxidative phosphorylation efficiency (ADP/O), with glutamate 40 mM or succinate 20 mM as substrate and ADP 0.6 mM of oysters grown on their natural environment or in hatchery, and sampled at the beginning of the experiment and after 4 weeks of conditioning. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups ( $n = 6$  pools of 5 oysters,  $P<0.05$ ).

	Field T0		Field Tf		T-Iso + <i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
RCR glutamate	6.2 <sup>a</sup>	0.5	6.4 <sup>a</sup>	0.2	4.8 <sup>b</sup>	0.4	S
RCR succinate	3.9 <sup>a</sup>	0.1	3.6 <sup>b</sup>	0.1	3.3 <sup>b</sup>	0.2	S
ADP/O glutamate	2.6 <sup>a</sup>	0.2	2.0 <sup>b</sup>	0.0	2.3 <sup>ab</sup>	0.3	S
ADP/O succinate	1.9 <sup>a</sup>	0.1	1.6 <sup>b</sup>	0.1	1.8 <sup>ab</sup>	0.2	S



**Figure 2** : Oxidative phosphorylation (state 3, A) and non-phosphorylating oxygen consumption (state 4, B) with glutamate 40 mM (full bars) or succinate 20 mM (hatched bars), on mitochondria isolated from oysters grown on their natural environment or in hatchery, and sampled at the beginning of the experiment and after 4 weeks of conditioning.. Assay temperature was 10°C. Values are mean  $\pm$  S.E. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups (n = 6 pools of 5 oysters,  $P < 0.05$ ).

*Cytochrome c oxidase activity*

CCO activity, expressed in  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  mitochondrial protein, was significantly lower in hatchery conditioned oysters (-33%), as compared to field oysters sampled at T0 and Tf (Table 4). As cyt *a* is located in complex IV (CCO) of the respiratory chain, activity of CCO was also expressed per nmole of cytochrome *a* units to reflect its catalytic activity. In that case, CCO activity showed no significant differences, albeit hatchery conditioned oysters showed a trend for lower activity ( $P = 0.21$ ).

*Citrate synthase activity*

Whereas present results showed evidence of modifications in mitochondrial functional properties between hatchery and field conditioned oysters, the overall tissue mitochondrial concentration did not seem to be impacted as indicated by equivalent CS activity in gill tissue (a proxy for mitochondrial abundance (Brown and Stuart 2007)) (Table 4).

**Table 4** : CCO activity, expressed in U per mg of mitochondrial proteins or per nmol of cytochrome *a*, and CS activity, expressed in U per mg of gill tissue of oysters grown on their natural environment or in hatchery, and sampled initially and sampled at the beginning of the experiment and after 4 weeks of conditioning. Assay temperature was 25°C. Values are mean  $\pm$  S.E. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups ( $n = 6$  pools of 5 oysters,  $P < 0.05$ ).

	Field T0		Field Tf		T-Iso + <i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
CCO activity							
( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot.}$ )	0.3 <sup>a</sup>	0.0	0.3 <sup>a</sup>	0.0	0.2 <sup>b</sup>	0.0	S
( $\text{U}\cdot\text{nmol}^{-1}\text{cyt } a$ )	4.4	0.9	4.5	0.7	3.2	0.4	NS
CS activity							
( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{tissue}$ )	4.4	0.4	4.7	0.3	5.0	0.2	NS

*Mitochondrial cytochrome concentrations*

Cytochrome *b* concentration was significantly lower in hatchery conditioned oysters (-24%) as compared to T0 and Tf field oysters (Table 5). There was no difference in individual cytochrome *a*, *c*<sub>1</sub> and *c* concentrations or in total cytochromes content. There was no difference between oyster groups when relative cytochrome quantities were expressed per cytochrome *c*<sub>1</sub>. Similarly, there was no difference in the ratio  $(b + c_1)/a$  between the three groups of oysters.

**Table 5 :** Concentrations of mitochondrial cytochromes *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*, expressed as nmol of cytochrome per mg of mitochondrial proteins, relative cytochrome ratios related to cytochrome *c*<sub>1</sub> and ratio  $(b + c_1)/a$  of oysters grown on their natural environment or in hatchery, and sampled at the beginning of the experiment and after 4 weeks of conditioning. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups (n = 6 pools of 5 oysters,  $P < 0.05$ ).

	Field T0		Field Tf		T-Iso + <i>C. gracilis</i>		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
Cyt. concentrations (nmol.mg <sup>-1</sup> prot.)							
<i>a</i>	0.07	0.007	0.06	0.008	0.05	0.006	NS
<i>b</i>	0.21 <sup>a</sup>	0.019	0.21 <sup>a</sup>	0.017	0.16 <sup>b</sup>	0.008	S
<i>c</i> <sub>1</sub>	0.12	0.011	0.13	0.011	0.12	0.016	NS
<i>c</i>	0.06	0.007	0.08	0.011	0.06	0.01	NS
Total	0.45	0.032	0.48	0.044	0.38	0.033	NS
Relative ratios							
<i>a/c</i> <sub>1</sub>	0.60	0.11	0.44	0.04	0.46	0.08	NS
<i>b/c</i> <sub>1</sub>	1.85	0.22	1.62	0.11	1.48	0.15	NS
<i>c/c</i> <sub>1</sub>	0.55	0.07	0.57	0.04	0.48	0.07	NS
$(b + c_1)/a$	5.2	0.8	6.1	0.6	6.1	1.1	NS

## Discussion

To compare mitochondrial activities between hatchery and field conditioning, oysters were respectively placed in a mesh bag attached on a tray in their natural environment or in experimental tank supplied with an equilibrated diet. Samplings were made before the conditioning (T0) and after four weeks conditioning (Tf). No mortality was reported during our experiment (data not shown). The similar increase in weight and in gonadal area occupation between oysters grown in hatchery and those let in their natural environment confirmed the suitability of this diet for bivalves' development in experimental conditions.

In hatchery, oysters *C. gigas* were routinely fed *ad libitum* with a mixture of the two microalgae *Isochrysis* aff. *galbana* clone Tahiti (T-Iso) and *Chaetoceros gracilis*. This ratio permits an adequate supply of essential FA as 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3, that are of major importance in survival, growth and reproduction of bivalves (Soudant et al. 1996a). A bispecific diet combining T-Iso and *Chaetoceros calcitrans* in a 1/1 cell ratio was shown to lead to good growth and survival (see Chapter I) and to the best larval development and metamorphosis (Rico-Villa et al. 2006). Here, *C. gracilis* was used instead of *C. calcitrans*. These two diatoms had similar FA profiles, except that *C. gracilis* contains a higher proportion of 20:4n-6 (Napolitano et al. 1990). Differences in FA compositions of gill mitochondria were observed but proportions of essentials FA 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3 were similar between hatchery and field oysters. This observation confirmed the suitability of the mixed diet T-Iso + *C. gracilis* in experimental conditions, in terms of essential FA input.

Despite the apparent dietary needs met by this mixed diet, major functional modifications of mitochondrial capacities were observed between hatchery conditioned oysters and oysters from the field sampled after the 4 weeks of experimentation. Mitochondrial phosphorylative (state 3) oxygen consumption was almost two times lower in hatchery conditioned oysters mitochondria fueled with glutamate through complex I or succinate through complex II. Similarly, CCO activity was 1.5 times lower in hatchery oysters. This suggests that hatchery conditioning significantly affected mitochondrial oxidative capacity in gills of oysters. CCO is the last complex of the respiratory chain and can control, at least in part, mitochondrial respiration through the rate of electron transport by the ETC (Groen et al. 1982). The concomitant decrease in respiration rates and in CCO activity has been observed in several species in response to diet (Yamaoka et al. 1988), temperature (Blier and Lemieux 2001 ; Kraffe et al. 2007), and hypoxic hibernation (Boutilier and St-Pierre 2002).

RCR and ADP/O were not impacted in a same way in gill mitochondria of hatchery oysters when fueled with glutamate or succinate. For succinate, the marked decline in state 3 respiration rates in hatchery conditioned oysters was matched by that of state 4 respiration, and RCR were not different between hatchery and field oysters. On the contrary, non-phosphorylative oxygen consumption (state 4) with glutamate was slightly modified in hatchery as compared to field oysters, and RCR were 25% lower. As oxygen consumption in state 4 is considered an estimate of proton leak through the inner mitochondrial membrane (St-Pierre et al. 2000), this could provide an indication that proton leak and the relative respiration that does not contribute to phosphorylation was specifically modified in hatchery oyster mitochondria.

Differences in mitochondrial oxygen uptake capacities can be related to changes in concentrations and relative levels of electron transport chain complexes (Guderley et al. 2005). In our study, there was no difference in relative ratios of the different cytochromes, but cytochrome *b* was 24% less abundant in oysters grown in hatchery. As cytochrome *b* is a component of the respiratory chain complexes II and III, a decrease in cytochrome *b* content may in turn have reduced the capacity and activity of the respiratory pathway.

It has been established that modifications in membrane lipid composition is a way for physiological adaptation of organisms to their environment (Hazel and Williams 1990). In their membrane pacemaker theory, Hulbert and Else suggest that global membrane FA unsaturation influences enzymatic activities and kinetic of membrane processes (Hulbert and Else 1999). Mitochondria inner membrane is an important site of membrane processes, especially oxidative phosphorylation, that couples the transfer of electrons from complex I or II to the last complex (complex IV- cytochrome *c* oxidase) of the respiratory chain with the production of adenosine triphosphate (ATP) by the  $F_0F_1$ ATP-synthase. In our study, proportion of total saturated FA (SFA) was higher in gill mitochondria of field oysters than hatchery conditioned oysters, while proportion of total monounsaturated FA (MUFA) was lower. In a partner study, we strengthened the possible importance of the regulation of overall membrane characteristics (total SFA, MUFA and PUFA) as key structural parameters within membrane lipid structures to maintain mitochondrial function in oyster gill mitochondria (see Chapter I) as reported in mammals (Astorg and Chevalier 1991 ; Lemieux et al. 2008 ; Abbott et al. 2012), fish (Guderley et al. 2008 ; Martin et al. 2012) and bivalves (Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1996a ; Soudant et al. 1996c ; Delaporte et al. 2005). According to this, the differences observed for SFA and MUFA between hatchery and field oysters could be one potential mechanism that impacted mitochondrial oxygen uptake and CCO activity

between hatchery and field oysters. In addition, specific modifications of 22:5n-6, NMI FA and specific molecular species contents could be of importance on membrane proteins that control their activity (Zhou et al. 2011 ; Martin et al. 2012 ; Khairallah et al. 2012 ; see also Chapter I). Nevertheless, the level of details of the analysis still not permit to conclude on this aspect for the differences of mitochondrial capacities found between hatchery and field oysters.

Besides FA composition, modulation of phospholipid classes in the environment of membrane-bound proteins can be another mechanism for their regulation (Robinson 1993 ; Stuart et al. 1998 ; Frick et al. 2010). Differences in phospholipid proportions were observed between hatchery and field oysters at the mitochondrial level. Particularly, significant lower levels of CL could explain the decreased CCO electron transport activity (Sedlák et al. 2006). CL is specifically located in the inner membrane of mitochondria and its association with enzymes of the ETC and the  $F_0F_1$ ATP-synthase is of major importance for the activity of the mitochondrial respiratory chain and the efficient generation of the inner membrane potential (Eble et al. 1990 ; Schlame et al. 2000 ; Haines and Dencher 2002 ; Zhou et al. 2011 ; Böttinger et al. 2012). A reduced CL content was associated with a decreased mitochondria activity in several studies on mammals (Paradies et al. 1997), snails (Stuart et al. 1998) and fishes (Frick et al. 2010). CL is also bound to the complex III of the respiratory chain. CL deficiency was shown to induce destabilization, decreased activity and loss of this complex (Schlame et al. 2000 ; Lange et al. 2001 ; Petrosillo et al. 2003 ; Böttinger et al. 2012) and could explain the lower cytochrome *b* content found in oysters grown in hatchery. As a consequence of a lower level of CL in hatchery conditioned oysters, the PE/CL ratio was increased and could have impacted the stability of several protein complexes of the mitochondrial respiratory chain (Zhou et al. 2011 ; Böttinger et al. 2012).

The ratio PC/PE was also found lower in field oysters. PC and PE are the two main phospholipids in biological membranes and have distinct molecular shapes. A mixture of cylindrical (PC) and conical (PE) lipid molecules produces an appropriate balance between bilayer stabilising (cylinders) and destabilising (cones) effects in biological membranes (Logue et al. 2000), and may contribute to the regulation of physical and physiological properties of biomembranes (Hazel and Carpenter 1985). It has been reported that the ratio PC/PE can be changed in conditions of thermal adaptation or essential fatty acids deficiency in order to maintain membrane dynamics and mitochondrial activity (Senault et al. 1990 ; Logue et al. 2000). As an example, activity of adenine nucleotide translocase (ANT), a protein located in the inner mitochondrial membrane that catalyzes the exchange of

mitochondrial ATP for cytosolic ADP, was reported to be strongly correlated with the ratio PC/PE in mitochondrial membrane (Krämer and Klingenberg 1980 ; Mak et al. 1983).

Most of feeding experiments performed on bivalves focused on effects of diet on global physiology (survival, growth, gametogenesis) but did not investigate cellular or subcellular activities. Our results showed that experimental conditions in hatchery caused a lower mitochondrial activity in oysters as compared to oysters placed in their natural environment, despite similar weight and gonad development in these two groups of oysters. Standardized condition, with *ad libitum* feeding with a mixed plankton culture, could therefore appear to not appropriately substitute for the natural conditions in the field, and to reduce the physiological processes of artificially fed animals held under ‘optimized’ laboratory conditions (Guerra et al. 2012). One hypothesis comes from nutritional value of the diet. Beside FA composition, microalgal species can vary significantly in their vitamin and mineral contents (Brown 2002). In mammals, these compounds are critical cofactors that support basic metabolic functions of the mitochondria, and inadequate amounts of some of these micronutrients lead to decline in critical enzymatic activities of the electron transport complexes and in cardiolipin content (Ames et al. 2005 ; Oliveros et al. 2007).

Food potential may not be the only factor regulating mitochondrial function in oysters. As field oysters were held in a mesh bag stocked on a tray at the near bottom water, low oxygen concentration and high resuspension of inorganic particles can have influenced mitochondrial capacities. In parallel, hatchery conditioned oysters were maintained in well aerated filtered seawater for all the duration of the experiment. Also, field oysters were maintained in the intertidal zone as in their natural environment. In this way, field oysters had to cope with variations in physical and chemical parameters in their environment, especially because of tidal cycles. Important variations in temperature and periodical oxygen fluctuations during phases of emersion and immersion are important environmental factors that can have induced mitochondrial adaptations in the field (Hofmann and Somero 1995) and brought to the differences of mitochondrial capacities found between hatchery and field conditioned oysters.



## Conclusion

Our results indicate that standardized conditions, such as *ad libitum* feeding with a mixed plankton diet, cannot appropriately substitute for the conditions in the field in regards to mitochondria functionalities. Differences of mitochondrial capacities in hatchery conditioned oysters could be explained by lower CCO activity and lower cytochrome *b* concentration related to specific modifications in mitochondrial membrane lipid compositions. Such differences apparently did not reduce the physiological fitness of hatchery animals held under ‘optimized’ laboratory conditions as oysters showed similar increase in weight and gonadal development but could have other important consequences for other cellular processes in oysters held in hatchery conditions. These results suggest that the nutritive quality of the diet or other abiotic factors (e.g. temperature, oxygen availability or desiccation) differing between natural environment and experimental conditions could have important impact on mitochondrial properties in oysters.

## Acknowledgements

We are grateful to all co-workers from the Argenton hatchery for taking care of oysters during the experimental conditioning. Many thanks to Nelly Le Goïc for histochemistry technique explanations, to Marc Long for helping in tissue grinding and lipid analysis, to Caroline Fabioux and Jean-Philippe Beguel for helping in dissections, to Rossana Sussarellu for helping in mitochondria preparations and to Catherine Segueineau for explanations on enzymatic activities. Tony Dudognon fellowship was funded by the French Research Ministry. Funding for the experiment was provided by the project in Europole Mer (research consortium on marine science and technology in Brittany, France): LIPIDOMITO.

## Conclusion

L'objectif de cette étude était de comparer les capacités fonctionnelles mitochondriales d'huîtres nourries en éclosion avec un régime « équilibré » T-*Iso* + *C. gracilis* avec celles d'huîtres nourries dans leur milieu naturel. Du point de vue de l'animal entier, le mélange T-*Iso* + *C. gracilis* permet de bonnes performances de croissance et de maturation sexuelle chez les huîtres. Après quatre semaines de conditionnement, celles-ci montrent en effet un poids et un développement gonadique similaires aux huîtres laissées sur le terrain. En revanche, de fortes différences d'activité mitochondriale sont observées entre les deux lots d'huîtres.

Un mélange 1:1 de T-*Iso* et *C. gracilis* semble fournir un apport en acides gras (AG) essentiels équivalent à la nourriture trouvée dans le milieu naturel. Ces AG essentiels sont importants pour la survie, la croissance et la reproduction puisque les bivalves ne sont pas capables de les synthétiser *de novo* et doivent donc les récupérer à partir de leur nourriture (Soudant et al. 1996a). L'analyse de la composition en AG des membranes de mitochondries confirme une composition similaire en AG essentiels entre les deux lots d'huîtres. La composition en AG des branchies est semblable à celle des mitochondries (Table 1). Les membranes de mitochondries présentent également quelques différences de composition en AG et en phospholipides qui pourraient expliquer une partie des différences fonctionnelles mitochondriales observées. Les différences de proportions d'AG saturés et mono-insaturés entre les huîtres élevées en éclosion et celles laissées sur le terrain pourraient être une des raisons expliquant les différences d'activité mitochondriale observées entre ces deux lots d'huîtres. La consommation d'oxygène mitochondriale liée à la phosphorylation oxydative (stade 3) ou au stade non-phosphorylant (stade 4) de même que l'activité de la CCO sont significativement plus basses chez les huîtres nourries en éclosion que chez celles laissées dans leur milieu naturel. Ces résultats pourraient être corrélés avec la quantité moins importante de CL chez les huîtres nourries en éclosion. Une diminution de l'activité de la CCO a déjà été associée à une diminution du contenu en CL dans les mitochondries de diverses espèces (Paradies et al. 1997 ; Stuart et al. 1998 ; Frick et al. 2010). Les différences d'activité mitochondriale pourraient aussi s'expliquer par une plus faible quantité de cytochrome *b* chez les huîtres nourries en éclosion. Le cytochrome *b* fait partie du complexe III de la chaîne respiratoire, auquel le CL est également lié. Des déficiences en CL induisent une déstabilisation, une diminution d'activité et une perte de ce complexe (Schlame et al. 2000 ; Lange et al. 2001 ; Petrosillo et al. 2003 ; Böttinger et al. 2012).

**Table 1 :** Composition en acides gras des phospholipides de branchies d'huîtres élevées dans leur milieu naturel (Tf terrain) ou en éclosion (T-Iso + *C. gracilis*) et collectées après 4 semaines d'expérimentation. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'acides gras totaux (n = 6 pools de 5 huîtres).

% mol	Tf terrain		T-Iso + <i>C. gracilis</i>		Sign.
	Moyenne	E.S.	Moyenne	E.S.	
14:0	1.2	0.0	1.9	0.1	S
16:0	12.3	0.3	13.0	0.2	S
18:0	6.8	0.1	6.2	0.2	S
16:1n-7	2.5	0.0	2.6	0.0	S
18:1n-9	1.7	0.0	1.9	0.1	NS
18:1n-7	3.2	0.1	5.3	0.3	S
20:1n-11	3.1	0.1	3.8	0.1	S
20:1n-9	1.7	0.1	1.3	0.1	S
20:1n-7	5.7	0.1	6.0	0.1	S
18:2n-6	0.8	0.0	1.3	0.1	S
18:4n-3	1.9	0.1	0.9	0.1	S
20:4n-6	5.1	0.0	4.5	0.1	S
20:5n-3	15.8	0.2	14.0	0.7	NS
22:2NMI(7,13)	2.9	0.0	2.6	0.2	NS
22:2NMI(7,15)	7.8	0.1	9.4	0.3	S
22:3NMI(7,13,16)	1.3	0.1	1.0	0.0	S
22:4n-6	0.7	0.0	0.6	0.0	S
22:5n-6	0.4	0.0	2.0	0.2	S
22:5n-3	2.0	0.0	1.1	0.0	S
22:6n-3	16.9	0.2	15.6	0.4	S
Others*	5.6	0.2	4.6	0.1	S
Total BR.	0.5	0.0	0.3	0.0	S
Total SAT.	20.4	0.2	21.3	0.2	S
Total MONO	18.2	0.2	21.7	0.2	S
Total n-9	3.5	0.1	3.7	0.2	NS
Total n-7	11.3	0.1	14.0	0.2	S
Total POLY	60.9	0.4	56.7	0.3	S
Total n-4	0.3	0.0	0.3	0.0	NS
Total n-6	8.3	0.0	9.3	0.3	S
Total n-3	39.6	0.6	33.3	0.8	S
Total NMI	12.7	0.3	13.8	0.4	NS
UI	13.1	0.2	11.9	0.2	S

\*Others : total of 21 fatty acids detectable (20:0, 22:0, 24:0, 18:1n-11, 22:1n-9, 16:2n-7, 16:2n-6, 16:2n-4, 16:3n-6, 16:3n-4, 16:4n-3, 18:2n-4, 18:3n-6, 18:3n-3, 18:5n-3, 20:2NMI(5,11), 20:2NMI(5,13), 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:5n-3), none of which were more than 1%.

BR. : branched FA; SAT. : saturated FA; MONO : monounsaturated FA; POLY : polyunsaturated FA; NMI : non-methylene-interrupted FA; UI : unsaturation index

Des modifications sont également visibles à l'échelle cellulaire. Dans les granulocytes (une des deux sous-populations d'hémocytes, les cellules immunitaires des invertébrés), l'activité oxydante des huîtres élevées en éclosion est presque deux fois plus faible que celle des huîtres élevées dans leur milieu naturel (Table 2). De la même façon, la production mitochondriale d'anions superoxydes est moins importante dans les granulocytes d'huîtres élevées en éclosion que dans les granulocytes d'huîtres élevées dans leur milieu naturel. La composition lipidique des hémocytes n'ayant pas été étudiée, ces modifications cellulaires ne peuvent toutefois pas être directement corrélées à des changements structuraux.

**Table 2 :** Paramètres hématocytaires d'huîtres élevées dans leur milieu naturel et collectées en Mai (T0 terrain) ou en Juin (Tf terrain), ou élevées en éclosion et collectées en Juin (T-Iso + *C. gracilis*). La proportion d'hémocytes morts est exprimée en pourcentage (%). Le potentiel membranaire mitochondrial est exprimé comme un ratio de fluorescences. Les autres paramètres (taille, complexité, activité oxydante et production mitochondriale d'anions superoxydes) sont exprimés en unités arbitraires (U.A.). Les différentes lettres en exposant indiquent les valeurs qui diffèrent entre les régimes (n = 6 pools de 5 huîtres).

	T0 terrain		Tf terrain		T-Iso + <i>C. gracilis</i>		Sign.
	Moyenne	E.S.	Moyenne	E.S.	Moyenne	E.S.	
pourcentage d'hémocytes morts	2.0 <sup>a</sup>	0.2	5.0 <sup>b</sup>	0.5	4.4 <sup>b</sup>	0.5	S
<b>granulocytes</b>							
taille (U.A.)	262	17	262	9	248	9	NS
complexité (U.A.)	791	48	766	70	688	28	NS
activité oxydante (U.A.)	200 <sup>a</sup>	12	216 <sup>a</sup>	22	113 <sup>b</sup>	24	S
production mitochondriale de superoxydes (U.A.)	260 <sup>a</sup>	23	196 <sup>b</sup>	17	118 <sup>c</sup>	26	S
potentiel membranaire mitochondrial (ratio)	12	1	12	1	12	1	NS
<b>hyalinocytes</b>							
taille (U.A.)	218	15	214	10	224	2	NS
complexité (U.A.)	71 <sup>a</sup>	6	93 <sup>b</sup>	7	102 <sup>b</sup>	4	S
activité oxydante (U.A.)	77	11	91	5	58	13	NS
production mitochondriale de superoxydes (U.A.)	152 <sup>a</sup>	24	90 <sup>b</sup>	8	75 <sup>b</sup>	19	S
potentiel membranaire mitochondrial (ratio)	11	1	11	2	9	1	NS

Nos résultats montrent de claires différences de capacité mitochondriale des branchies et d'activité oxydante des hémocytes entre les huîtres nourries en éclosion et celles laissées dans leur milieu naturel, ce qui suggère que les conditions expérimentales de l'éclosion ne miment pas parfaitement les conditions environnementales rencontrées sur le terrain. Une des explications peut venir de la nourriture. En effet, même s'il est délivré *ad libitum* et si l'apport en AG essentiels correspond aux besoins des bivalves, le mélange utilisé pour nourrir les bivalves en éclosion ne peut pas remplacer la qualité de la nourriture naturelle trouvée sur le terrain (Guerra et al. 2012). Par exemple, les vitamines et les minéraux qui sont chez les mammifères des composés impliqués dans le bon fonctionnement des mitochondries, dont des quantités inadéquates de certains de ces micronutriments mènent à une baisse d'activité des complexes de transfert d'électrons et à une diminution du contenu en cardiolipide (Ames et al. 2005 ; Oliveros et al. 2007) pourraient expliquer les différences observées.

D'autres facteurs environnementaux contrôlés et/ou non présents en condition d'éclosion tel que les cycles d'émersion/immersion pourraient également jouer un rôle important sur les différences d'activités mitochondriales observées. Les huîtres placées dans leur milieu naturel ont en effet subi le cycle des marées, se trouvant alternativement en émersion et en immersion. En revanche, le système de conditionnement utilisé en éclosion ne permettait pas de recréer ces cycles de marées, et les huîtres nourries en éclosion étaient donc en immersion permanente. La quantité d'oxygène dissous disponible pouvant être très variable pour les huîtres entre les périodes d'émersion et d'immersion, nous nous sommes demandés s'il pouvait exister des modifications d'activité mitochondriale lorsque les huîtres étaient exposées à l'air libre, en comparaison de celles se trouvant en immersion. Cette question a donné lieu au troisième chapitre de cette thèse.

## **CHAPITRE III :**

**Capacités fonctionnelles des mitochondries  
de *Crassostrea gigas* pendant un cycle tidal  
d'émersion et d'immersion**



## Introduction

La zone intertidale représente un environnement particulier pour les organismes qui y vivent. Les animaux sessiles tels que les bivalves y subissent le cycle des marées et sont ainsi régulièrement exposés à l'air libre. Outre les différences de température (Hofmann and Somero 1995) et de disponibilité en nourriture (Wong and Cheung 2001), d'importantes fluctuations en quantité d'oxygène disponible sont observées entre l'immersion et l'émersion. En effet, en immersion, les bivalves ouvrent leur coquille afin de filtrer l'eau et récupérer la nourriture et l'oxygène dissous. En revanche, en émersion, la quantité d'oxygène dissous disponible diminue car les bivalves ne possèdent qu'une petite réserve d'eau de mer dans la cavité paléale de leur manteau, dans la mesure où ils ferment leur coquille pour éviter la dessiccation (Newell 1979 ; Grieshaber et al. 1994). Les mitochondries utilisent plus de 90% de l'oxygène respiré lors de la phosphorylation oxydative (Nathan and Singer 1999). Durant ce processus, l'oxydation de la matière organique permet de fournir des électrons aux complexes de la chaîne respiratoire. Les électrons sont transférés du complexe I – ou II suivant le substrat – au complexe IV (la CCO), lequel donne ses électrons à l'accepteur final, l'oxygène. Ce transfert d'électrons permet un pompage simultané de protons à travers la membrane interne, causant ainsi une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire. En revenant dans la matrice mitochondriale via la  $F_0F_1$ ATP-synthase, les protons fournissent à cette enzyme la force nécessaire à la production d'ATP. Une réduction de la concentration en ATP a été observée chez des bivalves exposés à l'air (Wijsman 1976 ; Widdows et al. 1979 ; Nicchitta and Ellington 1983 ; Moal et al. 1989 ; Sukhotin and Pörtner 1999), laissant supposer que l'exposition à l'air aurait donc une influence sur le métabolisme mitochondrial.

Dans la plupart des travaux s'intéressant à l'effet de l'exposition à l'air, les bivalves sont soumis à des conditions extrêmes qui ne reflètent pas les situations rencontrées dans l'environnement naturel. Ainsi, certains auteurs attachent les valves afin d'empêcher le phénomène d'« air gaping », mécanisme permettant à certains bivalves de récupérer l'oxygène de l'air grâce à l'ouverture momentanée de leur coquille (Lent 1968), et font également durer l'exposition à l'air plusieurs jours (Kurochkin et al. 2009 ; Ivanina et al. 2010a ; Ivanina et al. 2010b ; Piontkivska et al. 2011). Ces études n'observent pas les éventuels effets se déroulant pendant les premières heures d'exposition à l'air. De rapides



ajustements de capacités oxydatives mitochondriales en réponse à une hypoxie de courte durée et réalisée dans l'eau de mer ont pourtant récemment été mis en évidence dans notre laboratoire chez *C. gigas* (Sussarellu 2011, voir publication en annexe). Ceci suggère que le niveau d'oxygène dans l'eau de mer induirait des ajustements fonctionnels rapides des capacités mitochondriales chez *C. gigas*, au travers de régulations d'enzymes de la chaîne de transfert d'électrons.

Le but de cette troisième étude a été de tester si les propriétés mitochondriales sont sensibles aux variations de quantité d'oxygène disponible rencontrées dans le cas d'une exposition à l'air, à l'échelle d'un cycle de marées. Pour ce faire, des huîtres *C. gigas* récoltées sur le terrain ont été rassemblées au niveau d'un même point de l'estran. Après un mois d'adaptation, les huîtres ont été prélevées en période d'émersion ou en période d'immersion. Les capacités respiratoires, la consommation d'oxygène maximale due aux flux d'électrons à travers les complexes I-IV, II-IV et IV de la chaîne respiratoire, de même que les capacités de production d'ATP ont été mesurées à partir de mitochondries isolées de branchies. La morphologie des membranes mitochondriales a aussi été évaluée en mesurant l'activité de l'enzyme mitochondriale citrate synthase et le contenu en phospholipides des préparations mitochondriales.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication soumise à Aquatic Living Resources (Numéro spécial Physiomar 2012) (« **Functional capacities of mitochondria in oyster *Crassostrea gigas* during an emersion/immersion tidal cycle** ») en cours d'évaluation. Ils sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique, dont le résumé est également traduit en français ci-après.

### Résumé

Les animaux sessiles qui vivent sur l'estran sont soumis à des cycles de marée, et peuvent avoir à faire face à des variations de concentration en oxygène. Lors de l'émersion, la concentration en oxygène dissous disponible peut être réduite pour les bivalves, qui n'ont seulement qu'une petite réserve d'eau de mer à l'intérieur de leurs coquilles fermées. Les différences de concentration en oxygène devraient donc conduire à des modifications du métabolisme, y compris des changements dans l'activité mitochondriale. Toutefois, la plupart des travaux précédents ont étudié l'exposition à l'air dans des conditions extrêmes, qui ne reflètent pas toujours les conditions environnementales rencontrées par ces organismes. Dans

cette étude, les capacités fonctionnelles des mitochondries de branchies de l'huître *Crassostrea gigas* ont été étudiées au cours d'une période d'un cycle de marée, en comparant des huîtres collectées après émergence et immersion. Seules de mineures différences ont été relevées pour les stade 3 (phosphorylation oxydative) et stade 4 (consommation d'oxygène non-phosphorylante) entre les deux conditions. De même, aucune différence n'a été observée au niveau de l'activité de la CCO ou de la consommation d'oxygène liée aux flux d'électrons maximums à travers les complexes I à IV, II à IV, et IV. Alors que les capacités d'oxydation des substrats ont été maintenues entre les conditions d'émergence et d'immersion, les capacités mitochondriales de production d'ATP sont significativement plus faibles chez les huîtres échantillonnées en émergence. Ces résultats suggèrent que bien que *C. gigas* pourrait maintenir un métabolisme aérobie pendant l'émergence lors d'un cycle de marée, les mécanismes de production d'énergie ont néanmoins été affectés par l'exposition à l'air. Les résultats sur le contenu en phospholipides des mitochondries suggèrent un remodelage membranaire mitochondrial entre les périodes d'immersion et d'émergence, ce qui pourrait être un mécanisme expliquant la modulation de la production d'ATP mitochondriale observée au cours des cycles d'émergence/immersion ayant lieu lors des cycles tidaux.



## **Functional capacities of mitochondria in oyster *Crassostrea gigas* during an emersion/immersion tidal cycle**

Tony DUDOGNON<sup>a</sup>, Philippe SOUDANT<sup>a</sup>, Catherine SEGUINEAU<sup>b</sup>, Claudie QUÉRÉ<sup>b</sup>,  
Michel AUFFRET<sup>a</sup> and Edouard KRAFFE<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 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

<sup>b</sup> Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, IFREMER, UMR 6539 CNRS / UBO / IRD / IFREMER, 29280 Plouzané, France

### **Abstract**

Sessile animals that live on the foreshore undergo tidal cycles, and can have to face variations in oxygen concentration. During emersion, dissolved oxygen available can be lowered for bivalves, which have only a small reserve of seawater inside their closed shells. Differences in oxygen concentration are thus expected to lead to modifications of the metabolism, including changes in mitochondrial activity. Nevertheless, most of previous studies investigated air exposure in extreme conditions, which do not always reflect environmental conditions cope by these organisms. In this study, functional capacities of gill mitochondria of the oyster *Crassostrea gigas* were studied during a tidal cycle period, by comparing oysters collected after emersion and immersion. Only minor differences were found in state 3 (oxidative phosphorylation) or in state 4 (non-phosphorylating oxygen consumption) rates between the two conditions. Similarly, no difference was observed in cytochrome *c* oxidase activity or in oxygen consumption related to maximal electron flux through complexes I-IV, II-IV and IV. While capacities of substrate oxidation were maintained in both emersion and immersion conditions, mitochondria ATP production capacities were significantly lower in oysters sampled during emersion. These results suggest that although *C. gigas* could maintain aerobic metabolism during emersion period within a tidal cycle in its environment, energy producing mechanisms were nevertheless affected. Results on phospholipid contents of mitochondria suggest the occurrence of mitochondrial membrane remodeling between immersion and emersion periods and could be one mechanism explaining observed modulation of mitochondrial ATP production during emersion/immersion tidal cycles.

## Introduction

Sessile organisms inhabiting the intertidal zone such as bivalves have to cope with variations in physical and chemical parameters in their environment, especially because of tidal cycles. Important variations in temperature can induce thermal stress in these species (Hofmann and Somero 1995), and changes in food availability can lead to modifications in digestive enzyme activities (Wong and Cheung 2001). Periodical oxygen fluctuations are an important environmental stressor in intertidal and coastal habitats. Benthic sessile animals face large variations in oxygen concentration between emersion and immersion phases. Bivalves, which are filter feeders animals, open their shells during immersion to filter water and take up oxygen directly from the seawater. During emersion, the amount of dissolved oxygen available decreases because bivalves have only a small reserve of seawater in mantle paleal cavity, as they close shell valves to prevent desiccation (Newell 1979 ; Grieshaber et al. 1994).

Intertidal molluscs are hypoxia tolerant animals successfully dealing with fluctuating oxygen levels with a suite of physiological, biochemical and metabolic adaptations. Major effects of air exposure reported in bivalves are reduced oxygen uptake (Coleman 1973 ; Widdows et al. 1979 ; Mingoa-Licuanan 1993 ; Huang and Newell 2002), lowered live weight, dry meat weight and dry shell weight (Spencer et al. 1978), decreased hemocyte number and activity and reduced hemolymph pH (Pampanin et al. 2002 ; Allen and Burnett 2008), alterations of lysosomal membrane integrity in hemocytes (Zhang et al. 2006). Other, metabolic effects have been described including accumulation of anaerobic end - products (Michaelidis et al. 2005), altered levels of antioxydant enzyme activities and levels of lipid peroxidation and DNA damage (Almeida et al. 2005 ; Letendre et al. 2008 ; Letendre et al. 2009), and reduced adenosine triphosphate (ATP) concentration (Wijsman 1976 ; Widdows et al. 1979 ; Nicchitta and Ellington 1983 ; Moal et al. 1989 ; Sukhotin and Pörtner 1999). While emersion could result in major variations in oxygen concentration of the seawater reserve within the mantle paleal cavity, some bivalves can take up oxygen from the air thanks to shell gaping (Lent 1968). The intensity of shell gaping can be very different between species and can explain differences in aerial rate of oxygen consumption (Widdows et al. 1979 ; Rafrafi and Uglow 2009). Such phenomenon would allow some intertidal bivalves to maintain ~ 40% of immersed metabolism and avoid to reach anaerobic conditions (Shick et al. 1988).

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is well known for inhabiting intertidal area and are facultative anaerobes capable of surviving prolonged periods with no or low oxygen. Oysters also appear as excellent sensors of oxygen oscillation showing a high metabolic plasticity in response to oxygen fluctuations (Le Moullac et al. 2007 ; Rafrafi and Uglow 2009). Among the biochemical mechanisms that drive metabolic controls, mitochondria play critical roles and show important plasticity in oysters which could allow to cope with sharp oxygen fluctuations (Kurochkin et al. 2009 ; Sussarellu 2011). Mitochondria are organelles that generate most of energy supply during cell respiration, through the production of Adenosine TriPhosphate (ATP) by  $F_0F_1$ ATP-synthase (i.e. oxidative phosphorylation). Located in the inner membrane of mitochondria, enzymes of the electron transport chain (ETC) actively couple electron transfer to the transfer of protons across the inner membrane. This creates an electrochemical gradient in the intermembrane space, used by  $F_0F_1$ ATP-synthase to generate chemical energy in the form of ATP. During the electron transfer, oxygen is utilised as an electron acceptor by the last of a series of four protein complexes of the ETC, the cytochrome *c* oxidase (CCO), and is reduced to water.

The importance of oxygen availability for this organelle and the very quick adjustments of mitochondrial oxidative capacities in response to short-term hypoxia in seawater was recently highlighted in our laboratory in *C. gigas* (Sussarellu 2011). Unfortunately, modifications of mitochondrial functional capacities during air exposure in a natural tidal cycle have not been studied in this species. In most studies, bivalves have been subjected to unrealistic conditions of exposure to air which did not reflect situations that bivalves have to face in their natural environment. To prevent oxygen uptake from air-gaping, some authors have closed oyster shells with a rubber band and duration of the oxygen-limiting/anoxia conditions were reaching several days (Kurochkin et al. 2009 ; Ivanina et al. 2010a ; Ivanina et al. 2010b ; Piontkivska et al. 2011) or oysters were exposed under nitrogen atmosphere (Rafrafi and Uglow 2009). The latter study has shown lower weight loss and lower succinate accumulation in oysters *C. gigas* placed in emersion under humid air, as compared to those placed under nitrogen atmosphere (Rafrafi and Uglow 2009). This suggested that oxygen uptake can be possible by air-gaping during emersion and that gaping behaviour adopted by oysters under air exposure would limit transition from aerobic to anaerobic metabolism.

Oxygen level in seawater is thus hypothesized to induce functional changes in mitochondrial capacities in Pacific oyster through regulation of electron transport chain enzymes. The present study aimed to test whether mitochondrial properties are sensitive to oxygen variability upon natural emersion on a short-time (i.e. tidal) scale. To address these questions, we established a protocol to compare mitochondrial oxygen consumption between immersion and emersion periods during a natural tidal cycle. Functional capacities of gills mitochondria in oyster *C. gigas* were compared in animals sampled in the field after tidal immersion and emersion periods. To do so, respiratory capacities and maximal oxygen consumption due to flux through ETC complexes, as well as ATP production capacities were measured on isolated gill mitochondria. Mitochondrial membrane morphology was also evaluated by measuring the activity of the mitochondrial enzyme citrate synthase and membrane phospholipid content of mitochondrial preparations.

## **Materials and methods**

### ***Chemicals***

All chemicals were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), except otherwise mentioned.

### ***Experimental procedures***

Adult Pacific oysters *Crassostrea gigas*, of 6 to 11 cm shell length ( $8.5 \pm 0.2$ , mean value  $\pm$  standard error) were collected on January 2012 on a site named “Grand Dellec” ( $48^\circ 21'N$ ,  $4^\circ 34'W$ ), located ten minutes from the laboratory. Water temperature was  $12^\circ C$ . Eighty oysters, still cemented to their rock, were moved and gathered above the foreshore, in a place where oysters can undergo about 4 h of immersion and 8 h of emersion. These cycles corresponded to a place which was the upper limit of oysters distribution on the foreshore, with a maximum emersion time for the oysters at this site. After four weeks, oysters were opened and dissected on-the-spot at the end of submersion or emersion periods. Samplings were conducted within a week, 3 days for emersion period and 2 days for immersion period. Fifteen oysters per day were sampled, divided into 3 pools of 5 oysters. Gills were excised, transferred into 50 ml plastic tubes held on ice and immediately brought to the laboratory for subsequent preparation of mitochondrial suspension. Gill pools contained in average  $3.2 \pm 0.2$  g of gill tissue.

### ***Mitochondrial analysis***

Gills were chosen for isolation of mitochondria because they represent major sensors to oxygen fluctuations and have important metabolic function in regulating ion exchange (Sokolova et al. 2005 ; Piontkivska et al. 2011).

#### *Isolation of mitochondria*

Procedures of mitochondria isolation and assays were adapted from Kraffe et al. (2008). All manipulations were carried out on ice and centrifugations were performed at 4°C, taking about 1 h to be completed. Oyster gills were dried with paper towels, weighted, and initially chopped with scissors and rinsed two times on 80 µm mesh with 2 ml of isolation buffer containing 300 mM sucrose, 30 mM HEPES, 100 mM KCl, 8 mM EGTA and 1% of protease inhibitor cocktail (Sigma), pH 7.5. On the day of the experiment, 0.5% fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) was extemporaneously added to the buffer. The minced gills were then homogenized with three series of three passes in a motorised Potter tissue grinder (Heidolph, Kelheim, Germany) with a loosely fitting pestle, in 10 volumes of ice-cold isolation buffer. The homogenate was centrifuged at 900 g at 4°C for 10 min. The supernatant was collected, filtered on 80 µm mesh, and again centrifuged at 900 g at 4°C for 10 min. The resulting supernatant, considered free of unbroken cells or cell debris, was centrifuged at 10,000 g. The mitochondrial pellet was re-suspended in a volume of reaction buffer (400 mM sucrose, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM HEPES, 90 mM KCl, 50 mM taurine, 50 mM β-alanine, pH 7.5, with 0.5% fatty acid-free BSA added on the day of the experiment), corresponding to one-tenth of the mass of tissue used, and was used to immediately perform oxygen uptake and ATP production. A subsample was stored at -80°C for subsequent assays of enzymatic activities.

#### *Measurement of oxygen consumption*

Mitochondrial oxygen consumption was measured polarographically using a water-jacketed O<sub>2</sub> monitoring system (Qubit System, Kingston, Ontario, Canada). Temperature was controlled at 10°C by a circulating refrigerated water bath. The oxygen probes were calibrated with air-saturated reaction buffer and corrected for assay temperature and local atmospheric pressure. For each assay, around 0.8 mg of mitochondrial protein (40 µl mitochondrial preparation) was added to 0.4 ml reaction buffer containing 400 mM sucrose, 30 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM taurine and 50 mM β-alanine, pH 7.5. On the day of the experiment, 0.5% BSA was added to the assay medium. For measurement of maximal



oxidative capacities, glutamate (40 mM) or succinate (20 mM) was added to fuel oxygen consumption through complex I or II, respectively. The maximal respiration rate (state 3) was obtained after addition of ADP to a final concentration of 600  $\mu\text{M}$ . Preliminary experiments showed that glutamate alone stimulates respiration through complex I as previously found in *Crassostrea virginica* (Burcham et al. 1983). Our pilot studies also showed that 40 mM for glutamate and 20 mM for succinate are saturating concentrations under the assay conditions of this study (data not shown). Non-phosphorylating oxygen consumption (state 4) rate was measured after ADP depletion. Subsequently, 6.3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  oligomycin (final concentration) was added to evaluate oxygen consumption in the absence of oxidative phosphorylation (state 4<sub>oligo</sub>) (Nesci et al. 2012). Each measurement was performed in duplicates. Respiratory control ratio (RCR) was defined as the ratio between state 3 and state 4. Oxidative phosphorylation efficiency (relation between ADP added and oxygen consumption) was calculated with ADP/O ratio according to Estabrook (1967).

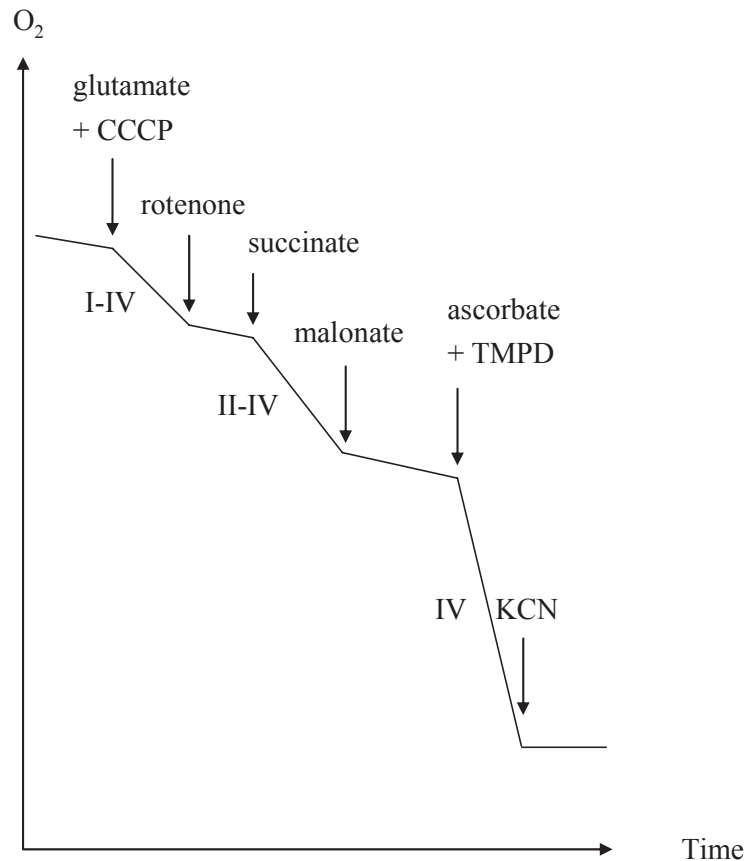
#### *Polarographic assessment of maximal flux through ETC complexes*

Oxygen consumption related to maximal electron flux through complexes I-IV, II-IV and IV was measured polarographically on the day of mitochondrial isolation using the same water-jacketed  $\text{O}_2$  monitoring system. Temperature was also controlled at 10°C. For these measurements, around 0.8 mg of mitochondrial protein (40  $\mu\text{l}$  mitochondrial preparation) was added to 0.4 ml of reaction buffer described above. Oxygen consumption related to electron flux through various segments of the ETC was assessed using specific chemical inhibitors (Figure 1).

Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP, 20  $\mu\text{M}$ ), an uncoupling agent of oxidative phosphorylation, was used to measure oxygen consumption due to maximal electrons flux through respiratory complexes (Oellermann et al. 2012). CCCP disrupts mitochondrial membrane potential via stimulation of proton leak, but does not directly affect the substrate oxidation of the ETC (Ivanina et al. 2012). No ADP was added for these measurements. Oxygen consumption due to flux through complexes I-IV was estimated from oxidation rates of glutamate (40 mM).

After steady state rates were obtained, rotenone (2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) was added to the chamber to inhibit complex I, and subsequently succinate (20 mM) was added to stimulate flux through complexes II-IV.

Malonate ( $1 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) was then added to inhibit complex II, and ascorbate ( $10 \text{ mM}$ ) and *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylene-diamine (TMPD,  $2 \text{ mM}$ ) were then added to determine flux through complex IV (CCO) (Martin et al. 2012). Adding KCN ( $32 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) fully inhibited oxygen consumption by CCO, demonstrating no auto-oxidation of TMPD in the presence of ascorbate.



**Figure 1 :** Respiratory profile of mitochondria isolated from gill tissue of *C. gigas* in response to substrate or inhibitor additions. Glutamate, succinate and a mixture of ascorbate + TMPD allow to measure oxygen consumption related to maximal electron flux through complexes I-IV, II-IV and IV, respectively. Rotenone, malonate and KCN are specific inhibitors of complexes I, II and IV, respectively.

### *Enzymatic activities*

Cytochrome *c* oxidase activity measured on mitochondrial preparations was adapted from Bouchard and Guderley (2003) and from Kraffe et al. (2008). Mitochondrial preparation was submitted to two cycles of freezing and thawing. The disrupted mitochondria were diluted in the assay buffer containing  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $50 \text{ mM}$  pH 7.8 at  $25^\circ\text{C}$ . Bovine

cytochrome *c* (cyt *c* C2037 Sigma) was employed as substrate to stimulate maximal CCO activity. Reduced cyt *c* solution was prepared by adding few grains of sodium dithionite. To avoid dithionite excess, small amounts of a stock solution of reduced cyt *c* were added to a cyt *c* oxidized solution. Absorbance was followed at 550 nm in order to obtain 95% absorbance of the reduced cyt *c* stock solution. The reaction was performed in microplates at 25°C in presence of an initial cyt *c* concentration of 60 μM. The decrease in absorbance was followed at 550 nm for 10 minutes and all assays were run in triplicate. Activities were calculated using an extinction coefficient of 19.6 mmol.l<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> for cyt *c* and are expressed as μmol cyt *c* transformed min<sup>-1</sup> ( $U_{CCO} = \mu\text{mol cytochrome } c \text{ reduced min}^{-1}$ , first order reaction).

Citrate synthase activity was measured on mitochondrial suspension. All the manipulations were carried out on ice. Mitochondrial suspension was diluted 100 times in lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% of Triton X100, 0.5% of Igepal, and 10% (v/v) of phosphatase inhibitor cocktail II (P5726 Sigma)). On the day of the experiment, EDTA free protease inhibitor cocktail (11873580001 Roche) was added to the buffer (2 tablets for 50 ml). The reaction was initiated by adding 20 μl of oxaloacetate 5 mM to 20 μl of samples and 160 μl of assay buffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM acetyl coA, 10 mM DTNB) and was monitored in a microplate reader at 412 nm for 10 min at 25°C. All assays were run in triplicate and activities were calculated using an extinction coefficient of 13.6 mM.cm<sup>-1</sup> ( $U_{CS} = \mu\text{mol citrate formed.min}^{-1}$ ).

#### *Protein concentration*

Aliquots of 20 μl of mitochondrial preparations were suspended in the reaction buffer without BSA and centrifuged for 10 min at 12,000 g at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended, washed and centrifuged two times again to remove the BSA. Pellets were maintained in 0.5 ml of ultra-pure water and frozen at -80°C until protein analysis. The protein concentration was determined with the RC DC Protein Assay Kit (BIORAD) using BSA as standard.

#### *ATP production*

ATP production was determined using the ATP luminescent assay (ATP LITE-M 300 Assay Kit, 6016943 Perkin Elmer). Mitochondrial suspensions held on ice were firstly pre-incubated for 1 min with or without 10 mM malonate in Eppendorf vials. Subsequently 20 mM succinate was added. We used malonate as a specific inhibitor of complex II. An inhibition of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ , the driving force of ATP synthesis through  $F_0F_1$ -

ATP synthase) is achieved by titration with malonate, which affects  $\Delta\psi_m$  *via* inhibition of the substrate oxidation subsystem (complex II) but does not affect phosphorylation subsystems (Hinkle et al. 1991 ; Ivanina et al. 2012). We found a >90% of inhibition of oxygen consumption under state 3 (ADP 0.6 mM) for malonate (10 mM) in mitochondrial preparations when succinate 20 mM was used as substrate.

Subsequently, in a 96-well microplate, 100  $\mu$ l of mitochondrial suspensions (with or without malonate) was added to 50  $\mu$ l of reaction buffer and to 50  $\mu$ l of substrate solution provided with the assay Kit. Luminescence was first read at 25°C every 2 min for 8 min to confirm the absence of ATP production at this step, then ADP (0.6 mM) was added to start oxidative phosphorylation and luminescence was read every 50 s for 15 min. In order to convert relative luminescence units into ATP contents, a calibration curve of ATP was realised by preparing a series of dilutions of a stock solution furnished with the assay Kit, except that mammalian cell lysis solution was replaced by mitochondrial reaction buffer. The calibration curve was linear in the range of ATP concentrations tested and ATP levels were determined by interpolation from the calibration curve. All assays (standard curve and samples) were run in triplicates. ATP production rate of the samples was determined after ADP addition in the linear part of the curve. The ATP production rate measured without malonate referred to total ATP production and was determined per milligram of mitochondrial proteins per minutes. The remaining ATP production in the presence of malonate was defined as non-F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATP-synthase related mechanisms, and would correspond to ATP production by other mitochondrial or non-mitochondrial contaminant ATP-producing systems. The ATP production through oxidative phosphorylation was determined as the difference between total ATP production rate and non-F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATP-synthase related ATP production rate.

### ***Membrane lipid analysis***

Before lipid extraction of mitochondrial suspensions, a 60  $\mu$ l aliquot of mitochondrial preparation (around 1.2 mg of mitochondrial protein) was resuspended in the reaction buffer minus BSA and centrifuged at 9000 g at room temperature for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet resuspended, washed in reaction buffer and centrifuged a further two times. The membrane lipids of mitochondrial suspensions were then extracted according to Folch et al. (1957) by resuspending pellets in chloroform/methanol (2:1, vol/vol). The final extracts for gill mitochondria were stored at -80°C under nitrogen after adding 0.01% w/v butylated hydroxytoluene (BHT, antioxidant).

*Separation of membrane lipid classes*

Phospholipid classes were analyzed by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) as described by Haberkorn et al. (2010). A preliminary run was carried out on silica glass plate (HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Darmstadt, Germany) with a polar solvent mix (methyl acetate:isopropanol:chloroform:methanol:KCl, 10:10:10:4:3.6). The plate was then dried and activated on a heating plate at 120°C for 30 min. Lipid samples were spotted on the plate by the CAMAG automatic sampler. The silica plate was then placed into the TLC developing chamber and incubated with the polar solvent mix described above. Lipid classes appeared as black bands after dipping plates in a cupric-sulfate solution, and heating at 160°C for 20 min. The charred plates were read by scanning at 370 nm, and black bands were quantified by Wincats software. The quantities of each phospholipid class were determined by comparison with standards of known amounts. Although sphingomyelin is absent in bivalves, its standard was used to quantify ceramide aminoethylphosphonate (CAEP) which has a similar structure (Le Grand et al. 2011). The technique used did not allow separating properly phosphatidylinositol (PI) and CAEP, so proportions of these two phospholipids were presented as the sum PI + CAEP.

*Statistical analysis*

MANOVA followed by post hoc Fisher's least significant difference (LSD) test was performed to compare oxygen uptake related to electron flux through complexes I-IV, II-IV and IV (factor 1) between oysters sampled during emersion or during immersion (factor 2). Non-parametric Mann-Whitney test was performed on other parameters (oxygen consumption, enzymatic activities, ATP production and lipid composition). Significant threshold was determined at  $P < 0.05$ . Percentage data were transformed (arcsin of the square root) but are presented in figures and tables as untransformed percentage values. All analyses were performed with the Statgraphics software, version Plus 5.1. (Manugistics, Inc, Dallas, USA).

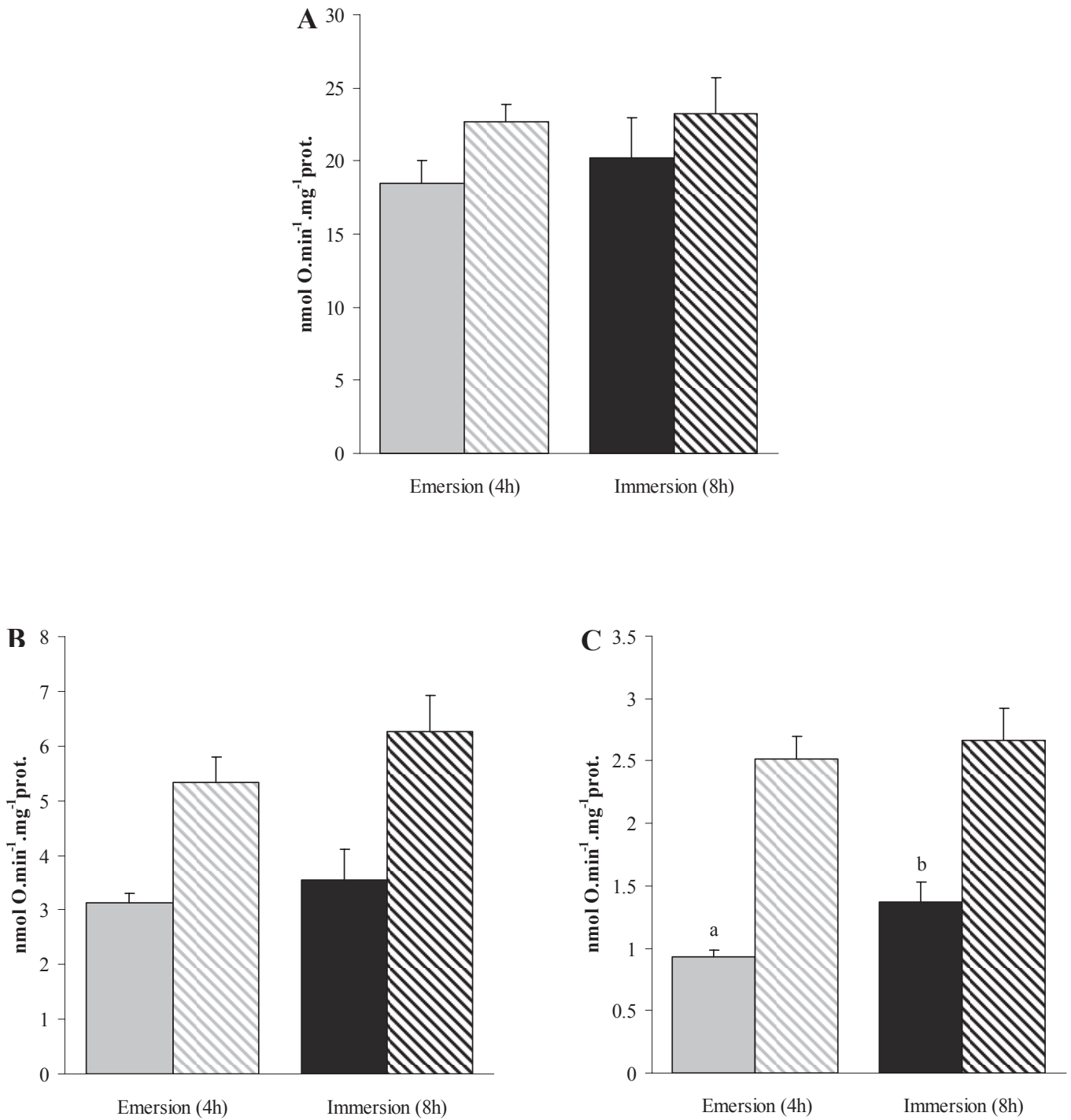
## Results

### *Mitochondrial oxidative capacities*

Oxidative capacities of mitochondria isolated from oyster gills were assessed using glutamate or succinate. This comparison of substrate preference showed that maximal state 3 respiration fuelled with glutamate was not different from state 3 with succinate ( $P = 0.083$  and  $0.411$  for oysters sampled during emersion and during immersion, respectively) (Figure 2A). However, non-phosphorylating rates (state 4) were significantly higher with succinate for substrate when compared to rates obtained with glutamate ( $P < 0.05$ ). RCR and ADP/O were significantly higher with glutamate as substrate compared to succinate ( $P < 0.05$ , Table 1). RCR is indicative of the degree of mitochondrial coupling. The significantly lower RCR obtained with succinate as substrate would indicate that succinate metabolism is less coupled. This was confirmed by a lower ADP/O ratio with succinate (Table 1). Nevertheless,  $RCR > 5.1$  for glutamate and  $> 4.0$  for succinate indicated mitochondrial preparations with tightly coupled mitochondria. Maximal state 3 rates and state 4 rates of glutamate and succinate oxidation were not affected by air exposure (Figure 2A and 2B). State 4<sub>oligo</sub> was significantly higher in oysters sampled during immersion than in those collected during emersion when glutamate was used as substrate but not with succinate (Figure 2C). RCR and ADP/O were not modified (Table 1).

**Table 1** : Respiratory control ratio (RCR) and oxidative phosphorylation efficiency (ADP/O), with glutamate or succinate used as substrate for isolated mitochondria from gills of oysters sampled after 4 h of emersion or after 8 h of immersion. Values are mean  $\pm$  S.E. (n = 9 pools of 5 oysters for emersion and n = 6 pools of 5 oysters for immersion).

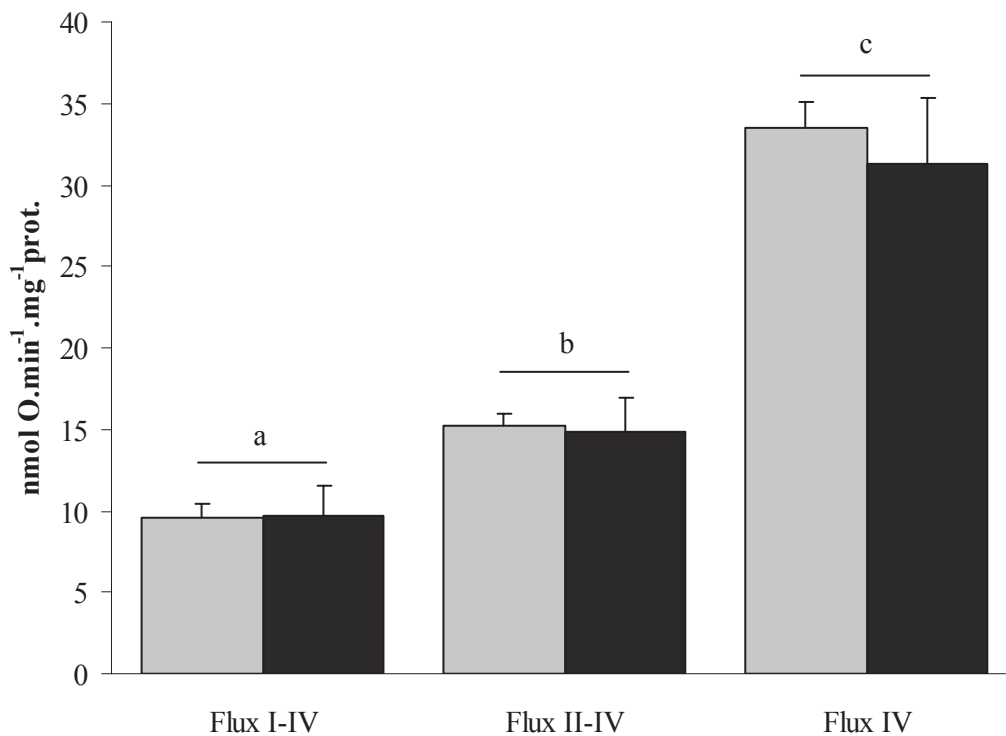
	Emersion		Immersion		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
RCR glutamate	5.9	0.2	5.1	0.4	NS
RCR succinate	4.4	0.4	4.0	0.2	NS
ADP/O glutamate	1.4	0.0	1.5	0.1	NS
ADP/O succinate	1.1	0.0	1.2	0.1	NS



**Figure 2 :** Oxidative phosphorylation (state 3, A) non-phosphorylating oxygen consumption (state 4, B), and oligomycin-inhibited state 4 (state 4<sub>oligo</sub>, C) with glutamate 40 mM (full bars) or succinate 20 mM (hatched bars), on mitochondria isolated from gills of oysters sampled after 4 h of emersion or after 8 h of immersion. Assay temperature was 10°C. Values are mean ± S.E. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups (n = 9 pools of 5 oysters for emersion and n = 6 pools of 5 oysters for immersion,  $P < 0.05$ ).

*Mitochondrial maximal electron flux*

Oxygen consumption related to maximal electron flux through complexes I-IV, II-IV and IV were similar between emersion and immersion conditions. However, as measured by oxygen consumption, maximal electron flux through complexes I-IV, II-IV and IV were different (Figure 3). After adding CCCP, maximal electron flux through complexes II-IV led to a significantly higher oxygen consumption rate, as compared to flux through complexes I-IV ( $P<0.05$ ). Maximal electron flux through complex IV measured with ascorbate + TMPD led to two and three times higher oxygen consumption as compared to flux through complexes II-IV and I-IV, respectively ( $P<0.05$ ).



**Figure 3 :** Oxygen uptake related to electron flux through complexes I-IV, II-IV and IV of isolated mitochondria from gills of oysters sampled after 4 h of emersion (grey bars) or after 8 h of immersion (black bars). Assay temperature was 10°C. Values are mean  $\pm$  S.E. Different superscript letters indicate values that differ between flux. Maximal flux through complexes of the ETC did not differ statistically between groups (n = 9 pools of 5 oysters for emersion and n = 6 pools of 5 oysters for immersion).



*Cytochrome c oxidase activity*

CCO activity in mitochondrial suspension, expressed in  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  mitochondrial protein, was not different between emersion and immersion conditions (Table 2, mean value  $0.36\pm 0.02$ ).

*Citrate synthase activity*

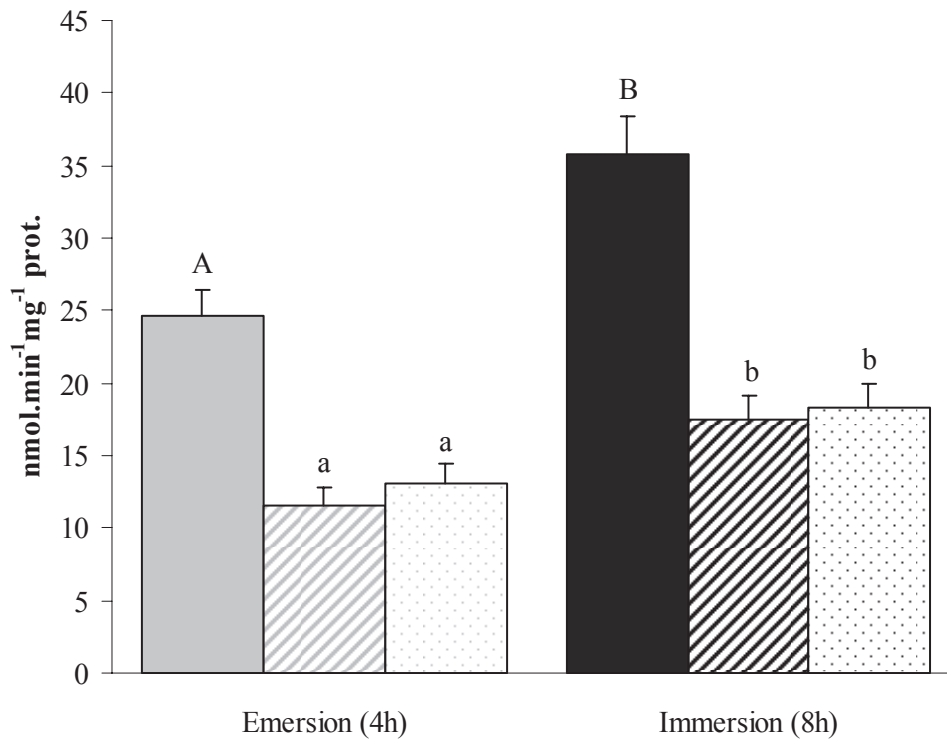
CS activity, measured on mitochondrial suspension and expressed in  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  mitochondrial proteins, was not different between emersion and immersion conditions (Table 2, mean value  $0.30\pm 0.01$ ).

**Table 2** : CCO and CS activities, expressed in U per mg of mitochondrial proteins, of isolated mitochondria from gills of oysters sampled after 4 h of emersion or after 8 h of immersion. Assay temperature was  $25^{\circ}\text{C}$ . Values are mean  $\pm$  S.E. (n = 9 pools of 5 oysters for emersion and n = 6 pools of 5 oysters for immersion).

	Emersion		Immersion		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
CCO activity	0.35	0.02	0.38	0.04	NS
CS activity	0.29	0.01	0.31	0.02	NS

*ATP production*

Total ATP production rate, ATP production rate related to  $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATP-synthase}$  and non- $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATP-synthase}$  related ATP production rate (all expressed in  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  mitochondrial proteins) were significantly higher in oysters sampled during immersion as compared to oysters sampled during emersion (45%, 52%, and 39% higher, respectively) ( $P < 0.05$ , Figure 4). ATP produced by other mechanisms than  $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATP-synthase}$  (non- $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATP-synthase}$  related ATP production) accounted for about 50% of total ATP production rates in oysters sampled during emersion and immersion.



**Figure 4 :** ATP production rate of mitochondria isolated from gills of oysters sampled after 4 h of emersion or after 8 h of immersion. Rates are expressed as nmol per min and per mg of mitochondrial proteins, and determined with succinate 20 mM, ADP 0.6 mM, and with (hatched bars) or without (full bars) malonate 10 mM (dotted bars: difference between ATP production determined with and without malonate). Assay temperature was 25°C. Values are mean  $\pm$  S.E. Different superscript letters indicate values that differ significantly between oyster groups (n = 6 pools of 5 oysters,  $P < 0.05$ ).

ATP production of samples incubated with malonate should correspond to ATP produced by other mechanisms than  $F_0F_1$ ATP-synthase. ATP produced by  $F_0F_1$ ATP-synthase was evaluated as the difference between total ATP production and non- $F_0F_1$ ATP-synthase related ATP production (see material and methods).

*Phospholipid classes of gill mitochondria*

Phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) were the two main phospholipid classes in gill mitochondria of oysters (more than 30% of the total phospholipids each). Phosphatidylinositol (PI) and ceramide aminoethylphosphonate (CAEP) represented together 19%, followed by cardiolipin (CL) (around 8%), and phosphatidylserine (PS) (around 7%, Table 3). Proportions of PC, PE, PI + CAEP, CL and PS were unchanged between the two groups of oysters, as well as the ratio PC/PE.

Albeit non significant ( $P = 0.052$ ), total phospholipids expressed per milligram of mitochondrial proteins tended to be more abundant in oysters sampled during immersion than in oysters sampled during emersion (Table 3). When total phospholipid content was expressed per unit of CS, phospholipid quantity was significantly higher in oysters sampled during immersion than in oysters sampled during emersion ( $P = 0.008$ ).

**Table 3 :** Content of total phospholipids and proportion of phospholipid classes in gills mitochondria of oysters sampled after 4 h of emersion or after 8 h of immersion. The results for phospholipid classes are expressed as mass percentages of total phospholipids. Values are mean  $\pm$  S.E. (n = 9 pools of 5 oysters for emersion and n = 6 pools of 5 oysters for immersion).

	Emersion		Immersion		Sign.
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
PE	34.0	0.3	33.2	0.5	NS
PI + CAEP	18.7	0.3	19.1	0.2	NS
CL	7.7	0.2	7.5	0.1	NS
PC	32.8	0.5	33.3	1.1	NS
PS	7.1	0.2	7.2	0.5	NS
PC/PE	0.96	0.02	1.00	0.05	NS
Total phospholipids content					
( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot.}$ )	361.0	13.8	437.1	25.8	NS
( $\text{mg}\cdot\text{U}_{\text{CS}}^{-1}$ )	1.2	0.0	1.4	0.0	S

PE : phosphatidylethanolamine; PI : phosphatidylinositol; CAEP : ceramide aminoethylphosphonate; CL : cardiolipin; PC : phosphatidylcholine; PS : phosphatidylserine

## Discussion

Functional capacities of gill mitochondria from *C. gigas* were compared between oysters sampled after emersion and immersion periods, at a natural tidal time scale. Although mitochondrial capacities measured at the different levels of organisation appeared to be maintained between emersion and immersion conditions, a significant impact on ATP production capacities of mitochondria was observed.

Rates of oxygen consumption by isolated gill mitochondria were higher when the substrate was succinate as compared to glutamate, as previously shown by Burcham et al. (1983) in a study on *Crassostrea virginica*. This difference between the two substrates, observed as a trend for state 3 but significant for state 4, showed that kinetics of electron transfer is dependent of substrate used. In the same way, oxygen consumption after addition of oligomycin (state 4<sub>oligo</sub>) was significantly higher with succinate. Although dissolved oxygen availability likely change between immersion and emersion, phosphorylative (state 3) and non-phosphorylative (state 4) oxygen consumption fueled by glutamate through complex I were similar after immersion or after emersion. Same observation was done for oxygen consumption fueled by succinate through complex II. Only state 4<sub>oligo</sub> was lower in oysters sampled after emersion with glutamate as substrate.

That mitochondrial properties and capacities were maintained for oysters following emersion strongly suggests that emersion does not involve molecular responses to oxygen deficiency. Indeed, the present results contrast with those obtained when oysters are immersed in seawater at 20% oxygen saturation, which induce rapid and significant modifications (only after 3 h of hypoxia) of functional properties of mitochondria in the Pacific oyster (Sussarellu 2011). One explanation could come from the air-gaping activity of *C. gigas* when emersed (Rafrafi and Uglow 2009). This behavior is likely to maintain oxygen partial pressure (pO<sub>2</sub>) of seawater in the mantle paleal cavity (Rafrafi and Uglow 2009). This may be sufficient to avoid the onset of down regulation of mitochondrial capacity in oysters during emersion within a tidal cycle in its environment.

Maintenance of oxidative capacities after emersion may reflect regulatory mechanisms between ETC complexes or other systems that would have buffered changes in individual protein activities. Thereby, regulations at the level of ETC individual enzymes were explored

by measuring flux through the different ETC complexes. Use of CCCP permitted to evaluate capacity of electrons flux through ETC complexes uncoupled to ATP production by  $F_0F_1$ ATP-synthase (Oellermann et al. 2012 ; Ivanina et al. 2012). Oxygen consumption fueled by glutamate therefore represents ETC maximal flux from complexes I to IV. Rotenone blocks complex I, with succinate dehydrogenase providing  $FADH_2$  to complex II, so that succinate oxidation represents flux from complexes II to IV. With complex II inhibited by malonate, TMPD donates electrons to cytochrome *c*, so TMPD oxidation represents flux through complex IV (cytochrome *c* oxidase). In oyster gill mitochondria, flux through complex IV alone was two to three times higher than flux through the entire ETC. This apparent excess capacity over mitochondrial state 3 respiration rate (Blier and Lemieux 2001 ; Pichaud et al. 2012) would reflect the fact that complex IV is typically present at much higher levels in the inner mitochondrial membrane than either complex I or II (Muleme et al. 2006 ; Sussarellu 2011). This excess catalytic capacity of CCO would be required to ensure an efficient thermodynamic gradient and free access of electrons to the ETC (Blier and Lemieux 2001). Nevertheless, no change between emersion and immersion conditions was observed for maximal electron flux through complexes I-IV or II-IV. Same observation was done for maximal electron flux through complex IV, which confirmed results of CCO activity determined by spectrophotometry. This suggests that oyster mitochondria undergo no functional alteration after emersion and that no signal of hypoxia/anoxia occurs for oysters during these periods of emersion in the field at the level of the ETC.

Contrastingly, total ATP production rate was found to be 31% lower in mitochondrial preparations of oysters sampled after emersion as compared to those sampled after immersion. Decrease of ATP level in bivalves exposed to air was previously reported (Wijsman 1976 ; Widdows et al. 1979 ; Nicchitta and Ellington 1983 ; Sukhotin and Pörtner 1999), and in a similar experiment on *C. gigas* by Moal et al. (1989). The latter study interpreted these results as an interruption of feeding processes and a reduction of oxidative phosphorylation during emersion time. Interestingly, the proportion of ATP produced by  $F_0F_1$ ATP-synthase represents only around 50% of the total ATP produced. This suggests that half of the ATP production seemingly came from other ATP producing systems, although mitochondria are generally considered as the major aerobic ATP producers. The phosphorylation subsystems to ATP production in oyster gill mitochondria are still unresolved. One possibility would be the presence of an adenylate kinase (AK) that can catalyse the reversible conversion of 2 molecules of ADP in 1 molecule of ATP and

1 molecule of AMP. In isolated mitochondria from plants, it has been shown that ATP production due to mitochondrial AK activity can represent two to four times the maximum activity of  $F_0F_1$ ATP-synthase (Roberts et al. 1997). The hypothesis of an AK activity would be consistent with the decrease of ATP production rate by non- $F_0F_1$ ATP-synthase related mechanisms observed after emersion (- 34%). Indeed, AK activity in gills of the eastern oyster *C. virginica* falls by 32% in winter when exposed to anoxic conditions (placed under  $N_2$  atmosphere) (Greenway and Storey 1999). This regulation may be induced by covalent and reversible modification of the enzyme (phosphorylation or dephosphorylation), as observed in response to anoxia for other enzymes involved in cell metabolism (Greenway and Storey 1999).

ATP production rate specifically related to  $F_0F_1$ ATP-synthase activity was also significantly affected by air exposure (- 28% as compared to values of oysters sampled after immersion). Regulation of ATP synthesis related to mitochondrial respiration still remains incompletely described and up to now is still poorly investigated, especially in marine bivalves. It should be stressed that ATP production results could be underestimated by ATPase activity (leading to ATP hydrolysis). It is not excluded that  $Na^+,K^+$ -ATPase or other non-mitochondrial ATPases were present in our mitochondrial preparations, even if it has been shown that these enzymes have a very low activity in similar preparations from rat kidney or rat brain (Malis and Bonventre 1986 ; Zheng and Ramirez 1999). Non-mitochondrial ATPases can be inactivated by EDTA (Rustin et al. 1994), but we chose to not add this product in the reaction buffer as our preliminary results showed an uncoupling of mitochondrial respiration in response to EDTA. Beside ATP consuming systems in mitochondria preparations,  $F_0F_1$ ATP-synthase is also known to display a bifunctional rotating molecular mechanism capable of re-energizing the membrane by ATP hydrolysis (Nesci et al. 2012). A small part of ATP hydrolysis should be due to this ATPase activity and proton conductance as we observed that oligomycin inhibited state 4 rate by about 50% (Hinkle et al. 1991).

The present results suggest an adjustment of mitochondrial ATP synthesis that may be due to inhibition of the  $F_0F_1$ ATP-synthase and/or reduced ADP transport into the mitochondria during emersion rather than regulation of the activity or coupling of the ETC. Indeed, modification of the ADP-stimulated respiration, phosphorylation efficiency (estimated through ADP/O) and flux through ETC complexes were not observed between oysters after emersion or immersion. Reduction of ATP production through  $F_0F_1$ ATP-synthase would also not be congruent with a modification of proton leak. Indeed, the

respiration rate of 'resting' mitochondria (estimated through state  $4_{\text{oligo}}$  rates) was not modified when succinate was used as substrate, indicating that adjustment of proton conductance through proton leak would not be a mean of dissipating the membrane potential and decoupling ATP synthesis via  $F_0F_1$ ATP-synthase.

Mechanisms of a potential inhibition of the oxidative phosphorylation ATP synthesis during emersion are still unknown. A possible mechanism of allosteric modulation of  $F_0F_1$ ATP-synthase activity and/or ADP transport is modifications in phospholipid composition. Modifications in phospholipid composition can be very fast. In mussels, it has been observed significant changes in membrane order occurring over short intervals (hours), which reflected an adaptation during tidal cycles (Williams and Somero 1996). It has been shown that  $F_0F_1$ ATP-synthase is specifically bound to phosphatidylethanolamine (PE) and cardiolipin (CL). CL is located in the inner membrane of mitochondria and specifically associated with enzymes of the ETC (Eble et al. 1990 ; Haines and Dencher 2002 ; Zhou et al. 2011). This tight association seems to influence the structural and catalytic properties of  $F_0F_1$ ATP-synthase, which underlines the role of phospholipids in maintaining an active conformation of this enzymatic complex (Laird et al. 1986 ; Haines and Dencher 2002 ; Zhou et al. 2011). CL also plays an important role in the micro-environment of the ADP/ATP translocase (ANT) (Schlame et al. 2000) and ANT activity was reported to be strongly correlated with the membrane content of hexagonal phase-forming lipids (PE/PC) (Krämer and Klingenberg 1980 ; Mak et al. 1983). In addition, modulations in the proportion of CL were associated with modifications in mitochondrial enzymatic activities in mammals (Paradies et al. 1997), fishes (Frick et al. 2010) and snails (Stuart et al. 1998). However, no difference in phospholipid proportions of gill mitochondria was observed in our study. Nevertheless, when total phospholipid mass was expressed per unit of CS, there was a significant difference, oysters sampled during emersion having a mitochondrial phospholipid content 12% lower compared to oysters sampled during immersion. This result would suggest a rearrangement of the mitochondrial membrane topology of oysters between emersion and immersion periods, and particularly of mitochondria cristae. It has already been shown that the shape of the inner membrane can influence mitochondrial function. For example, restriction of ADP diffusion related to changes in inner membrane topology can lead to diminished local production of ATP in rat (Mannella et al. 2001).

## **Conclusion**

Present results showed a high stability of oyster gill mitochondrial oxidative capacities between emersion and immersion, suggesting that oysters preserve mitochondrial capacities through tidal cycles. This would confirm the great tolerance of oysters to air exposure, and underlined the differences with results obtained in immersed hypoxia induced experiments. Maintained capacity of substrate oxidation during emersion-immersion at a tidal cycle scale could be a mean for oysters to preserve aerobic capacity and protect mitochondrial integrity, and can be a matter of oxygen uptake related to valve activity during emersion. However, the decrease in ATP production in oysters during emersion showed that air exposure has an influence on energy production by decreasing the activity of ATP producing systems. Although no data are currently available about the response of oysters to emersion on the ATP turnover rates in mitochondria, present data suggest that onset of metabolic rate depression is also likely to occur on a short-time scale of emersion. This parameter could be one of the first affected during lower oxygen availability. Mechanisms of regulation involved remain unclear and further studies are needed to characterize them.

## **Acknowledgements**

We wish to thank Doriane Combot for helping in lipid analysis. Tony Dudognon fellowship was funded by the French Research Ministry. Funding for the experiment was provided by the project in Europe Mer (research consortium on marine science and technology in Brittany, France): LIPIDOMITO.





## Conclusion

L'objectif de cette étude était de comparer les capacités mitochondriales d'huîtres *Crassostrea gigas* prélevées en émergence et en immersion, afin de voir si les mitochondries présentaient une sensibilité aux variations d'oxygène disponible dans le milieu, comme c'est le cas lors d'une exposition à l'air. Dans notre étude, le cycle émergence/immersion instauré correspond à un cycle de marées habituellement rencontré par les huîtres présentes sur le terrain (4 h d'émergence et 8 h d'immersion), de façon à ce que les conditions expérimentales correspondent au mieux aux conditions naturelles. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence entre les huîtres prélevées en émergence et celles prélevées en immersion, au niveau de la phosphorylation oxydative (stade 3), de la consommation d'oxygène non-phosphorylante (stade 4) ou de l'activité de la CCO, ni au niveau de la consommation en oxygène liée aux flux d'électrons maximums à travers les complexes I-IV, II-IV and IV. En revanche, la production d'ATP est plus faible dans les huîtres prélevées en émergence comparées à celles prélevées en immersion.

Le maintien des propriétés et des capacités mitochondriales en émergence suggère qu'il n'y a pas de réponse moléculaire à une déficience en oxygène après 4 h d'exposition à l'air. De même, les taux de consommation d'oxygène de mitochondries isolées de *C. virginica* sont similaires même après trois jours d'exposition à l'air (Kurochkin et al. 2009), et ce malgré la fermeture des coquilles pour éviter la réoxygénation par « air gaping ». Même si les conclusions de la comparaison de notre étude chez *C. gigas* et celles de Kurochkin chez *C. virginica* doivent être faites avec certaines précautions, ceci suggère une grande tolérance des huîtres face à des périodes intermittentes d'anoxie. En revanche, ces résultats contrastent avec ceux obtenus lorsque des huîtres sont immergées dans de l'eau de mer à 20% d'oxygène, ce qui induit de rapides modifications (seulement après 3 h d'hypoxie) des propriétés fonctionnelles mitochondriales chez *C. gigas* (Sussarellu 2011, voir publication en annexe). L'hypoxie et l'exposition à l'air sont donc deux phénomènes qui induiraient des réponses différentes au sein des mitochondries chez *C. gigas*. Une explication pourrait venir de l'activité « air gaping » de *C. gigas* en émergence (Rafrafi and Uglow 2009). Ce comportement est susceptible de maintenir la pression partielle en oxygène ( $pO_2$ ) de l'eau de mer dans la cavité palléale du manteau (Rafrafi and Uglow 2009), et pourrait ainsi être suffisant pour

éviter une diminution des capacités mitochondriales chez les huîtres pendant les périodes d'émersion ayant lieu lors des cycles de marées.

L'exposition à l'air est toutefois liée à une diminution de 30% de la production d'ATP, confirmant plusieurs études ayant démontré une baisse de la concentration en ATP chez des bivalves exposés à l'air (Wijsman 1976 ; Widdows et al. 1979 ; Nicchitta and Ellington 1983 ; Moal et al. 1989 ; Sukhotin and Pörtner 1999). L'utilisation d'inhibiteur montre que la moitié seulement de cette production correspondrait à la production d'ATP due à la phosphorylation oxydative, l'autre partie correspondant à l'activité d'autres mécanismes produisant de l'ATP, tels que l'adénylate kinase. La diminution de la production d'ATP liée à la phosphorylation oxydative ne peut pas s'expliquer par une modulation de l'activité de la  $F_0F_1$ ATP-synthase (ou de l'adénine nucleotide translocase) par des changements de proportions de phospholipides, la composition des classes de lipides des membranes de mitochondries étant similaire chez les huîtres prélevées en émersion et celles prélevées en immersion. Toutefois, la régulation de la production d'ATP pourrait être due à un réarrangement de la topologie des membranes de mitochondries, notamment au niveau des crêtes, par des modifications de la quantité totale de phospholipides.

Ces résultats suggèrent que malgré le maintien des propriétés et des capacités mitochondriales, l'initiation d'une dépression du taux métabolique pourrait survenir en émersion sur de courtes échelles de temps. Ce paramètre pourrait être un des premiers à être affecté en réponse à une diminution de la disponibilité en oxygène. Les mécanismes de régulations impliqués restent cependant incertains et de plus amples études sont nécessaires afin de les caractériser.

**DISCUSSION,  
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



## Discussion

La thèse présentée ici avait pour objectif d'apporter quelques éléments pour une meilleure compréhension des relations entre la structure lipidique des membranes cellulaires et leurs fonctions, et en particulier au sein des mitochondries, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Parce qu'un remodelage de leurs membranes est observé lors d'adaptations aux cycles des marées (Williams and Somero 1996), à la température (Pernet et al. 2007a ; Pernet et al. 2007b ; Pernet et al. 2008) ou à la salinité (Glémet and Ballantyne 1995 ; Fokina et al. 2007), les bivalves constituent des modèles intéressants pour les études des relations entre la structure des membranes cellulaires, directement corrélée à leur composition lipidique, et des activités d'enzymes associées. Cette relation a néanmoins été très peu étudiée chez ces animaux. Parmi les membranes cellulaires, nous avons choisi d'étudier la membrane interne des mitochondries, qui nous semblait la plus intéressante pour ce genre d'études. En effet, celle-ci est riche en protéines, spécialement en enzymes de la chaîne respiratoire, qui sont impliquées dans la production d'énergie cellulaire sous forme d'ATP (Becker et al. 2009). Les mitochondries montrent de plus une importante spécificité lipidique. Le cardiolipide est un lipide particulier, spécifiquement retrouvé dans la membrane interne des mitochondries et associé aux complexes de la chaîne de transfert des électrons et à la  $F_0F_1$ ATP-synthase, où sa présence est nécessaire pour l'activité optimale de ces enzymes (Eble et al. 1990 ; Robinson 1993 ; Schlame et al. 2000 ; Haines and Dencher 2002 ; Zhou et al. 2011 ; Böttlinger et al. 2012). Enfin, la mitochondrie est un organite qui peut moduler sa composition lipidique membranaire pour s'adapter à l'environnement, comme c'est le cas chez les ectothermes lors des processus d'adaptation à la température (Dahlhoff and Somero 1993 ; Guderley 2004 ; Kraffe et al. 2007 ; Grim et al. 2010) ou lors des processus d'estivation ou d'hibernation (Frick et al. 2010 ; Armstrong et al. 2011).

L'étude de l'effet de l'alimentation sur les capacités des mitochondries isolées des branchies de *C. gigas* a montré, après quatre semaines d'expérimentation, une grande régulation malgré les différences de composition en AG des régimes alimentaires. L'analyse de la composition en AG des membranes mitochondriales d'huîtres nourries en éclosion avec trois régimes différents (deux régimes monospécifiques, composés de *T-Iso* ou de *C. gracilis*, et un mélange 1:1 de ces deux algues) a révélé que, comme c'est le cas au niveau cellulaire, le régime alimentaire a une forte influence sur la composition lipidique des membranes

subcellulaires. Pour cette expérimentation de nutrition, les algues ont été choisies pour leurs différences de composition en AG, notamment au niveau de leurs proportions en AG essentiels. Chez les bivalves, les AG essentiels (20:4n-6, 20:5n-3 et 22:6n-3 principalement) sont importants pour la survie, la croissance et la reproduction, mais les bivalves ne sont pas capables de les synthétiser *de novo* et doivent les obtenir à partir de leur nourriture (Soudant et al. 1996a). D'une façon générale, la composition en AG des membranes de mitochondries reflète la composition en AG du régime alimentaire. Toutefois, l'incorporation des AG alimentaires au sein des membranes est un processus fortement régulé, comme c'est le cas pour les AG essentiels 20:5n-3 et 22:6n-3. Contrairement à ces AG, la proportion importante de 22:5n-6 dans les membranes de mitochondries indique une incorporation sélective de cet AG dans les phospholipides. La même observation a été faite dans les phospholipides de mitochondries de muscle rouge de truites, ce qui suggère une importante régulation de cet AG dans la maintenance des AG poly-insaturés totaux (Martin et al. 2012). Dans notre étude, la proportion de 22:5n-6 dans les membranes de mitochondries d'huîtres nourries avec un mélange équilibré est plus de cinq fois supérieure à la proportion de cet AG dans les membranes de mitochondries d'huîtres nourries dans leur milieu naturel, ce qui représente la différence majeure entre ces deux profils d'AG. Il a été émis l'hypothèse que chez le pétoncle, le 22:5n-6 pourrait être essentiel à la croissance et pourrait jouer un rôle structural dans le maintien de la structure et de la fluidité membranaire (Soudant et al. 1996a ; Milke et al. 2006).

Malgré les importantes différences de composition en AG, y compris en AG essentiels, dans les membranes de mitochondries d'huîtres nourries en éclosion avec trois régimes artificiels, ces mitochondries ne présentent ni différence d'activité, ni modification de leur quantité dans les branchies de ces huîtres. La quantité de cytochromes ne change pas non plus, suggérant qu'il n'y a pas de réarrangements des crêtes mitochondriales, en particulier au niveau des complexes de la chaîne respiratoire. Enfin, la modulation de la composition en AG membranaires par les AG alimentaires n'a qu'un effet minimal sur les proportions de classes de phospholipides. Ces résultats suggèrent donc une faible interaction entre les importantes différences de composition en AG membranaire et les activités enzymatiques mitochondriales. Ceci a confirmé les résultats de Martin et al. (2012) obtenus chez la truite, mais aussi des travaux chez les mammifères dans lesquels l'activité mitochondriale n'est pas modifiée en dépit d'une modification de composition de lipides membranaires induite par des régimes alimentaires différents (Astorg and Chevalier 1991 ; Larqué et al. 2003 ; Lemieux et

al. 2008 ; Khairallah et al. 2012). La stabilité des activités enzymatiques pourrait être due au maintien des proportions en AG saturés, mono-insaturés et poly-insaturés (dont les NMI) totaux entre les conditions alimentaires. En effet, la théorie du pacemaker membranaire de Hulbert et Else (1999) soutient que l'énergie cinétique des protéines et la vitesse des processus membranaires dépend de l'insaturation globale des AG membranaires (Hulbert 2007 ; Hulbert 2008). De précédentes études sur l'effet de la nutrition chez les bivalves ont déjà montré que ces paramètres ne variaient pas ou très peu entre les régimes (Delaunay et al. 1993 ; Soudant et al. 1996a ; Soudant et al. 1996b ; Delaporte et al. 2005). La régulation de l'homéostasie membranaire pourrait également se faire par des AG minoritaires (Guderley et al. 2008 ; Martin et al. 2012).

Au niveau cellulaire, l'étude de l'effet de l'alimentation sur les paramètres hémycytaires de *C. gigas* a montré des résultats semblables à ceux obtenus au niveau subcellulaire, à savoir une grande régulation des cellules immunitaires malgré les différences de composition en AG des régimes utilisés. A cause d'une quantité insuffisante de cellules pour l'analyse de la composition lipidique des hémycytes, les analyses de lipides ont été effectués sur les membranes de branchies, dont les changements de composition en AG induits par les régimes alimentaires sont similaires à ceux ayant lieu au sein des membranes des hémycytes (Delaporte et al. 2003). En accord avec de précédents travaux (Delaporte et al. 2003 ; Delaporte et al. 2005 ; González-Araya et al. 2011), le régime alimentaire de *C. gigas* a une forte empreinte sur la composition en AG des lipides membranaires de branchies, et par conséquent sur la composition en AG des lipides membranaires d'hémycytes. Malgré ces différences de composition en AG membranaires, le seul paramètre hémycytaire qui varie significativement entre les trois régimes artificiels (T-*Iso*, *C. gracilis*, et le mélange des deux) est le potentiel membranaire mitochondrial, plus élevé avec T-*Iso* qu'avec *C. gracilis*. Similairement aux résultats de Delaporte et al. (2003) obtenus avec un régime composé de *C. calcitrans*, les huîtres nourries avec *C. gracilis* dans notre étude ont tendance à avoir un plus grand nombre d'hémycytes circulants comparées à celles nourries avec T-*Iso* et le mélange des deux algues ( $P = 0.166$ ). Ceci pourrait s'expliquer par la forte proportion de 20:5n-3 dans *C. gracilis*, un précurseur de la synthèse des écosanoïdes (Lands 1992), qui pourrait avoir stimulé la production des hémycytes. En revanche, nos résultats ne montrent pas de différence significative d'activité oxydante des hémycytes entre les trois lots d'huîtres nourries avec des régimes différents, contrairement aux résultats de Delaporte et al. (2003). Dans des hémycytes non stimulés de *C. gigas*, les mitochondries représentent la source principale d'activité oxydante (Donaghy et al. 2012), comme il l'a été évalué par l'oxydation



du DCFH. Cela suggère que dans notre étude, les différents régimes n'affectent pas l'activité oxydante dans les mitochondries d'hémocytes.

L'homéostasie cellulaire et mitochondriale, malgré les modifications de composition en AG membranaires, pourrait être un moyen de faire face aux variations de nourriture disponible dans le milieu, et de maintenir les fonctions physiologiques des huîtres.

En revanche, de fortes différences sont observées dans les mitochondries entre des huîtres élevées pendant quatre semaines dans leur milieu naturel et des huîtres nourries pendant le même temps en éclosérie avec un mélange 1:1 de *T-Iso* + *C. gracilis*, un régime considéré comme équilibré et représentant un bon apport d'AG essentiels, menant à de meilleures performances (survie, croissance, reproduction) chez les huîtres comparé à d'autres mélanges d'algues (Rico-Villa et al. 2006). Du point de vue de l'animal entier, le mélange *T-Iso* + *C. gracilis* permet en effet de bonnes performances de croissance et de maturation sexuelle chez les huîtres, celles-ci montrant après quatre semaines de conditionnement un poids et un développement gonadique similaires aux huîtres laissées sur le terrain. Le profil en AG des membranes de mitochondries d'huîtres nourries en éclosérie avec un régime équilibré montre également peu de différences importantes avec le profil en AG des membranes de mitochondries d'huîtres élevées dans leur milieu naturel. Cependant, les capacités mitochondriales sont très différentes entre ces deux conditions. Ces résultats pourraient être corrélés à la quantité moins importante de CL chez les huîtres nourries en éclosérie. Le ratio PC/PE est également légèrement (6%) plus bas dans les mitochondries d'huîtres nourries en éclosérie et pourrait contribuer à la régulation des propriétés physiques et physiologiques des biomembranes (Hazel and Carpenter 1985). Des différences d'activité mitochondriale entre des animaux artificiellement conditionnés et des animaux prélevés dans leur milieu naturel ont également été mises en évidence par Guderley et al. (2011). Dans leur étude, les capacités oxydatives des mitochondries de gonades de pétoncles collectés dans le milieu naturel sont plus importantes (jusqu'à deux fois plus élevées) que celles des mitochondries de gonades de pétoncles nourries 8 semaines en éclosérie avec *T-Iso* ou *C. calcitrans*. Ceci semble souligner les déficiences induites par des régimes monospécifiques comparés au régime alimentaire trouvé par les pétoncles dans leur milieu naturel. De la même façon, Guerra et al. (2012) expliquent les différences de survie, d'index de condition et de croissance de la coquille, plus importants chez les pétoncles collectés dans leur milieu naturel que ceux élevés en éclosérie, par l'utilisation d'un régime alimentaire artificiel non optimale pour la physiologie des pétoncles. Malgré un mélange équilibré 1:1 d'*I. galbana* et de

*C. calcitrans* distribué *ad libitum*, cette nourriture standardisée ne semble donc pas présenter les mêmes qualités nutritives que la communauté d'algues rencontrées dans le milieu naturel, et ceci indiquerait que la variabilité et la diversité de la nourriture sont plus importantes pour la condition physiologique des bivalves que la quantité de nourriture disponible.

Ici aussi, les résultats obtenus au niveau cellulaire semblent suivre les observations sur mitochondries isolées. En effet, l'activité oxydante et la production d'anions superoxydes sont significativement plus basses dans les mitochondries d'hémocytes d'huîtres nourries en éclosion avec un régime « équilibré » (mélange *T-Iso* + *C. gracilis* en proportions 1:1) comparé aux huîtres élevées pendant un mois dans leur milieu naturel. La composition en AG membranaires des branchies d'huîtres nourries avec un régime artificiel équilibré est pourtant assez comparable à celle des huîtres nourries dans leur milieu naturel, mais présentent des proportions différentes d'AG saturés et mono-insaturés. Ces AG pourraient jouer un rôle dans la modulation des activités mitochondriales. Cependant, d'autres facteurs peuvent également expliquer les différences observées aux niveaux cellulaire et subcellulaire entre le conditionnement en éclosion et le conditionnement en milieu naturel.

La qualité nutritive des algues utilisées en éclosion, et notamment leur contenu en vitamines et en minéraux, est une des hypothèses pouvant expliquer les différences observées au niveau mitochondrial entre des huîtres nourries avec un régime équilibré artificiel et des huîtres élevées dans leur milieu naturel. Toutefois, d'autres facteurs environnementaux contrôlés et/ou non présents en condition d'éclosion tels que les cycles d'émergence/immersion pourraient également jouer un rôle important sur les différences d'activités mitochondriales observées. Les huîtres placées dans leur milieu naturel ont en effet subi le cycle des marées, se trouvant alternativement en émergence et en immersion. En revanche, le système de conditionnement utilisé en éclosion ne permettait pas de recréer ces cycles de marées, et les huîtres nourries en éclosion étaient donc en immersion permanente. La quantité d'oxygène dissous disponible pouvant être très variable pour les huîtres entre les périodes d'émergence et d'immersion, nous nous sommes demandés s'il pouvait exister des modifications d'activité mitochondriale lorsque les huîtres étaient exposées à l'air libre, en comparaison de celles se trouvant en immersion.

Les analyses d'activité mitochondriale d'huîtres collectées en émergence ou en immersion à l'échelle d'un cycle de marée n'ont montré aucune différence de consommation d'oxygène lors du stade 3 ou du stade 4. De même, l'activité de la CCO et la consommation

en oxygène liée aux flux d'électrons maximums à travers les complexes I-IV, II-IV et IV est similaire entre les deux conditions. Le maintien des propriétés et des capacités mitochondriales en émergence suggère qu'il n'y a pas de réponse moléculaire après 4 h d'exposition à l'air, lors d'une possible déficience en oxygène pour l'huître. De façon intéressante, l'inverse est observé seulement après 3 h d'hypoxie, lorsque des huîtres sont immergées dans de l'eau de mer à 20% d'oxygène. Cela induit alors de rapides modifications des propriétés fonctionnelles mitochondriales chez *C. gigas* (Sussarellu 2011, voir publication en annexe). L'hypoxie et l'exposition à l'air sont donc deux phénomènes qui induiraient des réponses différentes au sein des mitochondries chez *C. gigas*. Le maintien des capacités mitochondriales pourrait venir de l'activité « air gaping » de *C. gigas* en émergence (Rafrafi and Uglow 2009). Ce comportement est susceptible de maintenir la pression partielle en oxygène ( $pO_2$ ) de l'eau de mer dans la cavité palléale du manteau (Rafrafi and Uglow 2009), et pourrait ainsi être suffisant pour éviter une diminution des capacités mitochondriales chez les huîtres pendant les périodes d'émergence ayant lieu lors des cycles de marées.

Malgré cette régulation de l'activité mitochondriale, l'exposition à l'air est toutefois liée à une diminution de 30% de la production d'ATP, confirmant plusieurs études ayant démontré une baisse de la concentration en ATP chez des bivalves exposés à l'air (Wijsman 1976 ; Widdows et al. 1979 ; Nicchitta and Ellington 1983 ; Moal et al. 1989 ; Sukhotin and Pörtner 1999). L'utilisation d'inhibiteur a montré que la moitié seulement de cette production correspondrait à la production d'ATP due à la phosphorylation oxydative, l'autre partie correspondant à l'activité d'autres mécanismes produisant de l'ATP, tels que l'AK. L'hypothèse de l'activité AK serait cohérente avec la diminution de 34% de la production d'ATP par les mécanismes non dépendants de la phosphorylation oxydative observée en émergence. En effet, l'AK semble être sensible à la disponibilité en oxygène puisque l'activité AK dans les branchies de *C. virginica* diminue de 32% quand les huîtres sont exposées à des conditions d'anoxie (placées sous atmosphère d'azote  $N_2$ ) (Greenway and Storey 1999).

Les ratios ATP/O, qui sont les ratios du taux de synthèse d'ATP par la  $F_0F_1$ ATP-synthase sur le taux de consommation d'oxygène liée à la phosphorylation oxydative (stade 3), ont été calculés. Pour les huîtres collectées en immersion, ce ratio est de  $1.21 \pm 0.13$  (données non montrées). Cette valeur est à prendre avec précautions dans la mesure où les valeurs de production d'ATP ont été déterminées à 25°C alors que les valeurs de consommation d'oxygène ont été déterminées à 10°C. Néanmoins, cette valeur est proche des résultats de Ouhabi et al. (1998) qui trouvent un ratio ATP/O de  $1.42 \pm 0.20$  dans des

fibroblastes humains perméabilisés lorsque le succinate est utilisé comme substrat. En revanche, chez les huîtres collectées en émergence, cette valeur est presque deux fois plus faible à cause de la plus faible production d'ATP dépendante de la phosphorylation oxydative. Un mécanisme possible de modulation de l'activité de la  $F_0F_1$ ATP-synthase et/ou de transport d'ADP transport est la modification de la composition des mitochondries en phospholipides. La  $F_0F_1$ ATP-synthase est spécifiquement liée à la PE et au CL (Eble et al. 1990 ; Haines and Dencher 2002 ; Zhou et al. 2011). Cette étroite association semble influencer les propriétés structurales et catalytiques de la  $F_0F_1$ ATP-synthase, ce qui souligne le rôle des phospholipides dans le maintien d'une conformation active de ce complexe enzymatique (Laird et al. 1986 ; Haines and Dencher 2002 ; Zhou et al. 2011). Le CL peut également jouer un rôle important dans le micro-environnement de l'ADP/ATP translocase (ANT) (Schlame et al. 2000) et l'activité de l'ANT a été signalée comme étant fortement corrélée au contenu membranaire de lipides formant des phases hexagonales (PE/PC) (Krämer and Klingenberg 1980 ; Mak et al. 1983). Toutefois, aucune différence n'a été observée dans les proportions de phospholipides des mitochondries de branchies d'huîtres collectées en émergence ou en immersion. Néanmoins, quand la masse de phospholipides totaux est exprimée par unité de CS, les huîtres collectées en émergence présentent un contenu en phospholipides mitochondriaux 12% plus faible que celui des huîtres collectées en immersion. Ce résultat indiquerait un réarrangement des membranes mitochondriales entre l'émergence et l'immersion, en particulier au niveau des crêtes mitochondriales (Mannella et al. 2001).

Ces résultats suggèrent donc une initiation d'une dépression du taux métabolique survenant en émergence sur de courtes échelles de temps. Néanmoins, le maintien des propriétés et des capacités mitochondriales entre les huîtres collectées en émergence et celles collectées en immersion indiquent que les effets de cycles tidaux ne peuvent pas expliquer les différences observées au niveau des mitochondries entre les huîtres nourries en éclosion et celles laissées dans leur milieu naturel.



## Conclusions et perspectives

Cette thèse s'est intéressée aux relations pouvant exister entre la structure des membranes de mitochondries et l'activité des enzymes membranaires mitochondriales. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la stabilité des activités enzymatiques au sein des membranes de mitochondries malgré les importantes différences de composition en AG de ces membranes (chapitre I).

Tout d'abord, les enzymes membranaires pourraient posséder un seuil de tolérance aux variations de composition lipidique des membranes. En deçà de ce seuil, les modifications structurales de la membrane seraient sans effet sur le fonctionnement des enzymes. Il se pourrait donc que, dans notre première expérimentation, les modifications de composition en AG, bien qu'importantes, ne soit pas suffisamment grandes pour dépasser ce seuil et induire des changements d'activités enzymatiques.

Une alternative à cette hypothèse repose sur la théorie du pacemaker membranaire de Hulbert et Else (1999), laquelle soutient que l'énergie cinétique des protéines et la vitesse des processus membranaires dépend de l'insaturation globale des AG. Dans nos expérimentations, malgré des changements importants de proportions au niveau des AG membranaires individuels, les proportions d'AG saturés, mono-insaturés et poly-insaturés totaux ne changent que très peu entre les conditions. Le maintien de ces proportions pourrait être suffisant pour garder les protéines dans un environnement propice à leur fonctionnement optimal.

Contrairement à la précédente explication qui propose une régulation globale, à l'échelle de l'ensemble de la membrane, la dernière hypothèse fait mention d'une régulation spécifique. En effet, les effets de modifications structurales membranaires comme celles observées dans le chapitre I pourraient être atténués, ou même contrebalancés, par des lipides particuliers en interaction directe avec les enzymes membranaires. Cette régulation pourrait s'effectuer par des AG minoritaires, par certains phospholipides, ou par des espèces moléculaires de phospholipides spécifiques qui seraient spécifiquement conservées. La prochaine étape serait donc de pouvoir caractériser ces espèces moléculaires qui, pour le moment, ne peuvent pas être caractérisées par les méthodes analytiques dont nous disposons.

Afin de travailler sur mitochondries isolées, celles-ci ont été extraites des tissus grâce à un Potter motorisé, qui représentait la technique la plus efficace et la moins violente pour récupérer des mitochondries en bon état. L'isolement de ces organites s'est effectuée grâce à des centrifugations différentielles, une technique simple qui garde les mitochondries dans un état fonctionnel et bien couplées, comme le montre les résultats de consommation d'oxygène obtenus en cellules polarographiques. D'un point de vue méthodologique, il faudrait néanmoins développer la technique d'isolement des mitochondries afin d'obtenir, au final, des préparations mitochondriales hautement purifiées. En effet, l'observation des préparations mitochondriales en microscopie à fluorescence a révélé que les mitochondries ainsi isolées – mises en évidence par le Nonyl Acridine Orange (NAO), un colorant spécifique des mitochondries – ne constituaient pas un mélange homogène. L'identification d'une population homogène de mitochondries en cytométrie en flux et leur analyse subséquente par cette technique n'a donc pas été possible. Afin d'augmenter la pureté des préparations, l'isolement des mitochondries sur gradient de Percoll a été initiée. Une méthode efficace consisterait en la création d'anticorps dirigés contre des épitopes de mitochondries de *C. gigas* afin de développer une technique semblable à celle de Hornig-Do et al. (2009), où des anticorps greffés à des billes magnétiques permettent de récupérer une fraction relativement pure en mitochondries à partir d'un homogénat cellulaire. Ceci permettrait de pouvoir détecter les mitochondries en cytométrie en flux et ainsi de pouvoir coupler des analyses sur mitochondries fraîchement isolées en cellules polarographiques (mesure de la consommation d'oxygène), en spectrométrie (mesure de la production d'ATP) et en cytométrie en flux (mesure du potentiel membranaire mitochondrial, de la production d'anions superoxydes).

Les mesures d'activité mitochondriale ont révélé une grande régulation au sein de ces organites. Malgré des modifications de composition en acides gras membranaires induits par des régimes très différents dans leur composition en acides gras, et notamment en acides gras essentiels, la consommation d'oxygène, l'activité de la CCO, les proportions de classes de phospholipides et la composition en cytochromes n'ont pas été affectés (chapitre I). En revanche, tous ces paramètres présentent d'importantes différences entre des huîtres nourries en éclosérie avec un régime « équilibré » et celles nourries dans leur milieu naturel, malgré une composition en acides gras membranaires assez similaire (chapitre II). Les différences d'activité mitochondriale observées entre les huîtres élevées en éclosérie et celles laissées dans leur milieu naturel sont intrigantes et méritent des recherches supplémentaires. Il serait tout d'abord intéressant de comparer la valeur nutritive des algues utilisées en éclosérie avec

celle de la nourriture habituellement consommée par les huîtres dans leur milieu naturel, en particulier au niveau des vitamines et des oligo-éléments. Une expérimentation pourrait également être réalisée en croisant deux facteurs, à savoir la nature du régime alimentaire et l'exposition ou non aux cycles tidaux. Ceci permettrait d'évaluer l'influence des biais « nourriture », en termes qualitatif et quantitatif, et de l'alternance émergence/immersion sur les capacités mitochondriales

La grande régulation des capacités mitochondriales des huîtres face aux modifications des paramètres environnementaux s'observe également dans les cas d'expositions à l'air liés aux cycles tidaux (chapitre III). La consommation d'oxygène et l'activité de la CCO sont similaires en émergence et en immersion malgré de possibles différences de disponibilité en oxygène dissous entre ces deux conditions. Toutefois, une diminution de la production d'ATP en émergence semble indiquer une initiation d'une dépression du taux métabolique. Il faudrait étendre les temps d'émergence et d'immersion afin de voir si des adaptations structurales et/ou fonctionnelles peuvent être observées entre ces deux conditions, et si la production d'ATP s'en retrouve d'autant plus affectée. Notamment, contrairement aux expérimentations étudiant les effets d'une très longue exposition à l'air, il serait intéressant de regarder si une immersion permanente a un effet sur les mitochondries de *C. gigas*, une espèce normalement habituée au cycle des marées, contrairement aux huîtres des genres *Pycnodonta* et *Ostrea* qui rassemblent des espèces ne vivant que dans des zones toujours immergées. Inversement, l'effet de l'émergence pourrait être étudié chez ces espèces. L'effet d'une immersion permanente a voulu être testé au cours de cette thèse, lors de l'expérimentation décrite dans le chapitre III. Une partie des huîtres avait en effet été placée plus bas sur l'estran, dans une zone ne découvrant jamais à marée basse (et où aucune huître n'a été détectée). Un mois plus tard, lors de la collecte pour les analyses, à peu près toutes les huîtres avaient été ouvertes et mangées par des prédateurs (étoiles de mer principalement à en juger par la présence de ces animaux à côté des coquilles vides). L'étude de l'effet d'une immersion permanente doit donc être réalisée expérimentalement en laboratoire, ou sur le terrain en protégeant les huîtres des prédateurs. La présence de prédateurs peut modifier certains aspects de la physiologie des bivalves tels que la croissance, la reproduction ou encore les réponses de fuite (Guerra et al. 2012), et les réponses développées par les bivalves contre les prédateurs peuvent constituer un biais dans l'expérimentation. Il serait également intéressant d'étudier l'effet des saisons, et en particulier si des différences de capacités mitochondriales entre l'émergence et l'immersion peuvent être



détectées en été, lorsque l'activité mitochondriale peut être affectée par la gamétogenèse et peut être plus sensible aux variations de disponibilité en oxygène lors des cycles tidaux.

Des modifications de capacités mitochondriales ne se traduisent pas toujours par des changements dans la physiologie globale de l'individu. Les résultats du chapitre II montrent un gain de poids et un développement gonadique similaire entre les huîtres nourries en éclosérie et celles élevées dans leur milieu naturel, malgré des différences importantes d'activité mitochondriale. Cela suggère que des paramètres environnementaux peuvent être sans effet sur l'apparence générale des organismes et sur leurs performances physiologiques, mais peuvent affecter d'autres mécanismes cellulaires et subcellulaires. Dans notre étude, nous n'avons mesuré qu'un nombre limité de paramètres mitochondriaux, mais d'autres mesures permettraient une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation et/ou les modifications d'activités enzymatiques. Une de ces mesures pourrait être la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Dans la cellule, la membrane interne des mitochondries est le site principal de la production des ERO (Munro and Blier 2012). Il a été rapporté que les ERO peuvent mener à une perte du contenu en CL, associée à une réduction de l'activité du complexe III et de la phosphorylation oxydative (Petrosillo et al. 2003). En rapport avec les résultats du chapitre II, il serait donc judicieux de mesurer cette production mitochondriale des ERO pour voir si un éventuel stress oxydant pourrait être impliqué dans la diminution du contenu en CL et de la consommation en oxygène observées dans les mitochondries d'huîtres nourries en éclosérie.

Les analyses des paramètres hématocytaires (chapitres I et II) ont également montré une grande régulation de l'activité de ces cellules malgré des régimes alimentaires très différents dans leur composition en acides gras (chapitre I). Les modifications les plus importantes ont été observées lors de la comparaison entre des huîtres nourries en éclosérie et des huîtres élevées dans leur milieu naturel (chapitre II), indiquant que ces différences de conditionnement affectent les cellules immunitaires. Le couplage des analyses aux niveaux cellulaire et subcellulaire peut apporter beaucoup d'information sur les relations entre les changements se passant dans les organites et les effets se manifestant à l'échelle de la cellule. Lors des expérimentations réalisées au cours de cette thèse (chapitres I et II), la quantité d'hémocytes prélevés était trop faible pour pouvoir analyser la composition lipidique des membranes de ces cellules. La composition lipidique des membranes de branchies en représente néanmoins un proxy, qui ne peut toutefois pas être utilisé pour faire des

corrélations entre les modifications structurales observées dans un type cellulaire (les cellules branchiales) et les modifications d'activité d'un autre type cellulaire (les hémocytes). Il serait intéressant d'analyser directement la composition en lipides membranaires des hémocytes pour pouvoir coupler les résultats avec les paramètres hémocytaires et mitochondriaux déterminés en cytométrie en flux. Alternativement, ce genre d'étude pourrait également s'effectuer à partir d'autres types cellulaires, tels que les gamètes.

La mesure de la production mitochondriale d'ATP mériterait de continuer à être développée plus précisément. Le suivi cinétique en spectrophotométrie semble être une meilleure technique qu'une détermination en point final. Malgré tout, le choix de(s) l'inhibiteur(s) à utiliser pour différencier la production d'ATP dépendante de la phosphorylation oxydative de celle provenant d'autres mécanismes produisant de l'ATP reste à être déterminé. Il faudrait à ce sujet tester plusieurs inhibiteurs afin de connaître l'origine de la production d'ATP non dépendante de la  $F_0F_1$ ATP-synthase (chapitre III). En particulier, l'Ap<sub>5</sub>A est une molécule permettant d'inhiber l'activité de l'AK dans des mitochondries intactes sans que la phosphorylation oxydative ne soit affectée, ce qui en fait un outil intéressant pour distinguer la production d'ATP dépendant de la phosphorylation oxydative de celle provenant d'autres sources (Lüstorf and Schlimme 1976). L'ouabaïne, un inhibiteur d'ATPase, pourrait également être testé pour savoir s'il y a une hydrolyse d'ATP extra-mitochondriale en parallèle de sa production.

Une autre idée d'étude pour la suite serait de comparer les résultats d'expériences similaires à celles effectuées au cours de cette thèse obtenus avec d'autres bivalves. Notamment, la palourde *Ruditapes philippinarum* constituerait un bon modèle d'étude. Celle-ci appartient à l'ordre des eulamellibranches alors que *C. gigas* appartient à l'ordre des filibranches. Le fait que ces animaux soient relativement éloignés phylogénétiquement pourrait en effet induire des différences de réponses aux changements de ressources trophiques au niveau structural et fonctionnel des membranes mitochondriales. Le mode de vie de ces deux bivalves diffère également, la palourde étant une espèce endogée, qui s'enfonce dans le sédiment, alors que l'huître est une espèce épigée, restant à la surface du sol. Il serait donc intéressant de voir si ces différences entre ces deux espèces peuvent être à l'origine de réponses différentes à des conditionnements similaires.



# **BIBLIOGRAPHIE**



- Abbott SK, Else PL, Atkins TA, Hulbert AJ (2012) Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *BBA-Biomembranes* 1818:1309–1317
- Ackman RG, Hooper SN (1973) Non-methylene-interrupted fatty acids in lipids of shallow-water marine invertebrates: A comparison of two molluscs (*Littorina littorea* and *Lunatia triseriata*) with the sand shrimp (*Crangon septemspinosus*). *Comp Biochem Phys B* 46:153–165
- Acosta AL (2010) Les phénoloxydases chez l’huître creuse *Crassostrea gigas*: biomarqueurs potentiels de stress environnemental. Thèse de doctorat, 410p. Université de La Rochelle
- Aladaileh S, Nair SV, Raftos DA (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
- Albentosa M, Perez-Camacho A, Labarta U, Beiras R, Fernandez-Reiriz M (1993) Nutritional value of algal diets to clam spat *Venerupis pullastra*. *Mar Ecol-Prog Ser* 97:261–269
- Allam B, Paillard C (1998) Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis Aquat Organ* 33:123–128
- Allen SM, Burnett LE (2008) The effects of intertidal air exposure on the respiratory physiology and the killing activity of hemocytes in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Exp Mar Biol Ecol* 357:165–171
- Almeida EA, Bainy ACD, Dafre AL, Gomes OF, Medeiros MHG, Di Mascio P (2005) Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J Exp Mar Biol Ecol* 318:21–30
- Ames BN, Atamna H, Killilea DW (2005) Mineral and vitamin deficiencies can accelerate the mitochondrial decay of aging. *Mol Aspects of Med* 26:363–378
- Andreyev AY, Bondareva TO, Dedukhova VI, Mokhova EN, Skulachev VP, Tsofina LM, Volkov NI, Vygodina TV (1989) The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. *Eur J Biochem* 182:585–592
- Armstrong C, Thomas RH, Price ER, Guglielmo CG, Staples JF (2011) Remodeling mitochondrial membranes during arousal from hibernation. *Physiol Biochem Zool* 84:438–449
- Astorg PO, Chevalier J (1991) Phospholipid fatty acid composition and respiratory properties of heart and liver mitochondria from rats fed with or deprived of linolenic acid. *Nutr Res* 11:71–77
- Athenstaedt K, Daum G (2006) The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell Mol Life Sci* 63:1355–1369
- Auby I, Maurer D (2004) Etude de la reproduction de l’huître creuse dans le Bassin d’Arcachon. Rapport final, 203p

- Auffret M, Oubella R (1995) Cytology and cytometric analysis of bivalve mollusc haemocytes. In: Stolen JS et al. (ed) *Techniques in Fish Immunology, Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates*, SOS Publications. Fair Haven, United Kingdom, pp 55–64
- 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
- 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
- Ballantyne JS (2004) Mitochondria: aerobic and anaerobic design--lessons from molluscs and fishes. *Comp Biochem Phys B* 139:461–467
- Ballantyne JS, Storey KB (1983) Mitochondria from the ventricle of the marine clam, *Mercenaria mercenaria*: Substrate preferences and effects of pH and salt concentration on proline oxidation. *Comp Biochem Phys B* 76:133–138
- Barnathan G (2009) Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie* 91:671–678
- Barzanti V, Battino M, Baracca A, Cavazzoni M, Cocchi M, Noble R, Maranesi M, Turchetto E, Lenaz G (1994) The effect of dietary lipid changes on the fatty acid composition and function of liver, heart and brain mitochondria in the rat at different ages. *Brit J Nutr* 71:193–202
- Becker T, Gebert M, Pfanner N, Van der Laan M (2009) Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Curr Opin in Cell Biol* 21:484–493
- Berger A, German JB, Gershwin ME (1993) Biochemistry of cardiolipin: sensitivity to dietary fatty acids. In: Kinsella JE (ed) *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press. San Diego, California, pp 259–338
- Blier PU, Lemieux H (2001) The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *J Comp Physiol B* 171:247–253
- Böttinger L, Horvath SE, Kleinschroth T, Hunte C, Daum G, Pfanner N, Becker T (2012) Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. *J Mol Biol* 423:677–686
- Bouchard P, Guderley H (2003) Time course of the response of mitochondria from oxidative muscle during thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Biol* 206:3455–3465
- Boutilier RG, St-Pierre J (2002) Adaptive plasticity of skeletal muscle energetics in hibernating frogs: mitochondrial proton leak during metabolic depression. *J Exp Biol* 205:2287–2296
- Brand MD (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol* 35:811–820

- Brand MD, Brindle KM, Buckingham JA, Harper JA, Rolfe DF, Stuart JA (1999) The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int J Obesity* 23 Suppl 6:S4–11
- Bremer K, Moyes CD (2011) Origins of variation in muscle cytochrome c oxidase activity within and between fish species. *J Exp Biol* 214:1888–1895
- Brookes PS, Buckingham JA, Tenreiro AM, Hulbert AJ, Brand MD (1998) The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comp Biochem Phys B* 119:325–334
- Brown MF, Stuart JA (2007) Correlation of mitochondrial superoxide dismutase and DNA polymerase  $\beta$  in mammalian dermal fibroblasts with species maximal lifespan. *Mech Ageing Dev* 128:696–705
- Brown MR (2002) Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Gaxiola-Cortés MG, Simoes N (ed) *Avances En Nutrición Acuícola VI. Memorias Del VI Simposium Internacional De Nutrición Acuícola*, Cancún, Quintana Roo, México
- Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan G. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151:315–331
- Burcham JM, Paynter KT, Bishop S (1983) Coupled mitochondria from oyster gill tissue. *Mar Biol Lett* 349–356
- Calabrese A, Davis HC (1970) Tolerances and requirements of embryos and larvae of bivalve molluscs. *Helgoland Mar Res* 20:553–564
- Carbonell T, Ródenas J, Miret S, Mitjavila MT (1997) Fish oil and oxidative stress by inflammatory leukocytes. *Free Radical Res* 27:591–597
- Cayci T, Kurt B, Akgul EO, Kurt YG (2012) Quantification of mitochondrial abundance. *Fertil Steril* 97:doi:10.1016/j.fertnstert.2012.02.041
- Chapelle S, Meister R, Brichon G, Zwingelstein G (1977) Influence of temperature on the phospholipid metabolism of various tissues from the crab *Carcinus maenas*. *Comp Biochem Phys B* 58:413–417
- Chelomin VP, Zhukova NV (1981) Lipid composition and some aspects of aminophospholipid organization in erythrocyte membrane of the marine bivalve mollusc *Scapharca broughtoni* (Schrenck). *Comp Biochem Phys B* 69:599–604
- Cheng TC (1981) Bivalves. In: Ratcliffe NA and Rowley AF (ed) *Invertebrate Blood Cells*, Academic Press. pp 231–300
- Cheng TC (1996) Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (ed) *The Eastern Oyster, Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant Book pp 299–333
- Chu FL (1988) Humoral defense factors in marine bivalves. *Am Fish Soc Spec Publ* 178–188



- Coleman N (1973) The oxygen consumption of *Mytilus edulis* in air. *Comp Biochem Phys A* 45:393–402
- Dahlhoff EA, Somero GN (1993) Effects of temperature on mitochondria from abalone (genus *Haliotis*): adaptive plasticity and its limits. *J Exp Biol* 185:151–168
- Daum G (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 822:1–42
- Delaporte M (2005) Modulation des paramètres hémostatiques par la nutrition de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. Thèse de doctorat, 365p. Université de Rennes 1
- Delaporte M, Chu FL, Langdon C, Moal J, Lambert C, Samain JF, Soudant P (2007) Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-*Iso* supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. *J Exp Mar Biol Ecol* 343:261–275
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Giudicelli E, Lambert C, Séguineau C, Samain JF (2006) Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41:567–576
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Kraffe E, Marty Y, Samain JF (2005) Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comp Biochem Phys A* 140:460–470
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Lambert C, Quéré C, Miner P, Choquet G, Paillard C, Samain JF (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
- Delaunay F, Marty Y, Moal J, Samain JF (1993) The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J Exp Mar Biol Ecol* 173:163–179
- Divakaran P, Venkataraman A (1977) Effect of dietary fats on oxidative phosphorylation and fatty acid profile of rat liver mitochondria. *J Nutr* 107:1621–1631
- Donaghy L, Kraffe E, Le Goïc N, Lambert C, Volety AK, Soudant P (2012) Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. *PLoS One* 7:doi:10.1371/journal.pone.0046594
- 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
- Drew B, Leeuwenburgh C (2003) Method for measuring ATP production in isolated mitochondria: ATP production in brain and liver mitochondria of Fischer-344 rats with age and caloric restriction. *Am J Physiol-Reg I* 285:1259–1267
- Dunstan GA, Volkman JK, Barrett SM (1993) The effect of lyophilization on the solvent extraction of lipid classes, fatty acids and sterols from the oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 28:937–944

- Eble KS, Coleman WB, Hantgan RR, Cunningham CC (1990) Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 265:19434–19440
- Else PL, Hulbert AJ (2003) Membranes as metabolic pacemakers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:559–564
- 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
- Epifanio CE (1979) Growth in bivalve molluscs: Nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture* 18:1–12
- Estabrook RW (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. In: Estabrook RW and Pullman ME (ed) *Oxidation and Phosphorylation*, Academic Press. New York, pp 41–47
- Fokina NN, Nefedova ZA, Nemova NN, Khalaman VV (2007) Modulatory role of lipids and their fatty acids in adaptation of the White Sea mussels *Mytilus edulis* L. to environmental salinity changes. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 43:317–323
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
- Folguera G, Bastías DA, Caers J, Rojas JM, Piulachs M-D, Bellés X, Bozinovic F (2011) An experimental test of the role of environmental temperature variability on ectotherm molecular, physiological and life-history traits: implications for global warming. *Comp Biochem Phys A* 159:242–246
- Frick NT, Bystriansky JS, Ip YK, Chew SF, Ballantyne JS (2008) Lipid, ketone body and oxidative metabolism in the African lungfish, *Protopterus dolloi* following 60 days of fasting and aestivation. *Comp Biochem Phys A* 151:93–101
- Frick NT, Bystriansky JS, Ip YK, Chew SF, Ballantyne JS (2010) Cytochrome c oxidase is regulated by modulations in protein expression and mitochondrial membrane phospholipid composition in estivating African lungfish. *Am J Physiol-Reg I* 298:608–616
- Fyfe PK, McAuley KE, Roszak AW, Isaacs NW, Cogdell RJ, Jones MR (2001) Probing the interface between membrane proteins and membrane lipids by X-ray crystallography. *Trends Biochem Sci* 26:106–112
- Galtsoff P (1964) The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin
- Gerson AR, Brown JCL, Thomas R, Bernards MA, Staples JF (2008) Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondrial metabolism in mammalian hibernation. *J Exp Biol* 211:2689–2699
- Gillis T, Ballantyne J (1999a) Mitochondrial membrane composition of two arctic marine bivalve mollusks, *Serripes groenlandicus* and *Mya truncata*. *Lipids* 34:53–57

- Gillis TE, Ballantyne JS (1999b) Influences of subzero thermal acclimation on mitochondrial membrane composition of temperate zone marine bivalve mollusks. *Lipids* 34:59–66
- Giorgione J, Epanand RM, Buda C, Farkas T (1995) Role of phospholipids containing docosaheptaenoyl chains in modulating the activity of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9767–9770
- Glémet HC, Ballantyne JS (1995) Influences of environmental salinity on the structure and function of gill mitochondrial membranes of an osmoconforming invertebrate, *Crassostrea virginica*. *Mar Biol* 121:673–683
- Goldsby RA, Heytler PG (1963) Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones. II. Effects of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on mitochondrial respiration. *Biochemistry* 2:1142–1147
- González-Araya R, Quéau I, Quéré C, Moal J, Robert R (2011) A physiological and biochemical approach to selecting the ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part A). *Aquac Res* 42:710–726
- Goormaghtigh E, Brasseur R, Ruyschaert JM (1982) Adriamycin inactivates cytochrome *c* oxidase by exclusion of the enzyme from its cardiolipin essential environment. *Biochem. Biochem Biophys Res Co* 104:314–320
- Le Grand F (2010) Etude des relations entre compositions membranaires lipidiques et fonctions cellulaires: Cas des hémocytes de bivalves atteints de néoplasie disséminée. Thèse de doctorat, 330p. Université de Bretagne Occidentale - Brest
- Le Grand F, Kraffe E, Marty Y, Donaghy L, Soudant P (2011) Membrane phospholipid composition of hemocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Comp Biochem Phys A* 159:383–391
- Greenway SC, Storey KB (1999) The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *J Exp Mar Biol Ecol* 242:259–272
- Grieshaber M, Hardewig I, Kreutzer U, Pörtner HO (1994) Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev Physiol Bioch P* 125:43–147
- Grim JM, Miles DRB, Crockett EL (2010) Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *J Exp Biol* 213:445–452
- Grizel H, Heral M (1991) Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J Conseil* 47:399–403
- Groen AK, Wanders RJ, Westerhoff HV, Van der Meer R, Tager JM (1982) Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 257:2754–2757
- Guderley H (2004) Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biol Rev* 79:409–427

- Guderley H, Brokordt K, Pérez Cortés HM, Marty Y, Kraffe E (2011) Diet and performance in the scallop, *Argopecten purpuratus*: force production during escape responses and mitochondrial oxidative capacities. *Aquat Living Resour* 24:261–271
- Guderley H, Kraffe E, Bureau W, Bureau DP (2008) Dietary fatty acid composition changes mitochondrial phospholipids and oxidative capacities in rainbow trout red muscle. *J Comp Physiol B* 178:385–399
- Guderley H, Pierre JS, Couture P, Hulbert AJ (1997) Plasticity of the properties of mitochondria from rainbow trout red muscle with seasonal acclimatization. *Fish Physiol Biochem* 16:531–541
- Guderley H, Turner N, Else PL, Hulbert AJ (2005) Why are some mitochondria more powerful than others: insights from comparisons of muscle mitochondria from three terrestrial vertebrates. *Comp Biochem Phys B* 142:172–180
- Guerra C, Maeda-Martínez AN, Hernandez-Llamas A, Sicard-González MT, Koenigstein S, Abele D, Philipp EER (2012) The influence of temperature and presence of predators on growth, survival and energy allocation for reproduction in the Catarina scallop *Argopecten ventricosus*. *Aquac Res* 43:756–766
- Haberkorn H (2009) Impact du dinoflagellé toxique, *Alexandrium minutum*, sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas*: approche intégrative. Thèse de doctorat, 194p. Université de Bretagne Occidentale - Brest
- Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Guéguen M, Moal J, Palacios E, Lassus P, Soudant P (2010) Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 97:96–108
- Haines TH, Dencher NA (2002) Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 528:35–39
- Hamza N, Mhetli M, Khemis IB, Cahu C, Kestemont P (2008) Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Aquaculture* 275:274–282
- Haney EF, Nathoo S, Vogel HJ, Prenner EJ (2010) Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: a potential link to mode of action. *Chem Phys Lipids* 163:82–93
- Hatch GM, McClarty G (1998) Cardiolipin remodeling in eukaryotic cells infected with *Chlamydia trachomatis* is linked to elevated mitochondrial metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 243:356–360
- Haugland RP (2002) Handbook of fluorescent probes and research products. Eugene, Oregon
- Hazel JR (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol* 57:19–42
- Hazel JR, Carpenter R (1985) Rapid changes in the phospholipid composition of gill membranes during thermal acclimation of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Comp Physiol B* 155:597–602

- Hazel JR, Landrey SR (1988) Time course of thermal adaptation in plasma membranes of trout kidney. I. Headgroup composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 255:622–627
- Hazel JR, Williams EE (1990) The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res* 29:167–227
- Helm MM, Laing I (1987) Preliminary observations on the nutritional value of “Tahiti *Isochrysis*” to bivalve larvae. *Aquaculture* 62:281–288
- Hine PM (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immun* 9:367–385
- Hinkle PC, Kumar MA, Resetar A, Harris DL (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* 30:3576–3582
- Hirunpanich V, Sethabouppha B, Sato H (2007) Inhibitory effects of saturated and polyunsaturated fatty acids on the cytochrome P450 3A activity in rat liver microsomes. *Biol Pharm Bull* 30:1586–1588
- Hofmann G, Somero G (1995) Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J Exp Biol* 198:1509–1518
- Holmes O, Paturi S, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2012) Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified  $\gamma$ -secretase. *Biochemistry* 51:3565–3575
- Hornig-Do H-T, Günther G, Bust M, Lehnartz P, Bosio A, Wiesner RJ (2009) Isolation of functional pure mitochondria by superparamagnetic microbeads. *Anal Biochem* 389:1–5
- Huang SC, Newell RIE (2002) Seasonal variations in the rates of aquatic and aerial respiration and ammonium excretion of the ribbed mussel, *Geukensia demissa* (Dillwyn). *J Exp Mar Biol Ecol* 270:241–255
- Hulbert AJ (2007) Membrane fatty acids as pacemakers of animal metabolism. *Lipids* 42:811–819
- Hulbert AJ (2008) The links between membrane composition, metabolic rate and lifespan. *Comp Biochem Phys A* 150:196–203
- Hulbert AJ, Else PL (1999) Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J Theor Biol* 199:257–274
- Ivanina AV, Eilers S, Kurochkin IO, Chung JS, Techa S, Piontkivska H, Sokolov EP, Sokolova IM (2010a) Effects of cadmium exposure and intermittent anoxia on nitric oxide metabolism in eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *J Exp Biol* 213:433–444
- Ivanina AV, Kurochkin IO, Leamy L, Sokolova IM (2012) Effects of temperature and cadmium exposure on the mitochondria of oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to hypoxia and subsequent reoxygenation. *J Exp Biol* 215:3142–3154

- Ivanina AV, Sokolov EP, Sokolova IM (2010b) Effects of cadmium on anaerobic energy metabolism and mRNA expression during air exposure and recovery of an intertidal mollusk *Crassostrea virginica*. *Aquat Toxicol* 99:330–342
- Kanazawa A, Teshima S, Tokiwa S, Kayama M, Hirata M (1979) Essential fatty acids in the diet of prawn: II. Effect of docosahexaenoic acid on growth. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 45:1141–1153
- Keller M, Sommer AM, Portner HO, Abele D (2004) Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *J Exp Biol* 207:2529–2538
- Kern B, Ivanina AV, Piontkivska H, Sokolov EP, Sokolova IM (2009) Molecular characterization and expression of a novel homolog of uncoupling protein 5 (UCP5) from the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae). *Comp Biochem Phys D* 4:121–127
- Khairallah RJ, Kim J, O'Shea KM, O'Connell KA, Brown BH, Galvao T, Daneault C, Rosiers CD, Polster BM, Hoppel CL, Stanley WC (2012) Improved mitochondrial function with diet-induced increase in either docosahexaenoic acid or arachidonic acid in membrane phospholipids. *PLoS ONE* 7:doi:10.1371/journal.pone.0034402
- Kilarski WM, Romek M, Kozłowska M, Gorlich A (1996) Short-term thermal acclimation induces adaptive changes in the inner mitochondrial membranes of fish skeletal muscle. *J Fish Biol* 49:1280–1290
- Klingensmith J (1982) Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). *Lipids* 17:976–981
- Kostetsky E, Velansky P (2009) Phospholipids of sea worms, mollusks, and arthropods. *Russ J Mar Biol* 35:187–199
- Kraffe E (2003) Etude de la spécificité du cardiolipide et des plasmalogènes chez les mollusques bivalves: Apport des méthodes chromatographiques. Thèse de doctorat, 299p. Université de Bretagne Occidentale - Brest
- Kraffe E, Marty Y, Guderley H (2007) Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *J Exp Biol* 210:149–165
- Kraffe E, Soudant P, Marty Y (2004) Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids* 39:59–66
- Kraffe E, Tremblay R, Belvin S, LeCoz JR, 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
- Krämer R, Klingenberg M (1980) Enhancement of reconstituted ADP,ATP exchange activity by phosphatidylethanolamine and by anionic phospholipids. *FEBS Lett* 119:257–260
- De Kruijff B (1997) Lipids beyond the bilayer. *Nature* 386:129–130

- Kurochkin IO, Ivanina AV, Eilers S, Downs CA, May LA, Sokolova IM (2009) Cadmium affects metabolic responses to prolonged anoxia and reoxygenation in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Am J Physiol-Reg I* 297:1262–1272
- Laird DM, Parce JW, Montgomery RI, Cunningham CC (1986) Effect of phospholipids on the catalytic subunits of the mitochondrial  $F_0F_1$ -ATPase. *J Biol Chem* 261:14851–14856
- 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
- Lammi-Keefe CJ, Hammerschmidt DE, Weisdorf DJ, Jacob HS (1982) Influence of dietary omega-3 fatty acids on granulocyte function. *Inflammation* 6:227–234
- Lands WE (1992) Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. *FASEB J* 6:2530–2536
- Lange C, Nett JH, Trumpower BL, Hunte C (2001) Specific roles of protein–phospholipid interactions in the yeast cytochrome *bc1* complex structure. *EMBO J* 20:6591–6600
- Lango-Reynoso F, Devauchelle N, Le Pennec M, Hatt PJ (1999) Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the “Rade de Brest”, France. *Invertebr Reprod Dev* 36:141–144
- Larqué E, García-Ruiz P-A, Perez-Llamas F, Zamora S, Gil A (2003) Dietary trans fatty acids alter the compositions of microsomes and mitochondria and the activities of microsome  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase and glucose-6-phosphatase in livers of pregnant rats. *J Nutr* 133:2526–2531
- Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM (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
- Leary SC, Lyons CN, Rosenberger AG, Ballantyne JS, Stillman J, Moyes CD (2003) Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. *Am J Physiol-Reg I* 285:817–826
- Lejart M (2009) Etude du processus invasif de *Crassostrea gigas* en Bretagne: Etat des lieux, dynamique et conséquences écologiques. Thèse de doctorat, 255p. Université de Bretagne Occidentale - Brest
- Lemieux H, Blier PU, Tardif JC (2008) Does membrane fatty acid composition modulate mitochondrial functions and their thermal sensitivities? *Comp Biochem Phys A* 149:20–29
- Lent CM (1968) Air-gaping by the ribbed mussel, *Modiolus demissus* (Dillwyn): effects and adaptive significance. *Biol Bull* 134:60–73
- Leonard F, Haag M, Kruger MC (2001) Modulation of intestinal vitamin D receptor availability and calcium ATPase activity by essential fatty acids. *Prostag Leukotr Ess* 64:147–150
- Letendre J, Chouquet B, Manduzio H, Marin M, Bultelle F, Leboulenger F, Durand F (2009) Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defences in *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 67:69–74

- Letendre J, Chouquet B, Rocher B, Manduzio H, Leboulenger F, Durand F (2008) Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Phys C* 148:211–216
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80:780–787
- Logue JA, De Vries AL, Fodor E, Cossins AR (2000) Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *J Exp Biol* 203:2105–2115
- López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, Cascajo MV, Allard J, Ingram DK, Navas P, de Cabo R (2006) Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *PNAS* 103:1768–1773
- Lüstorff J, Schlimme E (1976) Does an inhibitor of mitochondrial adenylate kinase also affect oxidative phosphorylation? *Experientia* 32:298–299
- Mak IT, Shrago E, Elson CE (1983) Modification of liver mitochondrial lipids and of adenine nucleotide translocase and oxidative phosphorylation by cold adaptation. *Biochim Biophys Acta* 722:302–309
- Malis CD, Bonventre JV (1986) Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. A model for post-ischemic and toxic mitochondrial damage. *J Biol Chem* 261:14201–14208
- 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
- Mannella CA, Pfeiffer DR, Bradshaw PC, Moraru II, Slepchenko B, Loew LM, Hsieh C, Buttle K, Marko M (2001) Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* 52:93–100
- Marie D, Partensky F, Vaultot D, Brussaard C (1999) Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dobrucki J, Hyun WC, Nolan JP, Orfao A, Rabinovitch PS, Marie D, Partensky F, Vaultot D, Brussaard C (ed) *Current Protocols in Cytometry*, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA, pp 11.11.1–11.11.15
- Martin N, Bureau DP, Marty Y, Kraffe E, Guderley H (2012) Dietary lipid quality and mitochondrial membrane composition in trout: responses of membrane enzymes and oxidative capacities. *J Comp Physiol B* doi:10.1007/s00360-012-0712-5
- Martoja-Pierson M, Martoja-Pierson R (1967) Initiation aux techniques de l'histologie animale.
- Marty Y, Delaunay F, Moal J, Samain JF (1992) Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J Exp Mar Biol Ecol* 163:221–234



- Meistertzheim AL (2008) Capacité d'adaptation d'une espèce invasive, l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas*, en région Bretagne. Thèse de doctorat, 209p. Université de Bretagne Occidentale – Brest
- Metz JG, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, Valentine R, Lardizabal K, Domergue F, Yamada A, Yazawa K, Knauf V, Browse J (2001) Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* 293:290–293
- Michaelidis B, Haas D, Grieshaber MK (2005) Extracellular and intracellular acid-base status with regard to the energy metabolism in the oyster *Crassostrea gigas* during exposure to air. *Physiol Biochem Zool* 78:373–383
- Milke LM, Bricelj VM, Parrish CC (2004) Growth of postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*, on microalgal diets, with emphasis on the nutritional role of lipids and fatty acids. *Aquaculture* 234:293–317
- Milke LM, Bricelj VM, Parrish CC (2006) Comparison of early life history stages of the bay scallop, *Argopecten irradians*: Effects of microalgal diets on growth and biochemical composition. *Aquaculture* 260:272–289
- Mingoa-licuanan SS (1993) Oxygen consumption and ammonia excretion in juvenile *Tridacna gigas* (Linne, 1758): effects of emersion. *J Exp Mar Biol Ecol* 171:119–137
- Moal J, Samain JF, Le Coz JR, Daniel JY (1989) Responses and adaptations of the adenylate energy charge and digestive enzyme activities to tidal emersion of *Crassostrea gigas* populations in Marennes-Oleron Bay. *Sci Mar* 53:699–704
- Morash AJ, Bureau DP, McClelland GB (2009) Effects of dietary fatty acid composition on the regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Phys B* 152:85–93
- De Moreno JE, Moreno VJ, Brenner RR (1976) Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides*: 2-polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids* 11:561–566
- Le Moullac G, Bacca H, Huvet A, Moal J, Pouvreau S, Van Wormhoudt A (2007) Transcriptional regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during prolonged hypoxia. *J Exp Zool A* 307:371–382
- Moya-Falcón C, Hvattum E, Dyrøy E, Skorve J, Stefansson SO, Thomassen MS, Jakobsen JV, Berge RK, Ruyter B (2004) Effects of 3-thia fatty acids on feed intake, growth, tissue fatty acid composition, beta-oxidation and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in Atlantic salmon. *Comp Biochem Phys B* 139:657–668
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Haskó G, Hawkins BJ, Madesh M, Pacher P (2007) Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat Protoc* 2:2295–2301
- Muleme HM, Walpole AC, Staples JF (2006) Mitochondrial metabolism in hibernation: metabolic suppression, temperature effects, and substrate preferences. *Physiol Biochem Zool* 79:474–483

- Munro D, Blier PU (2012) The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell* 11:845–855
- Murphy MG (1990) Dietary fatty acids and membrane protein function. *J Nutr Biochem* 1:68–79
- Musatov A (2006) Contribution of peroxidized cardiolipin to inactivation of bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Free Radical Bio Med* 41:238–246
- Naimi A (2009) Le déterminisme du sexe de l'huître creuse *Crassostrea gigas* au cours de son développement et du cycle gamétogénétique adulte: recherche de déterminants moléculaires. Thèse de doctorat, 212p. Université de Caen Basse-Normandie
- Napolitano GE, Ackman RG, Ratnayake WMN (1990) Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *J World Aquacult Soc* 21:122–130
- Nathan AT, Singer M (1999) The oxygen trail: tissue oxygenation. *Brit Med Bull* 55:96–108
- Nelson DL, Cox MM (2008) *Lehninger principles of biochemistry*, fifth edition.
- Nesci S, Ventrella V, Trombetti F, Pirini M, Pagliarani A (2012) Tributyltin-driven enhancement of the DCCD insensitive Mg-ATPase activity in mussel digestive gland mitochondria. *Biochimie* 94:727–733
- Newell RC (1979) *Biology of intertidal animals*
- Nicchitta CV, Ellington WR (1983) Energy metabolism during air exposure and recovery in the high intertidal bivalve mollusc *Geukensia demissa granosissima* and the subtidal bivalve mollusc *Modiolus squamosus*. *Biol Bull* 165:708–722
- Niehaus AC, Angilletta MJ Jr, Sears MW, Franklin CE, Wilson RS (2012) Predicting the physiological performance of ectotherms in fluctuating thermal environments. *J Exp Biol* 215:694–701
- Nohl H, Gille L, Staniek K (2005) Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* 69:719–723
- Oellermann M, Pörtner HO, Mark FC (2012) Mitochondrial dynamics underlying thermal plasticity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) hearts. *J Exp Biol* 215:2992–3000
- Oliveros LB, Domeniconi MA, Vega VA, Gatica LV, Brigada AM, Gimenez MS (2007) Vitamin A deficiency modifies lipid metabolism in rat liver. *Brit J Nutr* 97:263–272
- Ouhabi R, Boue-Grabot M, Mazat JP (1998) Mitochondrial ATP synthesis in permeabilized cells: assessment of the ATP/O values in situ. *Anal Biochem* 263:169–175
- Owen JM, Adron JW, Middleton C, Cowey CB (1975) Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot *Scophthalmus maximus* L., and rainbow trout, *Salmo gairdnerii* rich. *Lipids* 10:528–531

- Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW (2002) The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 277:30409–30412
- Pampanin DM, Ballarin L, Carotenuto L, Marin MG (2002) Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes: effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents. *Comp Biochem Phys A* 131:605–614
- Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E (1997) Age-dependent decline in the cytochrome *c* oxidase activity in rat heart mitochondria: role of cardiolipin. *FEBS Lett* 406:136–138
- Paradis M, Ackman RG (1975) Occurrence and chemical structure of nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in American oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids* 10:12–16
- Parker RS, Selivonchick DP (1986) Uptake and metabolism of lipid vesicles from seawater by juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 53:215–228
- Pennarun AL, Prost C, Haure J, Demaimay M (2003) Comparison of two microalgal diets. 1. Influence on the biochemical and fatty acid compositions of raw oysters (*Crassostrea gigas*). *J Agr Food Chem* 51:2006–2010
- Pernet F, Gauthier-Clerc S, Mayrand É (2007a) Change in lipid composition in eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) exposed to constant or fluctuating temperature regimes. *Comp Biochem Phys B* 147:557–565
- Pernet F, Tremblay R, Comeau L, Guderley H (2007b) Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *J Exp Biol* 210:2999–3014
- Pernet F, Tremblay R, Redjah I, Sevigny JM, Gionet C (2008) Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J Exp Biol* 211:969–977
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, Paradies G (2003) Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J* 17:714–716
- Petursdottir DH, Hardardottir I (2007) Dietary fish oil increases the number of splenic macrophages secreting TNF- $\alpha$  and IL-10 but decreases the secretion of these cytokines by splenic T cells from mice. *J Nutr* 137:665–670
- Pichaud N, Chatelain EH, Ballard JWO, Tanguay R, Morrow G, Blier PU (2010) Thermal sensitivity of mitochondrial metabolism in two distinct mitotypes of *Drosophila simulans*: evaluation of mitochondrial plasticity. *J Exp Biol* 213:1665–1675
- Pichaud N, Rioux P, Blier PU (2012) In situ quantification of mitochondrial respiration in permeabilized fibers of a marine invertebrate with low aerobic capacity. *Comp Biochem Phys A* 161:429–435
- Piontkivska H, Chung JS, Ivanina AV, Sokolov EP, Techa S, Sokolova IM (2011) Molecular characterization and mRNA expression of two key enzymes of hypoxia-sensing pathways in

- eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin): hypoxia-inducible factor  $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ) and HIF-prolyl hydroxylase (PHD). *Comp Biochem Phys D* 6:103–114
- Pirini M, Manuzzi MP, Pagliarani A, Trombetti F, Borgatti AR, Ventrella V (2007) Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comp Biochem Phys B* 147:616–626
- Pompos LJ, Fritsche KL (2002) Antigen-driven murine CD4<sup>+</sup> T lymphocyte proliferation and interleukin-2 production are diminished by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids. *J Nutr* 132:3293–3300
- Pronker AE, Nevejan NM, Peene F, Geijssen P, Sorgeloos P (2008) Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part I. Impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. *Aquacult Int* 16:297–307
- Puri V, Czech MP (2008) Lipid droplets: FSP27 knockout enhances their sizzle. *J Clin Invest* 118:2693–2696
- Rabinovich AL, Ripatti PO (1991) The flexibility of natural hydrocarbon chains with non-methylene-interrupted double bonds. *Chem Phys Lipids* 58:185–192
- Rafrafi S, Uglow RF (2009) Nitrogenous compounds changes in emersed oysters: *Crassostrea gigas*. *Estuar Coast Shelf S* 81:210–214
- Rico-Villa B, Le Coz JR, Mingant C, Robert R (2006) Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256:377–388
- Roberts J, Aubert S, Gout E, Bligny R, Douce R (1997) Cooperation and competition between adenylate kinase, nucleoside diphosphokinase, electron transport, and ATP synthase in plant mitochondria studied by <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance. *Plant Physiol* 113:191–199
- Robinson NC (1993) Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* 25:153–163
- Roch P (1999) Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172:125–145
- Rohrbach S (2009) Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria. *Curr Pharm Design* 15:4103–4116
- Rosas C, Pascual C, Mascaro M, Gebauer P, Farias A, Paschke K, Uriarte I (2011) Applied ecophysiology: an integrative form to know how culture environment modulates the performance of aquatic species from an energetic point of view. In: Sladonja B (ed) *Aquaculture and the Environment - A Shared Destiny*, InTech, pp 161–194
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51
- Sargent JR (1989) Ether-linked glycerides in marine animals. In: Ackman RG (ed) *Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils*, CRC Press. Boca raton, Florida, pp 175–197

- Schlame M, Rua D, Greenberg ML (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* 39:257–288
- Schmitt P, Duperthuy M, Montagnani C, Bachère E, Destoumieux-Garzón D (2012a) Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: an overview with focus on summer mortalities. In: Qin JG (ed) *Oysters Physiology, Ecological Distribution and Mortality*, Nova Science Publishers, Inc. New York, pp 227–273
- Schmitt P, Rosa RD, Duperthuy M, Bachère E, Destoumieux-Garzón D (2012b) The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. *Front Microbio* 3:1–17
- Schneider A (2001) Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *Int J Parasitol* 31:1403–1415
- Sedlák E, Panda M, Dale MP, Weintraub ST, Robinson NC (2006) Photolabeling of cardiolipin binding subunits within bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 45:746–754
- Senault C, Yazbeck J, Gubern M, Portet R, Vincent M, Gallay J (1990) Relation between membrane phospholipid composition, fluidity and function in mitochondria of rat brown adipose tissue. Effect of thermal adaptation and essential fatty acid deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1023:283–289
- Shick JM, Widdows J, Gnaiger E (1988) Calorimetric studies of behavior, metabolism and energetics of sessile intertidal animals. *Am Zool* 28:161–181
- Shieh HS (1968) The characterization and incorporation of radioactive bases into scallop phospholipids. *Comp Biochem Phys* 27:533–541
- Silina AV, Zhukova NV (2007) Growth variability and feeding of scallop *Patinopecten yessoensis* on different bottom sediments: Evidence from fatty acid analysis. *J Exp Mar Biol Ecol* 348:46–59
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731
- Sokolova IM, Ringwood AH, Johnson C (2005) Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquat Toxicol* 74:218–228
- Sokolova IM, Sokolov EP (2005) Evolution of mitochondrial uncoupling proteins: novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP family. *FEBS Lett.* 579:313–317
- Sommer AM, Pörtner HO (2004) Mitochondrial function in seasonal acclimatization versus latitudinal adaptation to cold in the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Physiol Biochem Zool* 77:174–186

Soudant P, Leite R, Chu FL, Villalba A, Cancela L (2008) Bivalves-*Perkinsus* spp. interactions. In: Villalba A (ed) Workshop for the Analysis of the Impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry, Vilanova de Arousa, Spain, pp 78–109

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

Soudant P, Marty Y, Moal J, Samain J (1996b) Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquacult Int* 4:191–200

Soudant P, Moal J, Marty Y, Samain J (1997) Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.): Effect of nutrition. *J Exp Mar Biol Ecol* 215:103–114

Soudant P, Moal J, Marty Y, Samain JF (1996c) Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *J Exp Mar Biol Ecol* 205:149–163

Soudant P, Van Ryckeghem K, Marty Y, Moal J, Samain JF, Sorgeloos P (1999) Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Phys B* 123:209–222

Sparks AK, Morado JF (1988) Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. *Am Fish Soc Spec Publ* 18:139–152

Spector AA, Yorek MA (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* 26:1015–1035

Spencer BE, Key D, Millican PF, Thomas MJ (1978) The effect of intertidal exposure on the growth and survival of hatchery-reared Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) kept in trays during their first on-growing season. *Aquaculture* 13:191–203

Spira Afchain A (2007) Etude des relations structure-fonction du transporteur mitochondrial d'ADP/ATP et de ses interactions avec d'autres protéines membranaires mitochondriales. Thèse de doctorat, 178p. Université Joseph-Fourier - Grenoble I

Storey KB (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29:1715–1733

St-Pierre J, Brand MD, Boutilier RG (2000) The effect of metabolic depression on proton leak rate in mitochondria from hibernating frogs. *J Exp Biol* 203:1469–1476

St-Pierre J, Charest PM, Guderley H (1998) Relative contribution of quantitative and qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatisation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Biol* 201:2961–2970

Stryer L (1997) La biochimie

Stuart JA, Gillis TE, Ballantyne JS (1998) Compositional correlates of metabolic depression in the mitochondrial membranes of estivating snails. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 275:1977–1982

- Sukhotin AA, Pörtner HO (1999) Habitat as a factor involved in the physiological response to environmental anaerobiosis of White Sea *Mytilus edulis*. *Mar Ecol-Prog Ser* 184:149–160
- Suquet M, Rochet M-J, Gaignon JL (2005) Experimental ecology: A key to understanding fish biology in the wild. *Aquat Living Resour* 18:251–259
- Sussarellu R (2011) Processus moléculaires et physiologiques liés aux variations d'oxygène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, 174p. Université de Bretagne Occidentale - Brest
- Takagi T, Miyashita K (1987) Autoxidative rates of nonmethylene-interrupted polyenoic fatty acids. *J Am Oil Chem Soc* 64:407–413
- Tardy AL, Giraudet C, Rousset P, Rigaudière JP, Laillet B, Chalancon S, Salles J, Loreau O, Chardigny JM, Morio B (2008) Effects of trans MUFA from dairy and industrial sources on muscle mitochondrial function and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 49:1445–1455
- Tillman TS, Cascio M (2003) Effects of membrane lipids on ion channel structure and function. *Cell Biochem Biophys* 38:161–190
- Tocher D, Dick J, Sargent J (1995) Occurrence of 22:3n-9 and 22:4n-9 in the lipids of the topminnow (*Poeciliopsis lucida*) hepatic tumor cell line, PLHC-1. *Lipids* 30:555–565
- Torreilles J, Guérin MC, Roch P (1996) Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. *C R Acad Sci III, Sci Vie* 319:209–218
- Trider DJ, Castell JD (1980) Effect of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). *J Nutr* 110:1303–1309
- Uki N, Sugiura M, Watanabe T (1986) Requirement of essential fatty acids in the abalone *Haliotis discus hannai*. *Nippon Suisan Gakk* 52:1013–1023
- Utting SD, Millican PF (1997) Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155:45–54
- Vaskovsky V. (1989) Phospholipids. In: Ackman RG (ed) *Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils*, CRC Press. Boca Raton, Florida, pp 199–242
- Ventrella V, Pirini M, Pagliarani A, Trombetti F, Manuzzi MP, Borgatti AR (2008) Effect of temporal and geographical factors on fatty acid composition of *M. galloprovincialis* from the Adriatic sea. *Comp Biochem Phys B* 149:241–250
- Vickery MS, McClintock JB (2000) Effects of food concentration and availability on the incidence of cloning in planktotrophic larvae of the sea star *Pisaster ochraceus*. *Biol Bull* 199:298–304
- Waldock M, Holland D (1984) Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: Polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 19:332–336

- Wang YW, Field CJ, Sim JS (2000) Dietary polyunsaturated fatty acids alter lymphocyte subset proportion and proliferation, serum immunoglobulin G concentration, and immune tissue development in chicks. *Poultry Sci* 79:1741–1748
- Watkins SM, Carter LC, German JB (1998) Docosahexaenoic acid accumulates in cardiolipin and enhances HT-29 cell oxidant production. *J Lipid Res* 39:1583–1588
- Widdows J, Bayne BL, Livingstone DR, Newell RIE, Donkin P (1979) Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. *Comp Biochem Phys A* 62:301–308
- Wijsman TCM (1976) Adenosine phosphates and energy charge in different tissues *Mytilus edulis* L. under aerobic and anaerobic conditions. *J Comp Physiol B* 107:129–140
- Williams E, Somero G (1996) Seasonal-, tidal-cycle- and microhabitat-related variation in membrane order of phospholipid vesicles from gills of the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *J Exp Biol* 199:1587–1596
- Williams Jr. JN (1964) A method for the simultaneous quantitative estimation of cytochromes a, b, c<sub>1</sub>, and c in mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 107:537–543
- Wilson-Ormond EA, Powell EN, Ray SM (1997) Short-term and small-scale variation in food availability to natural oyster populations: food, flow and flux. *Mar Ecol* 18:1–34
- Wodtke E (1981) Temperature adaptation of biological membranes. The effects of acclimation temperature on the unsaturation of the main neutral and charged phospholipids in mitochondrial membranes of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Biochim Biophys Acta* 640:698–709
- Wong WH, Cheung SG (2001) Feeding rhythms of the green-lipped mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Mytilidae) during spring and neap tidal cycles. *J Exp Mar Biol Ecol* 257:13–36
- Yamaoka S, Urade R, Kito M (1988) Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J Nutr* 118:290–296
- Yin W, Signore AP, Iwai M, Cao G, Gao Y, Chen J (2008) Rapidly increased neuronal mitochondrial biogenesis after hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke* 39:3057–3063
- Zhang Z, Li X, Vandeppeer M, Zhao W (2006) Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256:502–509
- Zheng J, Ramirez VD (1999) Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase activity by estrogens: comparison with Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase of porcine cortex. *Eur J Pharmacol* 368:95–102
- Zhou M, Morgner N, Barrera NP, Politis A, Isaacson SC, Matak-Vinković D, Murata T, Bernal RA, Stock D, Robinson CV (2011) Mass spectrometry of intact V-type ATPases reveals bound lipids and the effects of nucleotide binding. *Science* 334:380–385



## Bibliographie

Zhukova NV (1986) Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids from [<sup>14</sup>C] acetate in molluscs. *Biochim Biophys Acta* 878:131–133

Zhukova NV (1991) The pathway of the biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Comp Biochem Phys B* 100:801–804

Zuniga ME, Lokesh BR, Kinsella JE (1989) Disparate effects of dietary fatty acids on activity of 5'-nucleotidase of rat liver plasma membrane. *J Nutr* 119:152–160

# **ANNEXE**



L'annexe présentée ici est un article issu des travaux de Mme Rossana Sussarellu auxquels j'ai participé. Cet article dont je suis co-auteur a pour titre **Rapid mitochondrial adjustments in response to short-term hypoxia and re-oxygenation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas***. Il a été soumis dans le Journal of Experimental Biology et est actuellement en cours de révision.



1 **Rapid mitochondrial adjustments in response to short-term hypoxia and re-oxygenation in**  
2 **the Pacific oyster *Crassostrea gigas***

3

4 **Short Title:**

5 **Oyster mitochondrial changes to hypoxia**

6

7 **Authors' names:**

8 Rossana Sussarellu<sup>a</sup>, Tony Dudognon<sup>a</sup>, Caroline Fabioux<sup>a</sup>, Philippe Soudant<sup>a</sup>, Dario Moraga<sup>a</sup>,  
9 Edouard Kraffe<sup>a\*</sup>

10

11 **\* Corresponding author:**

12 UMR CNRS 6539-LEMAR (Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin), IUEM  
13 (Institut Universitaire Européen de la Mer), Université de Bretagne Occidentale, Technopôle  
14 Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

15 E-mail: edouard.kraffe@univ-brest.fr

16

17 **Addresses:**

18 <sup>a</sup> UMR CNRS 6539-LEMAR (Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin), IUEM  
19 (Institut Universitaire Européen de la Mer), Université de Bretagne Occidentale, Technopôle  
20 Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

21

22

23 **Summary**

24

25 As oxygen concentrations in marine coastal habitats can fluctuate rapidly and drastically, sessile  
26 marine organisms like the oyster *Crassostrea gigas* can experience marked and rapid oxygen  
27 variations. In this study, we investigated the responses of oyster gill mitochondria to short-term  
28 hypoxia (3 h and 12 h, at 1.7 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) and subsequent re-oxygenation. Mitochondrial  
29 respiratory rates (state 3 and 4 stimulated by glutamate), phosphorylation efficiency (RCR ratio  
30 and ADP/O) were measured. Cytochrome c oxidase activity (CCO) and cytochrome  
31 concentrations (*a*, *b*, *c*<sub>1</sub>, *c*) were measured to investigate the rearrangements of respiratory chain  
32 subunits. The potential implication of an alternative oxidase (AOX) was investigated using an  
33 inhibitor of the respiratory chain (antimycin A) and through gene expression analysis in gills and  
34 digestive gland. Results indicate a down regulation of mitochondrial capacity, with 60%  
35 inhibition of respiratory rates after 12 h of hypoxia. RCR ratio remained stable, while ADP/O  
36 increased after 12 h of hypoxia and 1 h of re-oxygenation, suggesting increased phosphorylation  
37 efficiency. CCO showed a fast and remarkable increase of its catalytic activity only after 3 h of  
38 hypoxia. AOX mRNA levels showed similar patterns in gill and digestive gland, and were up  
39 regulated after 12 and 24 h of hypoxia and during re-oxygenation. Results suggest a set of  
40 controls in regulating mitochondrial functions in response to oxygen fluctuations and  
41 demonstrate the fast and extreme plasticity of oyster mitochondria in response to oxygen  
42 variations.

43

44 *Key words: hypoxia, re-oxygenation, oyster, mitochondria, respiration, alternative oxidase*

45

46

47 **Introduction**

48

49 Marine organisms, and in particular sessile ones, can be confronted with a wide range of oxygen  
50 concentrations. Oxygen depletion in seawater is essentially caused by eutrophication. Plankton  
51 blooms and microbial degradation of organic matter can lead to hypoxia (Cloern, 2001; Gray et  
52 al., 2002). Eutrophication can also cause macrophyte blooms in shallow areas, resulting in low  
53 dissolved oxygen levels during the night due to algal respiration (Grieshaber et al., 1994).  
54 Oxygen deficiency can have fitness costs, such as reduced growth and reproduction, or even be  
55 rapidly lethal for sensitive organisms (Wu, 2002). Conversely, benthic animals can experience  
56 hyperoxic conditions when macrophyte photosynthesis leads to high oxygen production during  
57 the daytime (Bridges et al., 1984; Grieshaber et al., 1994). Moreover, re-oxygenation after low  
58 tide can cause an oxidative burst, similar to that experienced during reperfusion-ischemia injury  
59 (Storey, 1996). Hyperoxic conditions can potentially lead to over-production of reactive oxygen  
60 species (ROS) and oxidative stress (Turrens, 2003; Massabuau, 2001). Dealing with fluctuating  
61 environmental oxygen levels requires a suite of physiological and biochemical adaptations.  
62 Survival of hypoxia typically requires depression of metabolic rate (hypometabolism), and the  
63 use of anaerobic fermentative pathways to produce ATP (Larade and Storey, 2002; Grieshaber et  
64 al., 1994). Conversely, the avoidance of oxidative bursts during re-oxygenation is mainly  
65 achieved by maintenance of constitutive high levels of antioxidants (Storey, 1996), by increasing  
66 antioxidant defences during hypoxia/anoxia to minimize oxidative damage during recovery  
67 (Storey, 1996) or by energy dissipating mechanisms that avoid increased ROS production  
68 (Buttemer et al., 2010).

69 The biochemical mechanisms that drive metabolic depression during hypoxia and avoid  
70 oxidative injury during re-oxygenation are still poorly understood in marine invertebrates, but  
71 mitochondria are likely to play critical roles. The ability to adjust mitochondrial oxidative  
72 capacity is critical to controlling energy production under changing environmental conditions  
73 (Guderley, 2004, Bremer and Moyes, 2011). In mammals, hypoxic conditions reduce  
74 mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation (Schumacker et al., 1993). The decrease  
75 of mitochondrial respiration may implicate several mechanisms such as decreasing the area of  
76 the inner mitochondrial membrane, slowing down electron flux through the electron transport  
77 system (ETS), and inhibiting ATP synthase activity (Bishop et al., 2002; Duerr and Podrabsky,  
78 2010). Studies on reversible decrease of respiration during moderate hypoxia in rat isolated  
79 hepatocytes, revealed a role of cytochrome C oxidase (CCO) in cellular oxygen sensing and in  
80 the reversible suppression of oxidative phosphorylation (Chandel et al., 1995; Chandel et al.,



81 1996; Chandel et al., 1997). Adjustments of energy dissipation through decreased proton leak  
82 have been proposed to preserve aerobic energy production during metabolic depression (St-  
83 Pierre et al., 2000a). This proton conductance of the inner membrane of mitochondria allows a  
84 leak of protons back into the matrix, and results in oxidative phosphorylation being less than  
85 fully coupled (Brand, 2000). This energy-dissipating proton leak can involve different  
86 components of the mitochondrial membrane such as adenine nucleotide translocase (ANT), or  
87 uncoupling proteins (UCP), which have been recently characterized in oysters (Sokolova and  
88 Sokolov, 2005; Kern et al., 2009).

89 Besides systems controlling the respiratory chain, recent studies show the presence of an  
90 alternative oxidase (AOX) in hypoxia tolerant marine invertebrates (Tschischka et al., 2000;  
91 Buchner et al., 2001; Pichaud et al., 2012). AOX gene sequences were found in many  
92 invertebrates and in particular in bivalves (McDonald and Vanlerberghe, 2004; McDonald et al.,  
93 2009). The AOX, a mitochondrial inner-membrane protein, branches off the classical respiratory  
94 chain, reducing oxygen without pumping protons in the inter-membrane space and uncoupling  
95 therefore respiration from ATP production. This alternative pathway in marine invertebrates is  
96 thought to protect cells against oxidative injury during hypoxic and hyperoxic events by  
97 preventing increased rate of ROS production (Abele, 2007).

98 The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is well known for its tolerance to environmental oxygen  
99 fluctuations, making *C. gigas* an interesting model to study mitochondrial modifications during  
100 hypoxia. To date, studies on hypoxia responses were performed at the levels of the transcriptome  
101 (David et al., 2005; Sussarellu et al., 2010) and energy metabolism (Le Moullac et al., 2007a) on  
102 oysters exposed to long-term hypoxia (30% of oxygen saturation during 3 weeks). The  
103 biochemical mechanisms by which oysters respond to a short-term hypoxia (24 h) and  
104 subsequent re-oxygenation are less well known. Oxygen fluctuations in seawater often occur on  
105 short time scales and the response of hypoxia-tolerant systems to oxygen depletion occurs in two  
106 defence and rescue phases (Hochachka et al., 1996; Hochachka and Lutz, 2001). Thus, it is very  
107 important to understand the early mechanisms of hypoxia responses. Recently we studied  
108 antioxidant and energetic adjustments occurring in response to short-term oxygen variations on  
109 *C. gigas* (Sussarellu et al., 2012). Short-term hypoxic conditioning did not cause a switch  
110 towards anaerobic metabolism nor an oxidative stress, but AOX mRNA levels showed rapid  
111 modifications on a short time scale, suggesting a role in redox balance of *C. gigas*.

112 The aim of the present study was to investigate functional changes of *C. gigas* gill mitochondria  
113 during short-term hypoxia and re-oxygenation, and to evaluate the implication of AOX during  
114 such oxygen variations. The main questions were to know if mitochondrial capacities are

115 affected by a short-term hypoxia stress, and in which way. For this purpose, mitochondrial  
116 capacities were analyzed in oyster gills after 3 and 12 h of hypoxia ( $1.7 \pm 0.14 \text{ mg L}^{-1}$ ) and  
117 subsequent re-oxygenation. We sought to identify potential mechanisms by which mitochondrial  
118 oxidative capacities changed by examining phosphorylation efficiency, the activity of CCO and  
119 the concentrations of cytochromes (*a* representing the concentration of complex IV-CCO of the  
120 respiratory chain; *b* that of complexes II and III; *c<sub>I</sub>* complex III; and cytochrome *c*. The presence  
121 of an AOX pathway and its adjustments in the mitochondrial respiratory chain were estimated by  
122 using antimycin A to inhibit complex III of the respiratory chain and through gene expression  
123 analysis in gills and digestive gland.

124

## 125 **Material and Methods**

126

### 127 *Animal conditioning and sampling*

128 Three-year old oysters (66-85 g, 8-10 cm) were obtained in May 2010 from an oyster farm in the  
129 Bay of Brest (Plougastel, France). Immediately after arrival, oysters were placed in 500 L flow-  
130 through seawater tank, acclimated for one week before experiments. During the one week of  
131 acclimatising, no food was added, but the flow-through seawater system use a sand filter, likely  
132 allowing oyster to fed on natural phytoplankton brought by the pumped seawater. Throughout  
133 the experiments, salinity and temperature were 34 and 13°C, respectively. After one week,  
134 oysters were placed in 6 tanks with an effective volume of 40 L, each containing 30 animals.  
135 Three tanks were continuously supplied with fully oxygenated seawater ( $9.24 \pm 0.54 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ )  
136 to serve as the normoxic controls. In the three other tanks, oxygen levels were reduced to  
137  $1.7 \pm 0.14 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  for 24 h using the oxygen depletion system described by Pichavant et al.  
138 (2000). Hypoxic  $\text{O}_2$  concentrations were reached by bubbling nitrogen in seawater in a reservoir  
139 tank supplying the 3 hypoxic tanks. Surface gas exchange was limited by setting the water  
140 outflow under the water surface and covering tanks with transparent plastic bags. After 24 h of  
141 hypoxia, nitrogen bubbling was stopped and fully oxygenated water was delivered to the tanks.  
142 To speed up re-oxygenation, air pumps were placed in each tank and the plastic bags removed.  
143 Oxygen concentration 1 h after stopping nitrogen bubbling was  $8.58 \pm 0.31 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ . Water flow  
144 rates were 0.8 and 1  $\text{L min}^{-1}$  under hypoxic and normoxic conditions, respectively. Oxygen  
145 concentrations were monitored using a SevenGo DuoPro Mettler Toledo oxymeter (Greifensee,  
146 Switzerland), and adjusted when necessary to keep hypoxia constant throughout the experiment.  
147 Water parameters of the experimental setup (oxygen concentration and temperature) are

148 provided in S1. The level of hypoxia chosen ( $<2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ) was justified by the findings of Le  
149 Moullac et al. (2007a) that determined critical  $\text{PO}_2$  for oysters at  $15^\circ$  to be  $3.02 \pm 0.15 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ .  
150 For mitochondria extraction, gills were dissected after 3 and 12 hours of hypoxia and 1 hour  
151 after re-oxygenation. Oysters from normoxic tanks were used as control. At each sampling time  
152 9 oysters were sampled, 3 pools containing gills of 3 individuals were used (each pool contained  
153  $3.7 \pm 0.40 \text{ g}$  of gill tissue). Gill pools were immediately processed for mitochondrial extraction.  
154 For gene expression analysis, gills and digestive gland were sampled in hypoxic and normoxic  
155 tanks after 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hours of hypoxia, and 1 hour after re-oxygenation. For each  
156 condition and each time, 8 animals were sampled. Tissues were dissected, immediately frozen in  
157 liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until further analysis.

158

### 159 ***Mitochondrial isolation***

160 Procedures of mitochondrial isolation and assay were adapted from Kraffe et al. (2008).  
161 Mitochondrial isolation were performed immediately after dissection, all manipulations were  
162 carried out on ice and centrifugations were performed at  $4^\circ\text{C}$ , and took about 1h. Gill pools were  
163 initially crumbled with scissors, and rinsed with isolation buffer on a mesh ( $80 \mu\text{m}$ ). The minced  
164 tissues were then homogenised with a motorised potter tissue grinder (Heidolph, Kelheim,  
165 Germany; 3 passes on ice) in 10 volumes of isolation buffer containing sucrose 300 mM, HEPES  
166 30 mM, KCl 100 mM, EGTA 8 mM, pH 7.5 at  $25^\circ\text{C}$ , and 0.5% BSA (fraction V fatty acid free,  
167 SIGMA A6003 added the day of experiment). The homogenate was centrifuged at 900 g for  
168 10 min and the supernatant was filtered on an  $80 \mu\text{m}$  mesh and re-centrifuged at 900 g for 10  
169 min. The resulting supernatant, considered free of unbroken cells or cell debris, was centrifuged  
170 at 9000 g for 10 min and the pellet re-suspended in a volume of reaction buffer (containing  
171 sucrose 400 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, HEPES 30 mM, KCl 90 mM, taurine 50 mM,  $\beta$ -alanine 50  
172 mM and 0.5% BSA, pH 7.5 at  $25^\circ\text{C}$ ) corresponding to one-tenth of the initial mass of gills used.

173

### 174 ***Mitochondrial respiration***

175 Mitochondrial oxygen consumption was measured in a water-jacketed respiration chamber using  
176 a Clarke-type electrode OX1LP-1mL Dissolved Oxygen Package (Qubit Systems Inc., Kingston, ON  
177 CANADA). Temperatures of chambers were maintained at  $13^\circ\text{C}$  with a circulating refrigerated  
178 bath. For each assay, around  $600 \mu\text{g}$  of mitochondrial protein was added to  $400 \mu\text{L}$  of reaction  
179 buffer. Glutamate was added to a final concentration of 40 mM as substrate. The maximal rate of  
180 oxidative phosphorylation (state 3) was obtained by the addition of ADP to a final concentration  
181 of  $600 \mu\text{M}$ . Preliminary experiments showed that glutamate alone stimulates respiration through

182 complex I in *C. gigas* gill mitochondria as previously found in *Crassostrea virginica* (Burcham  
183 et al., 1983). Glutamate was also oxidized at higher rates than other substrates (data not shown)  
184 as in *C. virginica* (Kurochkin et al., 2009) and in *Placopecten magellanicus* (Kraffe et al., 2008).  
185 Non phosphorylating rates (state 4) were measured after ADP depletion. Measurements were  
186 performed in triplicate in three respiration chambers simultaneously. Inhibition of complex III of  
187 the respiratory chain was obtained after adding antimycin A to a final concentration of 20  $\mu\text{M}$ .  
188 Antimycin A was added 3 minutes after ADP addition (states 3 last in average 6 minutes using  
189 ADP at 600  $\mu\text{M}$ ). Inhibited rates were then measured and compared to non-inhibited rates (state  
190 3 rates) measured on the same sample before antimycin A addition. Respiratory control ratio  
191 (RCR) values are defined as the ratio between state 3 and state 4. Oxidative phosphorylation  
192 efficiency (relation between ADP and oxygen consumption) was calculated with ADP/O ratio  
193 according to Chance and Williams (1956).

194

#### 195 ***Cytochrome C oxidase activity***

196 CCO activity measurement on mitochondrial preparations was adapted from Bouchard and  
197 Guderley (2003) and Kraffe et al. (2008). Briefly, the mitochondrial preparation was submitted  
198 to two cycles of freezing and thawing. The disrupted mitochondria were diluted 100 times in the  
199 assay buffer containing  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM pH 7.8 at 25 °C. Bovine cytochrome c  
200 (cyt c C2037 Sigma) was employed as substrate to stimulate the maximal CCO activity. Reduced  
201 cyt c solution was prepared by adding a few grains of sodium dithionite. To avoid dithionite  
202 excess, small amounts of a stock solution of reduced cyt c were added to a cyt c oxidized  
203 solution and the absorbance was followed at 550 nm to obtain 95% of the absorbance of the  
204 reduced cyt c stock solution. The reaction was performed in microplates at 25°C using an initial  
205 cyt c concentration of 60  $\mu\text{M}$  reduced at 95%. The decrease in absorbance of cyt c was followed  
206 at 550 nm for 10 minutes and all assays were run in triplicate. Activities were calculated using an  
207 extinction coefficient of 19.1  $\text{mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$  for cyt c and are expressed as  $\mu\text{mol cyt c}$   
208 transformed  $\text{min}^{-1}$  ( $U_{\text{CCO}}$ , first order reaction).

209

#### 210 ***Cytochrome concentrations***

211 The concentrations of cytochromes *a*, *b*, *c<sub>1</sub>*, and *c* were quantified by difference spectra  
212 according to Leary et al. (2003). 600  $\mu\text{g}$  of mitochondrial proteins (40  $\mu\text{L}$  of mitochondrial  
213 suspension) were diluted in 960  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM pH 7.8  
214 at 25°C) without Triton-X. The ETC cytochromes were reduced by adding a few grains of  
215 sodium dithionite and incubated for 15 min at room temperature. The reduced samples were read

216 against air-oxidized samples between 400 and 630 nm. We used the solution to the simultaneous  
217 equations (Williams, 1964) to assess individual cytochrome concentrations.

218

### 219 ***Protein concentration***

220 Aliquots of 20  $\mu$ L of fresh mitochondrial preparations were suspended in the reaction buffer  
221 without BSA and centrifuged for 10 min at 12000 g at 4°C. The supernatant was discarded and  
222 the pellet re-suspended, washed and centrifuged once more to remove the BSA. Pellets were re-  
223 suspended with a known volume of ultra-pure water and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until protein analysis.  
224 The protein concentration was determined with the RC-DC Protein Assay Kit (BIORAD) using  
225 BSA as standard.

226

### 227 ***mRNA extraction***

228 Total RNA was isolated using 1 mL of Extract-all Reagent (Eurobio) *per* 100 mg of tissue  
229 according to manufacturer's instructions. RNA quality was assessed using an Agilent  
230 Bioanalyzer 2100 and RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA)  
231 according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured at 260 nm  
232 using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham MA, USA). Both for  
233 gills and digestive gland, the reference sample used for Real-Time PCR inter-run calibration was  
234 one of the normoxic samples at time 0. Four  $\mu$ g of RNA samples were first treated with 0.5 U  
235 RQ1 RNase-Free DNase (Promega) according to manufacturer's instructions, precipitated in 3  
236 M sodium acetate and 95% ethanol, washed twice in 70% ethanol, and finally diluted in 10  $\mu$ L of  
237 RNase/DNase-free water. Total RNA quality was assessed using an Agilent Bioanalyzer 2100  
238 and RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies), and RNA quantity was determined using a  
239 NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Reverse transcription was carried out  
240 with the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), according to the  
241 manufacturer's instructions, on 1  $\mu$ g of total RNA using random hexamer primers to start the  
242 reaction.

243

### 244 ***Real-Time PCR analysis***

245 The levels of AOX mRNA transcripts were measured in gills and digestive gland by Real-Time  
246 PCR using specific primers designed using Primer Express software V 2.0 (Applied Biosystems)  
247 on oyster AOX mRNA sequence (BQ426710), AOX\_forward 5'-GAA TGG TGG CAG CGA  
248 TGA C-3', AOX\_reverse 5'-CCG TGA TCC CGC TTG AGT-5'. Two different reference genes  
249 were screened: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with primers designed by

250 Sussarellu et al. (2010), and elongation factor 1 alpha EF1 with primers designed by Fabioux et  
251 al. (2004). The choice of these two reference genes was justified by the fact that they were both  
252 already tested in previous hypoxic experimentation on *C. gigas* and resulted as the least variable  
253 (Sussarellu et al., 2010; Sussarellu et al., 2012). Furthermore, GAPDH was one of the best  
254 reference gene over the ensemble of the tissues in *C. gigas* by a screening of 7 different  
255 reference genes (Dheilly et al., 2011). Variation coefficients for EF1 and GAPDH were <5% in  
256 both gills and digestive gland.

257 The primers PCR efficiency ( $E$ ) was estimated for each primer pair on both tissues by serial  
258 dilutions (from 1/20 to 1/640) of the reference cDNA sample (used for inter-run calibration). The  
259 primer efficiencies were determined by the slope of the standard curves by the following  
260 formula:  $E = 10^{[-1 / \text{slope}]}$  (Stahlberg et al., 2003). RT efficiency were comprised between 93 and  
261 105% for the references genes and AOX in both tissues.

262 Real-Time PCR was carried out in triplicate in a final volume of 10  $\mu\text{L}$ , using 4.86  $\mu\text{L}$  of cDNA  
263 (1/80 dilution) with 5  $\mu\text{L}$  of Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) and 70  
264 nM of each primer in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City CA,  
265 USA). Runs started with 15 minutes activation of the Thermo-Start DNA Polymerase at 95°C,  
266 followed by 45 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. A melting curve program  
267 was performed from 95–70°C by decreasing the temperature 0.5°C every 10 seconds in order to  
268 assess the specificity of the amplification reaction. Each run included the cDNA inter run  
269 control, a no template control, and a water control. Negative reverse-transcription controls on  
270 DNAase treated mRNA were run in order to assess the absence of genomic contaminations.

271 Reference gene expression stability (geNorm algorithm and Variation coefficient) and relative  
272 gene expression were calculated with the qbase<sup>plus</sup> software (biogazelle, Hellemans et al., 2007).  
273 The geometric mean of the two reference genes was employed to normalize gene expression.  
274 Specific amplification efficiencies on each tissue were employed for each couple of primers  
275 (90%< $E$ <110%). Inter-run calibration was employed to normalize inter-run variations within a  
276 gene between samples in order to remove the run-to-run difference. The difference between  
277 samples and the inter-run calibration sample were calculated in each run.

278

### 279 **Statistical analysis**

280 Sample normality was checked using the Shapiro Wilk test. Homoscedasticity of variances was  
281 tested with the Bartlett test. ANOVA was performed if normality and homogeneity of variances  
282 were respected. ANOVA were followed by post hoc Fisher's least significant difference (LSD)  
283 tests. As data from Real-Time PCR analysis were not normally distributed, non-parametric

284 Kruskal-Wallis ANOVA was performed, followed by Mann-Whitney U test on each time of  
285 sampling between conditions (normoxia/hypoxia). For each test, the significance threshold was  
286 5%. All analyses were performed with the Statistica 9 software (StatSoft).

287

## 288 **Results**

289

### 290 *Mitochondrial properties*

291 Mean RCR values were between 6.4 and 7.3 and did not vary significantly between different  
292 conditions (Table 1) indicating that mitochondria were maintained tightly coupled. ADP/O ratio  
293 increased significantly after 12 h of hypoxia and remained at the same level 1 h after re-  
294 oxygenation (Table 1). The maximal capacity of glutamate oxidation (state 3 rates, Fig. 1A)  
295 decreased markedly in oyster gill mitochondria exposed to hypoxia. State 3 rates tended to  
296 decrease after 3 h of hypoxia (-25% compared to normoxia) and were significantly reduced after  
297 12 h of hypoxia (-57.5% compared to normoxia). State 3 rates 1 h after re-oxygenation remained  
298 as low as in mitochondria after 12 h of hypoxia (-58.1% compared to normoxia). Non-  
299 phosphorylating rates (state 4, Fig. 1B) decreased in oysters exposed to hypoxia, following the  
300 same pattern as observed for state 3 rates. States 4 in oyster gill mitochondria exposed to 3 h of  
301 hypoxia were significantly lower than in the normoxic samples (-33%), and decreased further in  
302 oysters exposed to 12 h of hypoxia (-62.6% compared to normoxia). State 4 rates from oysters  
303 sampled 1 h after re-oxygenation remained similar to those measured after 12 h of hypoxia  
304 (-60.2% compared to normoxia).

305 CCO activity was expressed using both the amount of protein (mg) in the mitochondrial  
306 preparations and the amount of cyt *a* (nmol) (Fig 2). As cyt *a* is located in complex IV (CCO) of  
307 the respiratory chain, activity of CCO expressed per cytochrome *a* units reflects the catalytic  
308 activity of the enzyme. CCO activity expressed per cytochrome *a* increased significantly in  
309 mitochondria of oysters exposed to 3 and 12 h of hypoxia when compared to normoxia (Fig. 2B).  
310 The concentrations of cytochromes *a*, *b*, *c*<sub>1</sub>, and *c* expressed per mg of mitochondrial protein did  
311 not show significant differences with sampling time (Table 2). However, when cytochrome  
312 ratios were calculated, cyt *a*/cyt *c*<sub>1</sub> was significantly higher 1 h after re-oxygenation than under  
313 normoxic or hypoxic conditions (Table 2). These differences appear to be mainly due to a  
314 decrease in the amount of cyt *c*<sub>1</sub>.

315

### 316 *Alternative oxidase pathway*

317 Inhibition with antimycin A reduced state 3 rates of glutamate oxidation by approximately 85-  
318 90% and did not vary significantly with sampling time (Fig 3). Approximately 10-15% of the  
319 total oxygen consumption could thus be attributed to the alternative oxidase pathway. Albeit not  
320 significant (ANOVA  $p$ -value=0.087), the proportion of oxygen consumed by the alternative  
321 pathways tended to increase in mitochondria isolated 1 h after re-oxygenation.

322 Expression of AOX mRNA was significantly affected by hypoxia in gills and digestive gland  
323 (Kruskall-Wallis ANOVA,  $p$ -value < 0.001), showing similar patterns for both tissues. In gills,  
324 AOX mRNA levels were significantly higher in hypoxia than in normoxia at 12 h of hypoxia and  
325 1 h after re-oxygenation (Mann–Whitney U test  $p$ -value < 0.05, Fig. 4A). In digestive gland,  
326 AOX mRNA levels were significantly higher in normoxia than after 1 h of hypoxia (Mann–  
327 Whitney U test  $p$ -value < 0.001, Fig. 4B). On the other hand, AOX mRNA levels were more  
328 elevated in hypoxia than in normoxia at 12 h, 24 h of hypoxia and 1 h after re-oxygenation  
329 (Mann–Whitney U test  $p$ -value < 0.05, Fig. 4B).

330

### 331 **Discussion**

332

333 Overall, this study indicates that hypoxia induces rapid modifications of mitochondrial functions  
334 in oyster gills. Maximal oxidative capacities stimulated by the addition of glutamate (state 3) and  
335 non-phosphorylating respiration (state 4) drastically decreased during hypoxia. Rates of both  
336 states 3 and 4 were reduced by about 60% after 12 h of hypoxia. Only after 3 h of hypoxia, a  
337 decrease was apparent for state 3 and was significant for state 4. Decreasing respiratory rate is  
338 one of the first modifications during the onset of metabolic depression of hypoxia tolerant  
339 organisms and is crucial in the prevention of the onset of fatal oxygen depletion (Chandel et al.,  
340 1997; St-Pierre et al., 2000b; Bishop et al., 2002; Abele, 2007). Studies on hibernating  
341 amphibians suggest that a decrease in substrate oxidation and electron transport in the respiratory  
342 chain is the main mechanism reducing mitochondrial respiration (St-Pierre et al., 2000a). Results  
343 of the present study suggest that functional modifications of mitochondrial capacity could reflect  
344 rapid metabolic depression in oysters during hypoxia. The marked decline in state 3 respiration  
345 rates during hypoxia was matched by that of state 4 respiration and RCR remained stable during  
346 the duration of the experiment, indicating that mitochondria were well coupled. Oxygen  
347 consumption in state 4 is considered as an estimate of proton leak through the inner  
348 mitochondrial membrane (St-Pierre et al., 2000a). The relative stability of RCR could therefore  
349 provide an indication that proton leak, and the relative respiration that does not contribute to  
350 phosphorylation, was controlled in oyster mitochondria during hypoxia. Decrease of proton leak



351 during hypoxia is a consequence of reductions in ETC activity and in membrane potential (St-  
352 Pierre et al., 2000a). Such adjustments have been proposed to preserve or even increase the  
353 efficiency of aerobic energy production during metabolic depression in the frog *Rana temporaria*  
354 (St-Pierre et al., 2000a). At the mitochondrial level, reduction in proton leak could therefore  
355 result in significant energy saving under conditions of low ATP turnover during hypoxia.  
356 Optimization of ATP production during limited oxygen exposure could also be another strategy  
357 and may explain phosphorylation efficiency, commonly estimated using ADP/O ratio (Chance  
358 and Williams, 1956), to increase in oyster mitochondria after 12 h of hypoxia. Increase in the  
359 ADP/O is still difficult to explain as it may involve different controls that may function upstream  
360 and downstream of the electron transport chain. Nevertheless, the higher ADP/O during hypoxia  
361 suggests a tighter coupling of oxygen consumption that is used to drive the futile cycle of proton  
362 pumping used by ATP synthase to produce ATP.

363 The maintenance of at least 40% of normoxic respiration capacities and the increased efficiency  
364 after 12 h of hypoxia suggest that oysters did not switch towards anaerobic ATP production, but  
365 rather depressed their metabolic rate and optimized the residual aerobic metabolism. This would  
366 be confirmed by the onset of anaerobic pathways in *C. gigas* muscle observed only after 10 days  
367 of hypoxia ( $1.96 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ , Le Moullac et al., 2007b), and that genes involved in the switch  
368 toward anaerobic pathways were not activated during short-term hypoxia ( $2.6 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  for 24 h,  
369 Sussarellu et al., 2012). In addition, oysters seem to use different mechanisms to adjust its  
370 metabolism and mitochondrial functionality when hypoxia is experienced in seawater and when  
371 it occurs during air exposure. When *Crassostrea virginica* are exposed to anoxia under air  
372 exposure (Kurochkin et al., 2009), state 4 rates of gill mitochondria remained at near normoxic  
373 values throughout anoxia while state 3 rates were decreased. Thus, RCR decreased throughout  
374 the 6 days of air exposure, suggesting a decrease of mitochondrial efficiency. Moreover,  
375 accumulation of products of fermentation signalled the onset of anaerobic metabolism  
376 (Kurochkin et al., 2009). Hence, air exposure seems to decrease mitochondrial efficiency and  
377 initiate anaerobic energy production, whereas short-term hypoxia in seawater decreases aerobic  
378 metabolic rate and maintains mitochondria coupling to optimize oxygen use for energy  
379 production.

380 Regulation of respiration rates, coupling and phosphorylation efficiency during short-term  
381 hypoxia are presumably controlled by several adjustments of the respiratory chain. Reduction of  
382 state 3 could result from inhibition of the phosphorylation system (reactions that generate or  
383 utilize ATP), the substrate oxidation system (reactions responsible for generating proton motive  
384 force), or both (Gerson et al., 2008). The increase of CCO activity during hypoxia in oysters

385 (reported *per* nmol of cytochrome *a*) is unlikely a candidate for respiratory inhibition but  
386 suggests an involvement of this complex in response to hypoxia. CCO is the terminal oxidase of  
387 cellular respiration catalyzing the transfer of electrons to molecular oxygen and shows  
388 significant control of respiration rates in isolated mitochondria (Groen et al., 1982) and an  
389 apparent excess capacity over mitochondrial state 3 respiration rates (Blier and Lemieux, 2001;  
390 Pichaud et al., 2012). The increased capacity of CCO combined with the decreased  
391 mitochondrial oxidative capacity could be a strategy for higher oxygen affinity of the respiratory  
392 chain (Gnaiger et al., 1998). Such a mechanism was described in mammals and its role would be  
393 to provide a buffer against the inhibition of the respiratory chain when CCO becomes oxygen  
394 limited. This increase in CCO catalytic capacity would be required to ensure an efficient  
395 thermodynamic gradient and free access of electrons to the ETC (Blier and Lemieux, 2001).  
396 CCO was also involved in changes in mitochondrial capacities during changes in environmental  
397 temperature and during metabolic depression in fish (Blier and Lemieux, 2001; Frick et al.,  
398 2010). Mechanisms regulating CCO activity can involve transcriptional, translational and  
399 allosteric regulation of the different CCO subunits as well as protein-phospholipid interactions  
400 (Stuart et al., 1998; Kraffe et al., 2007; Frick et al., 2010). In this context, cytochrome  
401 concentrations were expected to provide indications whether structural modifications were  
402 involved in adjustments of mitochondrial functions, as differences in the relative levels or  
403 concentrations of electron transport chain complexes could contribute to variability of the  
404 catalytic capacity of the mitochondria (Sidell, 1983; Guderley et al., 2005). Levels of  
405 cytochromes were quite constant during hypoxia exposure, although the relative concentration of  
406 cytochrome *a* (cyt *a*/cyt *c<sub>I</sub>* ratio) was significantly increased during re-oxygenation (seemingly  
407 linked to a decrease in the amount of cyt *c<sub>I</sub>*). Cytochrome *a* is one of the heme centres of subunit  
408 I of CCO, and cytochrome *c<sub>I</sub>* is a subunit of complex III. Thus, changes in their relative  
409 concentrations suggest that functional rearrangements of respiratory chain complexes may take  
410 place during re-oxygenation, which could in turn have reduced the capacity and activity of the  
411 classical respiratory pathway.

412 In hypoxia tolerant marine invertebrates, electron transfer through an alternative oxidase (AOX)  
413 was hypothesized to allow further control of the respiratory chain, to maintain cellular redox  
414 balance during oxygen fluctuations (Portner and Grieshaber, 1993; Abele, 2007). AOX branches  
415 off the classical respiratory chain before complex III, reducing oxygen without pumping protons  
416 in the inter-membrane space. Its role would be to maintain respiratory electron flux and cellular  
417 redox balance under metabolically down regulated conditions, or when oxygen levels within the  
418 cell start to rise because the classical respiratory chain is saturated with oxygen, minimizing the

419 risk of oxidative stress (Tschischka et al., 2000). AOX activity has been detected in various  
420 marine invertebrates (Tschischka et al., 2000; Buchner et al., 200; Pichaud et al., 2012), and the  
421 presence of its sequence was established in *C. gigas* and several bivalves (McDonald and  
422 Vanlerberghe, 2004; McDonald et al., 2009). In *C. gigas* an EST corresponding to the AOX  
423 sequence was first found in a hemocyte cDNA library coming from a bacterial challenge  
424 (Gueguen et al., 2003). Blast analysis on *C. gigas* AOX protein sequence (Genbank access  
425 ACL31211) indicates the presence of the typical AOX domain (ferritin-like diiron-binding  
426 domain) found in plants, fungi and protists. In the present study, AOX mRNA levels showed the  
427 same pattern in gills and digestive gland, but expression levels were higher in gills. This could  
428 suggest an important role of AOX in gills as the first sensor responding to oxygen fluctuations  
429 and having a high metabolic importance in regulating ion exchange. AOX mRNA levels were  
430 over-expressed in both gills and digestive gland after 12 h and 24 h of hypoxia and 1 h of re-  
431 oxygenation. Considering that AOX can be regulated at the transcriptional level (Vanlerberghe  
432 and McIntosh, 1997), these results support the hypothesis of a role of the AOX in fluctuating  
433 oxygen conditions in bivalves as proposed by Tschischka et al. (2000).

434 The respective contribution to overall rates of mitochondrial oxygen consumption of the classical  
435 and the alternative respiratory pathways has been generally investigated using respiratory chain  
436 inhibitors (KCN and SHAM, a specific inhibitor of CCO and AOX, respectively; Vanlerberghe  
437 and McIntosh, 1997). However, even in very well studied plant models, it is difficult to quantify  
438 their relative contributions using these inhibitors (Njogu et al., 1980; Bingham and Stevenson,  
439 1995). In preliminary trials, the use of SHAM to inhibit AOX in *C. gigas* was not conclusive,  
440 and might be due to non-specific effect of SHAM on CCO (Tschischka et al., 2000), or to AOX  
441 in oysters that would be not sensitive to SHAM (Donaghy et al., 2012). In the present study, we  
442 blocked the respiratory chain at complex III with antimycin A to assess the potential contribution  
443 of AOX to mitochondrial respiration. This inhibitor has previously been used to investigate AOX  
444 oxygen consumption (Albury et al., 2010; Pichaud et al., 2012). In the present study, Antimycin  
445 A inhibited about 85-90% of state 3 oxidation of glutamate in oyster gill mitochondria,  
446 suggesting that 10-15% of residual respiration could be attributed to AOX oxygen consumption.  
447 This observation is consistent with results observed on the sandworm *Nereis virens* (Pichaud et  
448 al., 2012). Furthermore, oxygen consumption by the “classical” respiratory pathway showed a  
449 decrease, albeit not significant (ANOVA p-value=0.087) in oyster mitochondria 1 h after re-  
450 oxygenation, indicating that AOX could be activated during re-oxygenation. AOX activity is  
451 controlled at the transcriptional level as well as by carbon availability, increased ROS production  
452 and redox potential (Vanlerberghe and McIntosh, 1997, Abele 2007), and reversible covalent

453 modification of specific carbon metabolites can also modify its activity (Vanlerberghe and  
454 McIntosh, 1997). In this context we can hypothesize that the increased AOX activity during re-  
455 oxygenation may be correlated to increased carbon availability, as the mitochondria are  
456 emerging from metabolic depression. Although our results suggest that an increased AOX  
457 activity 1 h after re-oxygenation can be associated with an increase in gene expression,  
458 mechanism of AOX regulations are not completely elucidated by this study, especially the  
459 relationship between increased AOX gene expression and higher AOX protein concentration.  
460 Moreover, we don't know if gene expression after 24 of hypoxia did reach its *plateau*. More time  
461 points in the hypoxic time series would help to answer this question. Furthermore, the increase  
462 of the alternative pathway 1 h after re-oxygenation may just be the result of a delay between  
463 gene expression increase during hypoxia and protein synthesis, representing therefore a  
464 carryover response of hypoxia. More time points in the re-oxygenation time series would help to  
465 answer this question. Although the evidence presented here suggests that AOX may play a role  
466 during hypoxia, the fact that AOX gene expression is only up-regulated after 12h of hypoxia,  
467 indicates that AOX adjustments are not a short-term response to hypoxia but would rather be  
468 regulated on persisting hypoxic conditions.

469

## 470 **Conclusions**

471

472 The lower level of oxygen in water seems to be a strong stimulus for gills to down-regulate  
473 mitochondrial capacities in the Pacific oyster. This study highlighted the plasticity of  
474 mitochondria that appear to be optimized to cope with sharp oxygen fluctuations. Overall, our  
475 results indicate that adjustments in mitochondrial oxidative capacities in oyster gills during  
476 hypoxia and re-oxygenation occur very quickly and are likely related to regulation of electron  
477 transport chain enzymes. Oyster gill mitochondria showed a remarkable sensitivity to O<sub>2</sub>  
478 variation as shown by the rapid decrease of their oxidative capacities (state 3 and 4 stimulated by  
479 glutamate) and CCO catalytic capacities. The analysis of alternative oxidase using both  
480 measurements of respiratory capacity and gene expression support the hypothesis of its existence  
481 in *C. gigas*, involved in response to oxygen fluctuation. To the best of our knowledge, no studies  
482 so far have dealt with AOX gene expression and its activity in molluscs faced with oxygen  
483 fluctuations, but further elucidation of AOX regulation within the respiratory chain in oyster  
484 mitochondria is necessary.

485

486

487 **Acknowledgements**

488 The authors want to thank Dr Helga Guderley from Université Laval for comments on the  
489 manuscript and editing the English language. Thanks to Sebastian Artigaud from the LEMAR  
490 laboratory for help with the experimental conditioning.

491

492 **Funding**

493 R. Sussarellu fellowship was funded by the French Research Ministry (Ministère de  
494 l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, M.E.S.R.). Funding for the experiment was  
495 provided by two projects in Europole Mer (research consortium on marine science and  
496 technology in Brittany, France): OxyGenes and LIPIDOMITO.

497

498 **References**

- 499 **Abele, D.** (2007). Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Front. Biosci.* **12**, 933.
- 500 **Albury, M. S., Elliott, C. and Moore, A. L.** (2010). Ubiquinol-binding site in the alternative  
501 oxidase: Mutagenesis reveals features important for substrate binding and inhibition.  
502 *BBA. Bioenergetics* **1797**, 1933–1939.
- 503 **Bingham, I. J. and Stevenson, E. A.** (1995). Causes and location of non-specific effects of  
504 SHAM on O<sub>2</sub> uptake by wheat roots. *Physiol. Plant.* **93**, 427–434.
- 505 **Bishop, T., St-Pierre, J. and Brand, M. D.** (2002). Primary causes of decreased mitochondrial  
506 oxygen consumption during metabolic depression in snail cells. *Am. J. Physiol. Regul.*  
507 *Integr. Comp. Physiol.* **282**, R372–R382.
- 508 **Blier, P. U. and Lemieux, H.** (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c  
509 oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *J. Comp.*  
510 *Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **171**, 247–253.
- 511 **Bouchard, P. and Guderley, H.** (2003). Time course of the response of mitochondria from  
512 oxidative muscle during thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J.*  
513 *Exp. Biol* **206**, 3455–3465.
- 514 **Brand, M. D.** (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing.  
515 *Exp. Gerontol.* **35**, 811–820.
- 516 **Bremer, K. and Moyes, C. D.** (2011). Origins of variation in muscle cytochrome c oxidase  
517 activity within and between fish species. *J. Exp. Biol.* **214**, 1888–1895.
- 518 **Bridges, C. R., Taylor, A. C., Morris, S. J. and Grieshaber, M. K.** (1984). Ecophysiological  
519 adaptations in *Blennius pholis* (L.) blood to intertidal rockpool environments. *J. Exp.*  
520 *Mar. Biol. Ecol.* **77**, 151–167.
- 521 **Buchner, T., Abele, D. and Pörtner, H.-O.** (2001). Oxyconformity in the intertidal worm  
522 *Sipunculus nudus*: the mitochondrial background and energetic consequences. *Comp.*  
523 *Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **129**, 109–120.
- 524 **Burcham, J., Paynter, K. and Bishop, S.** (1983). Coupled mitochondria from oyster gill tissue.  
525 *Mar. Biol. Lett.* **4**, 349–356.
- 526 **Buttemer, W. A., Abele, D. and Costantini, D.** (2010). From bivalves to birds: oxidative stress  
527 and longevity. *Funct. Ecol.* **24**, 971–983.
- 528 **Chance, B. and Williams, G. R.** (1956). Respiratory chain and oxidative phosphorylation. In  
529 *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, pp. 65–130. John  
530 Wiley & Sons.
- 531 **Chandel, N., Budinger, G. R., Kemp, R. A. and Schumacker, P. T.** (1995). Inhibition of  
532 cytochrome-c oxidase activity during prolonged hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol.*  
533 *Physiol.* **268**, L918–L925.
- 534 **Chandel, N. S., Budinger, G. R. S. and Schumacker, P. T.** (1996). Molecular oxygen  
535 modulates cytochrome c oxidase function. *J. Biol. Chem.* **271**, 18672–18677.

- 536 **Chandel, N. S., Budinger, G. R. S., Choe, S. H. and Schumacker, P. T.** (1997). Cellular  
537 respiration during hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 18808–18816.
- 538 **Cloern, J. E.** (2001). Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem.  
539 *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **210**, 223–253.
- 540 **David, E., Tanguy, A., Pichavant, K. and Moraga, D.** (2005). Response of the Pacific oyster  
541 *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J.* **272**,  
542 5635–5652.
- 543 **Dheilly, N., Lelong, C., Huvet, A. and Favrel, P.** (2011). Development of a Pacific oyster  
544 (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: Identification of reference genes and  
545 tissue-enriched expression patterns. *BMC Genomics* **12**, 468.
- 546 **Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A. K. and Soudant, P.** (2012).  
547 Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea*  
548 *gigas*: A Mitochondrial Involvement. *PLoS ONE* **7**, e46594.
- 549 **Duerr, J. M. and Podrabsky, J. E.** (2010). Mitochondrial physiology of diapausing and  
550 developing embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: implications for  
551 extreme anoxia tolerance. *J. Comp. Physiol. B.* **180**, 991–1003.
- 552 **Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J. Y., Minguant, C.**  
553 **and Le Pennec, M.** (2004). Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell  
554 development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 592 – 598.
- 555 **Frick, N. T., Bystriansky, J. S., Ip, Y. K., Chew, S. F. and Ballantyne, J. S.** (2010).  
556 Cytochrome c oxidase is regulated by modulations in protein expression and  
557 mitochondrial membrane phospholipid composition in estivating African lungfish. *Am. J.*  
558 *Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R608 –R616.
- 559 **Gerson, A. R., Brown, J. C. L., Thomas, R., Bernards, M. A. and Staples, J. F.** (2008).  
560 Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondrial metabolism in  
561 mammalian hibernation. *J. Exp. Biol.* **211**, 2689–2699.
- 562 **Gnaiger, E., Lassnig, B., Kuznetsov, A., Rieger, G. and Margreiter, R.** (1998). Mitochondrial  
563 oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome C oxidase. *J.*  
564 *Exp. Biol.* **201**, 1129–1139.
- 565 **Gray, J. S., Wu, R. S. and Or, Y. Y.** (2002). Effects of hypoxia and organic enrichment on the  
566 coastal marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **238**, 249–279.
- 567 **Grieshaber, M. K., Hardewig, I., Kreutzer, U. and Pörtner, H. O.** (1994). Physiological and  
568 metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 43–  
569 147.
- 570 **Groen, A. K., Wanders, R. J., Westerhoff, H. V., van der Meer, R. and Tager, J. M.** (1982).  
571 Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial  
572 respiration. *J. Biol. Chem.* **257**, 2754 –2757.
- 573 **Guderley, H.** (2004). Locomotor performance and muscle metabolic capacities: impact of  
574 temperature and energetic status. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **139**,  
575 371–382.

- 576 **Guderley, H., Turner, N., Else, P. L. and Hulbert, A. J.** (2005). Why are some mitochondria  
577 more powerful than others: Insights from comparisons of muscle mitochondria from  
578 three terrestrial vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **142**, 172–  
579 180.
- 580 **Gueguen, Y., Cadoret, J.-P., Flament, D., Barreau-Roumiguière, C., Girardot, A.-L.,**  
581 **Garnier, J., Hoareau, A., Bachère, E. and Escoubas, J.-M.** (2003). Immune gene  
582 discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-  
583 challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* **303**, 139–145.
- 584 **Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. and Vandesompele, J.** (2007). qBase  
585 relative quantification framework and software for management and automated analysis  
586 of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**, R19.
- 587 **Hochachka, P. W. and Lutz, P. L.** (2001). Mechanism, origin, and evolution of anoxia  
588 tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **130**, 435–459.
- 589 **Hochachka, P. W., Buck, L. T., Doll, C. J. and Land, S. C.** (1996). Unifying theory of  
590 hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving  
591 oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9493–9498.
- 592 **Kern, B., Ivanina, A. V., Piontkivska, H., Sokolov, E. P. and Sokolova, I. M.** (2009).  
593 Molecular characterization and expression of a novel homolog of uncoupling protein 5  
594 (UCP5) from the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae). *Comp.*  
595 *Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* **4**, 121–127.
- 596 **Kraffe, E., Marty, Y. and Guderley, H.** (2007). Changes in mitochondrial oxidative capacities  
597 during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane  
598 proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *J. Exp. Biol.* **210**, 149–165.
- 599 **Kraffe, E., Tremblay, R., Belvin, S., LeCoz, J.-R., Marty, Y. and Guderley, H.** (2008).  
600 Effect of reproduction on escape responses, metabolic rates and muscle mitochondrial  
601 properties in the scallop *Placopecten magellanicus*. *Mar. Biol.* **156**, 25–38.
- 602 **Kurochkin, I. O., Ivanina, A. V., Eilers, S., Downs, C. A., May, L. A. and Sokolova, I. M.**  
603 (2009). Cadmium affects metabolic responses to prolonged anoxia and reoxygenation in  
604 eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*  
605 **297**, R1262–R1272.
- 606 **Larade, K. and Storey, K. B.** (2002). Chapter 3 A profile of the metabolic responses to anoxia  
607 in marine invertebrates. In *Sensing, Signaling and Cell Adaptation*, pp. 27–46. Elsevier.
- 608 **Le Moullac, G., Quéau, I., Souchu, P. L., Pouvreau, S., Moal, J., Coz, J. R. L. and Samain,**  
609 **J. F.** (2007a). Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen  
610 level and temperature. *Mar* **3**, 357–366.
- 611 **Le Moullac, G., Bacca, H., Huvet, A., Moal, J., Pouvreau, S. and Van Wormhoudt, A.**  
612 (2007b). Transcriptional regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate  
613 carboxykinase in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during prolonged  
614 hypoxia. *J. Exp. Zool. A.Ecol. Genet. Physiol.* **307A**, 371–382.



- 615 **Leary, S. C., Lyons, C. N., Rosenberger, A. G., Ballantyne, J. S., Stillman, J. and Moyes, C.**  
616 **D.** (2003). Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. *Am. J. Physiol. Regul.*  
617 *Integr. Comp. Physiol.* **285**, R817–R826.
- 618 **Massabuau, J.-C.** (2001). From low arterial- to low tissue-oxygenation strategy. An  
619 evolutionary theory. *Respir. Physiol.* **128**, 249–261.
- 620 **McDonald, A. E. and Vanlerberghe, G. C.** (2004). Branched mitochondrial electron transport  
621 in the animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUBMB Life* **56**,  
622 333–341.
- 623 **McDonald, A. E., Vanlerberghe, G. C. and Staples, J. F.** (2009). Alternative oxidase in  
624 animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *J. Exp. Biol.* **212**, 2627–2634.
- 625 **Njogu, R. M., Whittaker, C. J. and Hill, G. C.** (1980). Evidence for a branched electron  
626 transport chain in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1**, 13–29.
- 627 **Pichaud, N., Rioux, P. and Blier, P. U.** (2012). In situ quantification of mitochondrial  
628 respiration in permeabilized fibers of a marine invertebrate with low aerobic capacity.  
629 *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **161**, 429–435.
- 630 **Pichavant, K., Person-Le-Ruyet, J., Le Bayon, N., Sévère, A., Le Roux, A., Quémener, L.,**  
631 **Maxime, V., Nonnotte, G. and Boeuf, G.** (2000). Effects of hypoxia on growth and  
632 metabolism of juvenile turbot. *Aquaculture* **188**, 103–114.
- 633 **Portner, H. and Grieshaber, M.** (1993). Critical PO<sub>2</sub> in oxyconforming and oxyregulating  
634 animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In *The*  
635 *vertebrate gas transport cascade-Adaptations to environment and mode of life*, pp. 330–  
636 357. Boca Raton: CRC Press.
- 637 **Schumacker, P. T., Chandel, N. and Agusti, A. G.** (1993). Oxygen conformance of cellular  
638 respiration in hepatocytes. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **265**, L395–L402.
- 639 **Sidell, B. D.** (1983). Cellular acclimatisation to environmental change by quantitative alterations  
640 in enzymes and organelles. In *Cellular Acclimatisation to Environmental Change*, pp.  
641 103–120. A.R. Cossins and P. Sheterline.
- 642 **Sokolova, I. M. and Sokolov, E. P.** (2005). Evolution of mitochondrial uncoupling proteins:  
643 novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP  
644 family. *FEBS Lett* **579**, 313–317.
- 645 **St-Pierre, J., Brand, M. and Boutilier, R.** (2000a). The effect of metabolic depression on  
646 proton leak rate in mitochondria from hibernating frogs. *J. Exp. Biol.* **203**, 1469–1476.
- 647 **St-Pierre, J., Tattersall, G. J. and Boutilier, R. G.** (2000b). Metabolic depression and  
648 enhanced O<sub>2</sub> affinity of mitochondria in hypoxic hypometabolism. *Am. J. Physiol. Regul.*  
649 *Integr. Comp. Physiol.* **279**, R1205–R1214.
- 650 **Stahlberg, A., Aman, P., Ridell, B., Mostad, P. and Kubista, M.** (2003). Quantitative Real-  
651 Time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of  $\kappa$  and  
652  $\lambda$  immunoglobulin light chain expression. *Clin. Chem.* **49**, 51–59.

- 653 **Storey, K. B.** (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**,  
654 1715–1733.
- 655 **Stuart, J. A., Gillis, T. E. and Ballantyne, J. S.** (1998). Compositional correlates of metabolic  
656 depression in the mitochondrial membranes of estivating snails. *Am. J. Physiol. Regul.*  
657 *Integr. Comp. Physiol.* **275**, R1977–R1982.
- 658 **Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E. and Moraga, D.** (2010).  
659 Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Mar.*  
660 *Genomics* **3**, 133–143.
- 661 **Sussarellu, R., Fabioux, C., Camacho Sanchez, M., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P.**  
662 **and Moraga, D.** (2012). Molecular and cellular response to short-term oxygen variations  
663 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **412**, 87–95.
- 664 **Tschischka, K., Abele, D. and Portner, H.** (2000). Mitochondrial oxyconformity and cold  
665 adaptation in the polychaete *Nereis pelagica* and the bivalve *Arctica islandica* from the  
666 Baltic and White Seas. *J. Exp. Biol.* **203**, 3355–3368.
- 667 **Turrens, J. F.** (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**, 335  
668 –344.
- 669 **Vanlerberghe, G. C. and McIntosh, L.** (1997). Alternative oxidase: from gene to function.  
670 *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **48**, 703–734.
- 671 **Williams, J. N.** (1964). A method for the simultaneous quantitative estimation of cytochromes a,  
672 b, c1, and c in mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 537–543.
- 673 **Wu, R. S. S.** (2002). Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Mar. Pollut.*  
674 *Bull.* **45**, 35–45.
- 675
- 676

677 **Table 1.** Phosphorylation capacity of mitochondria expressed as Respiratory Control Ratio (RCR, state  
678 3/state 4), and oxidative efficiency of mitochondria (ADP/O, ADP added *per* nmol of consumed oxygen).  
679 Differences between groups were tested for significance using Fisher's LSD test. Values are mean  $\pm$  the  
680 standard error (n=3).

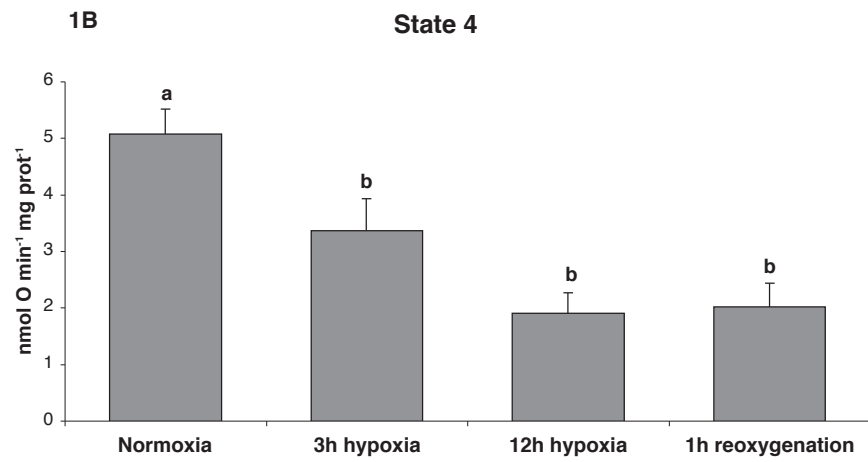
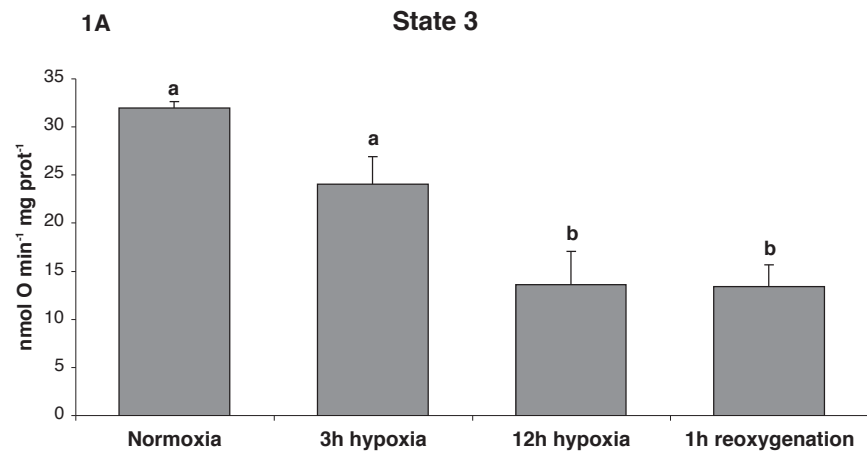
681  
682 **Table 2.** Concentrations of mitochondrial cytochromes *a*, *b*, *c<sub>1</sub>*, and *c* expressed as nmol cytochrome *per*  
683 mg of total mitochondrial proteins, and relative cytochrome ratios using *c<sub>1</sub>* as denominator. Small letters  
684 indicate differences between groups tested for significance using Fisher's LSD test. Values are mean  $\pm$  the  
685 standard error (n=3).

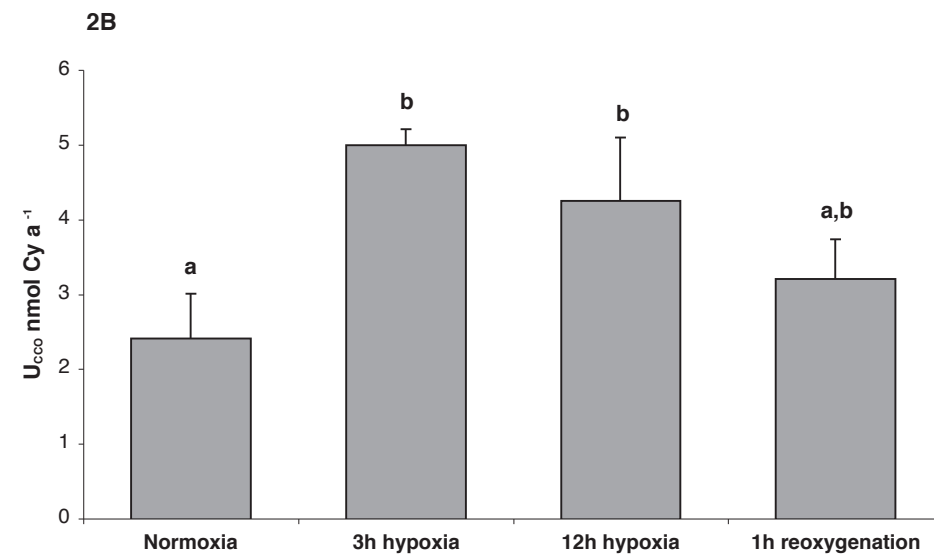
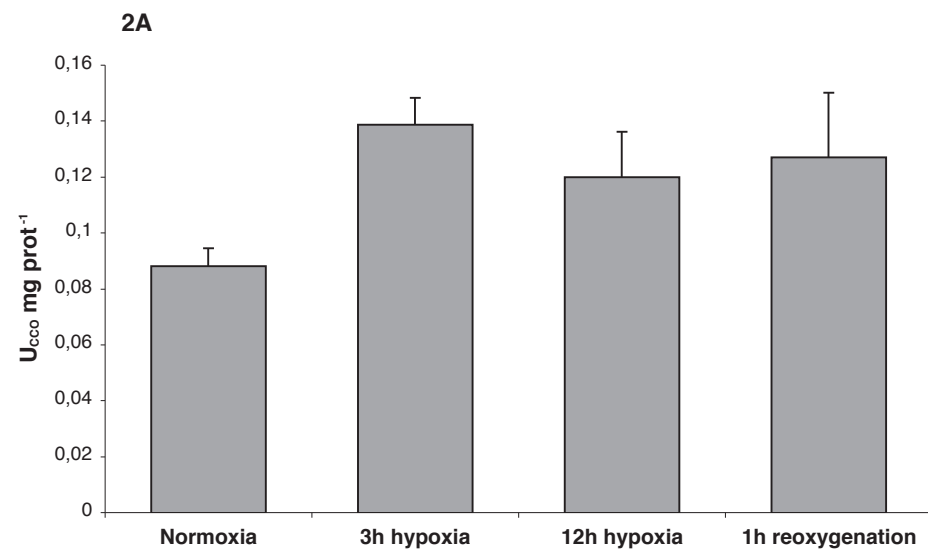
686  
687 **Figure 1.** State 3 (1A) and state 4 (1B) rates of mitochondrial respiration expressed as nmol of oxygen  
688 *per* minute *per* mg of total mitochondrial protein. Differences between groups were tested for significance  
689 using Fisher's LSD test. Values are mean  $\pm$  the standard error (n=3).

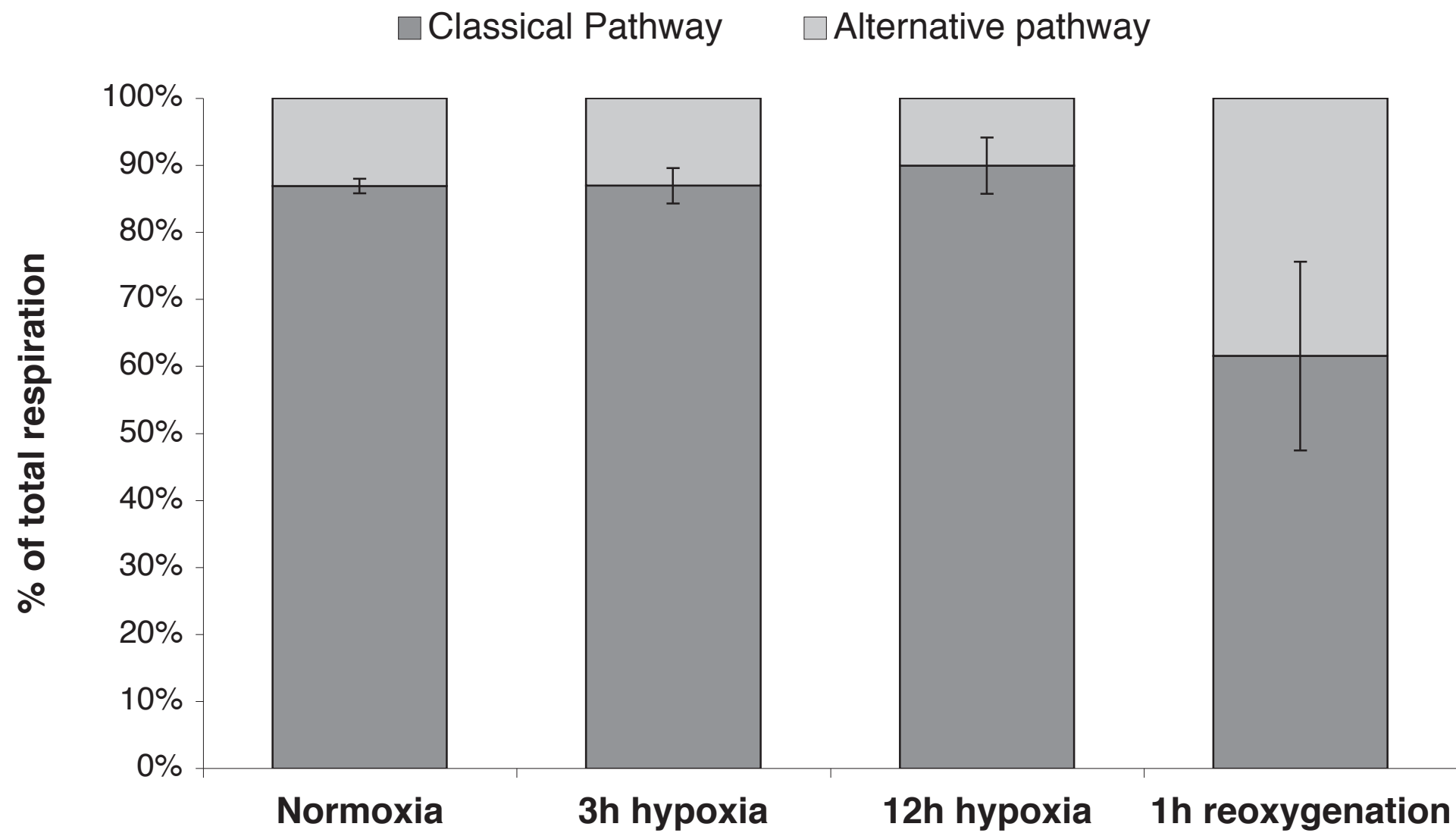
690  
691 **Figure 2.** Cytochrome c oxidase (CCO) activity expressed in  $U_{CCO}$  *per* mg total mitochondrial protein  
692 (2A), and  $U_{CCO}$  *per* nmol of cytochrome *a* (2B).  $U_{CCO}$ = $\mu$ mol cytochrome *c* reduced *per* min. Differences  
693 between groups are defined by using Fisher's LSD test. Values are mean  $\pm$  the standard error (n=3).

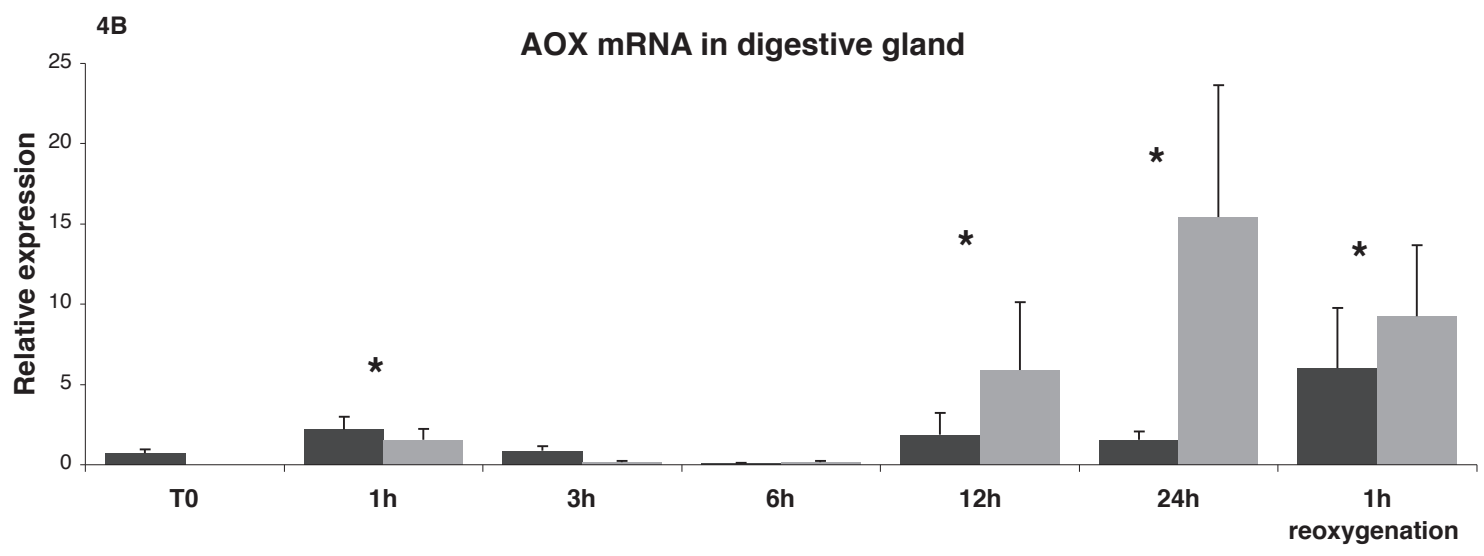
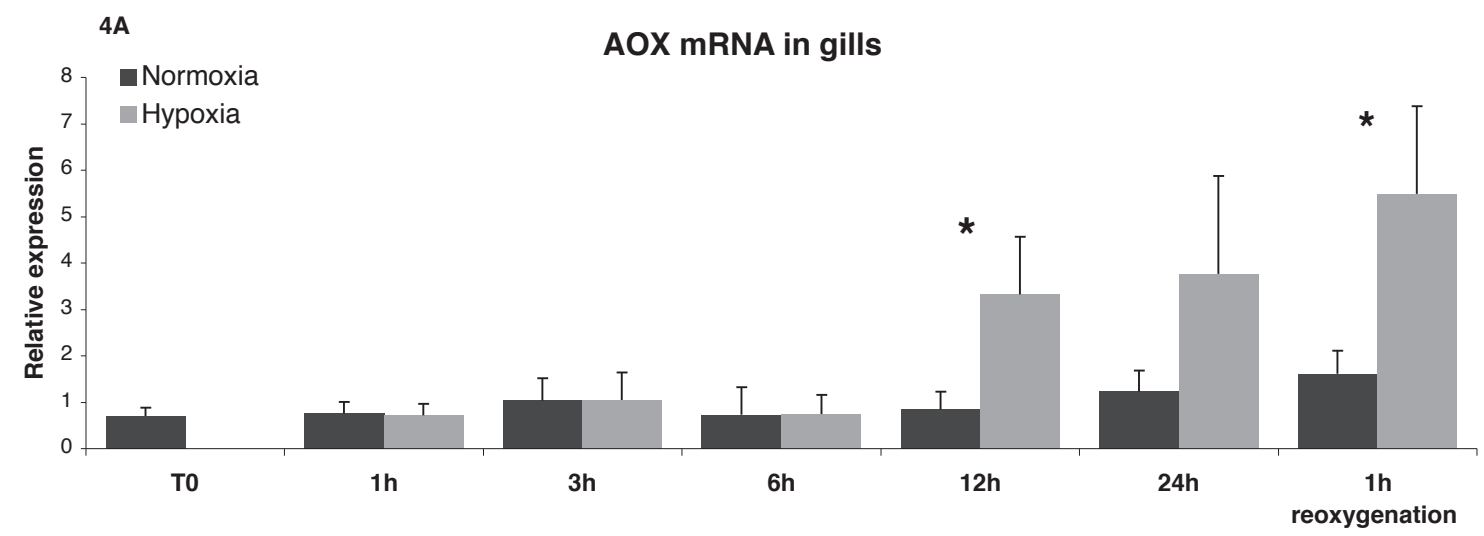
694  
695 **Figure 3.** Percentage contribution to mitochondrial oxygen consumption of the classical and alternative  
696 pathways. Dark grey bars represent the percentage of inhibition of state 3 rates by antimycin A (20  $\mu$ M).  
697 Light grey bars represent the hypothetical percentage of alternative pathway respiration. Values are mean  
698  $\pm$  the standard error (n=3).

699  
700 **Figure 4.** AOX mRNA relative expressions for gills (4A) and digestive gland (4B). Results are expressed  
701 as the relative expression to the geometric mean of the two reference genes used. Asterisks indicate  
702 significant differences between hypoxic and normoxic samples within one time of sampling (Mann-  
703 Whitney U test). Values are mean  $\pm$  the standard error (n=8).









	<b>RCR</b>	<b>ADP/O</b>
Controls	6.38 ±0.50	2.18 ±0.03 <sup>a</sup>
3h hypoxia	7.31 ±0.77	2.04 ±0.08 <sup>a</sup>
12h hypoxia	7.05 ±0.56	2.86 ±0.29 <sup>b</sup>
1h reoxygenation	6.84 ±0.90	2.96 ±0.26 <sup>b</sup>



	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c1</i>	<i>c</i>
Normoxia	0.04 ±0.01	0.19 ±0.02	0.11 ±0.01	0.06 ±0.00
3h hypoxia	0.03 ±0.00	0.22 ±0.05	0.09 ±0.01	0.06 ±0.02
12h hypoxia	0.03 ±0.00	0.18 ±0.01	0.09 ±0.02	0.05 ±0.01
1h reoxygenation	0.04 ±0.01	0.14 ±0.02	0.06 ±0.01	0.05 ±0.01

**Relative cytochrome quantities**

	<i>a/c1</i>	<i>b/c1</i>	<i>c/c1</i>
Normoxia	0.31 ±0.04 <sup>a</sup>	1.70 ±0.05	0.45 ±0.07
3h hypoxia	0.22 ±0.04 <sup>a</sup>	2.02 ±0.20	0.41 ±0.08
12h hypoxia	0.29 ±0.05 <sup>a</sup>	1.82 ±0.10	0.41 ±0.03
1h reoxygenation	0.54 ±0.01 <sup>b</sup>	2.12 ±0.01	0.61 ±0.05



## Résumé

Tout d'abord considérés comme simples composants d'une barrière imperméable, il a été démontré que les lipides membranaires auraient en fait un rôle biologique bien plus important, pouvant modifier l'environnement des enzymes membranaires et moduler l'activité de ces dernières. Dans la thèse présentée ici, ces relations ont été étudiées dans les mitochondries de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les bivalves subissent d'importants changements environnementaux et l'adaptation à ces changements peut passer par un remodelage des membranes, ce qui fait de ces animaux des modèles intéressants pour les études des relations entre la structure des membranes et les activités d'enzymes associées. Des huîtres ont été nourries en éclosérie avec deux régimes d'algues monospécifiques, *T-Iso* et *Chaetoceros gracilis*, et un mélange équilibré de ces deux algues. Malgré d'importantes modifications de composition en acides gras induites par les différents régimes alimentaires, une grande stabilité des processus membranaires mitochondriaux a été observée. D'un autre côté, la comparaison entre des huîtres élevées en éclosérie et des huîtres élevées dans leur milieu naturel a révélé d'importantes modifications de capacités mitochondriales, qui pourraient être liées à une modulation des classes de phospholipides et de leur insaturation. Ces différences ne peuvent pas s'expliquer par une influence des cycles tidaux dans la mesure où, malgré un changement de production d'ATP, l'activité des mitochondries a été montrée comme étant similaire chez les huîtres collectées en émergence et en immersion. L'homéostasie mitochondriale observée dans cette étude pourrait être un moyen pour les huîtres de faire face aux variations biotiques (disponibilité en nourriture) et abiotiques (disponibilité en oxygène) de l'environnement naturel de *C. gigas*, et de maintenir leurs fonctions physiologiques malgré ces variations.

## Abstract

First considered as simple components of an impermeable barrier, it has been shown that membrane lipids would have a more important biological role. These lipids could modify the environment of membrane enzymes and modulate their activity. In this thesis, these relationships have been studied in mitochondria of the oyster *Crassostrea gigas*. Bivalves undergo major environmental changes and adaptation to these changes may require a membrane remodelling, which makes these animals interesting models to study the relationship between membrane structure and membrane processes. In this study oysters were fed in hatchery with two monospecific algal diets, *T-Iso* and *Chaetoceros gracilis*, and an equilibrated mix of both algae. Despite significant changes in fatty acid composition induced by these diets, mitochondrial capacities remained stable. On the other hand, the comparison between hatchery-reared oysters and oysters reared in their natural environment revealed significant changes in mitochondrial capacity, which could be related to modulation of phospholipid class composition and unsaturation. These differences can not be explained by the influence of tidal cycles. Indeed, despite a change in ATP production, mitochondrial activity was shown to be similar in oysters collected during emergence and immersion. Mitochondrial homeostasis observed in this study could be a way for oysters to cope with biotic (food availability) and abiotic (oxygen availability) variations in the natural environment of *C. gigas*, and to maintain their physiological functions despite these variations.