

APPROCHE DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE L'HUITRE CREUSE
CRASSOSTREA GIGAS AU COURS D'UN CYCLE SAISONNIER
A MARENNES-OLERON

par

Jeanne MOAL*, Jean-François SAMAIN* et Alain BODOY**, Jean-René LE COZ*

* IFREMER, Centre de Brest, BP 337, 29273 Brest Cedex, FRANCE

** IFREMER, BP 133, Ronce-Les-Bains, 17390 La Tremblade, FRANCE

ABSTRACT : APPROACH OF THE SEASONAL VARIATIONS OF THE PHYSIOLOGICAL STATE
OF THE JAPANESE OYSTER CRASSOSTREA GIGAS AT MARENNES OLERON

The energy charge was measured for two Crassostrea gigas populations, during an annual survey at Marennes-Oleron, to appreciate the condition of health of these oysters. It is assumed that the actual decrease in production of this area is related to a biomass overload which affects the oysters by lowering their scope for growth. Energy charge, an index developed by ATKINSON (1968), defines the energy equilibrium of organisms. It is the adenylic nucleotide ratio : $E.C = (ATP + 1/2ADP)/ATP + ADP + AMP$. We have measured this parameter to determine the state of health of these oysters. A methodological study has been conducted previously to define the conditions of sampling, conservation and extraction for a HPLC assay. The HPLC method (high performance liquid chromatography) is an adaptation of the HOFFMAN and LIAO (1977) method, that is performed with a C18 column and an isocratic elution with a pairing agent (tetrabutylammonium). A seasonal effect of nucleotide concentrations is observed (ANOVA test). Size exhibits no effect on the values of nucleotide concentrations. The highest values of nucleotides are observed in summer during the reproductive period. At this time, the variability of values is the highest too. In winter, the adenylic energy charge (AEC) is high and the concentrations of nucleotides low, suggesting a good physiological status of the oysters. We assume that the nucleotide variations express modifications in the metabolism level during a seasonal cycle. These results would be related to the capacity of the species to adapt its physiology depending on the seasonal constraints encountered in the field.

Key words : energy charge, nucleotides, physiological indice, Crassostrea gigas, seasonal variations, Marennes-Oléron.

RESUME :

Nous avons mesuré la charge énergétique de deux populations d'huitres Crassostrea gigas, dans le cadre d'un suivi saisonnier à Marennes-Oléron, pour apprécier l'état de condition ou de santé de ces huitres. On présume, en effet, que la baisse actuelle de production de ce bassin aurait pour origine une surcharge de biomasse qui se traduirait au niveau des huitres par un affaiblissement général de la physiologie. La charge énergétique, développée par ATKINSON (1968), définit l'équilibre énergétique des organismes. Il s'agit du rapport des nucléotides adényliques, $C.E = (ATP + 1/2 ADP) / ATP + ADP + AMP$. Nous avons mesuré ce paramètre pour apprécier l'état de santé des huitres. Une étude méthodologique préalable nous a permis de définir les conditions de prélèvements, de conservation et d'extraction pour une analyse ultérieure des nucléotides en HPLC (chromatographie liquide haute performance). La méthode chromatographique, qui dérive de celle de HOFFMAN and LIAO (1977), utilise une colonne en C18 et une élution isocratique en présence d'un contre-ion, le tétrabutylammonium.

Les taux de nucléotides des séries adényliques, guanyliques, uridyliques ainsi que la charge énergétique adénylique présentent un effet saisonnier marqué (test de variance). Les concentrations des nucléotides ne sont pas corrélées à la taille de l'animal. Les concentrations les plus élevées sont observées en été au moment de la reproduction. A cette époque la variabilité est aussi la plus forte. En hiver, les hautes valeurs de la charge associées à de faibles concentrations traduiraient des bonnes conditions physiologiques. On suggère que ces variations de taux de nucléotides expriment des changements d'activité métabolique. Ce résultat traduit la capacité des huîtres à adapter leur physiologie en fonction des variations annuelles du milieu.

Mots clés : charge énergétique, nucléotides, indice physiologique, Crassostrea gigas, cycle saisonnier, Marennes-Oléron

INTRODUCTION

Dans les bassins conchylicoles français, on constate généralement un allongement du cycle de production. D'une étude historique sur le bassin de Marennes Oléron (IFREMER, 1986), il ressort qu'à des périodes d'accroissement de biomasse cultivée, succèdent les problèmes pathologiques (épizootie). L'hypothèse d'une surcharge de biomasse qui placerait les animaux en état d'affaiblissement physiologique a été avancée. D'autres observations abondent dans ce sens. Ainsi des animaux transférés dans des conditions trophiques riches (claires) présentent des croissances améliorées (DESLOUS PAOLI et al., 1982). Des modifications lentes de l'équilibre animaux/milieu environnant peuvent conduire à des effets sublétaux tels que la diminution de reproduction, la susceptibilité accrue aux maladies, ou la diminution d'adaptation aux changements de l'environnement qui sont peu perceptibles. Développer des indices qui permettent de connaître l'état physiologique des organismes devient une nécessité pour appréhender ces phénomènes de dérives. La charge énergétique $\frac{ATP + 1/2 ADP}{ATP+ADP+AMP}$ définit l'énergie disponible pour le métabolisme, à

partir du pool des nucléotides adényliques (ATKINSON, 1968). La valeur de la charge est très régulée et c'est un point central du métabolisme puisqu'elle régule un grand nombre de réactions anaboliques ou cataboliques (BOMSEL et PRADET, 1968). Des altérations de ce paramètre devraient indiquer des modifications des conditions de vie.

Ainsi la valeur de cet indice diminue de façon significative en cas de stress provoqué par des polluants (IVANOVICI, 1980a ; ZAROOGIAN et al., 1982), lors de stress thermique ou de salinité (RAINER et al., 1979 ; IVANOVICI, 1980b ; SYLVESTRE et al., 1984), dans des conditions anoxiques (WIJSMAN, 1976 ; PRADET et BOMSEL, 1978 ; GADE et MEINARDUS, 1981 ; BARTHEL, 1984). Les variations de la charge et des concentrations des nucléotides adényliques ont été enregistrées au cours de suivis saisonniers chez la moule Mytilus edulis (SKJOLDAL et BARKATI, 1982), le homard (DICKSON et GIESY, 1982a), des clams d'eau douce (GIESY et DICKSON, 1981), le zooplancton (BAMSTED et SKJOLDAL, 1976) et le plus souvent associées aux cycles de reproduction, parfois à l'âge ou à la croissance.

Nous avons étudié au cours d'un cycle saisonnier la charge énergétique chez des huîtres Crassostrea gigas cultivées dans des conditions standards de production à Marennes Oléron. Une nouvelle méthode de séparation et de dosage des nucléotides par chromatographie liquide haute performance a été utilisée et a permis de mesurer, outre l'ATP, l'ADP et l'AMP, les nucléotides des séries guanine et uridine.

MATERIEL et METHODE

Du naissain de 18 mois de l'espèce Crassostrea gigas, collecté à La Tremblade (France), détroqué, a été placé dans des casiers plastique de 1mx0,5m fixés sur des tables métalliques à 50cm du sol et à un coefficient de marée de 75. Les casiers ont été remplis à une densité de 250 huîtres/ casier. Deux sites du bassin dont les caractéristiques hydrologiques et de biomasse cultivée sont connues ont été choisis pour le suivi annuel. L'expérience a débuté par la mise sur parcs des casiers en mai 1985 et s'est poursuivie jusqu'au mois de mai 1986, avec un rythme de prélèvement mensuel pendant les périodes printanières et estivales et trimestriel en automne et en hiver. Les prélèvements sont effectués alors que les casiers sont encore dans l'eau ou viennent juste d'exonder, pour s'affranchir des modifications métaboliques liées à l'anoxie (BARTHEL, 1984). Douze huîtres sont prélevées au hasard dans un casier ; elles sont rapidement ouvertes et toute la chair aussitôt congelée dans l'azote liquide. Les coquilles numérotées sont conservées pour des mesures ultérieures de taille : longueur, largeur et épaisseur au laboratoire. Les échantillons conservés dans l'azote liquide sont broyés en poudre fine dans un broyeur à bille Dangoumau (30 sec.), dont les pots métalliques sont préalablement refroidis dans l'azote liquide pour éviter toute décongélation de l'échantillon (Température finale : -100°C). Une aliquote de cette poudre (environ 200 mg) est ensuite extraite dans 2 ml d'acide trichloracétique (TCA) froid 0,5 M au potter de Thomas. Après 5 minutes de contact à 4°C , les extraits sont centrifugés à 4 500 t/mn pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée. Le culot de centrifugation est récupéré et dissout dans 2 ml NaOH N pour l'analyse des protéines totales de l'échantillon (LOWRY et al., 1951). Le surnageant est neutralisé (V/V) à l'amine fréon 0,5 M (KHYM, 1975). Les échantillons ainsi neutralisés sont analysés le jour même en chromatographie liquide de haute performance (CLHP) pour l'analyse des nucléotides. Les extraits neutralisés se conservent au moins six mois à -20°C sans perte d'ATP.

Conditions de séparation en CLHP

Les séparations sont effectuées sur une colonne WATERS NOVAPAK C18 de 5 μm , munie d'une précolonne LICHROSORB (MERCK), conditionnée avec le même type de phase, mais de granulométrie supérieure (7 μm). La phase mobile utilisée est un tampon NaH_2PO_4 (0,15 M), contenant comme agent d'appariement du tétrabutyl ammonium (4,2 M) et 5,4% (V/V) de méthanol, de pH 6,0. L'éluant est filtré sur filtre de 0,45 μm avant usage. Les nucléotides étalons sont de qualité analytique (SIGMA). 10 μl d'échantillon sont injectés à l'aide d'une seringue de précision dans une vanne UK6 WATERS et l'éluant délivré par une pompe M 510 WATERS à un débit de 1 ml/min. A la sortie de la colonne, les nucléotides sont détectés à une densité optique de 254 nm par un spectrophotomètre WATERS (modèle 481).

Dans ces conditions, dans un mélange de standards, on sépare en moins de 25 mn la plupart des nucléotides mono, di et triphosphate des séries adénosine, guanosine, uridine et cytosine. Un recouvrement de pics s'effectue au niveau du CMP qui élue en même temps que le nucléoside uridine et du GMP qui élue avec le CDP, l'IMP et la guanosine. Dans les extraits d'huîtres cependant, l'UDP qui est faiblement représenté élue juste après un pic important d'un composé inconnu, ce qui rend sa quantification difficile.

Le CMP (+U) et le CTP sont très rarement rencontrés dans les échantillons d'huîtres et il est très probable que le CDP le soit lui aussi. Le pic pollué (GMP + CDP + IMP) a donc été attribué au GMP (par excès) du fait de la bonne représentation des nucléotides di et triphosphates de cette série.

La quantification est assurée à partir de l'évaluation de surface des pics (intégrateur SHIMADZU CR3A) d'un mélange de nucléotides standards de concentration connue.

RESULTATS

Croissance

La forme très irrégulière de la coquille de l'huître japonaise et la pousse dans une dimension préférentielle selon le mode de culture ne permet pas l'utilisation d'une seule dimension pour une appréciation correcte de la croissance. Les meilleurs paramètres biométriques pour l'huître creuse font référence à un volume ou mieux à un poids (BODOY et al., 1986 ; BERTHOME et al., 1986). Notre protocole expérimental, qui nécessite une manipulation rapide des animaux, ne nous a pas permis de mesurer le poids. Pour cette raison, nous avons utilisé nos données de taille en les transformant en un volume, estimé par les formules $V = L \times l \times e$ ou $V = \left(\frac{L+l+e}{3} \right)^3$

La croissance estimée à partir des données biométriques est équivalente pour les deux sites.

La période de croissance de la coquille se situe essentiellement pendant la période mai - juin - juillet - août. Sur une année (juin à mai), la croissance en longueur a été de l'ordre de 20% avec une longueur moyenne de 78,4 mm en juin 1985 et 94 mm en mai 1986.

Nucléotides : moyennes annuelles

L'analyse des nucléotides en chromatographie liquide haute performance permet de confirmer la prédominance des nucléotides adényliques. Ceux-ci représentent en moyenne 79% du total des nucléotides mesurés. Parmi les nucléotides adényliques l'ATP représente 55%, l'ADP 32% et l'AMP 12%. En concentration, les quantités mesurées sont caractéristiques des mollusques : 19 μ mole ATP/g protéine, 11,3 μ mole ADP/g protéine, 4,3 μ mole AMP/g protéine (Tableau 1). Parmi les autres nucléotides, on trouve essentiellement les séries mono, di et triphosphate de la guanosine et de l'uridine. Le GTP (2,7 μ mole/g protéine) est le plus abondant et les proportions du mono, di et triphosphate de la série guanosine équivalent à la série adénylique avec respectivement 7 %, 39 % et 53 %. L'UDP souvent mal séparé, n'a pu être quantifié. Contrairement aux séries précédentes, l'UMP est aussi abondant que l'UTP (1,7 μ mole/g protéine). Les nucléotides de la série cytosine sont rarement détectés et nous n'avons pas effectué de moyenne annuelle.

Le rapport ATP/AMP de 4,36 est faible et caractérise les organismes à faible dépense d'énergie (BEIS et NEWSHOLME, 1975). Le rapport GTP/ATP (purine triphosphate) est faible 0,143.

Tableau 1 - Concentrations moyennes annuelles intervalle de confiance ($P < 0,01$) des nucléotides de *Crassostrea gigas* valeurs exprimées en $\mu\text{mole/g}$ protéine

ATP	19.0 ± 0.9
ADP	11.3 ± 0.7
AMP	4.3 ± 0.4
GTP	2.7 ± 0.2
GDP	2.0 ± 0.3
GMP	0.38 ± 0.07
UTP	1.7 ± 0.2
UMP	1.7 ± 0.2
Total Adenylate	34.6 ± 1.5
Total Nucleotide	43.7 ± 1.9
C.E	$0.716 \pm 0,015$

La charge énergétique adénylique est relativement stable sur l'année pour les deux lots. La moyenne annuelle est de $0,716 \pm 0,015$, soit un coefficient de variation de 2 % ($P < 0,01$).

La charge énergétique guanylique, calculée de la même façon que la charge énergétique adénylique ($\text{GTP} + 1/2 \text{GDP/GTP} + \text{GDP} + \text{GMP}$) est fortement corrélée à celle-ci ($P < 0,01$) $r = 0,749$ $n = 191$.

Variations saisonnières

Les valeurs de la charge énergétique et des concentrations de nucléotides présentent toutes un effet saisonnier (analyse de variance ANOVA) significatif ($P < 0,01$).

Les plus fortes variations de la charge sont enregistrées en juillet-août au moment de la ponte et en hiver où on observe les valeurs les plus élevées (fig. 1).

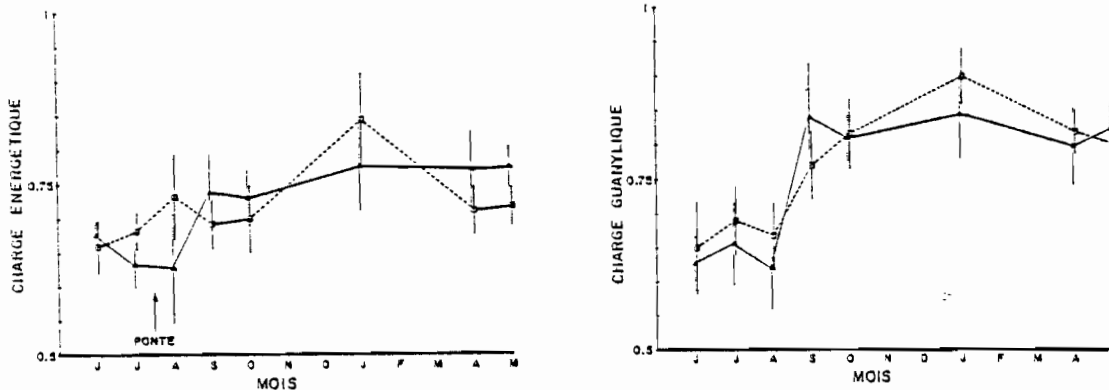


Figure 1 - Valeurs des charges énergétiques, adénylique et guanylique, de 2 populations d'huîtres à Marennes-Oléron au cours d'un cycle saisonnier. Chaque point représente la moyenne de 12 analyses et la barre verticale l'intervalle de confiance Banc Dagnas, Banc des Doux

Ces périodes de variation sont aussi caractérisées par la plus forte dispersion des valeurs entre individus. Pour tous les nucléotides, les concentrations les plus fortes sont observées en été (fig. 2-3). A partir du mois d'octobre toutes les valeurs baissent. Les variations saisonnières sont plus marquées pour les nucléotides des séries guanosine et uridine que pour la série adénylique. La baisse est de l'ordre de 20 % pour la somme des adényliques alors qu'elle est de 25 % pour le total des nucléotides. Les nucléotides qui participent le plus à la baisse sont les nucléotides mono et diphosphate.

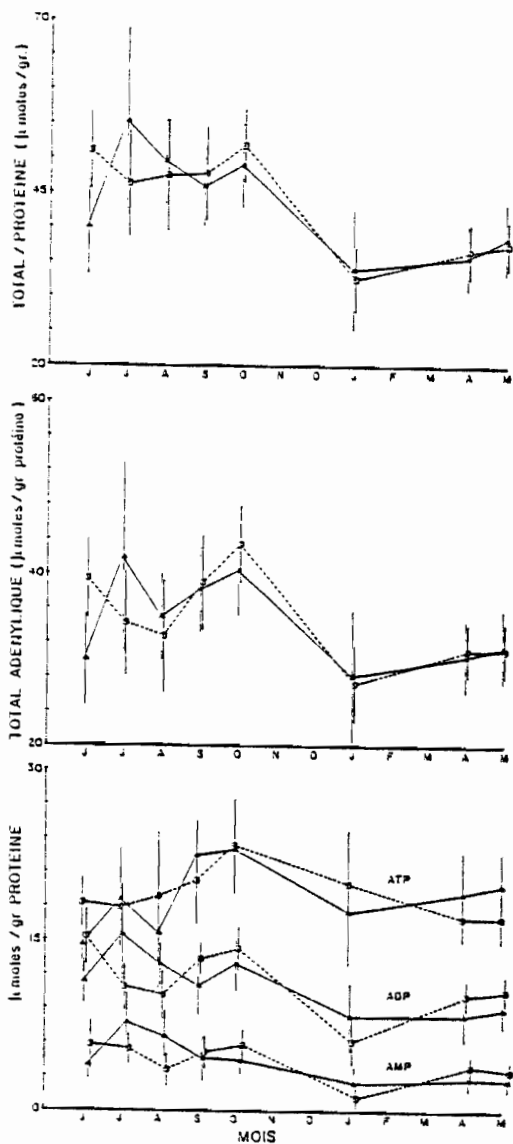


Figure 2 - Concentrations des nucléotides, exprimées en µmoles de nucléotide/g protéine au cours d'un cycle saisonnier. a : somme des nucléotides analysés en HPLC, b : somme des nucléotides adényliques ATP + ADP + AMP, c : variations des concentrations d'ATP, d'ADP, d'AMP. Mêmes sigles que la figure 1.

Les concentrations de nucléotides triphosphate ne présentent pas la même évolution selon la série considérée : les concentrations d'ATP se maintiennent à des valeurs fortes, les concentrations de GTP diminuent de 25 % et les concentrations d'UTP présentent la plus grande différence maximum - minimum de l'ordre de 60 %.

Puisque les animaux mis en élevage (18 mois) sont en cours de croissance, on a testé l'influence de celle-ci sur les concentrations des nucléotides et sur la charge énergétique, et la charge guanylique. Il n'existe pas de relation entre croissance et les paramètres étudiés. Les coefficients de corrélation sont non significatifs excepté pour la charge guanylique, le GMP et le GDP $P < 0,05$ - Tableau 2.

L'évolution des rapports tels que UTP/ATP, GTP/ATP ou UTP/GTP peut permettre d'appréhender l'influence relative de plusieurs voies de biosynthèses puisque ces nucléotides sont impliqués dans des métabolismes différents. Les rapports présentent tous un maximum estival en juillet - août, puis une décroissance rapide dès le mois de septembre. Les rapports UTP/ATP et GTP/ATP se maintiennent ensuite à une valeur basse pour ne remonter qu'en avril - mai. Par contre le rapport UTP/GTP augmente en janvier et avril pour rediminuer ensuite (fig.4)

Tableau 2 - Coefficients de corrélation entre les paramètres de taille (mm) et les concentrations de nucléotides (µmole/g protéine). Le nombre d'échantillons utilisé pour le calcul de la corrélation est n=191 - * : corrélation significative pour une probabilité de 95%.

	AEC	GEC	εAdenyl	Total	ATP	ADP	AMP	GTP	GDP	GMP	UTP	UMP
Longueur	0.106	0.294*	0.054	-0.006	0.115	-0.008	-0.037	0.048	-0.198	-0.240	-0.010	0.153
Longxlargxépais	0.279*	0.409*	-0.013	-0.129	0.200	-0.161	-0.22	-0.078	-0.400*	-0.377*	-0.170	0.078
$\left(\frac{L+l+e}{3}\right)^3$	0.232	0.427*	0.008	-0.093	0.183	-0.119	-0.163	-0.051	-0.352*	-0.360	-0.124	0.126

DISCUSSION

Croissance

La croissance en taille débute au printemps (avril - mai) pour se terminer en septembre. La longueur moyenne de la population mise en culture en juin 1985 était de $78,4 \pm 6,7$ mm ; elle a atteint $90,9 \pm 10,9$ mm à Dagnas et $96,5 \pm 9,3$ mm aux Doux. Ces données sont tout à fait comparables à celles obtenues précédemment dans le bassin pour du naissain de 18 mois : croissance de 72,5 à 90 mm en longueur, de juin 1980 à juin 1981 (BERTHOME et al., 1986) ou 87,6 à 101,4 mm de juin 1979 à février 1980 (DESLOUS-PAOLI, 1982). Ceci correspond à une croissance moyenne de 20% en longueur.

Nucléotides

Une comparaison précise de nos données avec celles obtenues par d'autres auteurs utilisant des méthodes d'extraction ou d'analyse différentes des nôtres s'avère délicate ; elle peut fournir néanmoins un ordre de grandeur.

Nous avons choisi les protéines comme référence pondérale pour le fait que notre protocole expérimental nous permet de récupérer de façon quantitative les protéines précipitées au cours de l'extraction au TCA et qui correspondent aux nucléotides extraits. Nous avons vérifié la validité de cet indice pondéral en le comparant à d'autres indices comme le poids sec ou le poids humide (SAMAIN et al., à paraître) et estimé la proportion moyenne des protéines à 58% du poids sec. Le poids sec quant à lui représente 16,7% du poids humide. En modifiant la référence pondérale, nous obtenons des valeurs moyennes d'ATP de 11 μ mole/g poids sec ou 0,6% poids sec ou 1,85 μ mole/g poids humide, valeurs tout à fait comparables à celles de ANSELL (1977) (1,26% à 0,26% du poids sec pour 23 familles de bivalves), de BEIS et NEWSHOLME (1975) (2,02 μ mole/g poids humide), de GIESY et DICKSON (1981) 0,3% du poids sec, de WIJSMAN (1976) : 2 μ mole/g poids humide. Ceci confirme la validité de notre procédure d'extraction au TCA et de séparation en chromatographie. Les valeurs de concentrations en nucléotides adényliques sont faibles comparées à d'autres familles d'Invertébrés : Crustacés ou Insectes. Le rapport ATP/AMP de 4,36 faible lui aussi caractérise (BEIS et NEWSHOLME (1975), DICKSON et GIESY, 1981) des organismes à faible dépense énergétique. On peut souligner cependant que les fortes concentrations d'ATP se rencontrent essentiellement dans les muscles et que ceux-ci représentent une faible proportion de la chair totale de l'huître. La variabilité des concentrations est plus importante pour l'AMP (10,5%) que pour l'ATP (4,8%). Cette variabilité, calculée pour l'ensemble des données, rend compte de la variabilité saisonnière et de la variabilité spécifique. Toutes deux sont plus marquées pour l'AMP. L'erreur standard sur la moyenne de l'AMP avait déjà été signalée par GIESY et DICKSON (1981), qui l'avait attribué à une erreur méthodologique (addition des erreurs des 3 étapes nécessaires au dosage de l'AMP par la méthode luminométrique).

Les nucléotides adényliques représentent la majeure partie des nucléotides : 79%. Cependant d'autres nucléotides ont pu être identifiés par la méthode CLHP. Parmi ceux-ci les plus importants sont le GTP et l'UTP, bien que leurs concentrations respectives par rapport à l'ATP ne soient que de 14% et 8,7%.

Il existe peu de données sur les concentrations de ces nucléotides. Le rapport GTP/ATP varie de 0,08 à 2,34 pour les érythrocytes de poissons (LERAY, 1979) ; pour des échantillons d'eau de mer, les valeurs de ce rapport sont comprises entre 0,11 et 0,56 et augmentent en relation avec l'importance de la biomasse bactérienne qui est caractérisée par des plus fortes valeurs GTP/ATP que les algues (KARL, 1978).

La méthode de séparation par CLHP permet aussi de détecter le GMP, le GDP et l'UMP. L'UDP est mal séparé et sort sur la traînée d'un autre pic assez important non identifié : sa quantification a dès lors été très rarement possible.

Pour la série guanylique, les proportions respectives de mono, di et triphosphates sont de 7,4%, 39% et 53% très proches de la série adénylique. Les régulations de ces deux séries de nucléotides semblent très liées. Ainsi, par exemple, la charge guanylique est très corrélée à la charge énergétique adénylique. Les voies de biosynthèse et de dégradation de ces deux nucléotides puriques utilise en effet les mêmes réactions : l'IMP représentant l'intermédiaire commun. Par ailleurs, de nombreuses kinases permettent des échanges de phosphates entre les différents nucléotides.

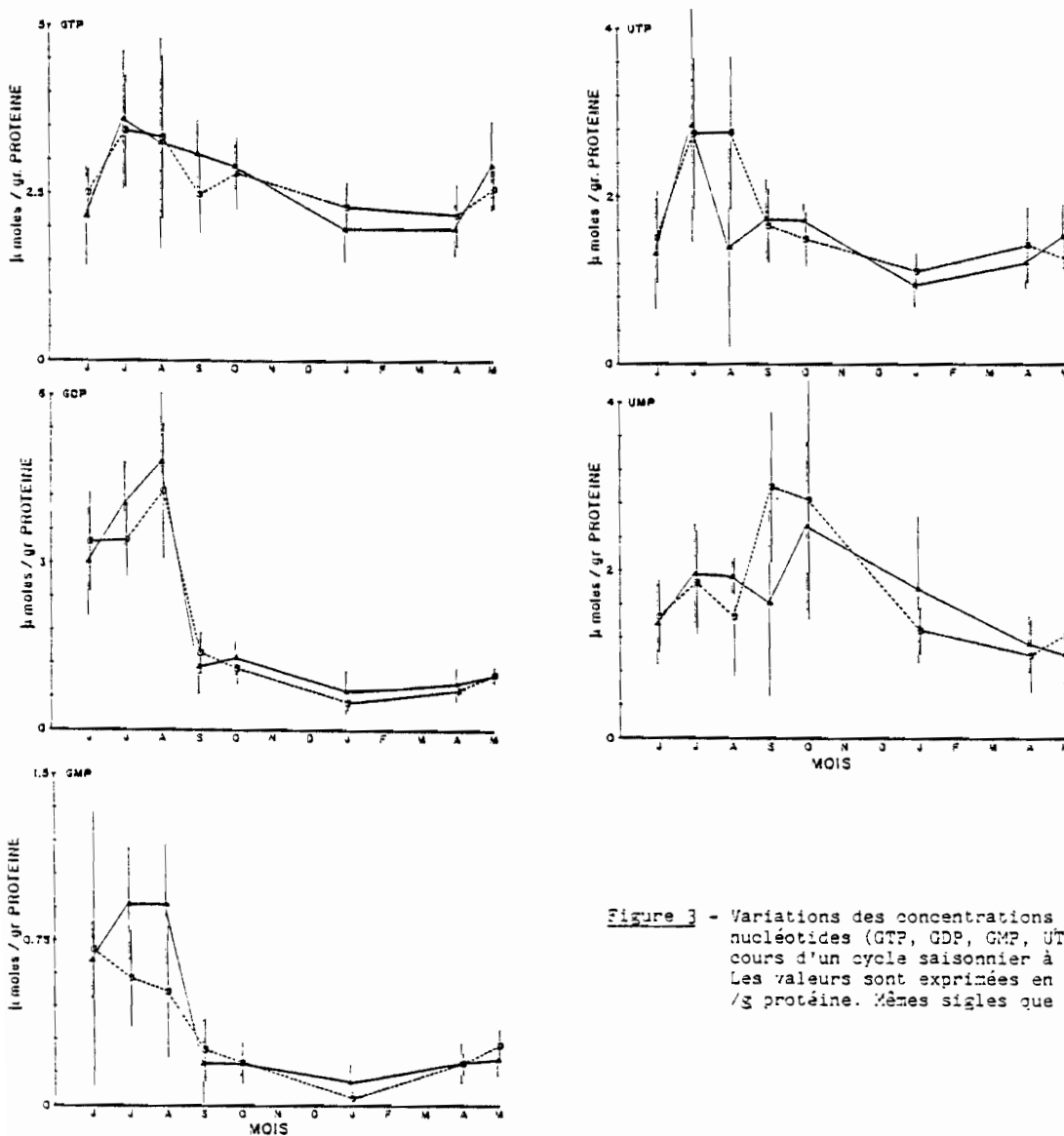


Figure 3 - Variations des concentrations de différents nucléotides (GTP, GDP, GMP, UTP, UMP) au cours d'un cycle saisonnier à Marennes-Oléron. Les valeurs sont exprimées en μmole nucléotide /g protéine. Mêmes sigles que la figure 1.

VARIATIONS SAISONNIERES

Tous les nucléotides présentent des variations saisonnières de concentrations. Les concentrations les plus fortes sont observées en été. Le fait que les augmentations ou diminutions de concentrations des nucléotides individuels soient accompagnées des fluctuations similaires des adényliques totaux, indique qu'il n'y a pas simplement interconversion des adénylates mais synthèse et dégradation. Des concentrations élevées d'ATP ont été reliées, soit à une activité locomotrice accrue chez le homard (DICKSON et GIESY, 1982b), soit à la période de reproduction chez le zooplancton (SKJOLDAL et BAMSTED, 1976 ; BAMSTED et SKJOLDAL, 1976), période pendant laquelle le métabolisme est activé. Les variations saisonnières des concentrations de nucléotides pour un animal entier peuvent aussi bien refléter les changements de proportions des différents tissus que les modifications de concentration pour un tissu donné. Ainsi pour Mytilus edulis, SKJOLDAL et BARKATI (1982) attribuent les variations saisonnières des nucléotides de l'animal entier à des changements de proportions des tissus au cours du cycle annuel. En effet, chaque tissu est caractérisé par une concentration de nucléotides et une valeur de la charge énergétique. Chez les mollusques les valeurs les plus élevées sont observées dans le muscle, les valeurs les plus faibles dans les gonades et l'hépatopancréas (WISJMAN, 1976 ; ANSELL, 1977). L'augmentation des concentrations, observée en été (fig. 2-3) correspond probablement à une activité métabolique accrue reliée à la période de reproduction. Nos données correspondent en effet à l'animal entier et l'augmentation de volume des gonades en été (juin - juillet) devrait donc diminuer la moyenne des concentrations en nucléotides. La variabilité la plus forte de tous les paramètres est observée en août. Elle traduit une forte hétérogénéité de la population à cette période, probablement reliée à la reproduction. En 1986, l'émission principale des larves s'est produite pendant la deuxième quinzaine d'août. Cependant, on constate généralement dans le bassin de Marennes-Oléron une émission partielle pendant un mois précédant ou suivant cette ponte prédominante.

De la même façon que les fortes valeurs estivales de concentrations de nucléotides ont été rapprochées d'une intense activité métabolique reliée à la reproduction, les faibles valeurs observées en hiver correspondraient à une baisse du niveau métabolique. Cependant de nombreux taux métaboliques sont inversement proportionnels à l'âge chez les mollusques (CAPUZZO et SASNER, 1977 ; BAYNE et NEWELL, 1983) et la diminution hivernale des nucléotides pourrait être aussi associée à la baisse d'activité métabolique spécifique dépendant de l'âge, puisque nos animaux sont en croissance (18 mois à 30 mois). Cependant nous n'avons pas trouvé de relation entre la charge énergétique adénylique, les concentrations de la plupart des nucléotides, avec les paramètres décrivant la croissance. Seule la charge énergétique guanylique, les GDP et GMP sont corrélés aux paramètres biométriques estimant le volume de l'huître (Tableau 2). Une relation entre les concentrations en ATP et la taille a été mise en évidence pour un copépode par BAMSTED et SKJOLDAL (1976), mais n'a pu être démontrée pour le homard par DICKSON et GIESY (1982a).

La diminution des taux de nucléotides, observée en hiver chez Crassostrea gigas à La Tremblade, correspondrait donc à une modification des taux métaboliques reliée à la saison. L'influence de la température sur les taux métaboliques des invertébrés marins

(BAYNE et al., 1973 - LIVINGSTONE, 1981) est connue, mais l'appauvrissement du milieu en éléments nutritifs (phytoplancton) pourrait aussi expliquer la diminution des taux de nucléotides puisque le jeûne provoque une diminution d'ATP chez le rat (OSTOLOWSKI, 1978) et chez le copépode *Calanus finmarchicus* (BALCH, 1972). Les valeurs de la charge énergétique adénylique présentent aussi un caractère saisonnier. Les plus fortes valeurs de charge ont été observées en janvier alors que les concentrations en nucléotides sont les plus faibles. Ces résultats sont contradictoires à ceux obtenus chez *Mytilus edulis* (SKJOLDAL et BARKATI, 1982) pour lequel les plus fortes charges sont associées aux plus fortes concentrations d'ATP. Mais GIESY et DICKSON (1981) n'ont pas trouvé de relation entre la charge et la concentration d'ATP pour deux clams d'eau douce. L'association d'un métabolisme faible (métabolisme basal) à des valeurs de charge énergétique élevée, semble indiquer que le passage d'un métabolisme actif (estival) à un métabolisme ralenti (hivernal) s'effectue sans stress. Il est même probable que c'est ce changement d'activité métabolique qui permet à l'organisme de se maintenir en équilibre, de pouvoir assurer ses activités physiologiques essentielles face à un environnement plus défavorable.

Tous les nucléotides possèdent la même énergie libre d'hydrolyse (-7,3 kcal/mole pour les triphosphates), mais seul l'ATP a un rôle de transport et d'échange des groupements phosphates dans la cellule. Les autres nucléotides ont pour rôle d'intervenir dans certaines voies de biosynthèse ; ils obtiennent leurs phosphates terminaux de l'ATP par des réactions catalysées par des enzymes Mg-dépendante, appelées nucléotide diphosphokinases. L'UTP est indispensable dans la voie de biosynthèse du glycogène, le GTP intervient dans la synthèse protéique et le CTP dans la biosynthèse des lipides. Notre séparation HPLC ne nous a pas permis de mesurer le CTP qui est très peu retenu et sort très rapidement après le volume mort de la colonne avec d'autres composés non identifiés. L'UTP et le GTP sont séparés et ont pu être mesurés. Comme pour les cellules humaines ou de vertébrés, ils sont très peu représentés par rapport à l'ATP. L'évolution de leur taux est identique à celui des adénylates, c'est-à-dire fortes concentrations estivales, faibles concentrations hivernales.

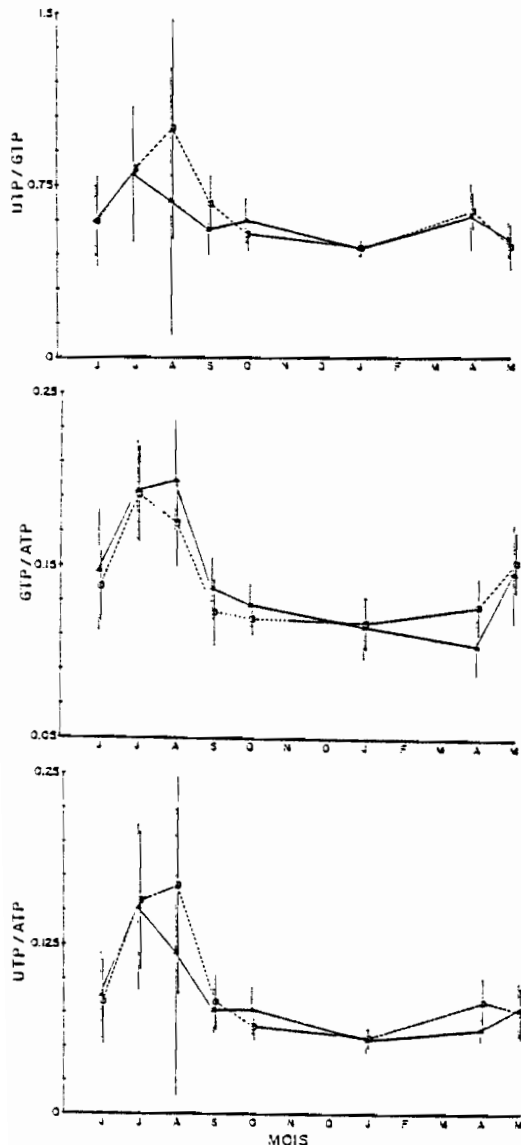


Figure 4 - Variations au cours d'un cycle saisonnier des rapports UTP/GTP (haut), GTP/ATP (milieu), UTP/ATP (bas) pour des huîtres élevées à Marennes-Oleron. Mêmes sigles que la figure 1.

Cependant, les proportions relatives de l'UTP et du GTP par rapport à l'ATP présentent aussi des variations saisonnières que l'on peut discuter en termes de prépondérance de certaines voies de biosynthèse. Les rapports UTP/ATP, GTP/ATP présentent tous deux un maximum marqué en juillet - août. Le reste de l'année les valeurs de ces rapports sont plus faibles et stables (fig. 4). KARL (1978) a trouvé chez les bactéries une corrélation entre le taux de croissance et le rapport GTP/ATP, correspondant à l'augmentation des synthèses protéiques. L'évolution saisonnière des composés biochimiques chez l'huître japonaise cultivée à Marennes est caractérisée par l'accumulation du glycogène dès le printemps et par sa transformation en lipides pour la formation des gamètes en juin - juillet (GABBOT, 1976). Les pertes tissulaires (lipides - protéines) qui accompagnent la ponte peuvent représenter de 30 à 60% du poids de chair selon la classe d'âge considérée (HERAL et DESLOUS-PAOLI, 1983) ; la reconstitution ultérieure des réserves dépendrait de la quantité et de la qualité de nourriture disponible dans le milieu (ANSELL et TREVAILLON, 1967 ; DESLOUS-PAOLI et al., 1982 ; DESLOUS-PAOLI, 1982). En 1986, la ponte s'intercale entre les prélèvements de juillet et d'août. Les valeurs élevées des rapports GTP/ATP et UTP/ATP suggèrent pourtant des synthèses protéiques et glucidiques actives non seulement en juillet pendant la période de maturation sexuelle, mais aussi en août après la ponte.

Les valeurs élevées du rapport UTP/GTP au cours de cette période estivale suggèreraient aussi une prédominance du métabolisme glucidique. En juillet, de fortes synthèses glucidiques ne conduisent pas forcément à une accumulation de glycogène, si celui-ci est rapidement converti en lipides. RILEY (1976) considère que la gametogénèse s'effectue aux dépens des réserves de glycogène de l'animal et non de l'environnement. En août, après la ponte, l'apport trophique du bassin de Marennes-Oléron est en général trop faible pour permettre la reconstitution des réserves (DESLOUS-PAOLI, 1982). Dans l'attente des résultats de composition biochimique (en cours) nous ne pouvons pas conclure sur la validité de l'hypothèse formulée sur la signification de ces rapports.

Une approche expérimentale, étudiant en parallèle l'évolution des nucléotides et les voies de biosynthèse par incorporation de traceurs radioactifs ou par les variations de certaines enzymes permettrait de comprendre les relations entre les taux de certains nucléotides et l'activation de certaines voies métaboliques.

BIBLIOGRAPHIE

- ANSELL, A.D., 1977. The adenosine triphosphate content of some marine bivalve molluscs. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 28 : 269-283.
- ANSELL, A.D. et A. TREVAILLON, 1967. Studies on Tellina tenuis da Costa. I-Seasonal growth and biochemical cycle. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 1 : 220-235.

- ATKINSON, D.E., 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochem.*, 7 (11) : 4030-4034.
- BALCH, N., 1972. ATP content of Calanus finmarchicus. *Limnol. Oceanogr.*, 17 : 906-908.
- BAMSTEDT, U. et H.R. SKJOLDAL, 1976. Studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, western Norway. Adenosine phosphates and nucleic acids in Euchaeta norvegica (Copepoda) in relation to its life cycle. *Sarsia*, 60 : 63-80.
- BARTHEL, D., 1984. Adenylate energy charge in three marine bivalve species during anoxia. *Ophelia*, 23 : 155-164.
- BAYNE, B.L., R.J. THOMPSON and J. WIDDOWS, 1973. Some effects of temperature and food on the rate of oxygen consumption by Mytilus edulis L. In : Effects of temperature on ectothermic organisms. W. WIESER (Ed.), 181-193. Springer Verlag - Berlin.
- BAYNE, B.L. and R.C. NEWELL, 1983. Physiological energetics of marine molluscs. In : The Mollusca -Vol. 4. Physiology- part I. A.S.M. SALEUDDIN, Karl. M. WILBUR (Ed.). Academic Press, 407-515.
- BEIS, I. et E.A. NEWSHOLME, 1975. The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.*, 153 : 23-32.
- BERTHOME, J.P., J. PROU and A. BODOY, 1986. Performance de l'huître creuse, Crassostrea gigas T, dans le bassin d'élevage de Marennes-Oléron entre 1979 et 1982. HALIOTIS (sous presse).
- BODOY, A., J. PROU et J.P. BERTHOME, 1986. Etude comparative de différents indices de condition chez l'huître creuse (Crassostrea gigas). HALIOTIS (sous presse).
- BOMSEL, J.L. et A. PRADET, 1968. Study of adenosine 5' mono, di, triphosphate in plant tissues. IV - Regulation of the level of nucleotides in vivo by adenylate kinase : theoretical and experimental study. *Biochem. Biophys. Acta*, 162 : 230-242.
- CAPUZZO, J.M. and J.J. SASNER, 1977. The effect of chromium on filtration rates and metabolic activity of Mytilus edulis L. and Mya arenaria L. In : Physiological responses of marine biota to pollutants. F.J. Wernberg, A. Calabrese, F.P. Thunberg and W.B. Wernberg (Ed.). Academic Press. New-York, 225-237.
- DESLOUS-PAOLI, J.M., 1982. Croissance et qualité de l'huître Crassostrea gigas Thunberg en élevage dans le bassin de Marennes-Oléron. *Tethys* 10(4) : 365-371.

- DESLOUS-PAOLI, J.M., Y. ZANETTE, M. HERAL, H. MASSE et J. GARNIER, 1982.
Amélioration de la forme et de la qualité de l'huître Crassostrea gigas T dans les
claires de Marennes-Oléron. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 45 : 181-194.
- DICKSON, G.W. et J.P. GIESY, 1981. Variation of phosphoadenylates and adenylate energy
charge in crayfish (decapoda : Astacidae) tail muscle due to habitat differences.
Comp. Biochem. Physiol., 70A : 421-425.
- DICKSON, G.W. et J.P. GIESY, 1982a. Seasonal variation of phosphoadenylate concentration
and adenylate energy charge in dorsal tail muscle of the crayfish, Procambarus
acutus acutus (Decapoda : Astacidae). Comp. Biochem. Physiol., 72A : 295-299.
- DICKSON, G.W. et J.P. GIESY, 1982b. The effects of starvation on muscle phosphoadenylate
concentrations and adenylate energy charge of surface and cave crayfish. Comp.
Biochem. Physiol., 71A : 357-361.
- GABBOTT, P.A., 1976. Energy metabolism. In : Marine mussels, their ecology
and physiology. Bayne B.L. (Ed.). Cambridge University Press : 293-355.
- GADE, G. et G. MEINARDUS, 1981. Anaerobic metabolism of the common cockle
Cardium edule. V-Changes in the level of metabolites in the foot during aerobic
recovery after anoxia. Mar. Biol., 65 : 113-116.
- GIESY, J.P. et G.W. DICKSON, 1981. The effect of season and location on phosphoadenylate
concentrations and adenylate energy charge in two species of freshwater clams.
Oecologia, 49 : 1-7.
- HERAL, M. et J.M. DESLOUS-PAOLI, 1983. Valeur énergétique de la chair de l'huître
l'huître Crassostrea gigas estimée par des mesures microcalorimétriques et par
dosages biochimiques. Oceanol. Acta, 6(2) : 193-199.
- HOFFMAN, N.E. and J.C. LIAO, 1977. Reverse phase high performance liquid
chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions.
Anal. Chem., 49 : 2231-2234.
- IFREMER, 1986. Evolution et état du cheptel ostréicole dans le bassin de Marennes-
Oléron : intérêt d'une régulation. Station de La Tremblade. Rapport interne DRV
86-06 : 35 p.
- IVANOVICI, A.M., 1980a. Adenylate energy charge : an evaluation of applicability to
assessment of pollution effects and directions for future research. Rapp. P.V. Réun.
Cons. Int. Explor. Mer, 179 : 23-28.

- IVANOVICI, A.M., 1980b. The adenylate energy charge in the estuarine mollusc (Pyrazus ebeninus). Laboratory studies of responses to salinity and temperature. Comp. Biochem. Physiol., 66A : 43-45.
- KARL, D.M., 1978. Occurrence and ecological significance of GTP in the ocean and in microbial cells. Appl. Environ. Microbiol., 36(2) : 349-355.
- KHYM, J., 1975. An analytical system for rapid separation of tissue nucleotides at low pressure on conventional anion exchangers. Clin. Chem. 21 (9) :1245-1252.
- LERAY, C., 1979. Patterns of purine nucleotides in fish erythrocytes. Comp. Biochem. Physiol., 64B :77-82.
- LIVINGSTONE, D.R., 1981. Induction of enzymes as a mechanism for the seasonal control of metabolism in marine invertebrates : glucose -6- phosphate dehydrogenases from the mantle and hepatopancreas of the common mussel Mytilus edulis L. Comp. Biochem. Physiol., 69B : 147-156.
- LOWRY, O.M., N.I. ROSEBOROUGH, A.L. FARRAND and R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 263-275.
- OSTOLOVSKII, E.M., 1978. Effect of protein deficiency on nucleotide content and ATPase activity in some rat tissues. Voprosy Pitannia, 5 : 33-36.
- PRADET, A. et J.L. BOMSEL, 1978. Energy metabolism in plants under hypoxia and anoxia. In Plant Life in anaerobic environments. D.D. Hook, R.M.M. Crawford Ed., Ann. Arbor Mich : Ann Arbor Sci : 89-118.
- RAINER, S.F., A.M. IVANOVICI and V.A. WADLEY, 1979. Effect of reduced salinity on adenylate energy charge in three estuarine molluscs. Mar. Biol., 54 : 91-99.
- RILEY, R.T., 1976. Changes in the total protein, lipid, carbohydrate and extracellular body fluid amino acids of Pacific oyster, Crassostrea gigas, during starvation. Proc. Nat. Shellfish. Ass., 65 : 84-90.
- SAMAIN, J.F., J.Y. DANIEL, J.M. DESLOUS-PAOLI, J.R. LECOZ et J. MOAL, 1987. Référence pondérale pour l'étude de l'équipement digestif chez l'huître Crassostrea gigas. Actualités de Biochimie marine, Oceanis (sous presse).
- SKJOLDAL, H.R. and U. BAMSTEDT, 1976. Studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, western Norway. Adenosine phosphates and nucleic acids in Meganctiphanes norvegica (Euphausiacea) in relation to the life cycle. Sarsia, 61 : 1-14.

SKJOLDAL, H.R. and S. BARKATI, 1982. ATP content and adenylate energy charge of the mussel Mytilus edulis during the annual reproductive cycle in Lindaspollene, Western Norway. Mar. Biol., 70 : 1-6.

SYLVESTRE, C., C. BEAUPOIL, Y. BATREL et Y. Le GAL, 1984. Evolution de la charge énergétique adénylique sous l'effet d'une pollution expérimentale. C.R. Soc. Biol., 178 : 512-517.

WIJSMAN, T.C.M., 1976. Adenosine phosphates and energy charge in different tissues of Mytilus edulis L. under aerobic and anaerobic conditions. J. Comp. Physiol., 107 : 129-140.

ZAROOGIAN, G.E., J.H. GENTILE, J.F. HELTSHE, M. JOHNSON and A.M. IVANOVICI, 1982. Application of adenine nucleotide measurements for the evaluation of stress in Mytilus edulis and Crassostrea virginica. Comp. Biochem. Physiol., 71 B : 643-649.