



UNIVERSITE de CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

ECOLE DOCTORALE : Normande Chimie-Biologie



THESE

présentée par

Melle Marie PRUDENCE

et soutenue

le 20 avril 2006

en vue de l'obtention du

DOCTORAT de l'UNIVERSITE de CAEN

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions

(Arrêté du 25 avril 2002)

Caractérisation de marqueurs génétiques fonctionnels de la nutrition et/ou de l'adaptation (les amylases) chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : intérêts pour la sélection

MEMBRES du JURY

Mr Pierre BOUDRY	Cadre de recherche, Ifremer, La Tremblade	Rapporteur
Mr Jean-Yves TOULLEC	Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie de Paris VI	Rapporteur
Mr Michel MATHIEU	Professeur, Université de Caen	Président du jury
Mr Pascal FAVREL	Professeur, Université de Caen	Examineur
Mr Alain VAN WORMHOUDT	Directeur de recherche, CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle de Concarneau	Examineur
Mr Jean-François SAMAIN	Cadre de recherche, Ifremer, Brest	Directeur de thèse



Avant-propos

Ces travaux de recherche ont été effectués dans le cadre de l'Unité Mixte de Recherche Ifremer 100 « Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins », au Laboratoire de Physiologie des Invertébrés du centre Ifremer de Brest, sous la direction de Monsieur Jean-François SAMAIN.

Ce travail de thèse a été financé par le Conseil Régional de Basse-Normandie et l'Ifremer.



Remerciements

Au terme de la rédaction, je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

Je remercie particulièrement,

Monsieur le Professeur Michel MATHIEU de m'avoir accueillie au sein de son Unité Mixte de Recherche Ifremer 100 « Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins », d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'en être le président.

Monsieur Jean-Louis NICOLAS de m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse au sein de son laboratoire, le Laboratoire de Physiologie des Invertébrés (LPI), au centre Ifremer de Brest.

Monsieur Jean-François SAMAIN de m'avoir confié ce sujet d'étude et pour ses conseils prodigués au cours de ces années. Je lui suis très sincèrement reconnaissante.

Madame Jeanne MOAL et Monsieur Arnaud HUVET de m'avoir fait profiter de leurs connaissances scientifiques et pour leur aide très précieuse.

Toutes les personnes du LPI (permanents et stagiaires) d'avoir accepté, avec sympathie et à plusieurs reprises, de participer aux échantillonnages d'huîtres, et particulièrement Madame Claudie QUERE et Monsieur Jean-Yves DANIEL pour leur contribution technique à la réalisation d'analyses.

Monsieur Lionel DEGREMONT de la station Ifremer de la Tremblade pour les huîtres et sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Toutes les équipes techniques des stations Ifremer d'Argenton (et particulièrement Messieurs Christian MINGANI, Pierrick LE SOUCHU, Loïc KERSAUDY, Jean-Paul CONNAN, Bertrand LE ROY et Madame Isabelle QUEAU) et de Bouin (et particulièrement

Monsieur Max NOURRY) de m'avoir permis de produire des familles génétiques nécessaires à la réalisation d'un suivi en milieux naturels et de disposer d'huîtres sous conditions contrôlées.

Tous les membres des stations Ifremer de La Trinité-sur-Mer (et particulièrement Messieurs Edouard BÉDIER et Aimé LANGLADE) et de Port-en-Bessin (et particulièrement Monsieur Michel ROBERT et Madame Virginie HUGONNET) pour leur participation active dans la maintenance des familles génétiques à Fort-Espagnol et en Baie des Veys.

Monsieur Jean-François TOULORGE de la Société Atlantique de Mariculture (SATMAR) d'avoir accepté de stocker plusieurs lots d'huîtres à l'Aber-Wrac'h et pour son intérêt porté aux expérimentations.

Monsieur Marcel KOKEN de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) de Brest de m'avoir initiée au western-blot.

Monsieur Pierre BOUDRY, Cadre de Recherche à la station Ifremer de la Tremblade, et Monsieur Jean-Yves TOULLEC, Maître de Conférences à l'Université Pierre et Marie Curie de Paris VI, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Monsieur Pascal FAUREL, Professeur à l'Université de Caen, et Monsieur Alain VAN WORMHOUDI, Directeur de Recherche au CNRS du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) de Concarneau, de m'avoir fait l'honneur d'être membres du jury de cette thèse.

Le Conseil Régional de Basse-Normandie et l'Ifremer pour leur soutien financier apporté sous forme de bourse.

Je voudrais enfin remercier ma famille, et particulièrement mes parents, ma sœur, mon frère pour leur confiance et leur soutien tout au long de mon cursus universitaire, et Jean d'être toujours à mes côtés. Un grand merci également à tous mes amis, et particulièrement à Odile (et ses parents), Béatrice, Lia, Stéphanie, Manon, Céline, Julien, Sylvain, Thierry et Christophe pour leur grande écoute et leurs paroles réconfortantes.

À mes parents,

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
1. Problématique de l'étude.....	2
2. Objectifs et plan de thèse	6
PRESENTATION DU MODELE BIOLOGIQUE, L'HUITRE DU PACIFIQUE	
<i>CRASSOSTREA GIGAS</i>.....	8
1. Position systématique.....	9
2. Répartition géographique.....	9
3. Historique de l'ostréiculture française.....	10
4. Anatomie	11
4.1. Coquille	12
4.2. Manteau, cavité palléale et branchies.....	12
4.3. Appareils circulatoire et excréteur	13
4.4. Système nerveux et organes sensoriels	14
5. Nutrition et digestion	14
5.1. Habitude alimentaire	14
5.2. Prise de nourriture et régulation	14
5.3. Appareil et équipement enzymatique digestifs	15
6. Reproduction	17
6.1. Hermaphrodisme	17
6.2. Cycle de reproduction et régulation	17
7. Cycle de développement.....	18
8. Pratiques d'élevage	20
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	22
1. Digestion-Assimilation	23
1.1. Digestion : étape-clé de la nutrition	23
1.2. Enzymes digestives	23
1.2.1. Lieux de synthèse	23
1.2.2. Synthèse et régulation	24
1.2.3. Fonctions	26
1.2.4. Régulation nutritionnelle des enzymes digestives chez les vertébrés	26
1.2.4.1. Adaptation nutritionnelle.....	26
1.2.4.2. Mécanismes d'adaptation pancréatique	28
1.2.4.3. Régulation moléculaire de l'adaptation pancréatique	29
1.2.5. Régulation nutritionnelle des enzymes digestives chez quelques invertébrés : adaptation et mécanismes.....	30
1.2.6. Régulation des enzymes digestives par d'autres facteurs (stade de développement, température) : adaptation et mécanismes	31

2. Amylases.....	32
2.1. Historique.....	32
2.2. Amylases animales (α -amylases).....	33
2.2.1. Lieux de synthèse.....	33
2.2.2. Propriétés catalytiques et structurales.....	36
2.2.3. Structure de la protéine.....	37
2.2.4. Structure du gène.....	39
2.2.4.1. Alternance exon/intron.....	39
2.2.4.2. Copies multiples.....	39
2.2.4.3. Liaisons.....	40
2.2.5. Formes multiples des enzymes.....	41
2.2.6. Relations polymorphisme/fonction.....	41
2.2.6.1. Poisson.....	41
2.2.6.2. Poulet.....	42
2.2.6.3. Drosophile.....	43
2.2.6.4. Crevette.....	44
1. MATERIEL ET METHODES.....	45
1. Matériel biologique.....	46
2. Élevages contrôlés : production de familles amylase bi-parentales et d'un pool amylase multi-parental.....	47
2.1. Mise en maturation des géniteurs.....	47
2.2. Fécondation et embryogenèse.....	48
2.3. Elevage larvaire.....	49
2.4. Micronurserie.....	50
2.5. Nurserie.....	51
3. Préparation des échantillons biologiques.....	52
3.1. Embryons/larves.....	52
3.2. Adultes.....	52
3.2.1. Glandes digestives, expérimentations « quantité trophique et température », « qualité trophique » et « suivi <i>in situ</i> ».....	52
3.2.2. Biopsie des géniteurs, expérimentation « suivi <i>in situ</i> ».....	53
4. Analyses.....	53
4.1. Biologie moléculaire.....	53
4.1.1. Extraction d'ADN au chelex.....	53
4.1.2. Extraction, traitement à la DNase I et quantification des ARN totaux.....	53
4.1.3. PCR-RFLP.....	54
4.1.3.1. Principe.....	54
4.1.3.2. Amplification par PCR.....	56
4.1.3.3. Digestion par une enzyme de restriction.....	57
4.1.4. Transcription inverse.....	58
4.1.5. PCR en temps réel.....	60
4.1.5.1. Principe.....	60
4.1.5.2. Amplification et détection au SyBR Green.....	62
4.1.5.3. Courbe de fusion.....	64
4.1.5.4. Quantification relative.....	64

4.2. Biochimie	65
4.2.1. Extraction des protéines hydrosolubles	65
4.2.2. Dosage de l'activité amylase	65
4.2.3. Dosage du K_M	66
4.2.4. Electrophorèses de protéines : électrophorèse sur gel d'agarose et isoélectrofocalisation	67
4.2.4.1. Electrophorèse sur gel d'agarose	68
4.2.4.2. Isoélectrofocalisation	68
4.2.4.3. Coloration et analyse des gels	68
5. Traitements statistiques	69
6. Mise au point d'une méthode de supplémentation d'amidon	70
6.1. Liste des paramètres mesurés sur l'amidon	70
6.2. Origine de l'amidon	70
6.2.1. Estimation de la taille de l'amidon	71
6.2.2. Digestion <i>in vitro</i> de l'amidon	71
6.2.3. Ingestion de l'amidon	73
CHAPITRE I : Régulation de l'amylase au cours de l'ontogenèse	77
1. Introduction	78
2. Matériels et Méthodes	79
2.1. Croisements contrôlés, élevages larvaire et post-larvaire	79
2.2. Stratégies d'échantillonnage	79
3. Résultats	80
3.1. Choix de la méthode de quantification des ARNm	80
3.2. Profils d'expression des amylases A et B au cours des différents stades de développement de <i>C. gigas</i>	82
3.2.1. Embryogenèse de 0 à 48 haf (larve D)	82
3.2.1.1. Niveaux des transcrits	82
3.2.1.2. Niveau d'activité spécifique	82
3.2.2. Développement larvaire du 2 à 27 jaf (post-larve)	84
3.2.2.1. Niveaux des transcrits	84
3.2.2.2. Niveau d'activité spécifique	84
4. Discussion	86
4.1. Invalidation du gène de référence (facteur d'élongation)	86
4.2. Embryogenèse de 0 à 48 haf (larve D)	86
4.3. Développement larvaire jusqu'à la métamorphose	88
4.4. A la métamorphose	88
4.5. Existe-t-il une corrélation entre les niveaux d'ARN et d'activité enzymatique ?	89
5. Conclusion	89

**CHAPITRE II : Régulation de l'amylase par la quantité trophique
et par la température 90**

1. Introduction	91
2. Matériels et Méthodes	92
3. Résultats	93
3.1. Choix de la méthode de quantification des ARNm	93
3.2. Effet de la quantité trophique	95
3.2.1. Sur les transcrits des gènes amylase A et B	95
3.2.2. Sur l'activité amylase spécifique	95
3.2.3. Sur les bandes d'IEF	97
3.2.4. Sur le K_M	100
3.2.5. Sur l'indice de glande digestive	101
3.3. Effet de la température	102
3.3.1. Sur les transcrits des gènes amylase A et B	102
3.3.2. Sur l'activité amylase spécifique	102
3.3.3. Sur les bandes d'IEF	103
3.3.4. Sur le K_M	103
3.3.5. Sur l'indice de glande digestive	103
4. Discussion	103
4.1. Quels sont les effets régulateurs de la quantité trophique ?	103
4.2. Quels sont les effets régulateurs de la température ?	105
5. Conclusion	106

CHAPITRE III : Régulation de l'amylase par la qualité trophique 107

1. Introduction	108
2. Matériels et Méthodes	109
3. Résultats	110
3.1. Choix de la méthode de quantification des ARNm	110
3.2. Niveaux des transcrits des gènes amylase A et B	112
3.3. Activité amylase spécifique	114
3.4. Sur les bandes d'IEF	115
3.5. K_M de l'amylase	117
3.6. Indice de chair	117
4. Discussion	119
4.1. Les fortes concentrations d'amidon agissent sur l'expression du gène amylase B	119
4.2. Les fortes concentrations d'amidon induisent une augmentation du K_M du mélange des amylases totales	120
4.3. Le changement de K_M implique un changement de protéine	121
4.4. Régulation de A et de B en réponse à l'augmentation de l'amidon dans le régime	123
4.5. Adaptation des amylases, nutrition et croissance	125
5. Conclusion	126

CHAPITRE IV : Etude <i>in situ</i> des relations polymorphisme/fonction associées aux gènes de l'amylase	128
1. Introduction	129
2. Matériels et Méthodes	130
2.1. Echantillonnage des géniteurs	130
2.2. Réalisation des familles	130
2.2.1. Croisement contrôlé, élevages larvaire et post-larvaire	130
2.2.2. Choix des familles	131
2.2.3. Suivi <i>in situ</i> : plan d'expérience et stratégie d'échantillonnage	131
3. Résultats	132
3.1. Liaison des gènes amylase	132
3.2. Survie	132
3.3. Croissance et rendement estimé	134
3.4. Paramètres enzymatiques	136
4. Discussion	137
4.1. Liaison des deux gènes amylase chez l'huître	137
4.2. Effet environnemental sur la survie et la croissance	138
4.3. Polymorphisme de l'amylase et ses relations avec la croissance et le rendement	139
4.4. L'activité amylase spécifique peut expliquer en partie les différences de croissance observées entre les génotypes amylase	140
5. Conclusion	141
DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES.....	142
1. Fonctionnement et régulation du double système amylase gène-enzyme	143
1.1. Au cours de l'ontogenèse	143
1.2. Effets de la quantité trophique	143
1.3. Effets de la température.....	144
1.4. Effets de la qualité trophique	145
2. Mécanismes de variation dans l'abondance en ARNm amylase.....	146
2.1. Nombre de copies de gènes	146
2.2. Transcription des gènes	147
2.3. Instabilité des ARNm	147
3. Relations polymorphisme/fonction associées aux gènes de l'amylase	148
4. Prospectives.....	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	150
ANNEXES.....	175
LISTE DES ABREVIATIONS	197

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

1. Problématique de l'étude

En 2001, la France a produit un peu plus de 126 000 tonnes (t) d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et elle occupe le premier rang des producteurs européens et le quatrième rang mondial après la Chine ($\approx 3\,500\,000$ t), le Japon ($\approx 231\,000$ t) et la Corée du Sud ($\approx 174\,000$ t) (FAO, 2003). Cette activité conchylicole exploite une superficie de 14 180 hectares du littoral français et concerne 3 329 entreprises (Agreste Primeur, 2003). Malgré ce succès, l'espèce *C. gigas* n'est pas pour autant domestiquée en France : aucun plan de sélection génétique ne lui a été appliqué et elle présente une grande variabilité de croissance, qui constitue un problème important pour la production aquacole de cette espèce.

La croissance des espèces, *e.g.* *C. gigas*, apparaît comme une fonction physiologique qui dépend de 2 composantes, la première est environnementale, la seconde est probablement génétique (Dégremont *et al.*, 2005).

En effet, la croissance des huîtres est d'une part dépendante de la ressource trophique. Des différences de croissance sont observées entre les régions de production, les meilleures croissances étant enregistrées en baie des Veys, dans l'Aber-Benoît et surtout dans l'étang de Thau (Fleury *et al.*, 2001). Dans le bassin de Marennes-Oléron, la croissance y est relativement faible et le cycle d'élevage y est par conséquent rallongé, phénomène économiquement et biologiquement néfaste (Héral *et al.*, 1998). Ceci peut s'expliquer par une surcharge des parcs, entraînant une limitation trophique dans le milieu (Héral, 1989). Des conditions trophiques limitées conduisent à un affaiblissement de l'état physiologique des huîtres qui, par conséquent, n'ont plus les moyens de lutter contre une agression provenant du milieu, augmentant ainsi le risque d'épizooties (Deslous-Paoli *et al.*, 1982).

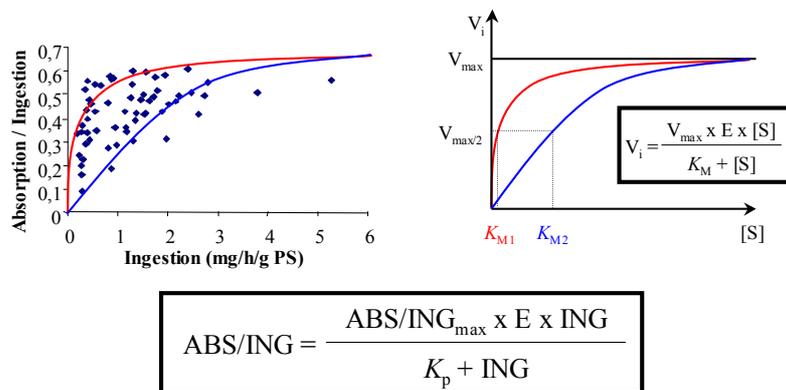
D'autre part, la croissance des huîtres est dépendante de leurs caractéristiques génétiques. La croissance varie énormément parmi des individus élevés sous des conditions environnementales communes (Collet *et al.*, 1999 ; Boudry *et al.*, 2003). Leitão *et al.* (2001)

ont montré, chez des huîtres creuses *C. gigas* sauvages et cultivées, la présence d'aneuploïdie (anomalie cytogénétique caractérisée par une variation du nombre de chromosomes, $2n = 20$ chez *C. gigas*) et sa relation négative avec la croissance : les huîtres à croissance lente montrent toujours plus d'aneuploïdie que des huîtres à croissance rapide. Les huîtres triploïdes ($3n$) présentent une croissance supérieure à celle des huîtres diploïdes ($2n$) (Guo *et al.*, 1996 ; Gouletquer *et al.*, 1996), permettant une commercialisation plus précoce.

L'adaptation des huîtres aux différents niveaux trophiques peut permettre d'améliorer leur croissance. Il est ainsi choisi de rechercher des souches plus performantes sur leur efficacité d'utilisation de la nourriture disponible, c'est-à-dire sur leurs capacités à digérer et à assimiler la nourriture. A terme, il sera possible d'étudier si des huîtres mieux adaptées aux conditions nutritives présentent aussi une meilleure capacité de défense face aux agressions, ce qui en feraient des bons candidats de sélection.

Ce choix de stratégie s'est notamment appuyé sur des résultats obtenus dans le cadre du programme européen GENEPHYS (génétique et physiologie chez *C. gigas*), montrant que les variations de croissance observées sur des huîtres issues de trois populations naturelles (Arcachon, Port des Barques, Bonne Anse) pouvaient s'expliquer par les variations du rapport entre le taux d'assimilation et le taux de respiration (GENEPHYS, 1997). Les individus présentant des croissances élevées avaient à la fois une forte assimilation et une faible respiration. Par ailleurs, ces huîtres, qui étaient pourtant placées dans les mêmes conditions d'apport trophique, présentaient des rendements d'assimilation (rapport entre le taux d'assimilation et le taux d'ingestion) très variables pour un même taux d'ingestion, en particulier, quand ce dernier était faible (GENEPHYS, 1997). Des résultats similaires ont été rapportés par Bayne (1983) pour les taux de croissance et d'ingestion chez *Mytilus edulis*. En considérant le rôle des enzymes digestives dans la digestion et, donc, dans l'assimilation, Samain *et al.* ont suggéré que des différences dans l'équipement enzymatique pouvaient être à l'origine de ces observations (GENEPHYS, 1997). Une relation, du type Michaelis-Menten, a ainsi été établie chez *C. gigas* permettant de modéliser le rendement d'assimilation comme étant une fonction dépendante à la fois de l'activité spécifique de deux enzymes digestives qui sont l'amylase et la laminarinase, du taux d'ingestion et de la constante physiologique ou K_P (intégrant la constante apparente d'affinité ou constante de Michaelis-Menten ou K_M des enzymes) (figure 1 ; GENEPHYS, 1997). Des relations de même type ont été validées auparavant chez *Artemia* et les larves de *Pecten maximus* (Samain *et al.*, 1981, 1991). Ces

relations montrent que (1) le rendement d'assimilation est maximal quand le taux d'ingestion est très important, (2) le rendement d'assimilation est lié de façon linéaire à l'activité des enzymes digestives quand le taux d'ingestion est faible, (3) le rendement d'assimilation peut être augmenté, pour un même taux d'ingestion, si la quantité d'enzymes digestives augmente ou si la constante physiologique diminue. Parmi les huîtres ayant servi à cette étude, ce modèle a permis de distinguer deux groupes aux K_p différentes, donc, aux K_M des enzymes différentes. Le modèle prédit que les huîtres disposant d'un équipement enzymatique de grande affinité pour son substrat (K_M faible) sont bien adaptées aux conditions trophiques faibles (limitantes). Par contre, les huîtres disposant d'un équipement enzymatique de petite affinité pour son substrat (K_M fort) sont bien adaptées aux conditions trophiques fortes ou ne sont pas adaptées aux conditions trophiques faibles.



- ABS/ING : efficacité d'absorption
- ABS/ING_{max} : efficacité d'absorption maximale
- E : activité spécifique (amylase et laminarinase)
- ING : taux d'ingestion
- K_p : constante physiologique intégrant la constante de Michaelis-Menten ou K_M des enzymes

Figure 1. Modèle expérimental du rendement d'assimilation

Ces résultats confirmaient l'intérêt porté à l'étude des enzymes digestives concernant leur implication dans les performances d'assimilation de l'animal, et ceci dans un environnement trophique donné. Il devenait par conséquent nécessaire, chez *C. gigas*, de caractériser les enzymes digestives aux niveaux génétique et protéique, et de connaître les processus de régulation de leur synthèse pour pouvoir étudier les relations entre les activités des enzymes digestives, les performances d'assimilation et de croissance.

Dans le modèle biologique *C. gigas*, c'est l'amylase (une α -(1-4) glucanase) qui a été choisie comme enzyme modèle compte tenu (1) qu'elle catalyse la première étape de digestion des polymères glucidiques (amidon et glycogène), de ce fait, cette hydrolyse constitue un facteur limitant de la digestion des sucres (Slaughter *et al.*, 2001), (2) qu'elle est fortement représentée dans le système digestif de cette espèce à tendance phytophage (Morton, 1983 ; Boucaud-Camou *et al.*, 1983 ; Moal *et al.*, 2000) et (3) que des données moléculaires et biochimiques la concernant sont largement disponibles (contrairement à la laminarinase, une β -(1-3) glucanase). En effet, les séquences nucléotidiques des gènes amylase ont été déterminées chez plusieurs espèces incluant les bactéries (Palva, 1982), les champignons (Tsukagoshi *et al.*, 1989), les insectes (Boer et Hickey, 1986 ; Grossman *et al.*, 1997 ; Da Lage *et al.*, 2000), les crustacés (Van Wormhoudt et Sellos, 2003), les mammifères (Schibler *et al.*, 1982 ; Nakamura *et al.*, 1984) et les plantes (Rogers et Milliman, 1983), il en est de même pour les séquences et structures des protéines amylase (Nakajima *et al.*, 1986 ; Janeček, 1994, 1997).

Chez *C. gigas*, Sellos *et al.* (2003) ont caractérisé et séquencé deux gènes A et B, codant deux amylases différentes. En comparant les deux gènes, 10 % de nucléotides sont différents au niveau des exons et en comparant les séquences peptidiques déduites à partir des ADNc (ADN complémentaires), 10,4 % des acides aminés sont différents entre l'amylase A et l'amylase B ; les points isoélectriques (pI) des deux amylases sont très similaires (7,32 pour A et 7,28 pour B). Ces deux gènes présentent une organisation similaire avec 8 exons et 7 introns. Dans les populations françaises, ces gènes sont polymorphes sur une portion recouvrant les exons 4 à 6 : 6 et 4 allèles ont été décrits pour respectivement les gènes A et B, par PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) en utilisant l'enzyme *EcoRI*. Dans les populations de *C. gigas* analysées, certains allèles sont apparus fréquents (A1 (70-80 %), A2 (10 %), B1 (>75 %)) et d'autres sont rares (A3, A4, A5, A6, B2, B3 et B4).

Dans une étude préliminaire, Dégremont (2000) a montré que la valeur du K_M de l'amylase augmentait avec le niveau trophique, et ce pour un même génotype de *C. gigas*. Ceci pouvait résulter d'une expression différentielle des deux gènes et/ou des allèles en fonction du niveau trophique, produisant des amylases aux K_M différents. De plus, des différences physiologiques (d'adaptation) sont observées entre deux des génotypes testés selon la quantité trophique. Ainsi, le génotype A2A2B1B5 présente les meilleures performances pour le taux d'ingestion, le rendement d'assimilation et le taux de croissance

relative en milieu trophique riche, mais il devient le moins performant en milieu trophique pauvre. Inversement, le génotype A1A1B1B1, qui présente les plus faibles performances en milieu trophique riche, devient le plus performant en milieu trophique pauvre. Pour comprendre les relations entre la présence différentielle des amylases et les processus d'assimilation, une étude portant sur des mesures d'expression de chacun des deux gènes et des propriétés enzymatiques s'imposait. Huvet *et al.* (2003) ont analysé l'expression de l'amylase dans différents tissus et ils ont observé des très hauts niveaux de transcrits des deux gènes (A et B) et d'activité enzymatique dans la glande digestive. Dans cet organe, le niveau des transcrits de A est significativement plus élevé par rapport à celui de B (70 fois plus grand), suggérant un rôle plus important de la protéine amylase A dans les processus digestifs et pouvant expliquer pourquoi un seul ADNc, correspondant au transcrit du gène A, a été caractérisé à partir d'une banque d'ADNc de glande digestive (Moal *et al.*, 2000). Concernant le type de régulation affectant la synthèse de l'amylase chez *C. gigas*, Moal *et al.* (2000) ont mis en évidence une relation entre le niveau d'ARNm totaux et l'activité enzymatique en fonction du rythme alimentaire suggérant une régulation transcriptionnelle possible de l'amylase. En montrant que le niveau des transcrits du gène A augmente avec la quantité trophique, Huvet *et al.* (2003) proposent également une régulation du niveau d'ARNm du gène amylase A. Par ailleurs, entre 0,3 % et 6 % de nourriture, le niveau des transcrits de A augmente de 18 % et le niveau d'activité enzymatique croît de 50 % (Huvet *et al.*, 2003). L'importance des différences du niveau d'ARNm (totaux ou du gène amylase A) selon le niveau de nourriture disponible n'étant pas totalement comparable avec celles du niveau d'activité enzymatique, ceci offre la possibilité d'une régulation traductionnelle de l'amylase.

2. Objectifs et plan de thèse

La présente thèse vise à caractériser, chez *C. gigas*, la fonction des deux gènes amylase ainsi que des relations génotype-phénotype en fonction des conditions environnementales bien définies. Les principales questions amenées par cette problématique sont les suivantes :

- Comment se met en place le système amylase chez un individu au cours de son développement ?
- Quels sont les paramètres environnementaux qui régulent le fonctionnement de ce système ?

- En fonction de l'environnement, existe-t-il des liens entre les performances physiologiques et le polymorphisme de ces deux gènes ?

Afin de répondre à l'ensemble de ces questions, différentes expérimentations ont été mises en œuvre. Le premier chapitre de cette thèse rapporte la cinétique d'expression des gènes A et B dans l'embryon puis dans la larve et la post-larve, afin de voir si l'un est un gène exprimé précocement et l'autre l'est tardivement. Les deuxième et troisième chapitres abordent la régulation de l'expression de ces deux gènes par la température, la quantité et la qualité trophiques afin de voir s'il existe des différences dans leurs modalités d'expression en fonction de ces trois paramètres environnementaux. Le quatrième chapitre est consacré à l'étude des phénotypes (croissance et survie) de différents génotypes amylase afin de rechercher s'il existe un lien entre ces phénotypes d'intérêts aquacoles et le polymorphisme des deux gènes amylase et si ces relations génotype-phénotype sont influencées par l'environnement.

Ces travaux vont permettre une meilleure compréhension des mécanismes régulant le système amylase. Ils vont aussi apporter des connaissances sur les relations génotype-phénotype associées aux gènes de l'amylase, qui pourront être exploitées à des fins de sélection génétique pour améliorer la croissance de l'huître *C. gigas*.

**PRESENTATION DU MODELE BIOLOGIQUE,
L’HUITRE DU PACIFIQUE *CRASSOSTREA GIGAS***

**PRESENTATION DU MODELE BIOLOGIQUE,
L'HUITRE DU PACIFIQUE *CRASSOSTREA GIGAS***

1. Position systématique

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (connue aussi sous les noms d'huître du Pacifique ou d'huître japonaise) occupe la position systématique suivante :

Embranchement : Mollusques

Classe : Bivalves

Ordre : Eulamellibranches

Famille : Ostréidés

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *gigas*

2. Répartition géographique

Originaire du Japon, cette espèce a été introduite dans de nombreuses régions du monde, au Canada (1912), sur la côte ouest des Etats-Unis (1926), au Chili, au Cap en Afrique du Sud, en Tasmanie (depuis 1952 ; Thompson, 1952, 1958), en Europe (depuis 1966 ; Grizel et Héral, 1991), en Nouvelle-Zélande (depuis 1972 ; Smith *et al.*, 1986) et enfin en Russie dans la mer d'Okhotsk et en mer Noire (1976) (Orlenko, 1994). Aujourd'hui, *C. gigas* est présente dans 27 pays à travers le monde, et elle représente le mollusque le plus cultivé avec une production mondiale supérieure à 4,1 millions de tonnes en 2001 (FAO, 2003). Ceci s'explique par son potentiel de croissance élevé et sa grande tolérance aux variations de température (espèce eurytherme), de salinité (espèce euryhaline) et de quantité de nourriture (Coleman, 1986 ; Smith *et al.*, 1986 ; Grizel, 1996).

3. Historique de l'ostréiculture française

Les huîtres sont consommées par l'homme depuis l'Antiquité. Effectivement, elles sont non seulement un plaisir culinaire, mais, en plus, elles constituent un aliment particulièrement riche en vitamines (vitamines D et B12) et en éléments minéraux (fer, magnésium, calcium, manganèse, cuivre, fluor, iode, sélénium, phosphore, sodium et potassium) très utiles à la santé et elles auraient des vertus aphrodisiaques (Favier *et al.*, 1995 ; Bourre, 2001).

Des textes anciens rapportent que les Grecs utilisaient les coquilles de ces mollusques comme bulletins de vote pour bannir un compatriote. Le terme ostracisme y trouva son origine (du grec *ostrakon* signifiant coquille). Les Romains furent les premiers Européens à organiser l'élevage des huîtres. Le terme ostréiculture fut créé il y a plus de deux mille ans (du latin *Ostrea* signifiant huître). C'est en envahissant la Gaule que les Romains apportèrent leur savoir-faire sur les côtes françaises. L'huître ramassée était uniquement l'huître plate indigène, *Ostrea edulis*. Siècles après siècles, la demande du marché était grandissante. Mais, cette exploitation intensive conduisit à l'épuisement des bancs naturels et la culture des huîtres devint petit à petit nécessaire. C'est sous Napoléon III que se développa l'ostréiculture organisée en France avec la création des premiers parcs en 1849. Cependant, la pénurie était telle que le bassin d'Arcachon dut importer des huîtres creuses du Portugal, *Crassostrea angulata*. En 1868, l'un des navires, « le Morlaisien », assurant ce transport fut contraint par le mauvais temps à jeter sa cargaison par-dessus bord et les bivalves rescapés s'acclimatèrent dans l'estuaire de la Gironde où le bateau s'était réfugié. L'huître *C. angulata* se répandit rapidement et elle supplanta les populations d'huîtres plates autochtones (Héral, 1989) le long de la côte atlantique : Marennes-Oléron en 1874, l'île de Ré en 1878 puis la Vendée et finalement la Bretagne, limite géographique pour la reproduction naturelle (Barré, 1981 ; Héral, 1989).

La densité croissante des stocks finit par entraîner progressivement une diminution de la croissance des huîtres, par les affaiblir en raison du manque de nourriture et par les frapper de plusieurs épisodes de mortalités (Héral, 1990 ; Héral et Deslous-Paoli, 1991). En 1920, une première vague de mortalités frappa les huîtres plates, peut-être liée à un agent infectieux qui ne fut pas déterminé (Orton, 1924). Durant la seconde moitié des années 1960, l'huître plate subit successivement deux épizooties, dues à des parasites *Marteilia refringens* (protozoaire de l'appareil digestif ; Grizel, 1974) et *Bonamia ostreae* (protozoaire des cellules de

l'hémolymphe ; Pichot *et al.*, 1979), entraînant la chute de la production française d'huîtres plates devenue aujourd'hui marginale : en 2001, les ventes françaises d'huîtres plates n'atteignaient pas les 1 700 tonnes (Agreste Primeur, 2003). Entre 1966 et 1973, la domination de l'huître portugaise prit fin avec la « maladie des branchies » et la « maladie hémocytaire », deux épidémies d'origine virale, qui la décimèrent totalement du littoral français (Barré, 1981 ; Comps, 1988 ; Elston, 1993). Le premier évènement de mortalité importante chez *C. angulata* serait dû aux premières importations dites « sauvages » d'une nouvelle espèce d'huîtres creuses provenant du Japon, *Crassostrea gigas*, transportant potentiellement l'agent pathogène (Iridovirus) tout en y étant apparemment tolérante (Renault, 1996).

Dès 1972, l'industrie ostréicole française fut relancée par l'importation massive de cette espèce exotique. Du naissain *C. gigas* fut importé du Japon et des huîtres adultes de Colombie britannique (Canada), eux-mêmes originaires du Japon (Grizel et Héral, 1991). Cette substitution d'espèce s'est révélée être un succès, expliqué en bonne partie par deux caractéristiques de *C. gigas* : une très bonne croissance (du grec *gigas* signifiant géant) et résistance aux maladies affectant les huîtres portugaises et plates (Smith *et al.*, 1986).

Aujourd'hui, l'huître creuse du Pacifique, *C. gigas*, représente 98 % du marché ostréicole français (FAO, 2003). La production française annuelle de *C. gigas* repose à 80-90 % sur le captage naturel du naissain dans les deux bassins de Marennes-Oléron et d'Arcachon, du fait de la température et de la composition de leurs eaux (Gouletquer et Héral, 1991 ; Robert et Gérard, 1999) ; les jeunes huîtres sont ensuite grossies dans les bassins de production bas-normands et méditerranéens. Des écloséries et nurseries peuvent également fournir du naissain de différentes tailles adapté aux besoins du professionnel qui n'est plus tributaire des aléas du captage naturel. Cependant, depuis la seconde moitié des années 1990, les ostréiculteurs français sont à nouveau confrontés à des mortalités importantes, durant l'été, dans certains cheptels de *C. gigas* ainsi qu'à une baisse générale des performances de croissance et des taux de survie (Gouletquer et Héral, 1997). Les mortalités estivales ne constituent pas un phénomène nouveau puisqu'elles affectent les productions ostréicoles du Japon et des Etats-Unis depuis plus de 40 ans (Mori, 1979 ; Perdue *et al.*, 1981).

4. Anatomie

L'huître creuse japonaise se caractérise par une forme généralement allongée et un bord de coquille très fortement ondulé ; la région pointue de l'huître est la région antérieure

tandis que la région arrondie et élargie est la région postérieure (figure 2). L'huître peut mesurer jusqu'à 30 cm de longueur, mais le coquillage est généralement récolté à l'âge de trois ans alors qu'il mesure 10 à 12 cm de longueur.



Figure 2. Huître *C. gigas* posée sur sa valve gauche. L'huître est fermée (photo de gauche) ou ouverte (photo de droite), après avoir enlevé la valve droite (d'après Fabioux, 2004).

4.1. Coquille

Le corps mou de l'huître est comprimé latéralement et protégé par une coquille. Représentant environ 95 % de la masse totale, la coquille est formée de deux valves asymétriques sécrétées par le manteau (figure 2). La valve supérieure (droite) est plane et fait office de couvercle, tandis que la valve inférieure (gauche) est creuse, fixée au substrat et sert d'habitable pour l'animal (Kennedy *et al.*, 1996). Les valves s'articulent au niveau de la charnière et sont mobiles l'une par rapport à l'autre par un ligament élastique dorsal et par un seul muscle adducteur (figure 3). Le ligament est sécrété par le manteau et est constitué de conchyoline : il est abducteur puisqu'il permet l'écartement des valves. À l'inverse, le muscle adducteur assure la fermeture de la coquille. La couleur de la coquille varie du beige au brunâtre avec parfois des tâches plus sombres ou pourpres. Des stries de croissance y sont nettement visibles. La coquille calcifiée est constituée de trois couches superposées : (1) le périostracum, couche organique externe composée de protéines tannées, (2) l'ostracum, constitué par des prismes hexagonaux de calcite, et (3) la nacre, résultant de l'empilement de lames d'aragonite et représentant la couche interne de la coquille des mollusques.

4.2. Manteau, cavité palléale et branchies

La masse viscérale est entièrement enveloppée par le manteau constitué de deux lobes (droite et gauche) qui, soudés l'un à l'autre sur le bord antéro-dorsal, forment le capuchon

céphalique recouvrant la bouche et les palpes labiaux (figure 3). L'espace libre entre les deux lobes du manteau est appelé cavité palléale où pendent, de chaque côté de la masse viscérale, une paire de branchies lamellaires hypertrophiées en forme de « w » (figure 3). Les branchies divisent la cavité palléale en deux parties, l'une est ventrale et correspond à la chambre inhalante (l'eau de mer rentre), l'autre est dorsale et est la chambre exhalante (l'eau de mer sort) (figure 3). Au rôle respiratoire des branchies, s'ajoute un rôle de capture de la nourriture par filtration.

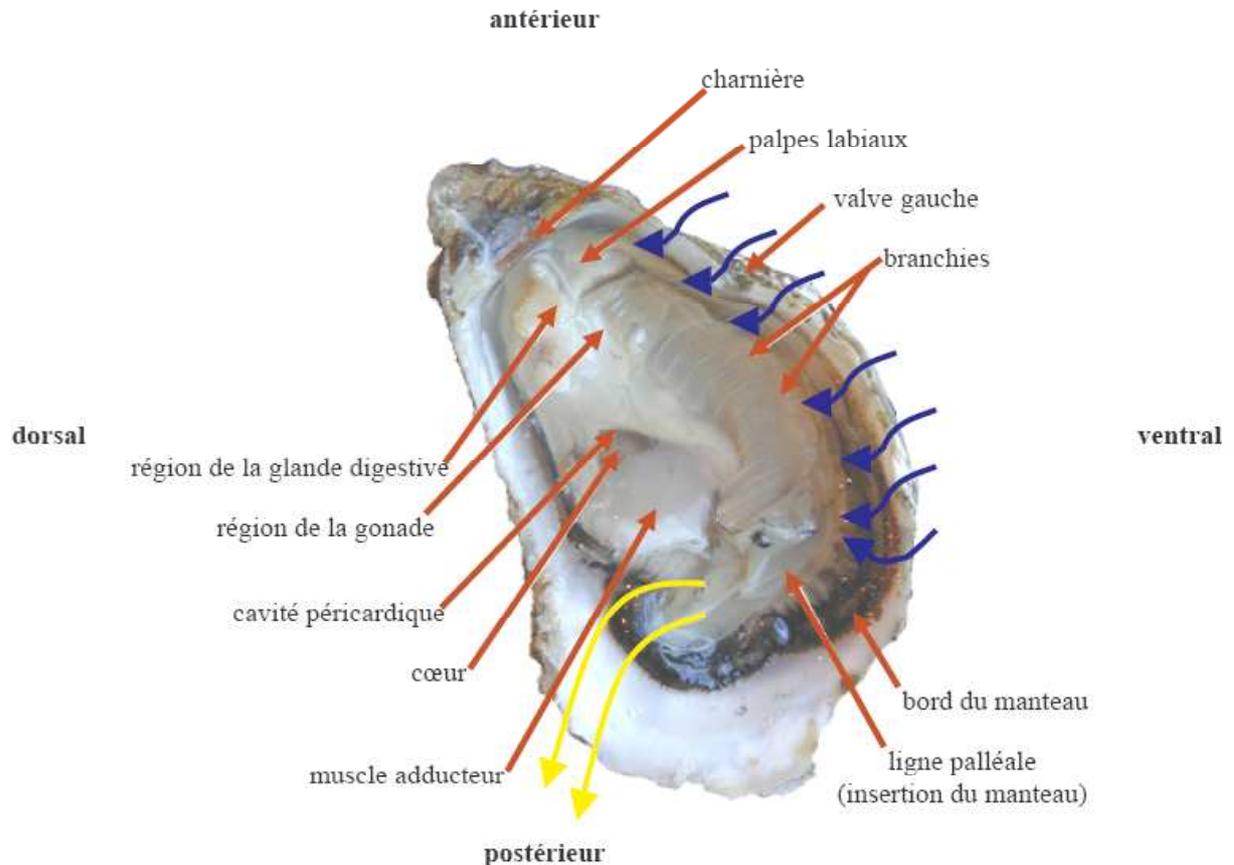


Figure 3. Circulation de l'eau et principaux organes chez *C. gigas*. L'huître inhale l'eau entrant (flèches bleues) chargée en particules nutritives et exhale l'eau filtrée (flèches jaunes). L'orientation de l'animal est indiquée en caractères gras.

4.3. Appareils circulatoire et excréteur

L'oxygène qui diffuse au travers de l'épithélium branchial est capté par un pigment respiratoire à base de cuivre, l'hémocyanine, auquel il se combine. En sortie des branchies, le fluide circulant ou hémolymphe, chargé en oxygène, gagne le cœur. Celui-ci comporte un ventricule unique et deux oreillettes (une par branchie), logés dans une cavité péricardique située près du muscle adducteur (figure 3). Le ventricule propulse l'hémolymphe dans tout

l'organisme grâce à deux aortes. Ces artères ne gagnent pas directement les organes mais déversent l'hémolymphe dans des vastes lacunes ou sinus, où ils baignent. C'est ce qu'on appelle un système circulatoire ouvert.

L'huître présente deux reins qui sont des métanéphridies. Ils débutent par le pavillon cilié qui s'ouvre dans le sinus péricardique. Le tube qui lui fait suite se dilate et à l'intérieur, il existe un sinus veineux. A ce niveau, l'hémolymphe est épurée et l'urine ainsi excrétée sort dans la cavité palléale par le pore urinaire.

4.4. Système nerveux et organes sensoriels

Le système nerveux de l'huître est peu développé, réduit à quelques ganglions difficilement observables, en raison d'organes sensoriels très rudimentaires.

5. Nutrition et digestion

5.1. Habitude alimentaire

L'huître est un organisme microphage suspensivore (filtreur) à tendance phytophage. En effet, dépourvue de tête, de bulbe buccal, de mâchoire, de radula et de glande salivaire, l'huître se nourrit de particules microscopiques en suspension dans l'eau de mer, principalement constituées de matière organique vivante : phytoplancton (algues microscopiques), bactéries, zooplancton (animaux microscopiques) et de petits débris d'organismes morts (Lubet, 1978). Cette nourriture est surtout abondante dans les estuaires et aux abords des rivières. Le rythme de nutrition est lié à la marée chez les bivalves intertidaux, comme l'huître (Morton, 1977).

5.2. Prise de nourriture et régulation

Chez l'huître, la prise de nourriture se fait grâce aux branchies qui filtrent les particules nutritives contenues dans l'eau de mer pénétrant dans la cavité palléale par l'entrebâillement des valves. La filtration est régulée par la température et le niveau trophique. Le débit de filtration augmente avec la température de 5 à 20°C, et diminue ensuite jusqu'à 32°C (Bougrier *et al.*, 1995). Des huîtres placées dans un environnement trophique riche présentent un débit de filtration faible par rapport à des huîtres situées dans un environnement trophique pauvre (Enriquez-Diaz, 2004). Piégées dans les mailles du filtre branchial, les

particules nutritives sont agglutinées par du mucus sécrété par les cellules glandulaires de l'appareil branchial. Dans la région antérieure, ces cordons muqueux sont acheminés vers l'orifice buccal par le battement des cils des deux branchies et des quatre palpes labiaux. Entourant la bouche, les palpes labiaux trient les particules à ingérer : ils rejettent celles qui sont volumineuses (supérieures à 10 μm) ou impropres à l'ingestion, et dirigent vers l'orifice buccal celles qui peuvent être consommées ; les particules non retenues sont accumulées sous forme de pseudo-fèces qui seront rejetés par le bord du manteau.

5.3. Appareil et équipement enzymatique digestifs

La bouche s'ouvre sur un œsophage court, légèrement courbé qui aboutit à l'estomac (figure 4). Ce dernier est en relation, par des canaux, avec une volumineuse glande digestive ou hépato-pancréas (figure 4). L'estomac globuleux présente postérieurement un cæcum cylindrique à paroi interne ciliée contenant le stylet cristallin (figure 4). C'est un bâtonnet translucide, rempli d'une gelée à forte teneur en enzymes digestives telles que des glucanases (amylase, laminarinase, cellulase) ; celles-ci ne sont pas sécrétées par le stylet cristallin mais par la paroi stomacale et aussi par la glande digestive (Boucaud-Camou *et al.*, 1983 ; Lebesnerais, 1985). Ce stylet cristallin est mis en mouvement par l'action de cils, et est lentement râpé sur une structure semblable à une meule, le bouclier gastrique, lui permettant ainsi de libérer les enzymes digestives et d'amorcer une digestion extracellulaire du matériel ingéré (figure 5) (Boucaud-Camou *et al.*, 1983 ; Lebesnerais, 1985). La digestion se poursuit ensuite de manière intracellulaire par la phagocytose du matériel et par sa digestion sous l'action d'enzymes lysosomales au niveau des cellules de la glande digestive et aussi dans celles de l'estomac (Boucaud-Camou *et al.*, 1983). Les résidus de la digestion provenant de la glande digestive et de l'estomac pénètrent dans un intestin assez long, pelotonné (figure 4). Dans cet organe, l'absorption et la digestion intracellulaire se poursuivent. Les matières fécales (fèces) sont formées dans le rectum et sont expulsées dans le milieu extérieur via l'orifice anal (figure 4).

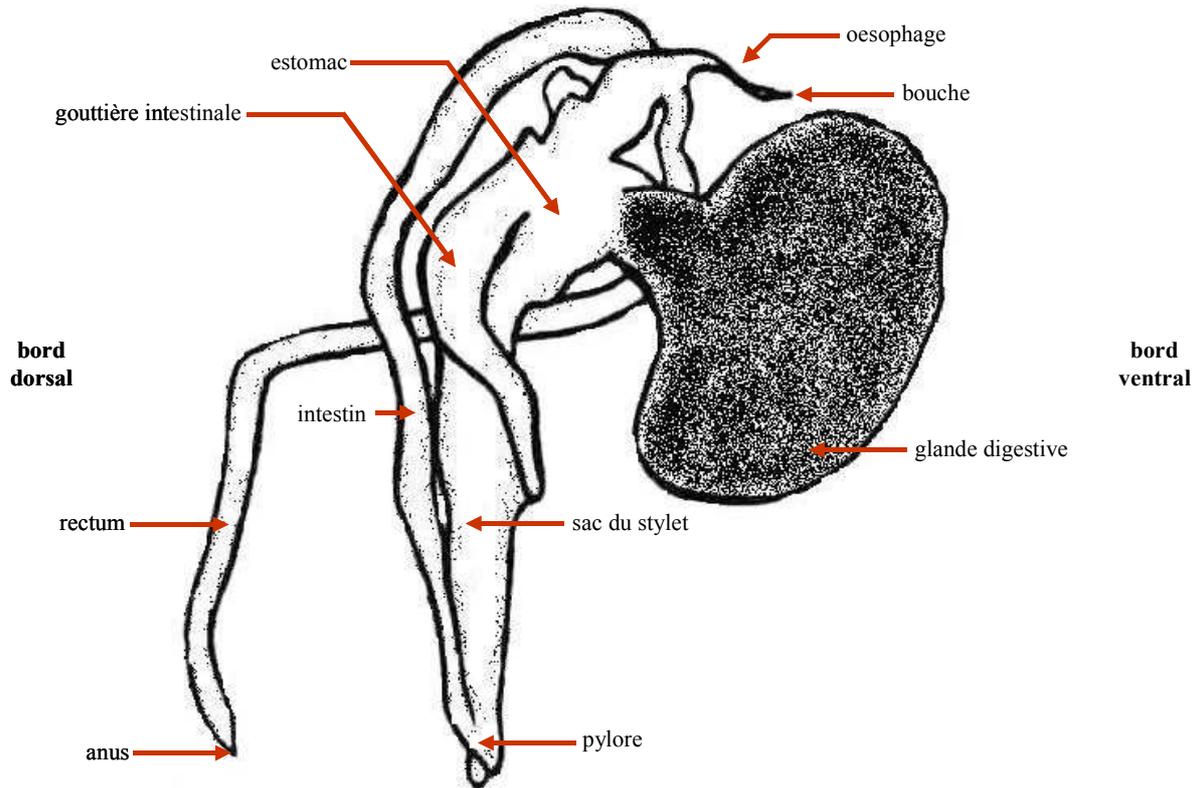


Figure 4. Reconstitution du tractus digestif de *C. gigas* (d'après Lebesnerais, 1985). L'orientation du tractus digestif est indiquée en caractères gras.

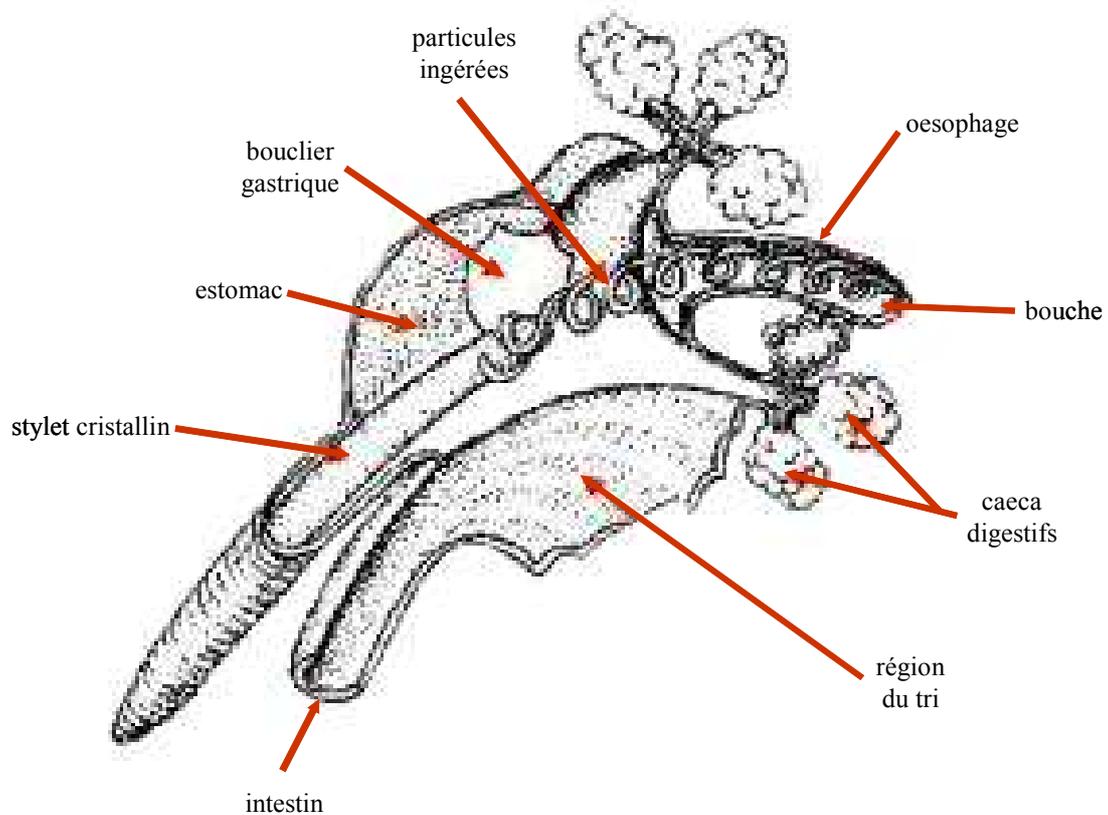


Figure 5. Schéma de l'appareil digestif d'un bivalve illustrant le stylet cristallin et le bouclier gastrique (d'après Morin, 2002).

6. Reproduction

6.1. Hermaphrodisme

Les bivalves n'ont pas de chromosomes sexuels, ils possèdent potentiellement les deux sexes. Cette bi-potentialité se traduit par l'existence d'un hermaphrodisme juvénile (Gérard *et al.*, 1995). L'huître creuse du Pacifique est considérée comme une espèce à hermaphrodisme alternatif irrégulier protandrique (Amemiya, 1929 ; Galtsoff, 1964 ; Buroker, 1983 ; Gérard *et al.*, 1995), ce qui signifie qu'elle est généralement mâle au début de son activité sexuelle puis qu'elle alterne à chaque période de reproduction pour un même individu entre mâle et femelle et *vice versa* (Guo *et al.*, 1998 ; Lango-Reynoso *et al.*, 1999).

6.2. Cycle de reproduction et régulation

L'huître *C. gigas* présente une activité sexuelle cyclique, rythmée par les saisons. L'organe reproducteur ou gonade, qui se développe autour de la glande digestive (figure 3), assure la production de gamètes (gamétogenèse), spermatozoïdes ou ovocytes. La gamétogenèse est très réduite durant l'automne et au début de l'hiver, période dite de « repos sexuel » (Lubet, 1991). Durant cette période, les gamètes résiduels (non émis) sont résorbés par cytolysse (atrésie) et phagocytose (Lubet, 1991 ; Fabioux, 2004), puis les cellules souches germinales prolifèrent et se différencient en gonies (Fabioux, 2004). Ces dernières vont subir des mitoses successives qui vont accroître considérablement leur nombre, à la fin de l'hiver (Gouletquer, 1995 ; Lango-Reynoso *et al.*, 1999). Cette phase de multiplication intense des gonies se continue jusqu'au début du printemps (Gouletquer, 1995 ; Lango-Reynoso *et al.*, 1999). Au printemps, les gonies entrent en méiose et arrivent à maturité sexuelle à la fin du printemps ou au début de l'été (Fabioux, 2004). Les gamètes sont émis pendant l'été (à 22°C). Une ponte principale dans le bassin de Marennes-Oléron est observée alors que plusieurs événements de ponte sont possibles dans le bassin d'Arcachon (His et Robert, 1985 ; Héral et Deslous-Paoli, 1991). La ponte est partielle voir absente en Bretagne ou en Normandie, régions ostréicoles où la température de l'eau est plus froide qu'en Charente, (Gouletquer, 1995). C'est pourquoi les huîtres creuses élevées en Bretagne ou en Normandie sont achetées, à l'état de naissains, dans le Sud-Ouest de la France (Gérard *et al.*, 1995).

La prolifération des gonies est régulée par la température : en milieu contrôlé, les mitoses goniales sont observées lorsque la température de l'eau est basse (entre 8 et 11°C) (Fabioux, 2004). L'entrée des gonies en méiose n'apparaît pas être contrôlée par une

augmentation de la température, c'est au contraire un mécanisme inéluctable (Fabioux, 2004). La maturation des cellules germinales est principalement contrôlée par la température et la quantité de nourriture (Deslous-Paoli *et al.*, 1981). Des températures élevées accélèrent la maturation des cellules germinales et permettent l'émission de gamètes (Mann, 1979 ; Muranaka et Lannan, 1984 ; Gouilletquer, 1995). Des huîtres placées dans un environnement trophique riche présentent une meilleure maturation par rapport à des huîtres situées dans un environnement pauvre (Enriquez-Diaz, 2004). L'émission de gamètes intervient souvent en réponse à un signal extérieur, essentiellement à des variations de température, de nourriture (bloom de phytoplancton) et à la présence dans le milieu de gamètes de quelques congénères.

Sur le plan biochimique, le cycle de reproduction se caractérise par un enrichissement en glycogène (polysaccharide de réserve) du tissu conjonctif durant la période de repos sexuel ; ce sucre est ensuite métabolisé en réserves lipidiques dans les mois qui précèdent la ponte (Gabbott, 1975 ; Maurer et Borel, 1986 ; Deslous-Paoli, 1980 ; Berthelin *et al.*, 2000a). Après l'émission de gamètes, à la fin de l'été, l'huître a épuisé toutes ses réserves et la gonade régresse.

7. Cycle de développement

L'espèce *C. gigas* suit une stratégie de reproduction dite de type « R » avec une fécondité très élevée et un cycle de développement court (Lubet, 1976 ; Takada et Nakajima, 1992).

La fécondation est externe chez les mollusques, elle se déroule dans le milieu extérieur pour *C. gigas*. Une première maturité sexuelle est observée dès l'âge d'un an, mais elle est environ 10 fois moins importante en terme de quantité de gamètes par rapport à celle d'animaux âgés de deux ou trois ans (Deslous-Paoli et Héral, 1988). La fécondité est élevée : 100 millions d'œufs sont émis dans l'eau de mer, en plusieurs fois durant l'été, pour les huîtres adultes (Quayle, 1969 ; Walne, 1974 ; Héral, 1989 ; His, 1991 ; Gérard, 1998).

Le développement de *C. gigas* est indirect, assorti d'une larve pélagique qui subit une métamorphose complexe et qui devient alors benthique (post-larve fixée). La durée de la phase pélagique (oviparité) est fonction de la température et de la quantité de nourriture disponible. Elle dure en moyenne 15 jours à 24-25°C et 28 jours à 20-22°C (Gouilletquer, 1995). La fixation s'effectue au stade pédivéligère (hauteur > 300 µm) au moment de la métamorphose.

Après la fécondation, l'œuf hétérolécithe subit une segmentation totale de type spiral (divisions successives à angle droit) conduisant à l'obtention d'une blastula, 5 heures après la fécondation (haf). Après la segmentation, la blastula subit la gastrulation (7 haf) par épibolie (recouvrement). Les cellules se réorganisent en trois feuilletts primordiaux (endoderme, mésoderme et ectoderme). Le stade gastrula est le dernier stade embryonnaire (figure 6). Le premier stade larvaire, la trochophore (hauteur $\approx 60 \mu\text{m}$, 16-24 haf), présente une forme caractéristique de toupie et des ceintures ciliaires, locomotrices (figure 6). Dans les 24 heures qui suivent la fécondation (pour une température comprise entre 22 et 24°C), la larve d'huître, ou véligère, est formée et acquiert la forme d'un D majuscule, d'où son appellation de larve D (hauteur $\approx 70 \mu\text{m}$) (figure 6). Elle présente une coquille (prodissoconque I) avec deux valves reliées par une charnière ainsi qu'un vélum, sorte de voile cilié qu'elle déploie hors de sa coquille pour nager et capter les particules alimentaires. Dès ce stade, l'appareil digestif est fonctionnel : l'organisme quitte sa phase endotrophe et commence à pouvoir s'alimenter. Vers le 6^{ème} jour après la fécondation (jaf), un crochet, ou umbo, apparaît au niveau de la charnière de la coquille. Cette larve est dite umbonée ($100 \mu\text{m} < \text{hauteur} < 250 \mu\text{m}$) (figure 6). A ce stade, la coquille est beaucoup plus calcifiée et est appelée prodissoconque II. Vers le 14 jaf, quand la hauteur de la larve dépasse $260 \mu\text{m}$, une tâche oculaire, improprement appelée œil et étant un organe sensoriel, apparaît au niveau de la première ébauche branchiale ; la larve est dite alors oeillée. Le dernier stade de la vie pélagique est atteint lorsque la larve approche et dépasse la hauteur de $300 \mu\text{m}$: c'est la pédivéligère. Un pied se développe (Prieur, 1971) et la larve devient compétente à la métamorphose. Il va lui permettre de ramper et de choisir un support favorable (rôle sensitif). Elle se fixe alors grâce à un ciment sécrété par une glande située à la base de son pied (rôle glandulaire). Après la fixation, la pédivéligère subit la métamorphose, phénomène durant lequel les différents tissus et organes se réorganisent pour donner une huître juvénile appelée naissain (Hickman et Gruffyd, 1971 ; Waller, 1981 ; Ikenoue et Kafuku, 1992) (figure 6). Ainsi, pour ce stade post-larvaire, le vélum et le pied disparaissent (Waller, 1981 ; Burke, 1983), les palpes labiaux sont formés (Hourdry *et al.*, 1995), les branchies se développent, permettant dorénavant la capture de la nourriture par filtration et la respiration, la coquille définitive est sécrétée, la dissoconque. Pendant cette phase de remaniements tissulaires, la pédivéligère ne peut s'alimenter (Bayne, 1976).

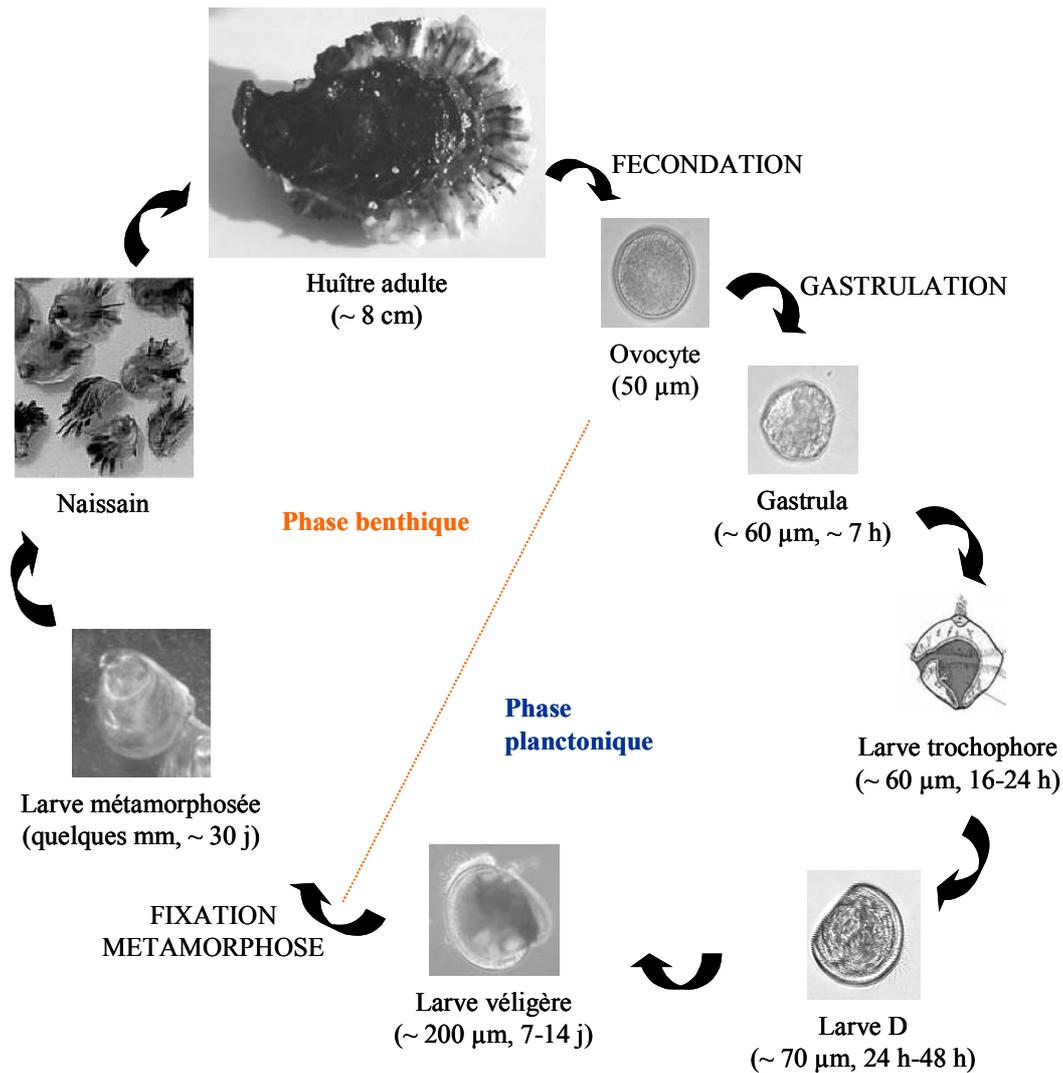


Figure 6. Cycle de développement de *C. gigas* (d'après Fabioux, 2004).

8. Pratiques d'élevage

Traditionnellement, la production annuelle française de *C. gigas* repose à 80-90 % sur le captage naturel de juvéniles dans les deux bassins de Marennes-Oléron et d'Arcachon, du fait de la température et de la composition de leurs eaux (Goulletquer et Héral, 1991 ; Robert et Gérard, 1999). Ce captage estival des jeunes huîtres permet d'approvisionner les autres bassins français de production comme la Normandie, la Bretagne et la Méditerranée. Pendant la période de reproduction, les ostréiculteurs commencent leur premier travail qui consiste à placer des collecteurs (tuiles, ardoises, coquilles d'huîtres ou de Saint-Jacques, tubes ou coupelles PVC) sur lesquels les larves vont se fixer ; c'est l'étape du captage. Après 6 à 18 mois de fixation en fonction des secteurs de production, les professionnels détachent le

naissain naturel de ses collecteurs et l'élève dans des parcs pour sa mise en pré-grossissement puis en grossissement.

L'élevage en parcs peut se faire selon trois techniques.

- (1) L'élevage à plat, en eaux profondes, consiste à étaler les huîtres sur le sable dans des parcs qui ne se découvrent pas, et de les récolter par des bateaux dragueurs.
- (2) L'élevage en surélévation ou sur tables, en eaux peu profondes se découvrant à marée basse, consiste à disposer les huîtres en poches sur des tables de 80 cm de haut, placées sur l'estran. Cela impose de retourner les poches sur les tables (ou de placer des bigorneaux à l'intérieur des poches) pour empêcher la prolifération des algues, de changer le maillage des poches et de les dédoubler en fonction de la croissance des huîtres. L'élevage en poches ostréicoles étalées sur des tables reste la méthode la plus courante sur la façade atlantique et en Manche, plus sujettes à la houle et aux courants.
- (3) L'élevage en suspension ou sur des cordes, en eaux profondes, consiste à coller les huîtres sur des cordes, suspendues à des tables plantées dans le sédiment. Cette pratique d'élevage est exclusivement méditerranéenne (étang de Thau) en raison de la faible amplitude des marées dans le Languedoc-Roussillon.

En fin d'élevage, les huîtres sont soit commercialisées directement, soit affinées en claires afin d'améliorer la qualité du produit. A ce stade, les huîtres vont se nourrir de la navicule bleue *Haslea ostrearia* (espèce phytoplanctonique contenant un pigment vert) qui leur procure la fameuse chair verte appréciée des consommateurs. Trois appellations commerciales sont proposées en fonction de la densité d'huîtres au m² et de la durée d'affinage : affinées en claires, fines de claires et spéciales de claires.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Digestion-Assimilation

1.1. Digestion : étape-clé de la nutrition

La nutrition comporte plusieurs étapes :

- la prise de nourriture qui consiste à se procurer et à ingérer la nourriture,
- la digestion de la nourriture qui correspond à l'ensemble des processus par lesquels les aliments bruts (glucides, protéines, lipides) sont transformés en des molécules plus petites assimilables, les nutriments (oses, acides aminés, acides gras). Initialement, les aliments ingérés sont triturés dans la partie antérieure du tube digestif puis hydrolysés par les enzymes digestives dans la partie moyenne du tube digestif. Les molécules ainsi transformées par le tube digestif sont ensuite absorbées à travers les membranes cellulaires puis utilisées pour l'anabolisme cellulaire ou dégradées pour fournir de l'énergie. Les déchets de la digestion (fèces) sont enfin rejetés dans le tube digestif postérieur.
- la distribution des nutriments à partir du tube digestif vers l'ensemble de l'organisme, celle-ci s'effectue en général par un système de transport (par exemple, le sang).

1.2. Enzymes digestives

1.2.1. Lieux de synthèse

Le pancréas exocrine des vertébrés (Corring *et al.*, 1989 ; Brannon, 1990), la partie moyenne du tube digestif des insectes (Sakai *et al.*, 2004) et la glande digestive ou hétopancréas des crustacés ou des mollusques (Dall et Moriarty, 1983 ; Gibson et Barker, 1979 ; Boucaud-Camou *et al.*, 1983) jouent un rôle très important dans la digestion des aliments en synthétisant et sécrétant les enzymes digestives.

1.2.2. Synthèse et régulation

Corring *et al.* (1989) et Brannon (1990) ont résumé les différentes étapes concernant la synthèse et la sécrétion des enzymes (protéines) digestives pancréatiques.

Dans le noyau cellulaire, les gènes codant les enzymes digestives sont transcrits en ARN hétérogènes nucléaires (ARNhn) appelés aussi transcrits primaires ou précurseurs des ARNm (ARN pré-messagers). Les transcrits primaires sont convertis en ARN messagers (ARNm) fonctionnels par plusieurs étapes de modifications post-transcriptionnelles (ajout de la coiffe et de la queue polyA aux extrémités 5' et 3', respectivement ; excision des introns et épissage des exons) qui jouent un rôle dans la stabilité ou la demi-vie des ARNm et dans leur traduction. Les ARNm sont ensuite transportés du noyau vers le cytoplasme pour y être traduits en protéine. La traduction commence sur des ribosomes libres puis se poursuit sur les mêmes ribosomes qui se sont liés à la membrane externe du réticulum endoplasmique (RE), grâce à l'interaction du peptide signal (séquence hautement hydrophobe) de l'extrémité NH₂ de la chaîne protéique naissante avec la particule SRP (*signal recognition particle*) présente dans le cytosol et le récepteur SRPR (*signal recognition particle receptor*), une protéine membranaire du RE. Le peptide naissant est alors transporté à travers la double couche lipidique du RE tandis que l'élongation reprend. Dans la lumière du RE, le peptide signal est clivé par une peptidase et la protéine native est plus tard maturée (par exemple, glycosylée). Cette maturation se poursuit dans l'appareil de Golgi. Les protéines quittent l'appareil de Golgi dans des vacuoles condensantes puis dans des granules de sécrétion, qui migrent vers la membrane apicale et libèrent leur contenu dans la lumière du tube digestif.

La synthèse des enzymes digestives subit des variations. Certaines d'entre elles sont sous l'influence de facteurs externes (nutrition, température, lumière), d'autres dépendent de facteurs internes (hormones), ces deux types de facteurs étant liés. Les différents niveaux possibles de régulation de la synthèse des enzymes digestives par ces facteurs sont (figure 7) :

- la transcription de l'ADN en ARNhn,
- la maturation de l'ARNhn en ARNm fonctionnel,
- le transport nucléocytoplasmique de l'ARNm,
- la stabilité cytoplasmique de l'ARNm,
- la traduction de l'ARNm en protéine,
- la maturation de la protéine,
- la stabilité de la protéine.

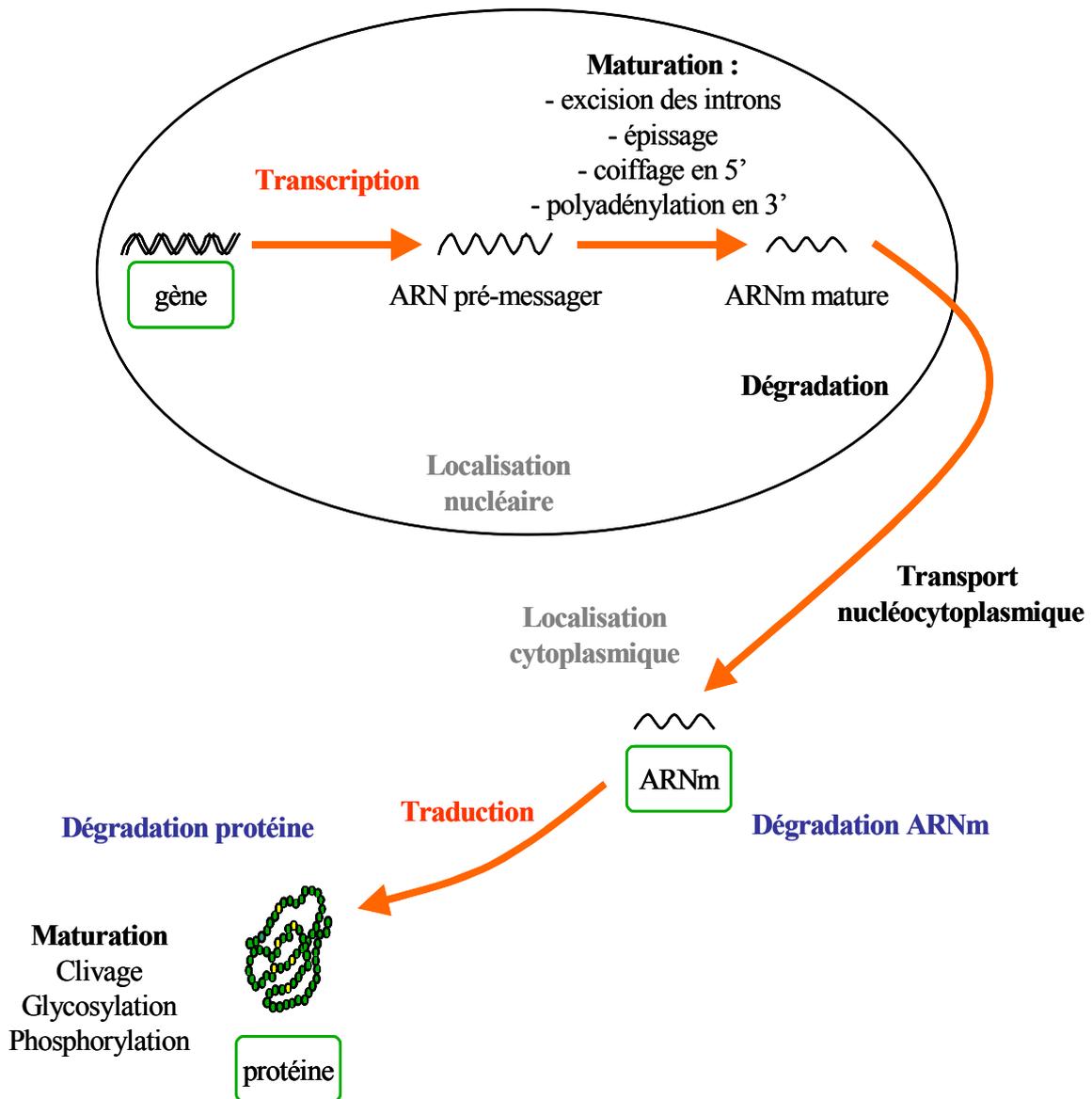


Figure 7. Niveaux de régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes

1.2.3. Fonctions

Les enzymes digestives pancréatiques hydrolysent les macromolécules alimentaires en des molécules plus petites qui peuvent être absorbées. Les protéines, l'amidon et les triglycérides constituent la majorité des macromolécules alimentaires et sont hydrolysés par des enzymes majeures que sont les protéases à sérine, l'amylase et la lipase.

Les protéases à sérine pancréatiques, une famille d'endopeptidases, présentent une structure tridimensionnelle similaire (Schotton et Hartley, 1970) et contiennent une sérine réactive au niveau de leur site actif. Ces enzymes sont généralement sécrétées sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes ou proenzymes), ce qui permet apparemment de protéger les cellules qui les synthétisent contre tout effet désastreux. La trypsine (EC 3.4.21.4) et la chymotrypsine (EC 3.4.21.1) sont les protéases à sérine prédominantes. La trypsine et la chymotrypsine ont plusieurs formes selon les espèces étudiées. La trypsine clive les liaisons peptidiques entre les acides aminés basiques (arginine et lysine) et l'acide aminé suivant, la chymotrypsine clive les liaisons peptidiques entre les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) et l'acide aminé suivant (Rinderknecht, 1986). Le trypsinogène est activé en trypsine par l'élimination d'un octapeptide N-terminal par l'entéropeptidase, cette activation du trypsinogène en trypsine est autocatalytique (Guy *et al.*, 1978). La trypsine peut à son tour activer le chymotrypsinogène. Le chymotrypsinogène est activé en chymotrypsine par le clivage de 4 liaisons peptidiques, libérant deux petits peptides, alors que les trois autres peptides ne sont pas éliminés puisqu'ils sont retenus par des ponts disulfures (Niemann, 1964).

L'amylase (EC 3.2.1.1) est sécrétée sous sa forme active et hydrolyse les liaisons glucidiques α -(1-4) de l'amidon et du glycogène (Roberts et Whelan, 1960).

La lipase (EC 3.1.1.3) est sécrétée sous sa forme active (Rinderknecht, 1986) et hydrolyse les liaisons ester des triglycérides.

1.2.4. Régulation nutritionnelle des enzymes digestives chez les vertébrés

1.2.4.1. Adaptation nutritionnelle

Pavlov (1879) a été le premier à observer une teneur élevée des activités protéolytiques du suc pancréatique chez le chien consommant un repas riche en viande. Ce phénomène d'adaptation nutritionnelle des enzymes pancréatiques a été depuis confirmé chez le rat (Gidez, 1973 ; Grossman *et al.*, 1943 ; Reboud *et al.*, 1962), le chien (Behrman et Kare,

1969), le porc (Corring et Saucier, 1972 ; Flores *et al.*, 1988), le poulet (Imondi et Bird, 1967) et les poissons (Zambonino Infante et Cahu, 1994).

La quantité des protéines, glucides et lipides du régime modifie les activités respectives des protéases, amylase et lipase contenues dans le tissu pancréatique ou le suc pancréatique entrant dans le duodénum chez le rat, le chien et d'autres espèces.

L'ingestion de quantités importantes de protéines, glucides et lipides entraîne une augmentation des activités des enzymes pancréatiques impliquées dans l'hydrolyse de ces substrats (Grossman *et al.*, 1943 ; Ben Abdeljlil et Desnuelle, 1964). L'augmentation du niveau des enzymes pancréatiques en réponse à la consommation de régimes riches en protéines, glucides ou lipides, résulte d'une modification spécifique de leur vitesse de biosynthèse (Reboud *et al.*, 1964). L'étude de la réponse des différentes isoenzymes des protéases pancréatiques à des changements de régime montre que c'est surtout la synthèse des formes acides des isoenzymes qui est modulée (Schick *et al.*, 1984). La biosynthèse du chymotrypsinogène anionique et de son homologue cationique est augmentée quand les animaux reçoivent le régime hyperprotéique par rapport au régime normal. Dans les mêmes conditions expérimentales, les biosynthèses relatives des amylases, toutes deux cationiques, diminuent parallèlement avec la teneur en protéines du régime alimentaire.

La qualité des protéines, glucides et lipides alimentaires affecte également cette variation chez le rat et le mouton.

L'ingestion d'une forte teneur en protéines de bonne qualité nutritionnelle (caséine, protéines de poisson) fait augmenter la synthèse des protéases à sérine et, surtout, celle du chymotrypsinogène (Johnson *et al.*, 1977). Par contre, les protéines de mauvaise qualité nutritionnelle (zéine, gélatine) n'entraînent aucune variation de la synthèse du chymotrypsinogène en réponse au régime hyperprotéique (Johnson *et al.*, 1977). Différents glucides (sucres complexes, disaccharides et monosaccharides) affectent les niveaux d'amylase pancréatique. L'amidon et le glucose augmentent le contenu en amylase de manière similaire (Deschodt-Lanckman *et al.*, 1971 ; Howard et Yudkin, 1963 ; Robberecht *et al.*, 1971), tandis que le sucrose et le fructose le font mais moins que l'amidon (Howard et Yudkin, 1963). Le lactose et la galactose n'affectent pas le contenu en amylase (Deschodt-Lanckman *et al.*, 1971). Kowalik *et al.* (2001) ont testé l'influence de la teneur en amidon et de son type, *i.e.* du degré de polymérisation (DP) de son amylose, sur l'activité amylase : l'activité amylase augmente avec le niveau d'amidon et cet effet dose est d'autant plus important avec l'amidon de blé (DP = 200 à 1 200 (Van der Maarel *et al.*, 2002)) qu'avec

l'amidon de pomme de terre (DP = 1 000 à 6 000 (Van der Maarel *et al.*, 2002)). L'activité de la lipase pancréatique est également influencée par le type de lipides alimentaires, *i.e.* son degré de saturation ou de sa longueur de chaîne. L'huile de tournesol la plus fortement insaturée (ratio polyinsaturé (P)/saturé (S) = 6,5) augmente moins le contenu en lipase que l'huile de maïs (P/S = 0,1) (Brannon, 1990). Les triglycérides à longue chaîne augmentent plus le contenu en lipase que les triglycérides à moyenne chaîne (Brannon, 1990).

L'adaptation à un régime riche en lipides est plus rapide que celle à un régime riche en protéines qui elle-même l'est plus que celle à un régime riche en glucides (Deschodt-Lanckman *et al.*, 1971 ; Lahaie et Dagorn, 1981), suggérant que différents mécanismes sont impliqués dans l'adaptation pancréatique aux différents types de macromolécule alimentaire.

1.2.4.2. Mécanismes d'adaptation pancréatique

Chez un animal adapté à un régime enrichi en un type d'aliment (protéine, glucide, lipide), la présence d'un taux élevé de cette macromolécule alimentaire dans le tractus digestif est rapidement suivie d'une augmentation du niveau de l'enzyme pancréatique chargée d'hydrolyser cette macromolécule, alors qu'aucun contact n'a eu lieu entre l'aliment et le pancréas (Corring *et al.*, 1989). Trois catégories d'effecteurs sont potentiellement impliqués dans l'adaptation nutritionnelle pancréatique : neurotransmetteurs, hormones et les produits de la digestion passant dans le sang.

La distension de l'estomac stimule la sécrétion des enzymes digestives pancréatiques par l'intermédiaire de fibres cholinergiques. Ce mécanisme met en jeu des réflexes gastro-pancréatiques avec libération de gastrine qui intervient comme médiateur chez certaines espèces (Solomon, 1987). Des dégradations physiques et biochimiques sont très rapidement initiées par l'estomac sur les aliments. L'estomac évacue un mélange de substrats et de produits d'hydrolyse dans le duodénum, qui constituent un signal de sécrétion des enzymes digestives pancréatiques.

L'adaptation pancréatique des protéases, lipase et amylase aux protéines, lipides et glucides alimentaires est contrôlée respectivement par la cholécystokinine (CCK) (Wicker *et al.*, 1985), la sécrétine (Rausch *et al.*, 1985) et l'insuline (Korc *et al.*, 1981). L'excrétion de l'amylase est aussi régulée par les glucocorticoïdes (Logsdon *et al.*, 1985). La CCK et la sécrétine sont des hormones synthétisées dans le duodénum, le jéjunum et dans le système nerveux (Strand, 1999), l'insuline est une hormone produite par le pancréas endocrine

(Brannon, 1990). Dans la région flanquante 5' du gène amylase pancréatique de souris, Amy-2.2, un élément de réponse à l'insuline (*insulin-response element*, IRE) a été identifié (Johnson *et al.*, 1993).

L'adaptation pancréatique des protéases aux types de protéines alimentaires requiert des protéines intactes ou petits peptides et n'implique pas les produits finaux de leur hydrolyse *i.e.* les acides aminés (Johnson *et al.*, 1977 ; Temler *et al.*, 1984 ; Lavau *et al.*, 1974). L'adaptation pancréatique de l'amylase et de la lipase est semblable mais différente de celle des protéases : les produits d'hydrolyse finaux, *i.e.* glucose ou acides gras, affectent l'amylase ou la lipase aussi bien que l'amidon ou les triglycérides (Robberecht *et al.*, 1971 ; Brannon *et al.*, 1990).

1.2.4.3. Régulation moléculaire de l'adaptation pancréatique

Un régime riche en protéines augmente les niveaux d'ARNm du trypsinogène (360 %), chymotrypsine (390 %) (Giorgi *et al.*, 1985). Un régime riche en glucides augmente le niveau d'ARNm de l'amylase (900 %) et, parallèlement, sa synthèse (470 %) (Giorgi *et al.*, 1984). Un régime riche en lipides augmente le niveau d'ARNm de la lipase (387 %) et, parallèlement, sa synthèse (77 %) (Wicker et Puigserver, 1989 ; Wicker *et al.*, 1988). Dans chacun de ces régimes, le substrat alimentaire augmente le niveau d'ARNm de son enzyme digestive en parallèle de sa synthèse, appuyant un mécanisme prétraductionnel par lesquels les macromolécules alimentaires régulent l'adaptation pancréatique. Les concentrations de tous les ARNm testés varient en parallèle des niveaux des enzymes, selon une amplitude compatible avec une régulation transcriptionnelle (Dagorn, 1986). Toutefois, pour l'amylase et la lipase dont les changements sont plus importants dans le niveau d'ARNm que dans celui des enzymes, la juxtaposition d'une régulation post-transcriptionnelle *i.e.* d'une régulation du transport nucléocytoplasmique ou stockage des ARNm dans la cellule pancréatique, limitant ainsi la traduction des ARNm en protéines, n'est pas exclue (Giorgi *et al.*, 1984).

A l'aide d'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, Puigserver *et al.* (1985) ont montré que seule la stabilité des ARNm du trypsinogène-1 et de la proélastase-1 augmente de 67 % et diminue de 50 %, respectivement suite à l'ingestion d'un régime hyperprotéique ; celle des ARNm des autres enzymes pancréatiques n'est pas modifiée. Ceci suggère que la régulation nutritionnelle de la biosynthèse de certaines enzymes pancréatiques est au moins en partie, traductionnelle.

L'insuline, la CCK et son analogue synthétique ou caeruleine régulent la traduction des enzymes digestives pancréatiques. A la fois, l'insuline et la CCK stimulent la synthèse des protéines totales, trypsinogène, chymotrypsinogène, lipase et amylase dans des acini traités *in vitro* avec de l'actinomycine D (Lahaie, 1986). Des perfusions de caeruleine augmentent la synthèse du trypsinogène anionique (300 %) et diminuent la synthèse de l'amylase (75 %) sans changer le niveau de leurs ARNm (Steinhilber *et al.*, 1988). Les régions 5' non codantes de ces ARNm ont une séquence conservée de 7 paires de bases (pb) qui peut former une structure en épingle à cheveux, qui affecte le contrôle traductionnel de ces ARNm (Pinsky *et al.*, 1985 ; Steinhilber *et al.*, 1988).

1.2.5. Régulation nutritionnelle des enzymes digestives chez quelques invertébrés : adaptation et mécanismes

Des modifications de l'activité de plusieurs enzymes digestives chez différents arthropodes sont reliées à la quantité ou à la qualité nutritive du régime alimentaire.

Chez *Penaeus vannamei*, un effet dose est observé pour l'activité de la trypsine en fonction de la quantité de caséine, sans changement du profil des isoformes (Le Moullac *et al.*, 1996). La chymotrypsine n'est pas affectée (Le Moullac *et al.*, 1996). L'activité amylase diminue quand la quantité de caséine augmente ; les 2 isoformes majeures et leurs ARNm sont présents avec un régime à 25 % de caséine, et une seule isoforme et son ARNm à un régime à 40 %, suggérant une régulation transcriptionnelle de l'amylase (Le Moullac *et al.*, 1996). Chez *Litopenaeus stylirostris*, un effet dose est observé pour l'activité de l'amylase en fonction des glucides alimentaires (Rosas *et al.*, 2000).

Chez *Penaeus vannamei*, la farine de calmar stimule significativement l'activité de la chymotrypsine alors que l'activité de la trypsine est significativement plus faible avec le concentré protéique soluble de poisson (Le Moullac et Van Wormhoudt, 1994). L'activité amylase augmente significativement avec l'amidon de maïs (Le Moullac et Van Wormhoudt, 1994). Le glucose alimentaire réprime l'activité de l'amylase chez plusieurs espèces de mouches du genre *Drosophila* (Hickey et Benkel, 1982a), alors que l'amidon induit cette activité (Abe, 1958 ; Doane, 1969 ; Yamazaki et Matsuo, 1984 ; Matsuo et Yamazaki, 1984, 1986 ; Inomata *et al.*, 1995). Les changements dans l'activité amylase globale ou des différentes isozymes chez les espèces de mouches du genre *Drosophila* sont corrélés aux

changements des ARNm correspondants (Benkel et Hickey, 1986a ; Yamate et Yamazaki, 1999), suggérant une régulation transcriptionnelle. En 5' de ces gènes, en amont du site d'initiation de la transcription (région promotrice), on trouve des éléments cis-régulateurs susceptibles de modifier l'expression des gènes de l'amylase (Magoulas *et al.*, 1993 ; Choi et Yamazaki, 1994).

1.2.6. Régulation des enzymes digestives par d'autres facteurs (stade de développement, température) : adaptation et mécanismes

- chez les vertébrés :

Le développement post-natal influe sur le niveau d'activité des enzymes digestives. Chez le porc âgé de trois jours, l'activité de l'amylase augmente de 336 % tandis que celles de la trypsine, chymotrypsine et de la lipase restent au niveau mesuré à la naissance (Mubiru et Xu, 1998). Chez le rat, les activités de ces enzymes déclinent de 61 à 92 % durant les 3 premiers jours post-natals (Mubiru et Xu, 1998). Chez le flet *Pleuronectes americanus*, des ARNm amylase sont détectés 5 jours après l'éclosion et leur niveau augmente pour atteindre un maximum à 20 jours puis décroître pendant la période de la métamorphose. Le gène de l'amylase est fortement exprimé chez l'adulte (Douglas *et al.*, 2000). Péres *et al.* (1998) ont montré des niveaux d'ARNm amylase plus élevés chez les larves jeunes par rapport à des larves plus âgées, pour le bar européen *Dicentrarchus labrax*.

- chez les invertébrés :

Une variation de l'activité des enzymes digestives est observée au cours du développement des larves de crevettes pénéides. Ainsi, le niveau des activités chez les nauplii est très faible et augmente à partir du stade zoé (Barnabé, 1991). La régulation nutritionnelle de la synthèse de la trypsine chez *P. vannamei* est différente selon le stade de mue. La régulation est probablement initialement transcriptionnelle au stade D0, tandis qu'elle serait traductionnelle au stade D2 (Klein, 1997). L'activité amylase de *Drosophila kikkawai* est hautement affectée par non seulement les sucres alimentaires mais aussi par les stades de développement (Inomata *et al.*, 1995). L'expression des 4 gènes de l'amylase est soumise à une régulation âge-spécifique chez *D. ananassae* : le cluster qui contient les gènes codant Amy 1 et Amy 2 est actif préférentiellement chez la larve alors que le cluster qui renferme les gènes codant Amy 3 et Amy 4 est plus exprimé chez l'adulte (Da Lage *et al.*, 1996a). Cette

spécificité d'expression de l'amylase en fonction du stade de développement pourrait s'expliquer par la forte divergence des régions flanquantes (régions 5' et 3') des gènes amylase alors que leurs séquences codantes demeurent similaires (Da Lage *et al.*, 2000).

Des changements dans les propriétés catalytiques sont montrés durant une adaptation à la température chez les crevettes pour les trypsines (Galgani, 1985), mais aussi pour les amylases (Van Wormhoudt, 1980). L'activité amylase de deux crustacés *Corophium volutator* (Stuart *et al.*, 1985) et *Gammarus palustris* (Guarna et Borowsky, 1995), deux bivalves *Cerastoderma edule* (Ibarrola *et al.*, 1998) et *Pecten maximus* (Le Pennec et Le Pennec, 2002) varie avec les saisons. Pour *P. maximus*, les transcrits d'ARNm amylase sont réduits durant l'hiver, mais ils deviennent abondants à partir de mars, quand les blooms phytoplanctoniques commencent, jusqu'en septembre (Le Pennec et Le Pennec, 2002). Il en est de même pour les actinies ou anémones de mer (Van Praet, 1982). Chez *Gammarus palustris*, deux bandes majeures d'activité amylase, Amy I et Amy II, sont détectées en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE). Des extraits à partir d'animaux collectés durant les mois les plus chauds montrent généralement une simple bande dans la zone Amy I (Amy I^w), mais les animaux collectés durant l'hiver ou au début du printemps ont une bande supplémentaire qui migre au côté de la bande Amy I^w (Amy I^c). Ces isozymes, Amy I^w et Amy I^c, sont donc produites différemment en fonction des saisons ; de plus, Amy I^c, peut être induite en diminuant la température (Borowsky, 1984). Cependant, ces deux isozymes présentent des variations d'activité similaires avec la température, le pH et la concentration de l'ion Cl⁻ (Guarna et Borowsky, 1995) ; par conséquent leurs propriétés étant identiques (Amy I^c n'est pas meilleure que Amy I^w pour travailler à basses températures), leur profil saisonnier d'expression n'est pas un mécanisme adaptatif.

2. Amylases

2.1. Historique

L'histoire des amylases a commencé en 1811 lorsque Kirchhoff a découvert un composant « glutineux » (comme il l'a appelé à l'époque) du blé, capable de dégrader l'amidon. Cette découverte a été suivie par plusieurs rapports sur les amylases digestives et les amylases de malt. Plus tard, en 1930, Ohlsson a suggéré la classification des enzymes digérant l'amidon dans le malt en deux catégories, les α - et β -amylases, qui se distinguent par leur site d'hydrolyse et par le type anomérique des sucres produits à la suite de la réaction enzymatique. Les α -amylases sont des endoamylases (EC 3.2.1.1) qui clivent les liaisons α -

(1-4)-D-glycosidiques présentes à l'intérieur (endo-) des chaînes d'amylose et d'amylopectine, constitutives de l'amidon et du glycogène. Les produits libérés à la suite de l'action des α -amylases sont des oligosaccharides, principalement du α -maltose (2 unités de glucose), et des dextrans α -limites. Les amylases animales sont généralement connues comme étant des α -amylases (Owen, 1966). Les β -amylases sont des exoamylases (EC 3.2.1.2) qui clivent les liaisons α -(1-4)-D-glycosidiques présentes au niveau des extrémités (exo-) non réductrices des chaînes d'amylose et d'amylopectine. Les liaisons α -(1-6)-D-glycosidiques d'amylopectine sont hydrolysées par des α -(1-6)-glucosidases (EC 3.2.1.10). Les β -amylases catalysent la libération progressive de β -maltose et des dextrans β -limites.

L' α -amylase a suscité beaucoup d'intérêt chez les biologistes, qui ont ainsi caractérisé plusieurs gènes et protéines de cette enzyme chez les animaux, les végétaux et les microbes (Svensson, 1988 ; Janeček, 1994 ; Pandey *et al.*, 2000) et qui lui ont découvert de nombreuses applications pharmaceutiques, cliniques et industrielles. En catalysant la première étape d'hydrolyse de l'amidon et du glycogène, non seulement, l' α -amylase assure un rôle majeur dans les processus digestifs, mais également, elle intervient, en amont, dans la production de glucose qui, avec les acides aminés et les stérols, assure la couverture des besoins énergétiques de chaque être vivant. C'est pourquoi, dès 1984, les α -amylases sont d'une part commercialisées comme médicaments dans le traitement des désordres digestifs. D'autre part, des patients diabétiques ou obèses sont traités avec l'acarbose, un pseudotétracosaccharide isolé de *Streptomyces*, inhibant les α -amylases et permettant ainsi une réduction du niveau de glucose sanguin postprandial (Muller *et al.*, 1980 ; Reaven *et al.*, 1990 ; Matsuo *et al.*, 1992 ; Chiasson *et al.*, 1994 ; Ledermann et Hoxter, 1994 ; Noda *et al.*, 1997). Les α -amylases sont aussi utilisées dans la boulangerie, la pâtisserie, la brasserie, le textile, l'industrie du papier et les détergents (Godfrey et West, 1996 ; Pandey *et al.*, 2000 ; Gupta *et al.*, 2003).

2.2. Amylases animales (α -amylases)

2.2.1. Lieux de synthèse

Chez l'homme, l'amylase est largement présente dans les sécrétions salivaires (amylase S) et pancréatiques (amylase P). Les amylases humaines S et P sont codées par les gènes Amy 1 et Amy 2A, respectivement, qui sont situés sur le chromosome 1 (Nishide *et al.*, 1986 ; Horii *et al.*, 1987 ; Tricoli et Shows, 1984). L'amylase humaine S est constituée principalement de deux familles ; les amylases de la famille A sont des protéines glycosylées

de 62 kDa, alors que les amylases de la famille B sont des protéines non glycosylées de 55 kDa (Karn et Malacinski, 1978). Les 2 principales amylases humaines P sont des protéines non glycosylées de 56 kDa chacune, mais, dont les points isoélectriques diffèrent : 7,2 contre 6,6 ; ces différentes valeurs de pI pourraient résulter de modifications post-traductionnelles autres que la glycosylation telles que des amidation/désamidation (Ferey-Roux *et al.*, 1998). Une amylase humaine codée par le gène Amy 2B est à la fois présente dans le foie et le tissu cancéreux pulmonaire (Tomita *et al.*, 1989 ; Yokouchi *et al.*, 1990 ; Koyama *et al.*, 2001b). Le niveau d'activité amylase hépatique est élevé chez le rat alors qu'il est faible chez l'homme (Samuelson *et al.*, 1988 ; Koyama *et al.*, 2001a,b) ; les foies montrant des activités amylase élevées présentent des teneurs élevées en amylases glycosylées (Koyama *et al.*, 2002). Il apparaît donc une diminution du niveau d'activité amylase dans le foie au fur et à mesure de l'évolution. Par conséquent, l'amylase du foie peut jouer un rôle significatif chez les rongeurs, *i.e.* l'amylase peut jouer un rôle dans le métabolisme du glycogène hépatique (Rutter *et al.*, 1961) d'autant que Koyama *et al.* (2001a) ont montré que l'amylase spécifique du foie a une forte affinité pour le glycogène. L'amylase du foie peut être une isozyme ancestrale, alors que les amylases de types S et P peuvent être exprimées plus récemment et être des isozymes développées chez les mammifères ; l'amylase du foie peut être une enzyme atrophique chez l'homme (Koyama *et al.*, 2002). Les amylase hépatiques de l'homme et du rat sont des protéines glycosylées de 50 kDa (Koyama *et al.*, 2001a,b). Les amylases hépatiques de l'homme et du rat peuvent être détectées avec un anticorps polyclonal anti-amylase S humaine (McGeachin et Potter, 1960). Des amylases humaines de type salivaire, c'est-à-dire possédant une mobilité électrophorétique voisine de celle des amylases salivaires, sont également produites dans les tractus génitaux féminin et masculin, les poumons, les glandes lacrymales et mammaires, et la thyroïde (Hernandez, 1986). Des amylases humaines de type pancréatique sont également synthétisées au niveau du duodénum, dans sa partie proximale (Hernandez, 1986).

Les poissons ne possèdent pas de glandes salivaires. La plupart des espèces de poissons ne possèdent pas un pancréas distinct, mais plutôt des cellules pancréatiques qui ont diffusé autour de l'intestin ou dans le foie (Yardley, 1988). L'activité amylase a ainsi été décrite dans l'estomac (Ugwumba, 1993 ; Yamada *et al.*, 1996), dans l'intestin (Ugwumba, 1993 ; Yamada *et al.*, 1991 ; Yamada *et al.*, 1996 ; N.R.C., 1993 ; Sabapathy et Teo, 1994) et dans les caecae pyloriques (Ugwumba, 1993). Yamada *et al.* (1996) ont purifié une amylase stomacale chez le tilapia mais, ils ont obtenu une protéine de masse moléculaire plus faible

(40 kDa) que celle des deux isoformes amylase (54 et 56 kDa, respectivement) provenant de l'intestin (Yamada *et al.*, 1991).

Chez les insectes, l'amylase est produite dans le tube digestif moyen (Sakai *et al.*, 2004).

Chez les crustacés, l'amylase est synthétisée dans l'hépto-pancréas (Dall et Moriarty, 1983 ; Gibson et Barker, 1979).

L'activité amylase dans le stylet cristallin des mollusques a été démontrée dès 1900 (Coupin, 1900) et est présentée depuis comme l'une des enzymes les plus actives du stylet cristallin (Trainer et Tillinghast, 1982). Dans notre modèle biologique *C. gigas*, les plus forts niveaux de transcrits des deux gènes (A et B) et d'activité amylase sont observés dans la glande digestive (Huvet *et al.*, 2003). De très faibles quantités de transcrits des deux gènes et d'activité amylase sont aussi observées dans des tissus ne présentant pas de fonctions digestives (branchies, manteau, muscle et palpes labiaux). Ceci peut être lié à une expression illégitime des deux gènes dans les tissus, autres que la glande digestive, comme cela est rapporté par Chelly *et al.* (1989) pour différents gènes dont l'expression est tissu-spécifique. Parmi ces tissus, les niveaux des transcrits des deux gènes et d'activité amylase sont particulièrement plus élevés dans les palpes labiaux. Les palpes labiaux trient les particules alimentaires avant qu'elles soient ingérées par les huîtres (Morton, 1983), de ce fait, les amylases qui y sont produites pourraient amorcer la digestion de l'amidon et avoir la même fonction que les amylases salivaires de mammifères. Les palpes labiaux sont aussi des lieux majeurs de stockage du glycogène (Berthelin *et al.*, 2000b). Les amylases des palpes labiaux pourraient être impliquées dans le métabolisme du glycogène, étant donné la similarité de structure entre l'amidon et le glycogène. En effet, l'amylase S humaine et les amylases hépatiques de l'homme et du rat présentent la même antigénicité (McGeachin et Potter, 1960). L'amylase S humaine est capable d'hydrolyser le glycogène issu des huîtres (Matsui *et al.*, 1996). L'amylase hépatique de rat hydrolyse le glycogène, libérant ainsi du glucose (Koyama *et al.*, 2001a).

2.2.2. Propriétés catalytiques et structurales

- Spécificités d'action et affinités pour différents substrats :
 - les amylases catalysent toujours le même type de réaction, c'est-à-dire l'hydrolyse des liaisons internes α -(1-4)-D-glycosidiques constitutives des polysaccharides glucidiques telles que l'amidon et le glycogène.
 - les isozymes de l'amylase ne se comportent pas de la même façon à l'égard de leurs différents substrats (Zakowski et Bruns, 1985). Vis à vis des amidons solubles, l'amylase salivaire (S) humaine développe une activité supérieure à l'amylase pancréatique (P) humaine, mais, vis à vis des amidons insolubles chromogéniques, c'est l'inverse qui se produit (Brock, 1987 ; Stiefel et Keller, 1975). En termes d'affinité, c'est « S » qui a moins d'affinité que « P » pour l'amidon soluble (Brock, 1987). Pour Stiefel et Keller (1975), c'est la nature physique du substrat qui est en cause, et « P » serait une molécule moins compacte que « S ».
- Activation par les ions Ca^{2+} et Cl^- : deux ligands non protéiques, les ions Ca^{2+} et Cl^- , sont d'une importance structurale et fonctionnelle pour les amylases. Les ions Ca^{2+} sont connus pour rendre l'amylase résistante à l'attaque protéolytique (Stein *et al.*, 1964). Plusieurs amylases, dont l'enzyme pancréatique de porc (Levitzki et Steer, 1974) et l'enzyme de la bactérie *Alteromonas haloplanctis* (Feller *et al.*, 1996) ont recours à l'ion Cl^- pour avoir une activité catalytique maximale. Pour ces amylases, l'élimination de l'ion Cl^- conduit non seulement à une diminution significative de leur activité mais aussi à un décalage de leur optimum de pH (Feller *et al.*, 1996 ; Wakim *et al.*, 1969).
- Inhibiteurs : les amylases sont inhibées par l'EDTA et l'inhibiteur spécifique de l'amylase du grain de blé (*Triticum aestivum*). L'EDTA, agent chélateur, élimine les ions Ca^{2+} qui sont nécessaires à l'activité de l'amylase (Fischer et Stein, 1960). L'élimination des ions Ca^{2+} déstructure l'amylase et l'expose ainsi à l'attaque protéolytique par d'autres enzymes présentes dans les extraits bruts (Stein et Fischer, 1958).
- Point isoélectrique : il se situe en général entre 6 et 8. Les amylases salivaires présentent un point isoélectrique inférieur à celui des amylases pancréatiques (Hernandez, 1986).
- Antigénicité : la non identité immunologique des amylases salivaire et pancréatique reflète leurs origines génétiques différentes, Amy 1 et Amy 2 (Merritt et Karn, 1977), dont les séquences sont différentes.

2.2.3. Structure de la protéine

A partir de l'analyse des séquences, les amylases appartiennent à la famille 13 des hydrolases glycosidiques (GH) (Henrissat, 1991 ; Henrissat et Bairoch, 1993, 1996 ; Henrissat et Davies, 1997). La comparaison des séquences en acides aminés des amylases issues de diverses origines montrent 4 régions hautement conservées. La similarité des séquences entre les différentes amylases est faible, environ 10 % entre les amylases bactériennes et mammaliennes, mais les structures tertiaires sont absolument bien conservées à l'intérieur de ce groupe d'enzymes (Nakajima *et al.*, 1986 ; Jespersen *et al.*, 1991 ; Janeček, 1994). D'une manière générale, les amylases sont des protéines monomériques d'environ 50 kDa et ayant 3 domaines structuraux appelés A, B et C.

Le domaine A est le plus large et il contient le site actif. Il a l'aspect d'un cylindre $(\beta/\alpha)_8$ constitué de 8 feuillets β parallèles et de 8 hélices α . Les feuillets β et les hélices α alternent le long de la chaîne polypeptidique et sont reliés entre eux par des boucles irrégulières. Les boucles 1 à 8 lient les extrémités C-terminales des feuillets β aux extrémités N-terminales des hélices α adjacentes portant les acides aminés impliqués dans la fixation et la catalyse du substrat (une triade catalytique composée de deux aspartates et d'un glutamate). Le site actif d'une amylase est composé d'un site catalytique et de plusieurs sous-unités contiguës, où une sous-unité est une région du site actif capable d'interagir avec une unité de glucose du substrat. Les différences dans la spécificité des amylases sont donc expliquées par des différences dans le nombre de sous-unités à chaque site actif, dans la nature des acides aminés constituant les sous-unités et le site catalytique. Ce cylindre $(\beta/\alpha)_8$ a été observé pour la première fois chez l'isomérase des trioses-phosphate du muscle de poulet (Banner *et al.*, 1975) et est donc aussi appelé cylindre TIM (par référence à la traduction anglaise). Certains membres de la famille des amylases, dont l'amylase pancréatique de porc (Levitzki et Steer, 1974), ont recours à l'ion chlorure Cl^- pour avoir une activité enzymatique maximale. Le site de liaison du Cl^- est situé dans le domaine A (Brayer *et al.*, 1995).

Les boucles, reliant les feuillets β aux hélices α adjacentes dans le domaine A de l'amylase, sont habituellement courtes. La boucle placée entre le troisième feuillet β et la troisième hélice α est cependant, assez longue pour être considérée comme un domaine distinct, appelé le domaine B (Qian *et al.*, 1993). Le domaine B présente une structure irrégulière plutôt riche en feuillets β , et varie énormément en taille et en structure d'un membre à l'autre de la famille des amylases (Jespersen *et al.*, 1993). Cette variation du

domaine B semble jouer un rôle dans les différences de spécificité de substrat observées entre les amylases (Janeček *et al.*, 1997). En général, le domaine B des amylases présente plusieurs acides aminés qui fonctionnent comme des sites de fixation du substrat (*e.g.*, Matsuura *et al.*, 1984) et il est impliqué dans la liaison des ions calcium (Ca^{2+}) qui ont un rôle structural en maintenant la chaîne polypeptidique dans une conformation correcte pour sa stabilité et son activité enzymatique (*e.g.*, Boel *et al.*, 1990). La liaison de Ca^{2+} au domaine B facilite son interaction avec le domaine A.

Le domaine C est situé dans la partie C-terminale de la séquence juste après le cylindre $(\beta/\alpha)_8$. Il présente une structure dite en sandwich de feuillets β (Qian *et al.*, 1993 ; Brayer *et al.*, 1995). Selon les séquences des amylases des espèces étudiées, une ou deux séquences de glycosylation (Asn-Xaa-Thr/Ser-Xaa) y sont observées. La fonction de ce domaine n'est pas encore bien comprise. Cependant, par des approches de mutations ou de délétions, Doyon *et al.* (2002) ont montré que le domaine C a un rôle essentiel dans le repliement post-traductionnel correct de l'amylase pancréatique de rat, garantissant ainsi l'activité et la sécrétion de cette enzyme.

D'une manière générale, les amylases sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique (protéine monomérique) ayant un poids moléculaire d'environ 55 kDa. Néanmoins, quelques rapports font état de sous-unités actives ayant des poids moléculaires inférieurs ou supérieurs à 55 kDa. Pour l'amylase pancréatique de porc, Robyt *et al.* (1971) ont détecté deux sous-unités enzymatiques actives ayant des poids moléculaires de 25 kDa chacune ; ces sous-unités seraient le résultat de clivages endoprotéolytiques. Robson (1979) trouva un poids moléculaire pour l'amylase du crustacé *Asellus aquaticus* de l'ordre de 220 kDa ou de 120 kDa selon que l'extrait avait été purifié par chromatographie échangeuse d'ion ou était brut, alors qu'une simple migration de l'amylase purifiée sur PAGE, par gradient de densité, indiquait un poids moléculaire de 70 kDa. Ces différents résultats pouvaient indiquer la formation de complexes entre plusieurs molécules d'enzymes. Van Wormhoudt et Favrel (1988) ont détecté 7 isoformes d'amylase issues de l'hépatopancréas du crustacé *Palaemon elegans*, dont les poids moléculaires sont compris entre 29 et 78 kDa. Les formes de faible poids moléculaire (29 à 33 kDa, les formes 1 à 4) correspondraient à l'expression d'un gène ancestral alors que les formes plus lourdes (53 à 75 kDa, les formes 5 à 7) pourraient résulter de la duplication et de la fusion de ce gène ancestral. La forme moléculaire la plus lourde (forme 7) dont l'activité spécifique est faible, pourrait être le précurseur donnant les deux autres classes après clivages endoprotéolytiques. Van Wormhoudt *et al.* (1995) ont montré

que les poids moléculaires apparents, déterminés par SDS-PAGE, étaient de 30 kDa pour deux crustacés décapodes, *Penaeus vannamei* et *Carcinus maenas*.

2.2.4. Structure du gène

2.2.4.1. Alternance exon/intron

La plupart des gènes d'eucaryotes, par exemple ceux qui codent les amylases, présentent une séquence codante interrompue par des introns (figure 8). La structure exon/intron du gène est variable concernant le nombre d'introns et leurs points d'insertion. Pour les animaux, les séquences géniques les plus complexes sont rencontrées chez l'homme, le poulet et les crustacés avec 9 introns (Nakamura *et al.*, 1984 ; Benkel *et al.*, 1997 ; Sellos et Van Wormhoudt, 2002). Parmi les insectes, aucun intron ou un seul intron est présent chez les mouches du genre *Drosophila* (Boer et Hickey, 1986 ; Da Lage *et al.*, 1992, 1996b), mais ces espèces ne sont pas représentatives du groupe. En effet, *Apis mellifera* et *Ceratitidis capitata* ont deux introns (Ohashi *et al.*, 1999 ; Da Lage *et al.*, 2002), *Tribolium castaneum*, 3 (Abukashawa *et al.*, 1993) et *Ostrinia nubilalis*, 6 (Forster *et al.*, 1993). Plus récemment, la structure du gène amylase a été rapportée chez *Litopenaeus vannamei* et *C. gigas* qui comptent 9 et 7 introns, respectivement (Sellos et Van Wormhoudt, 2002 ; Sellos *et al.*, 2003).

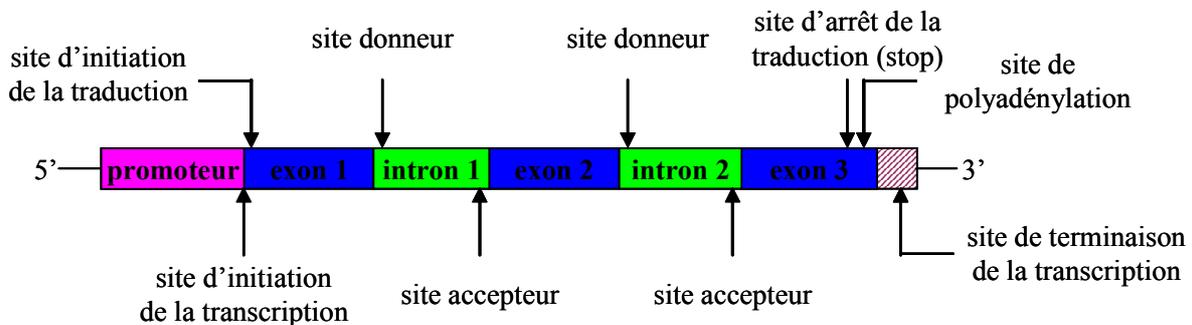


Figure 8. Structure d'un gène d'eucaryote et de son promoteur

2.2.4.2. Copies multiples

Les gènes codant les amylases sont présents en copies multiples. Chez les animaux, des duplications ont été mises en évidence chez l'homme (Groot *et al.*, 1989 ; Meisler et Ting, 1993 ; Nakamura *et al.*, 1984), les rongeurs (MacDonald *et al.*, 1980), les insectes (Levy *et al.*, 1985 ; Baker *et al.*, 1990 ; Hickey *et al.*, 1987), les crustacés (Laulier, 1988 ; Van

Wormhoudt et Sellos, 1996) et les mollusques (Scheil et Günther, 1981). Chez l'homme, trois gènes, Amy 1, Amy 2A et Amy 2B, ont été identifiés (Nishide *et al.*, 1986 ; Horii *et al.*, 1987 ; Yokouchi *et al.*, 1990), et ils produisent une amylase salivaire, pancréatique et tumorale, respectivement. Chez la souris, 2 gènes, Amy-1 et Amy-2, ont été isolés, et ils codent une amylase salivaire et pancréatique, respectivement. Une troisième amylase est détectée dans le foie de souris, différant de l'amylase salivaire par la région 5' non traduite de l'ARNm (Hagenbüchle *et al.*, 1980, 1981). Chez le poulet, deux copies du gène amylase sont détectées ; un locus est complet et exprime le gène amylase pancréatique, alors que la seconde copie ressemble plus à un pseudogène (Benkel *et al.*, 1997). De plus, aucun locus amylase putatif spécifique de la glande salivaire est trouvé dans le génome du poulet (Benkel *et al.*, 1997). Ce résultat est en accord avec le manque d'activité amylase détecté dans les tissus salivaires de poulet (Jerrett et Goodge, 1973). Chez plusieurs mouches du genre *Drosophila*, le nombre de gènes amylase rapportés varie entre 1 (*D. virilis*, (Tadlaoui-Ouafi, 1993)) et 7 (*D. ananassae* (Da Lage *et al.*, 2000)). Chez les crevettes, *Penaeus vannamei* présente au moins cinq gènes (Van Wormhoudt et Sellos, 1996) et *Litopenaeus vannamei*, 3 (Van Wormhoudt et Sellos, 2003). Chez l'huître creuse du Pacifique *C. gigas*, deux gènes amylase nommés A et B ont été décrits (Sellos *et al.*, 2003).

2.2.4.3. Liaisons

Chez l'homme et la souris, les gènes de l'amylase sont localisés dans des loci autosomiques étroitement liés (Merritt *et al.*, 1972 ; Sick et Nielsen, 1964 ; Kaplan *et al.*, 1973, Pittet et Schibler, 1985 ; Gumucio *et al.*, 1988), où les gènes amylase pancréatique et salivaire sont situés sur le même chromosome ; les deux loci correspondant aux gènes salivaire et pancréatique d'amylase sont distants au maximum de 0,87 cM chez la souris (Bloor et Meisler, 1980). Chez *Drosophila melanogaster*, deux gènes sont localisés sur le même chromosome (Levy *et al.*, 1985) alors que quatre gènes potentiellement actifs sont localisés au niveau de deux clusters présents sur des chromosomes différents chez *Drosophila ananassae*, chaque cluster étant constitué de deux gènes très liés (Da Lage *et al.*, 1992). La forte divergence génique entre ces deux gènes suggère que la duplication du gène est un événement très ancien. Chez *Aedes aegypti*, plusieurs copies multiples liées sont présentes dans deux loci situés sur des chromosomes différents (Grossman *et al.*, 1997).

2.2.5. Formes multiples des enzymes

Les formes multiples d'une enzyme (*i.e.* isozymes) peuvent être dues non seulement à la présence de plusieurs loci et/ou d'allèles par locus codant cette enzyme, mais également à des modifications co- ou post-traductionnelles affectant les chaînes polypeptidiques natives.

L'amylase salivaire humaine comprend deux familles majeures ; les amylases de la famille A sont glycosylées, ces glycoprotéines de 62 kDa présentent un seul oligosaccharide lié à l'extrémité N-terminale de la protéine, alors que les amylases de la famille B ne sont pas glycosylées et sont des protéines de 55 kDa (Karn et Malacinski, 1978). La séparation des enzymes de chaque famille se fait essentiellement par PAGE et par isoélectrofocalisation (IEF) ; la première méthode sépare en fonction du poids moléculaire, la seconde, en fonction du point isoélectrique de la protéine. En PAGE, Keller *et al.* (1971) ont séparé les amylases salivaires en 5 formes notées 1 à 5 de l'anode vers la cathode. Plusieurs formes additionnelles migrant plus vers l'anode que la bande 1, sont quelques fois présentes sous forme de traces, désignées bandes Z. Ces bandes deviennent plus importantes après incubation des échantillons salivaires à pH 9, tandis que les bandes 4 et 5 diminuent en importance : ce phénomène est le résultat d'une désamidation. Eckersall et Beeley (1981), par isoélectrofocalisation, ont séparé 5 bandes majeures. Les amylases pancréatiques ne sont pas glycosylées (aucune différence entre les poids moléculaires données par SDS-PAGE et ceux déduits à partir des séquences nucléotidiques). Warshaw et Lee (1977), par PAGE, séparent 3 bandes. La plus anodique, la bande 3, produite par désamidation de la bande 2 augmente particulièrement dans les liquides de kystes pancréatiques, dans les pancréatites aiguës, liquides où incube l'amylase pancréatique.

2.2.6. Relations polymorphisme/fonction

Très peu d'auteurs ont essayé d'établir des relations fonctionnelles entre un polymorphisme génétique et des paramètres physiologiques.

2.2.6.1. Poisson

Pour le cabillaud de l'Atlantique *Gadus morhua* Gadidae, des exceptions existent au niveau des loci de l'hémoglobine et de la trypsin-like. Le locus de l'hémoglobine chez le

cabillaud de l'Atlantique est caractérisé par au moins 3 génotypes différents Hb-I(1/1), Hb-I(1/2) et Hb-I(2/2). Mork *et al.* (1984a,b), Mork et Sundnes (1984) et Nævdal *et al.* (1992) ont rapporté des différences de croissance apparentées au polymorphisme génétique de l'hémoglobine. Ces taux de croissance génotype-dépendants sont probablement corrélés avec des différences dans les propriétés fonctionnelles des différentes hémoglobines produites. Brix *et al.* (1998) ont étudié la variation génétique et les propriétés fonctionnelles des hémoglobines de cabillaud et ils ont trouvé que l'affinité des hémoglobines pour l'oxygène variait entre les génotypes ; des résultats similaires ont été obtenus chez le turbot (Samuelsen *et al.*, 1999). Salvanes et Hart (2000) ont également montré une corrélation entre la croissance et le comportement alimentaire des génotypes.

Une corrélation entre la taille des poissons et les génotypes trypsin-like est établie pour le saumon de l'Atlantique *Salmo salar* (Torrissen, 1987 ; Torrissen 1991 ; Torrissen et Shearer, 1992) et l'omble chevalier *Salvelinus alpinus* (Torrissen et Barnung, 1991 ; Torrissen et Shearer, 1992). La croissance des poissons est étudiée en utilisant le profil électrophorétique des isozymes trypsin-like comme marqueur génétique. Les poissons porteurs des génotypes Trp-2 (92/92) ou Trp-2 (92/100) ont des poids significativement plus élevés que ceux des autres génotypes. Ce gain de poids n'est cependant pas dû à une digestion améliorée des protéines (Torrissen et Shearer, 1992). Les groupes possédant le variant Trp-2*92 chez *Salmo salar* et *Salvelinus alpinus* apparaissent pour autant plus capables d'utiliser la nourriture par rapport aux groupes ne présentant pas ce variant (Torrissen et Shearer, 1992).

2.2.6.2. Poulet

Les allozymes amylase agissent à la fois sur les performances de croissance et de conversion alimentaire des poulets ; cela est particulièrement bien visible dans la lignée « Barred Plymouth Rock » (Hughes *et al.*, 1994). Pour les poulets de la lignée « Barred Plymouth Rock », les génotypes amylase Amy^S présentent à la fois un poids plus élevé et une meilleure conversion alimentaire que les génotypes Amy^F. Pour les poulets de la lignée « Rhode Island Red », les génotypes amylase Amy^S montrent seulement un meilleur poids. Ceci suggère qu'en fonction des différences dans le bagage génétique, des poulets porteurs du même génotype amylase peuvent ne pas donner tout à fait les mêmes résultats ; d'autres gènes participent avec ceux de l'amylase à la conversion alimentaire. Néanmoins, il semble que ces différences de performances soient liées à des différences dans l'activité amylase spécifique (Gapusan *et al.*, 1990) et ne le sont pas au type d'amidon alimentaire utilisé dans ces

expériences comme cela avait été supposé au départ. En effet, les amylases Amy^F et Amy^S diffèrent dans leurs propriétés biochimiques (Yardley *et al.*, 1988 ; Gapusan *et al.*, 1990). Amy^F et Amy^S digèrent davantage l'amidon de maïs et l'amidon de blé, respectivement. De ce fait, Hughes *et al.* (1994) avaient supposé qu'en présence d'amidon de maïs, le génotype Amy^F aurait des meilleures performances que le génotype Amy^S, par contre, en présence d'amidon de blé, les génotypes inverseraient leurs performances. Or, dans l'ensemble des quatre expériences basées sur le génotype amylase et la nourriture (Amy^F, maïs ; Amy^S, maïs ; Amy^F, blé ; Amy^S, blé), le génotype Amy^S présente une plus forte activité, des meilleures efficacités de conversion et croissance.

2.2.6.3. Drosophile

D. melanogaster et *D. virilis* grandissent bien dans un environnement contenant de l'amidon, et elles y présentent une forte activité amylase. Donc, il est suggéré que ces deux espèces s'adaptent aux régimes alimentaires composés d'amidon en augmentant le niveau d'activité amylase (Fujimoto *et al.*, 1999). *D. saltans* grandissent bien dans un milieu contenant du glucose, à l'inverse d'un milieu contenant de l'amidon. Cette espèce montre la plus faible activité amylase sur amidon, indiquant que cette espèce ne peut utiliser l'amidon comme aliment. Ceci peut être la principale raison pour laquelle cette espèce ne s'adapte pas à un environnement contenant de l'amidon.

Les différences d'activité amylase entre trois génotypes amylase de *D. melanogaster* ne sont pas dues à des différences dans la structure des gènes amylase qui affectent la stabilité enzymatique ou l'efficacité catalytique des allozymes produites, mais plutôt à des différences dans la quantité d'enzymes synthétisées (Hickey, 1981). L'explication la plus plausible de ces différences génétiques dans la quantité enzymatique entre ces génotypes amylase est l'existence de gènes régulateurs ou de promoteurs qui contrôlent l'expression des gènes amylase. A ce propos, des gènes régulateurs qui contrôlent la distribution tissulaire de l'amylase dans *D. melanogaster* ont été identifiés (Abraham et Doane, 1978).

La variabilité dans la mobilité électrophorétique de l'amylase chez les espèces du genre *Drosophila* indique une adaptation à la diversité écologique (Prigent *et al.*, 2003). Dans cette étude, 150 espèces de drosophiles ont été analysées en électrophorèse de protéines. Les variants électrophorétiques migrant le plus vite vers l'anode sont généralement rencontrés dans des régions tropicales, et inversement, ceux qui migrent le plus lentement et ceux qui migrent vers la cathode sont plus communs dans les régions tempérées. Les amylases

anodiques sont plus fréquentes dans les régions tropicales, suggérant qu'elles présentent une plus grande stabilité thermique. D'ailleurs, l'amylase anodique de *D. virilis* est connue pour avoir une stabilité thermique plus élevée que l'amylase cathodique de *D. repleta*, cela se traduit par une différence de 15°C entre leurs optima de température (Prigent *et al.*, 1998). Il est donc probable que l'augmentation en acides aminés négatifs dans la séquence peptidique améliore la stabilité de la protéine amylase dans les régions tropicales. La distribution des variants électrophorétiques est montrée aussi pour être corrélée avec les habitudes alimentaires des espèces de *Drosophila* (Prigent *et al.*, 2003). Les amylases anodiques sont associées aux espèces phytophages, qui hydrolysent l'amidon des plantes, tandis que les amylases cathodiques sont associées aux espèces mycophages, qui hydrolysent le glycogène des champignons. D'ailleurs, l'amylase cathodique de *D. repleta* présente une plus grande affinité pour le glycogène par rapport à l'amylase anodique de *D. virilis* (Prigent *et al.*, 1998). Il est donc probable que l'augmentation en acides aminés positifs dans la séquence peptidique peut augmenter l'affinité de l'amylase pour le glycogène.

2.2.6.4. Crevette

Arena *et al.* (2003) ont montré que (1) des teneurs élevées en glucides alimentaires augmentaient l'activité amylase des crevettes sauvages mais, la diminuaient chez des crevettes issues de la 25^{ème} génération d'élevage, (2) l'activité amylase baissait au cours de la domestication des crevettes, avec des hautes valeurs chez les crevettes sauvages et des faibles valeurs chez les crevettes issues de la 25^{ème} génération, (3) l'hétérozygotie a chuté, conséquence de la sélection artificielle : les crevettes issues de la 25^{ème} génération d'élevage montraient moins d'hétérozygotie que les crevettes sauvages. Ainsi, la perte d'hétérozygotie modifie la réponse des crevettes aux différentes concentrations de glucides alimentaires.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

Des populations de *Crassostrea gigas* aux origines très diverses sont utilisées au cours des différentes expérimentations réalisées dans ce travail.

- Expérimentations visant à déterminer les rôles des deux gènes A et B via l'étude du fonctionnement moléculaire et enzymatique de l'amylase :

- (1) *au cours de l'ontogenèse* - Compte tenu des besoins importants en larves pour l'ensemble des analyses (*i.e.* la quantification des transcrits et le dosage d'activité enzymatique), ces analyses n'ont pas pu se faire à partir du même matériel biologique. Par conséquent, deux élevages larvaires puis post-larvaires ont été produits différemment selon des protocoles de croisement contrôlé et d'élevages détaillés dans les paragraphes 2.2 à 2.4. Au cours de certains changements d'eau, des prélèvements ont été réalisés. Les échantillons du premier élevage larvaire ont servi à quantifier les transcrits des deux gènes de l'amylase et ceux du second à doser son activité spécifique.

- (2) *et (3) en fonction de la température, de la quantité et de la qualité trophiques* - Les huîtres adultes utilisées pour l'ensemble de ces expérimentations provenaient d'une même population à base génétique large. Ces huîtres ont été produites à l'écloserie expérimentale Ifremer de la Tremblade (Charente-Maritime, France) en février 2001, à l'issue d'un croisement multi-parental à partir de géniteurs porteurs d'allèles amylase rares. Ces croisements avaient pour but d'amplifier les génotypes rares et d'équilibrer ainsi les fréquences des différents génotypes. A la mi-mars 2001, les naissains d'une taille d'environ 2 mm ont ensuite été transférés à la nurserie Ifremer de Bouin (Vendée, France) pour grossissement. Une partie de ce matériel a été transférée en octobre 2002 à l'Aber-Benoît (Finistère, France) puis, en novembre 2002, à la station Ifremer d'Argenton (Finistère, France) pour servir à l'expérimentation « quantité trophique et température ». L'autre partie a

été stockée de novembre 2002 à mars 2003 à Fort-Espagnol (Morbihan, France) puis, d'avril à octobre 2003, à l'Aber-Wrac'h (Finistère, France) au sein des concessions ostréicoles de la SATMAR et enfin, à la station Ifremer d'Argenton pour servir à l'expérimentation « qualité trophique ». Ces huîtres étaient âgées de 21 mois (poids total moyen = $32,1 \pm 1,5$ g) et de 33 mois (poids total moyen = $98,3 \pm 6,2$ g) pour les expérimentations « quantité trophique et température » et « qualité trophique », respectivement. Les analyses ont porté sur la quantification des transcrits des deux gènes de l'amylase par RT-PCR en temps réel et des paramètres catalytiques de cette enzyme (activité spécifique, constante apparente d'affinité ou constante de Michaelis-Menten ou K_M , électrophorèses de protéines) dans les glandes digestives prélevées au début et à la fin de chaque expérimentation.

- Expérimentations visant à établir des relations polymorphisme/fonction associées aux gènes de l'amylase en fonction de l'environnement (suivi *in situ*) : si une grande diversité des génotypes amylase existe, leur représentation dans la population naturelle n'est pas équilibrée : le génotype A1A1B1B1 y préside à plus de 70 % alors que les autres génotypes y sont rares. Ceci nous a donc empêché d'utiliser les populations naturelles comme matériel d'étude des propriétés d'un grand nombre de génotypes amylase. Pour disposer d'un panel de génotypes amylase, 400 huîtres ont été marquées, biopsées puis génotypées sur les deux marqueurs PCR-RFLP amylase à partir de l'ADN extrait au chelex. Toutes les huîtres présentant un ou plusieurs allèles rares pour l'un ou les deux gènes amylase ont été choisies en tant que géniteurs pour produire 5 familles bi-parentales selon des protocoles de croisement contrôlé et d'élevages détaillés dans les paragraphes 2.2 à 2.5. Dès leur 9^{ème} mois, les descendants issus de ces 5 croisements expérimentaux ont été élevés durant un an selon des conditions standard de culture dans deux sites ostréicoles français, la baie des Veys (Basse-Normandie) et Fort-Espagnol (Bretagne-Sud). Au début et à la fin du suivi *in situ*, des prélèvements ont été réalisés dans chaque famille pour des analyses de génotypage et de paramètres biologiques (croissance, survie, activité spécifique et K_M de l'amylase).

2. Élevages contrôlés : production de familles amylase bi-parentales et d'un pool amylase multi-parental

2.1. Mise en maturation des géniteurs

Après avoir séjourné un mois (mi-avril à mi-mai, année 2002) à l'Aber-Benoît, les huîtres *C. gigas*, choisies (après génotypage) dans la mesure du possible pour leur

hétérozygotie aux allèles amylase rares, ont été conditionnées pendant un mois (mi-mai à mi-juin, année 2002) à l'écloserie expérimentale Ifremer d'Argenton où une augmentation de la température de l'eau de mer et un fort apport trophique journalier permettent d'accélérer leur gamétogenèse. Les huîtres sont placées dans des bacs de conditionnement, remplis d'eau de mer filtrée à 20 µm et maintenue à 19°C (figure 9-a). Le volume d'eau de mer et son renouvellement sont fonction de la biomasse d'huîtres présentes. Ils sont fixés à 2,5 L/g et à 0,5 L/h/g de poids sec d'huîtres, respectivement. Les huîtres sont nourries avec un mélange algal composé de 4 algues apportées en quantités de biomasse équivalente (1/4, 1/4, 1/4, 1/4) : *Tetraselmis chui*, *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*, *Skeletonema costatum* et *Isochrysis* aff. *Galbana* (clone de Tahiti, T-Iso). Le mélange algal est apporté en continu (apport permanent d'eau de mer enrichie en micro-algues) à l'aide d'une pompe péristaltique, à raison de 8 % de poids sec d'algues par poids sec d'huîtres et par jour. Ces micro-algues sont produites dans des cylindres de 300 L (figure 9-c). Dans les bacs, la salinité et la saturation en oxygène sont en moyenne égales à 34 ppt et à 90-100 %, respectivement. Le brassage de l'eau de mer, son oxygénation et l'homogénéisation de la nourriture distribuée sont assurés par un système d'air lift. Le bac est nettoyé 3 fois par semaine pour éliminer les fèces et les débris algaux qui s'y sont accumulés.

2.2. Fécondation et embryogenèse

Les huîtres arrivées à maturité sexuelle sont ouvertes et sexées par observation microscopique. Les gamètes (femelle et mâle) sont récupérés en scarifiant la gonade, méthode dite du « stripping » (Allen *et al.*, 1989), filtrés sur un tamis (de maille de 60 µm) pour éliminer les débris et dilués dans de l'eau de mer filtrée à 1 µm. Les gamètes sont comptés sous un projecteur de profils.

Pour chacune des 7 familles bi-parentales, réalisées en triplicat, 3 millions d'ovocytes d'une femelle sont mélangés à 300 millions de spermatozoïdes d'un mâle dans un bécher de 2 L. Ce ratio de 100 spermatozoïdes par ovocyte tient compte d'un taux de polyspermie limité à 10 % (Gérard *et al.*, 1995). Pour le pool multi-parental servant à la quantification des transcrits, 40 millions d'ovocytes de 6 femelles sont mélangés à 4 milliards de spermatozoïdes de 4 mâles dans un bécher de 5 L. Pour le pool multi-parental servant à la quantification de l'activité enzymatique, 45 millions d'ovocytes de 7 femelles sont mélangés à 4,5 milliards de spermatozoïdes de 12 mâles dans un bécher de 5 L.

Une heure après le mélange des gamètes, des prélèvements sont effectués pour contrôler l'embryogenèse au microscope. Quand les seconds globules polaires sont observés (témoignant du succès de la fécondation) et/ou que les premières divisions cellulaires apparaissent, les embryons sont tamisés (maille de 20 μm) pour éliminer l'excédent de sperme puis répartis en quantités équivalentes dans 3 bacs cylindro-coniques de 30 L et de 150 L pour respectivement les 7 familles et les 2 pools, à une densité de 33 embryons/mL, 40 embryons/mL et de 100 embryons/mL pour respectivement les 7 familles, le pool servant à la quantification des transcrits et le pool servant à la quantification de l'activité enzymatique.

2.3. Elevage larvaire

En élevage larvaire, chaque famille et chaque pool est représenté par 3 réplicats de bacs de 30 L et de 150 L, respectivement (figure 9-b). L'eau de mer est filtrée à 1 μm , maintenue à 25°C et oxygénée par un bullage permanent afin d'éviter toute sédimentation. L'élevage larvaire est conduit selon la technique dite « séquentielle », c'est à dire que l'eau d'élevage est renouvelée 3 fois par semaine.

A partir du 2^{ème} jour qui suit la fécondation (2 jaf), les larves sont alimentées et les densités sont réajustées à 3, 5 et à 10 larves/mL pour respectivement les 7 familles, le pool servant à la quantification des transcrits et le pool servant à la quantification de l'activité enzymatique. Pour les larves des 7 familles et du pool servant à la quantification de l'activité enzymatique, le régime nutritif est un mélange algal composé de 3 algues apportées en quantités de biomasse équivalente (1/3, 1/3, 1/3) : *Pavlova lutheri*, T-Iso et *C. calcitrans* f. *pumilum* (régime PTC – Robert et Gérard, 1999 ; Robert *et al.*, 2001). L'apport trophique journalier augmente au fur et à mesure du grossissement des larves : il passe de 45 à 80 cellules/ μL (au total) du début à la fin de l'élevage larvaire. Pour les larves du pool servant à la quantification des transcrits, le régime nutritif est un mélange algal composé de 2 algues apportées en quantités de biomasse équivalente (1/2, 1/2) : T-Iso et *C. calcitrans* f. *pumilum*. L'apport trophique journalier passe de 20 à 120 cellules/ μL (au total) du début à la fin de l'élevage larvaire. La consommation algale des larves est contrôlée au compteur de particules (Coulter-Counter) et les rations nutritives sont ajustées en fonction de celle-ci. Ces micro-algues sont produites dans des ballons de 10 L. La salinité est égale en moyenne à 34 ppt.

A chaque changement d'eau et pour chaque bac (réplicat), des prélèvements sont réalisés pour estimer la survie et la croissance des larves. Les larves sont collectées en tamisant l'eau du bac d'élevage puis remises en suspension dans une éprouvette remplie d'eau

de mer. A l'aide d'un agitateur, les larves sont homogénéisées et prélevées. Pour la survie, 3 aliquotes sont prélevées par réplicat puis comptées sur une cellule quadrillée placée sous un projecteur de profils. Connaissant les volumes de l'éprouvette (100 à 2000 mL) et de l'aliquote (50 à 200 μ L), l'effectif larvaire est ainsi comptabilisé par règle de trois. Pour la croissance, 100 larves sont prélevées par réplicat puis analysées sous microscope relié à une caméra et à un ordinateur. Les images acquises sont traitées avec le logiciel IMAQ Vision Builder (National Instruments) qui donne la longueur moyenne de la coquille.

Au 19^{ème} jour d'élevage (19 jaf), en vue de préparer la fixation, la densité larvaire est réajustée à 1 larve/mL pour les 7 familles et le pool servant à la quantification de l'activité enzymatique, et à 2 larves/mL pour le pool servant à la quantification des transcrits.

Les larves pédivéligères ayant atteint une taille moyenne de 300 μ m sont transférées en micronurserie pour l'étape de la métamorphose au 21^{ème} jour d'élevage (21 jaf) pour les familles et le pool servant à la quantification de l'activité enzymatique, et au 23^{ème} jour d'élevage (23 jaf) pour le pool servant à la quantification des transcrits. Les premières fixations sont observées au 23^{ème} jaf pour les 7 familles et le pool servant à la quantification de l'activité enzymatique, et au 25^{ème} jaf pour le pool servant à la quantification des transcrits.

Compte tenu des contraintes zootechniques imposées en (micro)nurserie et du fait que les familles 6 et 7 ne présentent pas de bonnes performances de croissance et de survie larvaires (données non montrées), il est décidé de ne pas les garder ; 5 familles bi-parentales (1 à 5) sont donc conservées pour la caractérisation *in situ* des génotypes.

2.4. Micronurserie

En micronurserie, chaque famille et chaque pool est représenté par 3 réplicats de tamis de maille de 150 μ m. Dans ces tamis, les larves pédivéligères sont mises à fixer sur de la brisure de coquille d'huître *C. gigas* (200-300 μ m) (Walne, 1974) avec un effectif moyen de 25 000 larves par tamis. 4 tamis sont disposés par bac de 100 L rempli d'eau de mer filtrée à 1 μ m et maintenue à 22°C. L'eau circule dans le tamis selon le système dit de « downwelling » ; le taux de renouvellement est important (environ 100 L/h). La nourriture est constituée d'un mélange algal de 3 algues apportées en quantité de biomasse équivalente (1/3, 1/3, 1/3) : T-Iso, *C. calcitrans* f. *pumilum* et *S. costatum*. Ce mélange algal est apporté en continu à l'aide d'une pompe péristaltique, à raison de 8 % de poids sec d'algues par poids sec d'huître et par jour. Ces micro-algues sont produites dans des cylindres de 300 L. Dans le bac, la salinité et

la saturation en oxygène sont en moyenne égales à 34 ppt et à 90-100 %, respectivement. Les bacs et les tamis de fixation sont nettoyés 1 et 3 fois par semaine, respectivement. Au 37^{ème} jour qui suit la fécondation (37 jaf), la micro-brisure est éliminée par filtration sur un tamis de maille de 400 µm. Au 71^{ème} jour qui suit la fécondation (71 jaf), seuls les naissains des 5 familles (1 à 5) d'une taille d'environ de 1,8 mm sont transférés à la nurserie Ifremer de Bouin. Une semaine avant le transfert en nurserie, la température de l'eau d'élevage a été progressivement abaissée à 19°C pour atteindre la température de l'eau du milieu extérieur.

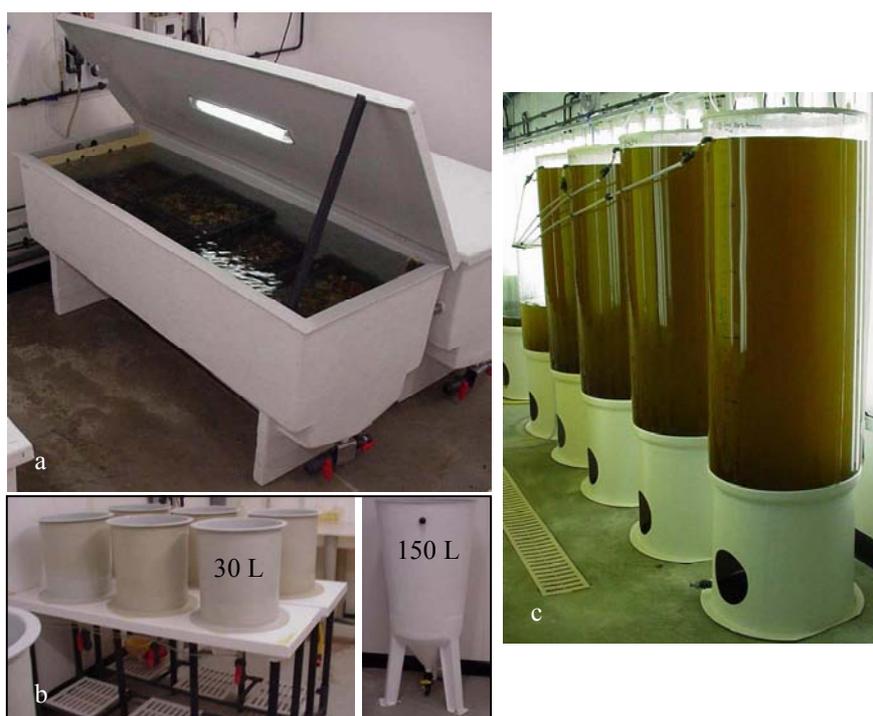


Figure 9. Etapes de production dans l'écloserie expérimentale Ifremer d'Argenton - a) bac de conditionnement des géniteurs, b) bacs cylindro-coniques d'élevage larvaire (30 L et 150 L), c) cylindres de phytoplancton

2.5. Nurserie

En nurserie, chaque naissain des familles (1 à 5) est représenté par 3 réplicats de tubes de 50 cm (de maille de 1 mm puis de 3 mm) maintenus dans des conditions d'élevage intensif avec un apport trophique riche en *S. costatum* (Bacher et Baud, 1992). L'eau circule dans le tamis selon le système dit de « upwelling ». Au 141^{ème} jour qui suit la fécondation (141 jaf), la veille de la mise sur le site ostréicole de Fort-Espagnol (Morbihan, France), chaque réplicat est pesé et 100 huîtres y sont choisies au hasard puis pesées ensemble. Connaissant ces deux poids, l'effectif du réplicat peut être estimé. Ainsi, en fonction de la variation de croissance entre les familles, 2 000 à 4 000 huîtres issues d'un réplicat de tube sont mises dans une poche

(maille de 4,5 mm, 54 cm x 100 cm). Chaque famille est ainsi représentée par 3 poches qui ont été stockées durant l'hiver 2002-2003 à Fort-Espagnol (Morbihan, France).

3. Préparation des échantillons biologiques

3.1. Embryons/larves

Pour les analyses de RT-PCR en temps réel, un million d'huîtres, de 0 haf à 48 haf, et 250 000 huîtres, de 7 jaf à 27 jaf, sont collectées sur des tamis de mailles croissantes (20 à 100 μm) puis transférées dans des tubes de 2 mL traités avec 0,1 % de diéthylpyrocarbonate (DEPC, inhibiteur des ribonucléases). Le surnageant d'eau de mer est retiré à la pipette après la sédimentation du matériel biologique au fond du tube puis 1 mL de tampon d'extraction TRIzol (Gibco BRL) est ajouté dans chaque tube pour les extractions d'ARN totaux. Les tubes sont ensuite conservés dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation.

Pour les analyses d'activité enzymatique, 300 000 huîtres, de 0 haf à 24 haf, 250 000 huîtres, de 2 jaf à 4 jaf, 100 000 huîtres à 5 jaf, 35 000 huîtres, de 9 jaf à 14 jaf, et 6 000 huîtres, de 21 jaf à 30 jaf, sont prélevées puis transférées dans des tubes de 2 mL non traités au DEPC. 2 mL de chlorure de calcium à 20 mM est ajouté dans chaque tube et les larves sont broyées au potter. Les tubes sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à l'extraction des protéines hydrosolubles.

3.2. Adultes

3.2.1. Glandes digestives, expérimentations « quantité trophique et température », « qualité trophique » et « suivi *in situ* »

Les glandes digestives sont prélevées à l'aide d'outils de dissection stérilisés et traités avec 0,1 % de DEPC, et sont immédiatement stockées dans l'azote liquide. Elles sont ensuite broyées dans l'azote liquide, à l'aide du broyeur Dangoumeau et par pool de 10 (soit 3 pools de 10 glandes digestives individuelles pour chaque conditionnement ou génotype). Le broyat est réparti en 2 fractions. Pour la quantification des transcrits, 1 mL de tampon d'extraction Extract-all (Eurobio) est ajouté à 30 mg de broyat, par tube de 2 mL traité avec 0,1 % de DEPC. Ces tubes sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux. Pour l'ensemble des analyses biochimiques (activité spécifique et K_M de l'amylase, électrophorèses de protéines), 1 mL de chlorure de calcium (20 mM) est ajouté à 80 mg (expérimentation « quantité trophique et température » et le suivi *in situ*) ou à 530 mg (expérimentation

« qualité trophique ») de broyat, homogénéisé à l'ultraturax pour assurer une rupture totale des tissus. Ces homogénats sont ensuite aliquotés en 200 μ L et stockés à -20°C jusqu'à l'extraction des protéines hydrosolubles.

3.2.2. Biopsie des géniteurs, expérimentation « suivi *in situ* »

Des fragments de manteau sont prélevés individuellement par biopsie pour les parents et les descendants des 5 familles bi-parentales. Les parents sont préalablement placés dans une solution anesthésiante composée à 3/5 d'eau douce, 2/5 d'eau de mer et de chlorure de magnésium à 250 mM (Sigma) afin que l'ouverture des valves se produise et que la biopsie puisse être faite sans sacrifier l'animal. Pour les descendants, la biopsie est effectuée après sacrifice de l'animal. Le prélèvement est conservé dans l'alcool absolu et à température ambiante jusqu'à l'extraction d'ADN.

4. Analyses

4.1. Biologie moléculaire

4.1.1. Extraction d'ADN au chelex

En utilisant la méthode décrite par Estoup *et al.* (1996), l'ADN est extrait du tissu (manteau) après une homogénéisation dans 440 μ L de tampon d'extraction contenant 4,5 % de billes de chelex (Sigma), 0,07 X de tampon TE (0,01 M de Tris-base, 1 mM EDTA pH 7,5) et 0,230 mg/mL de protéinase K (Sigma). Cette solution est incubée à 55°C pendant au moins 4 heures, puis à 100°C pendant 30 minutes, et est vortexée pendant 45 secondes. Les billes de chelex sont précipitées après avoir centrifugé la solution à 6 000 g pendant 10 min et à 4°C . Le surnageant contenant l'ADN est collecté en évitant de prendre les billes de chelex puis stocké à -20°C jusqu'à l'amplification par PCR.

4.1.2. Extraction, traitement à la DNase I et quantification des ARN totaux

Les ARN totaux des pools d'embryons et de larves prélevés à différents stades de développement, ceux des pools de glandes digestives d'adultes soumis à divers conditionnements sont extraits selon la méthode du TRIzol suivant le protocole fourni par chaque fabricant (GibcoBRL et Eurobio pour les embryons (ou larves) et adultes,

respectivement). Les ARN extraits sont ensuite dissous dans 100 μL d'eau stérile ultrapure (Qbiogene). Ces échantillons d'ARN totaux sont stockés à -80°C et, avant d'être utilisés pour la RT-PCR en temps réel, ils sont traités à la désoxyribonucléase I (DNase I) afin d'éliminer toutes traces d'ADN contaminant.

Par échantillon, le traitement à la DNase I est réalisé avec 100 μL d'ARN totaux (dosés au spectrophotomètre). Dans un volume total de 120 μL , le mélange réactionnel contient 1 X de tampon de réaction de la DNase I (avec 2 mM de MgCl_2 , Sigma) et 10 unités de DNase I (Sigma). La réaction d'hydrolyse de l'ADN est réalisée à température ambiante durant 15 min, elle est ensuite stoppée en ajoutant 1 X de tampon stop (avec 4 mM d'EDTA, Sigma) et en incubant le mélange réactionnel à 70°C pendant 10 min de façon à inactiver la DNase I.

Après le traitement à la DNase I, les ARN sont précipités avec l'éthanol et les sels le sont avec l'acétate de sodium. A partir du volume total de l'échantillon d'ARN totaux traités à la DNase I, $1/10^{\text{ème}}$ de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 et 3 volumes d'éthanol absolu sont ajoutés. Les ARN totaux sont précipités à -80°C durant 15 min et sont centrifugés à 7 500 g durant 15 min. Après l'élimination du surnageant, les culots résiduels sont lavés à deux reprises avec 3 volumes d'éthanol absolu pour éliminer les sels résiduels, dissous dans 1 mL d'eau stérile ultrapure (Qbiogene), puis aliquotés et stockés à -80°C .

Pour une aliquote, la concentration en ARN est déterminée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 260 nm. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260 nm. Une unité de densité optique à 260 nm correspond à l'absorption d'une solution d'ARN à la concentration de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La pureté des ARN est également contrôlée en calculant le rapport de l'absorption à 260 nm sur l'absorption à 280 nm.

4.1.3. PCR-RFLP

4.1.3.1. Principe

L'outil adapté à l'étude du polymorphisme génétique est le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) couplé à la technique de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). La PCR, mise au point par Mullis *et al.* (1986), permet de dupliquer en très grande quantité une séquence d'ADN délimitée par les régions d'hybridation de deux amorces (sens et anti-sens)

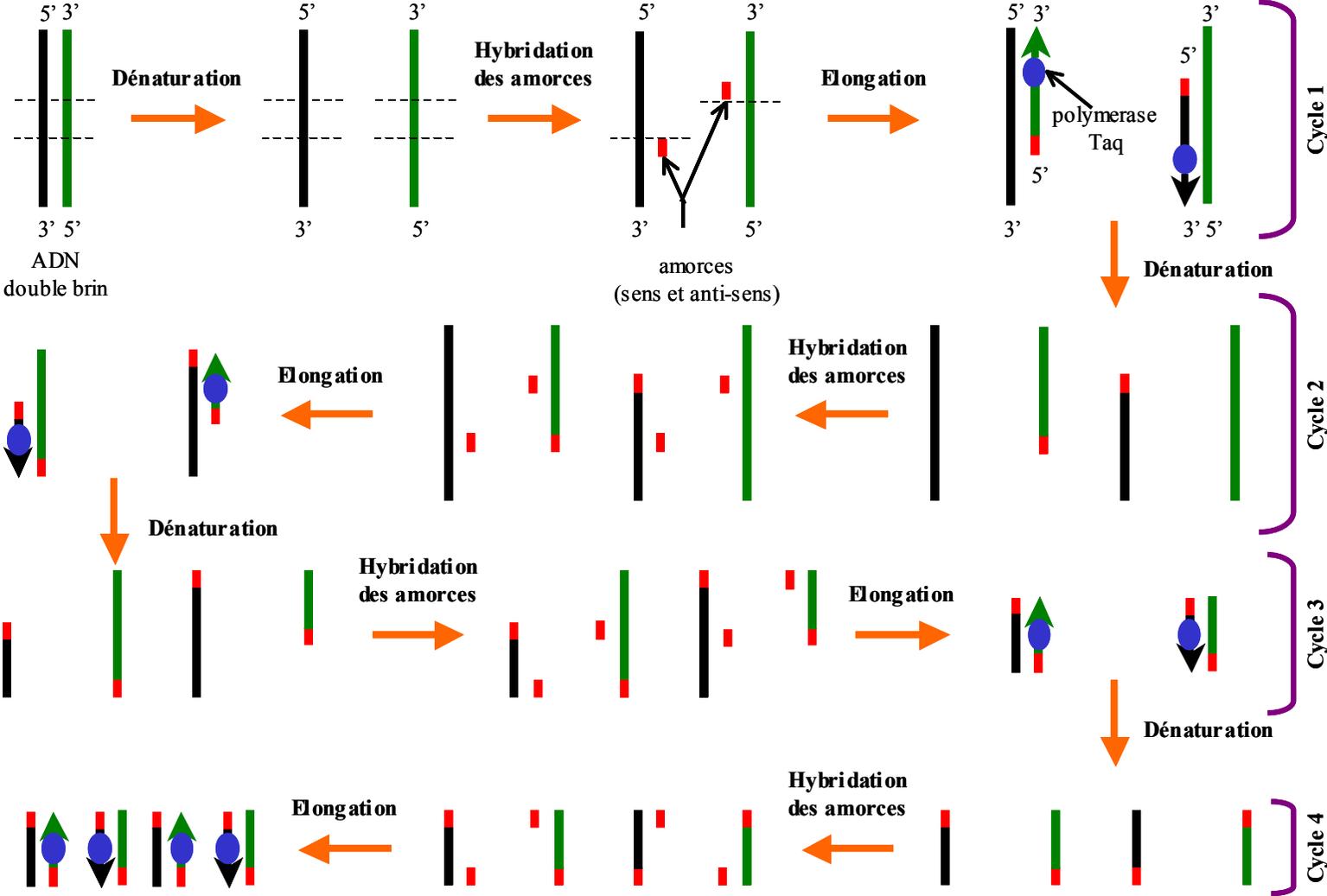


Figure 10. Etapes de la PCR

spécifiques (figure 10). Ce polymorphisme est mis en évidence en utilisant la capacité des enzymes de restriction à couper l'ADN en des sites de reconnaissance spécifiques, qui correspondent à des courtes séquences palindromiques (un palindrome est un mot qui peut se lire dans les deux sens, par exemple, le mot « radar »). Ainsi, une enzyme de restriction peut couper l'ADN au niveau d'une région précise si l'individu présente la bonne séquence. L'ADN d'un autre individu possédant une séquence différente (polymorphisme) ne sera pas reconnu donc pas coupé. La digestion d'une même région de l'ADN, par une ou plusieurs enzymes de restriction, fournit des brins d'ADN de taille variable selon les individus, c'est-à-dire selon que les sites de reconnaissance soient altérés ou non (d'où le terme RFLP).

4.1.3.2. Amplification par PCR

L'utilisation en PCR des couples d'amorces spécifiques du gène A (Ha-aH, tableau 1) ou du gène B (Hb0-bH et Hb1-bH, tableau 1), qui bordent la portion comprenant les exons 4 à 6, permet d'amplifier des fragments de 1179 pb et de 1214 pb pour les gènes A et B, respectivement (Sellos *et al.*, 2003). Pour le gène B, on remarque que 2 couples d'amorces, Hb0-bH et Hb1-bH, sont utilisés pour éviter un biais dû à une mutation ponctuelle (A/G) en position 3' de l'amorce sens. Les allèles nuls correspondants, appelés B5 et B6 (*i.e.* non détectés par l'amorce Hb utilisée par Sellos *et al.* (2003)), sont amplifiés par PCR en utilisant le couple d'amorces Hb1-bH alors que les autres allèles du gène B sont amplifiés en utilisant le couple d'amorces Hb0-bH. La réaction d'amplification est réalisée avec 1,5 µL d'ADN. Dans un volume total de 25 µL, les concentrations des réactifs sont les suivantes : 1 X du tampon de réaction de la *Taq* polymérase (avec 1,5 mM de MgCl₂, Qbiogene), 1 µM de chaque amorce (Sequentia), 0,8 mM des désoxynucléotides triphosphates ou dNTPs (Eurogentec) et 0,020 U/µL de l'enzyme *Taq* polymerase (Qbiogene). Les 3 étapes de la PCR, réalisées dans l'appareil RoboCycler (Stratagene), sont les suivantes : (1) une dénaturation longue à 94°C pendant 1 min, (2) 35 cycles comprenant chacun 3 étapes (une dénaturation de l'ADN matrice à 94°C pendant 30 s, une hybridation des amorces à l'ADN monocaténaire à 62°C pendant 1 min et une extension des amorces à 72°C pendant 2 min 30) et (3) une phase d'extension à 72°C et de 5 min pour permettre à la *Taq* polymérase de terminer l'extension de toutes les amorces hybridées à la matrice d'ADN.

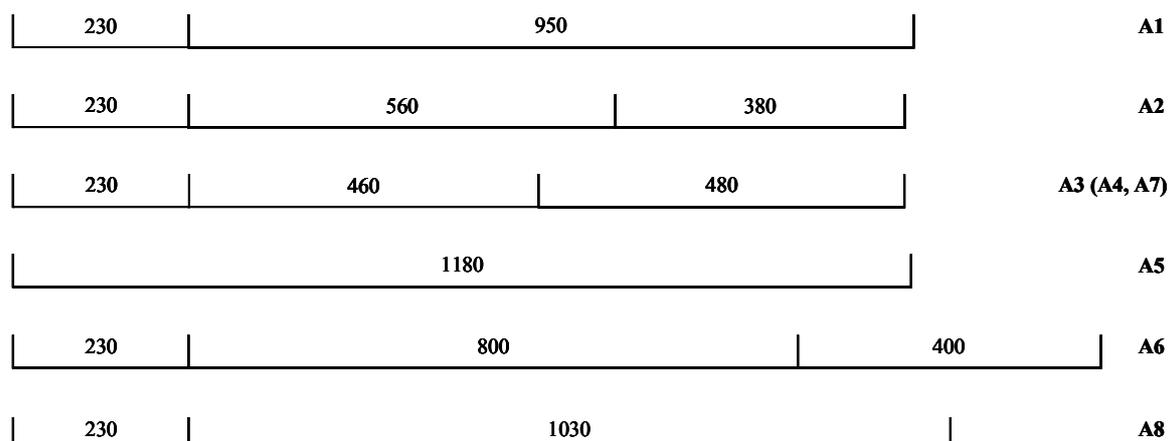
Tableau 1. Liste des amorces utilisées pour la PCR-RFLP

Gène	Allèle	Amorce	Séquence (5'-3')	% GC	T_m
Amylase A	A1 à A8	Ha	sens : AGCACGGGAGACGGCAAT	61,0	55,0
		aH	anti-sens : TGAGGGGGCCCTGCCAAT	68,0	63,0
Amylase B	B1 à B4	Hb0	sens : GTAGCACAGGAGATGGCG	61,0	48,0
		bH	anti-sens : TGAGGGGTCCCATCCAGC	68,0	59,0
	B5 et B6	Hb1	sens : GTAGCACAGGAGATGGCA	55,0	46,0
		bH	anti-sens : TGAGGGGTCCCATCCAGC	68,0	59,0

4.1.3.3. Digestion par une enzyme de restriction

Les produits des différentes PCR sont ensuite digérés par une enzyme de restriction, l'endonucléase *EcoRI* qui coupe l'ADN au niveau de ses séquences 5'- G↓AATTC -3'. La réaction de digestion est réalisée avec 10 µL de produit PCR. Dans un volume total de 20 µL, les concentrations des réactifs sont les suivantes : 1 X du tampon de réaction de *EcoRI* (avec 0,1 mg/mL de BSA, Qbiogene), 0,01 mg/mL de ribonucléase A (RNase A de Qbiogene) et 5 unités de l'enzyme *EcoRI* (Qbiogene). Les produits issus de la digestion sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % dans du tampon TAE 1X (0,04 M de Tris-acide Acétique, 1 mM EDTA pH 8). Plus la taille des fragments d'ADN est petite, plus ils vont migrer vers l'anode. Au terme de la migration, l'ADN sera visualisé sous UV grâce au bromure d'éthidium (BET) intercalé dans l'ADN bicaténaire. La taille des fragments d'ADN sera estimée par rapport à un marqueur de taille (le SmartLadder d'Eurogentec). Les gels sont photographiés par l'intermédiaire du Fluor-S MultiImager (Bio-Rad) relié à un ordinateur. Les profils PCR-RFLP obtenus pour les allèles des gènes A et B sont représentés dans la figure 11.

Allèles du gène A :



Allèles du gène B :

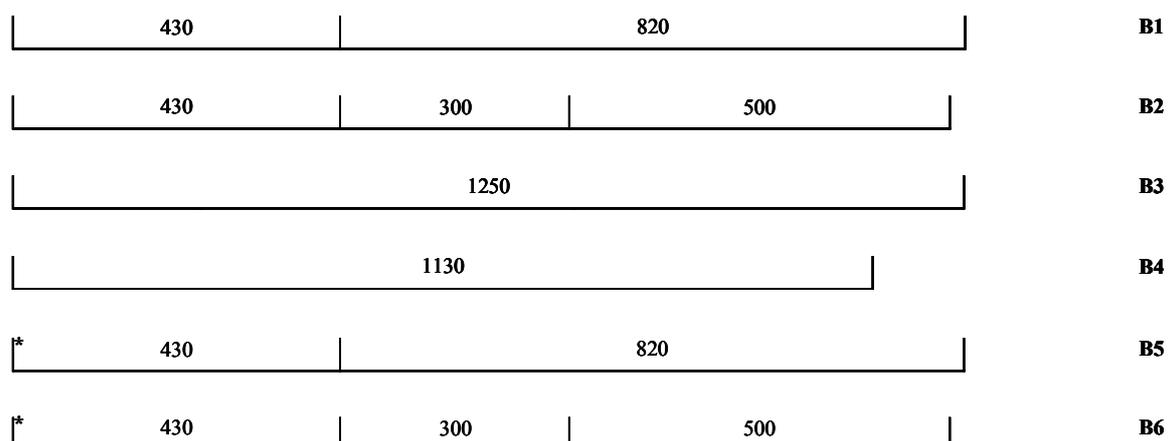


Figure 11. Profils PCR-RFLP des gènes des amylases A et B chez *C. gigas*.

4.1.4. Transcription inverse

La transcription inverse (*RetroTranscription*, RT) correspond à une synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'ARN messager. Cette réaction est catalysée par une transcriptase inverse issue d'un rétrovirus ; dans notre étude, c'est la transcriptase inverse issue du virus leucémique murin de Moloney (*Moloney-Murine Leukemia Virus*, M-MLV). La transcriptase inverse est une ADN polymérase ARN dépendante, capable d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADNc (figure 12) ; cela correspond effectivement à « l'inverse » d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN. Comme toutes les ADN polymérases, la transcriptase inverse ne peut pas initier seule la

synthèse d'un brin d'ADN dans le sens 5' vers 3'. Elle a en effet besoin d'une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre. Comme les ARNm des eucaryotes possèdent une queue polyadénylée en 3', l'amorce ici choisie est une séquence « oligo dT » constituée de 23 désoxythymidines.

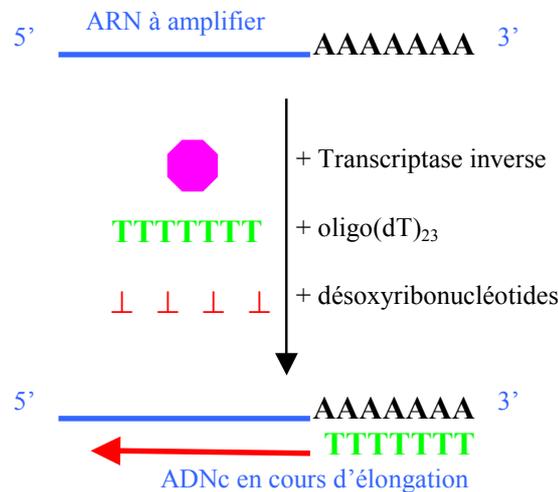


Figure 12. Schéma simplifié du principe de la réaction de transcription inverse en présence d'amorces oligo(dT).

Par échantillon, la réaction de transcription inverse est réalisée à partir de 30 µL contenant 2 µg d'ARN totaux traités à la DNase I, préalablement dénaturés à 70°C pendant 10 min. Dans un volume total de 50 µL, les concentrations des réactifs sont les suivantes : 1 X du tampon de réaction de la transcriptase inverse M-MLV (avec 1,5 mM de MgCl₂, Sigma), 0,8 mM de dNTPs (Eurogentec), 0,01 M de dithiothréitol ou DTT (Sigma), 1,4 µM d'amorces oligo(dT) (Sigma), 0,5 U/µL de l'inhibiteur de ribonucléases (Sigma) et 5 U/µL de la transcriptase inverse M-MLV (Sigma). La réaction de transcription inverse est réalisée, dans l'appareil MyCycler (Bio-Rad), à 25°C pendant 15 min, puis à 42°C pendant 50 min et est suivie d'une incubation des échantillons rétrotranscrits à 94°C durant 5 min afin d'inactiver la transcriptase inverse M-MLV. Les échantillons ADNc sont stockés à 4°C jusqu'à leur analyse en PCR en temps réel.

4.1.5. PCR en temps réel

4.1.5.1. Principe

Afin de pouvoir quantifier de façon relative le niveau des transcrits des 2 gènes de l'amylase, la technique de PCR en temps réel a été utilisée. La PCR en temps réel, initialement mise au point par Higuchi *et al.* (1992), est une technique inspirée de la PCR « classique » ou réaction enzymatique de polymérisation en chaîne de l'ADN. La PCR correspond à l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique (matrice) délimité par des séquences oligonucléotidiques (amorces) et appelé amplicon. Dans la PCR en temps réel, l'amplification de l'ADN *i.e.* ADNc peut être suivie au cours de la réaction, à chaque cycle de PCR, et être quantifiée. Son principe est basé sur la détection d'un signal fluorescent (émis par un fluorochrome, comme le SYBR green, figure 13) permettant de mesurer en continu la quantité d'ADN synthétisé durant la phase exponentielle de la PCR puisque la quantité de produits de PCR durant cette phase est directement proportionnelle au nombre de copies initiales du fragment d'ADNc à amplifier.

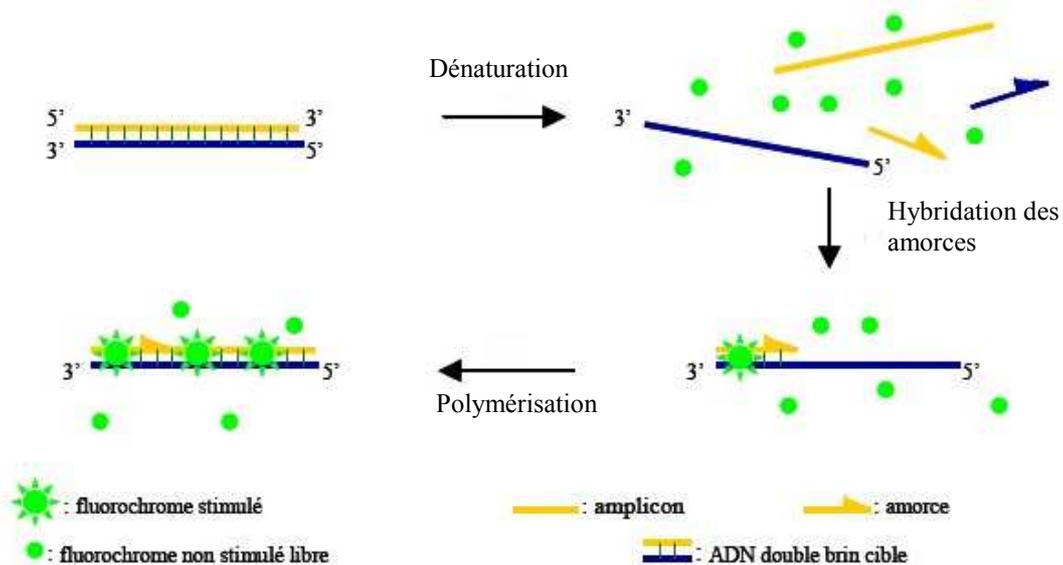


Figure 13. Mode d'action des fluorochromes de type SYBR Green utilisés en PCR en temps réel, d'après Poitras et Houde (2002).

La mesure de la fluorescence à chaque cycle d'amplification permet de réaliser une courbe d'amplification de l'ADNc et la détermination du CT (*Threshold Cycle* ou cycle-seuil) (Gibson *et al.*, 1996) (figure 14-a). Le cycle-seuil correspond à un certain nombre de cycles

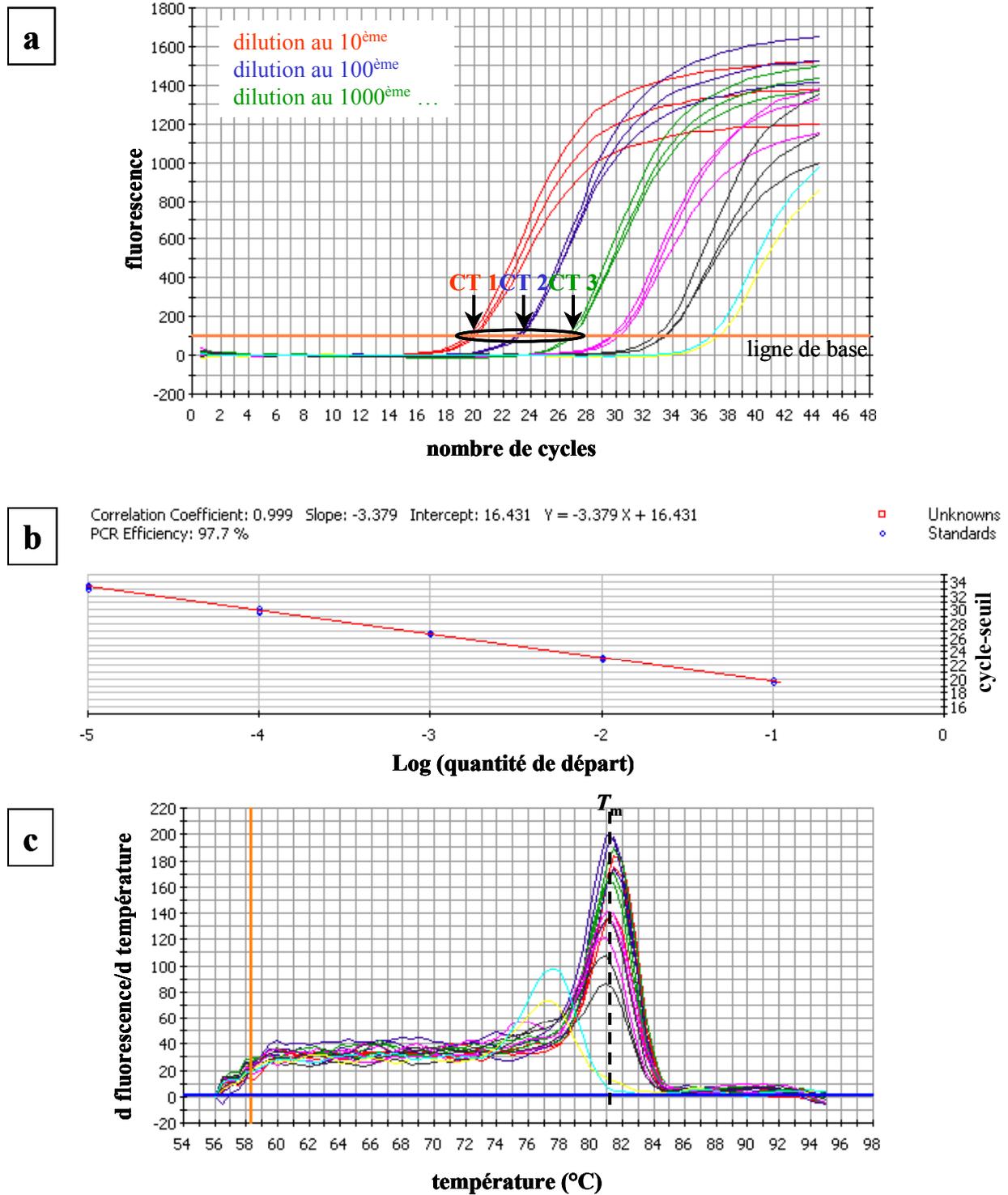


Figure 14. (a) Courbes d'amplification d'ADNc par PCR en temps réel d'un échantillon dilué (du 10^{ème} au 100000^{ème}) en triplicat. Le seuil de fluorescence est fixé à 100. L'échantillon atteint ce seuil à 20 (pour le plus concentré) et à 33 (pour le plus dilué) cycles. (b) Droite de régression des cycles-seuils (CT) de chaque dilution : calcul de l'efficacité de la PCR. (c) Courbes de fusion. Le pic de la courbe de fusion correspond au T_m de l'amplicon.

pour lesquels la fluorescence est significativement supérieure au bruit de fond. Pour cela, on définit un seuil (100 dans cette étude) correspondant à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle mais suffisamment élevé pour être au-dessus du bruit de fond (figure 14-a). Le nombre de copies d'ADNc cible et les valeurs de CT sont inversement proportionnelles : plus la quantité d'ADNc cible (matrice) est importante, plus le CT est faible.

4.1.5.2. Amplification et détection au SyBR Green

Pour cette étude, l'amplification est réalisée dans l'appareil iCycler iQ (Bio-Rad) en utilisant 2 kits selon le type d'expérimentation : le kit Quantitect SYBR Green PCR (Qiagen) pour les échantillons embryonnaires/larvaires et le kit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) pour les échantillons adultes des expérimentations « quantité trophique et température » et « qualité trophique ». Cet appareil présente un module optique relié au thermocycleur et mesure la fluorescence émise par le SyBR® Green lorsque cet agent intercalant est inséré dans l'ADN bicaténaire (figure 13). Le fluorochrome, les nucléotides, la *Taq* polymérase, le tampon et les autres composés indispensables à la réaction d'amplification sont inclus dans les kits. A partir des séquences des gènes amylase A (numéro d'accension GenBank, AF320688 (Sellos *et al.*, 2003)), amylase B (numéro d'accension GenBank AF321515 (Sellos *et al.*, 2003)), des amorces (Sequentia) sont dessinées à l'aide des logiciels Primer Express (Applied Biosystems) et Primer 3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3.cgi>). Les amorces du facteur d'élongation I et de l'actine sont celles qui ont été utilisées par Fabioux *et al.* (2004) et Huvet *et al.* (2003), respectivement. Les amorces doivent satisfaire un certain nombre de conditions : (1) les amplicons définis à partir de ces amorces doivent être courts (75-150 bp), (2) le nombre de bases G et C doit être supérieur à 50 % (compris entre 50 et 80%), (3) les répétitions d'un même nucléotide doivent être limitées (pas plus de 3), (4) les amorces ne doivent pas être complémentaires pour éviter la formation de dimères d'amorces lors de la réaction de PCR, (5) le T_m des amorces doit être similaire et autour de 60°C pour pouvoir réaliser l'analyse de ces gènes sur une même micro-plaque de PCR et il ne doit pas différer de plus de 1°C entre les 2 amorces (sens et anti-sens) d'un même couple. Les principales caractéristiques des amorces utilisées en PCR en temps réel sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2. Liste des amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Gène	Amorce	Séquence (5'-3')	% GC	T_m
Amylase A	Haqf 1	sens : CAACGGGGACATGAGCATT	52,6	56,7
	aHqr 1	anti-sens : CGTTACGGAAGGCAACCA	55,6	56,0
Amylase B	Hbqf 1	sens : CGCGTCACGGACTTCATT	55,6	56,0
	bHqr 1	anti-sens : CAGCGTCATTGGAGTTAGGC	55,0	59,4
Facteur d'élongation	Elongqf 1	sens : ACCACCCTGGTGAGATCAAG	55,0	59,4
	Elongqr 1	anti-sens : ACGACGATCGCATTCTCTT	45,0	55,3
Actine	Actinqf 1	sens : GCCCTGGACTTCGAACAA	45,0	55,3
	Actinqr 1	anti-sens : CGTTGCCAATGGTGATGA	50,0	53,7

Pour chaque couple d'amorces utilisé, l'amplification d'une gamme de dilution (1/5, 1/10, 1/1000, 1/1000) d'un échantillon d'ADNc est réalisée (1) pour vérifier que l'efficacité ou E ($E = 10^{(-1/pente)}$) de la PCR est comprise entre 99% et 100% et (2) pour déterminer la dilution de la matrice avec laquelle il faut travailler (figure 14-b). La dilution de travail ne doit être ni trop forte pour éviter un phénomène d'inhibition de la PCR et ni trop faible pour ne pas être en-dessous du seuil de détection.

Par échantillon, la réaction d'amplification est exécutée en triplicat avec 5 μ L d'ADNc dilué (dilution au 5^{ème} pour les échantillons embryonnaires/larvaires et dilution au 10^{ème} pour les échantillons adultes). Dans un volume total de 15 μ L, le mélange réactionnel contient 7,5 μ L de mix des kits Quantitect SYBR Green PCR (Qiagen) et iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) pour les échantillons d'embryons/larves et d'adultes, respectivement, 10 nM de fluorescéine et 0,3 μ M d'amorces sens et antisens. Les réactions sont exécutées dans une micro-plaque de 96 puits (Bio-Rad), recouverte d'un film plastique (Bio-Rad) pour empêcher l'évaporation des puits et leur contamination. Les étapes de la PCR sont les suivantes : (1) une phase d'activation de la *Taq* polymérase à 95°C pendant 15 min et 3 min pour respectivement le kit Qiagen et le kit Bio-Rad, (2) 45 cycles comprenant une phase de dénaturation à 95°C pendant 30 sec et une phase d'hybridation-élongation à 60°C pendant 1 min. Le produit PCR fluorescent est détecté durant la phase à 60°C.

Chaque réaction de PCR inclut : (1) un contrôle positif constitué par l'ADNc d'un échantillon de la série à analyser (le pool « ovocytes » pour l'expérimentation « ontogenèse » et un des 4 pools « Aber-Benoît » pour les expérimentations « quantité trophique et température » et « qualité trophique ») (2) un contrôle négatif (matrice remplacée par de l'eau ultrapure (Qbiogene)) pour vérifier l'absence de contaminations possibles du mélange réactionnel et de dimères d'amorces, (3) un témoin ARN (ARN totaux traités à la DNase I et non

rétrotranscrits) pour confirmer l'absence de contaminations de ces échantillons par de l'ADN génomique.

4.1.5.3. Courbe de fusion

Le marquage au SyBR Green est non spécifique dû au fait que ce fluorochrome se lie indifféremment aux produits de PCR spécifiques et non spécifiques, et aux dimères d'amorces. Pour contourner ce problème, un cycle de courbe de fusion est réalisé après la PCR. La température passe de 95°C à 60°C en diminuant de 0,5°C toutes les 10 sec de façon à ouvrir la totalité des amplicons bicaténaires (figure 14-c) et la fluorescence diminue due à l'apparition d'ADN monocaténaire en fonction de la température. En traçant la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température, une courbe unimodale est obtenue dont le maximum correspond au T_m (température de fusion) de l'amplicon *i.e.* température à partir de laquelle 50 % de l'ADN synthétisé est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin. Le T_m obtenu est comparé au T_m théorique du produit attendu. Le T_m est spécifique de chaque amplicon et il renseigne sur sa séquence puisqu'il est proportionnel au pourcentage de bases G et C. La courbe de fusion est donc importante pour vérifier la spécificité de la PCR : des pics (ou T_m) supplémentaires apparaissent sur la courbe de fusion lorsque des dimères d'amorces ou autres produits non spécifiques sont présents dans les produits de PCR.

4.1.5.4. Quantification relative

La mesure de la quantité de transcrits des gènes amylase (gènes cible) dans un échantillon se fait via la méthode de calcul des $\Delta\Delta CT$ (Livak et Schmittgen, 2001). En s'assurant que les efficacités de la cible et de la référence soient relativement les mêmes et proches de 100 %, la quantité de transcrits du gène cible, normalisée avec un gène de référence et relative au contrôle positif, est donnée par la formule suivante :

$$2^{-\Delta\Delta CT},$$

où $\Delta CT = (CT_{\text{échantillon}} - CT_{\text{contrôle}})$ pour les gènes cible et de référence et $\Delta\Delta CT = (CT_{\text{gène cible}} - CT_{\text{gène référence}})$.

Le facteur d'élongation et l'actine qui sont des gènes dits de ménage (*house keeping genes*) sont ici utilisés comme des références (Thellin *et al.*, 1999 ; Tricarico *et al.*, 2002). Ils sont testés sur les différents échantillons afin de choisir celui dont le niveau des transcrits apparaît le plus constant donc le moins influencé par les conditions expérimentales testées (ontogenèse, température, quantité et qualité trophiques). La normalisation des valeurs de CT obtenues par rapport à l'expression d'un gène de référence permet notamment de corriger les biais expérimentaux tels que le rendement de l'extraction d'ARN, l'intégrité de ces ARN, le rendement de RT et les erreurs de pipetage (Bustin, 2000, 2002 ; Pfaffl, 2003). Pour chaque échantillon d'ADNc testé, la quantification des gènes de référence et cible est effectuée en même temps (dans la même micro-plaque). Le contrôle positif est analysé à chaque micro-plaque et pour chaque couple d'amorces afin (1) de vérifier que les variations observées dans les niveaux d'ARNm ne soient pas liées à des artefacts expérimentaux et (2) de prendre en compte les éventuelles faibles variations expérimentales inter-plaques dans les calculs de $\Delta\Delta CT$.

Les quantités de transcrits des gènes cible exprimées par rapport au gène de référence sont des valeurs sans unités.

4.2. Biochimie

4.2.1. Extraction des protéines hydrosolubles

Les aliquotes qui étaient stockés à -20°C sont décongelées sur de la glace et centrifugées à 15 000 g pendant 15 min à 4°C . Les surnageants des homogénats vont servir d'extraits bruts pour l'activité α -amylase, le contenu en protéines hydrosolubles et pour la constante de Michaelis-Menten (K_M).

4.2.2. Dosage de l'activité amylase

Ce dosage repose sur l'hydrolyse de l'amidon en saccharides par l'amylase.

Pour les larves, il est réalisé manuellement en utilisant une quantité saturante de substrat (1 mg/mL d'amidon soluble, Merck) dans du tampon acétate 200 mM, pH 6,2, qui contient 200 mM de chlorure de sodium et 20 mM de chlorure de calcium (Samain *et al.*, 1977 ; Le Moine *et al.*, 1997). L'amidon se colore en bleu au contact du réactif de Lugol (2,5 mM d'iode et 9 mM d'iodure de potassium). L'absorption est mesurée à 660 nm. Une unité d' α -amylase est définie comme l'ensemble enzymatique capable d'hydrolyser 1 mg d'amidon

par min à 37°C. Pour cela, une courbe étalon est construite à partir de dilutions sériées (0,6 à 1 mg/mL) de la solution d'amidon employée. Les protéines hydrosolubles sont dosées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) en utilisant l'albumine sérique de bœuf (Sigma) comme standard.

Pour les glandes digestives d'adultes, il est effectué selon le même principe mais à l'aide de l'auto-analyseur Technicon et par rapport à un standard amylase bactérien (Merck). Une unité d' α -amylase est définie comme l'ensemble enzymatique capable d'hydrolyser 1 mg d'amidon par min à 45°C.

L'activité spécifique amylase sera exprimée en UI (unités internationales)/mg de protéines hydrosolubles.

4.2.3. Dosage du K_M

Pour déterminer le K_M (constante de Michaelis-Menten), la vitesse d'hydrolyse initiale (V_i) est calculée pour des concentrations variables en amidon ($[S]$) allant de 0,07 à 1 mg/mL. Le K_M est déduit grâce à la transformation de Lineweaver-Burk qui consiste à tracer la droite ayant pour équation suivante :

$$1/V_i = ((K_M/V_{max}) \times 1/[S]) + (1/V_{max}) \text{ qui est de la forme } (Y = aX + b).$$

K_M représente la concentration de substrat pour laquelle la vitesse d'hydrolyse est égale à la moitié de la vitesse maximale. Elle varie en relation inverse avec l'affinité de l'amylase pour son substrat, l'amidon. Elle s'exprime en mg/mL.

V_{max} correspond à la vitesse initiale maximale de la réaction enzymatique quand le substrat est en concentration saturante pour l'amylase. Elle s'exprime en UI/mn.

4.2.4. Electrophorèses de protéines : électrophorèse sur gel d'agarose et isoélectrofocalisation

Pour détecter l'activité α -amylase dans un gel, deux systèmes électrophorétiques différents sont utilisés : électrophorèse sur gel d'agarose (AG) et isoélectrofocalisation (IEF) (figure 15).

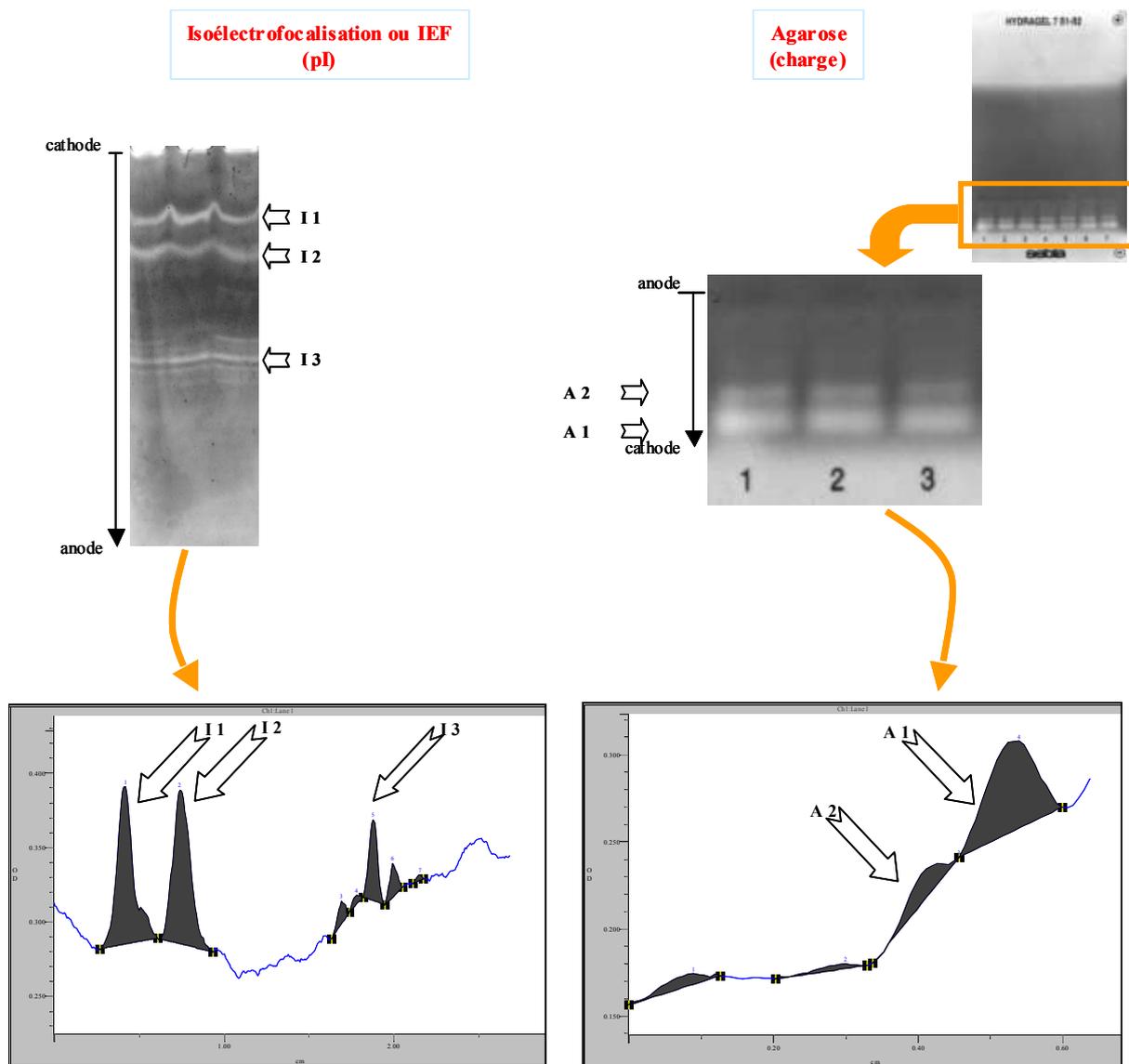


Figure 15. Quantification de l'activité α -amylase contenue dans les bandes d'électrophorèses (électrophorèse sur gel d'agarose et isoélectrofocalisation) à l'aide du Multi-Analyst de Bio-Rad.

4.2.4.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

Utilisée pour comparer et déterminer les distances de migration des protéines selon leur charge (Norby, 1964 ; Royse et Jensen, 1984), cette technique est réalisée sur des mini-gels d'agarose de 0,8 % en utilisant le système Hydragel K20 de Sebia. Les protéines hydrosolubles sont diluées dans du chlorure de calcium 20 mM et appliquées sur le gel pendant 5 min à la position 3 afin d'en déposer approximativement 37,5 µg ou 100 µg de protéines hydrosolubles pour l'expérimentation « quantité trophique et température » ou « qualité trophique ». L'électrophorèse est réalisée à 100 V (voltage constant) pendant 30 min à température ambiante.

4.2.4.2. Isoélectrofocalisation

Utilisée pour comparer et déterminer les points isoélectriques des protéines (Takeuchi *et al.*, 1975 ; Fernandez *et al.*, 2001), l'isoélectrofocalisation est réalisée sur des gels de polyacrylamide de 5 % présentant un gradient de pH de 5-8 (Bio-Rad) de la cathode vers l'anode, en utilisant l'appareil Mini-PROTEAN III de Bio-Rad. Les protéines hydrosolubles sont diluées dans du chlorure de calcium 20 mM. Avant leur dépôt au sommet du gel d'IEF, 37,5 µg ou 100 µg de protéines hydrosolubles pour l'expérimentation « quantité trophique et température » ou « qualité trophique » sont dilués 2 fois dans du tampon de migration contenant 25 % de glycérol et 1 % de bleu de bromophénol. Des marqueurs isoélectriques (Bio-Rad pI kit) sont aussi appliqués pour déterminer les points isoélectriques des différentes formes d' α -amylase. Selon Moreau (2001), la migration est réalisée en deux temps tout en maintenant la cuve dans un bain de glace, à 200 V pendant 90 min, puis à 400 V pendant 90 min.

4.2.4.3. Coloration et analyse des gels

Après la migration, les gels sont transférés dans une solution d'amidon soluble (Merck) de concentration différente selon le type d'électrophorèse (2,5 g/L pour l'électrophorèse sur gel d'agarose et 10 g/L pour l'isoélectrofocalisation) et préparée dans du tampon acétate de sodium (200 mM, pH 6,2) supplémentée en chlorure de sodium (200 mM) et en chlorure de calcium (20 mM). Ils sont incubés à 45°C dans cette solution de substrat pour des durées variables selon le type d'électrophorèse (15 min pour l'électrophorèse sur gel

d'agarose et 11 min pour l'isoélectrofocalisation). Après 3 rinçages rapides à l'eau distillée, l'activité amylase est stoppée en transférant les gels dans la solution de lugol pendant 15 min. Les gels sont ensuite traités à l'acide trichloroacétique 20 % pour fixer cette coloration. Pour les standards d'IEF, la bandelette de polyacrylamide est préalablement fixée pendant 1 h dans une solution d'acide trichloroacétique (0,7 M) et d'acide sulfosalicylique (0,16 M), puis rincée à l'eau distillée pour éliminer les ampholytes qui pourraient interagir avec le colorant. Elle est ensuite colorée pendant 30 min dans une solution de bleu de Coomassie R 250 (Sigma) 0,04 %, d'isopropanol 27 % et d'acide acétique 10 %, et décolorée dans une solution de méthanol 40 % et d'acide acétique 10 % jusqu'à disparition du colorant teintant le fond du gel. Un bain supplémentaire dans l'eau distillée est nécessaire pour lui permettre de retrouver sa taille initiale.

Les gels sont analysés à l'aide du Fluor-S MultiImager (Bio-Rad) relié à un ordinateur. Les gels sont scannés et les images acquises sont traitées avec le logiciel Multi-Analyst (Bio-Rad). Pour chaque profil de migration, un spectre est obtenu et chaque bande est représentée par un pic et la surface est quantifiée en pixels ou « count ». La surface et l'intensité de la bande est proportionnelle au « count », de ce fait, plus le « count » de la bande est élevé, plus l'activité amylase de cette bande est forte.

5. Traitements statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel Statgraphics version 5.1 (Manugistics). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'erreur standard, notée ES ($n = 3$).

Pour la comparaison de plusieurs groupes de données, 2 types d'analyses sont possibles selon le résultat du test d'homogénéité des variances. Si les variances sont égales, alors les différences entre les groupes sont comparées par l'analyse de variance (ANOVA) ; sinon, elles le sont par un test de Kruskal-Wallis. Quand l'ANOVA indique une différence significative ($P < 0,05$), il est suivi du test des différences significatives minimales de Fisher (*Least Significant Difference*, LSD) pour localiser les différences significatives ($P < 0,05$) entre les moyennes. Quand le test de Kruskal-Wallis indique une différence significative ($P < 0,05$), il est suivi du test de comparaison des médianes (*notched box plot*) pour localiser les différences significatives ($P < 0,05$) entre les moyennes. Une transformation Arcsin($\sqrt{\quad}$) a été faite sur les données exprimées en pourcentage avant de procéder aux analyses statistiques.

Dans l'expérimentation « suivi *in situ* », des comparaisons de fréquences sont réalisées en utilisant le test du Chi-carré. Au cas où $n < 5$, le test du Chi-carré corrigé par Yate est utilisé (Bailey, 1981).

6. Mise au point d'une méthode de supplémentation d'amidon

6.1. Liste des paramètres mesurés sur l'amidon

Pour l'expérimentation portant sur la qualité trophique, il est choisi de compléter une algue par de l'amidon. De ce fait, des expériences préliminaires ont porté sur le choix d'un amidon en fonction de 4 critères :

- (1) la taille afin de voir si elle est compatible avec les capacités de rétention de l'huître creuse *C. gigas*. En effet, les bivalves juvéniles et adultes acceptent des particules alimentaires dont la taille est comprise entre 3 et 20 μm (Haven et Morales-Alamo, 1970 ; Langdon et Siegfried, 1984 ; Defosse et Hawkins, 1997). Les adultes de *C. gigas* ne retiennent pas efficacement des particules plus petites que 2,5 μm et montrent un taux de rétention des particules maximal lorsque leur taille est comprise entre 3 et 4 μm (Sornin *et al.*, 1988),
- (2) la stabilité dans l'eau de mer durant 24 h afin de vérifier que ces amidons ne sont pas dégradés et restent particulaires, toujours accessibles à la filtration de l'huître,
- (3) la digestion *in vitro* par un extrait de glande digestive afin de s'assurer que les amylases de l'huître sont capables de digérer ces amidons,
- (4) l'ingestion par l'huître *C. gigas* afin de garantir que toute particule d'amidon filtrée est ingérée et n'est pas rejetée par l'individu sous forme de pseudo-fèces.

6.2. Origine de l'amidon

4 farines d'amidon (amidon natif de blé « excelsior », amidon transformé de maïs cireux « farinex WM 35 », amidon transformé de manioc « farinex VA 60T » et amidon transformé de pomme de terre « farinex VA 20 ») provenant de la société Chimiphar sont testées. L'amidon soluble (Merck), employé habituellement dans le dosage de l'activité amylase, est utilisé en tant que témoin positif.

6.2.1. Estimation de la taille de l'amidon

Des dilutions sériées d'une solution-mère d'amidon dans de l'eau de mer filtrée à 0,7 μm sont réalisées afin d'analyser une solution d'amidon à 1 $\mu\text{g/L}$ au compteur de particules (Coulter-Counter). Dans cet appareil, les particules sont comptées et mesurées afin d'avoir la répartition de la taille de l'échantillon après différents temps de séjour dans l'eau de mer. En comparant ces courbes à différents temps, après la mise en suspension de l'amidon dans l'eau de mer, la stabilité de l'amidon testé peut être appréciée.

La figure 16 présente l'évolution de la taille moyenne des particules des 5 amidons dilués dans de l'eau de mer, durant une journée (\pm l'erreur standard, notée SE pour *standard error*). Pour 3 amidons (blé, maïs, manioc), la taille se situe entre 4 et 40 μm et présente une moyenne proche de 20 μm . Pour la pomme de terre, la taille est comprise entre 4 et au-delà de 50 μm et montre une moyenne avoisinant les 50 μm , de ce fait, peu de particules de pomme de terre ont une taille inférieure à 20 μm . Quant à l'amidon de Merck, il a une taille comprise entre 4 et au-delà de 50 μm et affiche une moyenne autour des 30 μm .

Sur les 4 amidons de Chimiphar testés, l'amidon de blé apparaît le plus stable dans le temps.

6.2.2. Digestion *in vitro* de l'amidon

Un pool de 5 glandes digestives de *C. gigas* fraîchement disséquées est broyé au Potter. A 4°C, 80 mg de broyat sont homogénéisés dans 1 mL de chlorure de calcium à 20 mM. L'extrait digestif est aliquoté et centrifugé à 15 000 g pendant 15 min à 4°C. Les 5 solutions d'amidon à 1 g/L sont préparées dans du tampon acétate de sodium (200 mM, pH 6,2) supplémentée en chlorure de sodium (200 mM) et en chlorure de calcium (20 mM). Le mélange réactionnel enzyme digestive (200 μL)-substrat (500 μL) est incubé à 45°C pendant 12 min. A la fin de l'incubation, 500 μL du réactif de Lugol (2,5 mM d'iode et 9 mM d'iodure de potassium) est ajouté au mélange ; l'amidon se colorant en bleu au contact du réactif de Lugol. La solution est ensuite diluée par 3 mL d'eau distillée, avant de lire la densité optique à 660 nm (DO 660). La digestion *in vitro* de l'amidon est analysée en suivant l'évolution de la concentration d'amidon (*i.e.* DO 660) en présence du broyat digestif sur 6 heures (figure 17).

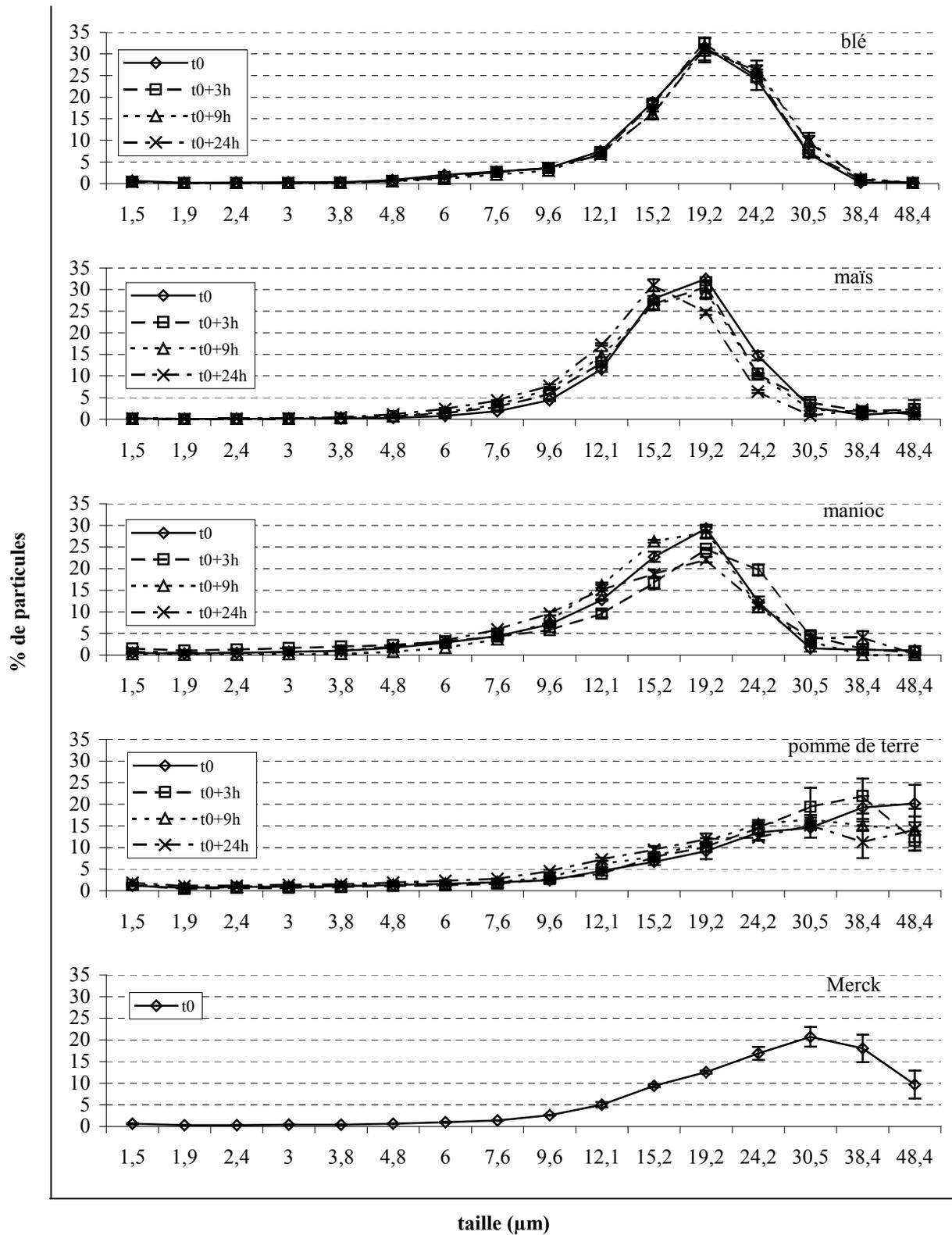


Figure 16. Evolution temporelle de la taille moyenne (\pm SE) de 5 amidons : blé, maïs, manioc, pomme de terre et Merck (de haut en bas).

On note qu'au début de l'incubation enzyme digestive-substrat, la DO 660 est nulle pour tous les amidons de Chimiphar alors qu'elle est de 0,890 pour l'amidon soluble de Merck. En solution, les amidons de Chimiphar paraissent insolubles. Par contre, au contact de l'extrait digestif d'huître, ils se solubilisent et, de ce fait, ils sont digérés par l'amylase comme le montre les valeurs de DO 660 qui apparaissent puis diminuent. La digestion des amidons de Merck et de blé est totale en 4 heures alors que celle du manioc et de la pomme de terre l'est pratiquement en 6 heures. Sur le maïs, l'amylase digestive a une très légère action.

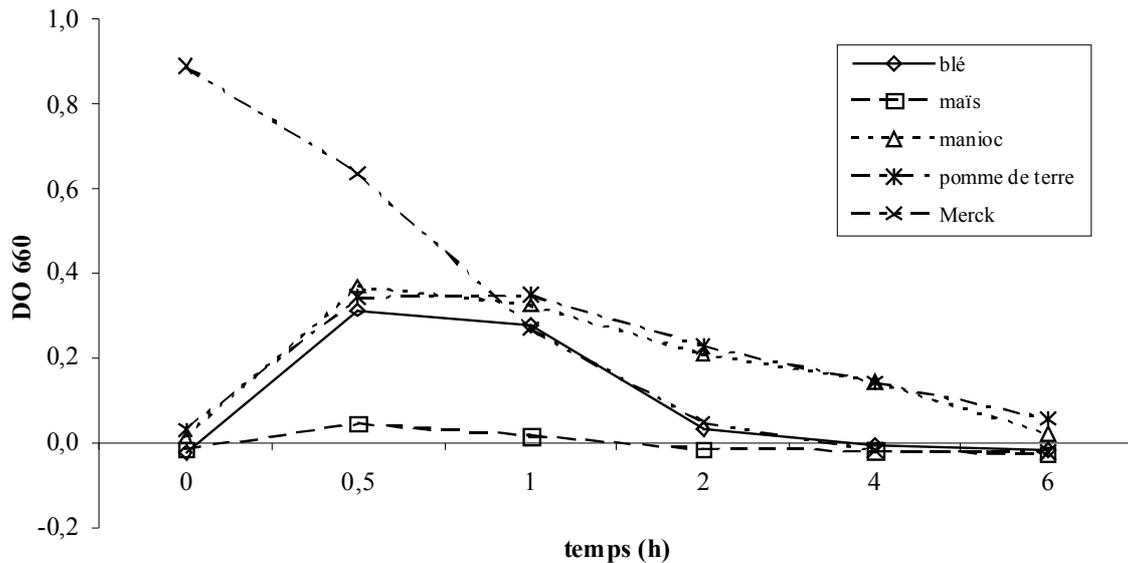


Figure 17. Evolution temporelle de la DO à 660 nm de 5 solutions d'amidon digéré par un extrait digestif de *Crassostrea gigas*

Compte tenu des bonnes caractéristiques de l'amidon de blé (taille compatible avec les capacités de filtration des huîtres, très forte stabilité dans l'eau de mer, très forte et rapide digestion par un extrait digestif d'huître), il est choisi de le compléter à une diatomée (*Chaetoceros gracilis*) qui en est dépourvue. Cette algue apporte en revanche un autre polysaccharide, la laminarine (Darley, 1977), qui ne peut pas être dégradé par l'amylase car ce sucre est constitué de glucose en β (1-3) et non pas de glucose α (1-4) qui compose l'amidon.

6.2.3. Ingestion de l'amidon

Pour se nourrir, l'huître filtre les particules contenues dans l'eau de mer. Les particules filtrées ont 2 devenir. (1) Elles sont ingérées, auquel cas elles sont digérées dans l'appareil digestif et les résidus sont excrétés dans le milieu, cela constitue les fèces. (2) Au contraire,

elles ne pénètrent pas dans la bouche, elles sont alors rejetées périodiquement sous forme de cordons muqueux, ce sont les pseudo-fèces. Ils renferment des particules inorganiques indigestes mais aussi le matériel organique en excès qui ne peut pas être ingéré. L'apparition des pseudo-fèces correspond au seuil d'ingestion maximal. Pour garantir qu'un gradient particulaire correspondra à un gradient d'ingestion de ces particules, il est nécessaire de se placer en-dessous de ce seuil de production de pseudo-fèces.

Dans un bac, l'amidon a tendance à décanter. Mais, pour pouvoir observer la production de fèces et de pseudo-fèces, il ne faut pas un milieu trop brassé. Pour répondre à ces 2 exigences, le banc d'écophysiologie (figure 18) de la station Ifremer d'Argenton est utilisé. Ce banc d'écophysiologie comprend un château d'eau (muni d'un système de dégazage) dans lequel arrive l'eau de mer filtrée à la température de 17°C. L'eau arrive par gravité dans 4 enceintes hermétiquement fermées (volume : 1,2 L) possédant chacune, en entrée, un petit débitmètre permettant de contrôler le débit d'alimentation (120 mL/min). Une pompe péristaltique est ajoutée à ce dispositif afin de distribuer, en continu, une solution algale (*C. gracilis*) supplémentée en amidon (de blé) à raison de 20 mL/min. Les enceintes et la mise en place de chicanes internes (figure 18) ont été optimisées selon les consignes préconisées par Riisgard (2001).



Figure 18. Banc d'écophysiologie de la station Ifremer d'Argenton (photo de gauche). Position de l'huître dans l'enceinte (photo de droite) : quelques pseudo-fèces et fèces produits par l'huître sont visibles en haut et en bas, respectivement. Le siphon exhalant est dirigé vers la sortie, le siphon inhalant vers l'entrée. Un système de chicane évite le mélange entre l'eau d'entrée et l'eau de sortie.

Chaque enceinte est divisée en 2 parties inégales (une grande et une petite) par une cloison. Durant 12 heures, l'huître est placée entre ces 2 compartiments de façon à inhaler l'eau entrant chargée en algues et en amidon dans le grand compartiment et à exhaler l'eau filtrée dans le petit compartiment. Les problèmes de recirculation sont en partie évités. Ces 4 enceintes sont réparties de la manière suivante : 3 enceintes contenant chacune 1 huître (enceintes de mesure) et 1 enceinte ne contenant pas d'huître (enceinte témoin), toutes sont alimentées avec le mélange algue-amidon. Une aliquote de l'eau de sortie de chaque enceinte est analysée au compteur de particules (Coulter-Counter) afin d'apprécier la consommation des huîtres via le taux de filtration (CR, L/h) calculé par différence entre l'enceinte témoin et l'enceinte de mesure, selon la formule suivante (Hildreth et Crisp, 1976) :

$$CR = F \times (C_0 - C_1) / C_0$$

où F est le débit d'alimentation.

C_0 et C_1 représentent les concentrations en algue (cellule/ μ L), dans respectivement l'enceinte témoin et l'enceinte contenant une huître.

Après avoir déterminé séparément les concentrations-seuil d'amidon de blé et d'algue *C. gracilis*, concentrations au-dessus desquelles des pseudo-fèces sont produits, 3 doses d'amidon (10 mg/L, 5 mg/L et 1 mg/L par enceinte) sont supplémentées à la solution algale (40 cellules/ μ L par enceinte). Aux concentrations testées, la sensibilité du compteur de particules (Coulter-Counter) est insuffisante pour détecter des variations de la teneur en amidon, de ce fait, l'appareil mesure la filtration des algues. Pour ces concentrations d'amidon en présence d'algues, aucun pseudo-fèces n'est observé et le taux de filtration est maximal (figure 19). En présence d'amidon, il ne semble pas avoir d'effet de l'amidon sur la filtration des algues comme le montre la constance du taux des particules filtrées (figure 19).

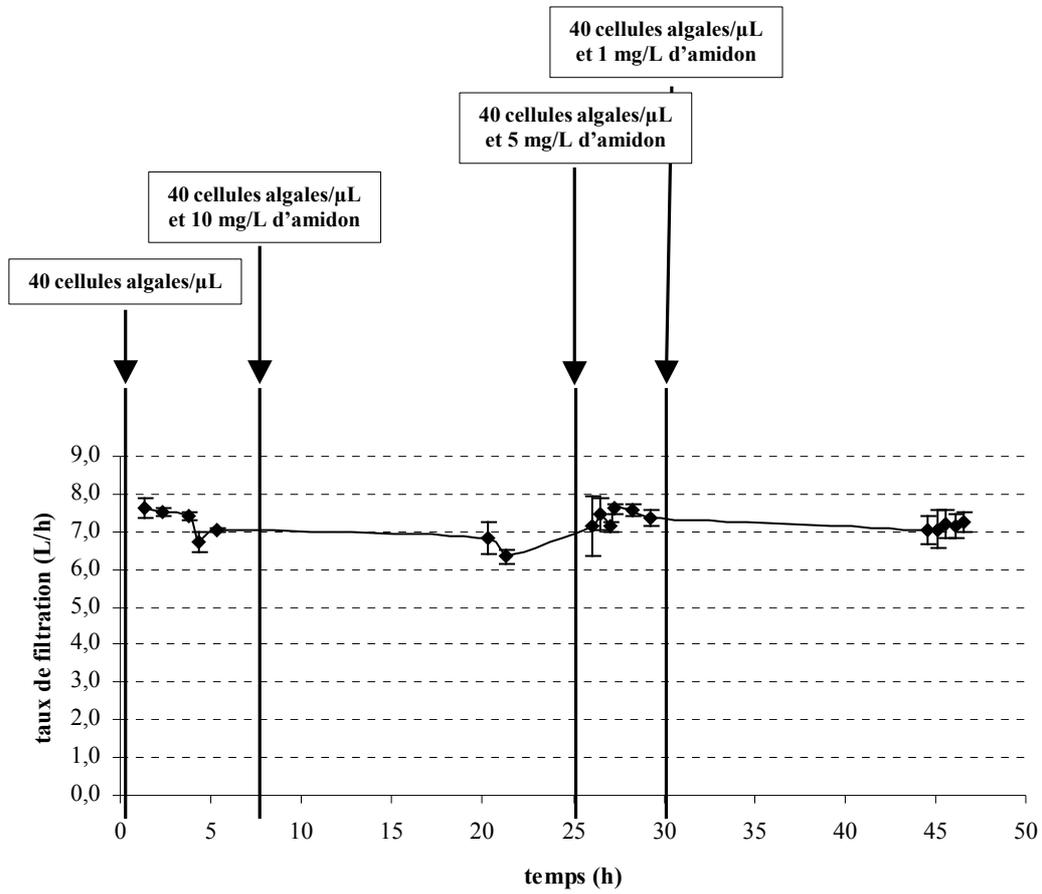


Figure 19. Evolution du taux de filtration moyen selon différentes conditions trophiques, chez *Crassostrea gigas*. Un régime algal à base de *Chaetoceros gracilis* (40 cellules/μL/enceinte) est supplémenté avec des doses décroissantes d'amidon de blé (10 mg/L, 5 mg/L et 1 mg/L).

CHAPITRE I

Régulation de l'amylase au cours de l'ontogenèse

CHAPITRE I

Régulation de l'amylase au cours de l'ontogenèse

1. Introduction

L'amylase est une enzyme ubiquitaire, trouvée dans plusieurs espèces de bactéries, champignons, plantes et animaux. Elle a été caractérisée sur le plan biochimique chez plusieurs organismes.

Les gènes codant les amylases sont exprimés de manière tissu-spécifique. Chez l'homme et le rat, les amylases existent sous 2 formes (isozymes) majeures : l'amylase salivaire (amylase A) et l'amylase pancréatique (amylase B) qui sont codées respectivement par les gènes amylase A et amylase B (Nishide *et al.*, 1986 ; Yokouchi *et al.*, 1990). 7 gènes codant des amylases sont regroupés en cluster dans le génome humain : 2 gènes pancréatiques, 3 gènes salivaires et 2 pseudogènes tronqués (Gumucio *et al.*, 1988). Les poissons ne possèdent pas de glandes salivaires. La plupart des espèces ne possèdent pas un pancréas distinct, mais plutôt un pancréas diffus dans l'intestin ou dans le foie (Yardley, 1988). Chez *Crassostrea gigas*, 2 gènes A et B codant respectivement les amylases A et B ont été caractérisés et séquencés ; ces 2 gènes s'expriment chez l'adulte au niveau de sa glande digestive avec une expression plus forte du gène A par rapport à celle de B (Huvet *et al.*, 2003). Les gènes codant les amylases sont exprimés à des périodes spécifiques. La synthèse et la sécrétion de l'amylase pancréatique sont très faibles chez le nourrisson (Koldovsky, 1992), l'amylase salivaire et l'amylase de la glande mammaire sont quantitativement plus importantes. Chez les poissons, un pic d'activité amylase est détecté autour du premier repas des larves (Zambonino-Infante et Cahu, 1994 ; Oozeki et Bailey, 1995 ; Péres *et al.*, 1998 ; Martinez *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 2001). L'expression de l'amylase a été rapportée pour être plus élevée durant le stade adulte du gambusie *Gambusia affinis* et plus faible durant ses stades embryonnaire et juvénile (Yardley, 1988). Chez *C. gigas*, aucune publication n'est parue sur les amylases A et B durant son développement embryonnaire et larvaire.

L'objet de ce chapitre est donc d'étudier la distribution temporelle de l'expression de ces 2 gènes chez *C. gigas* afin d'analyser la mise en place et le fonctionnement du système amylase aux stades précoces. Les niveaux des transcrits des gènes A et B, analysés par RT-PCR en temps réel, et de l'activité spécifique totale résultante sont suivis au cours de 2 élevages larvaires différents.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Croisements contrôlés, élevages larvaire et post-larvaire

Compte tenu des besoins importants en larves pour l'ensemble des analyses (*i.e.* la quantification des transcrits et le dosage d'activité enzymatique), ces analyses n'ont pas pu se faire à partir du même matériel biologique. Par conséquent, 2 élevages larvaires puis post-larvaires sont produits différemment selon des protocoles de croisement contrôlé et d'élevages détaillés dans les paragraphes 2.2 à 2.4 du chapitre matériel et méthodes. Ces différences portent sur la date du croisement multi-parental, l'origine et le nombre de géniteurs participant au croisement multi-parental et sur les algues utilisées pour l'alimentation des larves.

Pour la quantification des transcrits des gènes A et B, 10 géniteurs (6 femelles et 4 mâles) collectés sur le site ostréicole de l'Aber-Benoît (Finistère, France) et choisis au hasard ont été croisés le 04 juin 2003. Le régime alimentaire des larves est un mélange algal composé de 2 algues apportées en quantités de biomasse équivalentes (1/2, 1/2) : T-Iso et *C. calcitrans* f. *pumilum*. Pour la quantification de l'activité amylase, 19 géniteurs (7 femelles et 12 mâles) conditionnés à l'écloserie expérimentale Ifremer d'Argenton (Finistère, France) et choisis selon leurs génotypes les plus polymorphes possible aux deux gènes amylase sont croisés le 19 juin 2002. Le régime alimentaire des larves est un mélange algal composé de 3 algues apportées en quantités de biomasse équivalente (1/3, 1/3, 1/3) : *Pavlova lutheri*, T-Iso et *C. calcitrans* f. *pumilum*.

2.2. Stratégies d'échantillonnage

Le pas d'échantillonnage et le nombre d'huîtres prélevées sont différents entre les 2 types d'analyse.

Les analyses de RT-PCR en temps réel vont porter sur l'ovocyte mature (avant la fécondation), l'embryon à 4 cellules (1 heure après la fécondation (haf)), l'embryon à 8

cellules (2 haf), la morula (3 haf), la blastula (5 haf), la gastrula (7 haf), la larve trochophore (16-18 haf), la larve D (2 jours après la fécondation (jaf)), la larve umbonée (7 jaf), la larve oeuillée (14 jaf), la larve pédivéligère (18 jaf) et la post-larve (27 jaf). Un million d'huîtres, de l'ovocyte à la larve D, et 250 000 huîtres, de la larve umbonée à la post-larve, sont collectées sur des tamis de mailles croissantes (20 à 100 μm) puis transférés dans des tubes de 2 mL (Sarstedt) traités au diéthylpyrocarbonate (DEPC, inhibiteur des ribonucléases). Le surnageant d'eau de mer est retiré à la pipette après la sédimentation du matériel biologique au fond du tube puis les tubes sont immédiatement congelés dans l'azote liquide jusqu'à l'étape du broyage.

Les analyses d'activité enzymatique vont porter sur l'œuf (0 haf), la larve D (24 haf, 31 haf, 48 haf, 3 jaf, 4 jaf, 5 jaf), la larve umbonée (9 jaf), la larve oeuillée (14 jaf), la larve pédivéligère (21 jaf) et la post-larve (30 jaf). 300 000 huîtres, de 0 haf à 24 haf, 250 000 huîtres, de 2 jaf à 4 jaf, 100 000 huîtres à 5 jaf, 35 000 huîtres, de 9 jaf à 14 jaf, et 6 000 huîtres, de 21 jaf à 30 jaf, sont prélevées puis transférées dans des tubes de 2 mL non traités au DEPC. Ces prélèvements sont conservés de la même manière que précédemment.

3. Résultats

3.1. Choix de la méthode de quantification des ARNm

A partir d'1 μg d'ARN totaux par stade de développement étudié, les CT du gène de référence (facteur d'élongation) présentent pour l'ensemble des échantillons d'ADNc analysés un coefficient de variation plus élevé que les CT des 2 gènes cibles (amylase A et amylase B), 15,0 % contre 11,0 % et 10,4 %, respectivement (tableau 3). Le maximum de variation est surtout observé pour la larve D, la larve umbonée et la post-larve. De ce fait, le facteur d'élongation ne constitue pas un bon contrôle interne et les niveaux d'ARNm des 2 gènes amylase ne peuvent pas être normalisés par ce gène de référence. Les quantités relatives (QR) d'ARNm des 2 gènes amylase sont donc calculées à différents stades de développement de *C. gigas* en utilisant les échantillons d'ADNc du stade ovocyte comme échantillons contrôle ; elles sont exprimées en $2^{-\Delta\text{CT}}$ par μg d'ARN totaux.

Tableau 3. Moyennes, erreurs standard (ES) et coefficients de variation (CV) des cycles seuil (CT) pour les gènes amylase A, amylase B et facteur d'élongation à partir d'1 µg d'ARN totaux présents dans différents stades embryonnaires et larvaires de *C. gigas* (n = 3). En gras sont précisées les valeurs calculées pour l'ensemble des stades de développement.

Gène	Stade de développement	Moyenne	ES	CV
Amylase A	Ovocyte (non fécondé)	30,7	0,2	1,1
	4 cellules (1 haf)	31,3	0,1	0,8
	8 cellules (2 haf)	31,0	0,2	1,1
	Morula (3 haf)	33,2	0,4	2,2
	Blastula (5 haf)	32,3	0,4	2,2
	Gastrula (7 haf)	30,2	0,3	1,5
	Trochophore (18 haf)	30,0	0,1	0,7
	Larve D (2 jaf)	34,7	0,8	4,0
	Larve umbonée (7 jaf)	33,3	0,3	1,8
	Larve oeillée (14 jaf)	23,6	0,1	1,0
	Larve pédivéligère (18 jaf)	23,9	0,1	0,7
	Post-larve (27 jaf)	30,6	0,3	1,6
			30,4	0,6
Amylase B	Ovocyte (non fécondé)	29,8	0,2	1,4
	4 cellules (1 haf)	30,4	0,1	0,7
	8 cellules (2 haf)	29,9	0,4	2,3
	Morula (3 haf)	31,5	0,4	2,0
	Blastula (5 haf)	32,0	0,2	1,1
	Gastrula (7 haf)	32,7	0,4	2,3
	Trochophore (18 haf)	32,9	0,2	1,3
	Larve D (2 jaf)	38,1	1,1	5,0
	Larve umbonée (7 jaf)	38,9	1,8	8,0
	Larve oeillée (14 jaf)	31,0	0,2	0,9
	Larve pédivéligère (18 jaf)	28,5	0,2	1,1
	Post-larve (27 jaf)	36,2	0,3	1,6
			32,7	0,6
Facteur d'élongation	Ovocyte (non fécondé)	17,1	0,1	1,4
	4 cellules (1 haf)	17,3	0,1	1,0
	8 cellules (2 haf)	16,9	0,1	1,0
	Morula (3 haf)	18,4	0,2	1,9
	Blastula (5 haf)	18,9	0,1	0,9
	Gastrula (7 haf)	17,6	0,2	1,7
	Trochophore (18 haf)	16,2	0,1	0,7
	Larve D (2 jaf)	22,8	0,1	1,0
	Larve umbonée (7 jaf)	24,5	0,4	3,1
	Larve oeillée (14 jaf)	16,9	0,4	4,3
	Larve pédivéligère (18 jaf)	16,1	0,1	0,7
	Post-larve (27 jaf)	22,9	0,3	2,0
			18,8	0,5

3.2. Profils d'expression des amylases A et B au cours des différents stades de développement de *C. gigas*

3.2.1. Embryogenèse de 0 à 48 haf (larve D)

3.2.1.1. Niveaux des transcrits

La figure 20 montre des différences significatives dans le profil d'expression des gènes des amylases A et B durant l'embryogenèse, analysée par RT-PCR en temps réel (test de Kruskal-Wallis, $P < 0,001$). Des transcrits de ces 2 gènes sont détectés dans l'ovocyte non fécondé (0 haf). Les niveaux de transcrits de ces 2 gènes sont similaires et ils diminuent progressivement jusqu'au stade morula (3 haf). Alors que le niveau des transcrits du gène de l'amylase B continue à baisser, celui de l'amylase A augmente aux stades blastula (5 haf) et gastrula (7 haf), atteint un maximum au stade trochophore (18 haf) et diminue ensuite au stade larve D (48 haf). Des différences d'expression entre les 2 gènes de l'amylase sont significatives durant l'embryogenèse (test de Kruskal-Wallis, $P < 0,01$) : le gène A est 6 à 28 fois plus exprimé que le gène B à partir du stade gastrula jusqu'au stade larve D (tableau 4).

Tableau 4. Ratio des quantités des transcrits du gène amylase A par rapport à celles des transcrits du gène amylase B au cours de l'embryogenèse et du développement larvaire de *C. gigas*. Moyennes \pm ES (n = 3) affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$, test de comparaison des médianes).

Stade de développement	Amylase A/Amylase B
Ovocyte (non fécondé)	0,5 \pm 0,0 ^a
4 cellules (1 haf)	0,5 \pm 0,0 ^a
8 cellules (2 haf)	0,5 \pm 0,1 ^a
Morula (3 haf)	0,3 \pm 0,0 ^a
Blastula (5 haf)	0,9 \pm 0,2 ^a
Gastrula (7 haf)	5,7 \pm 0,7 ^{ab}
Trochophore (18 haf)	7,7 \pm 0,6 ^{ab}
Larve D (2 jaf)	27,7 \pm 23,0 ^b
Larve umbonée (7 jaf)	214,3 \pm 197,4 ^b
Larve ocellée (14 jaf)	166,4 \pm 3,4 ^b
Larve pédivéligère (18 jaf)	24,9 \pm 1,9 ^b
Post-larve (27 jaf)	77,5 \pm 35,1 ^b

3.2.1.2. Niveau d'activité spécifique

Aucune différence d'activité spécifique de l'amylase n'est présente durant l'embryogenèse (figure 21, test de Kruskal-Wallis, $P > 0,05$). Cette activité est absente dans l'ovocyte fécondé (0 haf) et elle apparaît ensuite à de très faibles niveaux dans les premiers stades larvaires.

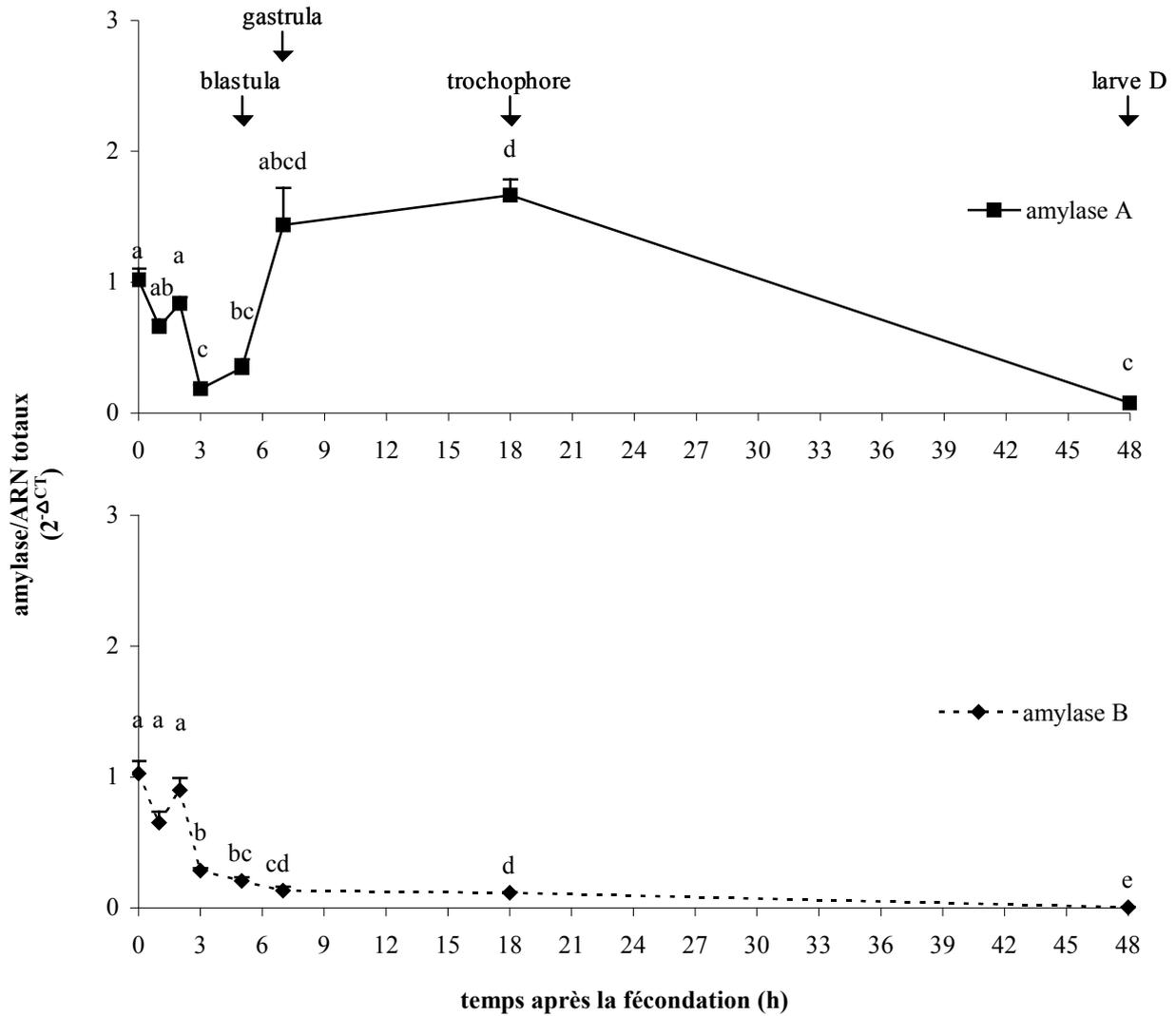


Figure 20. Quantités relatives des transcrits des gènes amylase A (en haut) et amylase B (en bas) au cours de l'embryogenèse de *C. gigas*. Moyennes ± ES (n = 3) affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$, test de comparaison des médianes).

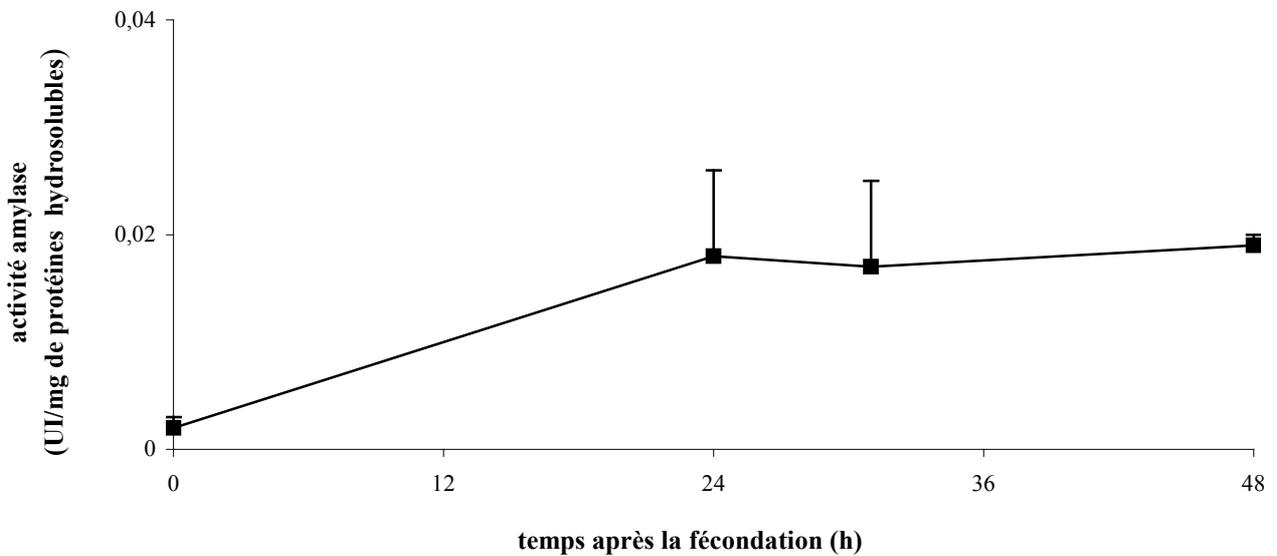


Figure 21. Activité spécifique de l'amylase au cours de l'embryogenèse de *C. gigas*. Moyennes ± ES (n = 3).

3.2.2. Développement larvaire du 2 à 27 jaf (post-larve)

3.2.2.1. Niveaux des transcrits

La figure 22 montre un pic d'expression pour chacun de ces 2 gènes durant le développement larvaire (test de Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). L'expression du gène de l'amylase A est plus précoce que celle du gène de l'amylase B. Son maximum apparaît au stade de larve oeuillée (14 jaf) alors que celui du gène de l'amylase B s'observe au stade pédivéligère (18 jaf). A partir du stade larve umbonée (7 jaf) et jusqu'au stade pédivéligère (18 jaf), les niveaux des transcrits des 2 gènes augmentent. Le gène de l'amylase A passe de 214 à 25 fois plus exprimé que le gène de l'amylase B du stade umbo (7 jaf) jusqu'au stade pédivéligère (18 jaf). Sur l'ensemble de cette période, le gène de l'amylase A est en moyenne 135 fois plus exprimé que le gène de l'amylase B. A partir du stade pédivéligère (18 jaf), les niveaux des transcrits des 2 gènes chutent et s'annulent chez la post-larve où le gène de l'amylase A est 77 fois plus exprimé que le gène B (tableau 4).

3.2.2.2. Niveau d'activité spécifique

La figure 23 montre des différences significatives dans l'activité spécifique de l'amylase durant le développement larvaire (test de Kruskal-Wallis, $P < 0,001$). L'activité spécifique de l'amylase apparaît de manière significative dans la larve D (3 jaf). Elle augmente progressivement jusqu'à atteindre un pallier au stade larve oeuillée (14 jaf) et elle stagne chez la larve se préparant à la métamorphose (21 jaf). Chez la post-larve, l'activité spécifique de l'amylase est environ 7 fois plus importante que celle mesurée de la larve D à la larve métamorphosée.

Régulation de l'amylase au cours de l'ontogenèse

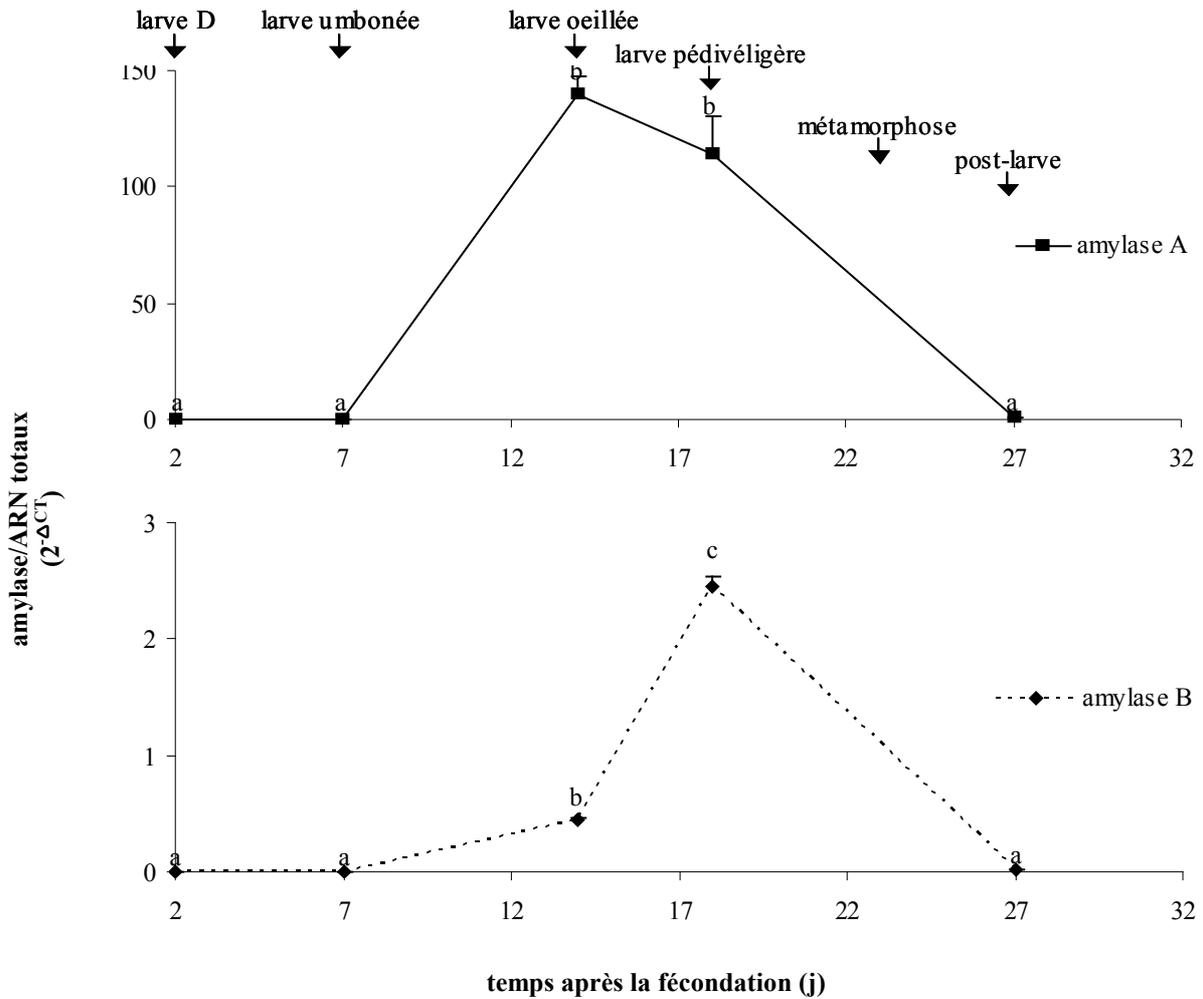


Figure 22. Quantités relatives des transcrits des gènes amylase A (en haut) et amylase B (en bas) au cours du développement larvaire de *C. gigas*. Moyennes \pm ES (n = 3) affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$, test de comparaison des médianes).

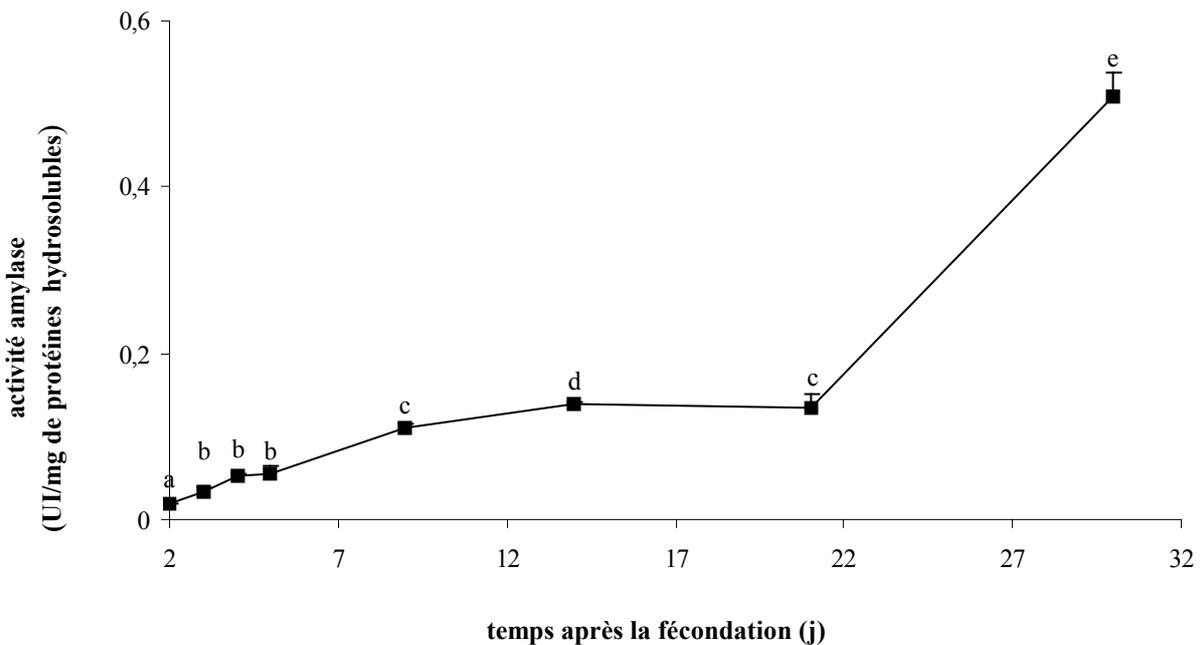


Figure 23. Activité spécifique de l'amylase au cours du développement larvaire de *C. gigas*. Moyennes \pm ES (n = 3) affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$, test de comparaison des médianes).

4. Discussion

4.1. Invalidation du gène de référence (facteur d'élongation)

Nos résultats montrent que le facteur d'élongation ne peut pas être utilisé comme gène de référence pour rapporter les quantités relatives des transcrits des gènes cibles (amylases A et B), au cours des différents stades de développement de *C. gigas*. En effet, à partir d'1 µg d'ARN totaux par stade de développement étudié, la variabilité du facteur d'élongation est apparue plus forte sur l'ensemble des stades de développement étudiés que celle des gènes des amylases A et B. De plus, un maximum de variation est surtout observé pour la larve D (2 jaf), la larve umbonée (7 jaf) et la post-larve (27 jaf). Durant ces stades qui correspondent à des périodes de modifications anatomiques et physiologiques, la synthèse des protéines tissulaires est accrue et du fait de la fonction essentielle du facteur d'élongation dans la traduction, il n'est pas surprenant que son niveau de transcrits varie entre les différents stades de développement. Trouver un bon gène de référence qui ne soit pas influencé par les conditions expérimentales est très important dans la quantification du niveau des transcrits, et il est souvent nécessaire de tester plusieurs gènes dits de ménage pour trouver celui qui est le mieux approprié à chaque expérience (Schmittgen et Zakrajsek, 2000 ; Giulietti *et al.*, 2001). C'est pourquoi, pour les analyses suivantes de RT-PCR en temps réel (expérimentations quantité trophique/température et qualité trophique), 2 gènes de référence, le facteur d'élongation et l'actine, ont été testés sur les différents échantillons. Mais, il arrive qu'aucun ne soit adéquat ; de ce fait, la normalisation des niveaux d'expression du gène cible est faite par rapport à 1 µg d'ARN totaux, procédure de normalisation grandement utilisée et la plus appropriée (Bustin, 2000, 2002 ; Tricarico *et al.*, 2002 ; Pfaffl, 2003). Ainsi, les résultats présentés ci-dessus ont été traités par rapport à 1 µg d'ARN totaux.

4.2. Embryogenèse de 0 à 48 haf (larve D)

Chez *C. gigas*, les niveaux des transcrits des gènes des amylases A et B sont similaires et ils diminuent progressivement jusqu'au stade morula (3 haf). Ces ARNm observés au cours des premiers stades embryonnaires pourraient correspondre à des ARNm d'origine maternelle qui sont dégradés. En effet, chez tous les animaux, les premières heures de la vie se caractérisent par une activité transcriptionnelle silencieuse (Davidson, 1986). De ce fait, le développement embryonnaire précoce est dépendant des composants cytoplasmiques hérités maternellement, *i.e.* protéines et ARNm, qui sont synthétisés durant l'ovogenèse et stockés

dans l'ovocyte. Les ARNm maternels sont traduits pour générer de nouvelles protéines dans les ovocytes matures et dans les oeufs fécondés (Hake et Richter, 1997). Les ARNm qui ne sont plus utilisés sont activement dégradés au cours des stades embryonnaires précoces (Bashirullah *et al.*, 2001). Par exemple, chez la souris, la dégradation des ARNm maternels est déclenchée lors de la maturation ovocytaire et est quasi-complète dans les embryons à 2 cellules (Piko et Clegg, 1982 ; Paynton *et al.*, 1988 ; Schultz, 1993). Les ARNm maternels ne sont donc pas traduits en masse et à n'importe quel stade. En fait, une régulation traductionnelle s'exerce sur ces ARNm maternels dans le but de contenir leurs activités à la fois dans le temps et dans l'espace (Hake et Richter, 1997). La régulation traductionnelle de ces ARNm maternels fait intervenir des séquences présentes dans leurs régions 3' non traduites (3'UTR). Les protéines issues de la traduction d'ARNm maternels pourraient jouer un rôle dans la nutrition de l'œuf en dégradant ses réserves.

Chez *C. gigas*, le niveau de transcrits du gène de l'amylase A augmente à partir du stade blastula (5 haf) jusqu'au stade trochophore (18 haf) : cela correspond à la transcription des gènes du zygote en ARNm car c'est à partir du stade blastula qu'est observé ce phénomène de transcription dans la plupart des animaux (Wieschaus, 1996).

Toutefois, cette augmentation du niveau des transcrits du gène de l'amylase A ne génère pas d'augmentation significative du niveau d'activité spécifique de l'amylase durant l'embryogenèse. Ceci suggère l'existence dans l'embryon d'une régulation post-transcriptionnelle s'exerçant au niveau du transport nucléocytoplasmique ou du stockage des ARNm codant les amylases, générant ainsi un retard dans la traduction de ces ARNm en protéines. Cette hypothèse a été émise par Ma *et al.* (2001) chez le bar *Lates calcarifer* : bien que le niveau d'ARNm soit très élevé au 1 jaf, le niveau d'activité enzymatique y est difficilement détectable.

Cette augmentation de l'expression du gène de l'amylase A coïncide avec la mise en place des 3 feuilletts embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme) durant la gastrulation (7 haf). Chez les vertébrés, les cellules de l'endoderme vont se différencier pour former l'intestin embryonnaire qui, durant l'organogenèse, donnera le tractus gastro-intestinal, les structures glandulaires du pharynx, le tractus respiratoire et les organes associés tels que le foie et le pancréas (Tam *et al.*, 2003). Pour les larves de poissons, l'organogenèse n'est pas complètement achevée au moment de l'éclosion et elle continue durant le développement larvaire. En particulier, l'anatomie du système digestif de la larve est très différente de celle du poisson juvénile : l'estomac n'est pas encore développé chez la larve, de ce fait, le pancréas est un organe très important pour sa digestion (Kurokawa *et al.*, 2002).

Zambonino Infante et Cahu (1994) ont observé une augmentation de l'activité spécifique de l'amylase entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour d'élevage des larves de bar européen (*Dicentrarchus labrax*). Cette augmentation coïncide avec l'ouverture de la bouche et est indépendante de l'ingestion de nourriture dans la mesure où les larves de poissons n'étaient pas nourries avant le 6^{ème} jour. Ce phénomène n'est donc pas induit par une stimulation alimentaire mais serait plutôt génétiquement programmé.

Une chute brutale du niveau des transcrits du gène de l'amylase A est observée au stade larve D (48 haf) et rejoint la chute continue de B. Parallèlement, la quantité de transcrits du gène de l'amylase A est significativement plus importante que celle du gène de l'amylase B au stade larve D (48 haf). Ce déclin pourrait correspondre à une plus grande dégradation ou à une plus faible synthèse des ARNm, en particulier ceux de B, en relation avec des modifications anatomiques et physiologiques qui affectent la larve D.

Ce n'est que pendant l'embryogenèse que A et B ont des profils d'expression distincts, mais leurs niveaux d'expression sont extrêmement faibles pendant l'embryogenèse par rapport à ceux mesurés pendant la phase larvaire (au stade trochophore (18 haf), les gènes A et B sont respectivement 84 et 3 fois moins exprimés qu'au stade larve oeuillée (14 jaf)). Il est donc difficile d'interpréter l'origine de cette différence précoce mais temporaire.

4.3. Développement larvaire jusqu'à la métamorphose

De la larve D à la post-larve, un pic de transcrits est observé pour chacun des gènes de l'amylase. Durant cette période, le niveau de transcrits du gène de l'amylase A est en moyenne 102 fois plus élevé que celui du gène de l'amylase B. Ce différentiel d'intensité est aussi rencontré chez les adultes, exposés à plusieurs niveaux trophiques et thermiques (en moyenne, 110 fois). Les gènes des amylases A et B sont donc exprimés au cours du développement larvaire et le gène de l'amylase A est toujours le gène le plus exprimé. Le gène de l'amylase B n'est donc pas spécifique des stades précoces.

4.4. A la métamorphose

Au stade post-larve (27 jaf), le niveau des transcrits des 2 gènes de l'amylase chute. Ceci est à mettre en relation avec le fait qu'à la métamorphose, la post-larve a subi une réorganisation de la plupart des organes larvaires pour former l'huître juvénile avec ses organes définitifs (Prieur, 1971). Concernant l'activité spécifique de l'amylase, elle est stable

à la métamorphose, ce qui est en contradiction par rapport à des données publiées chez la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (Samain *et al.*, 1995) ou chez les crevettes *Penaeus setiferus* (Lovett et Felder, 1990) et *Penaeus japonicus* (Laubier-Bonichon *et al.*, 1977 ; Galgani et Benyamin, 1985) où une chute brutale du niveau d'activité apparaît à la métamorphose. Cela souligne un problème de pas d'échantillonnage.

4.5. Existe-t-il une corrélation entre les niveaux d'ARN et d'activité enzymatique ?

Des niveaux élevés d'ARNm des deux gènes de l'amylase et de l'activité spécifique sont mesurés chez la larve, autour du 15^{ème} jour. Ceci suggère que cette augmentation coordonnée entre l'activité spécifique et les niveaux d'ARNm est régulée de manière transcriptionnelle durant l'élevage larvaire. Ce type de régulation a également été montré chez les larves de *D. labrax* (Péres *et al.*, 1998). Bien que le pas d'échantillonnage ne permet pas d'observer l'augmentation des transcrits après la métamorphose, période marquée par une forte montée de l'activité enzymatique, il serait intéressant de vérifier, au niveau cellulaire, si ce changement d'activité important correspond à une nouvelle organogenèse de l'appareil digestif.

5. Conclusion

Ce travail constitue une pré-manipulation montrant globalement une surexpression du gène de l'amylase de A par rapport à celui du gène de l'amylase B, dans nos conditions d'élevage larvaire. Des niveaux élevés de transcrits des 2 gènes de l'amylase et d'activité spécifique sont observés au milieu de l'élevage larvaire puis ces ARNm chutent au moment de la métamorphose. Après la métamorphose, l'activité spécifique est plus forte traduisant soit une ingestion plus forte soit un appareil digestif pleinement mature chez les post-larves. Nous concluons donc que les transcrits des 2 gènes de l'amylase sont exprimés dès le stade larvaire jusqu'au stade adulte, à des niveaux très différents : le gène A est toujours plus exprimé que le gène B. L'expression de ces 2 gènes n'est donc pas spécifique des stades précoces.

CHAPITRE II

Régulation de l'amylase par la quantité trophique et par la température

CHAPITRE II

Régulation de l'amylase par la quantité trophique et par la température

1. Introduction

L'adaptation des enzymes digestives au régime alimentaire est bien détaillée chez les vertébrés (Howard et Yarkin, 1963 ; Puigserver *et al.*, 1985 ; Dagorn, 1986 ; Scheele, 1993). L'ingestion de quantités importantes de protéines, de glucides et de lipides entraîne une augmentation des activités enzymatiques impliquées dans l'hydrolyse de ces substrats (Grossman *et al.* 1943 ; Ben Abdeljlil et Desnuelle, 1964). Cinq à sept jours sont nécessaires pour que l'adaptation de la biosynthèse des protéines pancréatiques à un nouveau régime soit totale chez le rat (Ben Abdeljlil et Desnuelle, 1964) ou le porc (Corring et Saucier, 1972). La régulation de la synthèse de l'amylase s'exerce au niveau traductionnel chez le rat (Lhoste *et al.*, 1993) et chez le bar commun (Péres *et al.*, 1998). L'adaptation des enzymes digestives est moins bien décrite chez les invertébrés. Les cnidaires et les bivalves vivant dans des environnements littoraux subissent de larges variations dans leur alimentation en relation avec les saisons et la production primaire. Chez l'anémone de mer, la coquille Saint-Jacques et la coque, les activités amylase subissent des fluctuations saisonnières et présentent une augmentation durant le printemps-été par rapport à l'automne-hiver (Van Praet, 1982 ; Le Pennec *et al.*, 2001 ; Ibarrola *et al.*, 1996). Cela confirme la participation du phytoplancton et de la température dans la régulation de l'amylase. Des changements dans le niveau d'ARNm miment des variations observées dans l'activité amylase durant le cycle nutritionnel de *C. gigas* (Moal *et al.*, 2000). Toujours chez *C. gigas*, des travaux préliminaires ont montré qu'un niveau trophique riche induisait des augmentations significatives des transcrits amylase A et de l'activité amylase (Huvet *et al.*, 2003). L'ensemble de ces résultats suggère une régulation sur le niveau des transcrits des gènes amylase (au moins A) par le régime alimentaire. Des changements dans les propriétés catalytiques sont montrés durant une adaptation à la température chez les crevettes pour les amylases (Van Wormhoudt, 1980).

Pour analyser l'effet de la ressource trophique et d'autres facteurs comme la température sur le fonctionnement du système amylase, une expérimentation portant à la fois sur la quantité trophique et la température a été réalisée. Les analyses vont porter sur les niveaux des ARNm de chaque gène amylase, l'activité spécifique totale résultante et sur la constante de Michaelis-Menten ou K_M du mélange des amylases. Bien que les compositions en acides aminés des isoamylases soient très voisines (moins de 11 % d'acides aminés sont différents), de faibles différences en charge électrique sont suffisantes pour être mises en évidence par leurs points isoélectriques (pI) différents (7,32 pour A et 7,28 pour B). La méthode d'isoélectrofocalisation réalisant la séparation de ces isoamylases selon leurs pI est donc utilisée ; ces protéines seront révélées par leur activité. L'indice de glande digestive sera également calculé afin de voir si des variations de la quantité trophique et de température induisent une variation de ce paramètre.

2. Matériels et Méthodes

Les huîtres de cette étude ont été produites à la station Ifremer de la Tremblade (Charente-Maritime, France) en février 2001. Elles sont issues d'un croisement multi-parental réalisé à partir de géniteurs identifiés aux 2 marqueurs PCR-RFLP amylase (coll. Dégremont *et al.*).

Après une mise en stabulation à l'Aber-Benoît (Finistère, France) durant le mois d'octobre 2002 où la température de l'eau de mer avoisinait les 14°C, les huîtres âgées de 21 mois (poids total moyen = $32,1 \pm 1,5$ g) ont été réparties dans 6 bacs de 300 L, à raison de 74 huîtres par bac, à la station Ifremer d'Argenton (Finistère, France), en novembre 2002. La population expérimentale va alors subir les effets croisés de 2 facteurs (correspondant à 6 conditionnements différents) qui sont :

- la quantité de nourriture, selon trois niveaux (4 %, 8 % et 12 % de matière sèche d'algues par gramme de chair sèche d'huîtres et par jour),
- la température de l'eau de mer, selon deux niveaux (11 et 20°C).

Le régime alimentaire est un mélange algal composé de 4 algues apportées en quantité de biomasse équivalente (1/4, 1/4, 1/4, 1/4) : *T. chui*, *C. calcitrans* f. *pumilum*, *S. costatum* et T-Iso). Le mélange algal est apporté en continu (apport permanent d'eau de mer enrichie en micro-algues) à l'aide d'une pompe péristaltique.

Le plan d'échantillonnage est le suivant : un prélèvement initial en sortie de l'Aber-Benoît (novembre 2002, T0) et un prélèvement final après 4 semaines de conditionnement (T1). A T0 et à T1, 40 et 30 huîtres sont prélevées, respectivement, sur lesquelles on mesure :

- le poids total (P_T),
- le poids de la glande digestive (P_{GD}).

L'indice de glande digestive (I_{GD}) peut être calculé selon la formule suivante : $I_{GD} = [(P_{GD})/(P_T)] \times 100$. Pour chaque conditionnement, 3 pools de 10 glandes digestives individuelles sont constitués et broyés pour les analyses biomoléculaires (quantification des transcrits des 2 gènes amylase par RT-PCR en temps réel) et biochimiques (activité amylase spécifique, K_M , isoélectrofocalisation).

3. Résultats

3.1. Choix de la méthode de quantification des ARNm

Pour 1 μ g d'ARN totaux extraits à partir des glandes digestives d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la quantité trophique et de la température, aucune différence significative entre les différents conditionnements n'est observée sur les valeurs des cycles seuil (CT) pour les 2 gènes de référence (ANOVA, $P = 0,794$ et $P = 0,401$ pour le facteur d'élongation et l'actine, respectivement). Les coefficients de variation (CV) des CT des 2 gènes de référence sont faibles et moins élevés (CV = 2,2 et 1,7 pour le facteur d'élongation et l'actine, respectivement) que ceux des CT des 2 gènes cible (CV = 2,7 et 3,5 pour l'amylase A et l'amylase B, respectivement) (tableau 5). Par conséquent, les quantités relatives (QR) des ARNm de chaque gène amylase dans un échantillon sont normalisées par rapport au gène de l'actine (CV étant le plus faible), et relatives à un contrôle positif. Le contrôle positif est un échantillon commun à toutes les réactions de PCR en temps réel et il est constitué par un des 4 pools d'ADNc représentatifs de 10 glandes digestives d'huîtres prélevées à l'Aber-Benoît. Les QR sont exprimées selon la formule suivante : $QR = 2^{-\Delta\Delta CT}$ où $\Delta CT = (CT_{\text{échantillon}} - CT_{\text{Aber-Benoît}})$ pour les 2 gènes amylase et d'actine et $\Delta\Delta CT = (CT_{\text{amylase}} - CT_{\text{actine}})$.

Tableau 5. Moyennes, erreurs standard (ES) et coefficients de variation (CV) des cycles seuil (CT) des gènes amylase A, amylase B, facteur d'élongation et actine à partir d'1 µg d'ARN totaux présents dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la quantité trophique et de la température (n = 3). En gras sont précisées les valeurs calculées pour l'ensemble des conditionnements.

Gène	Conditionnement	Moyenne	ES	CV
Amylase A	11°C-4%	19,8	0,2	1,6
	11°C-8%	19,8	0,1	0,7
	11°C-12%	20,4	0,2	1,5
	20°C-4%	19,3	0,3	2,3
	20°C-8%	19,1	0,2	1,8
	20°C-12%	19,4	0,3	2,9
		19,6	0,1	2,7
Amylase B	11°C-4%	26,8	0,4	2,3
	11°C-8%	26,8	0,4	2,5
	11°C-12%	27,0	0,3	2,1
	20°C-4%	25,7	0,3	2,1
	20°C-8%	25,5	0,3	2,2
	20°C-12%	25,8	0,9	5,7
		26,3	0,2	3,5
Facteur d'élongation	11°C-4%	16,5	0,2	2,2
	11°C-8%	16,7	0,3	3,0
	11°C-12%	16,3	0,2	2,2
	20°C-4%	16,5	0,4	3,9
	20°C-8%	16,6	0,1	1,2
	20°C-12%	16,6	0,1	1,4
		16,5	0,1	2,2
Actine	11°C-4%	17,2	0,2	2,5
	11°C-8%	17,0	0,2	2,1
	11°C-12%	17,2	0,1	0,7
	20°C-4%	16,9	0,1	0,8
	20°C-8%	17,0	0,1	0,6
	20°C-12%	17,0	0,3	2,8
		17,0	0,1	1,7

Tableau 6. Ratio des quantités des transcrits du gène amylase A par rapport à celles des transcrits du gène amylase B dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la quantité trophique et de la température. Moyennes ± ES (n = 3).

Conditionnement	Amylase A/Amylase B
11°C-4%	127,6 ± 18,1
11°C-8%	139,2 ± 31,2
11°C-12%	100,6 ± 11,2
20°C-4%	90,2 ± 23,9
20°C-8%	93,8 ± 21,5
20°C-12%	111,3 ± 61,7

3.2. Effet de la quantité trophique

3.2.1. Sur les transcrits des gènes amylase A et B

L'effet de la quantité trophique n'est pas significatif sur les QR des transcrits amylase A et B à 11°C (figure 24, ANOVA, $P = 0,095$ et ANOVA, $P = 0,536$ pour les transcrits amylase A et B, respectivement) et 20°C (figure 24, Kruskal-Wallis, $P = 0,288$ et ANOVA, $P = 0,85$ pour les transcrits amylase A et B, respectivement). Même si elles ne sont pas significatives au seuil de 5 %, les variations dans les QR des transcrits amylase A induites par les variations du niveau trophique sont plus importantes à 11°C qu'à 20°C, alors que pour celles des transcrits amylase B, c'est le contraire. En effet, entre 4 et 12 % de nourriture, le niveau de transcrits amylase A diminue de 31,3 % à 11°C (QR = $1,31 \pm 0,10$ vs $0,90 \pm 0,16$) alors que celui des transcrits amylase B augmente de 29,2 % à 20°C (QR = $1,25 \pm 0,36$ vs $1,62 \pm 0,64$).

Aucune différence significative entre les différents niveaux trophiques n'est observée sur le ratio des quantités des transcrits amylase A par rapport à celles des transcrits amylase B à 11°C (tableau 6, ANOVA, $P = 0,482$) et 20°C (tableau 6, ANOVA, $P = 0,925$). Dans nos conditions expérimentales, le niveau des transcrits amylase A est en moyenne 110 fois plus élevé que celui des transcrits amylase B.

3.2.2. Sur l'activité amylase spécifique

La quantité trophique augmente de manière significative l'activité amylase spécifique à 11°C (figure 25, ANOVA, $P = 0,047$) et 20°C (figure 25, ANOVA, $P = 0,004$). Cette augmentation entre 4 % et 12 % de nourriture est moins forte à 11°C (45 %) qu'à 20°C (55 %) : les valeurs s'étendent de $0,81 \pm 0,11$ à $1,18 \pm 0,09$ UI/mg de protéines hydrosolubles et de $0,63 \pm 0,05$ à $0,98 \pm 0,02$ UI/mg de protéines hydrosolubles pour 11 et 20°C.

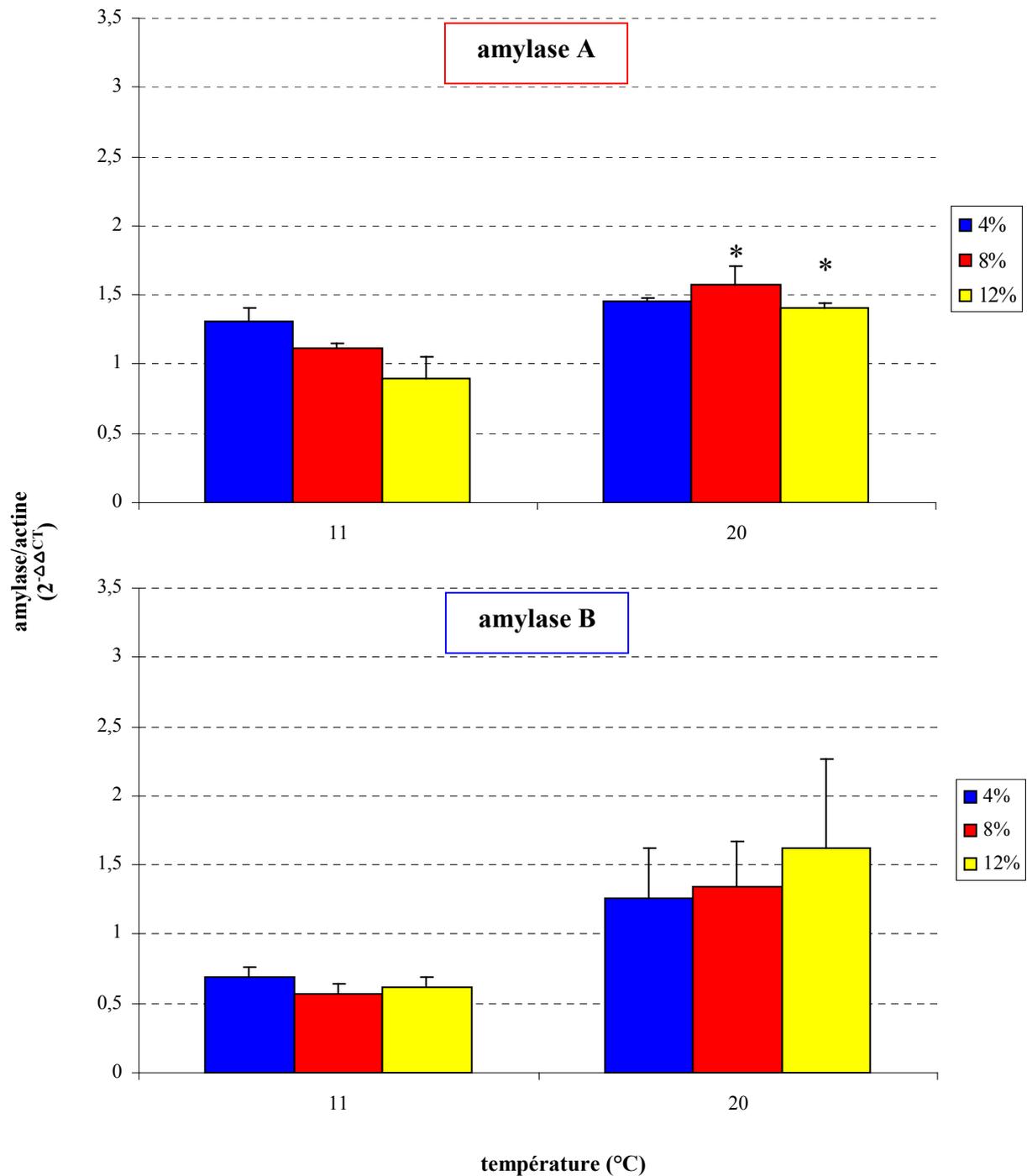


Figure 24. Niveaux des transcrits des gènes amylase A (en haut) et amylase B (en bas) présents dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la quantité trophique et de la température. Ces quantités (moyennes ± ES (n = 3)) sont normalisées par rapport au gène de l'actine et sont relatives par rapport à un contrôle (pool Aber-Benoît). A 8 % et 12 % de nourriture, l'astérisque indique une différence significative entre 11°C et 20°C pour les quantités relatives (QR) des transcrits du gène amylase A (test LSD, $P < 0,05$).

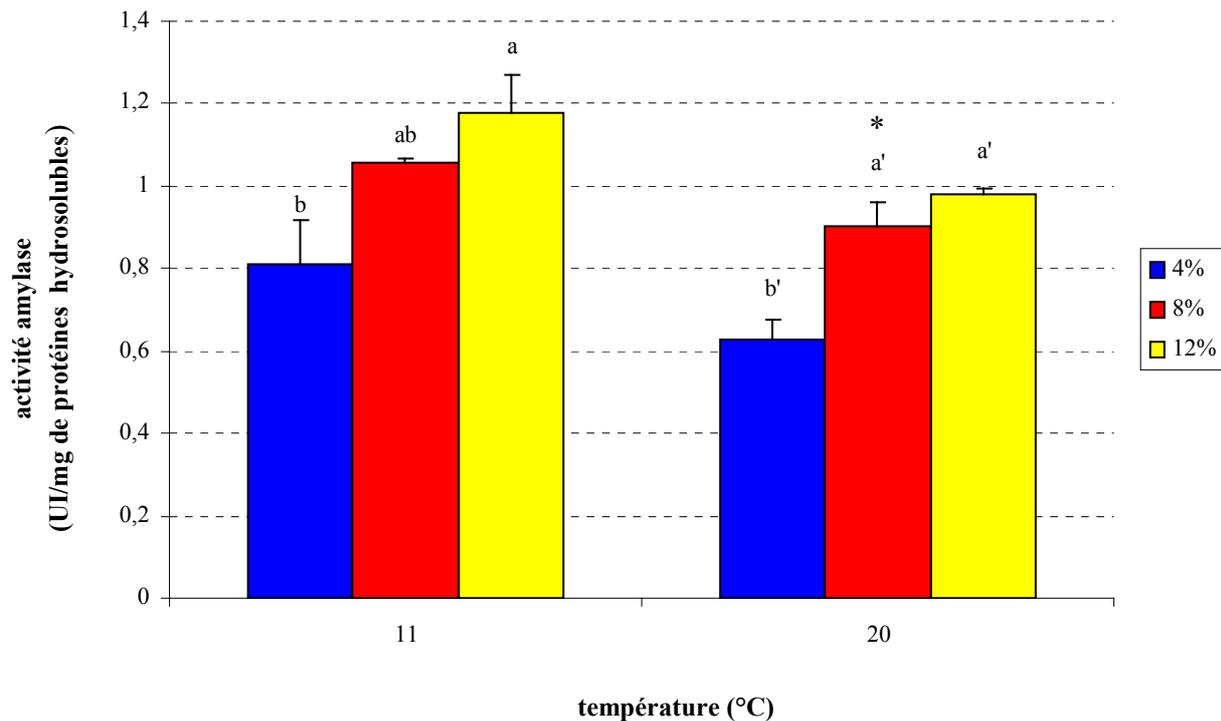


Figure 25. Niveaux d'activité amylase spécifique (moyenne \pm ES (n = 3)) présente dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la quantité trophique et de la température. A 11°C ou 20°C, les moyennes affectées de lettres différentes sont significativement différentes (test LSD, $P < 0,05$). A 8 % de nourriture, l'astérisque indique une différence significative entre 11°C et 20°C (test de comparaison des médianes, $P < 0,05$).

3.2.3. Sur les bandes d'IEF

Dans un gel de polyacrylamide présentant un gradient de pH de 5 à 8 de l'anode vers la cathode, la révélation d'activité amylase montre au mieux 7 bandes (figure 26). 2 d'entre elles sont majoritaires et sont désignées I1 et I2 en allant de la cathode vers l'anode. Ces 2 bandes présentent des valeurs de pI comprises entre 7 et 8 (avec une plus forte valeur de pI pour I1 que pour I2), qui sont compatibles avec les valeurs théoriques de pI des protéines amylase A et B (7,32 et 7,28 pour les protéines amylase A et B, respectivement (Sellos *et al.*, 2003)). A 4 %, 8 % et 12 % de nourriture et aux 2 températures testées, nous observons de très fortes valeurs d'erreur standard pour les activités des bandes I1 et I2 (figure 27). Ceci peut expliquer pourquoi aucune différence significative entre les niveaux trophiques n'est montrée sur les activités de ces bandes I1 et I2 à 11°C (ANOVA, $P = 0,418$ et $P = 0,109$ pour I1 et I2, respectivement) et 20°C (ANOVA, $P = 0,567$ et $P = 0,843$ pour I1 et I2, respectivement).

Dans nos conditions expérimentales, l'activité de I1 est en moyenne 2 fois plus élevée que celle de I2 dans la glande digestive.

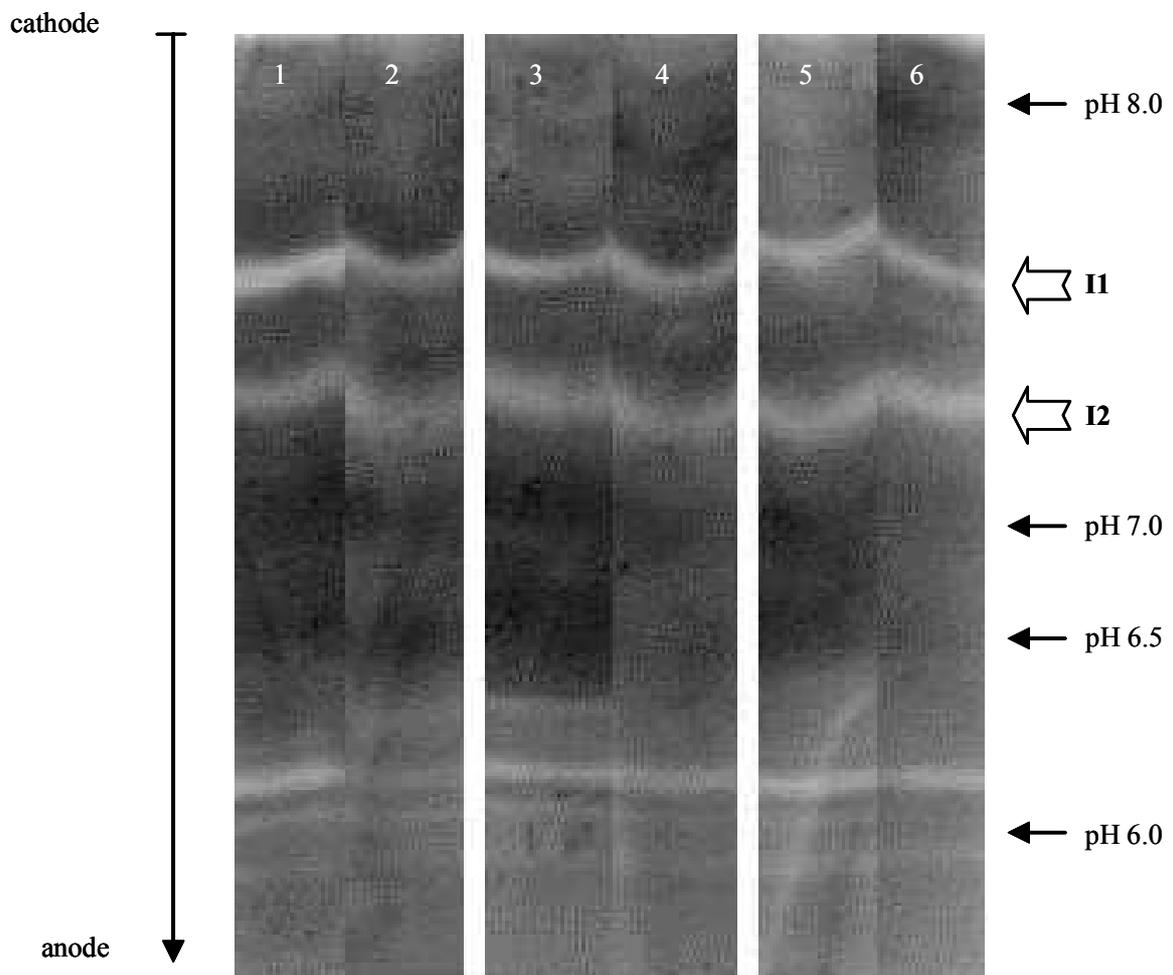


Figure 26. Analyse par isoélectrofocalisation (IEF) d'extraits bruts de glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la quantité trophique et de la température. Par puits, 37,5 μ g de protéines hydrosolubles sont déposées. Les puits 1-2, 3-4, 5-6 correspondent aux extraits préparés à partir d'huîtres nourries respectivement avec 4 %, 8 % et 12 % de nourriture. Les puits 1-3-5 et 2-4-6 correspondent aux extraits préparés à partir d'huîtres placées respectivement à 11°C et 20°C. Révélation des activités amylase en présence d'amidon et après une coloration au lugol. Deux bandes majoritaires sont détectées et sont désignées par I1 et I2.

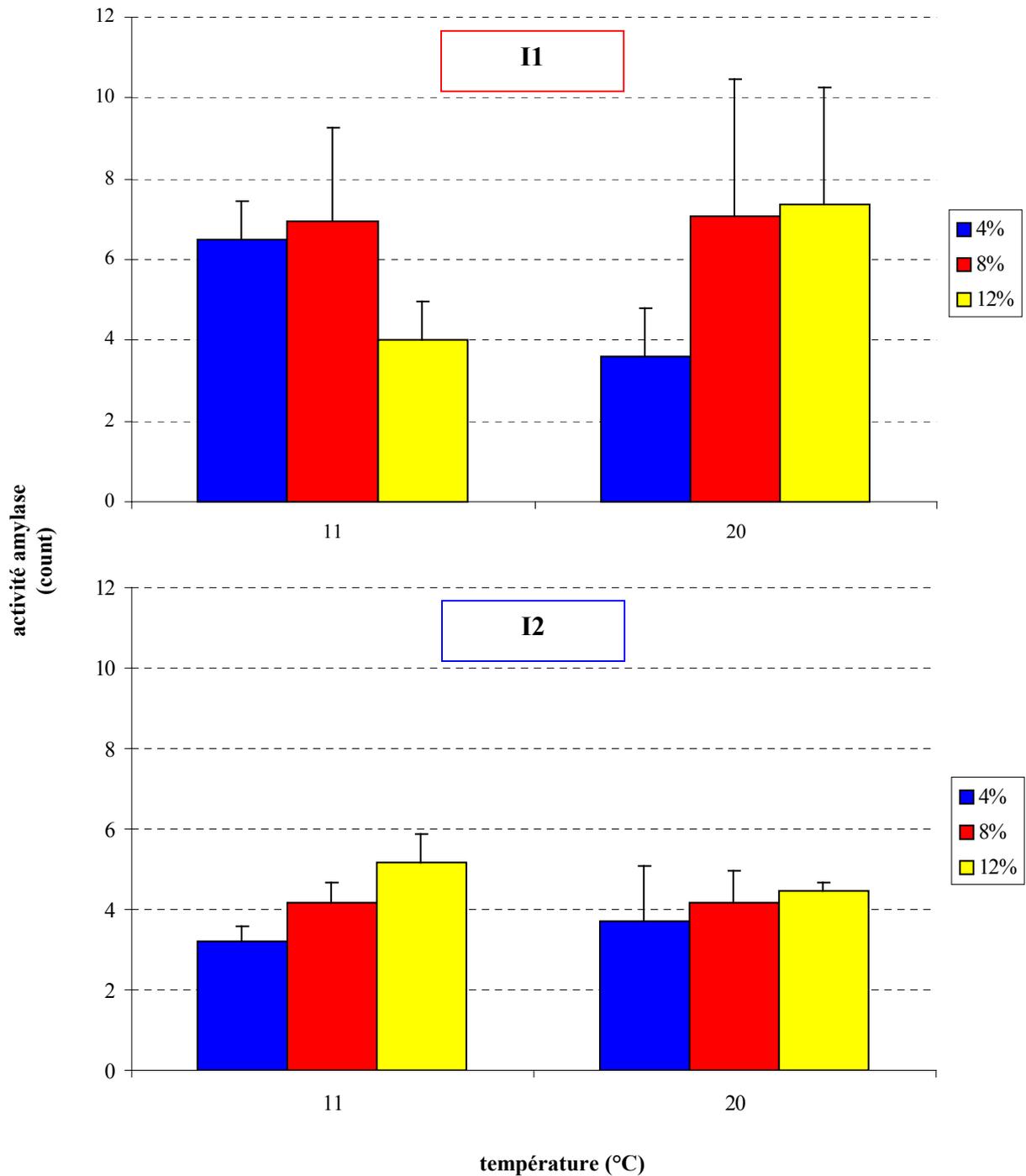


Figure 27. Niveaux des activités amylase des bandes I1 (en haut) et I2 (en bas) détectées en IEF (moyenne \pm ES (n = 3)) et présentes dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la quantité trophique et de la température.

3.2.4. Sur le K_M

L'effet de la quantité trophique n'est pas significatif sur le K_M à 11°C (figure 28, ANOVA, $P = 0,732$) et 20°C (figure 28, ANOVA, $P = 0,119$). Même si elle n'est pas significative au seuil de 5 %, l'augmentation du K_M entre 4 % et 12 % de nourriture est de 23 % ($0,49 \pm 0,03$ mg/mL vs $0,60 \pm 0,04$ mg/mL) à 20°C.

Seul le K_M ($0,36 \pm 0,01$ mg/mL) mesuré à l'Aber-Benoît est significativement inférieur aux K_M des différents conditionnements dont la valeur moyenne est de $0,51$ mg/mL (test LSD, $P < 0,05$).

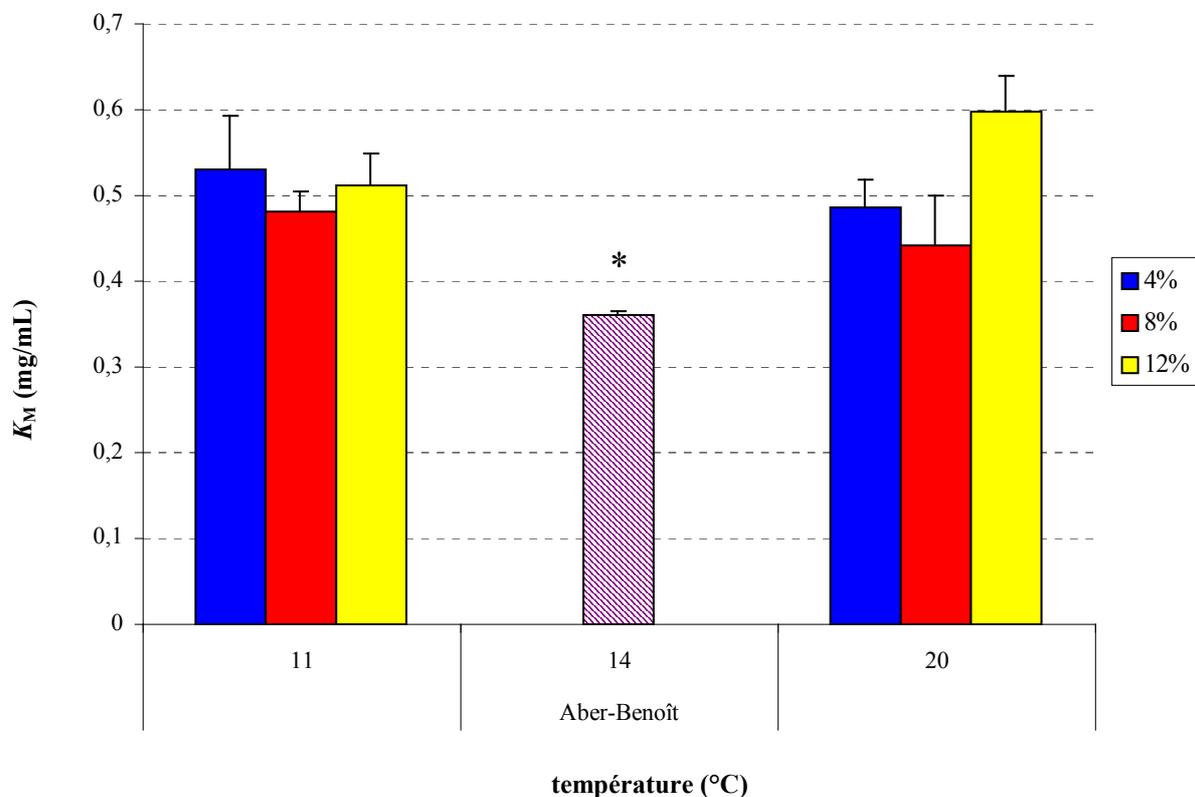


Figure 28. Niveaux du K_M de l'amylase (moyenne \pm ES ($n = 3$)) présente dans la glande digestive d'adultes *C. gigas*, au début (à la sortie de l'Aber-Benoît) et à la fin de l'expérimentation (à la sortie d'Argenton). A Argenton, durant 4 semaines, les huîtres ont été placées dans 3 conditions de quantité trophique (4 %, 8 % et 12 %) et dans 2 conditions de température (11°C et 20°C). L'astérisque indique que le K_M mesuré à l'Aber-Benoît est significativement plus faible que ceux mesurés à Argenton (test LSD, $P < 0,05$).

3.2.5. Sur l'indice de glande digestive

La quantité trophique augmente de manière significative l'indice de glande digestive à 11°C (figure 29, Kruskal-Wallis, $P = 0,002$) et 20°C (figure 29, Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$). Cette augmentation entre 4 % et 12 % de nourriture est moins forte à 11°C (46 %) qu'à 20°C (49 %) : les valeurs s'étendent de $1,11 \pm 0,06$ à $1,61 \pm 0,12$ % et de $0,79 \pm 0,10$ à $1,17 \pm 0,08$ % pour 11 et 20°C.

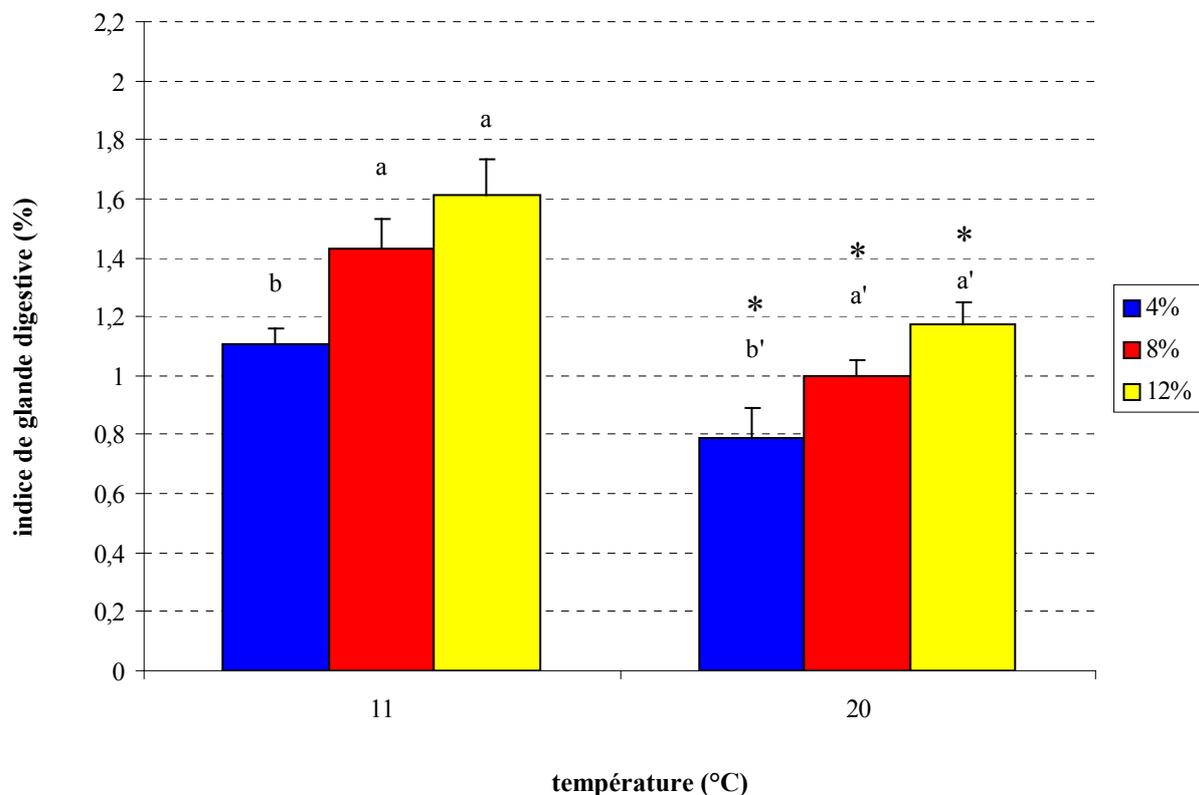


Figure 29. Indice de glande digestive (moyenne \pm ES (n = 3)) chez des adultes *C. gigas* soumis à des variations de la quantité trophique et de la température. A 11°C ou 20°C, les moyennes affectées de lettres différentes sont significativement différentes (test de comparaison des médianes, $P < 0,05$). A 4 %, 8 % et 12 % de nourriture, l'astérisque indique une différence significative entre 11°C et 20°C (test de comparaison des médianes, $P < 0,05$).

3.3. Effet de la température

3.3.1. Sur les transcrits des gènes amylase A et B

La hausse de température augmente uniquement de manière significative les QR des transcrits amylase A à 8 % (figure 24, ANOVA, $P = 0,026$ et ANOVA, $P = 0,086$ pour les transcrits amylase A et B, respectivement) et 12 % de nourriture (figure 24, ANOVA, $P = 0,036$ et Kruskal-Wallis, $P = 0,513$ pour les transcrits amylase A et B, respectivement). Cette augmentation du niveau des transcrits amylase A entre 11°C et 20°C est moins forte à 8 % de nourriture (41,2 %) qu'à 12 % (55,8 %) : les valeurs s'étendent de $1,12 \pm 0,03$ à $1,58 \pm 0,13$ et de $0,90 \pm 0,16$ à $1,40 \pm 0,04$ pour 8 et 12 % de nourriture, respectivement. A 20°C et aux 3 niveaux trophiques testés, nous notons de très fortes valeurs d'erreur standard pour les QR des transcrits amylase B, pouvant expliquer pourquoi aucune différence significative entre 11 et 20°C n'est montrée sur ce paramètre. Même si elle n'est pas significative au seuil de 5 %, l'augmentation du niveau des transcrits amylase B entre 11°C et 20°C est aussi moins forte à 8 % (137,9 %) qu'à 12 % de nourriture (163,4 %) : les valeurs s'étendent de $0,56 \pm 0,08$ à $1,34 \pm 0,33$ et de $0,62 \pm 0,07$ à $1,62 \pm 0,64$ pour 8 et 12 % de nourriture, respectivement.

Aucune différence significative entre 11°C et 20°C n'est observée sur le ratio des quantités des transcrits amylase A par rapport à celles des transcrits amylase B à 4 % (tableau 6, ANOVA, $P = 0,280$), 8 % (tableau 6, ANOVA, $P = 0,280$) ou 12 % de nourriture (tableau 6, ANOVA, $P = 0,872$).

3.3.2. Sur l'activité amylase spécifique

La hausse de température ne diminue de manière significative l'activité amylase spécifique qu'à 8 % de nourriture (figure 25, Kruskal-Wallis, $P = 0,049$). Cette diminution entre 11°C et 20°C est de 14,8 % ($1,06 \pm 0,01$ vs $0,90 \pm 0,06$ UI/mg de protéines hydrosolubles).

3.3.3. Sur les bandes d'IEF

Aucune différence significative entre 11°C et 20°C n'est observée sur les activités des bandes I1 et I2 à 4 % (figure 27, ANOVA, $P = 0,131$ et $P = 0,757$ pour I1 et I2, respectivement), 8 % (figure 27, ANOVA, $P = 0,977$ et $P = 0,989$ pour I1 et I2, respectivement) et 12 % de nourriture (figure 27, ANOVA, $P = 0,327$ et $P = 0,393$ pour I1 et I2, respectivement).

3.3.4. Sur le K_M

Aucune différence significative entre 11°C et 20°C n'est observée sur le K_M à 4 % (figure 28, ANOVA, $P = 0,549$), 8 % (figure 28, ANOVA, $P = 0,558$) et 12 % (figure 28, ANOVA, $P = 0,202$) de nourriture. Même si elle n'est pas significative au seuil de 5 %, l'augmentation du K_M entre 11 et 20°C est de 17,6 % ($0,51 \pm 0,04$ mg/mL vs $0,60 \pm 0,04$ mg/mL) à 12 % de nourriture.

3.3.5. Sur l'indice de glande digestive

L'augmentation de température diminue de manière significative l'indice de glande digestive à 4 % (figure 29, ANOVA, $P < 0,001$), 8 % (figure 29, ANOVA, $P < 0,001$) et 12 % (figure 29, ANOVA, $P = 0,002$) de nourriture. Cette diminution entre 11 et 20°C est légèrement plus forte à 8 % (30,2 %) qu'à 4 % (28,7 %) et 12 % de nourriture (27,4 %) : les valeurs varient entre $1,11 \pm 0,06$ et $0,79 \pm 0,10$ %, $1,43 \pm 0,10$ et $1,00 \pm 0,06$ %, $1,61 \pm 0,12$ et $1,17 \pm 0,08$ % pour 4, 8 et 12 % de nourriture.

4. Discussion

4.1. Quels sont les effets régulateurs de la quantité trophique ?

Aucun changement significatif dans le niveau des transcrits amylase A et B n'est observé en réponse à une augmentation du niveau trophique allant de 4 à 12 %. Le niveau des transcrits amylase A est en moyenne 110 fois plus élevé que celui des transcrits amylase B.

Huvet *et al.* (2003) ont observé une légère augmentation (18 %) du niveau des transcrits amylase A entre 0,3 % et 6 % de nourriture et 70 fois plus de transcrits amylase A que de transcrits amylase B dans la glande digestive. Ces résultats semblent indiquer que la régulation par la quantité trophique de la synthèse de l'amylase s'exerce très peu au niveau des ARNm dans notre gamme de concentration de nourriture (4 à 12 %) et que la variation de quantité de nourriture, dans les petites concentrations nutritives, avait juste un effet sur le niveau d'ARNm amylase A.

L'activité amylase spécifique augmente en réponse aux variations croissantes du niveau trophique. Ce phénomène d'adaptation a aussi été observé par Huvet *et al.* (2003). Ces résultats semblent indiquer que la régulation par la quantité trophique de la synthèse de l'amylase s'exerce au niveau post-transcriptionnel et/ou traductionnel. Moal *et al.* (2000) ont suggéré un stockage des ARNm dans les cellules digestives, au vu des décalages entre les variations associées aux niveaux des ARNm amylase et de l'activité amylase.

L'augmentation du nombre de cellules digestives (*i.e.* augmentation de l'indice de glande digestive) correspond à une autre forme d'adaptation du système digestif au niveau nutritif, indépendante de l'activation transcriptionnelle ou traductionnelle de l'amylase.

Des réponses concernant l'identification des protéines amylase A et B peuvent être apportées par l'IEF. D'après les données de pI calculées à partir de la traduction des gènes A et B (7,32 et 7,28 pour respectivement les protéines amylase A et B (Sellos *et al.*, 2003)), les 2 bandes les plus hautes en pI ($7,0 < pI < 8,0$) et les plus intenses pourraient correspondre à la protéine codée par le gène amylase A ou par le gène amylase B ; les bandes les plus basses en pI et d'intensités mineures sont présumées être des produits de maturation post-traductionnelle. En effet, dans l'interprétation des résultats d'analyse des gels d'électrophorèse montrant la présence de plusieurs bandes (ou isoformes) pour une même enzyme, la glycosylation, la désamidation et l'acétylation sont généralement avancées comme des événements susceptibles de modifier l'équilibre des charges de la protéine, en conséquence, son pI. La glycosylation a été plusieurs fois avancée pour expliquer la présence de plusieurs isoformes dans la salive ou le suc pancréatique de porc (Al Kazaz *et al.*, 1998). L'intervention d'une désamidation a déjà été évoquée pour expliquer la présence de plusieurs isoformes d'amylases salivaires chez l'homme, ainsi que dans celles du pancréas de rat (Karn et Malacinski, 1978) ou du pancréas de porc (Al Kazaz *et al.*, 1996 ; Darnis *et al.*, 1999). Des

essais d'identification grâce à des anticorps (Eurogentec) spécifiques de l'une ou l'autre des amylases d'huître ont échoué et n'ont pas permis d'identifier ni les protéines amylase A ni celles de l'amylase B. D'après le pI et l'intensité des bandes, la bande I1 pourrait être la protéine amylase A alors que la bande I2 pourrait être la protéine amylase B. Ces 2 bandes sont d'une intensité inégale, I1 est 2 fois plus importante que I2. Or, le niveau des transcrits du gène A est 110 fois plus élevé que celui de B. Il faudrait donc que la traduction de B soit 50 fois plus efficace que celle de A. Des modifications dans la structure secondaire (*i.e.* structure en épingle à cheveux) des ARNm peuvent affecter le contrôle traductionnel d'ARNm codant le trypsinogène anionique et l'amylase (Pinsky *et al.*, 1985 ; Steinhilber *et al.*, 1988). Cependant, l'intensité de ces 2 bandes n'est pas affectée par l'augmentation du niveau trophique alors que l'activité globale l'est. Soit les valeurs élevées des erreurs standard associées à la méthode d'intégration et de quantification des bandes expliquent ce résultat, soit l'attribution des bandes à une forme A ou B est erronée.

Les valeurs de K_M sont similaires quelle que soit la condition trophique testée. L'augmentation de l'activité amylase spécifique avec le niveau trophique ne semble donc pas être expliquée par une variation des paramètres catalytiques des amylases, par une synthèse différentielle des formes A ou B, ce qui confirme l'absence de modifications dans l'importance des bandes en IEF.

4.2. Quels sont les effets régulateurs de la température ?

Aucun effet de la température n'est observé sur l'activité globale ou sur l'intensité des bandes en IEF ou sur le K_M , suggérant une absence de régulation de l'amylase par ce facteur.

Cependant, le rendement d'assimilation diminue durant l'été en conditions contrôlées et, *in situ*, la production de bio-dépôts diminue suggérant une diminution de l'ingestion qui pourrait occasionner une modification de stimulation de la synthèse des enzymes digestives dans la glande digestive (Pouvreau, comm. pers.). L'augmentation des ARNm amylase A en réponse à l'augmentation de la température pourrait être un mécanisme de compensation en réponse à une baisse d'ingestion : les huîtres mangent moins, elles produisent massivement des ARNm (en l'occurrence, du A) pour optimiser la digestion des aliments très faiblement présents et pour en retirer un maximum d'énergie. Mais, cette augmentation du niveau d'ARNm amylase A ne se répercute pas sur l'activité amylase spécifique, et l'indice de

glande digestive diminue avec l'augmentation de température, ceci étant en accord avec une baisse de l'ingestion.

5. Conclusion

Les variations de transcrits et d'activité ne sont pas corrélées, que ce soit par la quantité trophique ou la température : la régulation de l'amylase par ces 2 facteurs ne s'effectue pas au niveau de la transcription, mais plutôt au niveau post-transcriptionnel.

La quantité trophique ne modifie pas le niveau des ARNm des 2 gènes amylase, par contre, elle modifie globalement l'activité spécifique et l'activité totale par la taille de la glande digestive. Cela suggère une régulation globale du système digestif par la quantité de nourriture et probablement par les niveaux des nutriments circulant. Ce contrôle s'exercerait à 2 niveaux : posttranscriptionnel et taille de la glande digestive (divisions cellulaires).

L'augmentation des ARNm amylase A et la diminution de la taille de la glande digestive avec la hausse thermique paraissent correspondre à une baisse de l'ingestion associée à des perturbations de *C. gigas* au-delà de 19°C.

Les transcrits amylase A sont 110 fois plus présents que les transcrits amylase B mais, leurs activités ne diffèrent que d'un facteur 2. Ceci suggère que les processus post-transcriptionnels et/ou traductionnels impliqués compensent très fortement ce différentiel de messagers ou que les protéines produites par les 2 gènes ne sont pas différentes. Les différentes bandes correspondraient alors à des variants post-traductionnels.

CHAPITRE III

Régulation de l'amylase par la qualité trophique

CHAPITRE III

Régulation de l'amylase par la qualité trophique

1. Introduction

L'amylase est très sensible à toute variation dans l'ingestion de son substrat, l'amidon. Chez le rat, Desnuelle *et al.* (1962) ont montré que l'activité amylase pancréatique est multipliée par 6, quand les animaux habitués à un régime pauvre en amidon (11 à 20 %) sont nourris avec un régime riche en amidon (56 à 75 %). Ce résultat a été confirmé chez la même espèce par Howard et Yadkin (1963) et Snook et Meyer (1964). L'augmentation du niveau de l'amylase en réponse à la consommation d'un régime riche en amidon résulte d'une modification spécifique de sa vitesse de biosynthèse (Reboud *et al.*, 1964). La régulation de l'expression de l'amylase s'exerce au niveau traductionnel chez le rat (Lhoste *et al.*, 1993) et chez le bar européen (Péres *et al.*, 1998). Chez la crevette bleue *Litopenaeus stylirostris*, une induction significative de l'activité amylase est observée suite à une augmentation du niveau des sucres alimentaires (Rosas *et al.*, 2000). L'expression de l'amylase est réprimée par le glucose et induite par l'amidon chez la mouche du genre *Drosophila* (Benkel et Hickey, 1986b, 1987 ; Inomata *et al.*, 1995) mais pas chez la mouche du genre *Musca* (McCommas et Shornick, 1990), montrant que ces adaptations de l'amylase paraissent être des phénomènes espèce-dépendant. Chez la crevette blanche, *Penaeus vannamei*, des augmentations du niveau de caséine alimentaire ou du rapport caséine sur amidon conduisait à la perte d'expression d'une des deux isoformes de l'amylase (Le Moullac *et al.*, 1996).

Pour compléter cette étude portant sur le fonctionnement du système amylase, il est question de tester la qualité trophique. Pour cela, 2 types d'expérimentations peuvent être envisagés. Il s'agit soit de compléter une algue par de l'amidon soit de changer la composition d'un mélange algal en faisant varier l'apport d'une algue contenant de l'amidon (*Rhodomonas salina*). Compte tenu des difficultés à cultiver *R. salina* et que des variations du niveau des protéines alimentaires (Le Moullac *et al.*, 1996) peuvent être aussi à l'origine des variations d'activité amylase, nous avons choisi de tester la qualité trophique via la

supplémentation d'amidon. Les analyses vont porter sur les niveaux d'ARNm de chaque gène amylase, l'activité amylase spécifique totale résultante, le K_M du mélange des amylases, l'isoélectrofocalisation et sur l'indice de chair afin de voir si des variations de la qualité trophique génèrent une variation de ces paramètres.

2. Matériels et Méthodes

Les huîtres de cette étude proviennent de la même population que celle qui a été utilisée pour l'expérimentation « quantité trophique/température ».

Après une mise en stabulation à l'Aber-Wrach (Finistère, France) durant le mois d'octobre 2003, les huîtres âgées de 33 mois (poids total moyen = $98,3 \pm 6,2$ g) ont ensuite été réparties dans 5 bacs de 300 L, à raison de 79 huîtres par bac, à la station Ifremer d'Argenton (Finistère, France), en novembre 2003. La population expérimentale va alors subir 5 conditionnements différents :

- un jeûne (eau de mer filtrée à $1 \mu\text{m}$),
- un apport de *Chaetoceros gracilis* seule (40 cellules/ μL ce qui correspond à 8 % de matière sèche d'algues par gramme de chair sèche d'huîtres et par jour),
- une supplémentation d'amidon natif de blé « excelsior » (Chimiphar) à *C. gracilis*, selon 3 concentrations (1 mg/L, 5 mg/L et 10 mg/L par jour).

L'algue et l'amidon sont apportés en continu (apport permanent d'eau de mer enrichie en *C. gracilis* ou en amidon de blé) à l'aide de pompes péristaltiques. Par bac, une pompe de brassage est ajoutée au système d'air lift couramment employé afin d'éviter une sédimentation de l'amidon. La température de l'eau de mer est maintenue à 17°C . Les bacs sont reliés à un système de mesure et d'enregistrement automatique des paramètres hydrologiques (par exemple, la fluorescence) environnant les huîtres : le système Marel-Argenton (Fagon, 2002).

Le plan d'échantillonnage est le suivant : un prélèvement initial en sortie de l'Aber-Wrach (novembre 2003, T0), un prélèvement intermédiaire après 10 jours de conditionnement (T1) et un prélèvement final après 18 jours de conditionnement (T2). A chaque point de prélèvement, 30 huîtres sont prélevées, sur lesquelles on mesure :

- le poids total (P_T),
- le poids de chair (P_C).

Seul, l'indice de chair (I_C) est calculé ($I_C = [(P_C)/(P_T)] \times 100$). En effet, l'indice de glande digestive (I_{GD}) n'a pas pu être déterminé en raison d'une présence importante de glycogène

autour de cet organe qui empêchait une dissection et une mesure précise du poids de la glande digestive (P_{GD}). Néanmoins, les glandes digestives sont partiellement disséquées et immédiatement stockées dans l'azote liquide. Pour chaque conditionnement, 3 pools de 10 glandes digestives individuelles sont constitués et broyés pour les analyses biomoléculaires (quantification des transcrits des 2 gènes amylase par RT-PCR en temps réel) et biochimiques (activité spécifique et K_M de l'amylase, isoélectrofocalisation, électrophorèse sur gel d'agarose).

3. Résultats

3.1. Choix de la méthode de quantification des ARNm

Pour 1 μg d'ARN totaux extraits à partir des glandes digestives d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la qualité trophique, les coefficients de variation (CV) des cycles seuil (CT) des 2 gènes de référence sont faibles et moins élevés (CV = 2,5 et 2,8 pour le facteur d'élongation et l'actine, respectivement) que ceux des CT des 2 gènes cible (CV = 3,0 et 4,5 pour l'amylase A et l'amylase B, respectivement) (tableau 7). Par conséquent, les quantités relatives (QR) des ARNm de chaque gène amylase dans un échantillon sont normalisées par rapport au gène du facteur d'élongation (CV étant le plus faible) et relative à un échantillon de l'Aber-Benoît (le même que celui utilisé pour l'expérimentation « quantité trophique/température »). Les QR sont exprimées selon la formule suivante : $QR = 2^{-\Delta\Delta CT}$, où $\Delta CT = (CT_{\text{échantillon}} - CT_{\text{Aber-Benoît}})$ pour les 2 gènes amylase et du facteur d'élongation et $\Delta\Delta CT = (CT_{\text{amylase}} - CT_{\text{facteur d'élongation}})$.

Tableau 7. Moyennes, erreurs standard (ES) et coefficients de variation (CV) des cycles seuil (CT) des gènes amylase A, amylase B, facteur d'élongation et actine à partir d'1 µg d'ARN totaux présents dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la qualité trophique (n = 3). En gras sont précisées les valeurs calculées pour l'ensemble des conditionnements.

Gène	Traitement	Moyenne	ES	CV	
Amylase A	jeûne (T ₁)	20,1	0,1	1,0	
	<i>C. gracilis</i> (T ₁)	20,9	0,2	1,9	
	<i>C. gracilis</i> + 1 mg/L d'amidon (T ₁)	20,2	0,2	1,8	
	<i>C. gracilis</i> + 5 mg/L d'amidon (T ₁)	21,0	0,3	2,2	
	<i>C. gracilis</i> + 10 mg/L d'amidon (T ₁)	20,0	0,1	1,3	
	jeûne (T ₂)	20,4	0,3	2,3	
	<i>C. gracilis</i> (T ₂)	20,5	0,2	2,0	
	<i>C. gracilis</i> + 1 mg/L d'amidon (T ₂)	20,7	0,5	4,2	
	<i>C. gracilis</i> + 5 mg/L d'amidon (T ₂)	19,6	0,2	1,4	
	<i>C. gracilis</i> + 10 mg/L d'amidon (T ₂)	19,5	0,2	2,1	
			20,3	0,1	3,0
	Amylase B	jeûne (T ₁)	27,1	0,3	1,7
		<i>C. gracilis</i> (T ₁)	27,5	0,8	5,1
		<i>C. gracilis</i> + 1 mg/L d'amidon (T ₁)	26,8	0,7	4,5
<i>C. gracilis</i> + 5 mg/L d'amidon (T ₁)		26,8	0,5	3,0	
<i>C. gracilis</i> + 10 mg/L d'amidon (T ₁)		25,2	0,5	3,2	
jeûne (T ₂)		26,7	0,3	1,8	
<i>C. gracilis</i> (T ₂)		26,5	0,5	3,1	
<i>C. gracilis</i> + 1 mg/L d'amidon (T ₂)		26,5	0,1	0,6	
<i>C. gracilis</i> + 5 mg/L d'amidon (T ₂)		24,5	0,1	0,8	
<i>C. gracilis</i> + 10 mg/L d'amidon (T ₂)		24,9	0,2	1,2	
			26,2	0,2	4,5
Facteur d'élongation		jeûne (T ₁)	16,7	0,1	0,5
		<i>C. gracilis</i> (T ₁)	17,0	0,2	2,1
		<i>C. gracilis</i> + 1 mg/L d'amidon (T ₁)	16,7	0,1	0,9
	<i>C. gracilis</i> + 5 mg/L d'amidon (T ₁)	17,2	0,4	3,5	
	<i>C. gracilis</i> + 10 mg/L d'amidon (T ₁)	16,4	0,3	2,8	
	jeûne (T ₂)	16,7	0,1	0,6	
	<i>C. gracilis</i> (T ₂)	16,7	0,2	2,4	
	<i>C. gracilis</i> + 1 mg/L d'amidon (T ₂)	17,1	0,3	2,7	
	<i>C. gracilis</i> + 5 mg/L d'amidon (T ₂)	16,5	0,1	0,7	
	<i>C. gracilis</i> + 10 mg/L d'amidon (T ₂)	16,2	0,2	1,8	
			16,7	0,1	2,5
	Actine	jeûne (T ₁)	17,5	0,2	1,8
		<i>C. gracilis</i> (T ₁)	17,7	0,2	1,7
		<i>C. gracilis</i> + 1 mg/L d'amidon (T ₁)	17,4	0,2	1,6
<i>C. gracilis</i> + 5 mg/L d'amidon (T ₁)		17,2	0,2	2,1	
<i>C. gracilis</i> + 10 mg/L d'amidon (T ₁)		16,8	0,3	3,5	
jeûne (T ₂)		17,9	0,1	1,2	
<i>C. gracilis</i> (T ₂)		17,5	0,1	1,2	
<i>C. gracilis</i> + 1 mg/L d'amidon (T ₂)		17,5	0,2	1,9	
<i>C. gracilis</i> + 5 mg/L d'amidon (T ₂)		16,7	0,1	1,5	
<i>C. gracilis</i> + 10 mg/L d'amidon (T ₂)		16,8	0,1	0,6	
			17,3	0,1	2,8

3.2. Niveaux des transcrits des gènes amylase A et B

La qualité trophique, via la supplémentation de doses croissantes d'amidon à un régime algal, n'augmente de manière significative que les QR des transcrits amylase B après 10 jours de conditionnement (figure 30, Kruskal-Wallis, $P = 0,239$ et ANOVA, $P = 0,023$ pour les transcrits amylase A et B, respectivement) et 18 jours de conditionnement (figure 30, ANOVA, $P = 0,058$ et ANOVA, $P < 0,001$ pour les transcrits amylase A et B, respectivement).

A 18 jours de conditionnement, la plus forte valeur de QR des transcrits amylase B est obtenue pour la dose d'amidon de 5 mg/L ($2,86 \pm 0,24$) : elle est 2,8 fois plus importante que pour la dose de *C. gracilis* de 40 cellules/ μ L ($1,03 \pm 0,32$). A cette même période, les valeurs de QR des transcrits amylase B diminue de 27,7 % (non significatif) entre la dose d'amidon de 5 mg/L et la dose d'amidon de 10 mg/L ($2,07 \pm 0,27$). Toujours à 18 jours de conditionnement, le ratio des quantités des transcrits amylase A par rapport à celles des transcrits amylase B est le plus bas pour la dose d'amidon de 5 mg/L, cependant le niveau des transcrits amylase A reste en moyenne 30,7 fois plus élevé que celui de B (tableau 8).

La durée du conditionnement augmente de manière significative les QR des transcrits amylase A et B pour une dose d'amidon de 5 mg/L (figure 30, ANOVA, $P = 0,013$ et ANOVA, $P = 0,024$ pour les transcrits amylase A et B, respectivement). Cette augmentation entre 10 et 18 jours de conditionnement est de 65,4 % ($0,92 \pm 0,06$ vs $1,52 \pm 0,13$) et de 140,9 % ($1,19 \pm 0,41$ vs $2,86 \pm 0,24$) pour les QR des transcrits amylase A et B, respectivement.

Tableau 8. Ratio des quantités des transcrits du gène amylase A par rapport à celles des transcrits du gène amylase B dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la qualité trophique (moyenne \pm ES (n = 3)). Avec le régime alimentaire (*C. gracilis* \pm 5 mg/L d'amidon), l'astérisque indique une différence significative entre 10 et 18 jours de conditionnement (test LSD, $P < 0,05$).

Conditionnement	Amylase A/Amylase B
jeûne (T ₁)	134,1 \pm 35,9
<i>C. gracilis</i> (T ₁)	113,2 \pm 44,3
<i>C. gracilis</i> + 1 mg/L d'amidon (T ₁)	131,3 \pm 60,4
<i>C. gracilis</i> + 5 mg/L d'amidon (T ₁)	57,0 \pm 8,7
<i>C. gracilis</i> + 10 mg/L d'amidon (T ₁)	38,5 \pm 9,3
jeûne (T ₂)	84,1 \pm 13,1
<i>C. gracilis</i> (T ₂)	73,1 \pm 30,7
<i>C. gracilis</i> + 1 mg/L d'amidon (T ₂)	59,2 \pm 16,4
<i>C. gracilis</i> + 5 mg/L d'amidon (T ₂)	30,7 \pm 2,9*
<i>C. gracilis</i> + 10 mg/L d'amidon (T ₂)	40,9 \pm 3,3

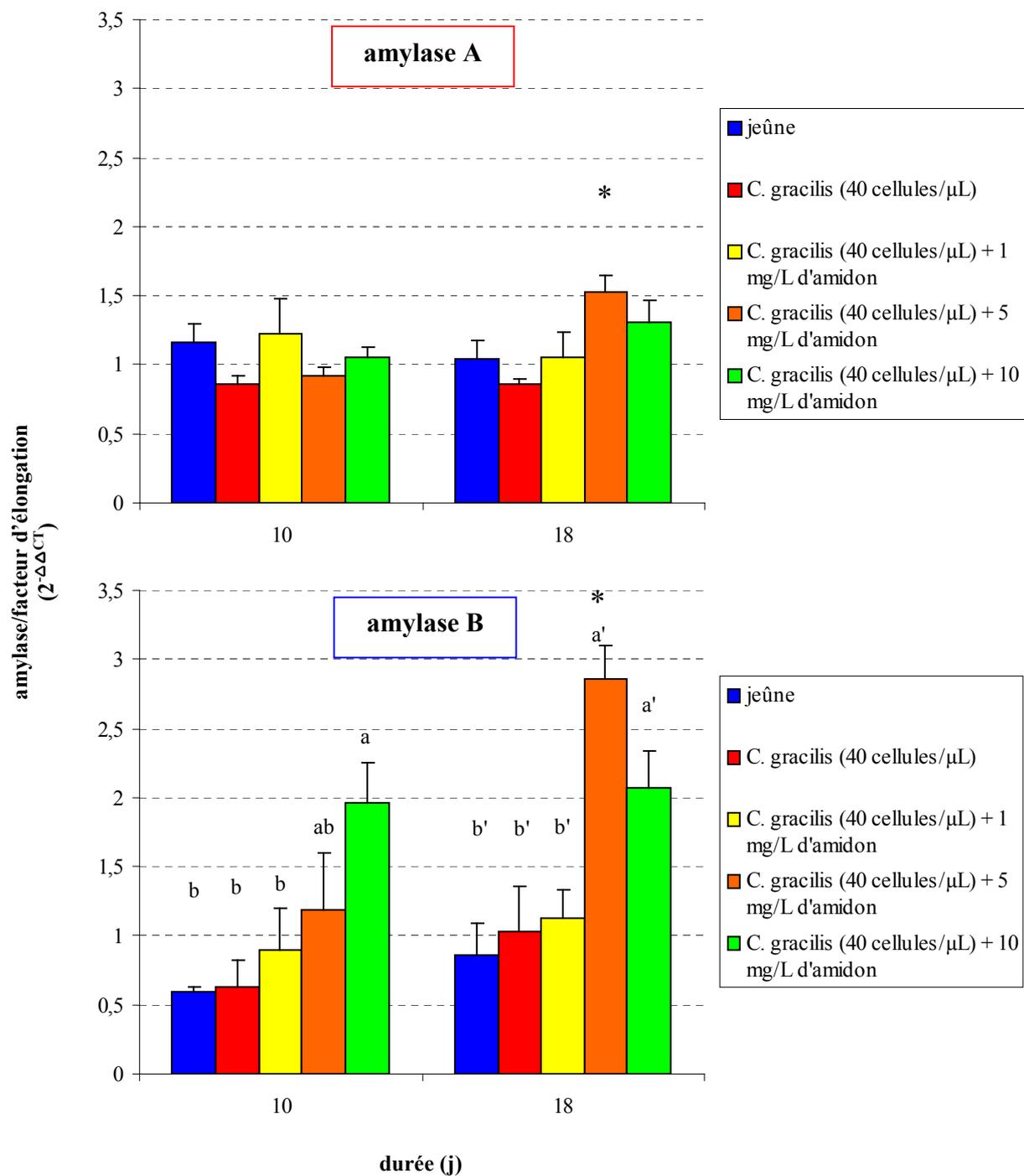


Figure 30. Niveaux des transcrits des gènes amylase A (en haut) et amylase B (en bas) présents dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la qualité trophique. Ces quantités (moyennes \pm ES (n = 3)) sont normalisées par rapport au gène du facteur d'élongation et sont relatives par rapport à un contrôle (pool Aber-Benoît). A 10 ou 18 jours de conditionnement, les moyennes affectées de lettres différentes sont significativement différentes (test LSD, $P < 0,05$). Avec le régime alimentaire (*C. gracilis* \pm 5 mg/L d'amidon), l'astérisque indique une différence significative entre 10 et 18 jours de conditionnement (test LSD, $P < 0,05$).

3.3. Activité amylase spécifique

La qualité trophique diminue de manière significative l'activité amylase spécifique après 10 jours de conditionnement (figure 31, Kruskal-Wallis, $P = 0,015$) et 18 jours de conditionnement (figure 31, ANOVA, $P \ll 0,001$). Cette diminution entre la dose de *C. gracilis* de 40 cellules/ μL et la dose d'amidon de 5 mg/L est légèrement moins forte à 10 jours de conditionnement (73,3 %) qu'à 18 jours de conditionnement (77 %) : les valeurs d'activité s'étendent de $1,86 \pm 0,16$ à $0,50 \pm 0,02$ UI/mg de protéines hydrosolubles et de $2,27 \pm 0,08$ à $0,52 \pm 0,05$ UI/mg de protéines hydrosolubles pour 10 et 18 jours de conditionnement, respectivement.

A 10 jours de conditionnement, l'activité à jeun est 27,3 % (non significatif) supérieure à l'activité sur le régime *C. gracilis* de 40 cellules/ μL ($2,37 \pm 0,19$ UI/mg et $1,86 \pm 0,16$ UI/mg, respectivement) alors qu'à 18 jours de conditionnement, elle est 18,2 % inférieure ($1,92 \pm 0,10$ UI/mg et $2,27 \pm 0,08$ UI/mg, respectivement).

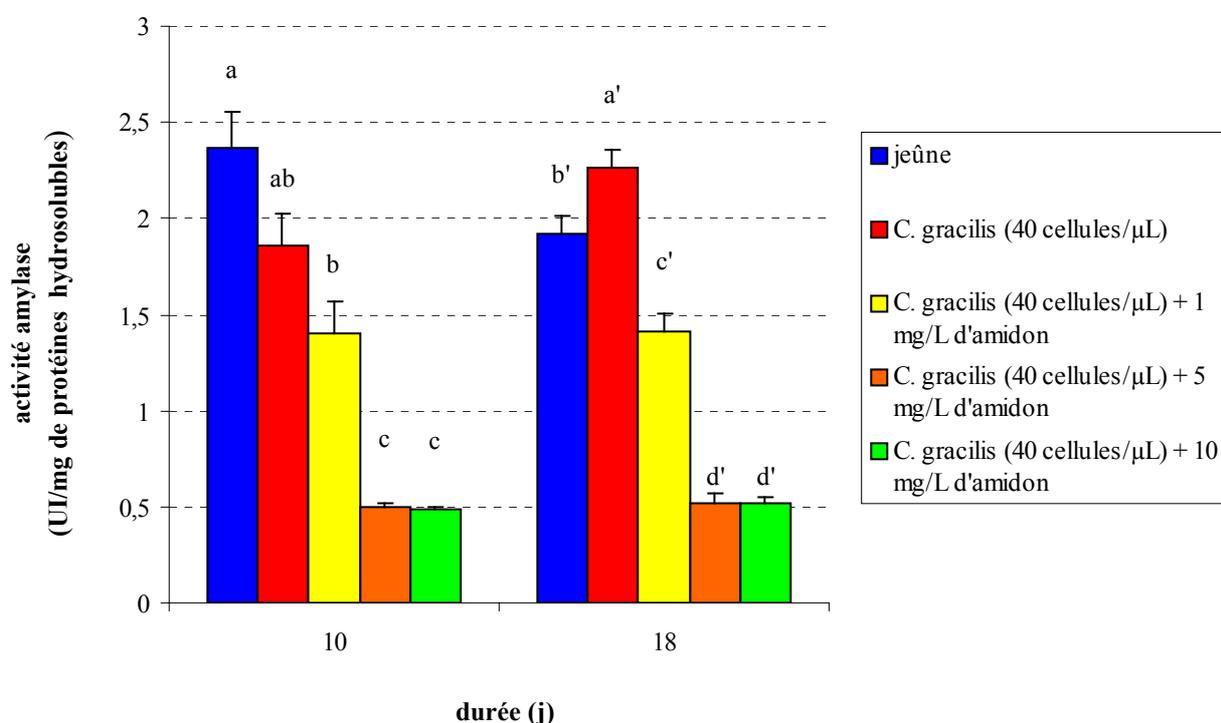


Figure 31. Niveaux d'activité amylase spécifique (moyenne \pm ES ($n = 3$)) présente dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la qualité trophique. A 10 ou 18 jours de conditionnement, les moyennes affectées de lettres différentes sont significativement différentes (test de comparaison des médianes ou test LSD, $P < 0,05$).

3.4. Sur les bandes d'IEF

A la différence de l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'IEF permet de mieux visualiser les différences d'intensité entre les bandes. C'est pourquoi, seuls les résultats obtenus à partir de l'IEF sont présentés ci-dessous.

Sur un gel de polyacrylamide présentant un gradient de pH de 5 à 8 de l'anode vers la cathode, la révélation d'activité montre 5 à 6 bandes (figure 32). 3 d'entre elles sont majoritaires et sont désignées I1, I2 et I3 en allant de la cathode vers l'anode. Elles ont des pI et des intensités différentes. Pour I1 et I2, leurs pI sont légèrement supérieurs à 7 et le pI de I1 est plus élevé que celui de I2. Pour I3, son pI est compris entre 6 et 6,5.

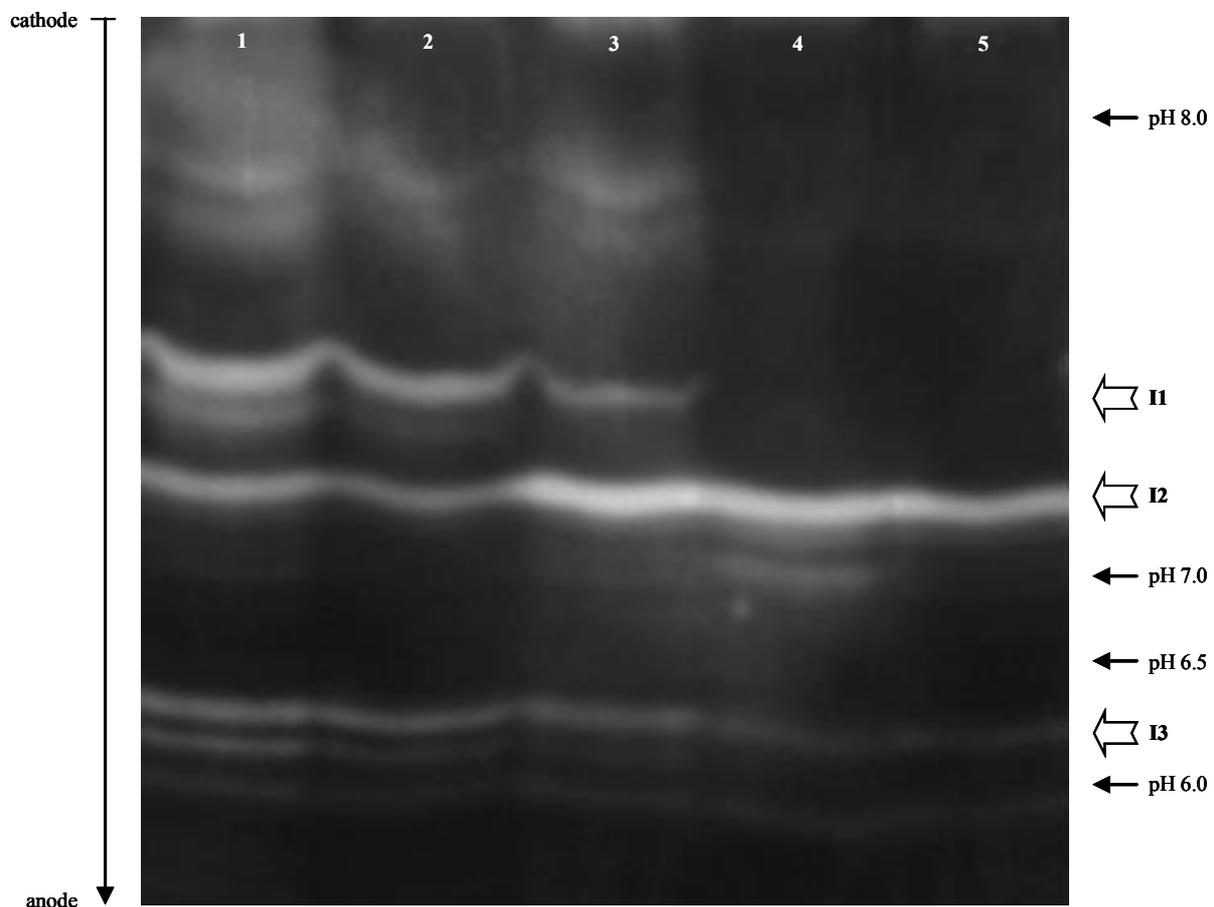


Figure 32. Analyse par isoélectrofocalisation (IEF) d'extraits bruts de glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la qualité trophique après 10 jours de conditionnement. Par puits, 100 µg de protéines hydrosolubles sont déposées. Les lignes 1, 2, 3, 4 et 5 correspondent aux extraits préparés à partir d'huîtres à jeun, nourries avec *C. gracilis* seule (40 cellules/µL) et supplémentée avec 1, 5, 10 mg/L d'amidon. Révélation des activités amylase en présence d'amidon et après une coloration au lugol. Trois bandes majoritaires sont détectées en IEF et sont désignées par I1, I2 et I3.

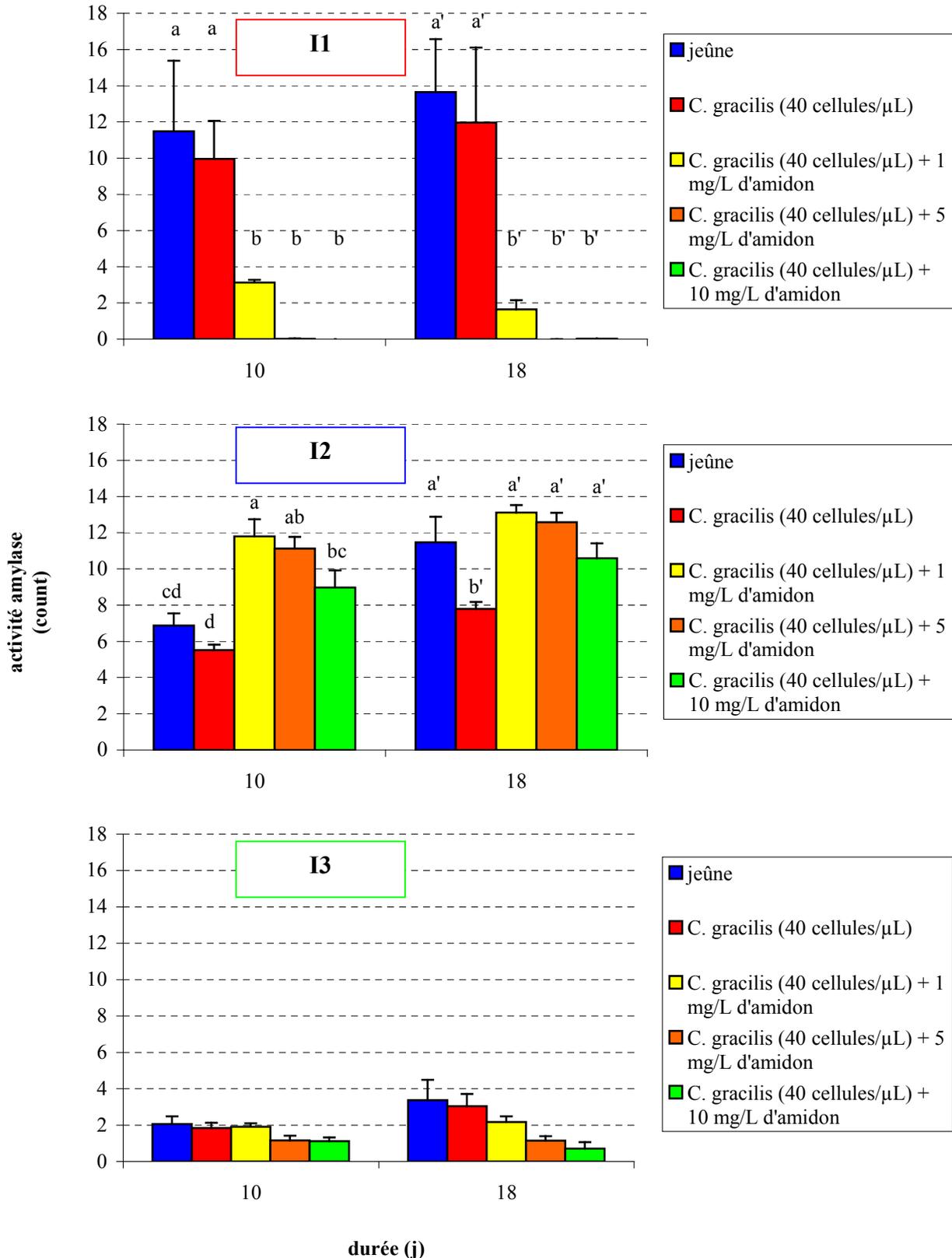


Figure 33. Niveaux des activités amylase des bandes I1 (en haut), I2 (au milieu) et I3 (en bas) détectées en IEF (moyenne \pm ES (n = 3)) et présentes dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la qualité trophique. A 10 ou 18 jours de conditionnement, les moyennes affectées de lettres différentes sont significativement différentes (test de comparaison des médianes ou test LSD, $P < 0,05$).

La qualité trophique diminue de manière significative l'activité de la bande I1 après 10 jours de conditionnement (figure 33, test de Kruskal-Wallis, $P = 0,013$) et 18 jours de conditionnement (figure 33, test de Kruskal-Wallis, $P = 0,013$). La qualité trophique augmente de manière significative l'activité de la bande I2 après 10 jours de conditionnement (figure 33, ANOVA, $P < 0,001$) et 18 jours de conditionnement (figure 33, ANOVA, $P < 0,001$) : on remarque que cette activité tend à diminuer avec des doses de plus en plus fortes d'amidon. Aucune différence significative entre les différentes conditions nutritives n'est observée sur l'activité de la bande I3 après 10 jours de conditionnement (figure 33, ANOVA, $P = 0,110$) et 18 jours de conditionnement (figure 33, ANOVA, $P = 0,053$).

3.5. K_M de l'amylase

La qualité trophique augmente de manière significative le K_M après 10 jours de conditionnement (figure 34, ANOVA, $P < 0,001$) et 18 jours de conditionnement (figure 34, Kruskal-Wallis, $P = 0,023$). Cette augmentation entre la dose de *C. gracilis* de 40 cellules/ μL et la dose d'amidon de 5 mg/L est plus forte à 10 jours de conditionnement (101,9 %) qu'à 18 jours de conditionnement (55,3 %) : les valeurs de K_M s'étendent de $0,37 \pm 0,01$ à $0,75 \pm 0,06$ mg/mL et de $0,42 \pm 0,03$ à $0,65 \pm 0,08$ mg/mL pour 10 et 18 jours de conditionnement, respectivement.

A 18 jours de conditionnement, le K_M augmente de 39,0 % entre la dose de *C. gracilis* de 40 cellules/ μL ($0,42 \pm 0,03$ mg/mL) et le jeûne ($0,59 \pm 0,02$ mg/mL).

La durée du conditionnement augmente de manière significative le K_M pour le jeûne (figure 34, ANOVA, $P = 0,002$). Cette augmentation entre 10 et 18 jours de conditionnement est de 78,4 % ($0,33 \pm 0,03$ vs $0,59 \pm 0,02$ mg/mL).

3.6. Indice de chair

Les indices de chair (I_C) pour la dose de *C. gracilis* de 40 cellules/ μL et les doses d'amidon de 1 mg/L et 5 mg/L sont similaires et plus forts que ceux de la dose de 10 mg/L après 10 jours de conditionnement (figure 35, test de Kruskal-Wallis, $P \ll 0,001$) et 18 jours de conditionnement (figure 35, ANOVA, $P = 0,002$). Cette diminution entre la dose de

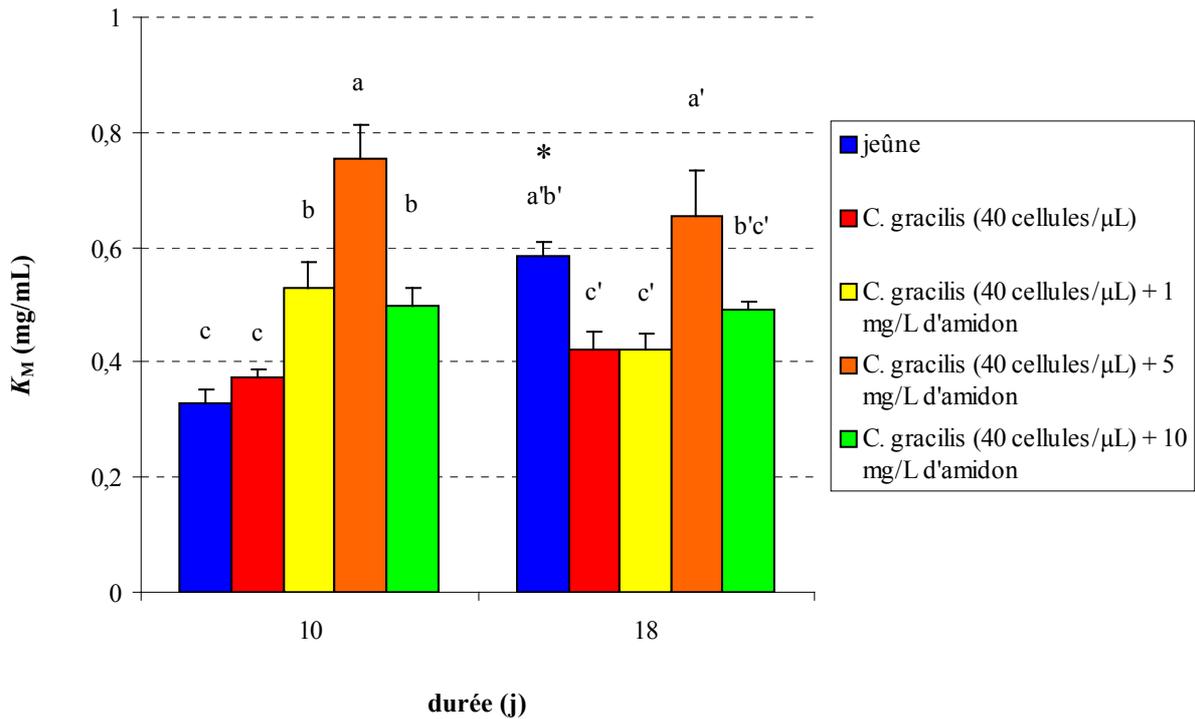


Figure 34. Niveaux du K_M de l'amylase (moyenne \pm ES (n + 3)) présente dans la glande digestive d'adultes *C. gigas* soumis à des variations de la qualité trophique. A 10 ou 18 jours de conditionnement, les moyennes affectées de lettres différentes sont significativement différentes (test de comparaison des médianes ou test LSD, $P < 0,05$). Avec le jeûne, l'astérisque indique une différence significative entre 10 et 18 jours de conditionnement (test LSD, $P < 0,05$).

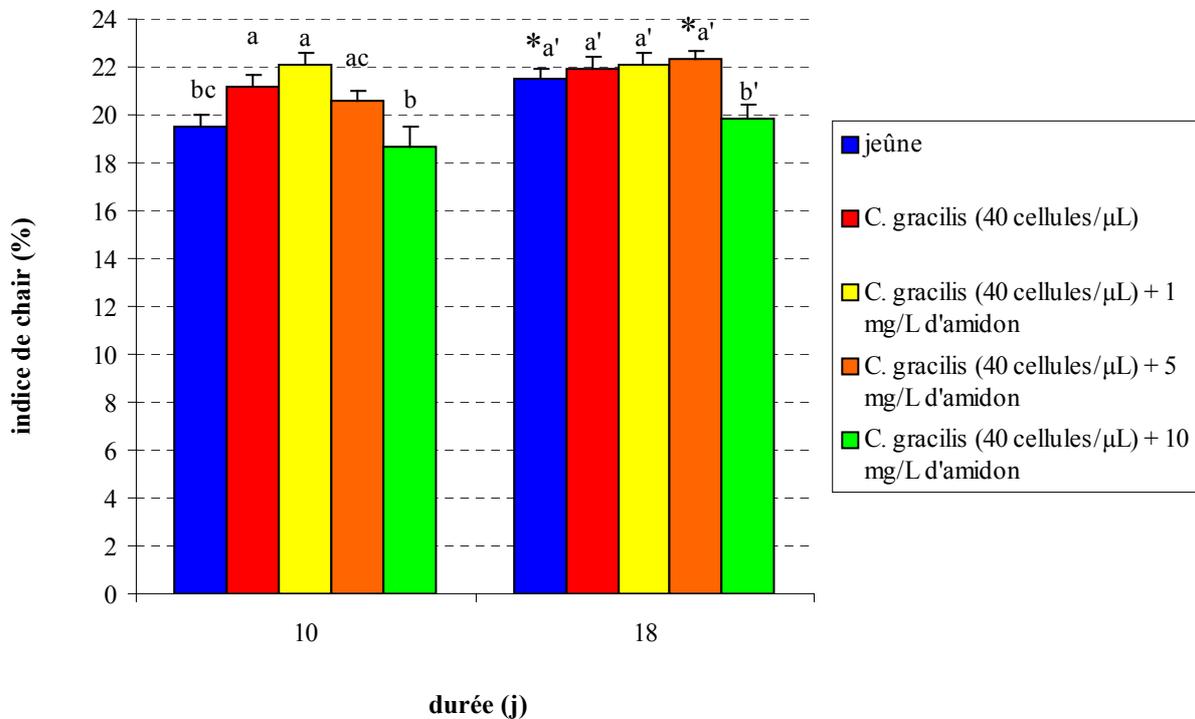


Figure 35. Indice de chair (moyenne \pm ES (n = 3)) chez des adultes *C. gigas* soumis à des variations de la qualité trophique. A 10 ou 18 jours de conditionnement, les moyennes affectées de lettres différentes sont significativement différentes (test de comparaison des médianes ou test LSD, $P < 0,05$). Avec le jeûne et le régime alimentaire (*C. gracilis* \pm 5 mg/L d'amidon), l'astérisque indique une différence significative entre 10 et 18 jours de conditionnement (test LSD, $P < 0,05$).

C. gracilis de 40 cellules/ μ L et la dose d'amidon de 10 mg/L est légèrement plus forte à 10 jours de conditionnement (11,8 %) qu'à 18 jours de conditionnement (9,6 %) : les valeurs de I_C s'étendent de $21,2 \pm 0,5$ à $18,7 \pm 0,8$ % et de $21,9 \pm 0,5$ % à $19,8 \pm 0,6$ % pour 10 et 18 jours de conditionnement, respectivement.

L' I_C du jeûne est plus faible que celui de la dose de *C. gracilis* de 40 cellules/ μ L et ceux des doses d'amidon de 1 mg/L et 5 mg/L, et il est comparable à celui de la dose de 10 mg/L après 10 jours de conditionnement (figure 35). Par contre, à 18 jours de conditionnement, les I_C du jeûne, de la dose de *C. gracilis* de 40 cellules/ μ L et des doses d'amidon de 1 mg/L et 5 mg/L sont au même niveau.

Les données de concentrations phytoplanctoniques, mesurées par fluorimétrie et enregistrées par l'automate Marel-Argenton, semblent constantes avec *C. gracilis* supplémentée en amidon (1, 5 et 10 mg/L d'amidon) ou avec *C. gracilis* seule (40 cellules/ μ L), suggérant une consommation régulière des algues plus ou moins supplémentées en amidon.

4. Discussion

4.1. Les fortes concentrations d'amidon agissent sur l'expression du gène amylase B

La qualité trophique, via la supplémentation de doses croissantes (1 à 10 mg/L) d'amidon à une diatomée, ne génère aucune variation du niveau d'ARNm du gène amylase A comme ce fut déjà le cas avec la quantité trophique (dans la gamme 4 % à 12 % de mélange algal). En revanche, le niveau d'ARNm du gène amylase B augmente avec la qualité trophique.

Une augmentation du niveau d'ARNm du gène amylase B en réponse à un régime riche en amidon a déjà été observée chez les espèces monogastriques (Brannon, 1990). L'expression des gènes amylase chez l'huître et chez les espèces monogastriques semble être régulée au niveau transcriptionnel. Chez l'huître, la transcription du gène amylase B serait activée en présence de grandes quantités d'amidon et elle serait responsable d'une adaptation à fort substrat pour l'huître. A l'inverse, la transcription du gène amylase A ne serait activée qu'en présence de petites quantités de substrat (Huvet *et al.*, 2003) et elle serait responsable d'une adaptation à faible substrat pour l'huître.

4.2. Les fortes concentrations d'amidon induisent une augmentation du K_M du mélange des amylases totales

L'augmentation d'amidon se traduit par une augmentation du K_M de l'activité amylase totale. La variation du K_M peut être expliquée par une proportion différente des amylases A et B entre la dose de *C. gracilis* et la dose d'amidon de 5 mg/L. L'isoélectrofocalisation des protéines amylase, montre en effet la disparition de la bande la plus haute (I1) et l'apparition de la bande I2 ; les valeurs de pI sont comprises entre 7 et 8 (avec une plus forte valeur de pI pour I1 que pour I2). Ceci correspondrait à la disparition de la protéine codée par le gène amylase A (bande I1), et à l'apparition de l'expression du gène amylase B et de la protéine amylase B (bande I2). L'augmentation du K_M indique que les amylases A et B possèdent deux K_M différents. Un petit K_M de l'ordre ou inférieur à 0,3 mg/ml correspondrait à l'amylase A, et de l'ordre ou supérieur à 0,7 mg/ml à l'amylase B. En effet, bien que ces deux enzymes catalysent la même réaction biochimique, elles peuvent présenter des valeurs de K_M différentes selon leur rôle biologique.

Deux exemples illustrent cette idée : (1) le système hexokinase/glucokinase et (2) le système malate déshydrogénase.

(1) Les hexokinases HK I à III sont rencontrées dans la plupart des tissus (Brownie et Kernohan, 2005). Elles font chacune environ 100 kDa en taille, elles ont des valeurs de K_M faibles pour le glucose et sont donc facilement saturées par ce substrat (Van Schaftingen *et al.*, 1994). Elles sont, de plus, inhibées par des concentrations physiologiques de leur produit, le glucose-6-phosphate (Colowick, 1973). Au contraire, l'HK IV, plus communément appelée glucokinase (GK), est sécrétée dans deux types cellulaires : les cellules parenchymateuses du foie et les cellules β des îlots pancréatiques (Weinhouse, 1976 ; Meglasson et Matschinsky, 1983). La GK a un grand K_M et, par conséquent, le flux glycolytique devient proportionnel à la concentration de glucose extra-cellulaire dans les cellules qui l'expriment la GK (Matschinsky, 1996 ; Iynedjian, 1993). D'autre part, elle n'est pas inhibée, par rétrocontrôle, par le glucose-6-phosphate (Postic *et al.*, 2001). C'est grâce aux caractéristiques cinétiques uniques de la GK que les hépatocytes et les cellules pancréatiques sont capables de répondre aux changements de la concentration en glucose sanguin (Matschinsky, 1990).

(2) Dans le cas de la malate déshydrogénase (MDH), deux formes majeures sont présentes chez les vertébrés et les invertébrés : soluble (sMDH) et mitochondriale (mMDH). Ces deux formes diffèrent dans leur mobilité électrophorétique (Markert et Moller, 1959), leur comportement cinétique (Kitto et Lewis, 1967), leur composition en acides aminés (Thorner

et Cooper, 1963). Chez les poissons, ces loci sMDH sont différemment exprimés en fonction de la température : le locus sMDH-A code une isoforme thermostable alors que le locus sMDH-B* code une isoforme thermolabile (Schwantes et Schwantes, 1982a,b ; De Luca *et al.*, 1983 ; Coppes *et al.*, 1987 ; Farias et Almeida-Val, 1992 ; Lin et Somero, 1995a,b ; Caraciolo *et al.*, 1996 ; Aquino-Silva *et al.*, 1997). La sMDH thermostable diffère de la forme thermolabile dans le sens où elle présente un K_M pour l'oxalo-acetate plus élevé (Bailey *et al.*, 1970 ; De Luca *et al.*, 1983 ; Lin et Somero, 1995b ; Aquino-Silva *et al.*, 2003). Selon Hochachka et Somero (1968), les enzymes montrent des valeurs de K_M minimales aux températures environnementales proches de celles rencontrées par les poissons dans leur habitat normal. Aussi, Hochachka et Somero (1973) ont proposé des stratégies généralistes sur l'adaptation biochimique employées par les organismes pour faire face aux conditions environnementales fluctuantes. Si les ajustements dans les taux d'activité enzymatique sont produits en changeant les types d'enzymes synthétisées dans le système, c'est donc la stratégie d'ordre qualitative qui est employée, conduisant à la présence d'isozymes « chaudes », présentant une forte affinité pour les substrats aux températures proches de la gamme thermique haute de l'organisme, et des isozymes « froides », proches de la gamme thermique basse de l'organisme.

4.3. Le changement de K_M implique un changement de protéine

Ce concept peut être appliqué aux observations faites pour l'amylase en fonction des concentrations de substrat. Le K_M de l'amylase qui augmente en moyenne de 77,2 %, suggère un mécanisme d'adaptation qui permet de couvrir les gammes de substrat amidon rencontrées. D'un point de vue catalyse, la seule variation de substrat fait varier la vitesse de réaction quand le substrat varie autour du K_M de l'enzyme, sans nécessité de faire varier la quantité d'enzyme. Il s'agit d'une régulation optimisée d'un point de vue énergétique (figure 36).

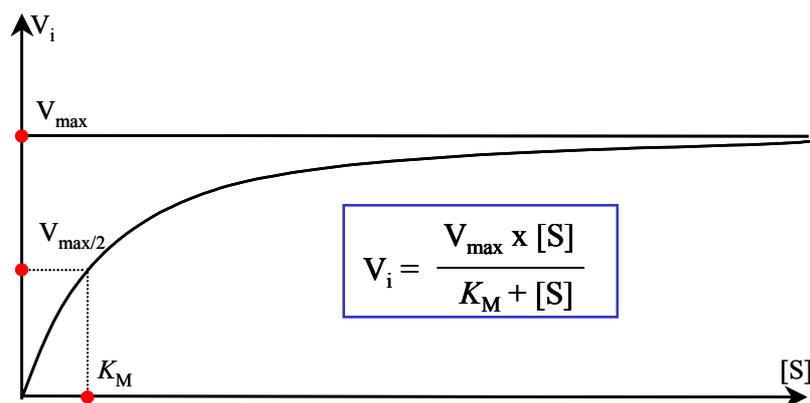


Figure 36. Equation de Michaelis-Menten reliant la vitesse initiale d'une réaction enzymatique et la concentration en substrat. La courbe $V_i = f([S])$ est une hyperbole équilatère (V_{max} : vitesse maximum, K_M : constante de Michaelis-Menten).

Lors de ce changement de protéine, on observe que l'activité amylase spécifique totale diminue en moyenne de 75,3 % entre la dose de *C. gracilis* et la dose d'amidon de 5 mg/L. Ce résultat est déjà décrit chez la crevette, la diminution de l'activité amylase en réponse à un changement du rapport amidon-caséine de l'aliment est liée à la disparition d'une isoforme amylase (Le Moullac *et al.*, 1996). Cette diminution résulterait du changement de protéine. En effet, si l'activité totale mesurée est répartie entre l'activité observée pour les bandes I1 et I2, celle de l'amylase B (bande I2), qui représentait au départ la moitié de celle de l'amylase A, double (augmentation moyenne de 81,6 %) entre la dose de *C. gracilis* et la dose d'amidon de 5 mg/L, tandis que celle de l'amylase A (bande I1) disparaît complètement. Le bilan engendre donc un déficit d'activité totale.

En général, des régimes riches en amidon conduisent à une augmentation de l'activité amylase spécifique. Cette réponse a été observée chez les mammifères (Marchis-Mouren *et al.*, 1963 ; Reboud *et al.*, 1966a,b), les poissons (Nagase, 1964 ; Jancarik 1964 ; Kawai et Ikeda, 1972), les poulets (Rodeheaver et Wyatt, 1984), les insectes du genre *Drosophila* (Hoorn et Scharloo, 1978, 1981 ; Hickey et Benkel, 1982b ; Yardley *et al.*, 1983 ; Yamazaki et Matsuo, 1984) et les crustacés (Hemambika et Raj, 1999). A l'inverse, une diminution de l'activité amylase spécifique a été montrée chez la gambusie *Gambusia affinis holbrooki* (Yardley et Wild, 1991), la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri* (Falge *et al.*, 1978 ; Spannhof et Plantikow, 1983) et le crustacé *Artemia salina* (Samain *et al.*, 1985). La réponse de la gambusie et de la truite peut être liée à leur stratégie alimentaire : ce sont deux poissons carnivores. Hidalgo *et al.* (1999) a en effet montré que l'activité amylase est moins élevée chez les poissons carnivores (la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, la dorade à tête dorée *Sparus aurata* et l'anguille européenne *Anguilla anguilla*) que chez les poissons omnivores

(la carpe commune *Cyprinus carpio*, le poisson rouge *Carassius auratus* et la tanche *Tinca tinca*). Un mécanisme d'activation et de répression de l'activité amylase par l'amidon a été suggéré chez *Artemia salina* par Samain *et al.* (1981) quand le substrat augmente plus que les besoins. Les résultats apparemment contradictoires de la littérature sont rassemblés dans un modèle d'assimilation qui montre que, pour maintenir constant un rendement d'assimilation correspondant à un niveau donné de besoins de l'animal, l'activité spécifique d'une enzyme digestive augmente ou diminue quand, à l'inverse, son substrat diminue ou augmente. Si chez l'huître *C. gigas* on retrouve bien cette diminution de l'activité globale de l'amylase quand l'amidon augmente, on montre ici que la chute de l'activité amylase en réponse à la qualité trophique ne semble pas s'expliquer par une répression générale de la synthèse des deux amylases mais, au contraire, par une diminution de la synthèse de l'amylase A, protéine de petit K_M et remplacée par l'amylase B, protéine de plus fort K_M .

4.4. Régulation de A et de B en réponse à l'augmentation de l'amidon dans le régime

Le mécanisme de régulation se décline à plusieurs niveaux : pour le gène A, le niveau d'ARNm du gène amylase A demeure constant et supérieur à celui du gène amylase B (entre 100 et 70 fois supérieur au niveau d'ARNm de B), quelle que soit la condition de la qualité trophique testée. Au delà d'un seuil, seule la protéine amylase A diminue jusqu'à disparaître quand la teneur en amidon augmente. Ceci suggère que la transcription du gène A est pratiquement constitutive dans nos conditions et que la régulation serait principalement post-transcriptionnelle et/ou traductionnelle, pour l'amylase A en réponse à un régime riche en amidon.

Pour le gène B, l'augmentation de la concentration en amidon dans le régime induit une augmentation dans le niveau d'ARNm du gène amylase B, traduisant une régulation de type transcriptionnelle. Une augmentation consécutive de la protéine peut correspondre aussi à une régulation post-transcriptionnelle. Ainsi, le gradient d'ARNm amylase B ne se répercute-t-il pas entièrement sur le gradient d'activité de la protéine amylase B : l'activité I2 atteint un plateau dès la dose minimale d'amidon testée (1 mg/L). Il pourrait s'agir d'une baisse de l'efficacité traductionnelle par la qualité trophique (par exemple résultant d'une baisse du transport nucléocytoplasmique ou stockage des ARNm du gène amylase B dans les cellules de la glande digestive en réponse à un régime riche en amidon, limitant ainsi la traduction des ARNm en protéines) comme l'avait déjà évoqué Giorgi *et al.* (1984) chez le rat. On aurait

donc une juxtaposition d'une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle pour le gène B.

Si l'on compare l'effet de la quantité à celui de la qualité, sur l'expression du gène A, Huvet *et al.* (2003) ont trouvé une très petite part de régulation transcriptionnelle de ce gène par la quantité, mais surtout une augmentation de la traduction quand la quantité de nourriture augmente. Les résultats présentés ici complètent cette observation dans une gamme supérieure de substrat et confirment que l'on observe peu d'effet sur la transcription de A quand le substrat amidon augmente fortement. Par contre, on observe une forte inhibition de sa traduction, complétant ainsi l'information sur une gamme large d'amidon. Swanson *et al.* (2000) ont suggéré que la traduction en protéine pouvait être l'une des étapes majeures dans la régulation de l'expression du gène de l'amylase chez le mouton. Chez la crevette, une diminution de l'activité amylase est observée (Le Moullac *et al.*, 1996). Cette diminution semble être due à la disparition d'une isoforme amylase. La disparition d'un ARNm amylase est aussi montrée suggérant que la régulation de l'amylase pouvait s'exercer au niveau transcriptionnel. Pour l'huître, le rapprochement des deux résultats observés en régime algal et en régime supplémenté en amidon, fait apparaître une courbe en cloche dont le maximum serait obtenu à de petites concentrations ou quantités d'amidon. L'amylase produite a alors un petit K_M , qui serait bien adapté à cette condition. Par contre, l'augmentation de la teneur en amidon, se traduit par une induction de l'expression et de la traduction du gène B, qui paraît ainsi prendre le relais, pendant la disparition de l'amylase A. La protéine ayant alors un plus grand K_M est mieux adaptée à ces nouvelles conditions.

Cette différence de régulation exercée par l'amidon sur les gènes A et B peut s'expliquer par des différences au niveau des séquences régulatrices de ces deux gènes, en particulier au niveau du promoteur. Les régions promotrices de ces deux gènes ont été caractérisées (Sellos *et al.*, 2003) et le gène B semble le seul à présenter des séquences régulatrices (séquences cis) au niveau de son promoteur. Le promoteur du gène B est constitué d'une séquence TATAA (boîte TATA ou *TATA box*) et d'une séquence CCAAT (boîte CAAT ou *CAAT box*), distantes de 61 et 100 paires de bases du site d'initiation de la transcription, respectivement. Aussi, d'autres séquences cis sont qualifiées d'éléments de réponse aux glucose et des sites de liaison du facteur de transcription AP1. Le premier niveau de contrôle de l'expression du gène B par la qualité trophique porte sur sa transcription et ce contrôle peut être médié par la fixation du glucose, produit de la réaction d'hydrolyse de l'amidon. L'absence de séquences régulatrices du gène A pourrait expliquer son expression

plutôt constitutive, la régulation de la traduction se situant à un autre niveau au cours des mécanismes post-transcriptionnels.

Les ARNm du gène A sont 100 fois plus nombreux que ceux de B, alors que l'activité ne diffère que d'un facteur 2 entre A et B quand le régime est pauvre en amidon. En présence d'amidon à 5 mg/L, le nombre de messagers de B augmente 30 fois et l'activité de l'amylase B double quand celle de A devient nulle. Les messagers de B apparaissent donc traduits avec une plus grande efficacité que ceux de A. Il faudrait étudier s'il existe une différence de stabilité des messagers de ces deux gènes. Cette différence confère au gène B un poids pratiquement similaire à celui de A malgré la différence d'expression.

4.5. Adaptation des amylases, nutrition et croissance

Dans les conditions de l'expérience, on observe que les huîtres gagnent un poids similaire à 10 et 18 jours d'élevage pour les conditions *C. gracilis*, ainsi que pour ce régime complété à 1 et 5 mg/L d'amidon. Dans ce cas, la compensation enzymatique ne fait pas apparaître de différence de performance. Par contre, elles ne grossissent pas ou même maigrissent à 10 mg/L d'amidon. Deux explications paraissent possibles : soit la dose d'amidon apportée est supérieure au seuil de production de pseudo-fèces et génère une baisse de l'ingestion des algues, soit la baisse d'activité amylase due au fort niveau d'amidon entraîne une baisse d'assimilation si l'ingestion reste constante. Dans les deux cas, la croissance pourrait diminuer. Nous n'avons pas assez d'éléments pour conforter ces interprétations.

Par ailleurs, les animaux à jeun les dix premiers jours sont significativement plus maigres que les animaux nourris sur les trois premiers régimes. Par rapport à des huîtres *C. gigas* nourries avec *C. gracilis*, leur activité amylase totale tend à augmenter après 10 jours de jeûne, puis elle diminue après 18 jours de jeûne. Une augmentation immédiate mais transitoire de l'activité amylase a également été observée chez *Artemia salina* quand des individus bien nourris étaient transférés dans des conditions de jeûne. Une diminution de cette activité est ensuite normalement constatée après plusieurs heures de jeûne (Samain *et al.*, 1985). Ceci illustre un mécanisme de compensation transitoire. En effet, quand la nourriture devient limitante, le taux d'ingestion baisse et, pour compenser cette perte d'ingestion, l'activité des enzymes digestives (par exemple, l'amylase) augmente pour maintenir un taux d'assimilation constant, permettant ainsi de satisfaire les besoins métaboliques de l'animal. Ensuite, l'activité des enzymes digestives finit par diminuer du fait de l'absence à long terme de

substrat. On peut penser que pendant les 10 premiers jours le taux d'ingestion était très faible, induisant cette forte activité de l'amylase.

Par contre, entre 10 et 18 jours, la croissance des animaux à jeun a rattrapé celle des animaux nourris. Le niveau des transcrits du gène amylase B, même s'il a baissé un peu plus que le témoin nourri, en reste proche. Le fait le plus surprenant est l'augmentation du K_M qui aurait dû baisser avec la diminution du substrat. Or il augmente en même temps que les huîtres grossissent. Cette prise de poids et une telle augmentation de K_M doit signifier que les huîtres consomment des particules riches en amidon. Ces huîtres considérées comme à jeun (*i.e.*, placées dans une eau de mer filtrée à 1 μm) auraient en fait ingéré du picoplancton riche en amidon. Plusieurs études ont démontré l'importance des eucaryotes picoplanctoniques (taille cellulaire comprise entre 0,2 et 3 μm) en termes de biomasse et de productivité dans la zone euphotique des eaux oligotrophes océaniques (Li, 1994) et dans les eaux côtières (Joint *et al.*, 1986). Les prasinophycées, les prymnésiofycées (2 classes d'algues contenant de l'amidon ; Samain *et al.*, 1985) et les pélagophycées sont les composants majeurs de la biomasse picoplanctonique dans différents systèmes marins (Moon-van der Staay *et al.*, 2000 ; Thomsen et Buck, 1998). Dans l'étang de Thau en été, période durant laquelle les meilleurs taux de croissance sont observés pour l'espèce *C. gigas* (Le Bec et Mazurie, 1992), la production de picophytoplancton, et principalement d'*O. tauri*, est largement responsable de la forte augmentation du rapport production primaire/biomasse (P/B ; Courties *et al.*, 1994). Cette algue unicellulaire présentant un très large granule d'amidon (Courties *et al.*, 1998 ; Ral *et al.*, 2004), il est donc possible que l'amylase digérant son substrat ait un rôle non négligeable dans la croissance de *C. gigas*. Il aura peut être fallu dix jours pour qu'une poussée de ce type de phytoplancton apparaisse, à moins que ce délai permette à l'huître de modifier son efficacité de filtration au niveau branchial.

5. Conclusion

L'augmentation de la concentration en amidon et donc la qualité trophique régule négativement les étapes post-transcriptionnelles et/ou traductionnelles de l'expression du gène amylase A. La qualité trophique régule positivement la transcription du gène amylase B ainsi que ses étapes post-transcriptionnelles et/ou traductionnelles. Le K_M de l'amylase totale augmente aussi avec la qualité trophique. La substitution de la protéine amylase A par la protéine amylase B se traduisant par une augmentation du K_M , celui de l'amylase A serait faible alors que celui de l'amylase B serait élevé. La perte de la protéine amylase A et la

baisse d'affinité apparente de la protéine amylase B pour l'amidon expliquent la chute de l'activité amylase spécifique avec l'augmentation de la concentration en amidon. Cependant, cette baisse intervient à un moment où le niveau d'amidon ingéré augmente, ce qui tend à stabiliser le rendement d'assimilation comme le décrit le modèle de Samain *et al.* (1981).

L'ensemble de ces résultats suggère un mécanisme d'adaptation de l'équipement digestif aux conditions de substrat. La substitution d'une enzyme de petit K_M par une enzyme de fort K_M quand le substrat augmente, confère au système une grande efficacité dans le processus enzymatique, puisque la seule variation du substrat dans la zone de K_M en fait varier la vitesse d'hydrolyse. Par contre, on peut imaginer que des mutations affectant l'un ou l'autre de ces gènes, modifie de façon importante les capacités d'adaptation des huîtres, ce qui justifie l'intérêt d'étudier le polymorphisme de ces gènes et les conséquences physiologiques associées.

CHAPITRE IV

Etude *in situ* des relations polymorphisme/fonction associées aux gènes de l'amylase

CHAPITRE IV

Etude *in situ* des relations polymorphisme/fonction associées aux gènes de l'amylase

1. Introduction

De nombreuses études traitant de la non-neutralité du polymorphisme de l'amylase chez différentes espèces animales existent. Chez le poulet, le polymorphisme de l'amylase affecte la croissance et la conversion alimentaire via l'activité spécifique de l'amylase, suggérant que le choix du marqueur amylase dans un programme de sélection peut améliorer la croissance et/ou la conversion alimentaire (Hughes *et al.*, 1994). Des corrélations positives entre le génotype amylase et la préférence alimentaire ont été montrées chez les crustacés (Guarna et Borowsky, 1993) ou entre le génotype amylase et la production de l'enzyme amylase chez les drosophiles (Hickey, 1981 ; Stojiljkovic *et al.*, 1995). Jusqu'à présent, aucune relation entre les traits phénotypiques et le polymorphisme des gènes de l'amylase n'a encore été établie chez l'huître.

Pour évaluer l'hypothèse de la non-neutralité du polymorphisme de l'amylase chez l'huître et pour rechercher des relations entre ce polymorphisme et les traits phénotypiques, nous rapportons des performances de croissance et de survie chez des génotypes amylase issus de cinq familles *C. gigas* bi-parentales différentes, croisées pour être polymorphes au niveau des deux marqueurs PCR-RFLP amylase et élevées durant une année, selon des conditions standard de culture, dans deux secteurs ostréicoles français présentant des conditions trophiques différentes. Pour les génotypes montrant des différences significatives de croissance à l'intérieur d'une famille, les paramètres enzymatiques (activité spécifique et K_M de l'amylase) ont aussi été analysés. Les applications potentielles de ces marqueurs amylase dans des programmes de sélection chez l'huître sont ici discutées.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Echantillonnage des géniteurs

400 huîtres *C. gigas* ont été échantillonnées parmi trois populations : une population naturelle du bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime, France) de calibre 5, une population polymorphe sur les gènes de l'amylase, et 5 familles bi-parentales MOREST (F4-15, F7-25, F9-34, F13-51 et F18-72) âgées de 14 mois et produites à l'écloserie Ifremer de la Tremblade (Charente-Maritime, France). Les individus sont identifiés par un numéro étiqueté, collé à la colle époxy sur la coquille. Tous ces individus sont génotypés sur les deux marqueurs amylase par PCR-RFLP (Sellos *et al.*, 2003) et sont transférés à la mi-avril 2002 à l'Aber-Benoît (Finistère, France) puis à la mi-mai 2002 à l'écloserie Ifremer d'Argenton (Finistère, France) pour être placés en salle de conditionnement des géniteurs (cf. paragraphe 2.1 du chapitre matériel et méthodes).

2.2. Réalisation des familles

2.2.1. Croisement contrôlé, élevages larvaire et post-larvaire

L'écloserie expérimentale Ifremer d'Argenton (Finistère, France) dispose de 24 bacs de 30 litres en salle d'élevage larvaire. Afin de comparer les performances de croissance et de survie *in situ* d'un large panel de génotypes amylase, sept types de croisements bi-parentaux ont été réalisés en triplicat de bacs au 19 juin 2002 ; les croisements 1 et 7 ou 5 et 6 sont du même type (tableau 9).

Tableau 9. Génotype des géniteurs aux loci amylase pour la constitution des 7 familles bi-parentales.

Famille	Génotype du mâle	Génotype de la femelle
1	A1A2B1B5	A1A2B1B5
2	A1A5B2B6	A1A2B1B2
3	A2A6B1B2	A1A3B1B5
4	A1A3B1B3	A1A3B1B5
5	A1A2B1B3	A2A6B1B2
6	A2A6B1B2	A1A2B1B3
7	A1A2B1B5	A1A2B1B5

Les procédures expérimentales de croisement et d'élevages larvaire et post-larvaire sont détaillées dans les paragraphes 2.2 à 2.5 du chapitre matériel et méthodes.

2.2.2. Choix des familles

Les familles retenues pour les étapes de micronurserie, de nurserie et de suivi *in situ* sont les familles 1 à 5 en raison de leurs bonnes performances de croissance et de survie durant la phase larvaire (données non montrées).

2.2.3. Suivi *in situ* : plan d'expérience et stratégie d'échantillonnage

Après un stockage hivernal (novembre 2002 à mars 2003) à Fort-Espagnol (Morbihan, France), les huîtres *C. gigas* âgées de 9 mois et présentant une taille moyenne homogène (aucune différence significative entre les 5 familles ou entre les génotypes d'une même famille) sont placées durant une année (mars 2003 (T0) à février 2004 (T1)) dans deux sites ateliers, la baie des Veys (Calvados, France) et Fort-Espagnol. Ces deux écosystèmes diffèrent essentiellement sur les plans thermique mais aussi trophique. La baie des Veys est riche en phytoplancton alors que Fort-Espagnol l'est moins. Sur 6 mois de suivi (mars à août, année 2003), le contenu moyen en chlorophylle « a » apparaît plus élevé en baie des Veys (4,9 µg/L) qu'à Fort-Espagnol (3,3 µg/L) (Ropert et Bouget, données non publiées). Ces huîtres sont élevées selon des conditions de culture traditionnelles, *i.e.* dans des poches ostréicoles (3 poches par famille) positionnées sur des tables ostréicoles élevées à 70 cm du sol, et contenant chacune 450 individus choisis au hasard (poids total individuel = $1,78 \pm 0,05$ g et poids de chair individuel = $0,15 \pm 0,01$ g).

Le plan d'échantillonnage est le suivant : un prélèvement initial (T0, en mars 2003) et un prélèvement final après 1 an sur site (T1, février 2004). Au début et à la fin du suivi *in situ*, 150 huîtres sont collectées au hasard dans chaque famille (50 huîtres par poche) sur lesquelles on mesure :

- le poids total (P_T),
- le poids de chair (P_C).

Ces huîtres sont biopsées (prélèvement d'un fragment de manteau) pour être génotypées sur les deux gènes de l'amylase par PCR-RFLP (cf. paragraphes 3.2.2 et 4.1.3 du chapitre matériel et méthodes). Compte tenu que le génotypage par PCR-RFLP représente beaucoup de travail, seuls les ADN des familles 2, 3 et 5 de la fin du suivi *in situ*, sont extraits à partir de la biopsie (cf. paragraphe 4.1.1 du chapitre matériel et méthodes). Pour chaque génotype des familles 2 et 3, en fin de suivi à Fort-Espagnol, 3 pools de 10 glandes digestives individuelles sont constitués et broyés pour mesurer les paramètres enzymatiques (activité

spécifique et K_M) de l'amylase. La mortalité est calculée en dénombrant les huîtres mortes et vivantes à la fin du suivi *in situ*, dans chaque poche.

3. Résultats

3.1. Liaison des gènes amylase

4 génotypes principaux (fréquence > 5 %) sont observés dans l'ensemble des familles, à l'exception de la famille 1, où 3 génotypes principaux y sont représentés (tableau 10). Au T0, les fréquences observées de ces génotypes sont conformes à celles qui sont théoriquement attendues sous l'hypothèse d'une liaison des gènes amylase A et B (1/4, 1/2, 1/4 dans la famille 1 et 1/4, 1/4, 1/4, 1/4 dans les autres familles). En effet, si les gènes amylase A et B étaient indépendants, 9 génotypes seraient attendus pour la famille 1, 12 génotypes pour la famille 4 et 16 génotypes pour les 3 autres familles. De plus, les fréquences attendues sous cette hypothèse d'indépendance des gènes sont significativement différentes des fréquences observées au seuil de 1 % (test du Chi2). 2 génotypes de type recombiné (*i.e.* un gène provient d'un parent, le second provenant de l'autre parent) sont observés dans les familles 1 et 2, et 3 le sont dans la famille 5 (tableau 10). Le pourcentage de crossing-over (*i.e.* le nombre d'individus porteurs des génotypes de type recombiné par rapport au nombre total d'individus génotypés) a ainsi été calculé. Il varie de 0 % pour les familles 3 et 4 à 3,8 % pour les familles 2 et 5. Sur l'ensemble des familles génotypées, le pourcentage moyen de crossing-over est donc de 1,7 %, correspondant à une distance approximative de 1,7 cM entre les gènes amylase A et B.

3.2. Survie

La survie analysée sur les 5 familles est très élevée en Basse-Normandie, allant de $90,5 \pm 0,5$ % pour la famille 3 à $94,7 \pm 0,3$ % pour la famille 5 (tableau 11). La survie est plus faible en Bretagne-Sud où elles oscillent entre $42,7 \pm 1,9$ % pour la famille 3 et $96,7 \pm 0,3$ % pour la famille 5. En Bretagne-Sud, des différences significatives sont observées entre les familles (tableau 11, ANOVA, $P < 0,0001$). La survie des familles 1 et 5 (95 % et 96,7 %, respectivement) est significativement meilleure que celle des familles 2, 3 et 4 (74,7 %, 42,7 % et 64,3 %, respectivement).

Tableau 10. Fréquences génotypiques théoriques et observées aux loci amylase au début de l'expérimentation (T0) pour les 5 familles bi-parentales polymorphes et dans les familles 2, 3 et 5 à la fin de l'expérimentation (T1), c'est-à-dire après 1 an d'élevage, dans 2 sites ostréicoles français (Bretagne-Sud et Basse-Normandie). Les fréquences génotypiques théoriques sont données sous l'hypothèse d'une liaison des gènes A et B.

Famille	Génotypes des parents	Génotypes observés dans la descendance	Fréquences théoriques en %	Fréquences observées en % à T0 (nombre d'individus)	Fréquences observées en % à T1 en Bretagne (nombre d'individus)	Fréquences observées en % à T1 en Normandie (nombre d'individus)
1	Mère Père	A1A1B5B5	25	25,0 (44)		
		A1A2B1B5	50	47,7 (84)		
		A2A2B1B1	25	26,1 (46)		
		A1A1B1B5	0	0,6 (1)		
		A1A2B1B1	0	0,6 (1)		
2	Mère Père	A1A1B1B2	25	19,5 (26)	23,0 (34)	24,2 (36)
		A1A2B2B2	25	24,1 (32)	22,3 (33)	32,2 (48)
		A1A5B1B6	25	22,6 (30)	33,8 (50)	22,1 (33)
		A2A5B2B6	25	30,1 (40)	20,9 (31)	21,5 (32)
		A1A5B2B6	0	2,2 (3)		
		A2A5B2B2	0	1,5 (2)		
3	Mère Père	A1A2B2B5	25	26,4 (33)	28 (42)	28,0 (42)
		A1A6B1B5	25	24,8 (31)	26,7 (40)	26,0 (39)
		A2A3B1B2	25	18,4 (23)	18 (27)	23,3 (35)
		A3A6B1B1	25	30,4 (38)	27,3 (41)	22,7 (34)
4	Mère Père	A1A1B1B5	25	24,6 (33)		
		A1A3B1B1	25	27,6 (37)		
		A1A3B3B5	25	22,4 (30)		
		A3A3B1B3	25	25,4 (34)		
5	Mère Père	A1A2B2B3	25	18,6 (24)	28,85 (43)	19,3 (29)
		A2A2B1B2	25	23,2 (30)	14,1 (21)	20,7 (31)
		A1A6B1B3	25	22,5 (29)	28,85 (43)	33,3 (50)
		A2A6B1B1	25	31,8 (41)	28,2 (42)	26,7 (40)
		A1A2B1B2	0	0,8 (1)		
		A1A2B1B3	0	0,8 (1)		
		A2A2B1B1	0	2,3 (3)		

Tableau 11. Poids total, Poids de chair et taux de survie (moyenne \pm ES (n = 150)) des 5 familles d'huîtres, après 1 an d'élevage (T1), dans 2 sites ostréicoles français (Bretagne-Sud et Basse-Normandie). Les groupes homogènes (désignés par des lettres) à l'intérieur d'un site sont estimés en utilisant un test de comparaisons multiples, le test LSD ($P < 0,05$). A l'intérieur d'un site, ils sont identiques pour les poids totaux et de chair, et sont donc représentés une seule fois.

	Famille	Poids total (g)	Poids de chair (g)	Groupe homogène	Taux de survie (%)	Groupe homogène
Bretagne-Sud	F1	19,9 \pm 0,8	2,2 \pm 0,1	B	95,0 \pm 0,1	A
	F2	14,6 \pm 0,6	1,3 \pm 0,1	C	74,7 \pm 1,5	B
	F3	22,5 \pm 0,9	2,2 \pm 0,1	A	42,7 \pm 1,9	D
	F4	23,7 \pm 0,9	2,5 \pm 0,1	A	64,3 \pm 1,8	C
	F5	24,0 \pm 0,9	2,5 \pm 0,1	A	96,7 \pm 0,3	A
Basse-Normandie	F1	32,2 \pm 0,9	4,3 \pm 0,2	B	94,0 \pm 2,0	A
	F2	34,3 \pm 1,0	4,5 \pm 0,2	B	93,0 \pm 0,1	A
	F3	34,0 \pm 1,1	4,4 \pm 0,2	B	90,5 \pm 0,5	A
	F4	35,9 \pm 1,2	4,6 \pm 0,2	B	94,0 \pm 0,6	A
	F5	41,3 \pm 1,2	5,9 \pm 0,2	A	94,7 \pm 0,3	A

A l'intérieur des familles 2, 3 et 5 qui ont été analysées pour leur composition génotypique à T0 et à T1, aucune différence significative dans les fréquences génotypiques n'est observée au seuil de 5 % (test du Chi²) entre le T0 et le T1 et ceci quel que soit le site (tableau 11).

3.3. Croissance et rendement estimé

Les poids totaux et de chair mesurés sur les 5 familles en Basse-Normandie sont fortement plus élevés qu'en Bretagne-Sud (tableau 11). Concernant le poids total, les différences moyennes entre ces 2 sites sont comprises entre 11,5 g pour la famille 3 et 19,7 g pour la famille 2, soit une différence de 51,2 % et 134,6 %, respectivement.

Sur chacun des 2 sites, des différences significatives de poids total et de chair sont observées entre les familles ; leur classement par rang hiérarchique est similaire sur ces 2 sites (tableau 11, ANOVA, $P < 0,0001$). En Bretagne-Sud, la famille 2 présente les plus faibles valeurs de poids totaux et de chair ($14,6 \pm 0,6$ g et $1,3 \pm 0,1$ g, respectivement), alors que la famille 5 montre les valeurs les plus élevées (poids total = $24 \pm 0,9$ g ; poids de chair = $2,5 \pm 0,1$ g). La famille 5 affiche aussi les plus fortes valeurs de poids total ($41,3 \pm 1,2$ g) et de poids de chair ($5,9 \pm 0,2$ g) en Basse-Normandie par rapport aux 4 autres familles (poids total = $34,1 \pm 0,5$ g ; poids de chair = $4,5 \pm 0,1$ g) (tableau 10).

Des différences significatives sont observées entre les génotypes, à l'intérieur des familles 2 et 3, au niveau des poids totaux et de chair (figure 37, ANOVA, $P < 0,05$), mais aucune différence significative n'est observée entre les génotypes au sein de la famille 5 (figure 37). Dans la famille 2, en Bretagne-Sud, 3 groupes statistiques sont observés pour les poids totaux et de chair (figure 37, test LSD, $P < 0,05$) : A1A2B2B2 présente les poids les plus élevés, A1A1B1B2 et A1A5B1B6 affichent les poids les plus faibles, A2A5B2B6 montre des valeurs intermédiaires. Les différences entre les 2 génotypes extrêmes (A1A2B2B2 et A1A5B1B6) sont de 4,9 g et 0,5 g pour les poids totaux et de chair, correspondant à une différence de 39 % et 44 %, respectivement. En Basse-Normandie, un classement similaire des génotypes de la famille 2 est observé pour uniquement le poids total, à l'exception du génotype A1A5B1B6 qui montre une valeur intermédiaire en Basse-Normandie (groupé statistiquement avec A2A5B2B6) mais la valeur la plus faible en Bretagne-Sud (groupé statistiquement avec A1A1B1B2) (figure 37). La différence entre les 2

génotypes extrêmes (A1A2B2B2 et A1A1B1B2) est de 6,4 g, correspondant à une différence de 21 %.

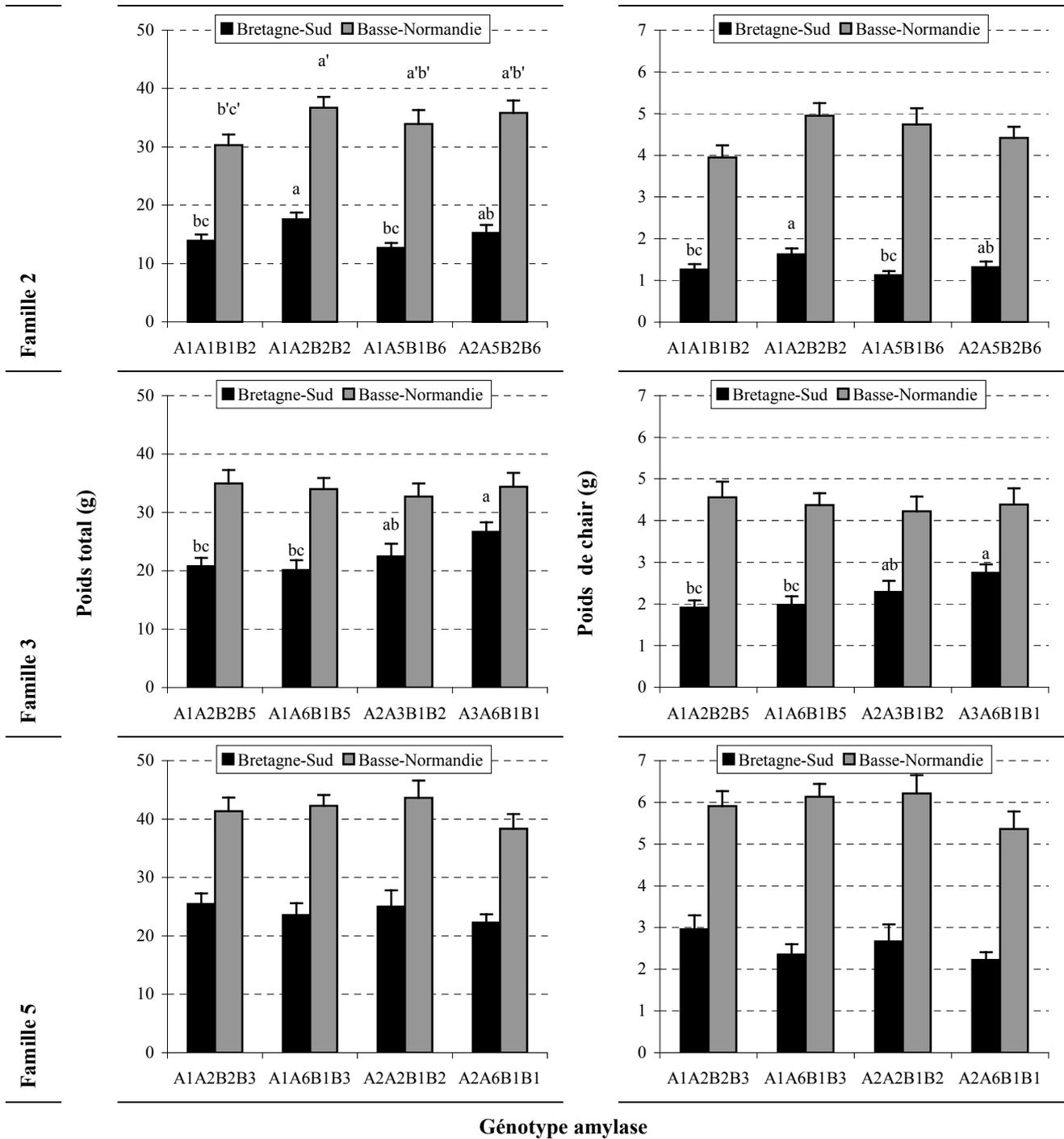


Figure 37. Poids total (à gauche) et poids de chair (à droite) des génotypes amylase dans 3 familles d’huîtres après 1 an d’élevage (T1) dans 2 sites ostrécoles français (histogrammes noirs : Fort-Espagnol en Bretagne-Sud, histogrammes gris : baie des Veys en Basse-Normandie). Les groupes homogènes (désignés par des lettres) sont estimés entre les génotypes à l’intérieur d’une famille et d’un site en utilisant un test de comparaisons multiples, le test LSD. De haut en bas : famille 2, famille 3 et famille 5.

Dans la famille 3, les poids totaux et de chair sont statistiquement similaires en Basse-Normandie alors qu'ils sont rangés en 3 groupes statistiques en Bretagne-Sud (figure 37, test LSD, $P < 0,05$) : le génotype A3A6B1B1 montre des poids totaux et de chair significativement plus forts que ceux observés pour les génotypes A1A6B1B5 et A1A2B2B5 (une différence moyenne de 30 % et 41 %, respectivement). Le génotype A2A3B1B2 montre des poids intermédiaires.

Quand des différences significatives sont observées au niveau du poids, le rendement journalier est estimé selon la méthode décrite par Dégremont *et al.* (2005). A Fort-Espagnol en Bretagne-Sud, il varie entre 3,4 % par jour pour le génotype A1A5B1B6 et 3,7 % par jour pour le génotype A1A2B2B2 à l'intérieur de la famille 2, et entre 2 % par jour pour le génotype A1A6B1B5 et 2,8 % par jour pour le génotype A3A6B1B1 dans la famille 3. Pour ce dernier génotype, le rendement journalier le plus élevé est estimé à 11,5 % en baie des Veys.

3.4. Paramètres enzymatiques

Comme les génotypes des familles 2 et 3 présentent des différences significatives au niveau des poids totaux et de chair en Bretagne-Sud, leurs paramètres enzymatiques (*i.e.* activité spécifique et K_M de l'amylase) ont été mesurés.

L'activité spécifique de l'amylase apparaît uniquement différente entre les génotypes de la famille 3 (figure 38, ANOVA, $P = 0,049$). Les valeurs s'étendent de $0,94 \pm 0,02$ à $1,38 \pm 0,13$ UI/mg de protéines hydrosolubles pour les génotypes A1A6B1B5 et A3A6B1B1 (figure 38). Elles sont comprises entre $1,17 \pm 0,01$ à $1,33 \pm 0,1$ dans la famille 2 (test de Kruskal-Wallis, $P = 0,269$). Aucune différence significative dans les valeurs de K_M de l'amylase n'est observée entre les génotypes à l'intérieur de ces 2 familles (figure 38, ANOVA, $P = 0,158$ et test de Kruskal-Wallis, $P = 0,147$ pour respectivement les familles 2 et 3) : les intervalles de confiance à 95 % sont égaux à $0,55 \pm 0,07$ mg/mL et $0,6 \pm 0,03$ mg/mL pour respectivement les familles 2 et 3.

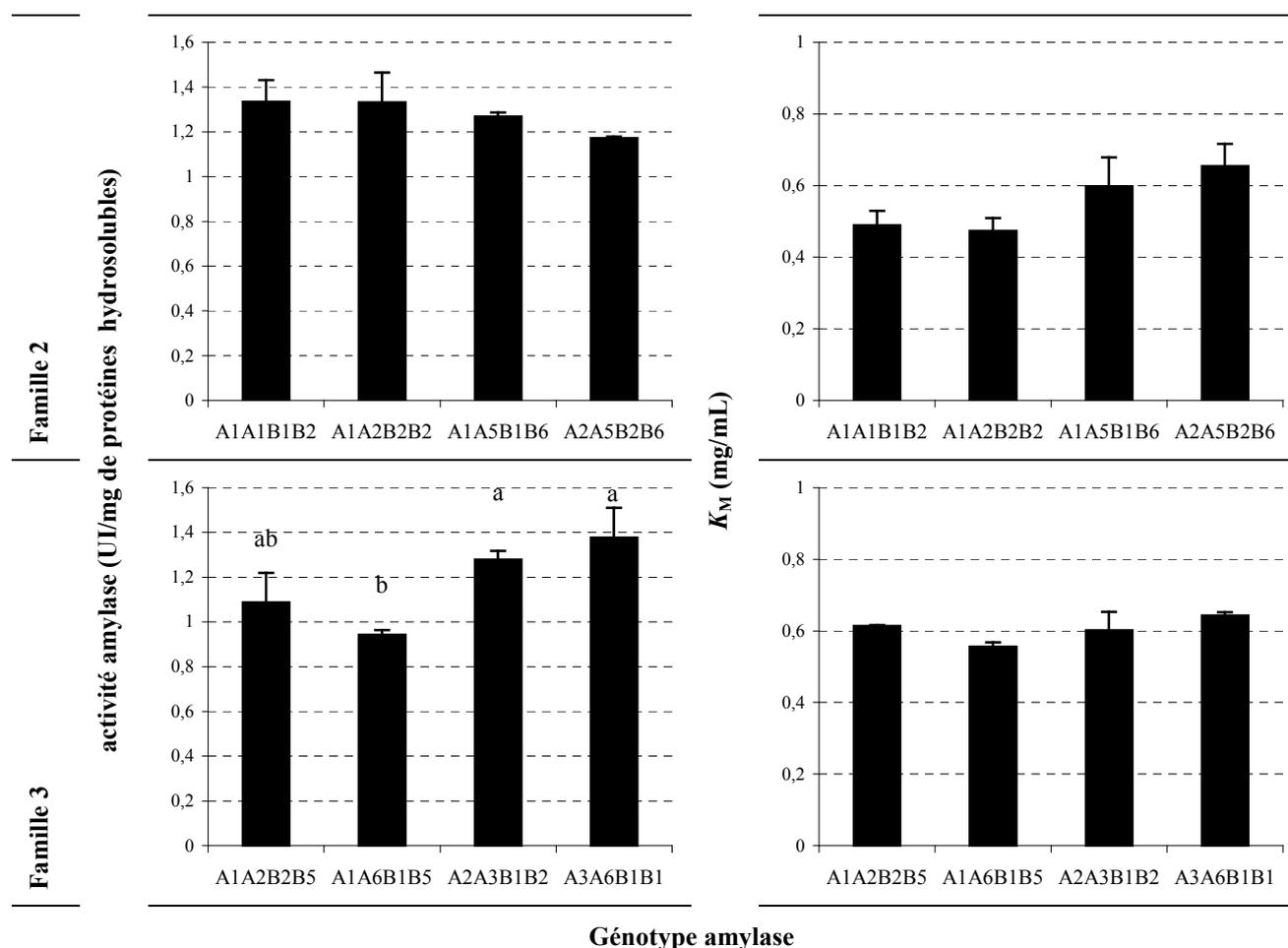


Figure 38. Activité spécifique et K_M de l'amylase (moyenne \pm ES (n = 3)) dans la glande digestive des génotypes amylase, constitutifs des familles 2 et 3, après 1 an d'élevage (T1) à Fort-Espagnol en Bretagne-Sud. Les groupes homogènes (désignés par des lettres) sont estimés entre les génotypes à l'intérieur d'une famille en utilisant un test de comparaisons multiples, le test LSD. De haut en bas : famille 2 et famille 3.

4. Discussion

4.1. Liaison des deux gènes amylase chez l'huître

Les fréquences génotypiques observées dans les familles étudiées montrent clairement que les gènes A et B ne se ségrègent pas de façon indépendante et qu'ils sont, au contraire, liés sur le même chromosome réduisant la recombinaison entre eux. Les gènes amylase sont rapportés comme étant portés par le même chromosome dans beaucoup d'organismes, *e.g.* l'homme, la souris et la drosophile (Levy *et al.*, 1985 ; Pittet et Schibler, 1985 ; Gumucio *et al.*, 1988). Un pourcentage maximum de crossing-over a pu être estimé (3,8 %) dans les familles 2 et 5 et, sur l'ensemble des 697 individus génotypés à T0, la valeur moyenne faible de crossing-over (1,7 %) suggère que les 2 gènes amylase pouvaient n'être séparés que par une courte distance (avoisinant les 1,7 cM) chez l'huître. A titre comparatif, les 2 loci

correspondant aux gènes salivaire et pancréatique d'amylase sont distants au maximum de 0,87 cM chez la souris (Bloor et Meisler, 1980).

4.2. Effet environnemental sur la survie et la croissance

Chez l'huître, des estimations de l'héritabilité de la croissance et de la survie ont été rapportées (Sheridan, 1997 ; Ernande *et al.*, 2004 ; Dégremont *et al.*, 2002, 2005), mais ces caractères sont aussi connus comme étant fortement dépendants des conditions environnementales (Héral et Deslous-Paoli, 1991 ; Mann *et al.*, 1991). Les résultats obtenus en famille vont dans ce sens bien qu'ils soient à prendre avec prudence puisque aucune de ces familles n'a été répliquée.

Les 5 familles de cette étude exhibent un taux de mortalité plus élevé à Fort-Espagnol qu'en baie des Veys et, à Fort-Espagnol, de fortes différences dans la mortalité sont observées entre les familles. Ceci suggère que 2 composantes, environnementale et génétique, affectent la survie. Toutefois, la survie ne semble pas avoir été affectée par le polymorphisme associé aux gènes de l'amylase. En effet, à l'intérieur des familles, l'analyse des fréquences génotypiques entre le début et la fin de l'expérience ne montre aucune différence, suggérant que la mortalité affecte l'ensemble des géotypes sans aucune distinction.

Des effets génétiques et environnementaux sont observés pour la croissance et ceci quel que soit le niveau de la comparaison (entre les familles ou entre les géotypes à l'intérieur d'une même famille). Des classements similaires des valeurs de poids sont vus entre les familles sur les 2 sites. Ces valeurs de poids sont toujours plus élevées en baie des Veys qu'à Fort-Espagnol. Des études portant sur les performances de croissance des huîtres ont déjà répertorié le site de la baie des Veys comme étant un site eutrophe, permettant une croissance élevée des huîtres (Enriquez-Diaz, 2004 ; Fleury *et al.*, 2003). Les principaux facteurs responsables de la variabilité de croissance entre les huîtres sont la disponibilité en nourriture et la température (Dégremont *et al.*, 2005). Pour notre expérience, les 2 sites ont été sélectionnés à cause de leur abondance nutritive annuelle différente. L'abondance nutritive devrait être considérée comme étant la principale raison pour laquelle des différences de croissance sont obtenues entre la Bretagne-Sud et la Basse-Normandie. De mars à août 2003, la teneur moyenne de la chlorophylle « a » apparaît plus forte en baie des Veys qu'à Fort-Espagnol : elle est égale en moyenne à 4,9 µg/L en baie des Veys et à 3,3 µg/L à Fort-Espagnol (Ropert et Bouget, données non publiées) ; de telles différences peuvent conduire à une consommation de nourriture et/ou à une efficacité de conversion de la nourriture plus

élevées et, donc, à une allocation d'énergie plus élevée pour les huîtres placées en baie des Veys.

4.3. Polymorphisme de l'amylase et ses relations avec la croissance et le rendement

Nos résultats montrent que les différences de croissance à l'intérieur d'une famille entre les génotypes amylase varient entre les sites et entre les familles. En effet, les génotypes amylase à l'intérieur des familles 2 et 3 montrent des différences significatives au niveau du poids, suggérant une corrélation entre le polymorphisme associé aux deux gènes de l'amylase et la croissance de l'huître. Un tel résultat indiquerait que les gènes de l'amylase ont pu être sélectionnés en raison de leur fonction digestive comme cela a été montré chez d'autres organismes (comme le poulet, Hughes *et al.*, 1994). L'hypothèse d'une non-neutralité du polymorphisme amylase chez les huîtres avait déjà été émise par Huvet *et al.* (2004) qui conclurent sur l'existence probable de processus de sélection au niveau d'un marqueur microsatellite, présent dans l'intron 4 du gène amylase A, chez une population d'huîtres portugaises.

Les différences en termes de poids entre les génotypes sont particulièrement apparentes à Fort-Espagnol en Bretagne-Sud. La croissance semble donc être plus influencée par le génotype amylase dans des conditions de faible disponibilité nutritive. Cette interaction entre le génotype et l'environnement suggère que les génotypes amylase sont mieux adaptés à certains environnements qu'à d'autres.

Comme nous l'avons observé, une grande variabilité pour le rendement a été récemment suggérée chez l'huître aux niveaux famille et site ostréicole (Langdon *et al.*, 2003). En prenant en compte les différences de poids et la similarité de survie (à l'intérieur d'une famille), le rendement journalier estimé apparaît différent entre les génotypes amylase, suggérant l'utilisation possible de ces marqueurs dans des programmes de croisement. Pour tester leur utilité dans la sélection pour la croissance, des études ultérieures seront nécessaires (*e.g.* comparaisons de lignées homozygotes) afin d'examiner si les relations entre le polymorphisme amylase et la croissance sont dues à la combinaison spécifique d'allèles au niveau des deux gènes ou d'un effet de l'hétérozygotie au niveau de chaque locus. La corrélation entre l'hétérozygotie aux allozymes et la fitness est largement discutée et admise en génétique des populations (Turelli et Ginzburg, 1983) et l'a été chez *C. gigas* entre le locus de la phosphoglucomutase-2 et la croissance (Pogson, 1991). Nos familles, croisées pour être polymorphes au niveau des 2 marqueurs amylase PCR-RFLP, étaient largement plus

hétérozygotes que des familles croisées aléatoirement. Dans les populations sauvages de *C. gigas*, les huîtres sont communément homozygotes (de 60 % à 70 %) au niveau de chaque marqueur amylase (Sellos *et al.*, 2003), un allèle étant beaucoup plus fréquent que les autres à chaque locus.

4.4. L'activité amylase spécifique peut expliquer en partie les différences de croissance observées entre les génotypes amylase

A la fin de l'expérience correspondant à la période hivernale (*i.e.* saison où la nourriture est faiblement disponible), l'activité amylase spécifique en Bretagne-Sud apparaît être légèrement affectée par le polymorphisme amylase pour la famille 3 tandis que le K_M ne l'est pas. Pour ces génotypes, les valeurs d'activité spécifique amylase sont corrélées positivement avec les valeurs des poids : A2A3B1B2 et A3A6B1B1 ont montré à la fois les poids les plus élevés et les valeurs les plus fortes d'activité amylase spécifique, A1A2B2B5 a présenté des valeurs intermédiaires et celles de A1A6B1B5 étaient plus faibles pour ces deux paramètres. Les différences de croissance observées entre les génotypes à l'intérieur de cette famille peuvent donc être partiellement expliquées par les différences d'activité amylase spécifique. Celles-ci reflètent un changement dans la quantité d'enzymes plutôt qu'un changement dans l'efficacité catalytique, comme cela a été montré chez *Drosophila melanogaster* (Hickey, 1981 ; Hickey et Benkel, 1982a) et chez le poulet (Hughes *et al.*, 1994). Des éléments régulateurs telles que les régions promotrices pourraient aussi être à l'origine des différences observées dans l'activité amylase spécifique. Effectivement, les allèles du gène amylase A codent la même séquence peptidique. 4 et 1 changements d'acides aminés sont observés à partir de la séquence amplifiée des allèles B2 et B3 par rapport à celle de B1 (Sellos *et al.*, 2003). Ces substitutions d'acides aminés entre les allèles de B ne sont pas rencontrées au niveau des 5 régions hautement conservées, et il est probable qu'elles aient peu d'influence sur l'activité enzymatique.

Pour compléter cette étude sur les relations polymorphisme amylase/fonction, les propriétés enzymatiques de l'amylase devront être explorées chez ces génotypes amylase mis en présence d'une nourriture hautement disponible, depuis que Moal *et al.* (2000) ont montré que l'activité amylase dépend de la disponibilité en nourriture.

5. Conclusion

En conclusion, nous avons observé une relation entre le polymorphisme associé aux gènes de l'amylase et la croissance chez l'huître du Pacifique *C. gigas*. (putativement exprimée par l'intermédiaire de la variation de l'activité amylase spécifique). Ceci suggère l'intérêt d'utiliser les marqueurs amylase (PCR-RFLP utilisés dans cette étude ou le microsatellite contenu dans l'intron 4 du gène amylase A) dans des programmes de sélection chez l'huître. Des recherches ultérieures portant à la fois sur les paramètres digestifs des huîtres (*i.e.* absorption, assimilation) ainsi que sur leurs niveaux d'ARN et d'activité amylase, qui dépendent de la ressource trophique (tant du point de vue quantitatif que qualitatif), devront être menées sur différents génotypes amylase afin de comprendre la relation observée entre le polymorphisme amylase et la croissance en termes de paramètres physiologiques.

Un article traitant de l'ensemble de ces résultats a été rédigé, il est actuellement soumis à la revue scientifique *Animal Genetics* (annexe 1).

DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES

Les objectifs généraux de la thèse étaient, d'une part, de comprendre les rôles des 2 gènes amylase, A et B, chez l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* en étudiant la régulation de leur expression au cours de l'ontogenèse et en fonction de 3 paramètres environnementaux (quantité et qualités trophiques, température). D'autre part, il s'agissait d'étudier les relations polymorphisme/fonction associées aux gènes amylase.

Les résultats des expérimentations portant sur l'ontogenèse, la quantité trophique, la température et la qualité trophique ont montré que ces facteurs affectent différemment les niveaux des transcrits des gènes A et B ainsi que les paramètres enzymatiques (activité, K_M) du mélange des amylases A et B chez *C. gigas*.

1. Fonctionnement et régulation du double système amylase gène-enzyme

1.1. Au cours de l'ontogenèse

Les transcrits des 2 gènes amylase sont exprimés dès le stade larvaire jusqu'au stade adulte, à des niveaux très différents : le gène A est toujours plus exprimé que le gène B. L'expression de ces 2 gènes n'est donc pas spécifique des stades précoces.

1.2. Effets de la quantité trophique

Entre 4 et 12 % de nourriture, les niveaux des transcrits des 2 gènes amylase ne varient pas et le niveau de A est 110 fois plus élevé que celui de B. Entre 0,3 % et 6 % de nourriture, une légère augmentation (18 %) du niveau des transcrits de A avait été obtenue (Huvet *et al.*, 2003). Ces résultats indiquent que la modification de la quantité trophique ne régule pas l'expression des 2 gènes amylase au niveau des ARNm dans notre gamme de concentrations nutritives hautes, par contre, elle a un effet sur le niveau d'ARNm de A dans des petites concentrations de nourriture. Entre 4 et 12 % de nourriture, l'activité amylase spécifique

augmente (50 %) comme l'avaient observé Huvet *et al.* (2003). L'importance des différences du niveau d'ARNm (du gène A) selon le niveau de nourriture disponible n'étant pas totalement comparable avec celles du niveau d'activité enzymatique, ceci suggère que la régulation de la synthèse de l'amylase A par la quantité trophique s'exerce aussi au niveau traductionnel chez *C. gigas*, comme c'est le cas chez le rat (Lhoste *et al.*, 1993) et chez le bar européen (Péres *et al.*, 1998).

1.3. Effets de la température

Entre 11 et 20°C, le niveau d'ARNm de A augmente (50 %) pour des niveaux trophiques élevés (8 % et 12 %) et l'activité amylase diminue (15 %) pour 8 % de nourriture. Par contre, cette augmentation de température est sans effet sur le niveau des transcrits de B quel que soit le niveau trophique considéré. Des travaux ultérieurs ont montré que le rendement d'assimilation décroît progressivement d'avril en juillet, *i.e.* quand la température dépasse les 19°C, et ce d'autant que la condition trophique est élevée (Pouvreau, comm. pers.). Cette baisse du rendement d'assimilation peut s'expliquer en partie par une baisse des activités spécifiques des enzymes digestives, *e.g.* l'amylase (Quéré, comm. pers.). L'activité amylase spécifique diminue durant la gamétogenèse et ce d'autant que la condition nutritive est faible.

Aucune action de la quantité trophique ou de la température n'est démontrée sur le K_M de l'amylase ou sur les bandes d'isoélectrofocalisation (d'IEF). Par contre, le passage des huîtres du milieu naturel (Aber-Benoît) vers le milieu d'écloserie (Argenton) n'est pas sans effet sur le K_M . Nos résultats rappellent à la fois ceux de Huvet *et al.* (2003) qui ont montré que la quantité d'algues disponible influençait le niveau d'activité enzymatique mais pas le K_M , et ceux obtenus par Dégremont (2000) qui a observé une variation du K_M entre des huîtres placées en milieu riche naturel et des huîtres placées en milieu pauvre d'écloserie. Les milieux naturel et d'écloserie différaient sur les plans trophiques tant du point de vue quantitatif que qualitatif, et thermique. Or, des variations du niveau trophique ou thermique ne modifient pas le K_M . Donc, ces résultats suggèrent que l'évolution du K_M entre ces deux milieux soit dépendante de la qualité trophique. Les résultats de l'expérimentation « qualité trophique » présentés ci-dessous abondent dans ce sens.

1.4. Effets de la qualité trophique

De façon dose-dépendant, l'amidon provoque une diminution de l'activité amylase spécifique et une augmentation de son K_M , suggérant une synthèse préférentielle d'amylase à faible affinité pour son substrat. Cette hypothèse est confirmée par les données d'isoélectrofocalisation et de RT-PCR en temps réel. En effet, l'amidon réprime la bande I1 alors qu'il induit la bande I2 ; il ne fait pas varier le niveau des transcrits de A mais il augmente celui de B. L'ensemble de ces résultats permet d'attribuer la bande I1 à la protéine A (amylase à faible K_M) et la bande I2 à la protéine B (amylase à fort K_M) compte tenu de la cohérence entre l'emplacement des bandes et la mesure des points isoélectriques déterminée par Sello *et al.* (2003). Une diminution de l'activité amylase, quand le niveau de caséine alimentaire ou du rapport caséine sur amidon augmentait, était obtenue chez la crevette *Penaeus vannamei* (Le Moullac *et al.*, 1996). Cette baisse semblait aussi être due à la disparition d'une des isoformes de l'amylase. La disparition d'un des ARNm amylase était aussi montrée suggérant que la régulation de l'amylase pouvait s'exercer au niveau transcriptionnel.

En conclusion, il semble y avoir un relai entre l'expression du gène A et celle du gène B en fonction de la teneur en amidon (figure 39). En effet, les résultats de l'expérience « quantité trophique » et ceux de l'expérience « qualité trophique » peuvent être reportés sur un même schéma tenant compte de la quantité d'amidon présente dans la ration. Elle est relativement faible mais croissante pour les régimes plurispécifiques (4 % à 12 %), recoupant la valeur du témoin algue de l'expérience qualité (8 %). Pour des faibles teneurs en amidon, le gène A serait principalement concerné : le niveau de transcrits de A est constant et plus élevé que celui de B, sa traduction augmente puis passe par un maximum et disparaît aux fortes quantités d'amidon. Inversement, quand la teneur en amidon augmente, le gène B interviendrait avec une augmentation de son niveau de transcrits et de sa traduction. Ce changement de protéine est marqué par un changement de K_M . La différence de niveau des messagers entre A et B et l'arrêt de la traduction pour A font baisser l'activité globale. Ce résultat ne semble pas avoir été rapporté dans la littérature à ce jour et paraît donc original. Il serait intéressant de vérifier sur une autre enzyme digestive, *e.g.* la laminarinase, s'il peut être généralisé dans le processus digestif.

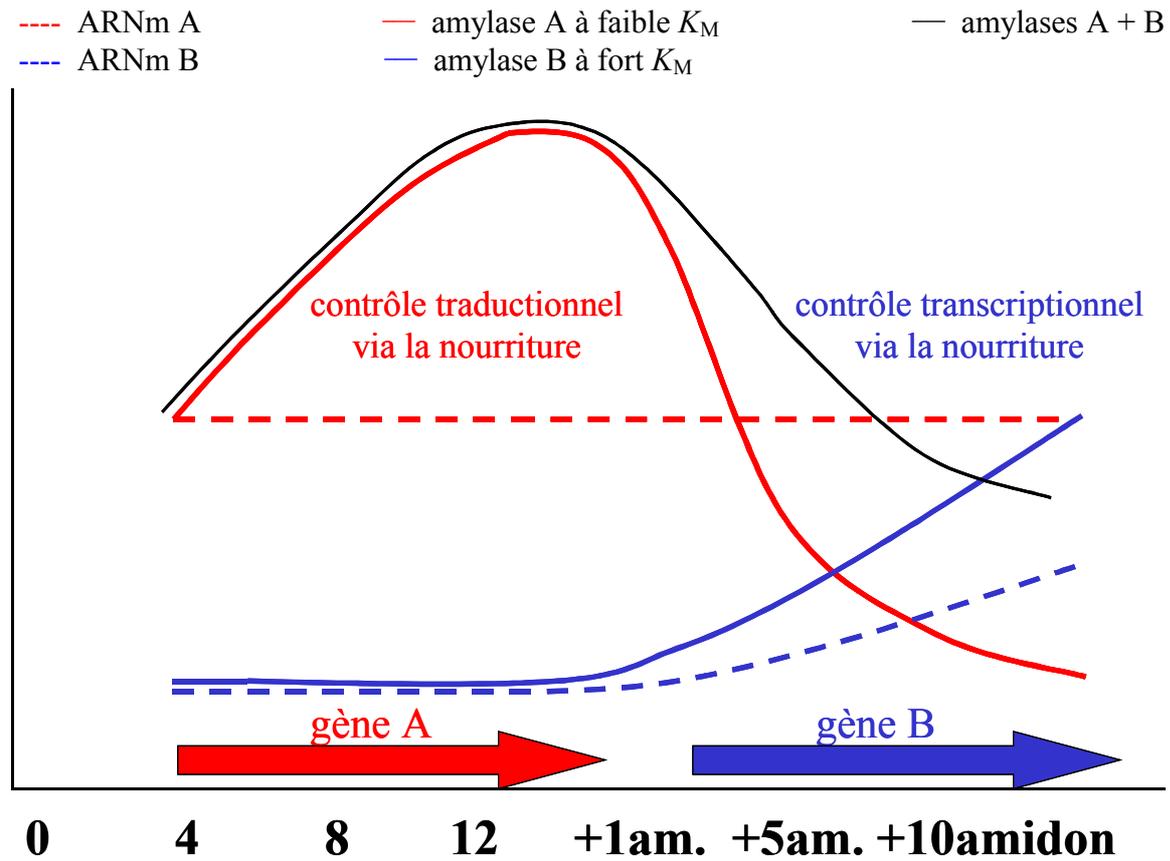


Figure 39. Expressions des gènes amylase A et B et propriétés catalytiques des protéines correspondantes en relation avec la composition du régime alimentaire.

2. Mécanismes de variation dans l'abondance en ARNm amylase

Chez *C. gigas*, les niveaux d'ARNm des gènes amylase A et B sont différents, celui de A est toujours plus élevé par rapport à celui de B sauf au début de l'ontogenèse. Durant les premiers stades embryonnaires, les niveaux des transcrits des gènes A et B sont similaires ; ces ARNm sont supposés être d'origine maternelle. La variation d'expression des gènes amylase peut être due à des différences dans le nombre de copies des gènes, le taux de transcription et la vitesse de dégradation des ARNm à partir d'un nombre constant de gènes.

2.1. Nombre de copies de gènes

L'augmentation du niveau d'ARNm de A par rapport à celui de B peut provenir d'un nombre plus important de copies actives du gène A par rapport au gène B. Par exemple, chez la souris, Meilser *et al.* (1986) ont relié une teneur plus élevée des ARNm amylase dans le pancréas des souches A/J et CE/J par rapport à la souche YBR et un nombre plus important de copies actives du gène pancréatique Amy-2. En effet, chez la souche YBR, 2 gènes amylase

pancréatiques ont été caractérisés, Amy-2.1 et Amy-2.2 (Gumucio *et al.*, 1985). 3 ou 4 copies de Amy-2.1 ont été détectées dans le génome de la souris A/J (Hagenbüchle *et al.*, 1984). 16 copies du gène Amy-2.2 ont été découvertes chez la souche CE/J, et au moins 5 de ces copies étaient transcrites (Bodary *et al.*, 1985 ; Tosi *et al.*, 1984).

2.2. Transcription des gènes

Les régions promotrices des gènes A et B ont été caractérisées : leur organisation est différente (Sellos *et al.*, 2003). Le promoteur de A est dépourvu de boîte TATA comme c'est le cas pour les gènes dits de ménage (*housekeeping genes*). Ces gènes ne contiennent ni de boîte TATA ni de boîte CAAT (Wang et Chen, 1996), et leur expression est pourtant constitutive, forte et large afin de maintenir intactes les fonctions cellulaires (Butte *et al.*, 2001 ; Vinogradov, 2004). A l'inverse, le promoteur de B présente des séquences régulatrices. Celui-ci est constitué d'une séquence TATAA localisée à 61 paires de bases en amont du codon d'initiation, et d'une séquence CCAAT distante de 100 paires de bases du début de la séquence codante. Un élément de réponse au glucose est aussi présent ainsi que des motifs de site de liaison au complexe activateur transcriptionnel AP-1 (*activator protein 1*). Ce facteur de transcription est constitué par les produits protéiques des proto-oncogènes c-fos et c-jun (Muller *et al.*, 1997). Au vu de ces éléments, le gène A peut assurer le métabolisme général : son expression est forte et peu régulée tandis que le gène B est exprimé dans des conditions particulières de qualité trophique, *i.e.* quand le ratio amidon/protéines augmente. Dans ce cas, le gène B aurait un rôle dans l'adaptation de l'huître à certains environnements riches en amidon.

2.3. Instabilité des ARNm

La plupart des éléments qui contrôlent la stabilité des ARNm ont été localisés dans les 3'UTR (3' untranslated regions) (Hershey *et al.*, 1996 ; Beelman et Parker, 1995). C'est le cas des séquences qui stimulent une réaction rapide de désadénylation et favorisent donc la dégradation des ARNm par les exoribonucléases. Ces séquences riches en résidus adénylate et uridylate (ARE ou *AU rich element*), ont été retrouvées dans les 3'UTR de nombreux ARNm labiles (demi-vies de l'ordre de 10 à 20 min) qui codent pour des proto-oncoprotéines (c-myc, c-fos, cjun) et des cytokines (GM-CSF, IL-3) (Shaw et Kamen, 1986). Quand les AREs issus d'ARNm instables (tel que c-fos) sont insérés à l'intérieur des 3'UTR d'ARNm stables (tels

que ceux de la β -globine dont les demi-vies sont supérieures à 20 h), le transcrit normalement stable est alors déstabilisé (Shaw et Kamen, 1986). La 3'UTR du gène B (numéro d'accèsion GenBank AF321515 (Sellos *et al.*, 2003)) étant incomplète, elle ne permet pas de vérifier la présence d'éléments (*e.g.* AREs) apparemment liés à l'instabilité des ARNm et ainsi provoquer leur destruction.

3. Relations polymorphisme/fonction associées aux gènes de l'amylase

Nous avons montré que le polymorphisme associé aux gènes de l'amylase affectait la croissance de l'huître *C. gigas*. En effet, à la fin du suivi *in situ* correspondant à la période hivernale, des génotypes amylase issus d'une même famille montraient des différences de croissance. Ces différences étaient plus marquées sur le site de Fort Espagnol (Bretagne-Sud) que sur celui de baie des Veys (Basse-Normandie). Pour certains génotypes, on a noté une corrélation positive entre les valeurs d'activité amylase spécifique et celles des poids, indiquant que les différences d'activité amylase spécifique pouvaient donc en partie expliquer les différences de croissance observées. Par contre, le K_M n'était pas affecté par le polymorphisme amylase indiquant que les variations d'activité amylase spécifique obtenues dans cette expérience reflétaient un changement de quantité d'enzymes plutôt qu'un changement d'efficacité catalytique, comme c'était le cas chez *Drosophila melanogaster* (Hickey, 1981 ; Hickey et Benkel, 1982a) ou chez le poulet (Hughes *et al.*, 1994). Cependant, les propriétés enzymatiques par rapport au polymorphisme de l'amylase doivent être explorées quand la nourriture est hautement disponible (par opposition à la nourriture faiblement disponible durant la période analysée), depuis que Moal *et al.* (2000) ont montré que l'activité amylase dépend de la disponibilité en nourriture.

Des éléments régulateurs telles que les régions promotrices pourraient aussi être à l'origine des différences observées dans l'activité amylase spécifique. Effectivement, les allèles du gène amylase A codent la même séquence peptidique. 4 et 1 changements d'acides aminés sont observés à partir de la séquence amplifiée des allèles B2 et B3 par rapport à celle de B1 (Sellos *et al.*, 2003). Ces substitutions d'acides aminés entre les allèles de B ne sont pas rencontrées au niveau des 5 régions hautement conservées, et il est probable qu'elles aient peu d'influence sur l'activité enzymatique.

En conclusion, la corrélation entre le polymorphisme amylase et la croissance chez l'huître *C. gigas* suggère l'intérêt d'utiliser les marqueurs amylase dans des programmes de sélection ostréicoles.

4. Prospectives

Pour garantir que les protéines séparées en IEF et révélées en activité (bains d'amidon et de lugol successifs) correspondent bien aux amylases A et B, des anticorps spécifiques de l'une ou l'autre des amylases devront être à nouveau produits. Des premiers essais d'identification grâce à des anticorps (Eurogentec) spécifiques de l'une ou l'autre des amylases d'huître ont effectivement échoué et n'ont pas permis d'identifier ni les protéines amylase A ni celles de l'amylase B.

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle l'amylase A a un faible K_M et qu'au contraire, l'amylase B a un fort K_M , une purification des amylases à partir d'extraits digestifs d'huîtres devra être mise en œuvre.

Pour affiner les liens entre le polymorphisme amylase et la croissance, des recherches sur les paramètres digestifs de l'huître (*i.e.* absorption, assimilation) et sur les paramètres de l'amylase (niveau d'ARNm, activité, K_M) sont maintenant nécessaires chez différents génotypes amylase et ceci dans différentes conditions environnementales.

Pour tester l'utilité des marqueurs amylase dans la sélection pour la croissance, des études ultérieures seront nécessaires (*e.g.* comparaisons de lignées homozygotes) afin d'examiner si les relations entre le polymorphisme amylase et la croissance sont dues à la combinaison spécifique d'allèles au niveau des deux gènes ou d'un effet de l'hétérozygotie au niveau de chaque locus. En fonction de ces résultats, des génotypes seront spécifiquement produits selon la capacité trophique des milieux.

D'autres niveaux de régulation du système digestif peuvent être étudiés (transcriptionnel, traductionnel, hormones, glande digestive). C'est la voie transcriptionnelle qui serait privilégiée dans la mesure où les régions promotrices des gènes amylase de l'huître ont été caractérisées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, K. (1958). Genetical and biochemical studies on amylase in *Drosophila melanogaster*. *Japanese Journal of Genetics*, 33, 138-145
- Abraham, I., Doane, W.W. (1978). Genetic regulation of tissue-specific expression of amylase structural genes in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 4446-4450
- Abukashawa, S., Genest, Y., Hickey, D.A. (1993). Unpublished, direct sequence submission. EMBL U04271
- Agreste Primeur. (2003). L'huître : perle de l'élevage conchylicole. Premier recensement de la conchyliculture. <http://www.agriculture.gouv.fr/spip/IMG/pdf/primeur126.pdf>
- Al Kazaz, M., Desseaux, V., Marchis-Mouren, G., Payan, F., Forest, E., Santimone, M. (1996). The mechanism of porcine pancreatic α -amylase. Kinetic evidence for two additional carbohydrate-binding sites. *European Journal of Biochemistry*, 241, 787-796
- Al Kazaz, M., Desseaux, V., Marchis-Mouren, G., Prodanov, E., Santimone, M. (1998). The mechanism of porcine pancreatic α -amylase. Inhibition of maltopentaose hydrolysis by acarbose, maltose and maltotriose. *European Journal of Biochemistry*, 252, 100-107
- Allen, S.K., Downing, S.L., Chew, K.K. (1989). Hatchery manual for producing triploid oysters. Distributed by University of Washington Press, Seattle, Washington, 27 pp
- Amemiya, I. (1929). On the sex-change of the Japanese common oyster, *Ostrea gigas* Thunberg. *Proceedings of the Imperial Academy (Tokyo)*, 5, 284-286
- Aquino-Silva, M.R., Schwantes, M.L.B., Schwantes, A.R. (1997). The multiple soluble malate dehydrogenase of *Hoplias malabaricus* (Characiformes). *Experimental Biology Online*, 2, 1-11
- Aquino-Silva, M.R., Schwantes, M.L.B., Schwantes, A.R. (2003). Isoform expression in the multiple soluble malate dehydrogenase of *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae, Characiformes). *Brazilian Journal of Biology*, 63, 7-15
- Arena, L., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Soyez, C., Van Wormhoudt, A., Rosas, C. (2003). Physiological and genetic variations in domesticated and wild populations of *Litopenaeus vannamei* fed with different carbohydrate levels. *Journal of Shellfish Research*, 22, 269-279
- Bacher, C., Baud, J.P. (1992). Intensive rearing of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in an upwelling system : optimization of biological production. *Aquatic Living Resources*, 5, 89-98
- Bailey, G.S., Wilson, A.C., Halver, J.E., Johnson, C.L. (1970). Multiple forms of supernatant malate dehydrogenase in salmonid fishes : biochemical, immunological and genetic studies. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 5927-5940
- Bailey, N.T. (1981). *Statistical Methods in Biology*. Hodder and Stoughton, London
- Baker, J.E., Halliday, W.R., Lum, P.T.M. (1990). Genetics of alpha amylase in *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 26, 7-10
- Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A., Corran, P.H., Furth, A.J., Milman, J.D., Offord, R.E., Priddle, J.D., Waley, S.G. (1975).

- Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature*, 255, 609-614
- Barnabé, G. (1991). Bases écologiques et biologiques de l'aquaculture. Lavoisier-TEC & DOC
- Barré, D. (1981). Implantation de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le bassin de Marennes-Oléron. *Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université de Toulouse*, 150 pp
- Bashirullah, A., Cooperstock, R.L., Lipshitz, H.D. (2001). Spatial and temporal control of RNA stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 7025-7028
- Bayne, B.L. (1976). Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In : *Estuarine Process*. Wiley M. (ed.), Academic Press, New York, p. 432-448
- Bayne, B.L. (1983). Physiological ecology of marine molluscan larvae. In : *The Mollusca, volume 3, Development*. Verdonk, N.H., Van Den Biggelaar J.A.M. and Tompa A.S. (ed.), Academic Press, New York, p. 299-343
- Beelman, C.A., Parker, R. (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell*, 81, 179-183
- Behrman, H.R., Kare, M.R. (1969). Adaptation of canine pancreatic enzymes to diet composition. *The Journal of Physiology*, 205, 667-676
- Ben Abdeljlil, A., Desnuelle, P. (1964). Sur l'adaptation des enzymes exocrines du pancréas à la composition du régime. *Biochimimica Biophysica Acta*, 81, 136-149
- Benkel B.F., Hickey, D.A. (1986a). Glucose repression of amylase gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 114, 137-144
- Benkel, B.F., Hickey, D.A. (1986b). The interaction of genetic and environmental factors in the control of amylase gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 114, 943-954
- Benkel, B.F., Hickey, D.A. (1987). A *Drosophila* gene is subject to glucose repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 1337-1339
- Benkel, B.F., Nguyen, T., Ahluwalia, N., Benkel, K.I., Hickey, D.A. (1997). Cloning and expression of a chicken alpha-amylase gene. *Gene*, 192, 261-70
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M. (2000a). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 125, 359-369
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M. (2000b). Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Marine Biotechnology*, 2, 136-145
- Bloor, J.H., Meisler, M.H., (1980). Additional evidence for the close linkage of amy-1 and amy-2 in the mouse. *The Journal of Heredity*, 71, 449-451
- Bodary, S., Grossi, G., Hagenbuchle, O., Wellauer, P.K. (1985). Members of the Amy-2 alpha-amylase gene family of mouse strain CE/J contain duplicated 5' termini. *Journal of Molecular Biology*, 182, 1-10
- Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z., Dodson, G.G., Jensen, V.J., Petersen, S.B., Swift, H., Thim, L., Woldike, H.F. (1990). Calcium binding in alpha-amylases : an X-ray diffraction study at 2.1-A resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*, 29, 6244-6249
- Boer, P.M., Hickey, D.A. (1986). The alpha-amylase gene in *Drosophila melanogaster* : nucleotide sequence, gene structure and expression motifs. *Nucleic acids research*, 14, 8399-8411
- Borowsky, R. (1984). Environmental control of amylase phenotype in amphipods of the genus *Gammarus*. *The Biological Bulletin*, 167, 647-657

- Boucaud-Camou, E., Lebesnerais, C., Lubet, P., Lihmann, I. (1983). Dynamique et enzymologie de la digestion chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg). Bases biologiques de l'aquaculture. Montpellier. *Actes de Colloques Ifremer*, 1, 75-96
- Boudry, P., Collet, B., McCombie, H., Ernande, B., Morand, B., Heurtebise, S., Gerard, A. (2003). Individual growth variation and its relationship with survival in juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture International*, 11, 429-448
- Bougrier, S., Geairon, P., Deslous-Paoli, J.M., Bacher, C., Jonquières, G. (1995). Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 134, 143-154
- Bourre, J.M. (2001). Les aliments de l'intelligence et du plaisir. *Odile Jacob Editions*, 390 pp
- Brannon, P.M. (1990). Adaptation of the exocrine pancreas to diet. *Annual Review of Nutrition*, 10, 85-105
- Brayer, G.D., Luo, Y., Withers, S.G. (1995). The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 4, 1730-1742
- Brix, O., Foras, E., Strand, I. (1998). Genetic variation and functional properties of Atlantic cod hemoglobins : introducing a modified tonometric method for studying fragile hemoglobins. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 119, 575-583
- Brock, A. (1987). Reaction kinetics of different forms of human α -amylase isoenzymes. *Advances in Clinical Enzymology*, 5, 137-143
- Brownie, A.C., Kernohan, J.C. (2005). Master medicine : medical biochemistry, 2nd edition. A core text with self-assessment. Churchill Livingstone, 336 pp
- Burke, R.D. (1983) The induction of metamorphosis of marine invertebrate larvae : stimulus and response. *Canadian Journal of Zoology*, 61, 1701-1719
- Buroker, N.E. (1983). Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia*, 23, 271-279
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169-193
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) : trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 23-39
- Butte, A.J., Dzau, V.J., Glueck, S.B. (2001). Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues". *Physiological Genomics*, 7, 95-96
- Caraciolo, M.C., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. (1996). Malate dehydrogenase polymorphism in Amazon curimatids (Teleostei : Curimatidae) : evidence of an ancient mutational event. *Revista Brasileira de Genética*, 19, 57-64
- Chelly, J., Concordet, J.P., Kaplan, J.C., Khan, A. (1989). Illegitimate transcription : Transcription of any gene in any cell type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 2617-2621
- Chiasson, L., Josse, R.G., Hunt, J.A., Palmason, C., Rodger, N.W., Ross, S.A., Ryan, E.A., Tan, M.H., Wolever, T.M.S. (1994). The efficacy of acarbose in the treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus : a multicenter controlled clinical trial. *Annals of Internal Medicine*, 121, 928-935
- Choi, J., Yamazaki, T. (1994). Molecular analysis of cis-regulatory sequences of the alpha-amylase gene in *D. melanogaster* : a short 5'-flanking region of Amy distal gene is required for full expression of Amy proximal gene. *Japanese Journal of Genetics*, 69, 619-635
- Coleman, N. (1986). A review of introductions of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around the world and a discussion of the possible ecological consequences of introducing

- the species into Victoria, Australia. Technical report n°56, Marine Resources Management Branch, Fisheries and Wildlife Service, Department of Conservation, Forests and Lands, Quescliff, Victoria, Australia, 39 pp
- Collet, B., Boudry, P., Thebault, A., Heurtebise, S., Morand, B., Gerard, A. (1999). Relationship between pre- and post-metamorphic growth in the Pacific *oyster* *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 175, 215-226
- Colowick, S.P. (1973). The hexokinases. In : *The enzymes, 3rd edition, volume 9*. Boyer P.D. (ed.), Academic Press, New York, p. 1-48
- Comps, M. (1988). Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *American Fisheries Society- Special publication*, 18, 23-37
- Coppes, Z.L., Schwantes, M.L.B., Schwantes, A.R. (1987). Adaptative features of enzymes from family Scianidae (Perciformes) - I. Studies on soluble malate dehydrogenase (sMDH) and creatine kinase (CK) of fishes from the South Coast of Uruguay. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 88, 203-209
- Corring, T., Juste, C., Lhoste, E.F. (1989). Nutritional regulation of pancreatic and biliary secretions. *Nutrition Research Reviews*, 2, 161-180
- Corring, T., Saucier, R. (1972). Sécrétion pancréatique sur porc fistulé. Adaptation à la teneur en protéines du régime. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 12, 223-241
- Coupin, H. (1900). Sur les fonctions de la tige cristalline des Acéphales. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences*, 130, 1214-1216
- Courties, C., Perasso, R., Chrétiennot-Dinet, M.J., Gouy, M., Guillou, L., Troussellier, M. (1998). Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Journal of Phycology*, 34, 844-849
- Courties, C., Vaquer, A., Troussellier, M., Lautier, J., Chrétiennot-Dinet, M.J., Neveux, J., Machado, C., Claustre, H. (1994). Smallest eukaryotic organism. *Nature*, 370, 255
- Da Lage, J.L., Klarenberg, A., Cariou, M.L. (1996a). Variation in sex-, stage- and tissue-specific expression of the amylase genes in *Drosophila ananassae*. *Heredity*, 76, 9-18
- Da Lage, J.L., Lemeunier, F., Cariou, M.L., David, J.R. (1992). Multiple amylase genes in *Drosophila ananassae* and related species. *Genetical Research*, 59, 85-92
- Da Lage, J.L., Maczkowiak, F., Cariou, M.L. (2000). Molecular characterization and evolution of the amylase multigene family of *Drosophila ananassae*. *Journal of Molecular Evolution*, 51, 391-403
- Da Lage, J.L., Van Wormhoudt, A., Cariou, M.L. (2002). Diversity and evolution of the α -amylase genes in animals. *Biologia, Bratislava*, 57, 181-189
- Da Lage, J.L., Wegnez, M., Cariou, M.L. (1996b). Distribution and evolution of introns in *Drosophila amylase* genes. *Journal of Molecular Evolution*, 43, 334-347
- Dagorn, J.C. (1986). Mechanism of pancreatic adaptation to diet. *Biochimie*, 68, 329-331
- Dall, W., Moriarty, D.J.W. (1983). Functional aspects of nutrition and digestion. In : *The Biology of Crustacea*. Bliss D.E. and Mantel L.H. (ed.), Academic Press, New York, p. 215-262
- Darley, W.M. (1977). Biochemical composition. In : *The Biology of Diatoms, Botanical Monographs* (eds. D., Werner), 13, 198-223. Oxford : Blackwell Scientific Publications
- Darnis, S., Juge, N., Guo, X.J., Marchis-Mouren, G., Puigserver, A., Chaix, J.C. (1999). Molecular cloning and primary structure analysis of porcine pancreatic α -amylase. *Biochimimica Biophysica Acta*, 1430, 281-289
- Davidson, E.H. (1986). Gene activity in early development. 2nd edition, Academic Press, New York
- De Luca, P.H., Schwantes, M.L.B., Schwantes, A.R. (1983). Adaptative features of ectothermic enzymes. IV. Studies on malate dehydrogenase of *Astyanax fasciatus*

- (Characidae) from Lobo Reservoir (São Carlos, São Paulo, Brasil). *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 47, 315-324
- Defosse, J.M., Hawkins, A.J.S. (1997). Selective feeding in shellfish : size-dependant rejection of large particles within pseudofaeces from *Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussatus*. *Marine Biology*, 129, 139-147
- Dégremont, L. (2000). Étude du polymorphisme des gènes de l'amylase chez *Crassostrea gigas*. Relation avec les paramètres physiologiques de l'assimilation. *Mémoire de DEA, Université de Bretagne Occidentale, IUEM*
- Dégremont, L., Bédier, E., Martin, J.L., Soletchnik, P., Joly, J.P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.F., Boudry, P. (2002). Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*). In : Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier August 19-23, 481-484
- Dégremont, L., Bédier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.F., Boudry, P. (2005). Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 249, 213-229
- Deschodt-Lanckman, M., Robberecht, P., Camus, J., Christophe, J. (1971). Short-term adaptation of pancreatic hydrolases to nutritional and physiological stimuli in adult rats. *Biochimie*, 53, 789-796
- Deslous-Paoli, J.M. (1980). Contribution à l'étude de la biologie de l'huître *C. gigas* (Thunberg) dans le bassin et les claires de Marennes-Oléron. *Thèse 3^{ème} cycle, Université d'Aix-Marseille II*, 121 pp
- Deslous-Paoli, J.M., Héral, M. (1988). Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquatic Living Resources*, 1, 239-249
- Deslous-Paoli, J.M., Héral, M., Berthome, J.P., Razet, D., Garnier, J. (1981). Natural reproduction of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron basin in 1979 and 1981 : Biochemical and energetic aspects. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 45, 319-327
- Deslous-Paoli, J.M., Zanette, Y., Héral, M., Masse, H., Garnier, J. (1982). Amélioration de la forme et de la qualité de l'huître *Crassostrea gigas* dans les claires de Marennes-Oléron. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 45, 181-194
- Desnuelle, P., Reboud, J.P., Ben Abdeljlil, A. (1962). Influence of the composition of the diet on the enzyme content of rat pancreas. In : *The exocrine pancreas. Normal and abnormal functions*. Reuck A. and Cameron M. (ed.), Ciba Found. Symposium on the Exocrine Pancreas. London, Livingstone, p 90-114
- Doane, W.W. (1969). *Drosophila* amylases and problems in cellular differentiation. pp 73-109. In : *RNA in Development*. Hanly E.W. (ed.). University of Utah Press, Salt Lake City
- Douglas, S.E., Mandla, S., Gallant, J.W. (2000). Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture*, 190, 247-260
- Doyon, Y., Home, W., Daull, P., LeBel, D. (2002). Effect of C-domain N-glycosylation and deletion on rat pancreatic alpha-amylase secretion and activity. *The Biochemical Journal*, 362, 259-264
- Eckersall, P.D., Beeley, J.A. (1981). Genetic analysis of human salivary alpha-amylase isozymes by isoelectric focusing. *Biochemical Genetics*, 19, 1055-1062
- Elston, R.A. (1993). Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 259-276

- Enriquez-Diaz, M.R. (2004). Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale*, 193 pp
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., Haure, J. (2004). Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I Spatial variation in fund abundance. *Journal of Evolutionary Biology*, 17, 342-356
- Estoup, A., Largiadere, C.D., Perrot, E., Chourrout, D. (1996). Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5, 295-598
- Fabioux, C. (2004). Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas* : intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. *Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale*, 219 pp
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Minguant, C., Le Pennec, M. (2004). Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 592-598
- Fagon, N. (2002). Mesures automatisées en écophysiologie marine. Dossier de présentation du thème de projet DPTP. 37 pp
- Falge, R., Schpanof, L., Jurss, K. (1978). Amylase, esterase and protease activity in the intestine content of rainbow *Salmo gairdneri* Rich., after feeding with feed containing different amounts of starch and protein. *Journal of Ichthyology*, 18, 283-287
- FAO. (2003). Aquaculture production : quantities 1950-2001 and values 1984-2001. Fishstat plus. <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/FISHPLUS.asp#Download>
- Farias, I.P., Almeida-Val, V.M.F. (1992). Malate dehydrogenase (sMDH) in amazon cichlid fishes : evolutionary features. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 103, 939-943
- Favier, J.C., Ireland-Ripert, J., Toque, C., Feinberg, M. (1995). Répertoire général des aliments. Table de composition, 2^{ème} édition, revue et argumentée. *INRA Editions*, 928 pp
- Feller, G., Bussy, O., Houssier, C., Gerday, C. (1996). Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplanctis* alpha-amylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 23836-23841
- Ferey-Roux, G., Perrier, J., Forest, E., Marchis-Mouren, G., Puigserver, A., Santimone, M. (1998). The human pancreatic α -amylase isoforms : isolation, structural studies and kinetics of inhibition by acarbose. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1388, 10-20
- Fernandez, I., Moyano, F.J., Diaz, M., Martinez, T. (2001). Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262, 1-12
- Fischer, E.H., Stein, E.A. (1960). Alpha-amylases. In : *The enzymes, 2nd edition*. Boyer P.D., Lardy H. and Myrback K. (ed.), Academic Press, New York, 4, 313-343
- Fleury, P.G., Cornette, F., Claude, S., Palvadeau, H., Robert, S., D'Amico, F., Le Gall, P., Vercelli, C. (2001). REMORA, résultats des stations nationales, année 2000. *Rapport Ifremer DRV/RA/RST 01-02*, 48 pp
- Fleury, P.G., Le Ber, E., Claude, S., Cornette, F., d'Amico, F., Guilpain, P., Palvadeau, H., Robert, S., Le Gall, P., Ropert, M., Simonne, C., Vercelli, C. (2003). Comparison of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) rearing results (survival, growth, quality) in French farming areas, after a 10-year monitoring (1993-2002) by the IFREMER/REMORA network. *Journal of Shellfish Research*, 22, 330
- Flores, C.A., Brannon, P.M., Bustamante, S.A., Bezerra, J., Butler, K.T., Goda, T., Koldovsky, O. (1988). Effect of diet on intestinal and pancreatic enzymes activities in the pig. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 7, 914-921
- Forster, P.G., Abukashawa, S., Hickey, D.A. (1993). Unpublished, direct sequence submission. EMBL U04223

- Fujimoto, J., Kanou, C., Eguchi, Y., Matsuo, Y. (1999). Adaptation to a starch environment and regulation of alpha-amylase in *Drosophila*. *Biochemical Genetics*, 37, 53-62
- Gabbott, P.A. (1975). Storage cycle in marine molluscs : an hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. *Proceedings of the 9th European Marine Biological Symposium*, p. 191-211
- Galgani, F. (1985). Régulation de l'activité des protéases digestives de *Penaeus japonicus* Bate en relation avec le température. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 94, 11-18
- Galgani, F.G., Benyamin, Y. (1985). Radioimmunoassay of shrimp trypsin : application to the larval development of *Penaeus japonicus* Bate, 1888. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 87, 145-151
- Galtsoff, P.S. (1964). The American oyster *Crassostrea virginica*. In : *Fisheries bulletin*, 480 pp
- Gapusan, R.A., Yardley, D.G., Hughes, B.L. (1990). The amylase gene-enzyme system of chickens. II. Biochemical characterization of allozymes. *Biochemical Genetics*, 28, 553-560
- GENEPHYS. (1997). Genetic bases and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas*. *Commission of the European Communities, contract No. Fair 95-421*, 162 pp
- Gérard, A. (1998). Avancées récentes sur la reproduction des huîtres. *European Aquaculture Society Special Publication*, 26, 115-119
- Gérard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launay, S., Heurtebise, C., Ledu, C., Phelipot, P. (1995). Contrôle de la gamétogenèse des huîtres creuses et plates. Relations « reproduction » et « génétique ». In : *La Reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves Cultivés en France. Rapport de groupe de travail. Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer*, p. 99-112
- Gibson, R., Barker, P.L. (1979). The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology. An annual review*, 17, 285-346
- Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6, 995-1001
- Gidez, L.I. (1973). Effect of dietary fat on pancreatic lipase levels in the rat. *Journal of Lipid Research*, 14, 169-177
- Giorgi, D., Bernard, J.P., Lapointe, R., Dagorn, J.C. (1984). Regulation of amylase messenger RNA concentration in rat pancreas by food content. *The EMBO Journal*, 3, 1521-1524
- Giorgi, D., Renaud, W., Bernard, J.P., Dagorn, J.C. (1985). Regulation of proteolytic enzyme activities in rat pancreas by food content. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 127, 937-942
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR : applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 386-401
- Godfrey, T., West, S. (1996). In : *Industrial enzymology, 2nd ed.* Godfrey T. and West S. (ed.), New York : Stockton Press, p. 91, 105-131, 192, 339-356, 361-371
- Gouletquer, P. (1995). Cycle de reproduction naturelle de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. In : *La Reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves Cultivés en France. Rapport de groupe de travail. Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer*, p. 7-20
- Gouletquer, P., Héral, M. (1991). Aquaculture of *Crassostrea gigas* in France. In : *The ecology of C. gigas in Australia, New Zealand, France and Washington state.* Sutherland J. and Osman R. (ed.), Maryland Sea Grant College, MD, p. 13-19
- Gouletquer, P., Joly, J.P., Gérard, A., Le Gagneur, E., Moriceau, J., Peignon, J.M., Heurtebise, S., Phelipot, P. (1996). Performance of triploid Pacific oysters *Crassostrea*

- gigas* (Thunberg) reared in high carrying capacity ecosystem: survival, growth, and proximate biochemical composition. *Haliotis*, 25, 1-12
- Gouilletquer, P., Héral, M. (1997). Marine molluscan production trends in France : from Fisheries to Aquaculture. In : *US Dep. Commer., NOAA Technica. Report NMFS*, 129, 137-164
- Grizel, H. (1974). Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 279, 783-785
- Grizel, H. (1996). Quelques exemples d'introductions et de transferts de mollusques. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 15, 401-408
- Grizel, H., Héral, M. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Journal du Conseil International de l'Exploration de la Mer*, 47, 399-403
- Groot, P.C., Bleeker, M.J., Pronk, J.C., Arwert, F., Mager, W.H., Planta, R.J., Eriksson, A.W., Frants, R.W. (1989). The human alpha amylase multigene family consists of haplotypes with variable number of genes. *Genomics*, 5, 29-42
- Grossman, G.L., Campos, Y., Severson, D.W., James, A.A. (1997). Evidence for two distinct members of the amylase gene family in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27, 769-781
- Grossman, M.I., Greengard, H., Ivy, A.C. (1943). The effect of dietary composition of pancreatic enzymes. *The American Journal of Physiology*, 138, 676-682
- Guarna, M.M., Borowsky, R.L. (1993). Genetically controlled food preference : biochemical mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 5257-5261.
- Guarna, M.M., Borowsky, R.L. (1995). Biochemical properties of amylase isozymes from *Gammarus palustris*. A comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 112, 619-628
- Gumucio, D.L., Wiebauer, K., Caldwell, R.M., Samuelson, L.C., Meisler, M.H. (1988). Concerted evolution of human amylase genes. *Molecular and Cellular Biology*, 8, 1197-1205
- Gumucio, D.L., Wiebauer, K., Dranginis, A., Samuelson, L.C., Treisman, L.O., Caldwell, R.M., Antonucci, T.K., Meisler, M.H. (1985). Evolution of the amylase multigene family : YBR/Ki mice express a pancreatic amylase gene which is silent in other strains. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 13483-13489
- Guo, X., DeBrosse, G., Allen, Jr S.K. (1996). All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture*, 142, 149-161
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K. (1998). Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolution*, 52, 394-402
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases : a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38, 1599-1616
- Guy, O., Lombardo, D., Bartelt, D.C., Amic, J., Figarella, C. (1978). Two human trypsinogens. Purification, molecular properties and N-terminal sequences. *Biochemistry*, 17, 1669-1675
- Hagenbuchle, O., Bovey, R., Young, R.A. (1980). Tissue-specific expression of mouse α -amylase genes : nucleotide sequence of isoenzyme mRNAs from pancreas and salivary gland. *Cell*, 21, 179-187
- Hagenbuchle, O., Tosi, M., Schibler, U., Bovey, R., Wellauer, P.K., Young, R.A. (1981). Mouse liver and salivary gland alpha-amylase mRNAs differ only in 5' non-translated sequences. *Nature*, 289, 643-646

- Hagenbuchle, O., Wellauer, P.K., Cribbs, D.L., Schibler, U. (1984). Termination of transcription in the mouse α -amylase gene Amy-2^a occurs at multiple sites downstream of the polyadenylation site. *Cell*, 38, 737-744
- Hake, L.E., Richter, J.D. (1997). Translational regulation of maternal mRNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1332, M31-M38
- Haven, D.S., Morales-Alamo, R. (1970). Filtration of particles from suspension by the American oyster *Crassostrea virginica*. *The Biological Bulletin*, 139, 248-264
- Hemambika, M., Raj, R.P. (1999). Effect of dietary starch levels on digestive enzyme activity in *Penaeus indicus*. The Fourth Indian Fisheries Forum Proceedings, 24-28, November, 1996, Kochi, p. 287-289
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical Journal*, 280, 309-316
- Henrissat, B., Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical Journal*, 293, 781-788
- Henrissat, B., Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *The Biochemical Journal*, 316, 695-696
- Henrissat, B., Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 637-644
- Héral, M. (1989). L'ostréiculture française traditionnelle. In : *Aquaculture*. Barnabé G. (ed.), Lavoisier, Tec & Doc., 1, 2, (3), 347-398
- Héral, M. (1990). Traditional oyster culture in France. In : *Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture*. Barnabé G. (ed.), Lavoisier, Tec & Doc, 6, 347-397
- Héral, M., Deslous-Paoli, J.M. (1991). Oyster culture in European countries. In : *Estuarine and Marine Bivalve mollusk culture*. Menzel W. (ed.), CRC Press, Boca Raton, p. 153-190
- Héral, M., Hawkins, A.J.S., Smaal, A., Navarro, E. (1998). Trophic capacity of the coastal areas for the culture of oyster, mussel and cockles. *Third european marine sciences and technology conference MAST. Lisbon 23-27 May 1998. Fishery and Aquaculture AIR 1990-1994 selected projects*, 5, 125-128
- Hernandez, J.F. (1986). Les isoamylases humaines. *Thèse de Doctorat, Pharmacie, Université Paris V (René Descartes)*, 151 pp
- Hershey, J., Mathews, M., Sonenberg, N. (1996). Translational control. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 794
- Hickey, D.A. (1981). Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster* : variation in the number of enzyme molecules produced by different amylase genotypes. *Biochemical Genetics*, 19, 783-796
- Hickey, D.A., Benkel, B. (1982a). Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster* : effects of dietary carbohydrate. *Biochemical Genetics*, 20, 1117-1129
- Hickey, D.A., Benkel, B. (1982b). Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster*. V. Effects of food components on amylase and alpha-glucosidase activity. *Genetica*, 49, 181-187
- Hickey, D.A., Benkel, B.F., Boer, P.H., Genest, Y., Abukashawa, S., Ben-David, G. (1987). Enzyme-coding genes as molecular clocks : the molecular evolution of animal alpha-amylases. *Journal of Molecular Evolution*, 26, 252-256
- Hickman, R.W., Gruffydd, L.D. (1971). The histology of the larvae of *Ostrea edulis* during metamorphosis. In : *Fourth European Marine Biology Symposium. European Marine Biology Symposia*. Crisp D.J. (ed.), 4, 281-294
- Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170, 267-283

- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P., Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10, 413-417
- Hildreth, D.I., Crisp, D.J. (1976). A corrected formula for calculation of filtration rate of bivalve molluscs in an experiment flowing system. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 56, 111-120
- His, E. (1991). Biologie et écotoxicologie des véligères de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le bassin d'Arcachon. *Thèse Doctorat Etat, Université de Bordeaux I*, 192 pp
- His, E., Robert, R. (1985). Développement des véligères de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. Etudes sur les mortalités larvaires. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 47, 63-88
- Hochachka, P.W., Somero, G.N. (1968). The adaptation of enzymes to temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 27, 659-664
- Hochachka, P.W., Somero, G.N. (1973). *Strategies of biochemical adaptation*. Saunders, Philadelphia
- Hoorn, A.J., Scharloo, W. (1978). The functional significance of amylase polymorphism in *Drosophila melanogaster*. V. Effects of food components on amylase and alpha-glucosidase activity. *Genetica*, 49, 181-187
- Hoorn, A.J., Scharloo, W. (1981). The functional significance of amylase polymorphism in *Drosophila melanogaster*. VI. Duration of development and amylase activity in larvae when starch is a limiting factor. *Genetica*, 55, 195-201
- Horii, A., Emi, M., Tomita, N., Nishide, T., Ogawa, M., Mori, T., Matsubara, K. (1987). Primary structure of human pancreatic α -amylase gene : its comparison with human salivary α -amylase gene. *Gene*, 60, 57-64
- Hourdry, J., Cassier, P., D'Hondt, J.L., Porchet, M. (1995). Métamorphoses animales. Transitions écologiques. Hermann, Editeurs des Sciences et des Arts, 365 pp
- Howard, F., Yadkin, J. (1963). Effect of dietary changes upon the amylase and trypsin activities of the rat pancreas. *British Journal of Nutrition*, 17, 281-294
- Hughes, B.L., Suniga, R.G., Yardley, D.G. (1994). Influence of amylase genotypes on growth rate and feed conversion of chickens. *Poultry Science*, 73, 953-957
- Huvet, A., Dubois, S., Daniel, J.Y., Quéré, C., Prudence, M., Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Samain, J.F., Moal, J. (2003). Tissue expression of two amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture*, 228, 321-333
- Huvet, A., Fabioux, C., McCombie, H., Lapègue, S., Boudry, P. (2004). Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Marine Ecology Progress Series*, 272, 141-152
- Ibarrola, I., Iglesias, J.I.P., Navarro, E. (1996). Differential absorption of biochemical components in the diet of the cockle *Cerastoderma edule* : enzymatic responses to variations in seston composition. *Canadian Journal of Zoology*, 74, 1887-1897
- Ibarrola, I., Larretxea, X., Iglesias, J.I.P., Urrutia, M.B., Navarro, E. (1998). Seasonal variation of digestive enzyme activities in the digestive gland and the crystalline style of the common cockle *Cerastoderma edule*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121, 25-34
- Ikenoue, H., Kafuku, T. (1992). Modern methods of aquaculture in Japan. *Development in Aquaculture and Fisheries Science. Second revised edition*, 24, 1-274
- Imondi, A.R., Bird, F.H. (1967). Effects of dietary protein level on growth and proteolytic activity of the avian pancreas. *Journal of Nutrition*, 91, 421-428
- Inomata, N., Kanda, K., Cariou, M.L., Tachida, H., Yamazaki, T. (1995). Evolution of the response patterns to dietary carbohydrates and the developmental differentiation of gene

- expression of alpha-amylase in *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 1076-1084
- Iynedjian, P.B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *The Biochemical Journal*, 293, 1-13
- Jancarik, A. (1964). Die Verdauung der Hauptnaehrstoffe beim karpfen. *Zeitschrift für Fischerei und deren Hilfswissenschaft*, 12, 602-684
- Janeček, S. (1994). Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *European Journal of Biochemistry*, 224, 519-524
- Janeček, S. (1997). α -amylase family : molecular biology and evolution. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 67, 67-97
- Janeček, S., Svensson, B., Henrissat, B. (1997). Domain evolution in the alpha-amylase family. *Journal of Molecular Evolution*, 45, 322-331
- Jerrett, S.A., Goodge, W.R. (1973). Evidence for amylase in avian salivary glands. *Journal of Morphology*, 139, 27-45
- Jespersen, H.M., MacGregor, E.A., Henrissat, B., Sierks, M.R., Svensson, B. (1993). Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes : prediction of structural features of the catalytic (beta/alpha)₈-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *Journal of Protein Chemistry*, 12, 791-805
- Jespersen, H.M., MacGregor, E.A., Sierks, M.R., Svensson, B. (1991). Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *The Biochemical Journal*, 280, 51-55
- Johnson, A., Hurwitz, R., Kretchmer, N. (1977). Adaptation of rat pancreatic amylase and chymotrypsinogen to changes in diet. *Journal of Nutrition*, 107, 87-96
- Johnson, T.M., Rosenberg, M.P., Meisler, M.H. (1993). An insulin-responsive element in the pancreatic enhancer of the amylase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 464-468
- Joint, I.R., Owen, N.J.P., Pomroy, A.J. (1986). Seasonal production of photosynthetic picoplankton and nanoplankton in the Celtic sea. *Marine Ecology Progress Series*, 28, 251-258
- Kaplan, R.D., Chapman, V., Ruddle, F.H. (1973). Electrophoretic variation of alpha-amylase in two inbred strains of *Mus musculus*. *The Journal of Heredity*, 64, 155-157
- Karn, R.C., Malacinski, G.M. (1978). The comparative biochemistry, physiology, and genetics of animal alpha-amylases. *Advances in Comparative Physiology and Biochemistry*, 7, 1-103
- Kawai, S., Ikeda, S. (1972). Studies on digestive enzymes of fishes. II. Effects of dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*, 38, 265-270
- Keller, P.J., Kaufman, D.L., Allan, B.J., Williams, B.L. (1971). Further studies on the structural differences between the isoenzymes of human parotid α -amylase. *Biochemistry*, 10, 4867-4874
- Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (1996). The Eastern oyster *Crassostrea virginica* Maryland Sea Grant College, Maryland, 733 pp
- Kitto, G.B., Lewis, R.G. (1967). Purification and properties of tuna supernatant and mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 139, 1-15
- Klein, B. (1997). Isolation, characterization and expression of trypsin genes in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Thèse de Doctorat, Université de Bonn*, 161 pp
- Koldovsky, O. (1992). Small and large intestine. In : *Fetal and Neonatal Physiology*. Polin R.A. and Fox W.W. (ed.), Philadelphia, WB Saunders, 2, p 1059
- Korc, M., Owerbach, D., Quinto, C., Rutter, W.J. (1981). Pancreatic islet-acinar cell interaction : amylase messenger RNA levels are determined by insulin. *Science*, 213, 351-353

- Kowalik, B., Kowalczyk, J., Pajak, J.J., Zebrowska, T., Dlugolecka, Z. (2001). The influence of dietary starch level and type on the activity of pancreatic digestive enzymes in sheep. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 10, 57-63
- Koyama, I., Komine, S., Hokari, S., Matsunaga, T., Nakamura, K., Komoda, T. (2002). Electrophoretically unique amylases in rat livers : phylogenic and ontogenetic study on the mammalian liver. *Electrophoresis*, 23, 3278-3283
- Koyama, I., Komine, S., Yakushijin, M., Hokari, S., Komoda, T. (2001a). Expression of α -amylase gene in rat liver : liver-specific amylase has high affinity to glycogen. *Electrophoresis*, 22, 12-17
- Koyama, I., Komine, S., Iino, N., Hokari, S., Igarashi, S., Alpers, D.H., Komoda, T. (2001b). α -amylase expressed in human liver is encoded by the AMY-2B gene identified in tumorous tissues. *Clinica Chimica Acta*, 309, 73-83
- Kurokawa, T., Suzuki, T., Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Unuma, T. (2002). Expression of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 68, 736-744
- Lahaie, R.G. (1986). Translational control of protein synthesis in isolated pancreatic acini : role of CCK8, carbachol, and insulin. *Pancreas*, 1, 403-410
- Lahaie, R.G., Dagorn, J.C. (1981). Dietary regulation of pancreatic protein synthesis II. Kinetics of adaptation of protein synthesis and its effect on enzyme content. *Biochimica et Biophysica Acta*, 654, 119-123
- Landgon, C., Evans, F., Jacobson, D., Blouin, M. (2003). Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg improved after one generation of selection. *Aquaculture*, 220, 227-244
- Langdon, C.J., Siegfried, C.A. (1984). Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. *Aquaculture*, 39, 135-153
- Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Penneç, M., Hatt, P.J. (1999). Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest", France. *Invertebrate Reproduction and Development*, 36, 141-144
- Laubier-Bonichon, A., Van Wormhoudt, A., Sellos, D. (1977). Croissance larvaire contrôlée de *Penaeus japonicus* Bate. Enzymes digestives et changements de régimes alimentaires. *Actes de Colloques CNEXO*, 4, 131-145
- Laulier, M. (1988). Génétique et systématique évolutives du complexe d'espèces *Sphaeroma hookeri* Leach, *Sphaeroma levii* Argano et *Sphaeroma rugicauda* Leach (Crustacés Isopodes Flabellifères). 1. Génétique formelle de onze locus enzymatiques. *Genetics, Selection, Evolution*, 20, 63-74
- Lavau, M., Bazin, R., Herzog, J. (1974). Comparative effects of oral and parenteral feeding on pancreatic enzymes in the rat. *Journal of Nutrition*, 104, 1432-1437
- Le Bec, C., Mazurie, J. (1992). Croissance de *Crassostrea gigas* en Bretagne en 1989, mise en place d'un réseau d'acquisition des données. In : *Les mollusques marins : biologie et aquaculture, Brest (France), 9 novembre 1990*. Le Penneç M. (ed.). *Actes de Colloques Ifremer*, 14, 61-70
- Le Moine, S., Sellos, D., Moal, J., Daniel, J.Y., Serrano, F.S.J., Samain, J.F., Van Wormhoudt, A. (1997). Amylase in *Pecten maximus* (Mollusca, bivalves) : protein and cDNA characterization, quantification of the expression in the digestive gland. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6, 228-237
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. (1996). Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208, 107-125

- Le Moullac, G., Van Wormhoudt, A. (1994). Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquatic living resources*, 7, 203-210
- Le Penec, G., Le Penec, M. (2002). Molecular analysis of the seasonal expression of genes coding for different functional markers of the digestive gland of the bivalve mollusk *Pecten maximus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 133, 417-426
- Le Penec, G., Le Penec, M., Beninger, P.G. (2001). Seasonal digestive gland dynamics of the scallop *Pecten maximus* in the Bay of Brest (France). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81, 663-671
- Lebesnerais, C. (1985). Etude expérimentale de la digestion chez l'huître japonaise *Crassostrea gigas*. Thèse de 3^{ème} cycle, *Sciences Biologiques Fondamentales et Appliquées, Psychologie, Caen*, 102 pp
- Ledermann, H., Hoxter, G. (1994). Effect of acarbose on postprandial increase in blood glucose. Additive acute effect of once daily administration in insulin treated diabetes. *Fortschritte der Medizin*, 112, 467-470
- Leitão, A., Boudry, P., Thiriou-Quévieux, C. (2001). Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : ten years of evidence. *Aquaculture*, 193, 39-48
- Levitzki, A., Steer, M.L. (1974). The allosteric activation of mammalian alpha-amylase by chloride. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 41, 171-180
- Levy, J.N., Gemmill, R.M., Doane, W.W. (1985). Molecular cloning of alpha-amylase genes from *Drosophila melanogaster*. II. Clone organization and verification. *Genetics*, 110, 313-324
- Lhoste, E.F., Fiszlewicz, M., Gueugneau, A.M., Wicker-Planquart, C., Puigserver, A., Corring, T. (1993). Effect of dietary proteins on some pancreatic mRNAs encoding digestive enzymes in the pig. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 4, 143-152
- Li, W.K.W. (1994). Phytoplankton biomass and chlorophyll concentration across the North Atlantic. *Scientia Marina*, 58, 67-79
- Lin, J.J., Somero, G.N. (1995a). Temperature-dependent changes in expression of thermostable and thermolabile isozymes of cytosolic malate dehydrogenase in the eurythermal goby fish *Gillichthys mirabilis*. *Physiological Zoology*, 68, 114-128
- Lin, J.J., Somero, G.N. (1995b). Termal adaptation of cytoplasmic malate dehydrogenase of Eastern Pacific barracuda (*Sphyraena* ssp) : the role of differential isoenzyme expression. *The Journal of Experimental Biology*, 198, 551-560
- Livak, K.L., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-Ct method. *Methods*, 25, 402-408
- Logsdon, C.D., Moessner, J., Williams, J.A., Goldfine, I.D. (1985). Glucocorticoids increase amylase mRNA levels, secretory organelles and secretion in pancreatic acinar AR 42J cells. *The Journal of Cell Biology*, 100, 1200-1208
- Lovett, D.L., Felder, D.L. (1990). Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval an postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *The Biological Bulletin*, 178, 144-159
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275
- Lubet, P. (1976). Ecophysiologie de la reproduction chez les mollusques lamellibranches. *Haliotis*, 7, 49-55
- Lubet, P. (1978). Nutrition des Lamellibranches (Huîtres, Moules). *Oceanis*, 4, 23-54
- Lubet, P. (1991). Bases biologiques de la culture des mollusques. In : *Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture*. Barnabé G. (ed.), Lavoisier, Tec & Doc, p. 99-212

- Ma, P., Sivaloganathan, B., Reddy, P.K., Chan, W.K., Lam, T.J. (2001). Ontogeny of α -amylase gene expression in sea bass larvae (*Lates calcarifer*). *Marine Biotechnology*, 3, 463-469
- MacDonald, R.J., Crerar, M.M., Swain, W.F., Pictet, R.L., Thomas, G., Rutter, W.J. (1980). Structure of a family of rat amylase genes. *Nature*, 287, 117-122
- Magoulas, C., Bally-Cuif, L., Loverre-Chyurlia, A., Benkel, B., Hickey, D. (1993). A short 5'-flanking region mediates glucose repression of amylase gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 134, 507-515
- Mann, R. (1979). Some biochemical and physiological aspect of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* at sustained elevated temperatures. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 59, 95-110
- Mann, R., Bureson, E.M., Baker, P.K. (1991). The decline of the Virginica oyster fishery in Chesapeake bay: considerations for introduction of a non-endemic species, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Shellfish Research*, 10, 379-388
- Marchis-Mouren, G., Paséro, L., Desnuelle, P. (1963). Further studies on amylase biosynthesis by pancreas of rats fed on a starch-rich or casein-rich diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 13, 262-266
- Markert, C.L., Moller, F. (1959). Multiple forms of enzyme: tissue, ontogenic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45, 753-763
- Martinez, I., Moyano, F.J., Fernandez-Diaz, C., Yufera, M. (1999). Digestive enzymes activity during larval development of the *Senegal sole*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21, 317-323
- Matschinsky, F.M. (1990). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β -cells and hepatocytes. *Diabetes*, 39, 647-651
- Matschinsky, F.M. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*, 45, 223-241
- Matsui, M., Kakut, M., Misaki, A. (1996). Fine structural features of oyster glycogen : mode of multiple branching. *Carbohydrate Polymers*, 31, 227-235
- Matsuo, T., Odaka, H., Ikeda, H. (1992). Effect of an intestinal disaccharidase inhibitor (AO-128) on obesity and diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55, 314S-317S
- Matsuo, Y., Yamazaki, T. (1984). Genetic analysis of natural populations of *Drosophila melanogaster* in Japan. IV. Natural selection on the inducibility, but not on the structural genes, of amylase loci. *Genetics*, 108, 879-896
- Matsuo, Y., Yamazaki, T. (1986). Genetic analysis of natural populations of *Drosophila melanogaster* in Japan. VI. Differential regulation of duplicated amylase loci and degree of dominance of amylase activity in different environments. *Japanese Journal of Genetics*, 61, 543-558
- Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W., Kakudo, M. (1984). Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 95, 697-702
- Maurer, D., Borel, M. (1986). Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis*, 15, 125-134
- McCommas, S, Shornick, L.P. (1990). The effect of carbohydrate sources on the level of amylase activity in *Musca domestica*. *Biochemical Genetics*, 28, 585-589
- McGeachin, R.L., Potter, B.A. (1960). Amylase in isolated liver cells. *Journal of Biological Chemistry*, 235, 1354-1358
- Meglasson, M.D., Matschinsky, F.M. (1983). Discrimination of glucose anomers by glucokinase from liver and transplantable insulinoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 6705-6708

- Meisler, M.H., Antonucci, T.K., Treisman, L.O., Gumucio, D.L., Samuelson, L.C. (1986). Interstrain variation in amylase gene copy number and mRNA abundance in three mouse tissues. *Genetics*, 113, 713-722
- Meisler, M.H., Ting, C.N. (1993). The remarkable evolutionary history of the human amylase genes. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 4, 503-509
- Merritt, A.D., Karn, R.C. (1977). The human alpha-amylases. *Advances in Human Genetics*, 8, 135-234
- Merritt, A.D., Rivas, M.L., Ward, J.C. (1972). Evidence for close linkage of human amylase loci. *Nature : New Biology*, 239, 243-244
- Moal, J., Daniel, J.Y., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., Samain, J.F. (2000). Amylase mRNA expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles. *Journal of Comparative physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 170, 21-26
- Moon-Van der Staay, S.Y., Van der Staay, G.W.M., Guillou, L., Vaultot, D., Claustre, H., Medlin, L.K. (2000). Abundance and diversity of Prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography*, 45, 98-109
- Moreau, Y. (2001). Couverture des besoins énergétiques des poissons tropicaux en aquaculture. Purification et comparaison des amylases de deux tilapias *Oreochromis niloticus* et *Sarotherodon melanotheron*. *Thèse de Doctorat, Université d'Aix-Marseille III, Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme*, 215 pp
- Mori, K. (1979). Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 53, 361-369
- Morin, A. (2002). Animaux : structures et fonctions. http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/Notes/Les_Mollusques.htm
- Mork, J., Giskeødegård, R., Sundnes, G. (1984a). Population genetic studies in cod (*Gadus morhua* L.) by means of the haemoglobin polymorphism ; observations in a Norwegian coastal population. *Fiskeridirektoratets Skrifter Serie HavundersFkelser*, 17, 449-471
- Mork, J., Giskeødegård, R., Sundnes, G. (1984b). The haemoglobin polymorphism in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) : genotype differences in somatic growth and in maturing age in natural population. In : *The Propagation of Cod Gadus Morhua L.* Dahl E., Danielsen D.S., Moksness E. and Solemdal P. (ed.). *Flødevigen rapportserie*, 1, 721-732
- Mork, J., Sundnes, G. (1984). Zero-group cod (*Gadus morhua*) in captivity : differential survival of certain genotypes. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 39, 63-70
- Morton, B.S. (1977). The tidal rhythm of feeding and digestion in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 26, 135-151
- Morton, B.S. (1983). Feeding and digestion in Bivalvia. In : *The Mollusca, volume 5, Physiology, Part 2.* Saleuddin A.S.M. and Wilbur K.M. (ed.), Academic Press, New York, p. 65-147
- Mubiru, J.N., Xu, R.J. (1998). Comparison of growth and development of the exocrine pancreas in pigs and rats during the immediate postnatal period. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 120, 699-703
- Muller, J.M., Cahill, M.A., Rupec, R.A., Baeuerle, P.A., Nordheim, A. (1997). Antioxidants as well as oxidants activate c-fos via Ras-dependent activation of extracellular-signal-regulated kinase 2 and Elk-1. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 244, 45-52
- Muller, L., Junge, B., Frommer, W. (1980). In : *Enzyme inhibitors.* Brodbeck U. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim, p. 109-122

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1, 263-273
- Muranaka, M.S., Lannan, J.E. (1984). Broodstock management of *Crassostrea gigas* : Environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*, 39, 217-228
- N.R.C. (1993). Nutrients requirements of fish. National Academy Press, New York, USA. 114 pp
- Nævdal, G., Folkvord, A., Otterlei, E., Thorkildsen, S. (1992). Growth rate related to genotype of 0-group cod at three environmental temperatures. *Sarsia*, 77, 71-73
- Nagase, G. (1964). Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* (Peters) : digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 49, 270-284
- Nakajima, R., Imanaka, T., Aiba, S. (1986). Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 355-360
- Nakamura, Y., Ogawa, M., Nishide, T., Emi, M., Kosaki, G., Himeno, S., Matsubara, K. (1984). Sequences of cDNAs for human salivary and pancreatic α -amylases. *Gene*, 28, 263-270
- Niemann, C. (1964). Alpha-chymotrypsin and the nature of enzyme catalysis : the problem of catalysis is considered in terms of the behavior of a single hydrolytic enzyme. *Science*, 143, 1287-1296
- Nishide, T., Nakamura, Y., Emi, M., Yamamoto, T., Ogawa, M., Mori, T., Matsubara, K. (1986). Primary structure of human salivary *alpha*-amylase gene. *Gene*, 41, 299-304
- Noda, K., Umeda, F., Nawata, H. (1997). Effect of acarbose on glucose intolerance in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 37, 129-136
- Norby, S. (1964). Preliminary notes, electrophoretic non-identity of human salivary and pancreatic amylases. *Experimental Cell Research*, 36, 663-702
- Ohashi, K., Natori, S., Kubo, T. (1999). Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 265, 127-133
- Oozeki, Y., Bailey, K.M. (1995). Ontogenetic development of digestive activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Marine Biology*, 122, 177-186
- Orlenko, A.N. (1994). Giant oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia, Mytiliformes, Crassostreidae) as an acclimatizable species and stages of its transplantation to the Black Sea. *Zoologiceskij Zurna*, 73, 51-54
- Orton, J.H. (1924). An account of investigations into the cause or causes of the unusual mortality among oysters in English oyster beds during 1920 and 1921. *Fisheries Investigations Series II. Marine Fisheries of Great Britain, Ministry of Agriculture. Fisheries and Food*, 6, 1-199
- Owen, G. (1966). Digestion. In : *Physiology of Mollusca*. Wilbur K.M. and Yonge C.M. (ed.), Academic Press, New York, 2, 53-96
- Palva, I. (1982). Molecular cloning of α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene*, 19, 81-87
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. (2000). Advances in microbial enzymes. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 135-152
- Pavlov, I.P. (1879). *The Work of Digestive Glands*, Translated by W.H. Thompson (1910). London : Griffin and Co
- Paynton, B.V., Rempel, R., Bachvarova, R. (1988). Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Developmental Biology*, 129, 304-314

- Perdue, J., Beattie, J.H., Chew, K.K. (1981). Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Washington state. *Journal of Shell Research*, 1, 9-16
- Péres, A., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Le Gall, M.M., Quazuguel, P. (1996). Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15, 237–242
- Péres, A., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. (1998). Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19, 145–152
- Pfaffl, M.W. (2003). Livestock Transcriptomics : Quantitative mRNA Analytics in Molecular Endocrinology and Physiology. <http://www.gene-quantification.de/habilitation.html>
- Pichot, Y., Comps, M., Tigé, G., Grizel, H., Rabouin, M.A. (1979). Recherches sur *Bonamia ostreae* Gen. N., Sp. N., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes*, 43, 131-140
- Piko, L., Clegg, K.B. (1982). Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. *Developmental Biology*, 89, 362-378
- Pinsky, S.D., LaForge, K.S., Scheele, G. (1985). Differential regulation of trypsinogen mRNA translation : full-length mRNA sequences encoding two oppositely charged trypsinogen isoenzymes in the dog pancreas. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 2669-2676
- Pittet, A.C., Schibler, U. (1985). Mouse alpha-amylase loci, Amy-1a and Amy-2a, are closely linked. *Journal of Molecular Biology*, 182, 359-365
- Pogson, G.H. (1991). Expression of overdominance for specific activity at the Phosphoglucosyltransferase-2 locus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 128, 133-141
- Pogson, G.H., Zouros, E. (1994). Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus* : a test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics*, 137, 221-231
- Postic, C., Shiota, M., Magnuson, M.A. (2001). Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Progress in Hormone Research*, 56, 195-217
- Prieur, D. (1971) Recherches bibliographiques sur le développement embryonnaire des mollusques bivalves. *Mémoire de DEA d'Océanographie Biologique, Faculté des Sciences de Paris*, 33 pp
- Prigent, S., Matoub, M., Rouland, C., Cariou, M.L. (1998). Metabolic evolution in alpha-amylases from *Drosophila virilis* and *D. repleta*, two species with different ecological niches. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 119, 407-412
- Prigent, S., Renard, E., Cariou, M.L. (2003). Electrophoretic mobility of amylase in *Drosophilids* indicates adaptation to ecological diversity. *Genetica*, 119, 133-145
- Puigserver, A., Wicker, C., Gaucher, C. (1985) Molecular aspects of the adaptation of pancreatic and intestinal enzymes to dietary regimens. *Reproduction, Nutrition, Developement*, 25, 787-802
- Qian, M., Haser, R., Payan, F. (1993). Structure and molecular model refinement of pig pancreatic a-amylase at 2.1 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 231, 785-799
- Quayle, D.B. (1969). Pacific oyster culture in British Columbia. Fisheries Research Board of Canada, 193 pp
- Ral, J.P., Derelle, E., Ferraz, C., Wattedled, F., Farinas, B., Corellou, F., Bule'on, A., Slomianny, M.C., Delvalle, D., D'Hulst, C., Rombauts, S., Moreau, H., Ball, S. (2004). Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance

- in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiology*, 136, 3333–3340
- Rausch, U., Vasiloudes, P., Rudiger, K., Kern, H.F. (1985). In-vivo stimulation of rat pancreatic acinar cells by infusion of secretin. II. Changes in individual rates of enzyme and isoenzyme biosynthesis. *Cell and Tissue Research*, 242, 641-644
- Reaven, G.M., Lardinois, C.K., Greenfield, M.S., Schwartz, H.C., Vreman, H.J. (1990). Effect of acarbose on carbohydrate and lipid metabolism in NIDDM patients poorly controlled by sulfonylureas. *Diabetes Care*, 13, 32-36
- Reboud, J.P., Ben Abdeljlil, A., Desnuelle, P. (1962). Variations in the enzyme content of the rat pancreas as a function of the composition of the diet. *Biochimica Biophysica Acta*, 58, 326-337
- Reboud, J.P., Marchis-Mouren, G., Cozzone, A., Desnuelle, P. (1966a). Variations in the biosynthesis rate of pancreatic amylase and chymotrypsinogen in response to a starch-rich or a protein-rich diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 22, 94-99
- Reboud, J.P., Marchis-Mouren, G., Pasero, L., Cozzone, A., Desnuelle, P. (1966b). Adaptation of the rate of biosynthesis of pancreatic amylase and chymotrypsinogen A to starch-rich or protein-rich diets. *Biochimica et Biophysica Acta*, 117, 351-367
- Reboud, J.P., Pasero, L., Desnuelle, P. (1964). On chymotrypsinogen and trypsinogen biosynthesis by pancreas of rats fed on starch-rich diet or a casein-rich diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 17, 347-351
- Renault, T. (1996). Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizooties*, 15, 551-561
- Riisgard, H.U. (2001). On measurement of filtration rates in bivalves – the stony road to reliable data : review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series*, 211, 275-291
- Rinderknecht, H. (1986). Pancreatic secretory enzymes. In : *The Exocrine Pancreas : Biology, Pathobiology and Diseases*. Go V.L., Gardner J.W., Brooks F.P., Lebenthal E., DiMagno E. and Scheele G.A. (ed.), Raven Press, New York, 920 pp
- Robberecht, P., Deschodt-Lanckman, M., Camus, J., Christophe, J. (1971). Induction diététique des hydrolases pancréatiques chez le rat sevré (Dietary induction of pancreatic hydrolases in the weaned rat). *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 79, 206-207
- Robert, R., Gérard, A. (1999). Bivalve hatchery technology : the current situation for the pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources*, 12, 121-130.
- Robert, R., Parisi, G., Rodolfi, L., Poli, B., Tredici, M.R. (2001). Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 192, 333-346
- Roberts, P.J.P., Whelan, W.J. (1960). The mechanism of carbohydrase action. 5. Action of human salivary α -amylase on amylopectin and glycogen. *Biochemical Journal*, 76, 246-253
- Robson, C.M. (1979). Purification and properties of the digestive amylase of *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea, Isopoda). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 62, 501-505
- Robyt, J.F., Chittenden, C.G., Lee, C.T. (1971). Structure and function of amylases 1. the subunit structure of porcine pancreatic alpha-amylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 144, 160-167
- Rodeheaver, D.P., Wyatt, R.D. (1984). Effect of decreased feed intake on serum and pancreatic alpha-amylase of broiler chickens. *Avian Diseases*, 28, 662-668

- Rogers, J.C., Milliman, C. (1983). Isolation and sequence analysis of a barley alpha-amylase cDNA clone. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 8169-8174
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soye, C., Van Wormhoudt, A. (2000). Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 249, 181-198
- Royse, V.L., Jensen, D.M. (1984). Development of an agarose gel electrophoresis technique for determining α -amylase isoenzymes. *Clinical Chemistry*, 30/3, 387-390
- Rutter, W.J., Arnold, M., Brosemer, R.W., Miller, J.A. (1961). Liver amylase. II. Physiological role. *Journal of Biological Chemistry*, 236, 1259-1263
- Sabapathy, U., Teo, L.H. (1994). Some kinetics properties of amylase from the intestine of the rabbitfish, *Siganus canaliticus* (Park). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 109, 139-144
- Sakai, T., Satake, H., Minakata, H., Takeda, M. (2004). Characterization of crustacean cardioactive peptide as a novel insect midgut factor : isolation, localization, and stimulation of α -amylase activity and gut contraction. *Endocrinology*, 145, 5671-5678
- Salvanes, A.G.V., Hart, P.J.B. (2000). Is individual variation in competitive performance of reared juvenile cod influenced by haemoglobin genotype ? *Sarsia*, 85, 265 -274
- Samain, J.F., Daniel, J.Y., Le Coz, J.R. (1977). Trypsine, amylase et protéines du zooplancton : dosage automatique et manuel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29, 279-289
- Samain, J.F., Daniel, J.Y., Le Coz, J.R., Michaud, F., Moal, J. (1995). Digestive enzymes during development of *Pecten maximus* larvae. *Actes de Colloques Ifremer*, 17, 265
- Samain, J.F., Hernandorena, A., Moal, J., Daniel, J.Y., Le Coz, J.R. (1985). Amylase and trypsin activities during *Artemia* development on artificial axenic media ; effect of starvation and specific deletions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 86, 255-270
- Samain, J.F., Moal, J., Daniel, J.Y., Le Coz, J.R. (1981). Possibles processes of nutritive adaptations for zooplankton : a demonstration on *Artemia*. *Kieler Meeresforsch., Sonderh.*, 5, 218-228
- Samain, J.F., Salaun, M., Diouris, M., Daniel, J.Y., Le Coz, J.R., Moal, J. (1991). Digestive enzymes during development of *Pecten maximus*, relations with ingestion and absorption processes. *13th. International Congress of E.S.C.P.B. : Research for aquaculture, fundamentals and applied aspects. Antibes-Juan Les Pins. 6-10 october 1991*
- Samuelsen, E.N., Imsland, A.K., Brix, O. (1999). Oxygen binding properties of three different hemoglobin genotypes in turbot, *Scophthalmus maximus* Rafinesque. *Fish Physiology and Biochemistry*, 20, 135-141
- Samuelson, L.C., Wiebauer, K., Gumucio, D.L., Meisler, M.H. (1988). Expression of the human amylase genes : recent origin of a salivary amylase promoter from an actin pseudogene. *Nucleic Acids Research*, 16, 8261-8276
- Scheele, G.A. (1993). Regulation of pancreatic gene expression in response to hormones and nutritional substrates, In : *The Pancreas : Biology, Pathology and disease*, II edition. Vay Liang W., Go W. *et al.*, Raven Press NY., p. 103-119
- Scheil, H.G., Günther, A. (1981). Amylases in *Dreissena polymorpha* Pall. (Mollusca : Eulamellibranchiata) : Evidence for two polymorphic systems. *Zoologischer Anzeiger*, 207, 120-122
- Schibler, U., Pittet, A.C., Young, R.A., Hagenbüchle, O., Tosi, M., Gellman, S., Wellauer, P.K. (1982). The mouse α -amylase multigene family sequence organization of members expressed in the pancreas, salivary gland and liver. *Journal of Molecular Biology*, 155, 247-266

- Schick, J., Verspohl, R., Kern, H., Scheele, G. (1984). Two distinct adaptative responses in the synthesis of exocrine pancreatic enzymes to inverse changes in protein and carbohydrate in the diet. *American Journal of Physiology*, 247, G611-G616
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 46, 69-81
- Schotton, D.M., Hartley, B.S. (1970). Amino-acid sequence of porcine pancreatic elastase and its homologies with other serine proteinases. *Nature*, 225, 802-806
- Schultz, R.M. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays*, 15, 531-538
- Schwantes, M.L.B., Schwantes, A.R. (1982a). Adaptative features of ectothermic enzymes. I. Temperature effects on the malate dehydrogenase from a temperate fish, *Leiostomus xanthurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 72, 49-58
- Schwantes, M.L.B., Schwantes, A.R. (1982b). Adaptative features of ectothermic enzymes. II. The effects of acclimation temperature on the malate dehydrogenase of the spot, *Leiostomus xanthurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 72, 59-64
- Sellos, D., Moal, J., Dégremont, L., Huvet, A., Daniel, J.Y., Nicoulaud, S., Boudry, P., Samain, J.F., Van Wormhoudt, A. (2003). Structure of amylase genes in populations of Pacific cupped oyster (*Crassostrea gigas*) : tissue expression and allelic polymorphism. *Marine Biotechnology*, 5, 360-372
- Sellos, D., Van Wormhoudt, A. (2002). Structure of the alpha-amylase genes in crustacean and molluscan : evolution of the exon-intron organization. *Biologia, Bratislava*, 57, 191-196
- Shaw, G., Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 46, 659-667
- Sheridan, A.K. (1997). Genetic improvement of oyster production-a critique. *Aquaculture*, 153, 165-179
- Sick, K., Nielsen, J.T. (1964). Genetics of amylase isozymes in the mouse. *Hereditas*, 51, 291-296
- Slaughter, S.L., Ellis, P.R., Butterworth, P.J. (2001). An investigation of the action of porcine pancreatic α -amylase on native and gelatinised starches. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1525, 29-36
- Smith, P.J., Ozaki, H., Fujio, Y. (1986). No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 20, 569-574
- Snook, J.T., Meyer, J.H. (1964). Responses of digestive enzymes to dietary protein. *Journal of Nutrition*, 82, 409-414
- Solomon, T.E. (1987). Control of the exocrine pancreatic secretion. In : *Physiology of Gastrointestinal Tract, 2nd Ed.* Johnson L.R. (ed.), Raven Press, New York, p. 1173-1207
- Sornin, J.M., Deslous-Paoli, J.M., Hesse, O. (1988). Experimental study of the filtration of clays by the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) : adjustment of particle size for best retention. *Aquaculture*, 69, 355-366
- Spannhof, L., Plantikow, H. (1983). Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture*, 30, 95-108
- Stein, E.A., Fischer, E.H. (1958). The resistance of alpha-amylases towards proteolytic attack. *The Journal of Biological Chemistry*, 232, 867-879

- Stein, E.A., Hsiu, J., Fischer, E.H. (1964). Alpha-amylases as calcium-metalloenzymes. I. Preparation of calcium-free apoamylases by chelation and electro dialysis. *Biochemistry*, 3, 56-61
- Steinhilber, W., Poensgen, J., Rausch, U., Kern, F., Scheele, G.A. (1988). Translational control of anionic trypsinogen and amylase synthesis in rat pancreas in response to caerulein stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 85, 6597-6601
- Stiefel, D.J., Keller, P.J. (1975). Comparison of human pancreatic and parotid amylase activities on different substrates. *Clinical Chemistry*, 21, 343-346
- Stojiljkovic, V., Milanovic, M., Milosevic, M., Andjelkovic, M., Marinkovic, D. (1995). Adaptive significance of amylase polymorphism in *Drosophila*. X. Analysis of alpha-amylase activity of two amylase variants in individual *Drosophila subobscura* flies. *Japanese Journal of Genetics*, 70, 487-495
- Strand, F.L. (1999). Gut and brain neuropeptides I. Neuropeptides : regulators of physiological processes. A Bradford book. Cambridge, MA : The MIT Press, 383-431
- Stuart, V., Head, E.J.H., Mann, K.H. (1985). Seasonal changes in the digestive enzyme levels of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas) in relation to diet. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 88, 243-256
- Svensson, B. (1988). Regional distant sequence homology between amylases, α -glucosidases and transglucanoylases. *FEBS Letters*, 230, 72-76
- Swanson, K.C., Matthews, J.C., Matthews, A.D., Howell, J.A., Richards, C.J., Harmon, D.L. (2000). Dietary carbohydrate source and energy intake influence the expression of pancreatic alpha-amylase in lambs. *The Journal of Nutrition*, 130, 2157-2165
- Tadlaoui-Ouafi, A. (1993). Évolution structurale et moléculaire de la famille multigénique amylase chez quelques Drosophilidae. *Thèse, Université Pierre et Marie Curie, Paris*, 142 pp
- Takada, T., Nakajima, H. (1992). An analysis of life history evolution in terms of the density-dependent Lefkovich Matrix model. *Mathematical Biosciences*, 112, 155-176
- Takeuchi, T., Matsushima, T., Sugimura, T. (1975). Separation of human α -amylase isozymes by electrofocusing and their immunological properties. *Clinica Chimica Acta*, 60, 207-213
- Tam, P.P., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y. (2003). Early endoderm development in vertebrates : lineage differentiation and morphogenetic function. *Current Opinion in Genetics Development*, 13, 393-400
- Temler, R.S., Dormond, C.A., Simon, E., Morel, B., Mettraux, C. (1984). Response of rat pancreatic proteases to dietary proteins, their hydrolysates and soybean trypsin inhibitor. *Journal of Nutrition*, 114, 270-278
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards : use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75, 291-295
- Thompson, J.M. (1952) The acclimatization and growth of the pacific oyster (*Gryphaea gigas*) in Australia. *Australian Journal of the Marine Freshwater Research*, 3, 64-73
- Thompson, J.M. (1958) The Naturalization of the pacific oyster in Australia. *Australian Journal of the Marine Freshwater Research*, 10, 144-149
- Thomsen, H.A., Buck, K.R. (1998). Nanoflagellates of the central California waters : taxonomy, biogeography and abundance of primitive, green flagellates (Pedinophyceae, Prasinophyceae). *Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography*, 45, 1687-1707
- Thorner, C.J.R., Cooper, P.M. (1963). Preparation of pig heart supernatant malate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 81, 397-399

- Tomita, N., Horii, A., Doi, S., Yokouchi, H., Shiosaki, K., Higashiyama, M., Matsuura, N., Ogawa, M., Mori, T., Matsubara, K. (1989). A novel type of human α -amylase produced in lung carcinoid tumor. *Gene*, 76, 11-18
- Torrissen, K.R. (1987). Genetic variation of trypsin-like isozymes correlated to fish size of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 62, 1-10
- Torrissen, K.R. (1991). Genetic variation in growth rate of Atlantic salmon with different trypsin-like isozymes patterns. *Aquaculture*, 93, 299-312
- Torrissen, K.R., Barnung, T.N. (1991). Genetic difference in trypsin-like isozyme pattern between two strains of Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture*, 96, 227-231
- Torrissen, K.R., Shearer, K.D. (1992). Protein digestion, growth and food conversion in Atlantic salmon and Arctic char with different trypsin-like isozyme patterns. *Journal of Fish Biology*, 41, 409-415
- Tosi, M., Bovey, R., Astolfi, S., Bodary, S., Meisler, M., Wellauer, P.K. (1984). Multiple non-allelic genes encoding pancreatic alpha-amylase of mouse are expressed in a strain-specific fashion. *The EMBO Journal*, 3, 2809-2816
- Trainer, D.G., Tillinghast, E.K. (1982). Amylotic activity of the crystalline style of *Mya arenaria* (Bivalvia, Mollusca). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology*, 72, 99-103
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S.A., Orlando, C. (2002). Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction : normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*, 309, 293-300
- Tricoli, J.V., Shows, T.B. (1984). Regional assignment of human amylase to p22-p21 of chromosome 1. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 10, 205-210
- Tsukagoshi, N., Furukawa, M., Nagaba, H., Kirita, N., Tsuboi, A., Udaka, S. (1989). Isolation of a cDNA encoding *Aspergillus oryzae* Taka-amylase A : evidence for multiple related genes. *Gene*, 84, 319-327
- Turelli, M., Ginzburg, L.R. (1983). Should individual fitness increase with heterozygosity ? *Genetics*, 104, 191-209
- Ugwumba, A.A.A. (1993). Carbohydrases in the digestive tract of the african bony-tongue *Heterotis niloticus* (Pisces, Osteoglossidae). *Hydrobiologia*, 257, 95-100
- Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155
- Van Praet, M. (1982). Activités amylasiques et protéasiques chez les actinies, influence de l'alimentation sur les activités mesurées. *Actes de Colloques CNEXO*, 14, 221-230
- Van Schaftingen, E., Detheux, M., Veiga da Cunha, M. (1994). Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8, 414-419
- Van Wormhoudt, A. (1980). Régulation d'activité de l' α -amylase à différentes températures d'adaptation et en fonction de l'ablation des pédoncules oculaires et du stade de mue chez *Palaemon serratus*. *Biochemistry, Systematics and Ecology*, 8, 193-203
- Van Wormhoudt, A., Bourreau, G., Le Moullac, G. (1995). Amylase polymorphism in Crustacea Decapoda : electrophoretic and immunological studies. *Biochemistry, Systematics and Ecology*, 23, 139-149
- Van Wormhoudt, A., Favrel, P. (1988). Electrophoretic characterization of *Palaemon elegans* (Crustacea, Decapoda) amylase system : a study of amylase polymorphism during the intermoult cycle. *Compound Biochemistry and Physiology*, 89B, 201-207

- Van Wormhoudt, A., Sellos, D. (1996). Cloning and sequencing analysis of three amylase cDNAs in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea decapoda) : evolutionary aspects. *Journal of Molecular Evolution*, 42, 543-551
- Van Wormhoudt, A., Sellos, D. (2003). Highly variable polymorphism of the alpha-amylase gene family in *Litopenaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Molecular Evolution*, 57, 659-671
- Vinogradov, A.E. (2004). Compactness of human housekeeping genes : selection for economy or genomic design ? *Trends in genetics : TIG*, 20, 248-253
- Wakim, J., Robinson, M., Thoma, J.A. (1969). The active site of porcine pancreatic α -amylase : factors contributing to catalysis. *Carbohydrate Research*, 10, 487-503
- Waller, T.R. (1981). Functional morphology and development of veliger larvae of the european oyster, *Ostrea edulis* Linné. *Smithsonian Contributions to Zoology (City of Washington)*, 328, 1-66
- Walne, P.R. (1974). Culture of Bivalve molluscs : 50 years experience at Conwy. Fishing News Book, 189 pp
- Wang, L.H., Chen, L. (1996). Organization of the gene encoding human prostacyclin synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226, 631-637
- Warshaw, A.L., Lee, K.H. (1977). Characteristic alteration of serum isoenzymes of amylase in diseases of liver, pancreas, salivary gland, lung and genitalia. *Journal of Surgical Research*, 22, 362-369
- Weinhouse, S. (1976). Regulation of glucokinase in liver. *Current Topics in Cellular Regulation*, 11, 1-50
- Wicker, C., Puigserver, A. (1989). Changes in mRNA levels of rat pancreatic lipase in the early days of consumption of a high-lipid diet. *European Journal of Biochemistry*, 180, 563-567
- Wicker, C., Puigserver, A., Rausch, U., Scheele, G., Kern, H. (1985). Multiple-level caerulein control of the gene expression of secretory proteins in the rat pancreas. *European Journal of Biochemistry*, 151, 461-466
- Wicker, C., Scheele, G.A., Puigserver, A. (1988). Pancreatic adaptation to dietary lipids is mediated by changes in lipase mRNA. *Biochimie*, 70, 1277-1283
- Wieschaus, E. (1996). Embryonic transcription and the control of developmental pathways. *Genetics*, 142, 5-10
- Yamada, A., Takano, K., Kamoi, I. (1991). Purification and properties of amylases from tilapia intestine. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 1903-1909
- Yamada, A., Takano, K., Kamoi, I. (1996). Purification and properties of amylase from tilapia stomach. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 62, 269-274
- Yamate, N., Yamazaki, T. (1999). Is the difference in alpha-amylase activity in the strains of *Drosophila melanogaster* with different allozymes due to transcriptional or posttranscriptional control ? *Biochemical Genetics*, 37, 345-356
- Yamazaki, T., Matsuo, Y. (1984). Genetic analysis of natural populations of *Drosophila melanogaster* in Japan. III. Genetic variability of inducing factors of amylase and fitness. *Genetics*, 108, 223-235
- Yardley, D.G. (1988). The amylase gene-enzyme system of fishes. I. Developmental expression of amylase in the mosquitofish. *The Journal of Experimental Zoology*, 245, 24-32
- Yardley, D.G., Gapusan, R.A., Jones, J.E., Hughes, B.L. (1988). The amylase gene-enzyme system of chickens. I. Allozymic and activity variation. *Biochemical Genetics*, 26, 747-755

Références bibliographiques

- Yardley, D.G., Moussatos, V.V., Martin, M.P. (1983). The amylase system of *Drosophila*. II. Effects of development and diet on amylase activity in *Drosophila pseudoobscura*. *Insect Biochemistry*, 13, 543-548
- Yardley, D.G., Wild, S.E. (1991). Effects of diet on amylase expression in the mosquitofish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 9, 31–37
- Yokouchi, H., Horii, A., Emi, M., Tomita, N., Doi, S., Ogawa, M., Mori, T., Matsubara, K. (1990). Cloning and characterization of a third type of human α -amylase gene, AMY2B. *Gene*, 90, 281-286
- Zakowski, J.J., Bruns, D.E. (1985). Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 21, 283-322
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C. (1994). Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12, 399-408

LISTE DES ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Article associé à l'étude *in situ* des relations polymorphisme/fonction associées aux gènes de l'amylase.

Prudence, M., Moal, J., Boudry, P., Daniel, J.Y., Quéré, C., Jeffroy, F., Mingant, C., Ropert, M., Bédier, E., Van Wormhoudt, A., Samain, J.F., Huvet, A. Amylase gene polymorphism is associated with growth differences in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*. (Soumis à *Animal Genetics*).

Annexe 2. Valorisations scientifiques du travail de thèse

1 **ANNEXE 1**

2 **Article soumis à *Animal Genetics***

3
4 **TITLE:**

5 *Amylase* gene polymorphism is associated with growth differences in the Pacific cupped
6 oyster *Crassostrea gigas*

7
8 **Authors:**

9 M Prudence¹, J Moal¹, P Boudry², J-Y Daniel¹, C Quéré¹, F Jeffroy¹, C Mingant¹, M Ropert³,
10 E Bédier⁴, A Van Wormhoudt⁵, J-F Samain¹, A Huvet^{1*}

11
12 **Address:**

13 ¹ UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer, Centre de Brest,
14 B.P 70, 29280 Plouzané, France; ² Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, 17390 La
15 Tremblade, France; ³ Laboratoire Environnement Ressources Normandie, Ifremer, BP 32,
16 14520 Port en Bessin, France; ⁴ Laboratoire Environnement Ressources Morbihan Pays de la
17 Loire, Ifremer, 56470 La Trinité, France; ⁵ UMR 5178, Station de Biologie Marine du
18 Muséum National d'Histoire Naturelle, BP225, 29900 Concarneau, France.

19
20 *** Corresponding author:**

21 Arnaud Huvet. Email: ahuvet@ifremer.fr

22 UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer, Centre de Brest, B.P.
23 70, 29280 Plouzané, France

24 Phone: +33 (0)2 98 22 46 93 - Fax: +33 (0)2 98 22 46 53

25
26 **Running title:** *Amylase* genotype affects oyster growth

27 **SUMMARY:**

28 This paper investigates the non-neutrality of genetic polymorphism in α -amylase, a key
29 enzyme for carbohydrate digestion, in the oyster *Crassostrea gigas*. We report the growth and
30 survival of *amylase* genotypes in five bi-parental families of *C. gigas*, bred to be polymorphic
31 for two PCR-RFLP amylase markers. These progenies were reared and studied for one year
32 under standard culture conditions in two oyster production sites.

33 Differences in growth were observed between genotypes and between the different sites. A
34 relationship between *amylase* polymorphism and growth is therefore established in oysters,
35 suggesting that the amylase genes might be under selection due to their digestive function.
36 Estimated daily yield was different between *amylase* genotypes indicating the potential value
37 of amylase markers in oyster selective breeding programs.

38 For genotypes showing significant growth differences at the within family level, enzymatic
39 parameters (specific amylase activity and apparent Michaelis-Menten constant) were
40 analyzed. The specific amylase activity was significantly different between the genotypes
41 within one family and was positively correlated with weight differences. Specific amylase
42 activity was therefore affected by amylase polymorphism and may be partly responsible for
43 weight differences observed between amylase genotypes in this experiment.

44

45 **Keywords:** amylase - bivalve - digestive enzyme - genotype - growth - polymorphism

46

46 **1. Introduction**

47 Knowledge about bivalve feeding strategies, digestive capacities and conversion efficiencies
48 under different food availability conditions is important for aquaculture, as are the effects of
49 these factors on different phenotypic traits such as growth and survival. Assimilation is one of
50 the principal factors explaining growth variation in marine bivalves, as are: feeding rate,
51 aneuploidy and allozyme heterozygosity for metabolic pathways (Pogson & Zouros, 1994;
52 Hawkins & Day, 1996; Bayne et al., 1999; Leitão et al., 2001). Assimilation has been
53 reported to be mainly controlled by ingestion processes in relation to requirements and
54 activities of digestive enzymes, especially α -amylase (α -1, 4 glucan-4-glucanohydrolase)
55 which is the main enzyme for starch digestion (Samain et al., 1981; Ibarrola et al., 1998). In
56 oysters, amylase specific activity has been found to depend on food availability, ingestion and
57 nutritional rhythms (Moal et al., 2000; Huvet et al., 2003).

58 Numerous examples of the non-neutrality of *amylase* polymorphism exist in different
59 animal species. *Amylase* polymorphism in chicken was reported to affect growth and food
60 conversion, mainly because of the specific amylase activity, which suggests that selection
61 using *amylase* markers could improve growth and/or feed efficiency performance (Hughes et
62 al., 1994). Positive correlations were also observed between *amylase* genotype and food
63 preference in *Crustacea* (Guarna & Borowsky, 1993) and between *amylase* genotype and the
64 production of amylase enzyme in *Drosophila* (Hickey, 1981; Stojiljkovic et al., 1995).

65 In the Pacific oyster *C. gigas*, two genes (*A* and *B*) coding for two *amylase* mRNAs were
66 recently characterised (Sellos et al., 2003). Polymorphism of these two *amylase* genes was
67 analysed by PCR-RFLP in the most variable section of the deduced mature protein and
68 revealed six different alleles for gene *A* and four for gene *B* (Sellos et al., 2003).
69 Polymorphism of a microsatellite locus (TC) present in intron 4 of gene *A* was also analyzed
70 in European and Asian *C. gigas* and *Crassostrea angulata* populations (Huvet et al., 2004),

71 leading to the hypothesis that selective processes were at work at this locus in one Portuguese
72 population of *C. angulata*.

73 The present study tests the hypothesis of non-neutrality of the *amylase* polymorphism
74 in oyster and looks for relationships between *amylase* genotype and phenotypic traits. Growth
75 and survival of different *amylase* genotypes were examined within five different bi-parental
76 families of *C. gigas*, bred to be polymorphic for two PCR-RFLP amylase markers and reared
77 over one year under standard culture conditions in two French aquaculture sites which had
78 different trophic conditions. For genotypes showing significant within family growth
79 differences, enzymatic parameters were also analyzed.

80

81 **2. Material and Methods**

82 *2.1 Biological material*

83 400 wild oysters were collected in Marennes-Oléron Bay (France) and genotyped for two
84 *amylase* markers using Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length
85 Polymorphism (PCR-RFLP) analysis as described in Sellos et al. (2003). Heterozygote
86 oysters were chosen as parents and used to produce five different bi-parental families (Table
87 1) at the IFREMER hatchery in Argenton (France). The experimental procedure of crosses
88 and larval rearing are detailed in Dégremont et al. (2005). The spat were then grown on at the
89 IFREMER station in Bouin (France). At the age of nine months, the animals were placed at
90 the rearing sites. No significant size differences were observed between families or between
91 genotypes within family at the 5% level, except within the family 1, $P=0.035$, meaning that
92 the groups consisted of animals of homogeneous size. The oysters were placed in two rearing
93 sites, Fort-Espagnol in the southern Brittany sound and Baie des Veys sound in Normandy,
94 for one year (from March 2003 (T0) to February 2004 (T1)). These sites were chosen for their
95 difference in trophic conditions. Previous studies on oyster growth performance identified

96 Baie des Veys as an area conducive to high growth for oyster aquaculture (Fleury et al.,
97 2003). During the period of our study between March and August 2003, mean chlorophyll a
98 levels were higher in Baie des Veys than in Fort-Espagnol (mean value of chlorophyll a = 4.9
99 $\mu\text{g/L}$ in Baie des Veys and 3.3 $\mu\text{g/L}$ in Fort Espagnol, M. Ropert and J.F. Bouget,
100 unpublished data).

101 Oysters were reared under standard culture conditions in the two sites, *i.e.* in plastic
102 mesh bags each containing 450 individuals (3 bags per family), on traditional oyster-growing
103 tables (70 cm high). At T0 and T1 (families 2, 3 and 5 only were sampled at T1),
104 approximately 150 oysters (about one third of a bag) were randomly collected from each
105 family for genotyping and testing of biological parameters (see below).

106

107 2.2 PCR-RFLP analysis

108 For both parents and progenies, gill fragments were collected individually by biopsy (during
109 anaesthesia in 50% seawater – 50% freshwater with 0.25 M MgCl_2) and were preserved in
110 95% ethanol until DNA extraction (performed by a Chelex-based method as described by
111 Estoup *et al.* (1996)). For PCR-RFLP analysis, 1179 and 1214 bp segments of genes *A* and *B*
112 were amplified by PCR using Ha-aH, Hb0-bH and Hb1-bH primers respectively (Sellos et al.,
113 2003). Two primer pairs were used for gene *B*, Hb0-bH and Hb1-bH (Hb1: 5'- GTA GCA
114 CAG GAG ATG GCA -3'; Hb0 5'- GTA GCA CAG GAG ATG GCG -3'), to avoid bias due
115 to an A/G mutation in the 3' position of the Hb primer used in Sellos et al. (2003). The
116 corresponding null allele (*i.e.* not detected by the Hb primer), named B5, was amplified by
117 PCR using Hb1-bH whilst all other alleles were amplified using the Hb0-bH primer pair (B5,
118 Genbank accession number **DQ286954**). PCRs for all primer pairs were carried out in a total
119 volume of 25 μl using 10 ng of genomic DNA, the PCR products were then digested using

120 *EcoRI* endonuclease and separated by electrophoresis on 1% agarose gel according to
121 protocols described in Sellos et al. (2003).

122 A novel allele of gene *B* was revealed by the PCR-RFLP analysis. PCR products
123 corresponding to this allele were gel-extracted (QIAquick gel extraction kit, Qiagen) and
124 subcloned into pCR 2.1® TOPO plasmid (Invitrogen). Both strands were sequenced with the
125 T7 sequenase quick-denatured plasmid sequencing kit from USB Corporation and ³⁵SdATP.
126 This new allele is 1231 bp long with 2 *EcoRI* sites and was named B6; its Genbank accession
127 number is **DQ286955**.

128

129 *2.3 Biological parameters*

130 At T0 and T1, the 150 oysters randomly collected from each family for genotyping (only
131 families 2, 3 and 5 at T1) were also measured individually for total wet weight (to the nearest
132 0.1g) and wet flesh weight after draining (to the nearest 0.1g). Mortality was estimated by
133 counting the number of live and dead oysters in each bag at the end of the experiment.

134

135 *2.4 Enzymatic analysis*

136 At the final step of the experiment (T1), enzymatic assays were carried out on the digestive
137 glands of 30 oysters of each genotype collected from two families (2 and 3) reared at Fort-
138 Espagnol (southern Brittany sound) where significant differences in weight were observed
139 between genotypes. Three replicate pools of ten digestive glands per genotype were ground in
140 liquid nitrogen with a Danguomeau grinder. Samples (80mg) of the powder produced were
141 homogenized in distilled water with 0.02M CaCl₂, sonicated to ensure total tissue rupture and
142 assayed for: α -amylase activity (according to Le Moine et al., 1997), soluble protein content
143 (according to Lowry et al., 1951) and apparent Michaelis-Menten constant (K_M , determined

144 using a series of starch concentrations (0.07-0.1-0.2-0.5-1 mg/ml) and estimated after
145 Lineweaver-Burk transformation).

146

147 *2.5 Statistical analysis*

148 All statistical analyses, including tests of normality, were performed using one-way analyses
149 of variance (ANOVA) followed by multiple comparison tests with the least significant
150 difference (LSD) method (differences were considered significant below the 5% level) using
151 STATGRAPHICS software (version 5.0). Survival was analysed using the transformed
152 variable: $Y = \text{Arcsin}(\text{square root}(\text{survival percentage}))$.

153 Comparisons of genotypic distributions between the beginning (T0) and the end (T1)
154 of the rearing period and between sites (at T1) were made using Chi-square tests. In cases
155 where $N < 5$, a Chi-square test was used with Yate's correction.

156

157 **3. Results**

158 3.1 Linkage of amylase genes

159 Four main genotypes (frequency > 0.05) were observed in the families, except in family 1
160 where only 3 main genotypes were observed (Table 1). Observed genotypes and their
161 frequencies at T0 are highly consistent with those expected under the hypothesis of strong
162 linkage between genes *A* and *B* (complete linkage would have led to a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ segregation in
163 family 1 and $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{4}$ segregations in the other families). Were the two genes completely
164 independent, 9 different genotypes would be expected in family 1, and 12 genotypes in family
165 4, and 16 genotypes in the 3 other families. These expected frequencies are however
166 significantly different from our observed frequencies at the 1% level (using Chi-square tests).
167 Only 2 low frequency genotypes, not expected in case of complete linkage of the two genes,

168 were observed in families 1 and 2. In family 5, 3 of these low frequency genotypes were
169 found.

170 Percentage crossing-over was estimated from the relative number of recombinant
171 individuals out of the total number of individuals genotyped. This ranged from 0% in families
172 3 and 4 to 3.8% in families 2 and 5. For all families together, the mean percentage of
173 recombinant genotypes was 1.7%, corresponding to an approximate distance of 1.7 cM
174 between genes *A* and *B*.

175

176 *3.2 Survival*

177 Survival was very high in Normandy, ranging from 90.5 ± 0.7 in family 3 to 94.6 ± 0.6 % in
178 family 5 (Table 2). Survival was lower in south Brittany, ranging from 42.7 ± 3.2 in family 3
179 to 96.7 ± 0.6 % in family 5. Within families 2, 3 and 5 which were analyzed for their
180 genotypic composition at both T0 and T1, no significant differences in genotypic frequencies
181 were observed over time in either site (Table 1).

182

183 *3.3 Growth and estimated yield*

184 Total and flesh weights were much higher in Normandy than in southern Brittany. Mean
185 differences in total weight between the two sites ranged from 19.3 ± 2.2 g in family 2 to 11.5
186 ± 3.0 g in family 3, corresponding to inter-site differences of 80% and 40% respectively.
187 Between families, similar differences and rankings were observed for values of total and flesh
188 weights in the two locations (Table 2).

189 Within families, significant differences in total and flesh weights were observed
190 between genotypes at T1 in families 2 and 3 ($P < 0.05$) but not in family 5 (Figure 1). In
191 family 2 in southern Brittany, 3 different groups were observed: A1A2B2B2, which had the
192 highest total and flesh weights; A1A1B1B2 and A1A5B1B6, which had significantly lower

193 weights than the first group; and finally A2A5B2B6 which showed intermediate values.
194 Differences between the extreme genotypes (A1A2B2B2 and A1A5B1B6) were 4.9 g and 0.5
195 g for total and flesh weights respectively, corresponding to differences of 32% and 37%. In
196 Normandy however, statistical differences like these were only observed for total weight
197 between the genotypes within family 2. A similar pattern was shown here, apart from the
198 genotype A1A5B1B6 which had an intermediate value in Normandy (grouping statistically
199 with A2A5B2B6) but the lowest value in southern Brittany (grouping statistically with
200 A1A1B1B2) (Figure 1). The maximum difference observed between extreme genotypes was
201 smaller in Normandy than in Brittany, with an overall maximum difference of 19% between
202 genotypes A1A2B2B2 and A1A1B1B2.

203 Within family 3, the weights of the 4 different genotypes were not significantly
204 different in Normandy, whereas they clustered into 2 significantly different groups in southern
205 Brittany (Figure 1). Genotype A3A6B1B1 showed significantly higher total and flesh weights
206 than those observed for genotypes A1A6B1B5 and A1A2B2B5 (difference of 25 to 34%,
207 respectively). The fourth genotype, A2A3B1B2, had intermediate weights.

208 When significant weight differences were observed, daily yield was estimated as described in
209 Dégremont et al. (2005). In our Brittany site, daily yield ranged between 3.4 % per day for
210 A1A5B1B6 and 3.7 % per day for A1A2B2B2 within family 2. Within family 3, it ranged
211 between 2 % per day for A1A6B1B5 and 2.8 % per day for A3A6B1B1.

212

213 *3.4 Enzymatic parameters*

214 As the different genotypes present in families 2 and 3 showed significant differences in total
215 and flesh weights in southern Brittany, their amylase enzymatic parameters were analysed.
216 Specific amylase activity was only significantly different between genotypes in family 3 ($P =$
217 0.049). Values ranged from 0.94 ± 0.04 to 1.38 ± 0.23 IU/mg soluble protein for genotypes

218 A1A6B1B5 and A3A6B1B1 respectively. They ranged from 1.17 ± 0.01 to 1.33 ± 0.17 within
219 family 2 ($P = 0.269$). No significant differences of K_M values were observed between
220 genotypes within these two families (family 2: mean value = 0.55 ± 0.08 , $P = 0.147$; family
221 3: mean value = 0.6 ± 0.04 , $P = 0.158$).

222

223 **4. Discussion**

224 *4.1 Linkage between the two oyster amylase genes*

225 Genotype frequencies observed in the studied families clearly demonstrate that *amylase* genes
226 *A* and *B* did not segregate independently and thus that they are linked on the same
227 chromosome making recombination between them very limited. Different *amylase* genes have
228 been reported on the same chromosome in many organisms, e.g. human, mouse and
229 *Drosophila*, (Levy *et al.*, 1985; Pittet & Schibler, 1985; Gumucio *et al.*, 1988), and are
230 separated by a maximum of 0.87 cM in mouse (between the salivary and pancreatic *amylase*
231 genes, Bloor & Meisler, 1980). In our results, the low percentage of recombinant genotypes
232 suggests a small genetic distance close to 1.7 cM between the two *amylase* genes.

233

234 *4.2 Amylase polymorphism and its relationship with growth and yield*

235 *Amylase* genotypes within families 2 and 3 showed significant differences in weight
236 measurements, suggesting a correlation between *amylase* gene polymorphism and oyster
237 growth. Such a result suggests that the *amylase* genes could be under selection due to their
238 digestive function, as has been suggested in other organisms (such as chicken, Hughes *et al.*,
239 1994). This supports the putative non-neutrality of the microsatellite marker, present in intron
240 4 of *amylase* gene *A*, shown to be affected by linkage disequilibrium of polymorphic *amylase*
241 exons in one Portuguese population of oysters (Huvet *et al.*, 2004). Another possible
242 explanation is that *amylase* genes have no direct effect on fitness via growth but are affected

243 by linkage disequilibrium of linked non-neutral genes (i.e. genetic hitchhiking, see Barton,
244 2000), although this is unlikely to explain the observed relationship between *amylase*
245 polymorphism and growth.

246 The weight differences between *amylase* genotypes were particularly apparent in our
247 site in southern Brittany. Growth therefore seems to be more influenced by *amylase* genotype
248 under low food availability. This genotype x environment interaction suggests that some
249 *amylase* genotypes are better adapted to certain environments than others.

250 Taking into account differences in weight and similarity of survival (at the within
251 family level), estimated daily yield appeared different between *amylase* genotypes suggesting
252 that it would be useful to consider these markers for use in oyster selective breeding. To
253 assess their usefulness in selection for growth, further studies will be needed (e.g.
254 comparisons of homozygote lines) to examine whether the *amylase* polymorphism-growth
255 relationship is due to the specific combination of alleles at the two genes, or to the effect of
256 heterozygosity at each locus. Indeed, correlation between heterozygosity and fitness is widely
257 predicted by population genetics models (e.g. Turelli & Ginzburg, 1983) and was postulated
258 in *C. gigas* between the *Phosphoglucomutase-2* locus and growth (Pogson, 1991). Our *C.*
259 *gigas* families, bred to be polymorphic at the two PCR-RFLP *amylase* markers, were more
260 heterozygous than randomly bred families would have been. In wild *C. gigas* populations,
261 oysters were commonly found to be homozygous (from 60 to 70%) at each *amylase* marker
262 (Sellos et al., 2003), with one allele much more frequent than others at each locus.

263 In our study, the progenies exhibited clear differences in weight and mortality between
264 sites, and inter-family differences within sites (especially in Brittany). These results confirm
265 the existence of genetically-based variation for both traits in oyster (Sheridan, 1997; Ernande
266 et al., 2004; Dégremont et al., 2005) and the strong influence of environmental conditions
267 (e.g. Mann et al., 1991).

268

269 *4.3 Specific amylase activity may partly explain growth difference between amylase genotypes*

270 At the end of the experiment, specific amylase activity appeared to be slightly affected by
 271 *amylase* polymorphism within the family 3, whereas K_M was not. Activity values for
 272 genotypes correlated well with weight in southern Brittany. A2A3B1B2 and A3A6B1B1
 273 showed both the highest weights and highest values of specific amylase activity, A1A2B2B5
 274 had intermediate values and A1A6B1B5 had the lowest values of both parameters. The
 275 growth differences between genotypes in this family can therefore be partly explained by
 276 differences in specific amylase activity. This reflects a change in enzyme quantity rather than
 277 a change in catalytic efficiency, as found in *Drosophila melanogaster* (Hickey, 1981; Hickey
 278 & Benkel, 1982) and chicken (Hughes et al., 1994).

279

280 In conclusion, we observed a relationship between *amylase* polymorphism and growth in the
 281 Pacific cupped oyster *C. gigas* (putatively mediated via variation in specific amylase activity)
 282 which suggests that it could be useful to evaluate amylase markers for use in oyster selective
 283 breeding programs. Further investigation is now required into digestive parameters (i.e.
 284 absorption, assimilation) and the amylase parameters which depend on the polymorphism and
 285 food availability (mRNA level, activity), to provide an understanding of the observed
 286 relationship between *amylase* polymorphism and growth in terms of physiological
 287 parameters.

288

289 **Acknowledgements**

290 We are indebted to H. McCombie for her help with the English. We thank L. Dégremont for
 291 providing the parental oysters and all the staff of the Argenton, Bouin, La Trinité and Port en
 292 Bessin stations for providing experimental oysters which had been kept under controlled

293 conditions and for the maintenance of oysters in the field. M. Prudence was funded by a
294 Région Basse-Normandie doctoral grant. This work was partly supported by the Bureau des
295 Ressources Génétiques (contract n°05/5210460/YF); by the MOREST national project funded
296 by IFREMER; by the Conseil Général du Calvados; and by the Régions of Basse-Normandie,
297 Bretagne, Pays de la Loire and Poitou-Charentes.

298

299 **References**

300 Barton N.H. (2000) Genetic hitchhiking. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 355, 1553-
301 62.

302 Bayne B.L., Hedgecock D., McGoldrick D., Rees R. (1999) Feeding behaviour and metabolic
303 efficiency contribute to growth heterosis in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg).
304 *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 233, 115-130.

305 Bloor J.H., Meisler M.H. (1980) Additional evidence for the close linkage of amy-1 and amy-
306 2 in the mouse. *J. Hered.* 71, 449-451.

307 Dégremont L., Bédier E., Soletchnik P., Ropert M., Joly J.P., Huvet A., Moal J., Samain J.F.,
308 Boudry P. (2005) Variability of survival, growth and yield of hatchery-produced Pacific
309 oyster spat (*Crassostrea gigas*). Relative importance of family, site and field placement
310 timing on survival, growth and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat
311 (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 249, 213-229.

312 Estoup A., Largiader C.D., Perrot E., Chourrout D. (1996) Rapid one-tube extraction for
313 reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol. Mar. Biol.*
314 *Biotechnol.* 5, 295-598.

315 Ernande B., Boudry P., Clobert J., Haure J. (2004) Plasticity in resource allocation based life
316 history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I Spatial variation in food
317 abundance. *J. Evol. Biol.* 17, 342-356.

- 318 Fleury P.G., Le Ber E., Claude S., Cornette F., d'Amico F., Guilpain P., Palvadeau H., Robert
319 S., Le Gall P., Ropert M., Simonne C., Vercelli C. (2003) Comparison of Pacific oyster
320 (*Crassostrea gigas*) rearing results (survival, growth, quality) in French farming areas,
321 after a 10-year monitoring (1993-2002) by the Ifremer/Remora network. *J. Shellfish Res.*
322 22, 330.
- 323 Guarna M.M., Borowsky R.L. (1993) Genetically controlled food preference: biochemical
324 mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5257-5261.
- 325 Gumucio D.L., Wiebauer K., Caldwell R.M., Samuelson L.C., Meisle, M.H. (1988)
326 Concerted evolution of human amylase genes. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1197-1205.
- 327 Hawkins A.J.S., Day A.J. (1996) The metabolic basis of genetic differences in growth
328 efficiency among marine animals. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 203, 93-115.
- 329 Hickey D.A. (1981) Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster*: variation in
330 the number of enzyme molecules produced by different amylase genotypes. *Biochem.*
331 *Genet.* 19, 783-796.
- 332 Hickey D.A., Benkel B. (1982) Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster*:
333 effects of dietary carbohydrate. *Biochem. Genet.* 20, 1117-1129.
- 334 Hughes B.L., Suniga R.G., Yardley D.G. (1994) Influence of amylase genotypes on growth
335 rate and feed conversion of chickens. *Poult. Sci.* 73, 953-957.
- 336 Huvet A., Dubois S., Daniel J.Y., Quéré C., Prudence M., Van Wormhoudt A., Sellos D.,
337 Samain J.F., Moal J. (2003). Tissue expression of two amylase genes in the Pacific oyster
338 *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture* 228, 321-333.
- 339 Huvet A., Fabioux C., McCombie H., Lapègue S., Boudry P. (2004) Natural hybridization
340 between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata*
341 highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Mol. Ecol.*
342 *Prog. Ser.* 272, 141-152.

- 343 Ibarrola I., Navarro E., Iglesias J.I.P. (1998) Short-term adaptation of digestive processes in
344 the cockle *Cerastoderma edule* exposed to different food quantity and quality. *J. Comp.*
345 *Physiol.* 168B, 32-40.
- 346 Leitão A., Boudry P., Thiriou-Quévieux C. (2001) Negative correlation between aneuploidy
347 and growth in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. *Aquaculture*
348 193, 39-48.
- 349 Le Moine S., Sellos D., Moal J., Daniel J.Y., Serrano F.S.J., Samain J.F., Van Wormhoudt A.
350 (1997) Amylase in *Pecten maximus* (Mollusca, bivalves): protein and cDNA
351 characterization, quantification of the expression in the digestive gland. *Mol. Mar. Biol.*
352 *Biotech.* 6, 228-237.
- 353 Levy J.N., Gemmill R.M., Doane W.W. (1985) Molecular cloning of alpha-amylase genes for
354 *Drosophila melanogaster*. II. Clone organization and verification. *Genetics* 110, 313.
- 355 Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the
356 Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 251.
- 357 Mann R., Burreson E.M., Baker P.K. (1991) The decline of the Virginica oyster fishery in
358 Chesapeake bay: considerations for introduction of a non-endemic species, *Crassostrea*
359 *gigas* (Thunberg, 1793). *J. Shellfish Res.* 10, 379-388.
- 360 Moal J., Daniel J.Y., Sellos D., Van Wormhoudt A., Samain J.F. (2000) Amylase mRNA
361 expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles. *J. Comp. Physiol.* 170B, 21-26.
- 362 Pittet A.C., Schibler U. (1985) Mouse alpha-amylase loci, Amy-1^a and Amy-2^a, are closely
363 linked. *J. Mol. Biol.* 182, 359-365.
- 364 Pogson G.H., 1991. Expression of overdominance for specific activity at the
365 Phosphoglucosmutase-2 locus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genetics* 128, 133-
366 141.

- 367 Pogson G.H., Zouros E., 1994. Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth
368 rate in the scallop *Placopecten magellanicus*: a test of the associative overdominance
369 hypothesis. *Genetics* 137, 221-231.
- 370 Samain J.F., Moal J., Daniel J.Y., Le Coz J.R. (1981) Possible processes of nutritive
371 adaptations for zooplankton : a demonstration on *Artemia*. *Kieler Meeresforsch, Sonderh.*
372 5, 218-228.
- 373 Sellos D., Moal J., Dégremont L., Huvet A., Daniel J.Y., Nicoulaud S., Boudry P., Samain
374 J.F., Van Wormhoudt A (2003) Structure of amylase genes in populations of Pacific
375 cupped oyster (*Crassostrea gigas*): tissue expression and allelic polymorphism. *Mar.*
376 *Biotech.* 5, 360-372.
- 377 Sheridan A.K. (1997) Genetic improvement of oyster production-a critique. *Aquaculture* 153,
378 165-179.
- 379 Stojiljkovic V., Milanovic M., Milosevic M., Andjelkovic M., Marinkovic D. (1995)
380 Adaptive significance of amylase polymorphism in *Drosophila*. X. Analysis of alpha-
381 amylase activity of two amylase variants in individual *Drosophila subobscura* flies. *Jpn. J.*
382 *Genet.* 70, 487-495.
- 383 Turelli M., Ginzburg L.R. (1983) Should individual fitness increase with heterozygosity?
384 *Genetics* 104, 191-209.
- 385

385 **Tables and Figures**

386 Table 1. The five different families bred from parents chosen according to their genotypes at 2
 387 amylase loci; expected and observed genotype frequencies at the amylase loci at the
 388 beginning of the experiment (T0) and in families 2, 3 and 5 at the end of the experiment (T1)
 389 after one year of rearing in two different French aquaculture areas (southern Brittany and
 390 Normandy). The expected genotype frequencies are given under the hypothesis of linkage
 391 between amylase genes A and B.

family		Parental genotypes	Observed progeny genotypes	Expected frequency in %	Observed frequency in % (number of individuals)	Observed frequency T0 in % (number of Brittany individuals)	Observed frequency T1 in % (number of Normandy individuals)	
1	Dam	A1A2B1B5	A1A1B5B5	25	25.0 (44)			
			A1A2B1B5	50	47.7 (84)			
	Sire	A1A2B1B5	A2A2B1B1	25	26.1 (46)			
			A1A1B1B5	0	0.6 (1)			
			A1A2B1B1	0	0.6 (1)			
2	Dam	A1A2B1B2	A1A1B1B2	25	19.5 (26)	23.0 (34)	24.2 (36)	
			A1A2B2B2	25	24.1 (32)	22.3 (33)	32.2 (48)	
	Sire	A1A5B2B6	A1A5B1B6	25	22.6 (30)	33.8 (50)	22.1 (33)	
			A2A5B2B6	25	30.1 (40)	20.9 (31)	21.5 (32)	
				A1A5B2B6	0	2.2 (3)		
				A2A5B2B2	0	1.5 (2)		
3	Dam	A1A3B1B5	A1A2B2B5	25	26.4 (33)	28 (42)	28.0 (42)	
			A1A6B1B5	25	24.8 (31)	26.7 (40)	26.0 (39)	
	Sire	A2A6B1B2	A2A3B1B2	25	18.4 (23)	18 (27)	23.3 (35)	
			A3A6B1B1	25	30.4 (38)	27.3 (41)	22.7 (34)	
4	Dam	A1A3B1B5	A1A1B1B5	25	24.6 (33)			
			A1A3B1B1	25	27.6 (37)			
	Sire	A1A3B1B3	A1A3B3B5	25	22.4 (30)			
			A3A3B1B3	25	25.4 (34)			
5	Dam	A2A6B1B2	A1A2B2B3	25	18.6 (24)	28.85 (43)	19.3 (29)	
			A2A2B1B2	25	23.2 (30)	14.1 (21)	20.7 (31)	
	Sire	A1A2B1B3	A1A6B1B3	25	22.5 (29)	28.85 (43)	33.3 (50)	
			A2A6B1B1	25	31.8 (41)	28.2 (42)	26.7 (40)	
				A1A2B1B2	0	0.8 (1)		
				A1A2B1B3	0	0.8 (1)		
			A2A2B1B1	0	2.3 (3)			

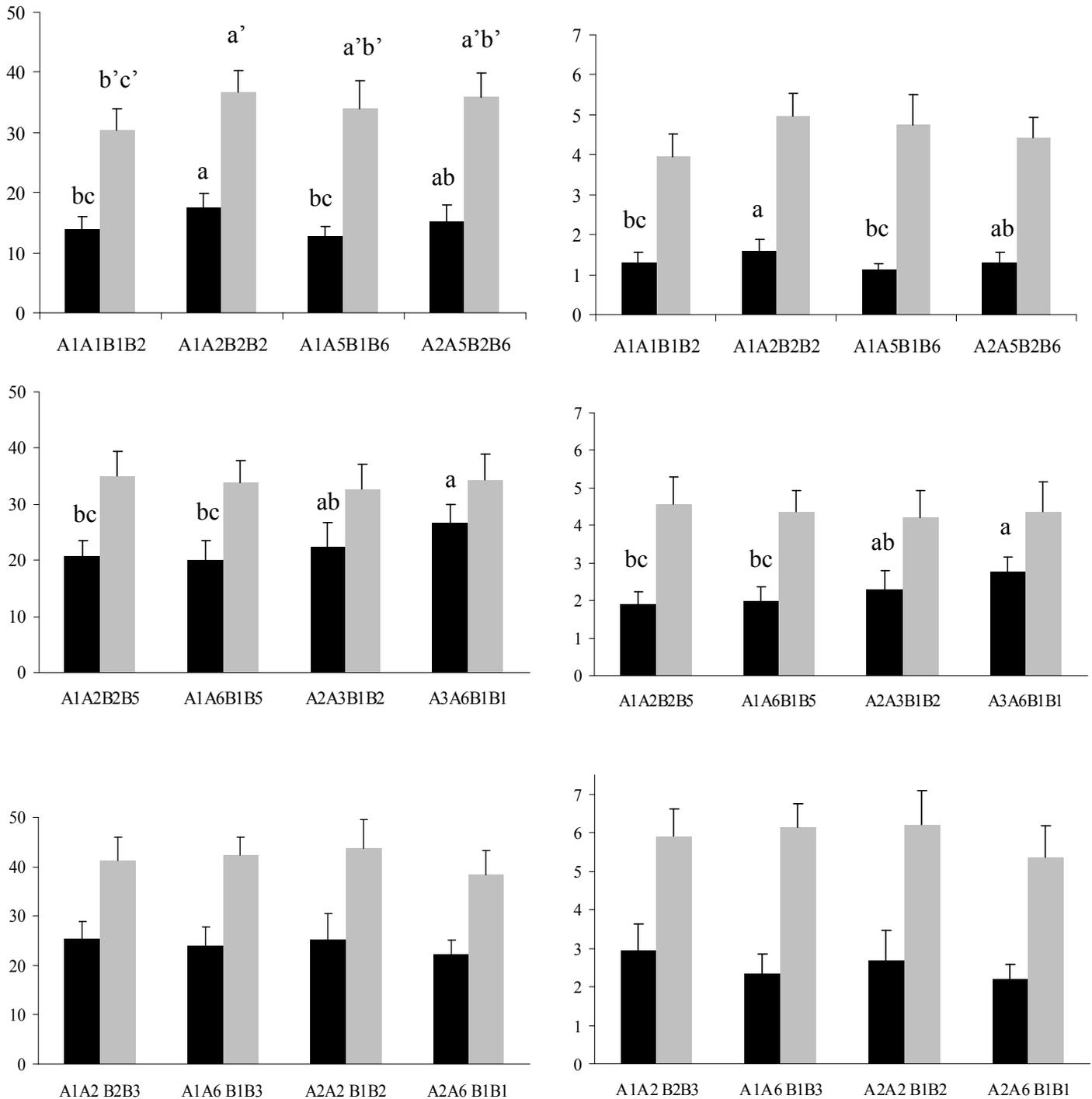
392

Table 2. Total wet weight (g), flesh wet weight (g) and survival rate (%) (mean \pm standard deviation) of 5 oyster families after one year in situ rearing in two different French aquaculture areas, southern Brittany and Normandy.

southern Brittany						Normandy				
Family	Total weight (g)	Flesh wet weight (g)	Homogenous group	Survival rate (%)	Homogenous group	Total weight (g)	Flesh wet weight (g)	Homogenous group	Survival rate (%)	Homogenous group
F1	19.9 \pm 1.5	2.2 \pm 0.2	B	95.0 \pm 0.1	A	32.2 \pm 1.8	4.3 \pm 0.3	B	94.0 \pm 2.8	A
F2	14.6 \pm 1.1	1.3 \pm 0.1	C	74.7 \pm 2.5	B	34.3 \pm 2.0	4.5 \pm 0.3	B	93.0 \pm 0.1	A
F3	22.5 \pm 1.6	2.2 \pm 0.2	A	42.7 \pm 3.2	D	34.0 \pm 2.1	4.4 \pm 0.3	B	90.5 \pm 0.7	A
F4	23.7 \pm 1.7	2.5 \pm 0.2	A	64.3 \pm 3.1	C	35.9 \pm 2.4	4.6 \pm 0.4	B	94.0 \pm 1.0	A
F5	24.0 \pm 1.8	2.5 \pm 0.2	A	96.7 \pm 0.6	A	41.3 \pm 2.3	5.9 \pm 0.4	A	94.7 \pm 0.6	A

Homogenous groups within sites were estimated between families using multiple comparison tests according to the least significant difference (LSD) method. Within site, homogenous groups were identical for total weight and flesh wet weight and are therefore given only once.

Figure 1. Total weight (left) and flesh wet weight (right) (g) of *amylase* genotypes in three oyster families after one year of rearing in two different French aquaculture areas (black bar for southern Brittany and grey bar for Normandy). From top to bottom: family 2, family 3 and family 5. Homogenous groups (without apostrophe for total weight and with apostrophe for flesh wet weight) were estimated between genotypes within family and location using multiple comparison tests according to the least significant difference (LSD) method.



ANNEXE 2

Valorisations scientifiques du travail de thèse

1. Publications

Prudence, M., Moal, J., Boudry, P., Daniel, J.Y., Quéré, C., Jeffroy, F., Mingant, C., Ropert, M., Bédier, E., Van Wormhoudt, A., Samain, J.F., Huvet, A. Amylase gene polymorphism is associated with growth differences in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*. (Soumis à *Animal Genetics*).

Huvet, A., Dubois, S., Daniel, J.Y., Quéré, C., **Prudence, M.**, Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Samain, J.F., Moal, J. (2003). Tissue expression of two amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture*, 228, 321-333

2. Communications orales pour colloques scientifiques

Huvet, A., **Prudence, M.**, Jeffroy, F., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Quéré, C., Boudry, P., Bédier, E., Ropert, M., Van Wormhoudt, A., Moal, J., Samain, J.F. Amylase polymorphism affects growth in the cupped oyster *Crassostrea gigas*. The 8th International conference on Shellfish Restoration, Brest, France, 2-5 october 2005

Samain, J.F., **Prudence, M.**, Huvet, A., Dégremont, L., Boudry, P., Daniel, J.Y., Quéré, C., Van Wormhoudt, A., Moal, J. Oyster *C. gigas* amylase A and B gene expressions and catalytic properties in relation to diet composition and polymorphism. The 7th International Marine Biotechnology Conference, St John's, Canada, 7-12 june 2005

Prudence, M., Huvet, A., Daniel, J.Y., Quéré, C., Van Wormhoudt, A., Moal, J., Samain, J.F. Localisation et conditions de l'expression des gènes de l'amylase de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, conséquences de leur polymorphisme sur le phénotype. Journées Conchylicoles, Nantes, France, 13-14 mars 2003

Prudence, M., Huvet, A., Daniel, J.Y., Van Wormhoudt, A., Moal, J., Samain, J.F. Mise au point des techniques d'analyse du polymorphisme protéique des amylases de *Crassostrea gigas*. 126^{ème} Congrès de la Société Zoologique de France, Plouzané, France, 16-18 septembre 2002

3. Communications pour groupes de travail

Prudence, M., Huvet, A., Daniel, J.Y., Van Wormhoudt, A., Moal, J., Samain, J.F. Caractérisation en électrofocalisation, en acétate de cellulose et en gel d'agarose des protéines amylasiques chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : identification et comparaison des profils. Ecole de biologie moléculaire (Ifremer), Banyuls, France, 10-14 juin 2002

Huvet, A., Dubois, S., Daniel, J.Y., Quéré, C., **Prudence, M.**, Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Samain, J.F., Moal, J. Structure moléculaire et expression tissulaire des deux gènes de l'amylase chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Effet du niveau trophique sur l'expression dans la glande digestive. Ecole de biologie moléculaire (Ifremer), Banyuls, France, 10-14 juin 2002

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
AG	: Electrophorèse de protéines sur gel d'agarose
ANOVA	: Analyse des variances
ARN	: Acide ribonucléique
ARNhn	: ARN hétérogène nucléaire
ARNm	: ARN messenger
BET	: Bromure d'éthidium
BSA	: Albumine sérique bovine (<i>Bovine serum albumin</i>)
CCK	: Cholécystokinine
CT	: Cycle-seuil (<i>Threshold cycle</i>)
CV	: Coefficient de variation
DEPC	: Diéthylpyrocarbonate
DNase I	: Désoxyribonucléase I
dNTPs	: Désoxynucléotides triphosphates
DP	: Degré de polymérisation
DTT	: Dithiothréitol
EDTA	: Éthylène diamine tétraacétique
e.g.	: Par exemple (<i>Exempli gratia</i>)
ES (SE)	: Erreur standard (<i>standard error</i>)
FAO	: Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (<i>Food and agriculture organization</i>)
GENEPHYS	: Programme européen traitant de la génétique et de la physiologie chez l'huître du Pacifique <i>Crassostrea gigas</i>
GH	: Hydrolase glycosidique
GK	: Glucokinase
Haf	: Heure après la fécondation
HK	: Kexokinase
i.e.	: C'est-à-dire (<i>Id est</i>)
IEF	: Isoélectrofocalisation
Ifremer	: Institut français pour la recherche et l'exploitation de la mer
IRE	: Élément de réponse à l'insuline (<i>Insulin-response element</i>)
Jaf	: Jour après la fécondation
K_M	: Constante apparente d'affinité ou constante de Michaelis-Menten
K_P	: Constante physiologique
MDH	: Malate déshydrogénase
M-MLV	: Virus leucémique murin de Moloney (<i>Moloney-murine leukemia virus</i>)
MOREST	: Défi Ifremer traitant des mortalités estivales chez l'huître du Pacifique <i>Crassostrea gigas</i>
P/B	: Production primaire/biomasse
P/S	: Ratio polyinsaturé/saturé
PAGE	: Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
pb	: Paires de bases
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pI	: Point isoélectrique
PTC	: Mélange algal à base de <i>Pavlova lutheri</i> , T-Iso et <i>C. calcitrans</i> f. <i>pumilum</i>
QR	: Quantité relative
RE	: Réticulum endoplasmique
RFLP	: Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
RNase A	: Ribonucléase A

Liste des abréviations

RT	:	Transcription inverse (<i>Retrotranscription</i>)
SATMAR	:	Société atlantique de mariculture
SDS	:	Sodium dodecyl sulfate
SRP	:	<i>Signal recognition particle</i>
SRPR	:	<i>Signal recognition particle receptor</i>
TCA	:	Acide trichloroacétique
Test LSD	:	Test des différences significatives minimales de Fisher (<i>Least Significant Difference</i>)
T_m	:	Température de fusion
UTR	:	Région non traduite (<i>Untranslated region</i>)
UV	:	Ultraviolets

Titre Caractérisation de marqueurs génétiques fonctionnels de la nutrition et/ou de l'adaptation (les amylases) chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : intérêts pour la sélection

RESUME

Deux gènes amylase A et B ont été caractérisés chez l'huître *Crassostrea gigas*. Par PCR-RFLP, 6 et 4 allèles ont été décrits respectivement pour les gènes A et B. Les rôles des gènes A et B ont été étudiés expérimentalement. Ils s'expriment de la larve à l'adulte, et le niveau des transcrits de A est plus fort que celui de B. Le niveau des transcrits de A augmente significativement avec la température, en condition trophique élevée. Les niveaux des transcrits de A et de B ne changent pas quand la quantité trophique augmente alors que l'activité amylase croît. Le niveau des transcrits de B est corrélé avec la quantité d'amidon dans le régime, alors que celui de A apparaît constant ; en même temps, l'activité amylase diminue et le K_M augmente. Ces résultats suggèrent que l'expression de B est régulée par la qualité trophique contrairement au gène A, et que l'amylase B aurait un K_M plus élevé. Afin d'étudier les relations entre le polymorphisme et la fonction de l'amylase, 5 familles bi-parentales à polymorphisme contrôlé ont été produites puis testées sur deux sites géographiques durant un an. Des différences significatives de croissance entre génotypes d'une même famille ont été principalement observées sur un site, indiquant un effet site. Certains génotypes présentant des différences significatives de croissance démontrent des variations d'activité amylase spécifique, alors que leur K_M ne change pas. La survie n'est pas affectée par ce polymorphisme. Cette corrélation entre le polymorphisme amylase et la croissance indique que la croissance des huîtres *C. gigas* peut être améliorée en utilisant les marqueurs amylase dans un programme de sélection.

Title Characterization of functional genetic markers for nutrition and/or adaptation (amylases) in Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* : relevance for selection

ABSTRACT

Two amylase genes, A and B, from the oyster *Crassostrea gigas* were characterized. Using PCR-RFLP, 6 and 4 alleles, respectively, were described for the amylase genes A and B. The roles of A and B amylase genes were investigated experimentally. They are expressed during larval and adult stages, and A transcripts are more abundant than B. The A transcript increases significantly with temperature, in high trophic conditions. However, A and B transcript levels do not change when food quantity increases although amylase activity augments. The level of B is correlated with dietary starch quantities, whereas the amount of A appears to remain constant ; simultaneously amylase activity decreases and the K_M increases. These results suggest that expression of B is regulated by diet quality in contrast to A expression. And that the B amylase probably has a higher K_M . In order to study the relationships between polymorphism and amylase function, 5 bi-parental families with checked polymorphisms were bred and reared in two geographic areas over one year. Significant growth differences between genotypes of a same family were mainly observed in one location, indicative for a site effect. Some genotypes, displaying significant differences in growth, demonstrated variations in amylase activity although their K_M remained constant. Survival performance was not influenced by these amylase polymorphisms. This correlation between amylase polymorphism and growth indicates that growth of *C. gigas* oysters can be improved using the amylase markers for selective breeding programs.

MOTS-CLES amylases, bivalves, huîtres**Effets de l'environnement, croissance, nutrition, gènes, polymorphisme génétique, analyse enzymatique

DISCIPLINE Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions

Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer, centre de Brest, BP 70, 29 280 Plouzané, France
Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de Caen / Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, 14 032 Caen Cedex