



THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1

Mention : Biologie

Présentée et Soutenue le 8 novembre 2007

par

BACCA Hélène

**ETUDE DES VOIES METABOLIQUES DES SUCRES CHEZ
L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*.
IMPLICATION DANS LES MORTALITES ESTIVALES**

COMPOSITION DU JURY :

Mr PANSERAT Stéphane – Chercheur INRA à St Pée-sur Nivelle	Rapporteur
Me SAN JUAN Fuencisla – Professeur à l'Université de Vigo, Espagne	Rapporteur
Mr SALIGAUT Christian- Professeur à L'Université de Rennes 1	Examineur
Mr LE BAIL Pierre-Yves – Chercheur INRA à Rennes	Examineur
Mr SAMAIN Jean-François – Chercheur IFREMER à Brest	Examineur
Mr MATHIEU Michel – Professeur à l'Université de Caen	Examineur
Mr VAN WORMHOUDT Alain – DR CNRS au MNHN de Concarneau	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de physiologie des Invertébrés du centre Ifremer de Brest, associé au Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines de l'Université de Caen, dans le cadre de l'Unité Mixte de Recherche « Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins ».

Pendant 3 ans, j'ai pu bénéficier d'un financement, c'est pourquoi je tiens à exprimer mes remerciements aux deux organismes que sont l'IFREMER et la région Bretagne.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Jean-Louis Nicolas, directeur du laboratoire pour son accueil au sein de cette structure.

Je remercie chaleureusement Arnaud Huvet, Jeanne Moal et Jean-François Samain pour leurs encadrements au quotidien et les nombreuses discussions. Je salue ici leur grande disponibilité et expérience grâce auxquelles j'ai pu mener mon projet jusqu'au bout. J'espère ne pas avoir été trop insupportable et je les remercie aussi pour leur soutien.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse M. Alain Van Wormhoudt pour son encadrement et ses nombreux conseils tout au long de ce travail. Mais ce n'est pas tout, je voudrais le remercier pour son amitié tout en lui exprimant la mienne et le rassurer pour ses inquiétudes quant à mon futur. Je continuerai de puiser de l'optimisme dans cet échange qui m'est cher.

Je souhaite exprimer mes remerciements les plus sincères et mon amitié à Claudie Quéré pour son aide plus que précieuse sur les dosages enzymatiques de la GS et à Philippe Miner pour la fourniture en algues et bien d'autres services extra-professionnels ! Merci également à Jean-Yves Daniel pour ses nombreux conseils en biologie moléculaire.

Un merci sincère et amical à Anne-Caroline Hanquet, du LBBM de Caen, pour toutes les informations fournies, les manip, malgré la distance, les soucis, et pour son accueil plus que chaleureux à Caen. J'aimerais en dire beaucoup plus mais je ne trouve pas les mots sauf ceux qui vont au bonheur que je te souhaite avec ta fille !

Merci aussi à Gilles Le Moullac en particulier pour son aide en zootechnie mais également pour les discussions scientifiques en métabolisme et aussi pour son accueil chaleureux au COP de Tahiti lorsque j'ai commencé à rédiger ce manuscrit.

Merci à mes deux stagiaires Joachim Winckler et Gaspard Delebeck pour leur aide et leur patience ! J'espère ne pas avoir été un trop mauvais maître de stage.

Comment oublier les visages rencontrés dans ce laboratoire en 4 années de travail ?

Je ne remercierais jamais assez mon ami Yannick Labreuche, et je suis sûre que cette formulation ne lui plaira pas, mais j'insiste en disant que sans lui tout aurait été bien différent, probablement beaucoup moins drôle, beaucoup moins attachant. Alors merci à toi, j'espère que nos chemins se croiseront à nouveau, en attendant il nous reste les cyber-apéros !

La vie d'un laboratoire ne se résume pas au travail, bien qu'on y soit pour ça, alors de toutes les espèces rencontrées je ne pourrais pas me permettre de ne pas remercier mes amis du couloir, du balcon, des pauses cafés à la cantine : Olivier Gastineau mon collègue de bureau préféré, Elodie Fleury la mignonne, Marie Vagner qui sent bon, Clément Leneveu et sa salade de tomate, Claire Macher d'en bas le midi, Vincent Bernard l'Hermitte, Emilie(s) jolie(s), Anthony très poli, Erwan le grand de l'île, Nico le partenaire d'escalade...

Sinon on dit souvent que les absents ont toujours tort, mais je ne suis pas d'accord, en tout cas pour certains, c'est pour ça que je remercie aussi ceux qui sont partis mais qui furent là un moment, deux moments, souvent ou pas à l'Ifremer : Christophe Rouillon avec une mention spéciale et forte d'amitié, François Coutard (le petit Paco) qui signait son contrat à côté de moi il y a 4 ans ! Ben l'Irlandais d'adoption, Sandrine Compain comme amie !

Et puis à l'interface du travail et du dehors, il y a ceux qu'on rencontre grâce à des collègues et qui deviennent essentiels ! Je pense en particulier à Anne Gaëlle Lafont à qui je dédie quelques chansons car c'est ma sœur d'esprit, elle saura bien de quoi je parle. Merci à toi, pour ton soutien inconditionnel, pour tout, et rendez-vous à Roissy avant de faire mieux, pour refaire le monde !

Merci également à mes parents qui ont su respecter mes choix universitaires malgré la distance qu'ils imposaient. Merci pour leur soutien dans les bons et les mauvais moments. Que vos montagnes restent à jamais un refuge où je pourrais revenir. Clin d'œil à mes deux sœurs Cécile et Elise et mon frère Etienne pour les longues conversations téléphoniques, les remontages de moral, les rares mais très bons moments partagés ces dernières années !

Merci au clan brestois dans son ensemble pour tous ces moments partagés autour d'un verre, ou devant la mer : Nico et Sarah que j'espère revoir au milieu du Pacifique prochainement ! Cédric le colloc caché finalement découvert ! Les précédemment cités Ifremériens ! Qui prouvent que travail et amitié font souvent bon ménage !

Merci au clan grenoblois, le clan du début, le clan de la fin et particulièrement à Raph et Caro qui restent à travers mes étapes, comme des murs porteurs de mon édifice !

Enfin l'incontournable, le plus difficile à remercier sans excès, c'est toi Xavier ! Car de tout ça tu es le centre ! Finis les longs mois de séparation, finis skype, msn, sms, mails ! Bonjour en vrai, mercis multiples !

N°ORDRE : 3591
De la thèse

THESE

Présentée

DEVANT L'UNIVERSITE de RENNES 1

Pour obtenir

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

Mention : Biologie

PAR

BACCA Hélène

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

Ecole Doctorale : VIE-AGRO-SANTE

Composante universitaire : SVE

**ETUDE DES VOIES METABOLIQUES DES SUCRES CHEZ
L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*.
IMPLICATION DANS LES MORTALITES ESTIVALES**

COMPOSITION DU JURY :

Mr PANSERAT Stéphane – Chercheur INRA à St Pée-sur Nivelle	Rapporteur
Me SAN JUAN Fuencisla – Professeur à l'Université de Vigo, Espagne	Rapporteur
Mr LE BAIL Pierre-Yves – Chercheur INRA à Rennes	Examineur
Mr VAN WORMHOUDT Alain – DR CNRS au MNHN de Concarneau	Directeur de thèse
Mr SAMAIN Jean-François – Chercheur IFREMER à Brest	Examineur
Mr MATHIEU Michel – Professeur à l'Université de Caen	Examineur

Table des matières

Introduction générale	1
1 Problématique de l'étude.....	2
2 Modèle biologique : l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	6
3 Le métabolisme du glycogène.....	13
3.1. Généralités.....	13
3.2. Voies métaboliques du glycogène.....	14
3.3. Position du métabolisme du glycogène dans celui des glucides.....	19
3.4. Régulation du métabolisme du glycogène.....	24
3.5. balance énergie-reproduction.....	45

Matériels et méthodes	49
1 Plans d'expériences.....	50
2 Primo culture de cellules de palpes.....	51
3 Dosages d'activités spécifiques.....	53
3.1. Préparation des extraits tissulaires ou cellulaires.....	53
3.2. Dosage des activités HK, G6PDH, PK et PGM.....	54
3.3. Dosage de l'activité GP.....	54
3.4. Dosage de l'activité GS.....	55
3.5. Dosage des protéines totales.....	56
4 Détermination des séquences d'ARNm.....	56
5 Quantification des ARNm.....	57
5.1. Protocole de PCR en temps réel.....	59
5.2. Méthode de quantification relative des ARNm.....	60
5.3. Quantification absolue des ARNm.....	60
5.4. Validation et traitement des données de PCR en temps réel.....	64
6 Stabilité des ARNm.....	66
7 Analyses statistiques.....	68

Partie 1 : Caractérisation et optimisation d'outils moléculaires et techniques d'analyses
chez l'huître *C. gigas* 71

1	Introduction.....	72
2	Caractérisation des séquences d'ADN complémentaire des enzymes clefs du métabolisme du glycogène chez l'huître	73
2.1.	Détermination de l'ORF de la GP	73
2.2.	Détermination de l'ORF de la GS	75
3	Mise au point et validation de la quantification absolue des ARNm par PCR en temps réel.. 78	
3.1.	Génération de gammes standards d'ADN recombinant (Rec ADN)	79
3.2.	Spécificité d'amplification sur ADN recombinant.....	79
3.3.	Efficacités d'amplification, linéarité des gammes RecADN	80
3.4.	Comparaison des efficacités de PCR des standards RecADN et des ADNc	81
4	Optimisation du dosage enzymatique de la GP	82
5	Optimisation du dosage enzymatique de la GS.....	84
6	Discussion	88
7	Conclusion.....	92

PARTIE 2 : Premiers travaux sur les variations annuelles du métabolisme du glycogène93

1	Introduction.....	94
2	Variations annuelles des paramètres biochimiques.....	96
3	Variations annuelles des ARNm Cg-GPH et Cg-GYS	99
4	Variations annuelles des activités de la GP et de la GS	101
5	Corrélations.....	106
6	Discussion	108
7	Conclusion.....	113

Partie 3 : Effet *in vivo* du niveau trophique et effet *in vitro* du glucose et de l'insuline sur le métabolisme du glycogène 115

1	Introduction.....	116
2	Effet du niveau trophique sur le métabolisme du glycogène.....	119
2.1.	Effet du niveau trophique sur le taux de glycogène.....	119
2.2.	Effet du niveau trophique sur la quantité d'ARNm Cg-HK, Cg-GYS et Cg-GPH120	
2.3.	Effet du niveau trophique sur la stabilité des ARNm Cg-GYS et Cg-GPH.....	122
2.4.	Effet sur les activités spécifiques HK, GS totale et GP totale, GP <i>a</i>	122
3	Effet <i>in vitro</i> du glucose sur le métabolisme du glycogène.....	125
3.1.	Effet du glucose sur la quantité d'ARNm Cg-GYS et Cg-GPH.....	126
3.2.	Effet du glucose sur les activités GS et GP.....	128
4	Effet <i>in vitro</i> de l'insuline sur le métabolisme du glycogène.....	129
5	Discussion.....	133
5.1.	Effet <i>in vivo</i> du niveau trophique sur le métabolisme du glycogène.....	133
5.2.	Effet <i>in vitro</i> du glucose et de l'insuline sur le métabolisme du glycogène.....	137
6	CONCLUSION.....	139

Partie 4 : Comparaison du métabolisme du glycogène et du glucose d'huîtres Résistantes et Sensibles aux mortalités estivales 141

1	Introduction.....	143
2	Comparaison du métabolisme du glycogène d'huîtres sélectionnées pour leur Résistance ou leur Sensibilité aux mortalités estivales, en conditions naturelles.....	145
2.1.	ARNm Cg-GYS et activité GS totale.....	145
2.2.	ARNm Cg-GPH et activité GP totale.....	145
2.3.	Discussion.....	146
3	Comparaison du métabolisme des glucides d'huîtres R et S en conditions expérimentales...	148
3.1.	Comparaison des huitres R et S en période critique.....	148
3.2.	Réponse trophique des huitres R et S en période critique.....	155
4	Conclusion.....	160

PARTIE 5 : Discussion générale, conclusion et perspectives 163

Références bibliographiques 175

Annexes 205

Liste des figures et tableaux 213

Publications scientifiques 219

LISTE DES ABREVIATIONS

AC	Actine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine DiPhosphate
AKH	AdipoKinetic Hormon, hormone adipocinétique
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPc	AMP cyclique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
<i>Cg-AC</i>	ARNm de l'AC de <i>C. gigas</i>
CEA	Charge Energétique Adénylique
<i>Cg-EF</i>	ARNm de l'EFI de <i>C. gigas</i>
<i>Cg-HK</i>	ARNm de l'HK de <i>C. gigas</i>
<i>Cg-G6PDH</i>	ARNm de la G6PDH de <i>C. gigas</i>
<i>Cg-GPH</i>	ARNm de la GP de <i>C. gigas</i>
<i>Cg-GYS</i>	ARNm de la GS de <i>C. gigas</i>
<i>Cg-PGM</i>	ARNm de la PGM de <i>C. gigas</i>
<i>Cg-PK</i>	ARNm de la PK de <i>C. gigas</i>
CK	Créatine Kinase
EF I	Facteur d'Elongation I
ERI	Element de Réponse à l'Insuline
FADH2	1,5 dihydro-Flavine adénine dinucléotide
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
GlRE	Glucose Responsive Element, élément de réponse au glucose
GluT	Glucose Transporter, Transporteur du glucose
GMH	Glycogen Mobilisation Hormone, hormone de mobilisation du glycogène
GP	Glycogène Phosphorylase
G1P	Glucose-1-Phosphate
G6P	Glucose-6-Phosphate
G6PDH	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GPH	Glycogène Phosphorylase Humaine
GPK	Glycogène Phosphorylase Kinase
GS	Glycogène Synthase

GSK3	Glycogène Synthase Kinase 3
GTP	Guanosine TriPhosphate
GYS	Glycogène Synthase humaine
HK	Hexokinase
LyNPY	<i>Lymnaea stagnalis</i> NPY
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MIP	Molluscan Insulin Peptide
MOREST	MORTalités ESTivales de <i>C. gigas</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NPF	NeuroPeptide F
NPY	NeuroPeptide Y
ORF	Open Reading Frame, cadre de lecture ouvert
pb	paires de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne
PGM	PhosphoGlucoMutase
Pi	Phosphate inorganique
PK	Pyruvate Kinase
PKA	Pyruvate Kinase A
PPI	Phosphorylase Phosphatase I
R	huîtres Résistantes aux mortalités estivales
RACE-PCR	Rapid Amplification of cDNA Ends, Amplification rapide des extrémités des ADNc
RecADN	Recombinant ADN, ADN recombinant
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
S	Huîtres Sensibles aux mortalités estivales
UDP	Uridine DiPhosphate
UDPG	Uridine DiPhosphoGlucose
UTR	UnTranslated Region
v / v	volume / volume

Introduction générale

1 *Problématique de l'étude*

Le secteur de l'aquaculture présente une des croissances les plus rapides dans le monde. En 2003, la production aquacole mondiale a atteint près de 42,3 millions de tonnes (données FAO, <http://faostat.fao.org/faostat/>). Dans ce secteur, les mollusques représentent une production de l'ordre de 19,4 millions de tonnes à l'échelle mondiale, dont 4,7 millions de tonnes d'huîtres. En France, l'ostréiculture constitue la première production aquacole. Elle repose essentiellement sur l'huître creuse du Pacifique ou huître japonaise *C. gigas* (115 000 tonnes/an en 2003) et de façon plus anecdotique sur l'huître plate *O. edulis* (2 000 tonnes/an en 2003) (FAO, 2003).

Historiquement, l'ostréiculture a connu, en France, une succession de phases de développement, de pleine exploitation et de crises engendrées par une surexploitation des ressources naturelles et/ou par l'apparition de maladies. L'huître plate *O. edulis*, seule espèce endémique des côtes françaises, a ainsi été exploitée pendant plusieurs siècles. Mais la pêche intensive associée à une demande croissante du marché a conduit à une destruction des bancs naturels. Pour faire face à cette pénurie, l'huître creuse du Portugal, *Crassostrea angulata*, a été importée en France à partir de 1860, et accidentellement introduite dans le milieu naturel quelques années plus tard. Cette espèce rustique a rapidement proliféré le long des côtes et les deux espèces ont dès lors été cultivées, parfois conjointement (Héral, 1985). Des épisodes de mortalités massives provoquées par l'apparition de parasites (dont *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*) dans les gisements d'huîtres *O. edulis* au cours des années 1920, 1960 et 1970 ont précipité l'arrêt de la production de cette espèce (Grizel, 1974, 1985). Entre 1969 et 1973, la production d'huîtres portugaises a, à son tour, été décimée par une infection virale due à un *Iridovirus*, responsable de la « maladie des branchies » (Comps et al., 1976; Comps, 1988).

Afin de relancer l'industrie ostréicole, une nouvelle espèce originaire du Japon, *C. gigas*, déjà cultivée avec succès sur la côte ouest des Etats-Unis et du Canada, a donc été introduite en France à partir de 1972. Depuis cette date, la culture de *C. gigas* a connu une expansion rapide (**Figure 1**), cette espèce représentant aujourd'hui 99% du marché ostréicole français et 93% du marché mondial (FAO, 2003).

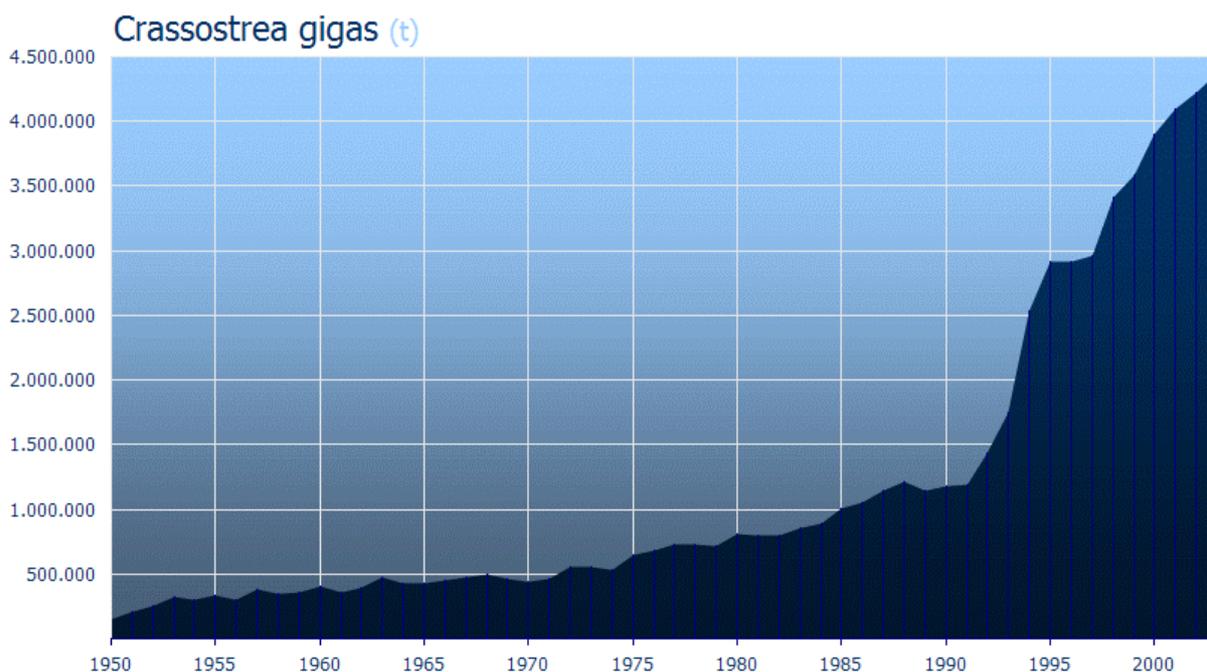


Figure 1 : Evolution de la production d'huîtres *Crassostrea gigas* (tonnes/an)

Cependant, les ostréiculteurs sont confrontés à des mortalités importantes de certains cheptels, ainsi qu'à une baisse générale des performances de croissance. Les premières observations d'un tel phénomène ont été réalisées au Japon dès 1945 (Koganezawa, 1974). Par la suite, des mortalités chroniques ont été rapportées aux Etats-Unis (Glude, 1975; Cheney et al., 2000) et en Europe (Gouletquer et al., 1998).

En France, ces mortalités sont apparues sur divers sites ostréicoles de la façade atlantique et en Manche (baie des Veys et baie de Morlaix) (Maurer et al., 1986). Elles se manifestent en période estivale dans le milieu naturel, de façon chronique ou à l'occasion de crises importantes, comme celles survenues en mai 1988 et en juin 1993 (Gouletquer et al., 1998). Ces épisodes engendrent des pertes généralement inférieures à 20% du cheptel, et des taux de mortalités supérieurs à 60% ont été observés pour certains lots (Maurer et al., 1986; Gouletquer et al., 1998).

Les causes de ces mortalités demeuraient inconnues avant que l'IFREMER n'initie en 2001 un programme multidisciplinaire (« MOREST » pour MORTalités ESTivales chez l'huître *C. gigas*). Plusieurs facteurs ont été proposés, à l'issue de ce programme en 2005, pour expliquer le déclenchement de ce phénomène (Samain et al., 2004; 2005) :

- La température élevée de l'eau (valeurs supérieures à 19°C), qui est le facteur environnemental le plus largement cité dans la littérature (Lipovsky & Chew, 1972; Gouletquer et al., 1998; Cheney et al., 2000; Soletchnik et al., 2003)

- Un déterminisme génétique des huîtres intervient également. De récentes études ont en effet démontré qu'il était possible de sélectionner génétiquement des animaux présentant une plus forte résistance aux mortalités (Dégremont, 2003; Boudry et al., 2004; Dégremont et al., 2005a; Dégremont et al., 2005b)

Introduction générale

- Les pratiques culturelles constituent une autre cause potentielle à l'origine de ce syndrome : il a en effet été démontré que les mortalités étaient significativement plus importantes (de 20 à 30%) pour les animaux élevés à proximité du sédiment par rapport aux animaux élevés sur tables (Soletchnik et al., 1999; 2003; 2005)

- L'intervention d'agents pathogènes est également suspectée pour expliquer ces mortalités. Aux Etats-Unis, Friedman et collaborateurs ont attribué, au moins en partie, ces événements à une bactérie à Gram positif du genre *Nocardia* (Friedman & Hedrick, 1991; Friedman et al., 1998). En France, des analyses d'huîtres moribondes ont révélé la présence de deux types d'agents pathogènes : un virus apparenté à la famille des *Herpesviridae* (Ostreid Herpesvirus type 1 ou OsHV-1) et des bactéries du genre *Vibrio*, appartenant principalement au genre *V. aestuarianus* (Nicolas et al., 2002) et au groupe polyphylétique des *V. splendidus* (Lacoste et al., 2001; Waechter et al., 2002). Toutefois, la présence de ces pathogènes n'a pu être démontrée de façon systématique au cours des différents épisodes de mortalités (Le Roux et al., 2002)

- Un déséquilibre métabolique de l'huître (Perdue et al., 1981). Les mortalités estivales interviennent généralement lors de la période de gamétogenèse lorsque les réserves énergétiques sont au plus bas, et l'hypothèse d'un effort de reproduction trop coûteux, affaiblissant les capacités de défense face à un stress, est fréquemment avancée (Soletchnik et al., 1996 ; Berthelin et al., 2000b; Soletchnik et al., 2003; Samain et al., 2004, 2007).

A ce jour, il n'a pas été possible d'expliquer les mortalités par un seul facteur. La piste d'une étiologie multifactorielle, faisant intervenir plusieurs compartiments (hôte/ un ou plusieurs pathogènes/ environnement), qui était la plus couramment envisagée, a été confirmée lors du programme MOREST (Samain et al., 2004; 2005, 2007).

Sur le plan énergétique, la période estivale est particulièrement difficile pour les huîtres creuses. Non seulement la température augmente les coûts métaboliques globaux mais les processus de maturation des gamètes associés à la diminution des réserves énergétiques peut conduire à un déficit. L'animal doit trouver des stratégies d'apports en énergie soit via l'alimentation, soit via l'utilisation de ses réserves (glucides, lipides, et parfois recyclage des acides aminés). C'est pourquoi il est capital de comprendre le fonctionnement des différentes voies métaboliques des glucides, mais aussi des lipides et de les mettre en relation avec les processus biologiques de l'huître. Chez les espèces de bivalves marins comme l'huître ou la moule, les réserves énergétiques sont essentiellement constituées par du glycogène, néanmoins certains lipides sont aussi stockés (Gabbott, 1983). Le glycogène joue un rôle central dans le support énergétique de la gamétogenèse mais aussi de la maintenance (Bayne *et al.*, 1982 ; Gabbott, 1975 ; Ruiz *et al.*, 1992a et b). Pour élucider le rôle de l'énergie dans la survie estivale, le choix a été porté en particulier sur l'étude du métabolisme du glycogène. Cependant, par quelques travaux, une étude plus étendue a été entreprise sur le métabolisme des glucides (glycolyse, néoglucogenèse).

Dans ce contexte, ce travail a pour objectif d'apporter des premiers éléments de description sur le fonctionnement du métabolisme du glycogène en relation avec le cycle de reproduction et le phénomène de mortalités estivales. Cette étude s'organise en quatre parties de résultats qui suivent cette introduction générale et une partie « Matériels et Méthodes ».

Une **première partie** présente, tout d'abord la caractérisation des séquences d'ARNm des enzymes Glycogène phosphorylase et Glycogène synthase. Sont également reportées l'optimisation d'une méthode de quantification de ces ARNm et des celles des activités enzymatiques correspondantes. Cette partie du travail est une validation méthodologique.

Une **seconde partie** fait l'objet des premiers travaux menés sur les variations saisonnières du métabolisme du glycogène. Les variations des paramètres biochimiques, moléculaires et enzymatiques conduisent à des hypothèses de régulation saisonnières.

Une **troisième partie** porte sur l'effet du niveau trophique sur la synthèse de glycogène dans les palpes labiaux. L'effet *in vitro* du glucose et de l'insuline a également été testé sur des primo cultures de cellules de palpes labiaux.

Une **quatrième partie** présente une recherche de différences d'utilisation du glucose entre des huîtres Résistantes et Sensibles aux mortalités estivales. Cette étude a été réalisée à partir d'expérimentations communes du programme MOREST.

2 *Modèle biologique : l'huître Crassostrea gigas*

Les huîtres sont des métazoaires classés parmi les mollusques bivalves. L'espèce d'huître étudiée dans cette thèse fait partie de l'embouche des mollusques, de la classe des bivalves, de l'ordre des ostréidés, du genre *Crassostrea* et de l'espèce *gigas* (Thunberg, 1793). L'espèce est originaire d'Asie, mais plusieurs vagues d'importations ont permis sa dissémination dans de nombreuses régions du monde, notamment en Europe (Grizel & Héral, 1991).

2.1. L'écologie des huîtres

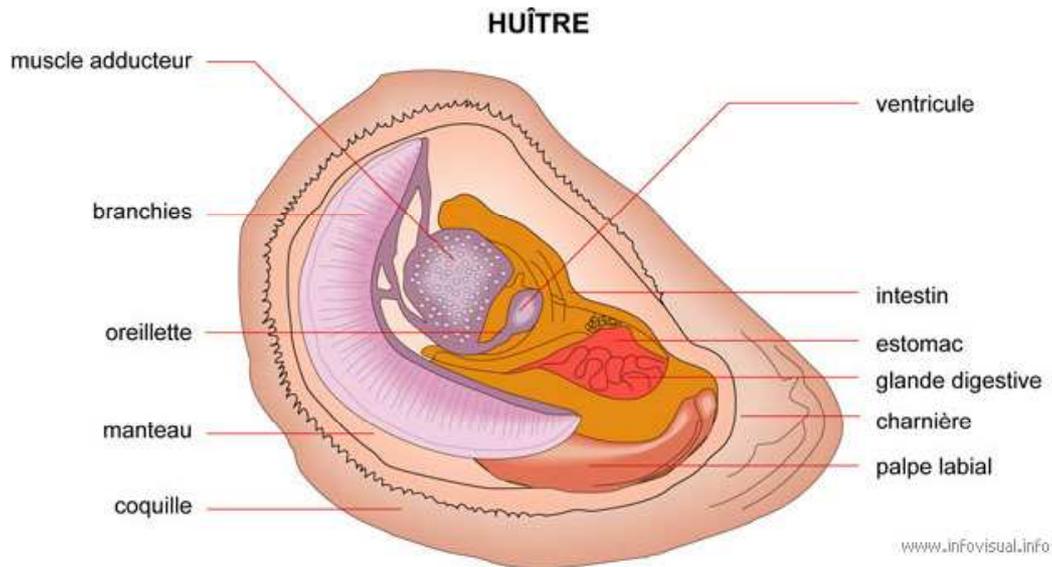
Les *Crassostrea* sont des huîtres de l'estran (partie du littoral découvrant à chaque marée). Les huîtres occupent deux types de biotopes en fonction de leur stade de développement. Les embryons et les premiers stades larvaires ont un mode de vie planctonique. Les huîtres juvéniles et adultes sont des animaux sédentaires, fixés, peuplant majoritairement des substrats durs, au niveau des zones littorales. On trouve des huîtres à peu près n'importe où dans le monde, en général dans les endroits abrités (bassins, étangs, lagons...). En effet les différentes espèces ont su s'adapter aux différents milieux et biotopes du monde.

Les huîtres sont des animaux filtreurs et brassent d'importants volumes d'eau nécessaires à leur nutrition et à leur respiration. Ils sont par conséquent en interaction permanente avec leur environnement.

2.2. Anatomie de l'huître

Les huîtres sont des animaux à corps mou comprimés latéralement et composés de deux valves articulées autour d'une charnière et d'un muscle adducteur puissant (Eble and Scro, 1996). Le pied est atrophié et l'animal est couché sur le côté gauche (valve gauche) (**Figure 2**).

A



B

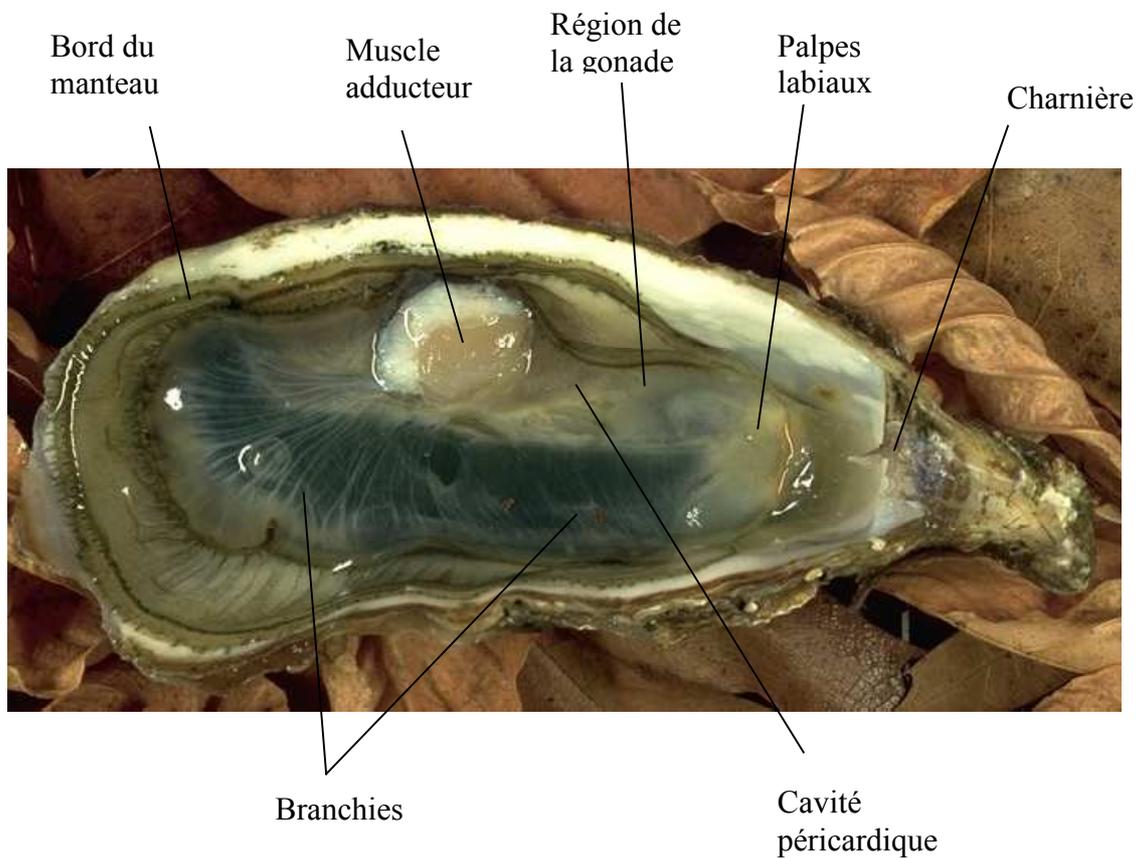


Figure 2 : **Anatomie interne de l'huître creuse *C. gigas***. **A** : Schéma d'une vue interne détaillée de l'huître. La valve droite n'est pas représentée. **B** : Photo de l'anatomie interne de l'huître. La valve droite a été ôtée et le pan gauche du manteau excisé.

Introduction générale

Le corps est enveloppé entre les deux pans du manteau dont le bord est composé de trois replis. Le repli externe secrète les deux couches externes de la coquille : le periostracum et la couche prismatique (carbonate de calcium). La couche nacrée de la coquille est secrétée par l'épithélium externe du manteau. Le repli médian a un rôle sensoriel et le repli interne est musculueux. Le manteau, riche en organes sensoriels, est couvert de cils à l'origine d'un courant d'eau entre les valves.

L'espace libre entre les deux lobes du manteau est appelé cavité palléale. De chaque côté de la masse viscérale se trouve une paire de branchies lamellaires. Les branchies assurent les fonctions de respiration mais aussi de nutrition. Elles sont en effet constituées de filaments ciliés créant un courant d'eau continu. Les branchies secrètent un mucus piégeant les aliments microscopiques qui seront dirigés vers l'orifice buccal, aidées par les quatre palpes labiaux.

La masse céphalique est absente (acéphale) et n'est plus représentée que par la bouche et les palpes labiaux. L'estomac forme un long caecum où se trouve une évagination tubulaire, le stylet cristallin, composé d'une gelée à forte teneur en enzymes digestives. L'estomac est entouré et relié à une glande digestive volumineuse (hépatopancréas).

Les huîtres ont un système circulatoire partiellement clos. En effet, il existe un système circulatoire mais le fluide circulant (hémolymphe) n'est pas confiné aux vaisseaux et au cœur. Il peut s'insinuer librement au sein des tissus et de sinus cœlomiques. Le cœur est simple, composé d'un ventricule et de deux oreillettes. Il est inclus dans une cavité péricardique située entre la masse viscérale et le muscle adducteur. L'hémolymphe ré-oxygénée au niveau des branchies est reconduite au cœur par un système artériel.

Le système d'excrétion est assuré par un rein constitué d'une glande tubulaire situé au sein d'un sinus rénal.

Le système nerveux est réduit, secondairement décentralisé, et constitué de quelques ganglions difficilement observables.

2.3. Reproduction et développement de l'huître

L'huître creuse est un hermaphrodite de type alternatif irrégulier (Galtsoff, 1964 ; Gérard *et al*, 1995). En règle générale, l'animal est mâle lors de la première saison de reproduction puis les changements de sexe alternent, entre deux saisons (Guo *et al*, 1998 ; Lango-Reynoso *et al*, 1999).

Chez l'huître, la reproduction est externe : les gamètes mâles et femelles sont libérées directement dans le milieu et la fécondation a lieu en « pleine eau ». L'émission des gamètes se produit généralement lors de la période estivale, une à plusieurs fois par an selon la localisation géographique (Gouletquer, 1997 ; Chavez-Villalba *et al*, 2001). Après fécondation, l'œuf se développe progressivement, passant des stades morula, blastula, gastrula à la larve trocophore (**Figure 3**). La larve trocophore se différencie en larve véligère, en forme de D caractéristique des larves planctotrophes. Elle se transforme progressivement en une larve pédivéligère : les ébauches des branchies apparaissent, le système nerveux se différencie plus nettement. La larve pédivéligère va ensuite se fixer au substrat et subir une métamorphose qui conduit à une réorganisation complète de l'animal pour donner une huître juvénile. L'huître est alors nommée naissain et mesure environ 0.4 mm. L'ensemble du cycle (de la fécondation au juvénile) dure environ 21 jours en fonction de la température. Le développement complet jusqu'à la maturité sexuelle dure de 5 à 24 mois selon les conditions de température et de niveau trophique.

L'appareil reproducteur, localisé dans la région gonadique, tissu mixte entre la glande digestive et le manteau, est constitué de tubules gonadiques, plus ou moins développés selon le stade de gamétogenèse. En période de maturité sexuelle, les tubules gonadiques envahissent la totalité de la région gonadique. Celle-ci devient blanchâtre et d'aspect laiteux. La reproduction comprend trois phases : en automne, une phase de repos sexuel marquée par la réorganisation du tissu gonadique (après la ponte) ; en hiver et au printemps, une phase de multiplication des cellules germinales par mitoses successives, une phase de développement des tubules gonadiques, puis de maturation des gamètes ; en été a lieu l'émission des gamètes. Les gamètes matures sont émis par pontes successives directement dans l'eau de mer où se déroule la fécondation.

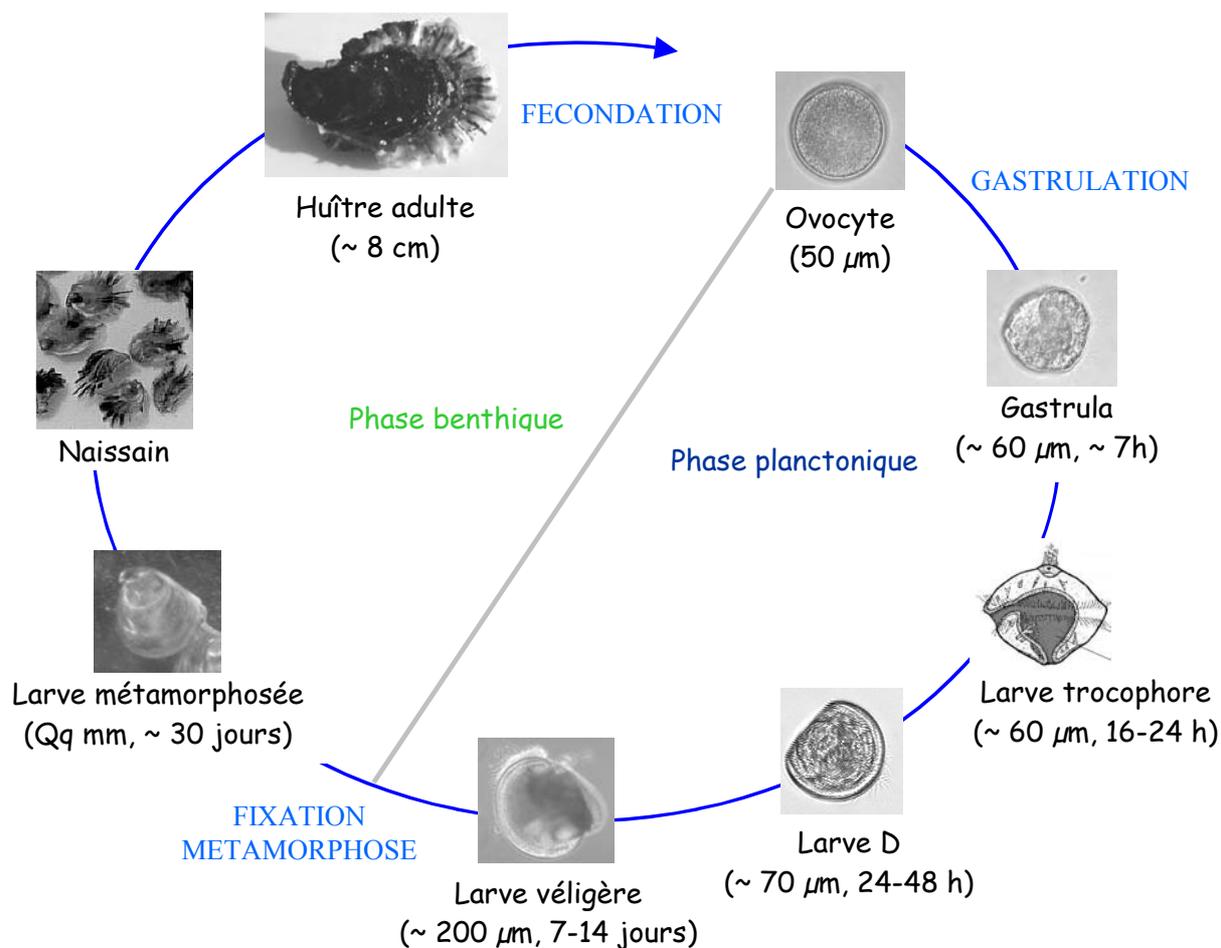


Figure 3 : Cycle de développement de *C. gigas*

Les différentes phases de la reproduction présentent une périodicité qui peut subir quelques variations chronologiques selon les conditions environnementales. La première maturité sexuelle est atteinte dès l'âge d'un an, mais reste réduite en terme de quantité de gamètes par rapport à des animaux qui réalisent leur deuxième ou troisième cycle de reproduction.

2.4. Nutrition de l'huître

L'huître se nourrit de particules microscopiques en suspension dans l'eau de mer. Ces particules sont principalement constituées de phytoplancton (microalgues) mais aussi de bactéries, zooplancton et de débris d'organismes morts (Lubet, 1978). La taille des particules est d'une grande importance dans la nutrition des bivalves. Les juvéniles et adultes sont capables de retenir des particules dont la taille varie entre 3 et 20 µm (e.g. Defossez & Hawkins, 1997). Pour l'huître creuse, le meilleur taux de rétention est obtenu avec des particules de 3 à 4 µm (Sornin *et al*, 1988).

Chez l'huître, la rétention de nourriture se fait d'abord grâce aux branchies qui filtrent les particules nutritives contenues dans le l'eau de mer. Piégées dans les mailles du filtre branchial, ces particules sont agglutinées dans des cordons muqueux. Les battements des cils branchiaux puis des palpes labiaux acheminent les particules jusqu'à l'orifice buccal. Les particules sont triées selon la taille et la présence d'ornementations au niveau des palpes labiaux. Les particules dont la taille est trop élevée sont éliminées sous formes de pseudo fécès. La bouche s'ouvre sur un œsophage court qui aboutit à l'estomac. Sa paroi ciliée et recouverte de mucus qui fait avancer les particules. L'estomac est le lieu d'un nouveau tri mais cette fois selon leur valeur nutritive. Il s'y effectue un broyage mécanique et une attaque enzymatique transformant le bol alimentaire en « soupe nutritive ». Le stylet cristallin, « tige » jaunâtre constitué de couches concentriques de mucoprotéines, bute sur la partie chitineuse de l'estomac. Des cils vibratiles le font tourner, le faisant s'user en libérant des enzymes digestives (amylase, laminarinase, cellulase). La présence de grains de sable à l'intérieur même de l'estomac facilite le broyage des particules. L'estomac est relié à la glande digestive par des canaux. La « soupe nutritive » remonte donc dans ces canaux qui se ramifient en tubules. La digestion se poursuit ici de manière intracellulaire par phagocytose des éléments nutritifs et attaque par des enzymes lysosomales. Les résidus de la digestion pénètrent finalement dans un intestin long. Dans cet organe, l'absorption des nutriments se poursuit. Les matières fécales (fécès) sont formées dans le rectum et expulsées par l'orifice anal.

2.5. Gestion des réserves énergétiques

L'effort de reproduction des huîtres occasionne d'importantes dépenses énergétiques soutenues par l'apport direct de nutriments mais surtout par l'utilisation de réserves préalablement constituées. La nature des réserves et le compartiment de stockage dépendent de l'espèce de bivalve. De même, au sein d'une même espèce, les périodes d'utilisation des réserves peuvent être légèrement décalées selon les sites puisque les étapes du cycle de vie sont liées à l'environnement (températures, photopériode...) (Gabbott, 1975 ; Bayne, 1976 ; Sastry, 1979, Fabioux *et al.*, 2005).

Chez les bivalves, les réserves énergétiques sont essentiellement constituées par du glycogène, néanmoins, certains lipides dits de réserve sont aussi stockés (triglycérides et stérols) (Gabbott, 1983). Chez la plupart des bivalves marins, le glycogène joue en effet un rôle central dans le support énergétique du métabolisme de maintenance et de la gamétogenèse (Bayne *et al.*, 1982 ; Gabbott, 1975 ; Ruiz *et al.*, 1992a et b).

L'évolution saisonnière du taux de glycogène est très liée aux différentes phases du cycle annuel de reproduction. Chez *C. gigas*, le tissu de réserve est présent majoritairement dans les palpes labiaux et la région gonade-manteau (Berthelin, 2000). Dans les palpes labiaux, la quantité de cellules impliquées dans le stockage du glycogène présente peu de variation saisonnière alors qu'elle varie fortement au cours de l'année dans la région gonade-manteau (**Figure 4**) (Berthelin *et al.*, 2000b). En automne, le tissu de réserve est encore fortement répandu dans la région gonade-manteau (Figure 3,A). Au printemps /été, cette région est envahie par les tubules gonadiques (plus foncé) et il n'y a presque plus de tissu de réserve (Figure 3,B).

Introduction générale

Les cellules spécialisées dans le stockage du glycogène et des lipides ont été caractérisées chez l'huître et portent le nom de cellules vésiculeuses (Berthelin, 2000). Les cellules de palpes et de région gonade-manteau présentent les mêmes caractéristiques ultrastructurales (Berthelin, 2000). Leur cytoplasme est rempli de fines granules de glycogène en période de mise en réserve.

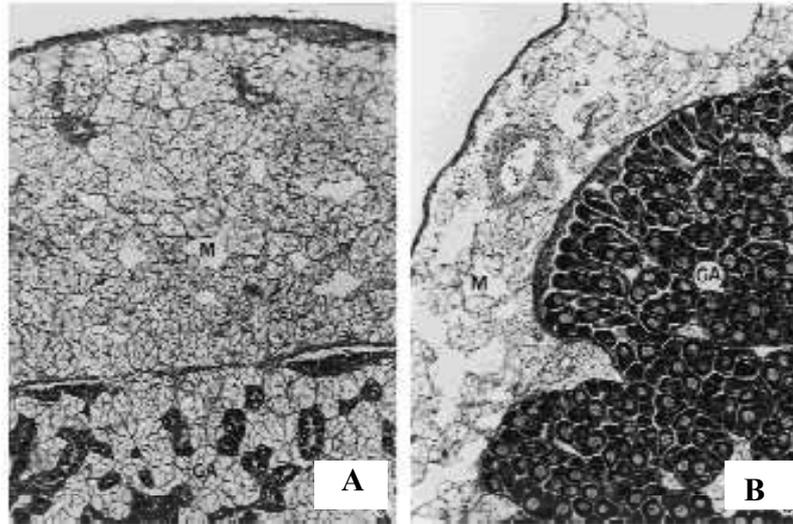


Figure 4 : **Variations saisonnières du tissu de réserve dans la région gonade-manteau** (D'après Berthelin *et al*, 2000).
A : Coupe transversale de la région gonade-manteau (GA) et du manteau (M) en automne. B : Coupe transversale de la région gonade-manteau (GA) et du manteau (M) en été.

3 *Le métabolisme du glycogène*

3.1. Généralités

Le glycogène est certainement la réserve énergétique la plus importante du règne animal. Des mammifères aux mollusques bivalves son utilisation est cependant bien différente.

Chez les vertébrés supérieurs, le glycogène est essentiellement stocké dans le foie (5-8% de la masse cellulaire) et les muscles (2% de la masse cellulaire). Dans le foie, il est utilisé pour réguler le taux de glucose sanguin (homéostasie du glucose). Il peut être utilisé pour libérer du glucose dans la circulation sanguine ou à l'inverse être synthétisé à partir du glucose circulant. Dans les muscles, le glycogène est le substrat énergétique de la contraction musculaire. La dégradation du glycogène alimente donc la glycolyse (voie métabolique reliée à la fabrication d'énergie).

Les poissons ont des réserves glucidiques sous forme de glycogène, mais ce dernier est un substrat énergétique assez peu utilisé (Kaushik, 1999). Il peut être la source d'énergie préférentielle dans le muscle blanc lors d'exercices intenses (Kaushik 1999). C'est également le substrat utilisé en réponse à un stress. Par exemple, lors d'un choc osmotique important, le taux de glycogène musculaire du poisson d'eau douce *Tilapia mossambica* diminue significativement (Bashamohideen & Parvatheswararao, 1972).

La grenouille rousse *Rana temporaria* est un amphibien pour qui le glycogène montre des fluctuations saisonnières qui semblent être contrôlées par la température et la photopériode (Koskela & Pasanen, 1975).

Chez les crustacés, les glucides jouent un rôle mineur dans les processus de maturation des gamètes, comparés aux lipides. Chez la langoustine *Nephrops norvegicus*, le taux de glycogène reste constant lors de la maturation (Rosa & Nunes, 2002). Chez cette même espèce, le glycogène semble être la source d'énergie en réponse à un jeûne prolongé (Baden *et al*, 1994) ou à une hypoxie (Hagerman *et al*, 1990). Il est également impliqué dans l'énergie allouée à l'osmorégulation du crustacé décapode *Chasmagnathus granulata* (Nery & Santos, 1993).

Chez les insectes migrateurs, le glycogène est une source d'énergie préférentielle du vol prolongé (Pour une revue voir : Van der Horst *et al*, 1997). Mais chez de nombreuses espèces, il sert également de source d'énergie pour la fabrication des gamètes comme c'est le cas chez le moustique *Aedes aegypti*. Pendant le premier cycle gamétogénétique, environ 60% des réserves en glycogène sont métabolisées et utilisées pour la fabrication d'énergie (Zhou *et al*, 2004). Les lipides servent quant à eux à approvisionner les œufs (Zhou *et al*, 2004).

Chez les mollusques bivalves, la reproduction est annuelle et représente le plus important processus physiologique de l'animal (ceux-ci ne se déplaçant pas, et n'ayant pas besoin de chasser leur nourriture). Le développement de la gonade est un mécanisme coûteux en énergie qui demande l'utilisation des nutriments ingérés et/ou le stockage et l'utilisation de réserves accumulées dans l'organisme (Sastry, 1979). Pour beaucoup

d'espèces, le tissu conjonctif de la gonade contient des cellules spécialisées dans le stockage des lipides et du glycogène (Sastry, 1979). C'est le cas chez l'huître *C. gigas* (Berthelin, 2000).

Les mollusques bivalves présentent un cycle saisonnier de stockage/utilisation du glycogène corrélé au cycle annuel de reproduction (Gabbott, 1975 ; Bayne *et al.*, 1976, 1982 ; Mathieu & Lubet, 1993). Il existe cependant une assez nette différence entre le cycle des mytilidés, pectinidés et celui de l'huître *C.gigas*. Le profil global du développement gamétogénétique de *Mytilus edulis* a été décrit par Chipperfield (1953) et Lubet (1959). En été il y a une courte période non reproductive pendant laquelle les réserves en glycogène et protéines s'accumulent dans le manteau (stade 0). Le développement de la gonade est initié en automne (stade I) suivi par une période de vitellogenèse (stade II). La perte du glycogène a lieu pendant l'hiver de façon synchrone avec le cycle gamétogénétique (stade II). A la fin de l'hiver, il y a une période de « dormance » pendant laquelle la gonade ne grandit plus. Elle est mature au début de l'été lorsque la(les) ponte(s) a (ont) lieu (stade III). Chez la moule, la période d'accumulation des réserves en glycogène coïncide avec les blooms phytoplanctoniques (De zwaan & Zandee, 1972). Ce n'est pas le cas de l'huître *C. gigas* dont le cycle des réserves en glycogène est temporellement inversé à celui de la moule (accumulation en automne/hiver, utilisation eau printemps/été). De même, chez l'huître américaine *Crassostrea virginica*, la gamétogenèse (période d'utilisation des réserves) a lieu lorsque la nourriture est abondante dans le milieu naturel (Soniat & Ray, 1985). Chez *C. gigas*, il y a donc un véritable cycle saisonnier de stockage du glycogène (voir aussi partie : rappel sur la biologie de l'huître) (Krishnamoorthy *et al*, 1979 ; Berthelin *et al*, 2000).

3.2. Voies métaboliques du glycogène

Le métabolisme du glycogène est une voie qui s'insère au niveau du **carrefour métabolique du glucose-6-phosphate (G6P)**. La synthèse du glycogène à partir des oses sanguins est appelée glucogenogenèse. Le glucose, qui entre dans la cellule via des transporteurs du glucose inter membranaires, est ensuite converti en G6P puis en glucose-1-phosphate (G1P) et en UDP-glucose avant d'être ajouté à une molécule de glycogène (**Figure 5**). A contrario, le glycogène peut être dégradé en résidus G1P, c'est la voie de la glycogénolyse. Ce G1P peut ensuite être reconverti en G6P et directement utilisé par la glycolyse en vue de la fabrication d'énergie. Il peut être reconverti en glucose et libéré dans le milieu extracellulaire (uniquement dans le foie : glycogenèse) ou encore être utilisé dans la voie des pentoses phosphates (non indiqué sur la figure 4).

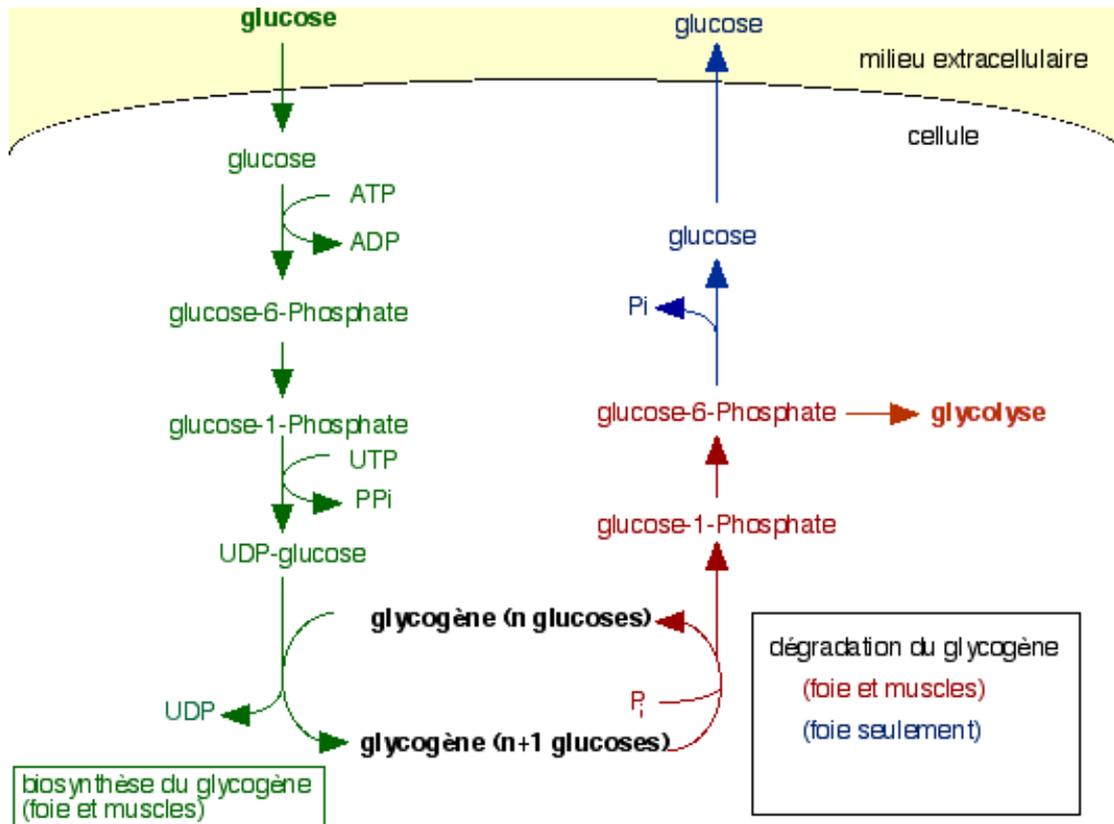


Figure 5 : Schéma récapitulatif des voies métaboliques de synthèse et de dégradation du glycogène.

3.2.1. Synthèse du glycogène : glucogenogenèse

La synthèse du glycogène se déroule essentiellement dans le foie et les muscles chez les vertébrés supérieurs. Traditionnellement, l'enzyme qui catalyse l'étape clef de la synthèse du glycogène est considérée comme le principal point de régulation de cette voie. Cette enzyme est la **Glycogène synthase (GS)**. Elle catalyse l'addition de résidus glucose au glycogène à partir de l'UDP-glucose. La **Figure 6** indique les différentes étapes de la synthèse du glycogène et les différentes enzymes impliquées.

Synthèse d'un primer pour initier la synthèse du glycogène

La Glycogène synthase qui assure la formation de la liaison en $\alpha(1-4)$ sur la molécule de glycogène est une enzyme d'élongation et ne peut initier *de novo* la synthèse du glycogène à partir du glucose. Il lui faut une amorce qui est soit un fragment de glycogène, soit une protéine appelée glycogénine (étape 1, **Figure 6**).

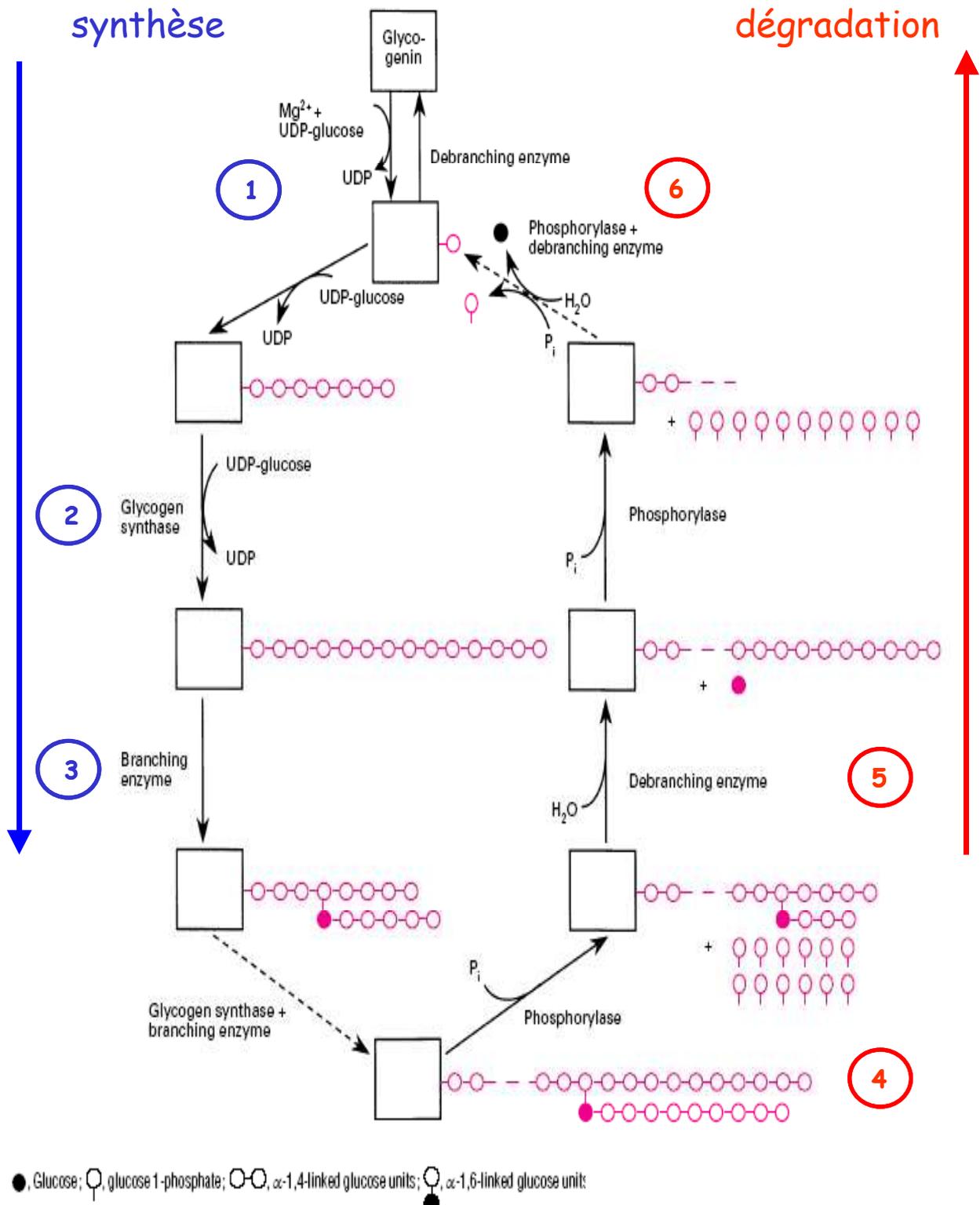


Figure 6 : Etapes de la synthèse et de la dégradation du glycogène. Bollen *et al.*, 1998.

Elongation de la chaîne en $\alpha(1-4)$ par la Glycogène synthase

L'élongation de la chaîne est assurée par la Glycogène synthase qui transfère le résidu glucosyl de l'UDP-glucose à l'extrémité non réductrice de la chaîne de l'amorce ou du glycogène en élongation (étape 2, **Figure 6**). Elle réalise une liaison en $\alpha(1-4)$.

Elongation de la chaîne en $\alpha(1-6)$ par une Glucosyltransférase

Les chaînes secondaires sont rapportées à la molécule de glycogène par une $\alpha(1-6)$ glucosyltransférase, appelée aussi enzyme « branching » (Etape 3, **Figure 6**).

3.2.2. Dégradation du glycogène : glycogénolyse

L'enzyme principale de dégradation du glycogène endogène est la **Glycolyse phosphorylase (GP)** qui libère des résidus G1P. Deux autres enzymes interviennent cependant dans la dégradation du glycogène : une Glucosyltransférase et une $\alpha(1-6)$ Glucosidase. La séquence des réactions enzymatiques associée à la dégradation du glycogène est indiquée à la **Figure 6**.

Coupure en $\alpha(1-4)$ du glycogène par la Glycogène phosphorylase

La dégradation du glycogène proprement dite est catalysée par la Glycogène phosphorylase (étape 4, **Figure 6**). Cette enzyme coupe les liaisons en $\alpha(1-4)$ à partir de l'extrémité non réductrice du glycogène et fixe sur le carbone 1 du glucose libéré, un groupement phosphate (consommation d'un ATP). Le G1P est donc libéré. La réaction est répétée de façon séquentielle sur le glycogène jusqu'à 4 résidus glucose sur chaque chaîne avant la liaison $\alpha(1-6)$.

Coupure en $\alpha(1-6)$ du glycogène par une Glucosidase

Enfin une α -glucosidase (« debranching enzyme ») hydrolyse les résidus glucoses reliés par la liaison $\alpha(1-6)$ et libère les glucoses libres (étape 5, **Figure 6**). L'action de la GP peut reprendre sur les chaînes en $\alpha(1-4)$ dégagées des chaînes secondaires.

Glycosyl-4,4-transférase

La Glucosyl-4,4-transférase (autre enzyme « debranching ») intervient sur la structure résiduelle du glycogène et libère la glycogénine (étape 6, **Figure 6**).

3.3. Position du métabolisme du glycogène dans celui des glucides *

Le rôle du glycogène dans le métabolisme énergétique dépend énormément de l'organisme et de l'organe considéré. Il est important de noter que le métabolisme du glycogène a pour point d'entrée et de sortie le G6P. Le G6P est un carrefour métabolique central du métabolisme des glucides. Il est le point intermédiaire de la glycolyse (fabrication d'énergie) et de la néoglucogenèse (endogenèse de glucose à partir des acides aminés). Il est aussi le point de départ de la voie des pentoses phosphates (impliquée dans la synthèse des acides nucléiques).

L'existence de ces voies métaboliques classiques (glycolyse, cycle de Krebs, chaîne respiratoire) est bien établie chez les mollusques (De Zwaan, 1977). Les différences observées au niveau biochimique sont essentiellement des différences de paramètres enzymatiques ou de régulation des enzymes mais pas à des différences dans la présence/absence des différentes enzymes impliquées. C'est pourquoi les différentes voies sont explicitées ici d'après le modèle vertébré.

3.3.1. Du glucose au glycogène

L'accumulation du glycogène est une réponse physiologique à l'augmentation du glucose sanguin post-prandiale. Les voies métaboliques qui autorisent l'incorporation de nouvelles unités glucose dans le glycogène sont bien connues et décrites chez les vertébrés supérieurs comme chez certains invertébrés modèles. Elles impliquent l'action de plusieurs protéines et enzymes. Rappelons que chez les mammifères, le foie est en mesure de produire du glucose à partir du glycogène. Les muscles n'ont pas cette capacité et utilisent plutôt le glycogène comme source d'énergie immédiate.

Les voies métaboliques qui mènent du glucose au glycogène sont tout d'abord le transport trans-membranaire du glucose et la phosphorylation du glucose en G6P. Ce chemin est un peu différent entre le foie et les muscles. La suite des voies biochimiques vers la synthèse du glycogène (conversion du G6P en G1P puis en Uridine Di PhosphoGlucose) a été décrite précédemment et ne présente pas de différence entre les deux tissus. La **Figure 7** représente l'ensemble des voies qui relient le glucose à la synthèse du glycogène.

a) Dans le foie

Dans les hépatocytes, le glucose extra et intracellulaire est en équilibre. Cela est dû à au principal transporteur du glucose hépatique GluT 2 (Bell *et al.*, 1993). La Glucokinase (GK ou Hexokinase IV) est la forme dominante d'enzyme phosphorylante du glucose des hépatocytes (et des cellules sécrétrices du pancréas) (Iynedjian, 1993). Cette enzyme a des propriétés cinétiques différentes comparée aux autres membres de la

*

Les informations non référencées de la partie 2.3 sont tirées de l'ouvrage général de biochimie : Lehninger, 1994.

famille des Hexokinases. En particulier, elle n'est pas inhibée par son produit, le G6P. Le flux de glucose à travers la GK est sensible aux fluctuations de son substrat dans des concentrations physiologiques (Iynedjian, 1993). L'activité de la GK est précisément modulée par une protéine régulatrice spécifique de la Glucokinase du foie (GKPR) (Van Schaftingen *et al.*, 1997). Dans le foie, la synthèse du glycogène est fortement corrélée aux activités de la Glucokinase et de la Glycogène synthase (Ferrer *et al.*, 2003).

b) Dans le muscle

Le glucose est transporté à travers la membrane principalement via le transporteur GluT 4. GluT 4 a une forte affinité et une faible capacité de transport du glucose. En l'absence d'insuline, le transporteur GluT 4 est localisé dans des vésicules donc inactif. Sa translocation a lieu jusqu'à la membrane en cas de fixation membranaire de l'insuline sur son récepteur (Azpiazu *et al.*, 2000). Par conséquent, à l'inverse du foie, le transport du glucose est insulino-dépendant. D'un autre côté, le muscle ne possède pas la Glucokinase du foie mais exprime deux isoformes I et II de l'Hexokinase (Wilson, 1998). Chacune a un Km faible pour le glucose et est inhibée par de faibles concentrations de G6P. Dans le muscle, la synthèse du glycogène est essentiellement contrôlée par le transporteur GluT4 et la Glycogène synthase (Ferrer *et al.*, 2003).

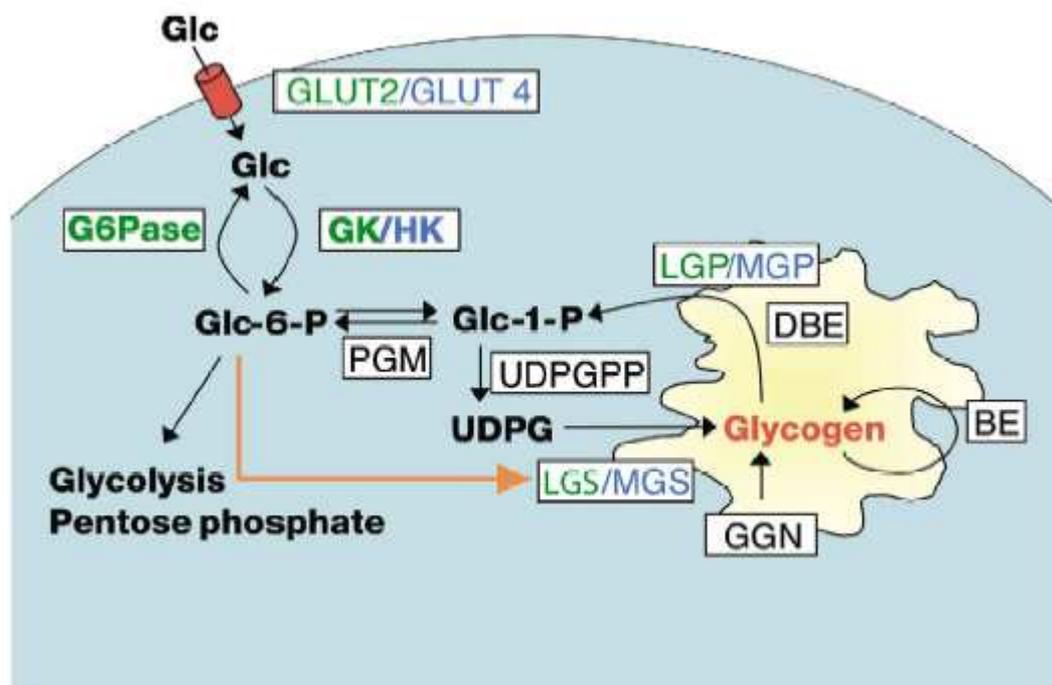


Figure 7 : Représentation schématique du métabolisme du glycogène dans le foie et le muscle de vertébrés. En vert sont indiquées les protéines du foie, en bleu celles du muscle. BE, enzyme « branching » ; DBE, enzyme « debranching » ; GGN, glycogénine ; Glc, glucose ; LGS/MGS, GS du foie /muscle ; LGP/MGP, GP du foie/muscle.

3.3.2. Du glycogène au glucose

Le glycogène est une source de glucose qui peut être utilisée pour réguler l'homéostasie du glucose chez les vertébrés supérieurs. Seul le foie a la capacité de relâcher du glucose dans la circulation sanguine. Les voies métaboliques impliquées sont la glycogénolyse d'une part, la conversion du G1P en G6P par la Phosphoglucomutase (PGM) et la déphosphorylation du G6P en glucose par la Glucose-6-phosphatase (G6Pase) d'autre part (**Figure 7**). Le passage du glucose par la membrane plasmique fait également intervenir des transporteurs du glucose.

3.3.3. Du glycogène à l'énergie

Le G6P libéré par la glycogénolyse peut aussi être utilisé directement par la voie de la glycolyse. La glycolyse anaérobie est une chaîne métabolique qui permet à une cellule d'extraire de l'énergie directement du glucose. Universelle, elle est partagée par tous les êtres vivants, des bactéries les plus primitives à l'homme. Les protéines qui la constituent sont les mêmes dans les différents embranchements, les modes de régulation aussi. Chez toutes les cellules vivantes, cette voie s'effectue en totalité dans le cytoplasme. La production d'énergie cellulaire se réalise en deux temps : par la glycolyse (**Figure 8**), puis par la respiration au sein des mitochondries.

Par l'intermédiaire d'une phosphofructoisomérase et d'une phosphofructokinase, le G6P va être convertie en fructose-6-P et en fructose-1,6 biphosphate. Sous l'action d'une aldolase, le fructose-1,6-P va être clivé en deux trioses, l'aldéhyde-3-phosphoglycérique (3PG) et la dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Le DHAP est isomérisé en 3PG par une triosephosphate isomérase. Les deux molécules de 3PG sont ensuite métabolisées de la même façon.

Jusque là, la voie a consommé de l'énergie, à partir de maintenant, elle va en produire. Tout d'abord une oxydation du 3PG en présence de NAD^+ et de phosphate va donner sous l'action de la glycéraldéhyde-phosphate deshydrogénase, du 1,3-biphosphoglycérate. Cette réaction très exergonique va produire un NADH et le triose est maintenant bi-phosphaté. Le second phosphate est très réactif. Une première desphosphorylation par la phosphoglycérate kinase va donner du 3-phosphoglycérate (PGA) et convertir une molécule d'ADP en ATP. Une isomérisation par une phosphoglycérate mutase et une deshydratation par une énoïase va donner successivement du 2-phosphoglycérate (2-PGA) et du phosphoenol pyruvate (PEP), ce qui amène le phosphate restant dans un état très réactif. Une deuxième déphosphorylation par la pyruvate kinase va permettre de récupérer l'énergie du phosphate sous forme d'ATP et donner le produit final de la voie, le pyruvate. Le bilan de la glycolyse est de deux moles d'ATP produites pour une mole de glucose consommée.

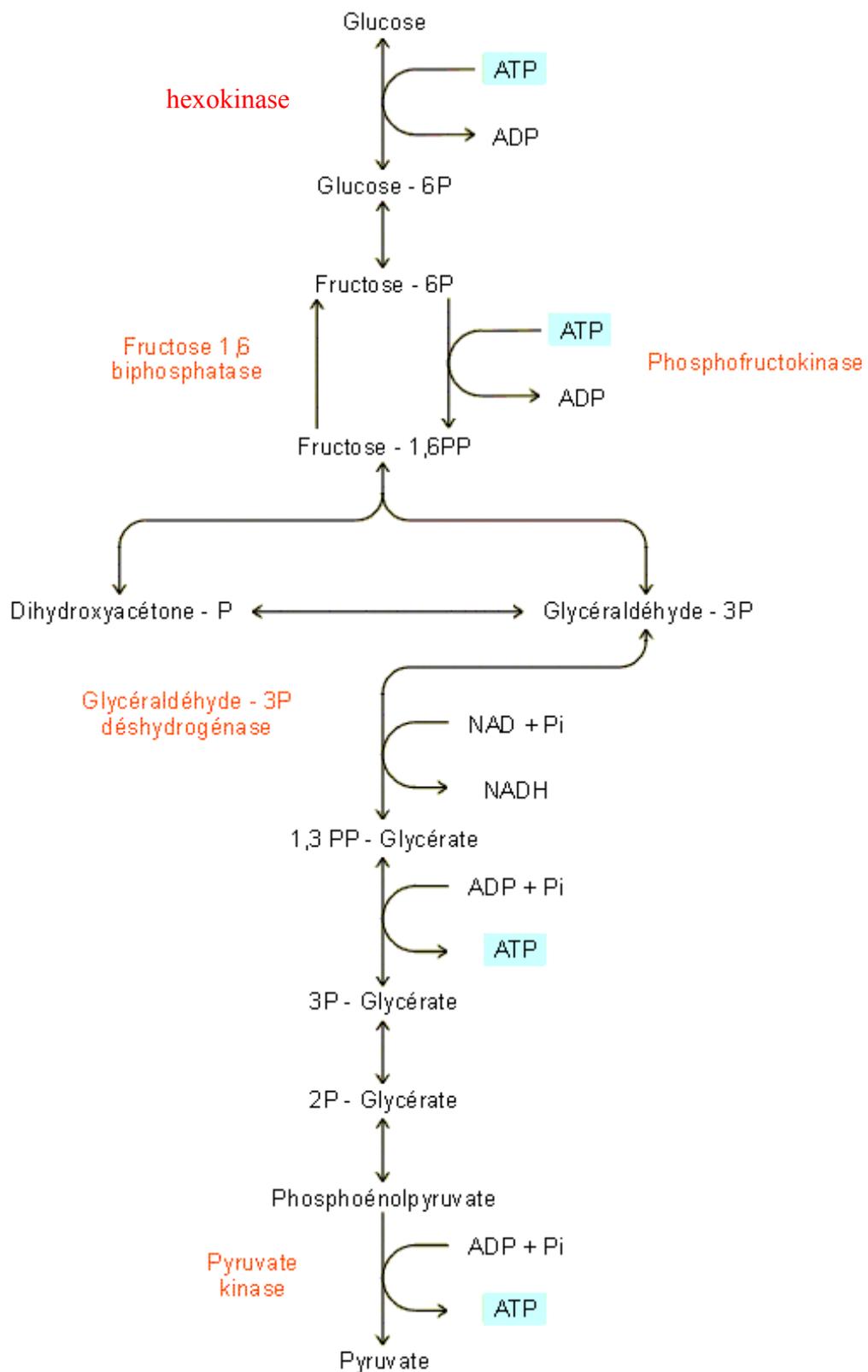


Figure 8 : Schéma détaillé de la glycolyse. Evènements cytoplasmiques de transformation du glucose au pyruvate. En rouge sont indiquées les principales enzymes limitantes de la glycolyse : Hexokinase ; Phosphofructokinase ; Fructose 1,6 biphosphatase ; Glycéraldéhyde -3P déshydrogénase et Pyruvate kinase.

Dans le cas le plus général (**Figure 9**), les pyruvates formés sont ensuite dégradés en citrate au sein des mitochondries lors du **cycle de Krebs** (ou cycle de l'acide citrique). A chaque tour du cycle de Krebs, ATP, NADH et FADH₂ sont produits et stockés. NADH et FADH₂ vont être réduits par la chaîne respiratoire pour fabriquer de nouvelles molécules d'ATP.

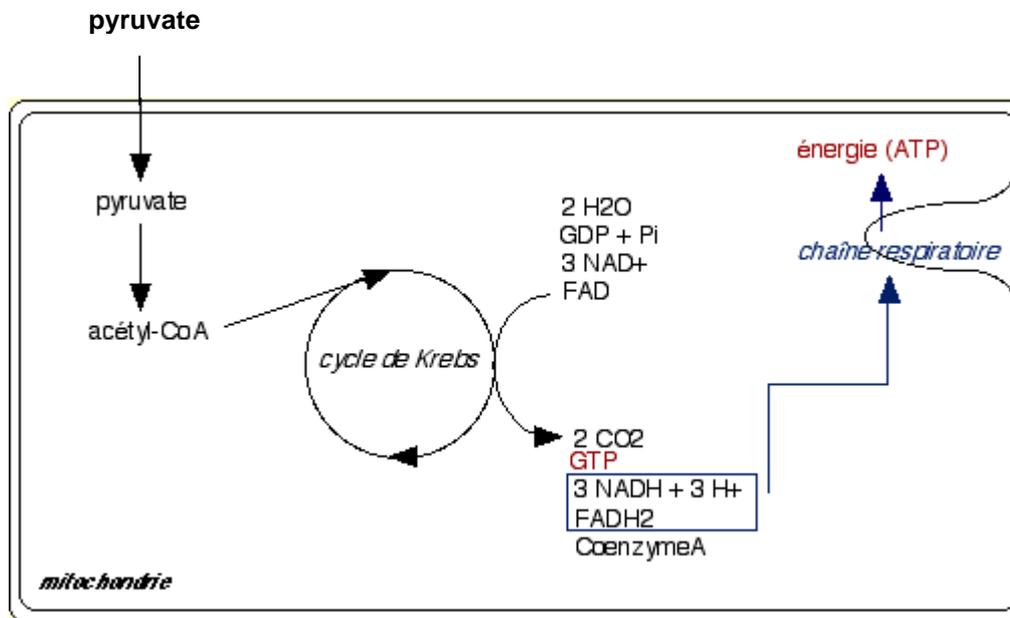


Figure 9 : **Schéma de l'utilisation mitochondriale du pyruvate via le cycle de Krebs.** A : Schéma du pyruvate jusqu'à la fabrication d'ATP par la chaîne respiratoire.

Le bilan maximal du cycle de Krebs, après réduction des co-enzymes par la chaîne respiratoire, est de 38 molécules d'ATP, produites à partir d'une seule molécule de glucose.

3.4. Régulation du métabolisme du glycogène

La régulation du métabolisme assure l'homéostasie du milieu intra-cellulaire en dépit des changements du milieu externe (concept de Claude Bernard du XIX^{ème} siècle). La base qui sous tend la réalisation et la préservation de l'homéostasie consiste en des réactions catalysées par des enzymes qui se produisent à des vitesses soigneusement équilibrées et coordonnées, sensibles à des changements de l'environnement cellulaire externe comme interne.

Pour adapter la synthèse et la dégradation des métabolites aux besoins physiologiques, les activités de toutes les voies métaboliques sont étroitement contrôlées en permanence. Le flux de métabolites à travers une voie dépend avant tout de l'activité des enzymes qui participent à cette voie. Pour piloter une voie, il suffit de modifier l'activité de l'enzyme qui catalyse l'étape la plus lente de la chaîne réactionnelle. L'activité des enzymes clefs, peut être modifiées sur plusieurs plans indépendants.

3.4.1. Contrôle par compartimentation cellulaire

a) Chez les vertébrés

La compartimentation cellulaire chez les eucaryotes assure l'efficacité métabolique. Les cellules comprennent à la fois des voies cataboliques et des chemins anaboliques. Il est nécessaire que ces voies soient séparées. Dans de nombreux cas, la compartimentation est physique : les enzymes de dégradation des protéines sont contenues dans des lysosomes (séparés du reste de la cellule par une membrane lipidique). Une autre forme de compartimentation est obtenue du fait de la haute spécificité de substrat montrée par les enzymes.

Chez les vertébrés supérieurs, le glycogène est essentiellement stocké dans les hépatocytes du foie et les cellules musculaires. Visibles au microscope électronique, les granules de glycogène, reliés entre eux à la manière d'un chapelet, sont localisés dans des sites intracellulaires spécifiques (Lehninger, 1994 ; Shearer, 2002). Chez les mammifères, le glycogène est généralement décrit comme cytosolique bien qu'un certain nombre d'études parlent d'une localisation à proximité des membranes (*e.g.* Cardell *et al*, 1985). Le glycogène est également décrit comme étant présent dans des lysosomes (Geddes *et al*, 1977).

La Glycogène synthase change de localisation intra cellulaire en réponse au glucose. En effet, dans le muscle, la GS se déplace du noyau au cytosol lorsque la concentration de glucose augmente (Cid *et al*, 2000 ; Ferrer *et al*, 1997). La GS du foie présente quant à elle une distribution cytosolique en l'absence de glucose, puis s'accumule à la périphérie des hépatocytes lorsque la concentration en glucose augmente (Fernandez-Novell *et al*, 1997 ; Garcia-Rocha *et al*, 2001). Le G6P est aussi responsable de l'activation et de la translocation de la GS (Fernandez-Novell *et al*, 1992). Les changements de distribution de la GS (et de la Glucokinase) opérés par le glucose sont corrélés à l'augmentation de la synthèse du glycogène (Agius, 1994).

Ceci permettrait d'ordonner dans l'espace, la synthèse et la dégradation du glycogène et représenterait un avantage fonctionnel pour ce métabolisme (Ferrer *et al.*, 2003).

Dans le muscle, 40% de la GP est généralement accolée au réticulum endoplasmique. La GP est solubilisée lorsque elle subit une modification covalente par la Phosphorylase kinase (Cuenda *et al.*, 1993). Field et ses collaborateurs (2006) proposent une hypothèse de **compartimentation fonctionnelle** dans la régulation de la GP où les trois enzymes du réticulum endoplasmique : GP, Créatine kinase (CK) et ATPase calcium dépendante, formeraient un **complexe tri-enzymatique**. La Créatine kinase (CK) est souvent décrite comme un tampon spatial et temporel de l'ATP (Saks *et al.*, 1991). La phosphorylation/déphosphorylation de la créatine (une sorte de transporteur d'ATP) par la CK permet de modifier localement, à l'intérieur de la cellule, le potentiel de phosphorylation. La phosphocréatine est une importante source d'énergie pour la pompe ATPase calcium dépendante du réticulum endoplasmique (cellules musculaires) qui fournit l'énergie à la contraction. Cette enzyme du réticulum clive donc l'ATP et relâche de l'ADP et du phosphate. Le phosphate libéré serait séquestré dans le complexe tri-enzymatique et pourrait être directement utilisé comme substrat par la GP pour dégrader le glycogène. D'autre part, l'ATP est l'inhibiteur allostérique de la GP (forme b, voir III.2.2). Le couplage de la CK avec la GP joue donc un rôle dans la régulation de l'enzyme clef de la glycogénolyse.

b) Chez les invertébrés

Ces mécanismes de compartimentation cellulaires du métabolisme du glycogène ont été beaucoup moins étudiés chez les autres organismes. Cependant, on retrouve dans certains travaux, une description sub-cellulaire des métabolites assez similaire à celle décrite chez l'homme. Par exemple, des granules de glycogène sont visibles dans le cytoplasme des cellules associées à l'estomac du crustacé *Derocheilocaris remanei* (Fernandez *et al.*, 2002). Chez la moule *M. edulis*, les cellules impliquées dans le stockage du glycogène (VCT : Vesicular Connective Tissue cells ; cellules dites vésiculeuses) montrent des particules de glycogène cytoplasmiques mais également du glycogène associé à des lysosomes en périphérie cellulaire (Pipe *et al.*, 1987 ; Lenoir *et al.*, 1989). Un type cellulaire proche existe chez l'huître américaine *C. virginica* (Eckelbarger & Davis, 1996) et chez l'huître *C. gigas* (Mathieu & Lubet, 1993 ; Berthelin *et al.*, 2000a). Des vésicules membraneuses sont observées chez *C. gigas* en plus du glycogène diffus dans le cytoplasme (Berthelin *et al.*, 2000a). Il semble donc exister deux formes de stockage du glycogène chez l'huître : une forme cytoplasmique et une forme vésiculeuse (Berthelin *et al.*, 2000a).

3.4.2. Contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel

a) Contrôle transcriptionnel

Définition

La biosynthèse des enzymes peut être influencée sur un plan génétique. L'impact sur la synthèse de l'enzyme se porte en premier lieu sur la synthèse de l'ARNm correspondant par conséquent à la transcription du gène codant l'enzyme (régulation transcriptionnelle, voir Lewin, 1996). En amont du premier nucléotide transcrit se trouve une région 5' non transcrite qui joue un rôle essentiel dans le contrôle de la transcription. La région de contrôle située à proximité directe du site d'initiation de la transcription est appelée promoteur proximal. Dans cette région sont trouvés essentiellement la TATA box, présente sur quasiment tous les gènes, la CCAAT box et la GC box, plus rare. Ces motifs servent à la fixation de l'ARN polymérase. Il existe toute une autre série de séquences ADN dispersées tout au long de la région 5', appelées éléments « cis-régulateurs ». Sur ces sites vont se fixer des éléments « trans-régulateurs ». Ces facteurs sont le plus souvent des protéines, mais diverses substances protidiques font également partie de ces facteurs trans-régulateurs. Quand un de ces éléments se fixe sur une séquence cis-régulatrice ADN, le taux de transcription, c'est à dire la quantité d'ARNm synthétisé, est brusquement modifié : augmentée (régulation positive) ou diminuée (régulation négative). Ce mécanisme permet d'ajuster le taux de transcription d'un gène aux besoins cellulaires. Par exemple, en période de développement et de croissance cellulaire, la quantité de protéines synthétisées, donc d'ARNm, doit être beaucoup plus élevée. Certaines hormones, comme les hormones stéroïdes, agissent en augmentant le taux de transcription de cette manière.

Les cellules répondent donc à des signaux (intra et extra-cellulaires) en « allumant » ou en « éteignant » certains gènes, ainsi qu'en modulant l'importance de la transcription des gènes actifs. Un des exemples classiques d'élément cis-régulateur impliqué dans la régulation de certains gènes du métabolisme des glucides chez les vertébrés est l'élément GIRE (pour Glucose Responsive Element). Ce motif a été trouvé dans les promoteurs des gènes répressibles par le glucose comme celui de la Phosphoenolpyruvate carboxykinase du foie de rat (Shih & Towle, 1992).

Gènes du métabolisme du glycogène

Chez les mammifères, la régulation transcriptionnelle de la GS et de la GP sont de moindre importance comparé à leur régulation enzymatique. En revanche, c'est une part de régulation importante chez la levure (Francois *et al*, 1992) où la présence d'une boîte TATA et de nombreux éléments régulateurs ont été reportés sur le promoteur des gènes GYS2 et GPH1 (codant respectivement la GS et GP) (Sunnarborg *et al*, 2001 ; Unnikrishnan *et al*, 2003). L'expression de ces enzymes semble en partie due à une régulation

transcriptionnelle. Chez cette espèce toujours, la quantité d'enzyme GS et GP augmente en même temps que le glycogène s'accumule, lorsque les cellules arrivent en phase stationnaire de croissance (Becker, 1982 ; Ni & LaPorte, 1995). L'augmentation simultanée des ARNm de ces deux enzymes métaboliques opposées suppose que l'expression de ces gènes est coordonnée. Pour un autre exemple, chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, le promoteur du gène de la GP 2 est activé en trans par l'AMPc lors du développement (Sucic *et al*, 1993). Des expériences de délétions dans le promoteur du gène de la GS peuvent abolir l'expression du gène ce qui prouve l'existence de séquences riches en GC (Williamson *et al*, 1996). La séquence du gène de la GS de *Dictyostelium discoideum* est par ailleurs très similaire à celles de la GS du muscle humain, de la levure et du foie de rat (Williamson *et al*, 1996).

Dans certains cas particuliers les gènes de la GS et de la GP peuvent être contrôlés de façon transcriptionnelle. Il existe par exemple un rythme circadien de la quantité d'ARNm GS et GP dans les astrocytes du cerveau de souris ayant une répercussion sur les activités enzymatiques correspondantes (Petit *et al*, 2002). Ces variations correspondent au cycle de réveil/sommeil. La quantité d'ARNm des deux gènes varie de façon similaire et montre un maximum au milieu de la période de réveil (Petit *et al*, 2002). Des études suggèrent une régulation transcriptionnelle de la GP par l'insuline et l'AMPc pour des cellules musculaires de rat en différenciation (Reynet *et al*, 1996). Chez le rat toujours, la synthèse de la GP serait sous influence neuronale puisqu'il a été montré que le niveau de transcrits de l'isozyme musculaire de la GP diminuait dans un muscle dénervé ou après une longue période d'inactivité (Matthews *et al*, 1998). Pour la GS, la quantité de transcrits est diminuée dans le muscle squelettique après trois jours de régime riche en lipides et pauvre en glucides, indiquant un contrôle nutritionnel de sa synthèse chez l'homme (Sparks *et al*, 2006). Toutefois, aucune région régulatrice particulière n'a été détectée dans le promoteur du gène GYS1 (GS forme muscle humaine), à part la région -692 à -544 (avant site d'initiation de la transcription) qui serait responsable de l'expression préférentielle de GYS1 dans le muscle (Fredriksson *et al*, 2004).

Chez les vertébrés, il existe plusieurs isoformes de la GP et de la GS qui sont différentiellement exprimées dans une large variété de tissus (Crerar *et al.*, 1988). Il existe trois isoformes pour la GP : muscle, foie et cerveau (Crerar *et al.*, 1988 ; Newgard *et al*, 1989). Au niveau des séquences d'ARNm, les formes muscles et cerveau de la GP sont plus proches entre-elles que de la forme foie (Crerar *et al.*, 1988 ; Hudson *et al.*, 1993). Il existe seulement deux isoformes pour la GS, une forme foie et une forme muscle présente dans la plupart des tissus (Browner *et al*, 1989 ; Klaslow & Lesikar, 1984). Les deux isoformes de la GS montrent environ 70% d'identité de séquence et ont quasiment les mêmes propriétés catalytiques (pour une revue : Roach, 2002).

La régulation transcriptionnelle des gènes de la GS et de la GP n'a pas été étudiée chez aucun invertébré modèle.

b) Contrôle post-transcriptionnel

Définition

Dans les cellules eucaryotes, la synthèse et la maturation des ARN messagers a lieu exclusivement dans le noyau. Ils sont ensuite exportés dans le cytoplasme et traduits par les ribosomes. La vie des ARNm se termine par des événements de dégradation catalysés par des exonucléases. Ces réactions conduisent à la perte de fonctionnalité des ARNm puis à leur hydrolyse complète. Leur hydrolyse libère des nucléotides qui seront réemployés à la synthèse de nouveaux acides nucléiques. La durée de vie des ARNm de cellules animales varie entre quelques minutes et une vingtaine d'heures. La dégradation des ARNm contribue donc au contrôle de l'expression des gènes et a une influence sur la quantité de protéine synthétisée (pour une revue voir McCarthy, 1998). De plus, pour certains gènes au moins, le taux de renouvellement des ARNm peut être régulé par des changements environnementaux. Il est maintenant admis que la dégradation des ARNm n'est pas un processus par défaut dans lequel des exonucléases coupent les séquences sans discrimination. Au contraire, tout comme la transcription, la maturation ou la traduction, la dégradation des ARNm est un processus précis qui dépend d'une variété de facteurs spécifiques : séquences cis-régulatrices et molécules trans-régulatrices. L'extrémité 5' d'un ARNm peut être le lieu d'un certain nombre d'éléments structuraux qui influencent sa stabilité. Dès sa transcription, l'extrémité 5' d'un ARNm est « protégée » par une structure particulière appelée coiffe du messager (cap). Cette coiffe dissimule l'extrémité 5' aux exonucléases 5'→3' spécifiques de cette partie de l'ARNm (McCarthy, 1998). D'autres éléments tels que la formation d'un complexe protéique dans la partie 5' UTR ou des structures secondaires de type boucles affectent la stabilité des ARNm. Ils exercent leur influence de deux façons : soit par inhibition de la traduction, soit par inhibition des activités exonucléases. L'extrémité 3' des ARNm eucaryotes est modifiée par addition de plusieurs nucléotides adénine (queue poly A). Cet élément semble jouer un rôle dans la dégradation des ARNm. D'autres déterminants stabilisateurs existent dans la partie 3'UTR et parfois dans l'ORF même de l'ARNm.

Dans l'ordre, la dé-adénylation de la queue poly(A) en 3' précède la perte de la coiffe cap en 5' (**Figure 10**). La dé-adénylation permet une diminution de la transcription, et probablement un arrêt de la traduction. La perte de cap entraîne ensuite la dégradation des ARNm par les exonucléases 5'→3'.

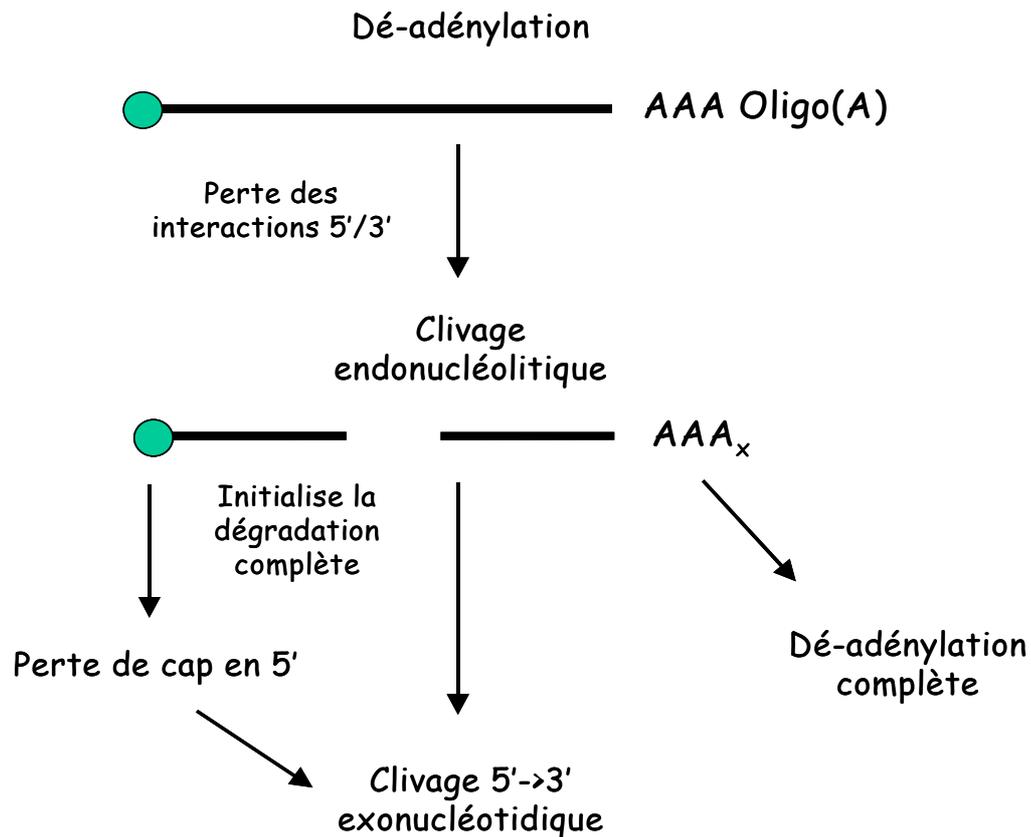


Figure 10 : Evènements de dégradation des ARN messagers.

Gènes du métabolisme du glycogène

Pour les ARNm de la GS et de la GP, quelques cas de régulation post-transcriptionnelle sont cités, notamment dans le muscle humain où la stabilité de l'ARNm de la GP est impliquée dans le contrôle de la contraction musculaire (Vali *et al.*, 2000). L'augmentation de la stabilité de l'ARNm GS serait également une modification induite par l'insuline sur des cellules hépatiques de rat (Okubo *et al.*, 1991).

A ma connaissance, aucune modification post-transcriptionnelle des gènes de la GS et de la GP n'a pour le moment été mise en évidence chez les invertébrés.

3.4.3. Contrôle par phosphorylation et allostérie enzymatique

Les réseaux de signalisation intracellulaire et les chemins métaboliques des cellules vivantes sont régulés via un réseau complexe d'enzymes en cascades (chock *et al.*, 1980). Chez les vertébrés, le contrôle des activités de la GP et de la GS est un exemple classique de système en cascade (Cohen, 1983 ; Roach, 2002). Pour éviter l'activation simultanée de la synthèse et de la dégradation du glycogène, la GS et la GP sont régulées réciproquement par un réseau d'enzymes et d'effecteurs allostériques (Cohen, 1978 ; Voet *et al.*, 1999 ; Mutalik *et al.*, 2004). Ainsi, le métabolisme du glycogène peut répondre à de fins signaux extra ou intracellulaires.

a) Contrôle enzymatique de la Glycogène phosphorylase

Chez les vertébrés

Les trois GP de vertébrés sont des homodimères d'environ 100 kDa codés par différents gènes. Toutes les isoformes de la GP (foie, muscle, cerveau) peuvent être régulées par une modification covalente (phosphorylation /déphosphorylation d'un résidu sérine en position 14) et par des modulations allostériques (Pour une revue, voir Bollen *et al.*, 1998). La somme de ces deux types de régulation répond à des signaux externes et intracellulaires qui reflètent l'équilibre énergétique de l'organe considéré. Ces facteurs peuvent être des effecteurs positifs ou négatifs (Fisher *et al.*, 1971 ; Hems & Whitton, 1980 ; Krebs, 1981 ; Madsen, 1986).

Les deux formes interconvertibles de la GP sont d'une part la forme non phosphorylée (GP *b*), dont l'activité catalytique dépend de la présence d'AMP, et la forme phosphorylée (GP *a*), qui est indépendante de l'AMP. Le contrôle de l'interconversion des formes dépend de l'activité de deux enzymes : la Phosphorylase kinase (GPK) pour la phosphorylation et la Protéine phosphatase I (PPI) pour la déphosphorylation (Stryer, 1995).

Il existe quatre sites indépendants de fixation des ligands allostériques pour la GP de vertébrés. La liaison des ligands à ces sites modifie la conformation de l'enzyme et induit soit un état actif R (pour Relâché), soit un état inactif T (pour Tendu). La fixation de multiples ligands sur ces sites allostériques peut conduire à des effets coopératifs ou compétitifs.

Le site actif

Lorsque les substrats Pi et G1P lient le site actif cela induit une conformation allostérique R active de la GP (Withers *et al.*, 1982). Lorsque le glycogène, le glucose ou l'UDPG se fixent, l'enzyme adopte une conformation T quasiment inactive (Sprang *et al.*, 1982, Madsen *et al.*, 1983) (**Figure 11**).

Le site des nucléotides

Appelé aussi site de l'AMP, il est constitué de trois sous sites. C'est le lieu privilégié de fixation des activateurs AMP, IMP comme des inhibiteurs ATP, ADP et G6P (Johnson *et al.*, 1979, 1987 ; Dombradi, 1981 ; Hata *et al.*, 1987 ; Carabaza, 1992 ; Klinov & Kurganov, 2001). Les substrats (Pi, UDPG) peuvent également se fixer sur ce site

Le site des nucléosides

Ce site appelé aussi site « inhibiteur » est le lieu de fixation des nucléosides (adénosine, inosine...) et de certains analogues de bases purine (par exemple la caféine). Il représente aussi un site secondaire de fixation des nucléotides (Johnson *et al.*, 1979 ; Dombradi, 1981 ;).

Le site de stockage du glycogène

C'est le site principal d'inhibition par le glycogène (Dombradi, 1981 ; Newgard *et al.*, 1989 ; Johnson *et al.*, 1989).

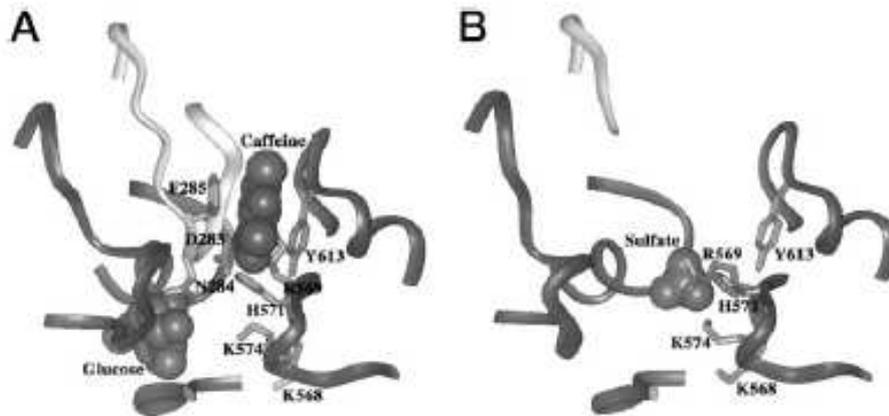


Figure 11 : Changement de conformation allostérique du site actif de la Glycogène phosphorylase. **A** : Liaison des inhibiteurs glucose et caféine : site actif en conformation inactive T. **B** : site actif en conformation active R après libération des ligands (D'après Buchbinder & Fletterick, 1996).

Les deux formes de la GP sont donc en équilibre constant entre ces deux états allostériques R et T. Chez les vertébrés, la GP *a* montre une constante allostérique (constante de l'équilibre entre l'état inactif /actif : R/T) plus faible que celle de la GP *b*. La GP *a* est donc la forme la plus active. Cette propriété confère aux vertébrés une certaine indépendance vis-à-vis des effecteurs allostériques et en particulier l'AMP (Madsen, 1986 ; San Juan Serrano *et al.*, 1991, 1993). La forme GP *b* (déphosphorylée, moins active) est activée par l'AMP, l'IMP et de fortes concentrations de Pi. Elle est inhibée par l'ATP, l'ADP, le G6P et l'UDPG (Dombradi, 1981).

Chez les invertébrés

La régulation de la GP *a* été étudiée chez quelques invertébrés par exemple chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Dombradi *et al.*, 1986), le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Vaandrager *et al.*, 1987), le vers à soie *Bombyx mori* (Morishima & Ueno, 1990), ou encore le crabe bleu *Callinectes danae* (Santiago *et al.*, 1974). Chez le criquet *L. migratoria* bien que l'AMP stimule la GP, il n'existe aucune forme qui nécessite absolument l'AMP pour montrer une activité (Applebaum & Schlesinger, 1973).

Pour les mollusques bivalves, les propriétés moléculaires et cinétiques de la GP ont été étudiées chez le pétoncle de baie *Argopecten irradians concentricus* (Chih & Ellington., 1986), le pétoncle japonais *Patinopecten yessoensis* (Hata *et al.*, 1987), la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (Vasquez-Baanante & Rossell-Perez, 1979a), la moule *Mytilus galloprovincialis* (San Juan Serrano *et al.*, 1991, 1993, 1995a et b, 1998a et b) et chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Hata *et al.*, 1993).

L'étude *in vitro* de la GP de *M. galloprovincialis* révèle des sites de fixations analogues à ceux décrits chez les vertébrés. Cependant, chez cette espèce, la GP est principalement présente sous sa forme GP *b*,

Introduction générale

déphosphorylée et AMP dépendante (San Juan Serrano *et al.*, 1993). La GP *a*, comme chez les vertébrés, n'est stimulée par aucune concentration d'AMP. Elle ne montre aucun effet allostérique et son activité maximale est égale à celle de la GP *b* (San Juan Serrano *et al.*, 1995a et b). De plus, les deux formes de la GP seraient exclusivement présentes sous leur état R, actif (San Juan Serrano *et al.*, 1995b). Ces propriétés rendent la GP de *M. galloprovincialis* probablement sensible aux variations de concentration de l'AMP.

L'effet des effecteurs allostériques est également différent de celui décrit chez les vertébrés. L'UDPG ne montre pas d'effet inhibiteur et l'affinité de l'enzyme pour le G1P est faible (San Juan Serrano *et al.*, 1998a). Chez *M. galloprovincialis*, la GP est finement régulée par la Charge Énergétique Adénylique (CEA) et les nucléotides adényliques (ATP, ADP et AMP). L'AMP n'active pas la GP *a in vitro* (San Juan Serrano *et al.*, 1995a). L'activité GP *b* est inversement corrélée à la CEA (San Juan Serrano *et al.*, 1998b). La GP *b* montre une cinétique d'inhibition non compétitive avec les nucléotides adényliques. L'ATP et l'ADP peuvent agir comme des activateurs de la GP *b* lorsque la concentration en AMP est faible, et comme des inhibiteurs lorsque la concentration en AMP est élevée (San Juan Serrano *et al.*, 1998b). De fortes concentrations en AMP, supérieures à 1,6 mM, ont un effet inhibiteur sur l'activité catalytique de la GP *b*, à cause d'une seconde liaison de cet effecteur sur le site allostérique des nucléosides (San Juan Serrano *et al.*, 1993). L'effet des nucléotides adényliques sur la GP de la moule est donc assez différent de celui montré chez les autres organismes (Childress & Sacktor, 1970 ; Helmreich *et al.*, 1964 ; Johnson *et al.*, 1989). Par ailleurs, le G6P agirait en synergie avec les nucléotides adényliques pour inhiber la GP *b* (San Juan Serrano *et al.*, 1998a). Le G6P varie avec le cycle de reproduction de la moule (Suarez *et al.*, 2005) et pourrait jouer un plus grand rôle régulateur que le glucose libre.

La GP de l'huître creuse *C. gigas* existe également sous ses deux formes *a* et *b* (Hata *et al.*, 1993). Les paramètres cinétiques de la GP *b* sont assez proches de ceux de la moule. L'ATP inhibe également les deux formes de la GP d'huître en l'absence d'AMP. Le G6P inhibe lui aussi très fortement l'activité des deux formes de la GP d'huître (Hata *et al.*, 1993). En revanche, l'activité catalytique de la GP *a* n'est plus inhibée par l'ATP en présence d'AMP. La forme GP *a* agirait comme l'enzyme active. Par ailleurs, la conversion de la GP *b* en GP *a* par phosphorylation serait lente, du fait de la très faible activité des Phosphorylase kinases chez les mollusques (Ebberink & Salimans, 1982 ; Chih & Ellington, 1986).

b) Contrôle enzymatique de la Glycogène synthase

Chez les vertébrés

La GS a été particulièrement étudiée en tant que premier exemple de la signalisation cellulaire de l'insuline (Villar-Palasi & Lerner, 1960). Deux isoformes de la GS ont été décrites : une forme retrouvée dans la plupart des tissus et le muscle, l'autre exprimée uniquement dans le foie (Roach *et al.*, 1998). Bien que les séquences en acides aminés de ces isoformes soient à 70% identiques, les séquences amino- et carboxyl-terminales montrent un degré d'homologies plus faible (Bai *et al.*, 1990). Ces régions contiennent les sites de

phosphorylation connus qui régulent l'activité de l'enzyme. Ces différences et leur distribution intracellulaire dissimilaire suggèrent que la GS du muscle et du foie ont des capacités distinctes dans le contrôle de la synthèse du glycogène de ces organes (Fernandez-Novell *et al.*, 1997, Ferrer *et al.*, 1997).

La GS a été purifiée à partir de nombreuses cellules d'eucaryotes, de la levure jusqu'aux mammifères en passant par l'ovocyte d'amphibien. Cependant, c'est l'enzyme du muscle mammalien qui a été la mieux caractérisée (Friedman & Lerner, 1963 ; Huijing & Lerner, 1966 ; Leloir & Cardini, 1957 ; Rosell-Perez & Lerner, 1963). Elle est constituée de sous-unités identiques, dont chacune a un poids moléculaire de 86 kDa. Il semble que le tétramère soit la plus petite forme polymérique active de la GS, bien qu'il soit connu que cette enzyme ait tendance à s'agréger.

Son activité est régulée à la fois par phosphorylation et par l'activation allostérique du G6P. Elle possède 9 sérines phosphorylables chez l'homme et le lapin (muscle), 2 dans la partie N-terminale, 7 dans la partie C-terminale (Poulter *et al.*, 1988 ; Skurat et Roach, 1996) (**Figure 12**). Une phosphorylation complète ou presque complète inactive la GS et bloque la synthèse du glycogène. C'est l'effet inverse de celui qu'on observe sur la GP. La GS existe, comme la GP, sous une forme a (active, déphosphorylée) et sous une forme b (peu active, phosphorylée).

Contrairement à la GP qui n'est phosphorylée que par une seule protéine kinase (la GPK), l'apport des phosphates de la GS est contrôlé par au moins dix protéines kinases (**Figure 12**). *In vivo*, la GS du foie peut être phosphorylée jusqu'à une stœchiométrie de 6 groupements phosphates par sous unité. Généralement, la phosphorylation est associée à une inactivation de l'enzyme (conversion en forme b). La phosphorylation de la GS du muscle conduit principalement à une diminution de son affinité pour le substrat UDPG.

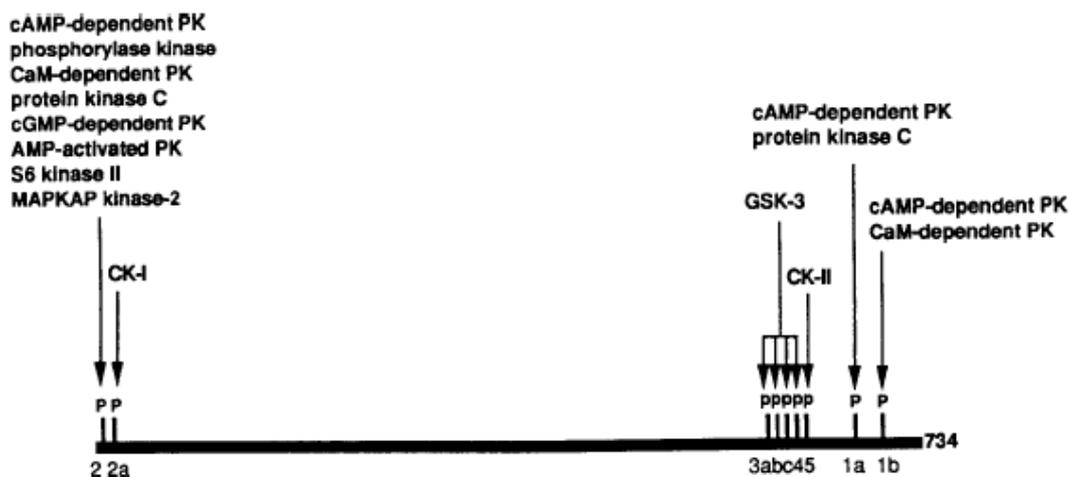


Figure 12 : Sites de phosphorylation de la Glycogène synthase. La GS du muscle de lapin (protéine de 734 acides aminés) est représentée par une ligne horizontale dense, avec les traits verticaux correspondant aux multiples sites de phosphorylation. La nomenclature classique pour ces derniers est indiquée en dessous. Les protéines kinases qui phosphorylent les sites protéiques *in vitro* sont également mentionnées. PK, protéine kinase; CaM, calmoduline; MAPKAP kinase-2, MAP kinase-activated protein kinase-2; CK-I, caséine kinase-I; CK-II, caséine kinase II; GSK-3, glycogène synthase kinase-3; P, phosphate fixé de manière covalente (Skurat et Roach, 1996).

La Protéine kinase A (PKA) fût la première enzyme reconnue pour phosphoryler la GS et ainsi l'inactiver (Soderling et al., 1974). On sait maintenant que le groupement phosphate est préférentiellement incorporé sur 3 sites : sites 1a, 2 et 1b. Le site 2, à proximité immédiate de l'extrémité NH₂-terminale, est aussi phosphorylé par bon nombre de kinases dont la Phosphorylase kinase, la protéine kinase II dépendante de la calmoduline, la PKC, la glycogène synthase kinase-4 (GSK-4) et une protéine kinase activée par la MAP-kinase. Le site 3, décomposé en 3 blocs (abc), est principalement phosphorylé par la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3). La caséine kinase II (CK-2) phosphoryle, quant à elle, la GS sur le site 5 composé d'un unique résidu sérine. L'étendue réelle de l'inactivation enzymatique dépendra non seulement des sites phosphorylés mais aussi de la concentration en effecteurs allostériques tel que le glucose 6- phosphate. En sa présence, une activité maximale de la GS est obtenue même avec des formes hautement phosphorylées de l'enzyme (Roach et al., 1976).

La phosphorylation à ces différents sites ne se produit pas de manière aléatoire ou indépendante car l'action d'une kinase peut amplifier l'effet d'une autre enzyme phosphorylante. Par exemple, l'action de la PKA sur les sites 1a, 1b et 2a est un pré-requis indispensable pour la phosphorylation par la caséine kinase I (CK-1) afin d'inhiber la GS par phosphorylation. La phosphorylation de la GS conduit en général à une diminution de son activité. Néanmoins, il faut tenir compte du modèle hiérarchique de phosphorylation car diverses protéines kinases peuvent engendrer un degré d'inhibition variable.

La régulation de la GS apparaît donc comme un système remarquable donnant lieu à une intégration de signaux différents (adrénaline, insuline ou autre) ainsi qu'à une modulation dans le temps par le jeu de phosphorylations successives. S'ajoute à ces phosphorylations, une fine régulation allostérique. Le G6P est l'activateur allostérique le plus puissant de la GS et surtout de la « GS b ». Il permet d'accroître la vitesse maximale de l'enzyme et de diminuer significativement le Km pour l'UDPG (Cohen, 1986). La GS purifiée à

partir de divers organes du lapin montre une activité spécifique de 10 à 30 unités par mg de protéines (une unité correspondant à la quantité d'enzyme capable de transférer une μ mole d'UDPG au glycogène, en une minute, à une température de 30°C et à un pH de 7,8). Le K_m pour l'UDPG varie entre 0,1 et 3 mM et le K_a pour le glucose 6-phosphate est compris entre 0,5 et 2 mM pour la forme b de l'enzyme. Les valeurs se rapportant à la forme active sont nettement plus basses et attestent de sa plus grande affinité pour son substrat.

Chez les invertébrés

La régulation de la GS a été étudiée chez les invertébrés notamment chez la balane *Balanus improvisus*, le crabe vert *Carcinus maenas* (Goromosova, 1976), mais aussi le mollusque d'eau douce *Lymnaea stagnalis* (Hemminga *et al.*, 1985), la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (Vasquez-Baanante & Rosell-Perez, 1979b) et les moules *M. edulis* (Cook & Gabbott, 1978 ; Whittle, 1982 ; Gabbott & Whittle, 1986 ; Whittle & Gabbott, 1986) et *M. galloprovincialis* (Goromosova, 1976). Enfin, la GS a été étudiée chez l'huître américaine *C. virginica* (Swift *et al.*, 1988) et l'huître plate *Ostrea edulis* (L-Fando *et al.*, 1972). Pour ces espèces, la nomenclature des formes phosphorylées /déphosphorylées de la GS est différente de celle utilisée chez les mammifères. La forme active déphosphorylée, décrite sous la forme GS *a* chez les mammifères, correspond à la forme GS *I*. Cette forme est indépendante du G6P (Cook & Gabbott, 1978). De la même façon, la forme inactive GS *b* porte le nom de GS *D*. Cette forme D est G6P dépendante, ce qui veut dire que son activité dépend de la présence du G6P.

Il est en général admis que la forme *I* (ou *a*) est la forme physiologiquement active de l'enzyme. La forme *D* (ou *b*) serait quasiment inactive en raison d'une faible affinité (fort K_m) pour le G6P et d'une inhibition par le Pi. L'activité de la GS *I* serait due à une forte affinité pour le substrat UDPG (pour une revue, voir Stalmans & Hers, 1973). Les données concernant la GS de *M. edulis* sont en accord avec celles trouvées chez les mammifères (Gabbott & Whittle, 1986). Pour l'huître américaine, le K_m de la GS *I* pour l'UDPG ($K_m = 7,09$) est supérieur à celui de la GS *D* ($K_m = 0,86$) dans le muscle adducteur.

3.4.4. Contrôle par les métabolites glucose et glucose-6-phosphate

Les principaux métabolites régulateurs de la GS et de la GP sont le glucose et la G6P. Il existe une très riche bibliographie à ce sujet (pour une revue, voir Nordlie & Foster, 1999).

a) Chez les vertébrés

Le glucose de l'alimentation provoque une augmentation de la synthèse du glycogène dans le foie. Le glucose induit l'inhibition de la GP et l'activation concomitante de la GS (Stalmans *et al.*, 1974, Hers, 1976). Les primo cultures d'hépatocytes humains, de rat ou de porc sont les modèles d'étude *in vitro* de l'effet du glucose et du G6P sur la GS et la GP. Ces cellules ont l'avantage d'être extrêmement décrites pour leur implication dans le stockage du glycogène hépatique.

Glycogénogenèse induite par le glucose

Stalmans et ses collaborateurs (1974) furent les premiers à proposer un mécanisme séquentiel d'inactivation de la GP /activation de la GS par le glucose chez la souris et le rat. Une élévation du taux de glucose sanguin cause tout d'abord une chute de la quantité de GP *a* dans le foie de mammifères. Cet effet s'explique par la stimulation de la Phosphorylase phosphatase (PP-1G) par le glucose (Stalmans *et al.*, 1970). La GP est donc déphosphorylée et rendue moins active (**Figure 13**). Or, la GP *a* inhibe la Synthase phosphatase (PP-1G_L), enzyme responsable de la déphosphorylation, donc de l'activation de la GS (Hers *et al.*, 1970). Cette inhibition allostérique de la Synthase phosphatase par la GP *a* fut démontrée *in vitro* (Alemany & Cohen, 1986). C'est un exemple d'ouvrage de biochimie classique (voir Stryer, 1995, P. 597). La diminution de GP *a* lève donc cette inhibition et provoque une conversion de la GS *b* en GS *a* (déphosphorylée, active). Le basculement entre les deux enzymes est rapide lorsque l'apport du glucose est suffisant. C'est uniquement lorsque la fraction de GP *a* (active) est descendue en dessous de 10% que la GS commence à être activée (Stalmans *et al.*, 1974, Massillon *et al.*, 1995).

Glycogénogenèse induite par le G6P

D'autres travaux plus récents montrent que la levée d'inhibition de la GP *a* ne suffit pas à élucider entièrement l'activation de la GS (Carabaza *et al.*, 1992, Massillon *et al.*, 1995, Cardenas & Goldbeter, 1996). Le G6P serait alors le principal métabolite intermédiaire impliqué dans la régulation de la GS (Vilar-Palasi & Guinovart, 1997). C'est un activateur allostérique de la GS et il détermine aussi son statut de phosphorylation en augmentant l'affinité de la phosphatase pour la GS *b*. De plus, le G6P régule la compartimentation sub-

cellulaire de la GS en causant la translocation et l'agrégation de celle-ci (Fernandez-Novell *et al.*, 1992, 1996, 1997). Une étude récente montre également le rôle du G6P dans l'inactivation enzymatique et la translocation de la GP (Aiston *et al.*, 2003, 2004). Les conditions métaboliques qui altèrent la concentration en G6P hépatique affectent le métabolisme du glycogène à travers la régulation de la GS mais aussi de la GP (Härndahl *et al.*, 2006). L'Hexokinase I et la Glucokinase du foie sont les enzymes qui contrôlent la concentration cellulaire en G6P (Seoane *et al.*, 1996).

La **figure 13** résume les différents mécanismes enzymatiques et influences des métabolites qui contrôlent le métabolisme du glycogène.

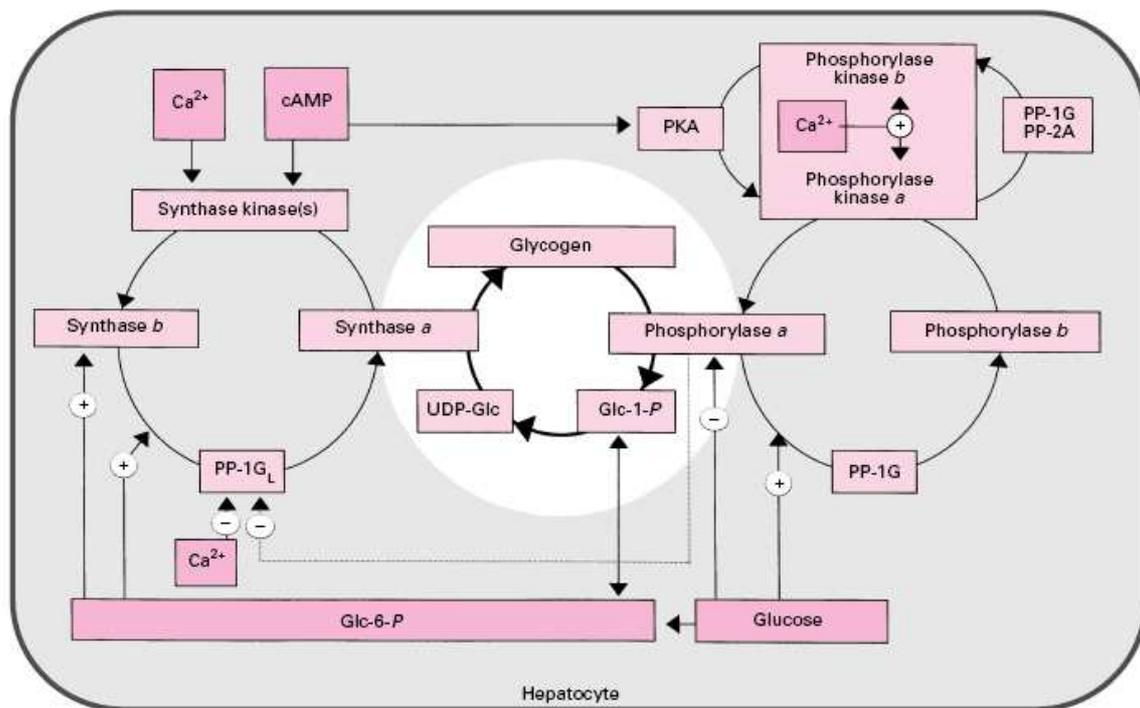


Figure 13 : Contrôle du métabolisme hépatique par phosphorylation enzymatique et par les métabolites. Abréviations : PKA, Protéine Kinase A ; PP-1G : Protéine phosphatase associée au glycogène, Glc-1-P, glucose-1-phosphate ; Glc-6-P, glucose-6-phosphate ; UDP-Glc, UDP-glucose. D'après Bollen *et al.* (1998).

b) Chez les invertébrés

Les études portant sur l'effet du glucose et du G6P sur le métabolisme du glycogène des espèces d'invertébrés modèles sont peu nombreuses. La régulation du métabolisme du glycogène par le glucose et le G6P montre quelques différences comparé au modèle vertébré.

Chez les insectes

Chez le criquet migrateur, le G6P joue le rôle d'inhibiteur principal de la GP du tissu adipeux (Applebaum & Schlesinger, 1973). Contrairement aux vertébrés, pour lesquels c'est l'AMP. Le rôle du G6P peut être alloué à l'importance du métabolisme du tréhalose. Ce disaccharide est en effet formé à partir du G6P dans le tissu adipeux du criquet. Cependant, chez la mouche *Phormia regina* les formes a et b de la GP ont été mises en évidence dans le muscle des ailes (Childress & Sacktor, 1970).

Chez les mollusques

Chez la moule *M. edulis*, le glucose fut décrit comme le principal métabolite de régulation du métabolisme du glycogène (pour une revue : Mathieu & Lubet, 1993). Chez le mollusque d'eau douce *L. stagnalis*, l'effet du glucose sur la synthèse du glycogène résulterait à la fois d'une inter-conversion des formes I et D de la GS mais aussi de l'augmentation des niveaux de métabolites (Hemminga *et al.*, 1985). Des injections de glucose à des moules vivantes (*Mytilus edulis*) ont montré un effet positif à court terme du glucose (3h post injection) sur l'activité GS I (forme active, G6P indépendante) et un effet positif à plus long terme sur l'activité GS totale (9h post-injection) (Gabbott & Whittle, 1986 ; Whittle & Gabbott, 1986). L'addition de glucose à des homogénats de muscle d'huître *C. virginica* provoque également une augmentation d'activité GS I en 10 minutes (Swift *et al.*, 1988). Chez l'huître creuse *C. gigas*, le glucose à 1,5 mM provoque une augmentation de l'incorporation du glucose dans le glycogène de cellules de palpes labiaux en primo culture (7h après mise en contact) (Berthelin, 2000). Cet effet n'est observé que pour des cellules prélevées sur des huîtres en période de mise en réserve (automne-hiver). Des travaux plus récents apportent une nouvelle hypothèse concernant la régulation de la GP par le glucose chez la moule. Contrairement aux vertébrés chez qui les deux formes de la GP sont inhibées de façon allostérique par le glucose, seule la GP b de *M. galloprovincialis* est légèrement inhibée par le glucose (San Juan Serrano *et al.*, 1998a). Le G6P montre un effet inhibiteur de la GP (a et surtout b) plus marqué que le glucose et interagit avec le site régulateur principal de l'enzyme (San Juan Serrano *et al.*, 1998a). Le Km de la GP pour la G6P est dans l'ordre de grandeur des concentrations en G6P mesurées dans le manteau de *Mytilus* (Ibarguren, 1990). Pendant la période de gamétogenèse, le taux de G6P est minimum et la forme GP b est majoritaire dans le manteau (San Juan Serrano *et al.*, 1998a). San Juan Serrano et ses collaborateurs (1998a) suggèrent que le G6P alors libéré par la glycogénolyse est directement utilisé par la voie des pentoses phosphates. Cela, pour synthétiser des acides nucléiques et du pouvoir réducteur nécessaire à la biosynthèse des lipides pendant la gamétogenèse. **Le G6P, plus que le glucose, serait *in vivo* le métabolite régulateur du métabolisme du glycogène chez la moule.** Les acides nucléiques tels que l'ATP et l'AMP ont aussi un rôle prépondérant à relier avec la reproduction.

3.4.5. Contrôle par des facteurs endocrine hypoglycémiant

a) Chez les vertébrés : l'insuline

Chez les vertébrés, l'insuline augmente la synthèse et inhibe la dégradation du glycogène. Son importance dans le maintien de l'homéostasie et la régulation du métabolisme des glucides est bien établie et décrite (Saltiel & Kahn, 2001).

La signalisation cellulaire provoquée par la fixation de l'insuline sur son récepteur est un mécanisme très décrit chez les vertébrés supérieurs. Le récepteur de l'insuline est un dimère, chaque dimère est composé de deux sous unités (hélices α et β). Les deux chaînes α fixent l'insuline alors que les chaînes β possèdent à leur extrémité C-terminale, une activité Tyrosine kinase. Les domaines kinase s'auto-phosphorylent à l'état activé (lorsque l'insuline est fixée) et phosphorylent également une protéine auxiliaire ou substrat du récepteur (IRS1) sur divers résidus tyrosine. Des protéines adaptatrices vont s'associer aux phosphotyrosines et propager le signal (**Figure 14**). Les actions de l'insuline sont multiples et passent par des protéines kinases qui s'activent mutuellement en cascade. A la fin de la chaîne, se trouvent des kinases qui influencent la transcription de certains gènes du métabolisme des glucides dans le noyau via la phosphorylation de protéines cibles ou alors stimulent la capture du glucose et sa transformation en glycogène.

Chez les vertébrés supérieurs, les effets de l'insuline sur le métabolisme des sucres se produisent en partie sans qu'il y ait besoin d'une néosynthèse protéique. La Phosphatidylinositol-3-kinase (PI₃K) est une des protéines adaptatrices. Elle phosphoryle les phospholipides membranaires appartenant au groupe des phosphoinosides (PI). La protéine kinase PDK1 s'associe au PIP₃ formé et active à son tour la protéine kinase B (PKB). Cette dernière a de nombreuses propriétés : elle augmente la capture du glucose extra cellulaire en augmentant la translocation des transporteurs membranaires de type GLUT. Par ailleurs, la PKB inhibe par phosphorylation la Glycogène synthase kinase 3 (GSK3). Comme la GSK3 inhibe à son tour la GS, son inhibition par la PKB entraîne une augmentation de la synthèse du glycogène (**Figure 14**).

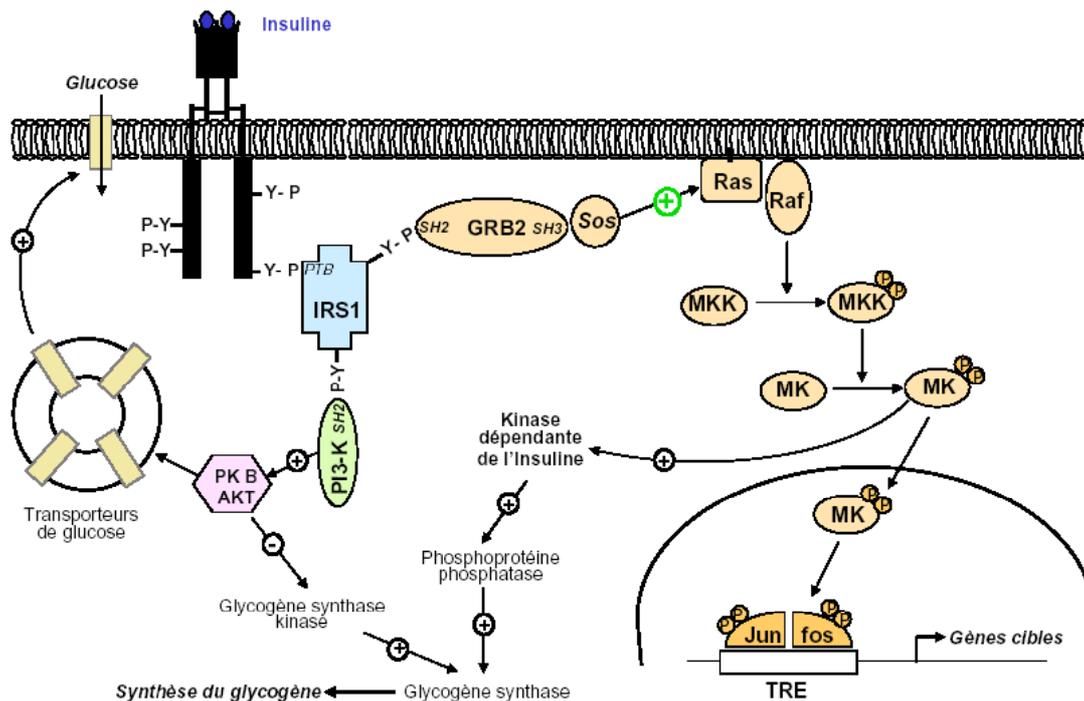


Figure 14 : Mécanismes d'action de l'insuline sur le métabolisme du glycogène de mammifère. Y-P représente les résidus phosphotyrosines. IRS1 : substrat du récepteur à l'insuline. PI3-K et GRB2 sont les deux protéines régulatrices qui vont propager un signal de phosphorylations en cascade.

La phosphoprotéine phosphatase I (PPI) qui ramène par déphosphorylation la GS sous sa forme active est également activée par l'insuline (**Figure 14**). En effet, les protéines adaptatrices GRB2 et SOS se lient au récepteur activé (IRS1) et activent une protéine G appelée Ras. Ras active la protéine kinase Raf. Raf déclenche une série de phosphorylation en cascade par l'intermédiaire des kinases MKK et MK (également appelées MAPK : *mitogen activated protein kinases*). Une MAPK active une protéine kinase dépendante de l'insuline qui conduit à l'activation de PPI et donc à l'activation de la GS.

Par ailleurs, l'activation des kinases MKK et MK conduit également à l'activation de facteurs de transcription dans le noyau. L'insuline régule la transcription génique en modifiant la fixation des facteurs de transcription sur les éléments de la réponse à l'insuline (ERI) ou en régulant leurs activités transcriptionnelles (pour une revue voir Mounier & Posner, 2006). Différentes cascades de signalisation de l'insuline ont été caractérisées en véhiculant l'effet de l'insuline sur la transcription des gènes. Ces mécanismes sont par exemple décrit pour la Phosphoenolpyruvatecarboxy kinase (PEPCK) dans la revue de Mounier & Posner (2006). En ce qui concerne les gènes du métabolisme du glycogène, l'action de l'insuline a été étudiée sur la biosynthèse de la GS, pour une lignée cellulaire de rat au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. La quantité de protéine GS montre un pic à 6h de culture pendant une incubation de 24h avec insuline (Fujita *et al.*, 1996). L'accumulation de l'enzyme serait due à l'augmentation de la quantité d'ARNm GS (Okubo *et al.*, 1991) et à l'augmentation de la vitesse de transcription du gène (Fujita *et al.*, 1996).

b) Chez les invertébrés : molécules apparentées aux insulines

La recherche de la fonction hypoglycémisante des molécules apparentées aux insulines chez les invertébrés a fait l'objet de nombreux travaux, tant au niveau des molécules elles-mêmes qu'au niveau de leurs récepteurs.

Chez les insectes

Chez la drosophile *D. melanogaster*, 7 gènes codant des molécules apparentées aux insulines (Dilp1-7) ont été identifiées (Brogiolo *et al.*, 2001). Le DILP2 apparaît comme le peptide le plus proche de l'insuline humaine, sa sécrétion serait sous contrôle nutritionnel (Brogiolo *et al.*, 2001). Chez le vers à soie *B. mori*, 38 gènes codant des molécules de type insuline (bombyxine) ont été caractérisés (*e.g.* Yoshida *et al.*, 1998). Il semblerait que le taux de glucose circulant soit un signal nutritionnel régulateur de la sécrétion de bombyxine par le système nerveux central (Masumura *et al.*, 2000). Chez le criquet migrateur *L. migratoria*, un seul gène d'organisation similaire à celle des gènes d'insulines mammaliennes a été caractérisé (Lagneux *et al.*, 1990). Le peptide est aussi proche des bombyxines que des insulines de poissons ou de reptiles (Lagneux *et al.*, 1990). Les bombyxines et les peptides apparentés auraient une action dans le métabolisme des glucides (Satake *et al.*, 1997), la croissance (Nijhout & Grunert, 2002) et la reproduction (Maniere *et al.*, 2004).

Si beaucoup d'études ont tenté de prouver l'existence des molécules insuline-like chez les insectes, très peu ont essayé de décrire les mécanismes moléculaires responsables de leurs nombreux effets biologiques. Hors chez les vertébrés, le récepteur à l'insuline est à activité tyrosine kinase et la cascade d'événements de phosphorylations qui découle de la fixation de l'insuline sur son récepteur est bien décrite. L'existence de ces récepteurs est connue chez certains invertébrés modèles comme la mouche *Drosophila melanogaster* (Fernandez-Almonacid & Rosen, 1987), le vers *Caenorhabditis elegans* (Kimura *et al.*, 1997), le moustique *A. aegypti* (Graf *et al.*, 1997).

Chez les mollusques

Chez les mollusques, des molécules apparentées aux insulines ont été mises en évidence dans différentes localisations tissulaires :

- Dans des cellules du tractus digestif de : *Buccinum undatum* (Boquist *et al.*, 1971), *O. edulis* (De Martinez *et al.*, 1973), *Achatina fulica* (Gomih & Grillo, 1976), *Strophocheilus oblongus* (Marques & Falkmer, 1976), *M. edulis* (Fritsh *et al.*, 1976), *Anodonta cygnaea* (Plisetskaia, 1977) et *Uno pictorum* (Plisetskaia *et al.*, 1977).
- Dans les cellules neurosécrétrices de ganglions nerveux chez : *L. stagnalis* (Schot *et al.*, 1981 ; Smit *et al.*, 1988), *Aplysia californica* (Van Minnen & Schallig, 1990), *Helisoma duryi* (Kahn *et al.*, 1992 ;

Introduction générale

Sevala *et al.*, 1993), *Planorbium corneum* (Sonetti *et al.*, 1992), *M. edulis* (Kellner-Cousin *et al.*, 1994), *Helix aspersa* (Marchand & Colard, 1992) et *O. lactea* (Abdraba, 1999 ; Abdraba & Saleuddin, 2000).

Chez le mollusque *L. stagnalis*, sept molécules insuline-like ont été caractérisées cependant leur fonction reste à éclaircir. Les molécules MIPs (pour Molluscan Insuline-related Peptides) produites par des cellules appelées Light Green cells (LGCs) participeraient cependant à la croissance de l'organisme et de sa coquille (Geraerts *et al.*, 1992a). Les MIPs montrent d'importantes divergences de structure entre eux et avec l'insuline de vertébrés. Chez la lymnée, les gènes MIP I, II, III et V sont impliqués dans la régulation de la croissance, de la reproduction et des métabolismes associés (Geraerts *et al.*, 1992b), le gène MIP VII ayant probablement un rôle dans la nutrition (Smit *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'insuline d'aplysie *A. californica* semble avoir une expression dépendante du stimulus nutrition, ce qui suggère son implication dans la régulation du métabolisme (Floyd *et al.*, 1999).

Les potentielles fonctions des insulines-like sur le métabolisme du glycogène ont des significations parfois contradictoires. Dans la recherche des fonctions hypoglycémiantes chez les mollusques, on peut classer deux types d'études : la recherche d'effets biologiques d'insulines hétérologues (souvent insuline porcine) et la recherche directe de molécules apparentées aux insulines ayant des effets hypoglycémiantes.

Le traitement avec de l'insuline mammalienne (5-10 UI/kg) crée une hypoglycémie chez *Anodonta cygnaea* et augmente l'activité de la GS du muscle (Plisetskaia *et al.*, 1978). Plisetskaia et ses collaborateurs (1977, 1978, 1979) ont aussi observé que l'injection d'insuline était suivie d'une augmentation de l'activité de la GS chez les mollusques *Unio pictorum*, *M. galloprovincialis*, et *Chlamys glaber ponticus*. Mais ces résultats n'ont pas été confirmés chez la moule *M. edulis* par Gabbott & Whittle (1986). D'autres effets biologiques ont pu être attribués aux molécules apparentées aux insulines chez les mollusques, notamment des effets sur la croissance et la reproduction. Des effets d'insuline hétérologues ont également pu être constatés sur la croissance de certains mollusques par exemple chez *H. aspersa* (Gomot & Gomot, 1995). Enfin, des effets de l'insuline porcine sur la synthèse du glycogène ont été mis en évidence chez l'huître creuse *C. gigas* (Berthelin, 2000). Le gène d'un peptide apparenté à l'insuline a été cloné récemment (Hamano *et al.*, 2005). Il montre une expression contrôlée par le cycle de reproduction. Ce gène ne montre cependant pas d'expression maximale à la période d'accumulation des réserves en glycogène.

Des récepteurs de type insuline, conservés sur leur domaine à activité tyrosine kinase, ont été clonés chez le mollusque *L. stagnalis* (Roovers *et al.*, 1995), le mollusque gastéropode *Biomphalaria glabrata* (Lardans *et al.*, 2001) et chez *C. gigas* (Gricourt *et al.*, 2003). La présence de ces récepteurs indique que l'insuline a probablement un rôle fonctionnel chez les mollusques.

3.4.6. Contrôle par des facteurs endocrine hyperglycémiant

a) Chez les vertébrés : glucagon

La baisse du niveau de sucre dans le sang entraîne chez les mammifères la sécrétion d'une hormone peptidique : le glucagon. Cette hormone active la dégradation du glycogène et simultanément inhibe la synthèse du glycogène.

Le glucagon se fixe à des récepteurs situés dans la membrane plasmique. Ces récepteurs possèdent 7 segments transmembranaires couplés à une protéine Gs (s pour stimulatrice). La protéine Gs convoit le signal reçu par les récepteurs jusqu'à une protéine effectrice : l'Adénylate cyclase (**Figure 15**). Cette enzyme donne naissance à un second messenger, l'adénosine monophosphate 3' 5'-cyclique (AMPc).

L'AMPc active à son tour une autre enzyme : la Protéine kinase A. Celle ci possède plusieurs sites d'action. Elle phosphoryle la GS, ce qui a pour conséquence de l'inactiver et de bloquer l'action de synthèse du glycogène. D'un autre côté, elle active par phosphorylation la Phosphorylase kinase qui a pour but de phosphoryler et donc d'activer la GP. La GP libère donc du G1P à partir du glycogène. Par ailleurs, la Phosphorylase kinase activée, bloque par le biais d'un inhibiteur (I) la Protéine phosphatase (PP) chargée de l'inhibition de la GP. Cette levée d'inhibition conduit également à l'augmentation de l'activité de dégradation du glycogène.

Lorsque le taux d'AMPc diminue de nouveau, les protéines phosphatases redeviennent actives, elles déphosphorylent les kinases précédentes, bloquant ainsi la dégradation du glycogène et déclenchant à nouveau sa synthèse.

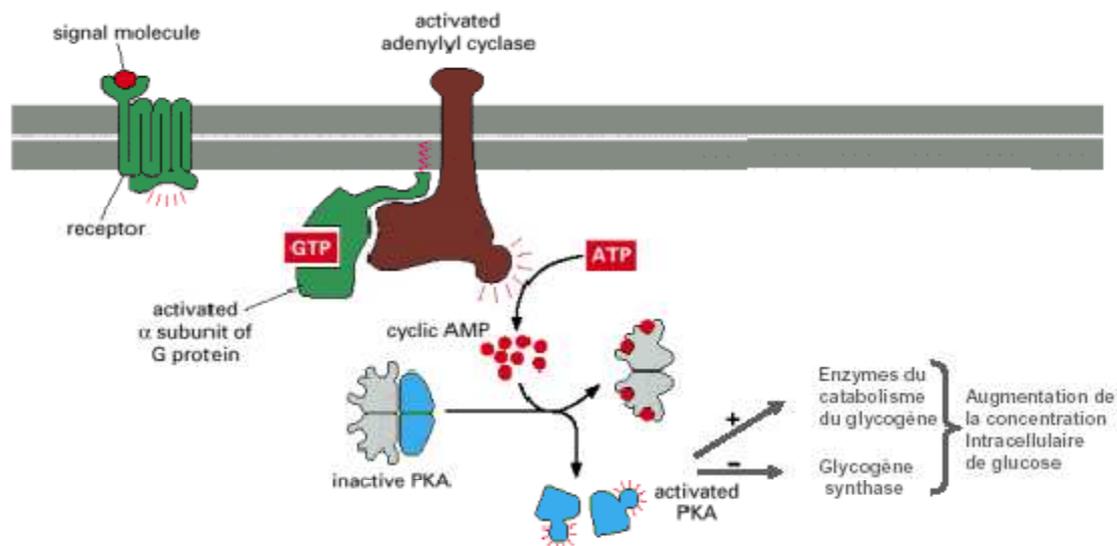


Figure 15 : Schéma représentant la transduction du signal pour un récepteur au glucagon. La fixation de la molécule signal sur le récepteur active la protéine Gs et provoque l'hydrolyse du GTP. La sous unité α activée de la protéine G va ensuite activer l'Adénylate cyclase qui produit l'AMPc comme messenger secondaire. L'AMPc active la PKA ce qui a pour conséquence d'activer le catabolisme du glycogène et d'inhiber sa synthèse.

b) Chez les invertébrés : molécules apparentées au glucagon

Chez les invertébrés, aucun isolement ni caractérisation exacte d'une molécule de glucagon n'a été réalisée. En revanche, certaines molécules présentant des similarités de structure et de fonction ont été identifiées chez certains insectes. C'est le cas par exemple chez le papillon *Manduca sexta* (Tager *et al.*, 1976). Chez les drosophiles, des cellules du *corpora cardiaca* sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Elles produiraient un polypeptide de type glucagon-like appelé hormone adipocinétique (AKH) (Kim & Rulifson, 2004). Les neuropeptides de la famille de l'hormone adipocinétique activent la mobilisation de plusieurs types de substrats stockés dans le corps gras des insectes (Gäde & Auerswald, 2003). L'AKH endogène se fixerait sur des récepteurs couplés à des protéines G et provoquerait l'activation de la GP via la voie de signalisation de l'AMPc (comme pour le glucagon chez les vertébrés) ou via l'activation d'une Phospholipase C (voie de signalisation du Ca^{2+}). Chez le criquet *L. migratoria*, l'implication de l'AMPc a aussi été clairement identifiée dans la transduction du signal induit par l'AKH qui mène à l'activation de la glycogénolyse (Vroemen *et al.*, 1995). Enfin, chez le nématode *Ascaris suum*, c'est le peptide FMRFamide AF2 qui aurait les mêmes fonctions biologiques que le glucagon (Rex *et al.*, 2004). La voie de signalisation impliquée serait également celle de l'AMPc.

Chez les mollusques, différents travaux basés sur des cultures d'organes ont mis en évidence l'action des ganglions cérébroïdes sur la mobilisation du glycogène dans le manteau (Herlin-Houtteville & Lubet, 1974 ; Mathieu, 1987). *In vitro*, Robbins *et al.*, (1990) ont démontré l'effet activateur d'un facteur présent dans des extraits de ganglions cérébroïdes sur la glycogénolyse. Ce facteur appelé GMH (Glycogen Mobilisation Hormone) inhiberait la synthèse et activerait la dégradation du glycogène. Il a été partiellement caractérisé

(Robbins *et al.*, 1991). Chez l'huître creuse *C. gigas*, un effet du glucagon de vertébré a été montré sur le métabolisme de cellules vésiculeuses en culture (Berthelin, 2000). Mais aucune molécule endogène n'a été identifiée pour le moment.

3.5. balance énergie-reproduction

Nous avons vu que la reproduction domine le cycle de vie des mollusques marins et que les phases d'accumulation des réserves énergétiques s'opposent dans le temps aux phases de maturation des gamètes. Les mécanismes qui contrôlent l'apport d'énergie, son stockage et les dépenses énergétiques existent car ils permettent à l'animal de survivre à sa maturation. Ils possèdent donc un certain déterminisme génétique. Les stimuli métaboliques ou hormonaux qui régissent le contrôle de la balance énergétique sont souvent réciproquement liés à ceux qui contrôlent la reproduction. Ainsi, ceux qui augmentent la prise alimentaire inhibent également les processus reproductifs. Cette thématique est très intéressante chez l'huître car cet animal adopte une véritable stratégie de gestion énergétique annuelle pour se reproduire. Il est donc clair qu'il existe une régulation réciproque du stockage du glycogène et de la reproduction.

3.5.1. Chez les vertébrés

Chez les mammifères, l'homéostasie du glucose est strictement régulée, cependant le tissu adipeux possède une grande plasticité. Des études récentes placent le Neuropeptide Y comme acteur principal de la communication entre balance énergétique et reproduction (Schneider, 2004). Ce neuropeptide serait le médiateur des effets du métabolisme énergétique sur la reproduction ou pourrait moduler la disponibilité en nutriments. Des boucles de rétro-actions permettent à l'organisme de conserver un équilibre énergétique (**Figure 16**). Des signaux de types métaboliques (métabolites circulants) renseignent le système nerveux central (SNC) sur le statut énergétique du corps (Costentin, 2003 ; Wade & Jones, 2004). D'autres signaux de types hormonaux renseignent également le SNC sur l'état des réserves énergétiques (leptine, ghréline). Les adipocytes produisent par exemple la leptine qui exerce un contrôle sur la prise alimentaire et la dépense énergétique (Campfield *et al.*, 1995 ; Pelleymounter *et al.*, 1995). Le mécanisme d'action de la leptine est une inhibition de la sécrétion de NPY par les neurones spécifiques de l'hypothalamus (Schneider, 2004). Comme le NPY a une action positive sur la prise alimentaire et négative sur la sécrétion de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) (Schneider, 2004), la leptine provoquerait une diminution de la prise alimentaire tout en favorisant le développement des fonctions reproductives (**Figure 16**).

L'action primaire de la leptine est d'inhiber la sécrétion du NPY dans le SNC (régulation endocrine). Mais la leptine a également de nombreuses actions sur le métabolisme des glucides et des lipides (régulation paracrine) (Fruhbeck & Salvador, 2000). Elle modulerait le taux de néoglucogénèse du foie (Rossetti *et al.*, 1997) et déclencherait une signalisation cellulaire antagoniste à celle du glucagon (diminution de l'AMPc)

Introduction générale

(Zhao *et al.*, 2000). La leptine inhiberait également la GP hépatique (Vardaneiga-Peicher *et al.*, 2003 ; Mustonen *et al.*, 2002). Les mammifères montrant des cycles de poids et d'appétits contrôlés par la photopériode (brebis, hamster sibérien) présenteraient des variations de sensibilité à la leptine qui supposent que ce système est sensible aux conditions environnementales (Adam & Mercer, 2004).

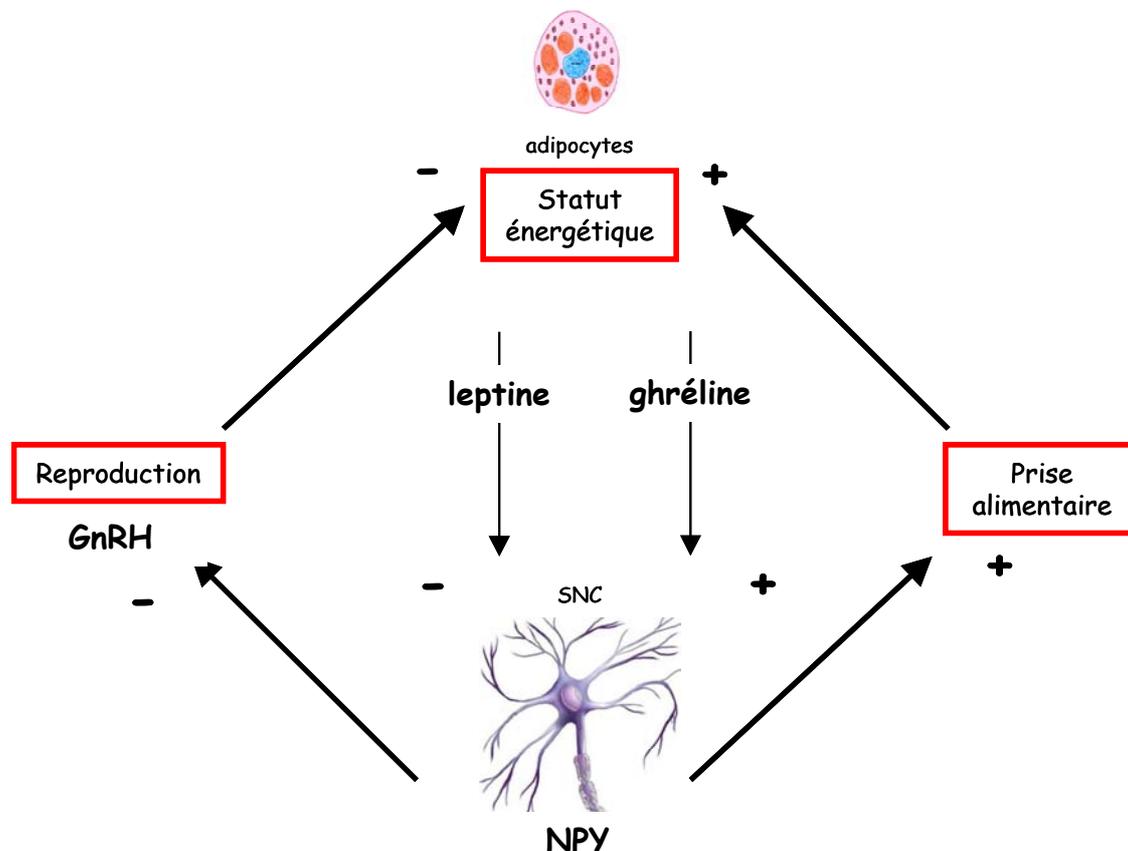


Figure 16 : Modèle de la communication entre le statut énergétique, la prise alimentaire et la reproduction à l'échelle de l'organisme chez les vertébrés. NPY, Neuropeptide Y ; GnRH, Gonatotropin Releasing Hormone ; SNC, Système Nerveux Central.

3.5.2. Chez les invertébrés

Même si les invertébrés sont phylogénétiquement très éloignés des mammifères, le contrôle de la balance énergétique par des molécules de type NPY ou leptine peut être supposé. L'alternance des cycles de stockage et d'utilisation des nutriments pour la gamétogenèse est souvent guidé par la température et la photopériode.

L'existence d'homologues au NPY chez les invertébrés a d'abord été prouvée chez le plathelminthe *Moniezia expansa* (Maule *et al.*, 1991). Cette protéine fut désignée par le nom Neuropeptide F (NPF) car son dernier résidu en C-terminal est une Phenylalanine (F). Le NPF fut ensuite déterminé chez l'escargot *H. aspersa* (Leung *et al.*, 1992), le plathelminthe *Artioposthia triangulata* (Grimmelikhuijzen *et al.*, 1996), le mollusque d'eau douce *L. stagnalis* (Tensen *et al.*, 1998 ; De Jong-Brink *et al.*, 1999), le mollusque marin *A. californica*

(Rajpara *et al.*, 1992) et la drosophile (Brown *et al.*, 1999). L'existence du NPY n'a pas été prouvée chez le nématode *C. elegans*.

Chez la lymnée, l'analogue du NPY (LyNPY) a des effets sur la croissance et la reproduction dans les deux jours qui suivent son injection (De Jong-Brink *et al.*, 1999) mais ne montre pas d'effet à court terme sur la prise alimentaire. Cependant, quatre jours après injection, la consommation de nourriture est augmentée. La lymnée stocke son énergie sous forme de glycogène dans des cellules spécialisées (GCs : Cellules à Glycogène). Les stocks de glycogène restent élevés juste après l'injection de LyNPY, ce qui coïncide avec la suppression de la croissance et de la reproduction (De Jong-Brink *et al.*, 1999). Puis, au bout de 4 jours, ces stocks diminuent significativement, alors que la prise alimentaire augmente. L'existence d'un facteur analogue à leptine est donc supposée (De Jong-Brink *et al.*, 2001). Il serait produit par les cellules à glycogène et permettrait un contrôle de type « feedback » des réserves en glycogène sur la prise alimentaire. A la différence des mammifères, ce facteur exercerait ses effets via un mécanisme séparé de la voie du LyNPY. La **Figure 17** rapporte le modèle de dynamique énergétique proposé chez la lymnée par De Jong-Brink et ses collaborateurs (2001).

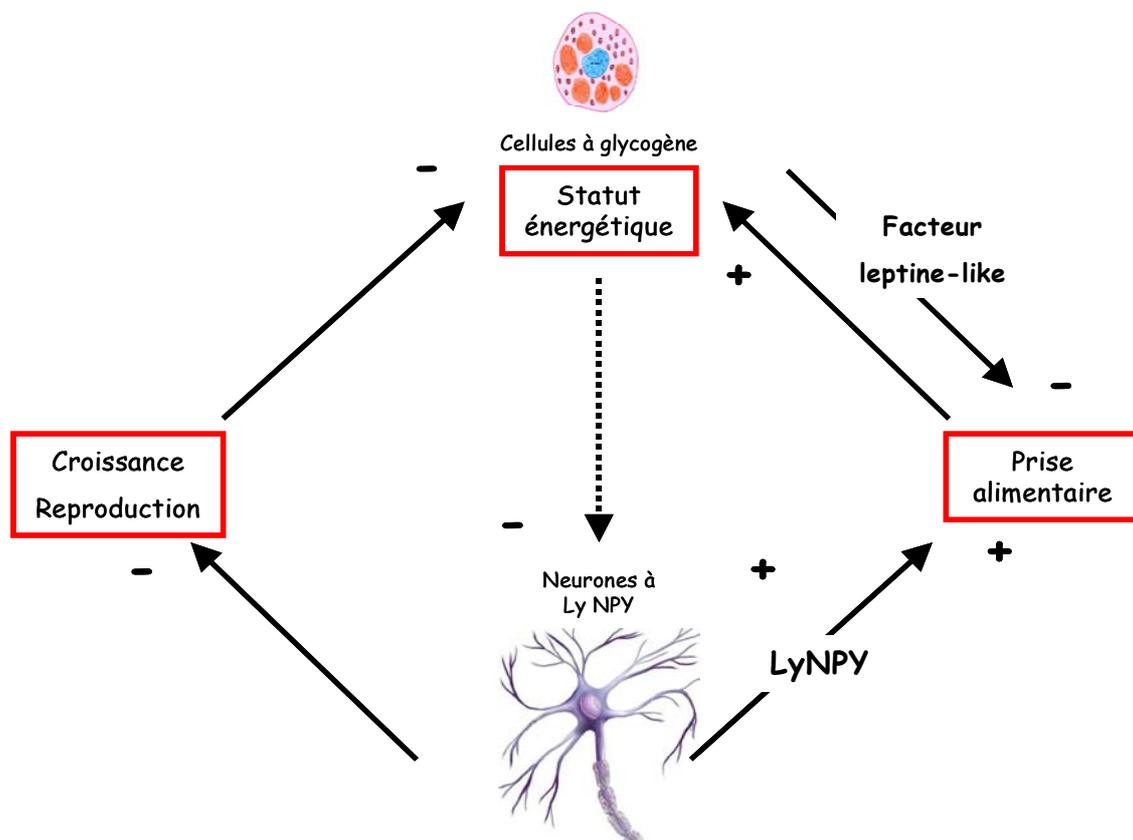


Figure 17 : Représentation schématique du rôle du NPY et du facteur leptine-like chez le mollusque *Lymnaea stagnalis* dans la régulation des principaux déterminants du modèle Dynamique du Budget Énergétique (DEB). La flèche en pointillé représente un effet supposé. D'après De Jong-Brink *et al.*, 2001.

De nombreuses études rapportent l'existence de neuropeptides impliqués dans le contrôle de la reproduction et des ressources énergétiques chez les invertébrés. On peut noter l'exemple de l'AKH (hormone Adipocinétique) chez les crustacés et les insectes. L'AKH inhibe la production des œufs en inhibant la formation des réserves lipidiques nécessaire à la vitellogénine (Lorenz, 2004). Pour le moment, aucune

Introduction générale

molécule homologue à la leptine n'a été caractérisée chez les invertébrés. Le rôle des réserves lipidiques et par ailleurs très différent de celui des mammifères. Cependant, le système de contrôle par le NPY a été montré pour plusieurs espèces. Il existe donc probablement des neuropeptides chez les mollusques capables de jouer un rôle similaire à celui de la leptine chez les mammifères.

Matériels et méthodes

1 Plans d'expériences

1.1. Matériel biologique

Une grande partie du matériel biologique utilisé au cours de ce travail a été produit dans le cadre du programme de recherche MOREST (MORTalités ESTivales de l'huître creuse *C. gigas*). Ce matériel a été obtenu en appliquant une sélection divergente, sur le critère de résistance à la mortalité, à des lots d'huîtres obtenus par croisements bi-parentaux en milieu contrôlé (première génération). Sur la base de leur taux de survie dans plusieurs sites naturels, les lots d'huîtres montrant les meilleurs taux de survie ont été croisés ensemble, ainsi que les lots montrant le plus faible taux de survie. Les huîtres de deuxième génération ont été séparées en deux groupes : Résistantes (R) et Sensibles (S) aux mortalités (Dégremont *et al*, 2003). Le caractère survie montrant une forte héritabilité génétique.

Un ensemble de 5 expérimentations en milieux contrôlés et naturels ont été utilisées pendant ce travail de thèse (**Tableau 1**). Deux expérimentations en 2002 et 2003 (GIGAREPRO 1 et 2) étaient des expérimentations communes MOREST. Une expérimentation en 2004-2005 (RESERV) a été réalisée par l'équipe K. Kellner /A.C. Hanquet du LBBM de Caen (UMR PE2M). Une expérimentation de 16 jours d'alimentation (TROPHIQUE) a été réalisée à la station expérimentale d'Argenton (Ifremer, LPI) pour répondre aux objectifs de cette thèse. Enfin, en 2006, des huîtres provenance de Plougastel (Finistère, France) ont été achetées et maintenues dans des bacs alimentés en eau de mer afin de réaliser des primo cultures de cellules de palpes (PRIMO CULTURE).

Tableau 1 : Expérimentations analysées : Année, lignée des huîtres, durée d'expérimentation et nom attribué aux conditionnements.

Année	Huîtres	F.	M.	A.	M.	J.	J.	A.	S.	O.	N.	D.	J.	F.	
2002	Pool mixte R & S	GIGAREPRO 1													
2003	Pool R + Pool S	GIGAREPRO 2													
2004-2005	Pool R + Pool S	RESERV			RESERV				RESERV						
2006	Famille												TROPHIQUE		
2006	Tout venant												PRIMO CULTURE		

Chacune des expérimentations menées présentent des caractéristiques de conditionnement propre. Le **Tableau 2** récapitule les conditions d'élevage et l'historique des huîtres utilisées dans les différentes expérimentations.

Tableau 2 : Historique des huîtres et caractéristiques des conditionnements réalisés : Type et quantité d'algues, température, photopériode et pas d'échantillonnage.

Expérimentation	Huîtres	Age	Algues	Quantité	Température	Photopériode	Echantillonnage
GIGAREPRO 1	Pool R & S	1 an	1/3 <i>T-iso (Isochrysis aff. Galbana)</i> 1/3 <i>Chaetoceros calcitrans</i> 1/3 <i>Tetraselmis chui</i>	8% poids sec algues / poids sec huître	Moyenne Marennes Oléron (sur 10 ans)	Moyenne Marennes Oléron (sur 10 ans)	mensuel 3 pools de 5 entiers 15 palpes et gonades
GIGAREPRO 2	Pool R + pool S	1 an	1/4 <i>T-iso (Isochrysis aff. Galbana)</i> 1/4 <i>Chaetoceros calcitrans</i> 1/4 <i>Tetraselmis chui</i> 1/4 <i>Skeletonema costatum</i>	4% et 12% poids sec algues / poids sec huître + mise à jeun 1 mois	Moyenne Marennes Oléron (sur 10 ans)	Moyenne Marennes Oléron (sur 10 ans)	mensuel 3 pools de 5 entiers juin 3 pool 5 palpes et gonade
RESERV	Pool R + pool S	18 mois	milieu naturel	milieu naturel	Baie des Veys Normandie	Baie des Veys Normandie	tri-annuel 6 pools de 6 palpes labiaux
TROPHIQUE	Famille multi parentale	18 mois	1/3 <i>T-iso (Isochrysis aff. Galbana)</i> 1/3 <i>Chaetoceros calcitrans</i> 1/3 <i>Skeletonema costatum</i>	0%, 6% et 12% algues poids sec / poids sec huître	11°C	janvier Bretagne	4 pools de 20 palpes
PRIMO CULTURES	Tout venant	2 ans	<i>T-iso (Isochrysis aff. Galbana)</i>	<i>ad libitum</i>	eau de pompage	...	palpes labiaux dissociation cellulaire

1.2. Echantillonnage

Dans les différentes expérimentations, les tissus ou pools d'animaux prélevés ont tous été traités de la même façon. Les échantillons biologiques sont disséqués et congelés immédiatement dans l'azote liquide. Ils sont ensuite broyés à -196°C à l'aide d'un broyeur à bille de type Danguomeau. Les échantillons destinés à des extractions d'ARN sont disséqués et broyés en conditions RNase free. Les échantillons broyés qui n'ont pas été traités directement ont été conservés dans l'azote liquide.

2 *Primo culture de cellules de palpes*

2.1. Dissociation de cellules de palpes

Les cellules de palpes ont été dissociées selon la méthode modifiée de Lenoir *et al* (1989) et Berthelin *et al* (2000a).

Les palpes sont disséquées en conditions stériles et coupées aux ciseaux fins dans de l'eau de mer stérile puis dans du milieu de culture stérile contenant deux antibiotiques (Leibovitz L15 : 1,5X, NaCl : 340 Mm, KCl : 7 mM, CaCl₂ : 4 mM, MgSO₄ : 4 mM, MgCl₂ : 20 mM, Hepes : 18 mM, Streptomycine : 0.2 mg/ml,

Matériels et méthodes

Pénicilline : 200 U/ml). Le milieu de culture contient de la collagénase à 0,1% (Sigma) et permet une dissociation enzymatique des cellules. Le mélange de morceaux de palpes et de collagénase est laissé 30 minutes en agitation douce sur glace avant d'être filtré sur une membrane en nylon de 100µm. L'opération est répétée deux fois. Les filtrats de cellules dissociées obtenus sont centrifugés à 100g pendant 30 minutes à 15°C puis le culot de cellules est repris dans 1 à 5 ml de milieu de culture neuf.

2.2. Détermination de la concentration cellulaire

La concentration cellulaire est déterminée par comptage à la cellule de Thomas. Dix micro litres de bleu de Trypan (Sigma T8154) sont ajoutés à 90µl de la suspension cellulaire diluée au 50^{ème}. De cette façon, les cellules vivantes (non colorées) peuvent être distinguées des cellules mortes (bleues). Le comptage est effectué 2x3 fois et le nombre de cellules /ml est déterminée par la formule qui suit. La concentration cellulaire utilisée pour les tests *in vitro* réalisés est de **5x10⁶ cellules / ml**.

$$\text{cell/ml} = (\text{Nb de cellules comptées}) \times (\text{facteur de dilution}) \times 15625 (\text{Nb de Thomas})$$

2.3. Viabilité des cellules dissociées

La viabilité cellulaire des suspensions de cellules de palpes est déterminée d'après la méthode de Mosman (1983) utilisée précédemment sur l'huître par Coulon (1993). Ce test est basé sur la dégradation enzymatique du 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide MTT (Sigma M5655) par la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules vivantes. Les cellules sont incubées pendant 24h à 15°C avec 1/10 (vol/vol) de solution de MTT (0,012 mM dans du milieu de culture). L'ajout de 0,04N d'isopropanol (vol/vol) permet la solubilisation des cristaux formés. Après 30 minutes d'agitation ; le niveau de produit formé solubilisé (bleu de formazan) est estimé par spectrophotométrie (570 et 630 nm).

3 *Dosages d'activités spécifiques*

3.1. Préparation des extraits tissulaires ou cellulaires

3.1.1. Extraits tissulaires

Les tissus broyés (palpes labiaux, gonade ou animal entier) sont homogénéisés à l'ultra turrax dans 3 volumes (poids /volume) de tampon d'extraction (TPE). Le TPE contient 40 mM Tris Acetate, pH 7.0, 5 mM d'imidazole, 5 mM d'EDTA, 10 mM de NaF, 5 mM de β -mercaptoethanol et 0,1 % de BSA (Bovine Serum Albumin, Merck 1.12018). L'homogénat est centrifugé à 15000 g pendant 20 minutes à 4°C pour enlever les débris cellulaires. Le surnageant est utilisé pour doser les activités enzymatiques et les protéines totales.

Pour le dosage enzymatique de la GP

Afin d'éliminer les acides nucléiques (AMP, ATP, ADP) qui sont des effecteurs allostériques de la GP, 500 μ l d'extraits tissulaires sont mis en contact avec 300mg de résine échangeuse d'anions de type DOWEX (DOWEX 1X8, Sigma). La résine a été préalablement hydratée avec du TPE. Le temps de contact est de 2h sous agitation douce à 4°C. La résine est éliminée par centrifugation à 7500g, 4°C pendant 5 minutes.

Pour le dosage enzymatique de la GS

Afin d'éliminer les molécules organiques de type glucose, G6P et glycogène, qui sont des effecteurs allostériques de la GS, 500 μ l d'extraits tissulaires sont mis en contact avec 300 mg de résine Amberlite (XAD16, Sigma). La résine a été préalablement hydratée avec du TPE. Le temps de contact est de deux heures à 4°C. La résine est éliminée par centrifugation à 7500g, 4°C pendant 5 minutes.

3.1.2. Extraits cellulaires

Une quantité minimale de 8×10^6 cellules est récoltée par centrifugation de la suspension cellulaire à 5000g pendant 5 minutes et élimination du milieu de culture. 300 μ l de TPE est ajouté au culot de cellules. Les cellules sont lysées par sonication de 15 secondes sur glace. Le mélange est laissé 30 minutes sur glace pour augmenter le rendement d'extraction des enzymes. Les débris cellulaires sont éliminés après centrifugation à 15000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est utilisé pour doser les activités enzymatiques de la GP et de la GS.

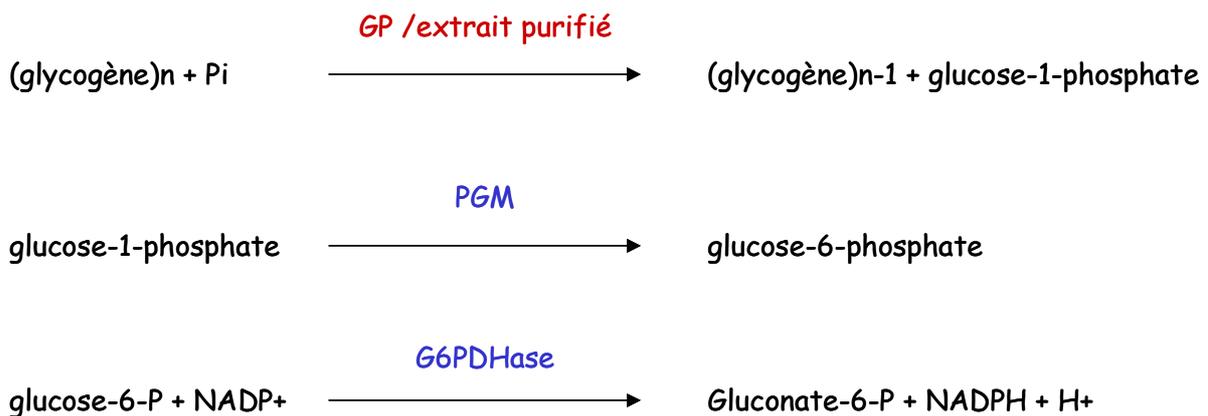
3.2. Dosage des activités HK, G6PDH, PK et PGM

Les activités HK, G6PDH, PK et PGM sont mesurées d'après la technique mise au point par Greenway & Storey (1999) sur l'huître américaine *C. virginica*. Les principes de réactions reposent sur des systèmes de réactions enzymatiques auxiliaires dont les produits finaux sont le NADPH ou le NAD⁺. La formation du NADPH ou la disparition du NADH sont suivies par spectrophotométrie à 340 nm pour 20 µl d'extrait tissulaire dilué au 1/2 dans un volume réactionnel final de 220 µl. Les tampons réactionnels utilisés pour chaque dosages ainsi que les concentrations des réactifs sont indiqués à l'**Annexe 1**. Le coefficient d'extinction molaire du NADPH/ NADH est de 6.22 mM⁻¹.cm⁻¹. Une unité d'activité est définie par la quantité d'enzyme capable de catalyser la formation d'1 µmole de produit par minute à 30°C.

Ces 4 systèmes de dosage ont fait l'objet d'une vérification de linéarité et de reproductibilité des mesures chez l'huître *C. gigas*.

3.3. Dosage de l'activité GP

Le dosage de l'activité de la GP d'huître creuse *C. gigas* a fait l'objet d'une optimisation développée dans la partie résultats de la Partie 1. Le protocole a été établi sur la base des travaux de Childress & Sacktor (1970) et San Juan Serrano & al (1993). Le principe du dosage repose sur un système de réactions couplées faisant intervenir deux enzymes auxiliaires présentes en excès dans le mélange réactionnel : la PGM et la G6PDH. Le G1P produit par la dégradation du glycogène par la GP est converti en G6P par la PGM puis en gluconate-6-phosphate + NADPH par la G6PDHase (voir réactions suivantes).

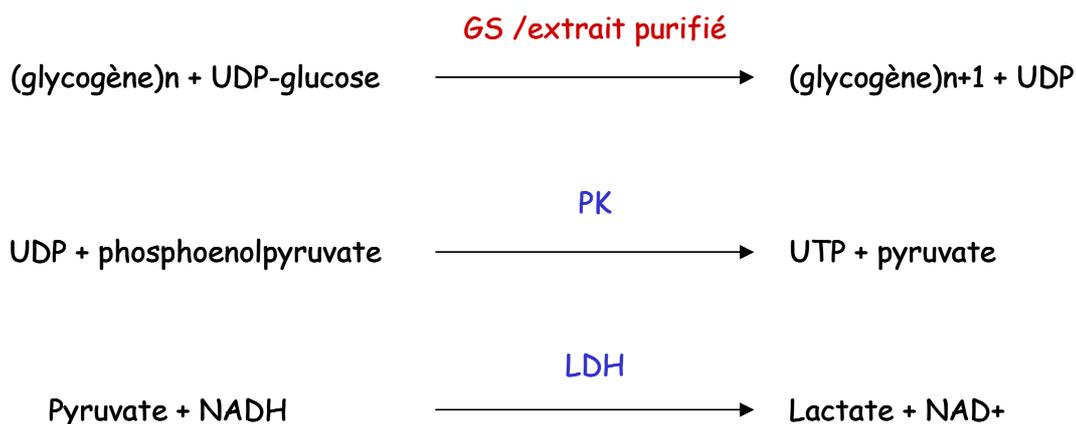


La réaction est effectuée à partir de 20 µl d'extrait purifié sur résine DOWEX dilué au 1/2 dans du tampon de réaction TPR GP (**Annexe 2**) ou 20 µl d'extrait cellulaire brut. La composition du tampon de réaction et la concentration des réactifs sont indiqués à l'**Annexe2**. Le dosage de l'activité des formes GP *a+b* (GP totale) se distingue du dosage de l'activité de la forme GP *a* (AMP indépendante) par la présence de 6,4 mM d'AMP. Les blancs réactionnels sont des essais dans lesquels un des substrats de la GP *a* été omis (Pi).

La formation de NADPH est suivie par spectrophotométrie à 340 nm pour 20 μ l d'extrait tissulaire dilué au demi ou 20 μ l d'extrait cellulaire brut dans un volume réactionnel final de 220 μ l. Le coefficient d'extinction molaire du NADPH est de 6.22 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Une unité d'activité est définie par la quantité d'enzyme capable de catalyser la formation d'1 μ mole de G1P par minute à 30°C.

3.4. Dosage de l'activité GS

Le dosage de l'activité GS d'huître creuse a fait l'objet d'une optimisation développée dans les résultats de la Partie 1 de ce manuscrit. Le protocole a été établi sur la base des travaux de Passonneau & Rottenberg (1973) et Greenway & Storey (1999). Le principe du dosage repose sur un système de réactions couplées faisant intervenir deux enzymes auxiliaires présentes en excès dans le mélange réactionnel : la Pyruvate kinase (PK) et la Lactate déshydrogénase (LDH). L'UDP libéré lors de la synthèse du glycogène par la GS est le deuxième substrat de la PK qui converti le PEP en pyruvate. Le pyruvate + NADH est ensuite converti en lactate et NAD⁺ par la LDH (voir réactions suivantes).



En pratique, le protocole de dosage de la GS se déroule en deux étapes. La première étape consiste à produire de l'UDP, la deuxième à doser l'UDP formé par la GS. Pour cela deux mélanges réactionnels sont préparés. La composition des deux tampons de réactions utilisés ainsi que la concentration des réactifs des deux étapes sont indiqués à l'**Annexe 3**.

La première étape de synthèse du glycogène a lieu à partir de 50 μ l d'extrait tissulaire purifié dans un volume réactionnel de 650 μ l. L'incubation est de 60 minutes à 27°C. Les enzymes sont ensuite inactivées par incubation 5 minutes à 70°C. Après centrifugation 5 minutes à 5000g (très importante pour la réussite du dosage) la deuxième étape est effectuée à partir de 20 μ l du précédent mélange dans un volume final de 220 μ l. La formation du NADH est suivie au spectrophotomètre à 340 nm. Une unité d'activité est définie par la quantité d'enzyme capable de catalyser la formation d'une μ mole d'UDP par minute à 27°C.

3.5. Dosage des protéines totales

Les protéines totales sont estimées selon la méthode de Lowry (1951) après extraction des protéines des extraits tissulaires ou cellulaires bruts dans de la soude 1N pendant 1h.

4 Détermination des séquences d'ARNm

4.1. Extraction des ARN totaux et transcription inverse

Les ARN totaux des différents tissus d'huître utilisés dans ce travail pour la détermination des séquences d'ARN messagers (palpes labiaux) mais également pour les analyses de la quantité des ARNm et de la stabilité des ARNm ont été isolés avec le réactif EXTRACT-ALL (Eurobio, Les Ulis, France) dans une proportion de 1 ml pour 50 mg de tissu d'huître broyé. Les ARN extraits sont ensuite traités à la DNase I (Sigma, France) à raison d'1 unité de DNase / μg ARN et précipités dans l'éthanol absolu avec un traitement à l'acétate de sodium (3 M, pH 5,2). Ces traitements permettent l'élimination de l'ADN génomique et des sels contaminant les échantillons. La quantité et la qualité des ARN a été confirmée par mesures spectrophotométriques répétées à 260 et 280 nm. Le facteur de conversion utilisé est de 1 DO = 40 μg /ml ARN.

Les ARN messagers sont reverse-transcrits à partir d'1 μg d'ARN totaux dénaturés pendant 10 minutes à 70°C. La réaction est effectuée dans 25 μl et la concentration des différents réactifs est de : 50 unités d'enzyme M-MLV reverse transcriptase (Sigma, France), 1X de tampon M-MLV reverse transcriptase, 0,2 mM de dNTPs, 4 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), 0,5 μg d'amorces oligodT (Sigma, France), 25 unités d'inhibiteur de ribonucléases. L'hybridation des amorces a lieu pendant 15 minutes à 25°C, l'élongation se déroule pendant 20 minutes à 42°C puis l'enzyme est dénaturée 5 minutes à 95°C. Les ADNc obtenus sont immédiatement placés à 4°C. Pour une conservation de longue durée, les ADNc sont congelés à -20°C afin d'éviter toute évaporation.

4.2. Recherche des séquences par PCR, clonage et séquençage des ADNc partiels

Au départ, les séquences des ARNm de la GS et de la GP n'étaient pas connues. C'est pourquoi des amorces dégénérées ont été dessinées à partir de l'alignement multiple des séquences conservées en acides aminés de la GS et de la GP de plusieurs espèces : homme (Genbank numéro d'Accession PO0737, P11217, P11216), rat (PO9811, P09812), drosophile (Q9XTL9) et le vers *C. elegans* (Q9N5UI). Les couples d'amorces dégénérées utilisées sont pour la GP en amorce sens GPF (5'-GCN GCN TGY TTY YTN GAY WSN ATG GC-3'), en amorce anti-sens GPR (5'-AAV AWR TTR TCR TTN GGR TAN ARN AC-3'). Pour la GS,

amorce sens GSF (5'-GAR TTY CAR AAY YTN CAY GC-3') et amorce anti-sens GSR (5'-GCN GGN GTR TAN CCC CAN GG-3').

L'amplification des fragments de séquences par Réaction de Polymérase en Chaîne (PCR) a été effectuée dans 25µl à partir d'1 µg d'ADNc, 1 µM de chaque amorce, 1X de tampon Taq, 0,25 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ et 0,5 unité de *Taq polymérase* (Qbiogene). Les cycles de températures utilisés sont répétés 35 fois : 30 secondes à 94°C (dénaturation), 1 minute à 47°C (hybridation), 2,5 minutes à 72°C (élongation) avec une élongation finale de 5 minutes à 72°C.

Les fragments obtenus ont été déposés sur un gel d'agarose à 1% préparé dans du tampon TAE 1X (Tris, acetic acid, et 0.5 M EDTA, pH8) contenant du bromide d'éthidium (BET). Les fragments présentant une taille attendue ont été extraits du gel selon le protocole du kit d'extraction QIAquick (QIAGEN, France) et clonés avec un kit de clonage TOPO-TA (Invitrogen) pour être envoyés au séquençage (Qbiogene).

4.3. RACE-PCR et clonage des séquences complètes d'ADNc

A partir des fragments précédemment obtenus, les extrémités 5' et 3' des ADNc de la GS et de la GP ont été caractérisées par RACE PCR (Rapid Amplification of the cDNA Ends- Polymerase Chain Reaction) selon le protocole fourni par le kit Smart Race cDNA Amplification (BD Biosciences) (**Figure 18**). Cette procédure permet de réaliser une transcription inverse et de fixer des adaptateurs aux extrémités 5' et 3' des ADNc néoformés. Il est ensuite possible de procéder à l'élongation des brins d'ADNc avec des amorces universelles fournies dans le kit et des amorces spécifiques des gènes d'intérêt.

Pour la GP, en 5' l'amorce utilisée est 5'-CAG GTT CCT CAA CCT GCC AAC CAT C-3', en 3' : 5'-TAC CGT GTC TCG CTG GCT GAG AAG A-3'. Les produits de RACE PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1% et les fragments de plus grande taille ont été purifiés et sous clonés dans le plasmide pCR 2.1® du kit TOPO-TA (Invitrogen).

5 Quantification des ARNm

La PCR en temps réel (Real-time PCR) est une révolution dans l'utilisation de la PCR. Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet, par son principe, de faire des mesures quantitatives d'un type d'ARNm (représenté par son ADNc) initialement présent dans un échantillon. Pour réaliser une mesure quantitative, une cinétique d'amplification des ADNc est réalisée (fluorescence en fonction du nombre de cycle de PCR). Les algorithmes actuels définissent un nombre de cycles dans la phase exponentielle d'amplification pour lesquels la fluorescence dépasse un certain seuil (cycle seuil = Ct). Ce seuil est déterminé automatiquement par l'appareil de mesure ou peut être modifié de façon manuelle. C'est uniquement dans la phase exponentielle d'amplification qu'un lien peut être établi entre le cycle seuil « Ct » et la quantité initiale d'ADNc de l'échantillon.

Matériels et méthodes

La quantité des ARNm est mesurée par PCR en temps réel à l'aide d'un thermocycler capable de mesurer la fluorescence de l'échantillon (Icycler IQ, Biorad) (Wittwer *et al*, 1997). La technique de détection choisie est celle du SYBR Green, détection non spécifique des ADN doubles brins, mesurée à chaque fin d'élongation lors des cycles de PCR (Morisson *et al*, 1998).

Entre le début et la fin de ce travail de thèse, la méthode de quantification des ARNm a été modifiée de la quantification relative (par rapport à un gène de référence) vers la quantification absolue. C'est pourquoi certains résultats sont exprimés en quantités relatives d'ARNm et les suivants en quantités absolues d'ARNm. La mise au point de la méthode de dosage des ARNm en nombre de copies fait l'objet d'une partie des résultats de la Partie 1 de ce manuscrit.

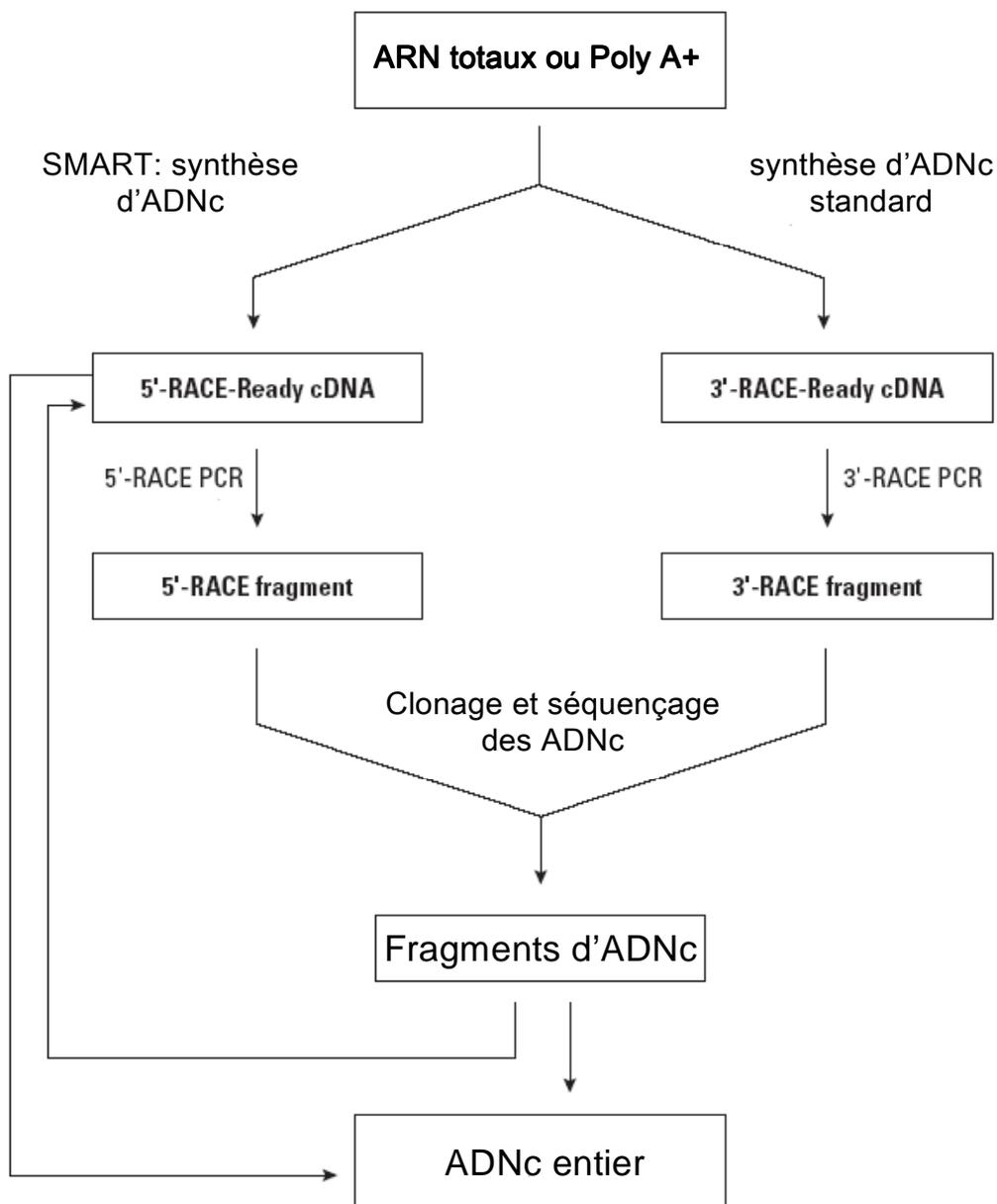


Figure 18 : Principe de la RACE PCR d'après le kit SMART RACE amplification kit (BD bioscience).

5.1. Protocole de PCR en temps réel

5.1.1. Amorces oligonucléotidiques

Des amorces spécifiques ont été dessinées à partir des séquences des différents ARNm étudiés dans ce travail, de façon à respecter les conditions imposées par la technique (Biorad) avec l'assistance du logiciel libre accès Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Le **tableau 3** résume les différentes amorces spécifiques utilisées pour chaque séquence ainsi que pour les gènes de référence actine et facteur d'élongation I.

Tableau 3 : Séquences des différentes amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Oyster-specific primers for real time PCR	
HK	Forward: 5' -AGGTCAAGATGTACCCACCT- 3' Reverse: 5' -TAAACCCGGAAGTTTGTCC- 3'
PGM	Forward: 5' -GGGGAGGAGAGCTTGGAAC- 3' Reverse: 5' -GACCATAGGTCTGCCAGTGC- 3'
PK	Forward: 5' -ACATGATTTTCGCCTCCTTC- 3' Reverse: 5' -TCTCTGGGGGAATCTCAATG- 3'
PEPCK	Forward: 5' -CATGGCGTCATGGTTGGAGC- 3' Reverse: 5' -GTCAAGCCAGTGCTGTAGG- 3'
GS	Forward: 5' -GACGCCAACGACCAAATG- 3' Reverse: 5' -TTCAGGAACTGGGGGTGA- 3'
GP	Forward: 5' -AGACGGTCCCCGATGATT- 3' Reverse: 5' -GGCAGCTCCTGGCTATCA- 3'
G6PDH	Forward: 5' -GGTGGAGAAGCCGTTTGG- 3' Reverse: 5' -CGAGGCGATTCCGTCTCT- 3'

Les amplifications par PCR en temps réel sont effectuées dans un volume total de 15µl avec 7,5µl de SYBR Green PCR Master Mix 1X (BIORAD), 0,5 µl de chaque amorce spécifique à 10 µM, 5µl d'ADNc dilué au 5^{ème} et 1,5 µl d'eau ultra pure RNase free. Après activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 15 minutes, l'amplification a lieu pendant 40 cycles de 30 secondes à 95°C (dénaturation) et 1 minute à 60°C (hybridation et élongation). La mesure de fluorescence est effectuée à la fin de chaque cycle d'élongation et une courbe de fusion des amplicons est réalisée à la fin du programme par décrémentation de température et mesure de la fluorescence (pas de 0,5°C toutes les 10 secondes, de 95°C à 55°C). La mise au point de cette technique a été réalisée au laboratoire.

5.1.2. Vérification de non contamination des échantillons et du MIX réactionnel

Afin de vérifier la non contamination des échantillons d'ADNc par de l'ADN génomique, la PCR en temps réel est avant tout effectuée sur 1µg des ARN totaux utilisés pour réaliser la transcription inverse. De plus, des blancs de PCR sont effectués afin de vérifier la non contamination à l'ADN du Mix réactionnel de PCR.

5.1.3. Répétabilité des mesures

Les gènes d'intérêt et les gènes de référence d'un même échantillon sont toujours amplifiés sur la même plaque de PCR, afin d'éviter tout biais de variation inter-PCR. Chaque mesure est ensuite répétée 3 fois.

5.2. Méthode de quantification relative des ARNm

Pour la quantification relative des ARNm, l'expression des résultats se base sur le rapport de la fluorescence mesurée pour le /les gènes cibles par rapport à un gène dit de « référence » à expression constante. Deux gènes de « référence » connus ont été systématiquement amplifiés à partir des échantillons analysés : l'actine et le facteur d'élongation I. Pour ces deux gènes, les séquences d'ARNm ont été caractérisés chez l'huître *C.gigas* (actine : Miyamoto *et al*, 2002 ; Facteur d'élongation : Genbank AB122066).

Le calcul utilisé pour traiter les données de PCR en temps réel en quantification relative est selon les cas celui décrit par Livak & Schmittgen (2001) ou par Bacca *et al.* (2005).

5.3. Quantification absolue des ARNm

Dans ce type de quantification, le principe est d'utiliser une gamme de fragments d'ADN d'intérêt, de concentration connue, en tant que calibre du dosage. La quantification est ensuite faite par comparaison des Ct des échantillons avec les Ct de cette courbe standard.

5.3.1. Réalisation d'une gamme d'ADN plasmidique

Obtention de fragments d'ADNc

Afin de réaliser des gammes étalons en nombre connu de copies d'ADNc / μ l pour les gènes de la GS, de la GP, de l'actine et du Facteur d'élongation I, des fragments de chacune de ces séquences ont été amplifiés par PCR (Etape 1, **Figure 19**). Les amorces spécifiques dessinées pour amplifier ces fragments (**Tableau 4**) ont été choisies pour entourer de part et d'autre les sites de fixation des amorces de PCR en temps réel (citées plus haut dans le **tableau 3**). Ces fragments sont donc de taille légèrement supérieure à celle des fragments amplifiés par PCR en temps réel. L'amplification des fragments a été effectuée dans 25 μ l à partir d'1 μ l d'ADNc (voir 4.1 du matériel et méthodes), 1 μ M de chaque amorce, 1X de tampon Taq, 0,25 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ et 0,5 unité de *Taq polymérase* (Qbiogene). Le programme utilisé pour l'amplification des fragments à cloner était de 1 minute à 94°C, 1 minute à 52°C, 2 minutes à 72°C (35 cycles) et une élongation finale de 5 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose à 1% pour une électrophorèse. Les bandes de taille attendue ont été extraites du gel et purifiées selon le protocole du kit d'extraction QIAquick (QIAGEN, France) en vue du clonage.

Clonage des fragments d'ADNc

Les fragments purifiés ont ensuite été clonés dans des plasmides pCR 2.1® du kit TOPO-TA (Invitrogen) (Etape 2, **Figure 19**). Des bactéries compétentes du kit ont été transformées avec les plasmides recombinants (Etape 3, **Figure 19**) et mises en culture une nuit à 37°C sur du milieu LB solide contenant de la kanamycine (Etape 4, **Figure 19**). Avec ce kit, seules les bactéries comportant le plasmide plus l'insert poussent sur ce milieu sélectif. Pour les 4 clonages réalisés, plusieurs clones sont ensuite mis en culture une nuit à 37°C dans du milieu LB liquide contenant de la kanamycine (Etape 5, **Figure 19**).

Matériels et méthodes

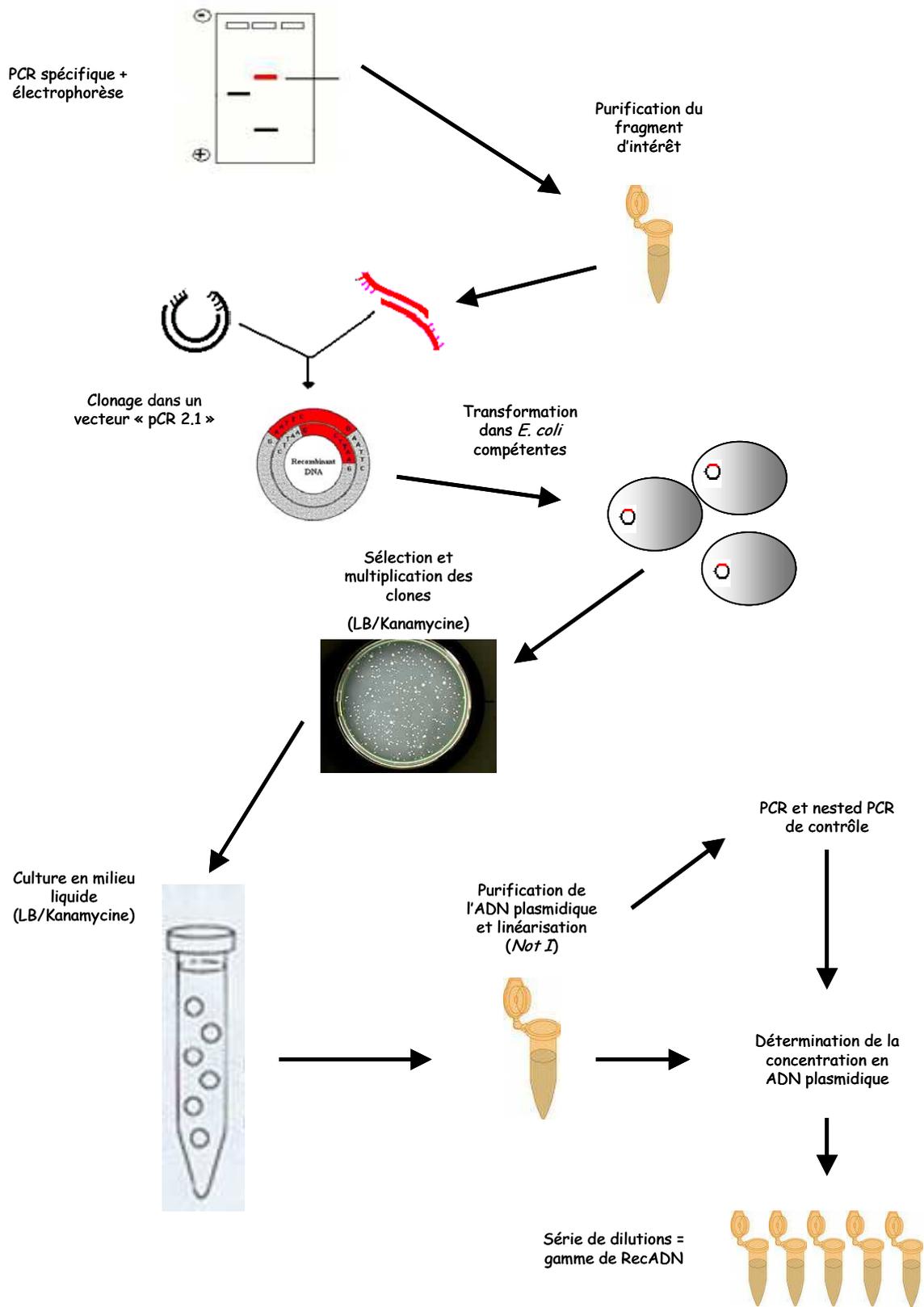


Figure 19 : Principe de la réalisation des gammes d'ADN plasmidique pour la quantification absolue en PCR en temps réel.

PCR et nested PCR de contrôle

Deux PCR de contrôle ont permis de sélectionner les clones ayant bien le fragment d'intérêt (Etape 5, **Figure 19**). La première PCR est effectuée sur 3 µl de culture avec les amorces spécifiques du **tableau 4** et le même protocole que précédemment. Une seconde PCR de contrôle (nested PCR) est réalisée sur 3µl de produits de la première PCR avec les amorces de PCR en temps réel (**Tableau 3**) donc une température d'hybridation fixée à 60°C. Après électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, les clones montrant une double amplification (doubles positifs) ont été retenus.

Extraction d'ADN plasmidique et linéarisation des plasmides

L'ADN plasmidique des clones doubles positifs est ensuite purifié avec le kit de purification Plasmid mini kit (Quiagen, France). Les plasmides sont ensuite linéarisés avec une enzyme de restriction *Not I* (Promega, France) coupant l'ADN circulaire en un seul point (Etape 6, **Figure 19**).

Tableau 4 : Amorces, taille des fragments amplifiés et poids moléculaire des plasmides recombinants (avec inserts) pour les 4 gènes clonés. La taille du plasmide double brin pCR 2.1 ® est de 3956 pb

	Amorces PCR	Taille fragment	Poids Moléculaire
G. Synthase	sens 5'-AGG GGC AAA ATT CCA ACT G-3' anti 5'-CAA ACA AAG GGT TGG TGG AG-3'	241 pb	7,44 10 ⁴ g/mol
G. Phosphorylase	sens 5'-TGC TCA ATT GCT TCC ACA TC-3' anti 5'-GCG AGA CAC GGT AGT TCT CC-3'	225 pb	6,95 10 ⁴ g/mol
Actine	sens 5'-GCC GAG AGA GAA ATC GTC AG-3' anti 5'-TTC CTC TCA GGT GGA GCA AT-3'	398 pb	1,23 10 ⁵ g/mol
Facteur d'Elongation I	sens 5'-CTT GCC CAG GTC ATC ATC TT-3' anti 5'-CAG CCT TCT CAA CCT CCT TG-3'	312 pb	9,66 10 ⁴ g/mol

Détermination de la concentration en ADN plasmidique

Les plasmides doubles brins ont été quantifiés par de multiples mesures au spectrophotomètre (n = 5) à la longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques (260 nm) et pour 2 dilutions. Le facteur de conversion de 1 DO = 50 µg/ml ADN a été utilisé.

Le poids moléculaire des différents clones est calculé à partir de la taille en paire de base des produits de PCR et d'après la taille du plasmide pCR 2.1 de 3956 paires de bases (**Tableau 4**).

$$\text{Nb copies /}\mu\text{l} = \frac{2 \times [\text{plasmide recombinant}]_{(\mu\text{g} / \mu\text{l})}}{\text{PM plasmide recombinant}_{(\mu\text{g} / \text{mol})}} \times \mathcal{N}_a$$

\mathcal{N}_a : Nombre d'Avogadro, 1 mole contient 6.023×10^{23} molécules.

Gammes de dilutions d'ADN plasmidique

A partir des solutions mères de concentrations connues en nombre de copies (RecGS, RecGP, RecAC ou RecEF), des aliquotes ont été préparées allant de 10^7 copies / μl à moins de 100 copies / μl (Voir Résultats de la Partie 1 de ce manuscrit). Les aliquotes correspondant aux 4 courbes de calibration ont été congelées à -20°C alors que les solutions mères sont conservées à -80°C .

5.4. Validation et traitement des données de PCR en temps réel

5.4.1. Variation du gène de référence

La variabilité du gène de référence est vérifiée et ne doit pas dépasser 5% de coefficient de variation pour l'ensemble des données d'une expérimentation. Les facteurs (par exemple : niveau trophique, temps, lignée génétique) ne doivent pas avoir d'effet sur la quantité d'ARNm des gènes de référence mesurée à partir d' $1\mu\text{g}$ d'ARN totaux.

5.4.2. Calculs d'efficacités de PCR

L'efficacité de PCR (E) est un élément fondamental à prendre en compte pour obtenir une mesure quantitative ou établir un protocole de PCR. Elle désigne l'ordre de la phase exponentielle d'amplification. L'équation de la cinétique s'écrit donc :

$$[ADM]_n = [ADM]_{initiale} \times E^n$$

Où n = nombre de cycle de PCR

La majorité des protocoles expérimentaux donnent une efficacité de PCR entre 1,85 et 2 (85% à 100% en pourcentage). Deux écoles s'affrontent, avec des arguments expérimentaux à l'appui. L'une considère que cette efficacité est une constante pour chaque amplicon dans un protocole expérimental donné. L'autre estime qu'elle varie toujours significativement et qu'elle nécessite d'être constamment remesurée. Il faut être certain que l'efficacité utilisée (mesurée à chaque expérience ou non) est bien celle qui a eu cours dans l'échantillon à calibrer. Il existe plusieurs moyens de déterminer l'efficacité de PCR.

Méthode de calcul d'efficacité par les courbes standards

Cette méthode est la plus couramment utilisée et aussi la plus ancienne (très nombreuses références, voir Rasmussen *et al.*, 2001). Elle consiste à amplifier l'ADN d'une gamme de dilutions du même échantillon de départ. Si l'efficacité est de 100%, la proportionnalité est parfaitement respectée entre les points de gamme, le report du nombre de cycles seuils (Ct) en fonction de la quantité d'ADN donne alors une droite. L'efficacité est donc estimée à partir de la pente de la droite de régression ($E = 10^{(-1/\text{pente})}$).

Dans cette méthode, le seuil de fluorescence est fixé par l'utilisateur dans la phase exponentielle d'amplification des points de gammes. Ce seuil est ensuite conservé pour traiter les données des échantillons à analyser.

Méthode de calcul d'efficacité individuelle

Certains auteurs considèrent que de délimiter le seuil de fluorescence mesurable de façon subjective et/ou globale (algorithme automatique des appareils de qPCR) génère des erreurs dans la détermination des efficacités de réaction par la méthode des courbes standards (Liu & Saint, 2002, Bar *et al.*, 2003). Car il est connu que pendant la phase exponentielle, les efficacités individuelles d'amplification peuvent varier reflétant les infimes différences de concentration d'amorces, enzyme, nucléotides et inhibiteurs de polymérase entre chaque puits (Wilson, 1997 ; Chandler *et al.*, 1998). Récemment, un algorithme de détermination des efficacités alternatif a donc été proposé (Bar *et al.*, 2003 ; Tichopad *et al.*, 2003 ; Chernoneva *et al.*, 2006). Dans cette méthode, il est possible de déterminer l'efficacité d'amplification de chaque échantillon individuellement. Le principe repose sur la détermination statistique du démarrage de la phase exponentielle de PCR (**Annexe 5**).

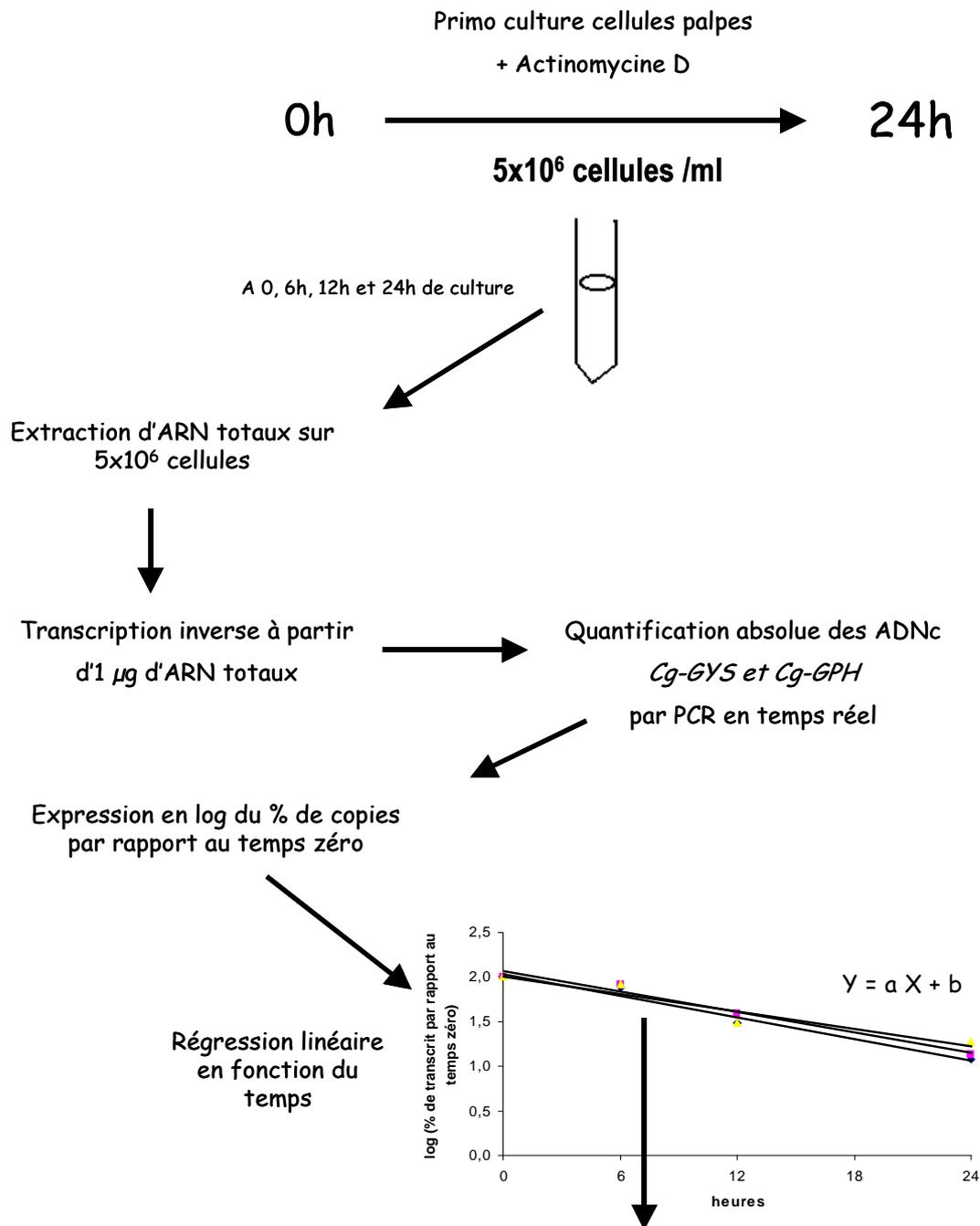
Cette méthode est largement plus adaptée aux mesures en quantification absolue. En effet, elle permet de vérifier l'égalité des efficacités d'amplification entre des ADNc natifs (échantillons) et des plasmides recombinants (standards). Ces deux types d'ADN sont très différents en terme de soluté et donc susceptibles de faire varier le fonctionnement de la polymérase pendant la PCR.

6 *Stabilité des ARNm*

Un des moyens d'étudier la stabilité des ARNm est de bloquer leur biosynthèse et de suivre leur disparition en fonction du temps. Ceci peut être fait avec un inhibiteur de transcription tel que l'Actinomycine D. Cette molécule est constituée de deux chaînes identiques polypeptidiques rattachées par un noyau phénoxazone, dont la structure plane permet une intercalation au niveau de l'ADN.

Le suivi de la stabilité des ARNm est réalisé à partir d'une suspension de cellules de palpes dissociées et mises en culture dans du milieu L15 avec antibiotiques à raison de 5×10^6 cellules /ml (**Figure 20**). Au temps T0, l'actinomycine D est ajoutée à la suspension cellulaire telle que sa concentration finale soit de 5 g /ml. La quantité d'ARNm d'intérêt est ensuite déterminée à plusieurs temps par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en pourcentage de transcrits par rapport au temps zéro. La demi-vie correspond au temps nécessaire pour voir 50% des transcrits disparaître. Le calcul est possible grâce à l'équation d'une régression linéaire du log de ce pourcentage en fonction du temps. L'extraction des ARN totaux est effectuée sur 1ml de prélèvements (soit 5×10^6 cellules) à 0, 6h, 12h et 24h de culture. La transcription inverse est réalisée sur 1µg d'ARN totaux. La viabilité des cellules est contrôlée par le test MTT décrit précédemment.

Détermination du temps de demi-vie d'un ARNm



Le temps de demi-vie de l'ARNm considéré est le temps correspondant à la disparition de 50% des transcrits par rapport au temps zéro : $Y = \log(50\%)$

Figure 20 : Calcul du temps de demi-vie d'un ARNm par blocage de la transcription à l'actinomycine D et mesure des ARNm par PCR en temps réel.

7 *Analyses statistiques*

L'effet statistique de différents facteurs (période, niveau trophique, concentration en glucose, en insuline, lignée génétique) a été testé avec le logiciel Statgraphics Plus v5.1 pour les paramètres mesurés dans ce travail de thèse :

Quantités d'ARNm rapportées à un gène de référence (actine ou facteur d'élongation)

Quantités d'ARNm exprimées en nombre de copies (*Cg-GYS*, *Cg-GPH*)

Activités spécifiques (GS, GP, HK, PGM, PK)

Taux de glycoène, de glucides totaux, d'AMP, d'ATP

7.1. Comparaison des moyennes si la variance des données est homogène

Avec un test t (Student)

Pour les comparaisons deux à deux (seuil de significativité de 5%).

Avec une analyse de variance (ANOVA)

A un ou plusieurs facteurs pour les données multiples (seuil de significativité de 5%)

Avec un test LSD (Least Significance Difference)

Pour discriminer les groupes homogènes dans des comparaisons multiples. Test effectué après un ajustement de Bonferroni.

7.2. Comparaison des médianes si la variance des données n'est pas homogène

Avec un test de Kolmogorov-smirnov

Pour les comparaisons deux à deux non paramétriques (seuil de significativité de 5%).

Avec un test de Kruskal Wallis

Pour les comparaisons multiples non paramétriques (seuil de significativité de 5%).

Par la méthode des Box-Plot :

Pour discriminer les groupes homogènes de façon graphique dans des comparaisons de données multiples.

**Partie 1 : Caractérisation et
optimisation d'outils moléculaires et
techniques d'analyses chez l'huître *C.***

gigas

1 Introduction

L'étude d'une ou plusieurs voies métaboliques passe par l'analyse de ses enzymes clefs. Le métabolisme du glycogène est essentiellement contrôlé par la Glycogène synthase (GS) pour la synthèse, et par la Glycogène phosphorylase (GP) pour la dégradation. Si les niveaux de régulation de ces enzymes sont largement décrits chez les mammifères, chez *C. gigas*, les enzymes du métabolisme du glycogène ont été peu étudiées. Un ensemble de travaux relate cependant l'existence d'un système de régulation enzymatique similaire à celui des vertébrés pour la GP de *M. galloprovincialis* (San Juan Serrano *et al.*, 1995), de *C. gigas* (Hata, 1984 ; Hata *et al.*, 1993) et la GS de *M. edulis* (*e.g.* Whittle & Gabbott, 1986) et des huîtres *C. virginica* et *O. edulis* (Swift *et al.*, 1988 ; L-Fando *et al.*, 1972).

Le système de contrôle enzymatique par phosphorylation /déphosphorylation de la GS et de la GP, et les contrôles allostériques par les acides nucléiques (ATP et AMP) et le glucose-6-phosphate (G6P) est probablement un point important dans la gestion des réserves en glycogène des mollusques bivalves. Cependant, il existe probablement d'autres niveaux de régulation pour ces enzymes. La biosynthèse des enzymes peut en effet être influencée sur un plan génétique en particulier la synthèse des ARNm (régulation transcriptionnelle). La régulation transcriptionnelle de la GS et de la GP n'a jamais été étudiée chez les invertébrés. En effet, d'une part les séquences d'ARNm de la GS et de la GP n'ont jamais été caractérisées, et d'autre part la quantification des niveaux de transcrits d'un gène d'intérêt est une technique récente comparativement aux travaux en enzymologie menés jusqu'alors.

Dans ce travail de thèse, nous avons donc fait le choix d'étudier deux niveaux de régulation de la Glycogène synthase et de la GP : le dosage de l'abondance des ARNm et le dosage enzymatique de leurs activités. Afin de réaliser cet objectif, un premier travail fut de mettre au point un ensemble d'outils moléculaires et techniques d'analyses spécifiques à notre modèle biologique. La technique de quantification des ARNm appliquée dans cette thèse est la PCR en temps réel. Cette technique récente, très sensible, permet de faire des mesures quantitatives d'un type d'ARNm (représenté par l'ADN complémentaire) initialement présent dans un échantillon.

Dans cette partie sont donc premièrement reportés les travaux de caractérisation et d'analyse phylogénétique des séquences d'ARNm de la GS et de la GP d'huître et la mise au point réalisée et la validation de la technique de PCR en temps réel. Actuellement, les méthodes de calculs de la quantité d'ARNm sont souvent controversées, c'est pourquoi il est important d'adopter un algorithme de mesure précis. Le choix a été porté sur une méthode de quantification absolue du nombre d'ARNm développée au cours de cette thèse. Enfin, les dosages enzymatiques des activités de la GS et de la GP ont été optimisés pour l'huître à partir de travaux précédemment réalisés sur d'autres espèces d'invertébrés. Les problèmes rencontrés dans le dosage enzymatique de la GS ont été résolus au cours de ce travail de thèse.

2 *Caractérisation des séquences d'ADN complémentaire des enzymes clefs du métabolisme du glycogène chez l'huître*

2.1. Détermination de l'ORF de la GP

La séquence complète de l'ADNc de la GP (*Cg-GPH*) a été obtenue à partir d'ARN totaux de palpes et étendue en 5' et 3' par RACE-PCR (voir partie « matériel et méthodes »). La description de cette séquence fait partie d'une publication (Bacca *et al*, 2005).

La séquence isolée fait 3018 paires de bases (Genbank, numéro d'accèsion [AY496065](#)). Elle comprend une région non transcrite en 5' de 50 paires de bases. Le codon ATG d'initiation de la traduction a été identifié dans cette région (nucléotides 51-53). Un codon stop (TGA) a été positionné 2565 paires de bases plus loin autorisant une ORF de 855 acides aminés. Il existe une région non transcrite en 3' de 399 paires de bases.

La séquence déduite en acides aminés a été comparée à celle d'autres séquences de la base de données Genbank en utilisant un algorithme BLAST (Altschul *et al*, 1997). La séquence correspond à une séquence de GP ($p=0,0$). La séquence déduite de la GP de *C. gigas* révèle les domaines et positions conservés des GP ($p = 0,0$).

La séquence en acides aminés est à 68% similaire à celle des vertébrés (*Gallus gallus*, *Ovis aries*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*) quel que soit le tissu (foie, muscle et cerveau) et à 68% et 66% similaire à celle de *D. melanogaster* et *C. elegans*, respectivement.

La position de phosphorylation par la Phosphorylase kinase (résidu 14), les sites de fixation des substrats (site actif) ainsi que les motifs impliqués dans le contrôle allostérique (sites des nucléotides et des nucléosides) ou l'attachement des sous unités (sous unité) de la GP sont très conservés (**Figure 21**).

L'analyse des relations phylogénétiques entre les GP montre plusieurs groupes correspondants aux Protozoaires (*Giardia intestinalis*, *Dictyostelium discoideum*), Nématodes (*C. elegans*) et Protostomiens (*C. gigas*, *D. melanogaster*), et aux Deutérostomiens (**Figure 22**).

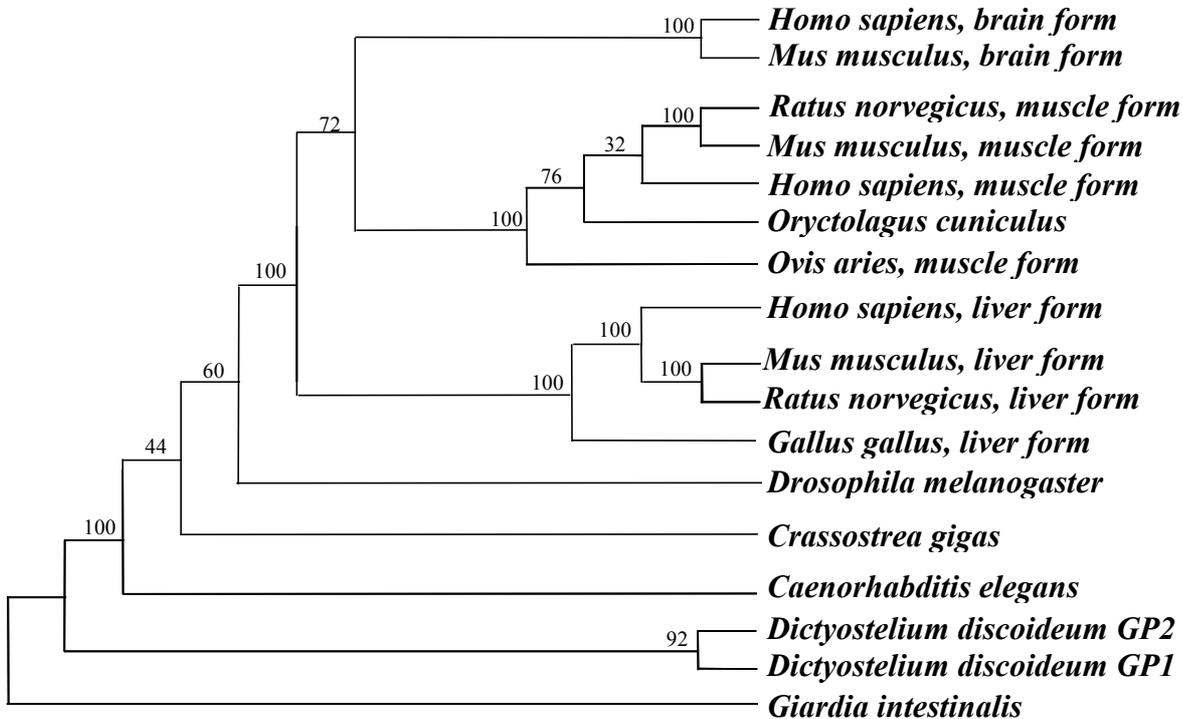


Figure 22 : Représentation graphique de l'analyse phylogénétique de la glycogène phosphorylase (Bacca *et al.*, 2005). L'alignement de séquence a été réalisé avec Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). L'arbre est construit selon le modèle PHYMLIP (Felsenstein, 1993) en utilisant la méthode « unweighted-pair group method with arithmetic means » (UPGMA). Les nombres à côté de chaque nœud représentent les valeurs de l'analyse des bootstraps en pourcentage. Les numéros d'accèsion de Genbank pour les différentes séquences sont : *Giardia intestinalis* ([AAK69600](#)), *Dictyostelium discoideum* GPH1 ([Q00766](#)) and GPH2 ([P34114](#)), *C. elegans* ([Q9N5U1](#)), *Drosophila melanogaster* ([Q9XTL9](#)), PHS1 *Gallus gallus* liver form ([NP_989723](#)), PHS2 *Ovis aries* muscle form ([O18751](#)), PHS2 *Oryctolagus cuniculus* muscle form ([P00489](#)), PHS1 *Rattus norvegicus* liver form ([P09811](#)), PHS2 *Rattus norvegicus* muscle form ([P09812](#)), PHS1 *H. sapiens* liver form ([P06737](#)), PHS2 *H. sapiens* muscle form ([P11217](#)), PHS3 *H. sapiens* brain form ([P11216](#)), PHS1 *M. musculus* liver form ([Q9ET01](#)), PHS2 *M. musculus* muscle form ([Q9WUB3](#)), PHS3 *M. musculus* brain form ([Q8CI94](#)).

2.2. Détermination de l'ORF de la GS

La séquence complète de l'ADNc de la GS (*Cg-GYS*) a été obtenue à partir des ARN totaux de palpes d'huître puis étendue par criblage d'une banque d'ADNc de bord de manteau d'huître (voir partie « matériel et méthodes »).

La séquence isolée fait 2408 paires de bases (Genbank, numéro d'accèsion [AY496064](#)). Elle comprend une région non transcrite en 5' de 34 paires de bases. Le codon ATG d'initiation de la traduction a été identifié dans cette région (nucléotides 35-37) et un codon stop (TGA) a été positionné 2120 paires de bases plus loin autorisant une ORF de 695 acides aminés. Il existe une région non transcrite en 3' de 285 paires de bases.

Partie 1 : Outils moléculaires et techniques d'analyses

La séquence déduite en acides aminés a été comparée à celle d'autres espèces de la base de données Genbank en utilisant un algorithme BLAST (Altschul *et al*, 1997). La séquence correspond à une séquence de Glycogène synthase ($p=0,0$). La séquence déduite de la GS de *C. gigas* révèle les domaines conservés de la Glycogène synthase ($p = 0,0$).

La séquence en acides aminés est à 61% identique à celle des vertébrés (*H. sapiens*, *M. musculus*, *Oryctolagus cuniculus*) pour les deux isoformes (foie et muscle). Elle est à 62% identique avec celle du poisson téléostéen *Brachydanio rerio* et à 59% et 66% du vers *C. elegans* et du moustique *A. aegypti* respectivement. Enfin, la séquence montre 57% d'identité avec celle de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Par comparaison des séquences en acides aminés humaines de GYS1, GYS2 et de la séquence d'huître (Cg-GYS) il apparaît que les sérines phosphorylables caractéristiques des séquences de GS du muscle humain (GYS1) et du foie humain (GYS2) sont en partie conservées pour la séquence d'huître (**Figure 23**). Dans la partie N-terminale (**Figure 23A**), les deux positions de sérines 2 et 2a ne sont pas conservées. Deux sérines sont en revanche visibles aux positions 6 et 10. Dans la partie C-terminale (**Figure 23B**), les positions 3a, 3b et 3c sont conservées ainsi que la position 5. Les positions 4, 1a et 1b ne sont pas conservées.

A

	2 2a	
GYS1-human	MPLNRTL <small>S</small> MSSLPGLEDEWE-DEFDL-----ENAVLFEVAWEVANKVGGIYTVLQTKAKV	53
GYS2-human	MLRGRSL <small>S</small> VT <small>S</small> LGGLPQWEVEELPV-----EELLLFEVAWEVTNKVGGIYTVIQTKAKT	54
Cg-GYS	MRRRNSFYRSFKDACPEFEEMLMDRGATAAAQNKWVFEIAWEVANKVGGIYTVIKSKAPV	60
	* * * * * * * * * * * *	

B

		3abc	
GYS1-human	SDLLDWKYLGRYYMSARHMALSKAFPEHF T YEPNEADAAQGYRYPRPASVPPSPSL <small>S</small> RHS		652
GYS2-human	SDLLDWRYLGRYYQHARHLTL <small>S</small> RAFPDKFHVELTSPPTTEGFKYPRP <small>S</small> SVPPSPSGSQAS		652
Cg-GYS	SDLLDWRNLGVYYRKARQIAVARGYPDLAAKE-EEILQEKRFMYPRPA <small>S</small> EPS <small>S</small> PSA <small>S</small> RS		659
	***** ** ** * *	**** * * * * *	
	4 5	1a 1b	
GYS1-human	S PHQ <small>S</small> EDEEDPRNGPLEEDGERYDEDEEAAKDRRNIRAP <small>E</small> WPRRA <small>S</small> CTSSSTSGSKRN <small>S</small> VD		712
GYS2-human	S P-QSSDVED-----EVEDERYDEEEEAERDRLNIKSP-----		684
Cg-GYS	TPA <small>S</small> EHGDD-----EDDDIDEDEENA-----		681
	* * *	** **	
GYS1-human	TATSSSLSTPSEPLSPTSSLGEERN		737
GYS2-human	-----FSLSHVPHGKKKLHGEYKN		703
Cg-GYS	-----EMSSNPESDMPMFK----		695
	*		

Figure 23 : Comparaison des séquences peptidiques de muscle (GYS1-human) et foie (GYS2-human) humain avec la séquence de GS d'huître (Cg-GYS). Les résidus sérines phosphorylables pour la partie N-Terminale (A) et C-terminale (B) conservés ou non sont indiqués par des chiffres. Il existe 7 positions phosphorylables pour la forme foie (nomenclature 2, 2a, 3abc, 4 et 5) et 9 pour la forme muscle (nomenclature 2, 2a, 3abc, 4, 5, 1a et 1b). Les boîtes verticales noires représentent les positions non conservées chez l'huître. Les boîtes verticales rouges et les lettres indiquées en rouge montrent les positions conservées chez l'huître. Les étoiles indiquent les acides aminés conservés pour les trois séquences alignées.

L'analyse des relations phylogénétiques entre les séquences peptidiques de GS montre plusieurs groupes correspondants aux eutélostomiens (*H. sapiens*, *M. musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Brachydanio rerio*), aux protostomiens (*A. aegypti*, *C. gigas*) au nématode *C. elegans* et à l'eucaryote unicellulaire *Saccharomyces cerevisiae*. On voit distinctement la séparation au sein du groupe d'eutélostomiens, de deux sous groupes correspondant aux isoformes muscle (GYS1) et foie (GYS2). La forme cerveau caractérisée chez la souris

(GYS3) est plus proche de la forme muscle que de la forme foie de la même espèce (**Figure 24**). La séquence de GS d'huître est plus proche de celle du moustique *A. aegypti*.

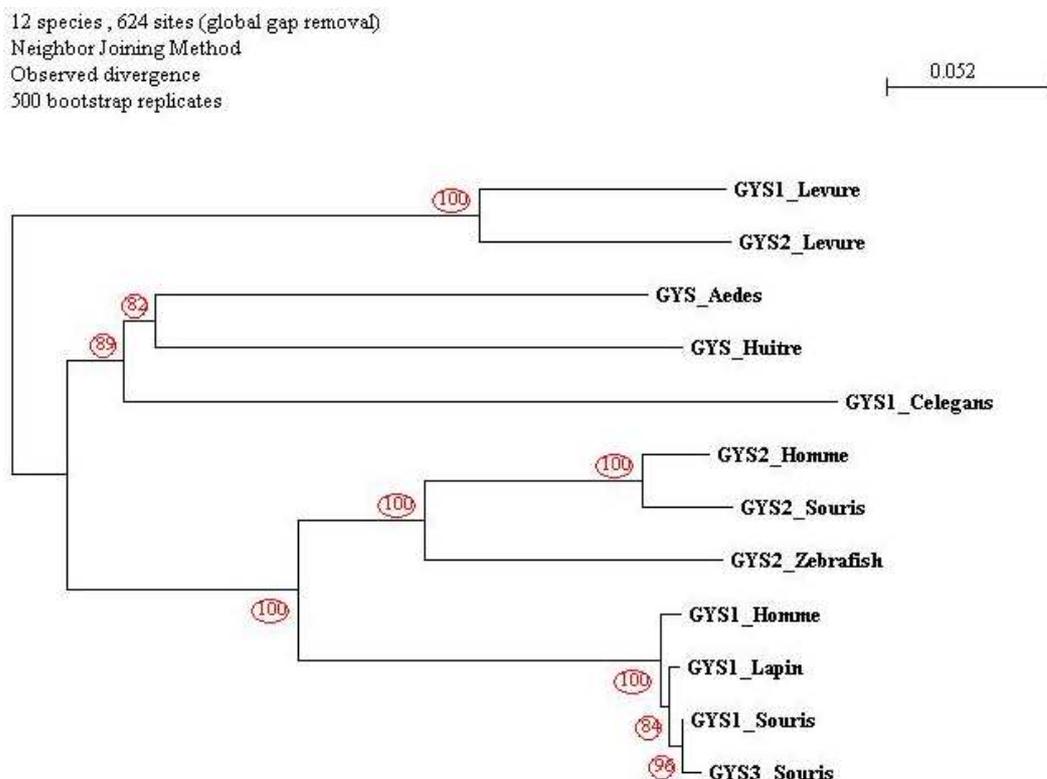


Figure 24 : Représentation graphique de l'analyse phylogénétique de la Glycogène synthase. L'alignement de séquence a été réalisée avec Clustal W (Thompson et al., 1994). L'arbre est construit selon le modèle PHYLIP (Felsenstein, 1993) en utilisant la méthode « Neighbor Joining Method » (NJ). Les nombres à côté de chaque nœud représentent les valeurs de l'analyse des bootstraps en pourcentage. Les numéro d'accension de Uniprot pour les différentes séquences sont : homme : *H. sapiens* GYS1 (P13807), GYS2 (P54840) ; souris : *M. musculus* GYS1 (Q8VEB0), GYS2 (Q8VCB3), GYS3 (P54859) ; lapin : *Oryctolagus cuniculus* GYS1 (P13834) ; zebrafish : *Brachydanio rerio* GYS2 (Q5RGX8) ; nématode : *C.elegans* (Q2U2D9) ; moustique : *A. aegypti* GYS (Q17D60) ; levure : *Saccharomyces cerevisiae* GYS1 (P27471), GYS2 (P27472).

3 Mise au point et validation de la quantification absolue des ARNm par PCR en temps réel

Sont reportés ici les résultats de mise au point de la technique de PCR en temps réel par quantification absolue. L'utilisation de gammes standards d'ADN recombinant a été choisi comme méthode de quantification. Afin de valider cette technique, il a fallu générer des gammes d'ADN recombinant pour les séquences d'ARNm des gènes d'intérêt et des gènes de référence. La spécificité de l'amplification de ces gammes pas PCR en temps réel ainsi que l'efficacité d'amplification ont dues également être vérifiées.

3.1. Génération de gammes standards d'ADN recombinant (Rec ADN)

Les différents fragments d'ADN complémentaires de la GS et de la GP (*Cg-GYS*, *Cg-GPH*) et des gènes de référence actine (*Cg-AC*) et facteur d'élongation I (*Cg-EF I*) ont été clonés (voir « matériel et Méthodes »).

La concentration des différentes solutions d'ADN plasmidique avec inserts (ADN recombinant) a été déterminée après purification et linéarisation des plasmides nommés GS7-lin, GP6-lin, AC7-lin, EF1-lin (correspondant respectivement au clonage des fragments *Cg-GYS*, *Cg-GPH*, *Cg-AC* et *Cg-EF I*). Le **Tableau 5** indique les concentrations en nombre de copies d'insert, calculées à partir de la DO à 260 nm des plasmides recombinants (facteur de conversion : 1 DO = 40 µg/µl).

Tableau 5 : Concentrations des solutions mères de plasmides + inserts linéarisés (GS7-lin, GP6-lin, AC7-lin, EF1-lin). Pour chaque solution, la DO est déterminée pour deux dilutions et mesurée 5 fois.

Insert	DO 260 nm (n=5)	concentration plasmide + insert (µg/µl)	Nb copies insert / µl
GS7-lin	0,1083	0,070	6,047E+10
GP6-lin	0,1222	0,084	7,329E+10
AC7-lin	0,1025	0,066	5,552E+10
EF1-lin	0,1142	0,078	6,680E+10

Ces solutions mères d'ADN recombinant ont été diluées en série de façon à obtenir des gammes de concentrations de fragments d'ADNc allant de l'ordre de 10^8 copies /µl à 10^1 copies /µl pour chaque type de séquence.

3.2. Spécificité d'amplification sur ADN recombinant

Les produits de PCR en temps réel obtenus après amplification sur les 4 gammes d'ADN recombinant ont été vérifiés d'une part par séquençage des produits obtenus (A. Van Wormhoudt) et comparaison avec les séquences caractérisées des ADNc d'huître (*Cg-GYS*, *Cg-GPH*, *Cg-AC* et *Cg-EF I*). D'autre part une deuxième vérification a été faite par l'analyse des courbes de fusion fournies par l'appareil Icyler IQ (Biorad). La température de fusion d'une séquence nucléotidique se détermine en fonction du nombre et du type de nucléotides présents. Pour chaque ADN recombinant (RecADN), la température de fusion est la même que celle des amplicons obtenus sur ADNc natifs non clonés. Les courbes se superposent parfaitement (**Figure 25**). Les températures de fusion sont de 81,5°C, 81,2°C, 83°C et 83,3°C pour les RecADN et les ADNc *Cg-GYS*, *Cg-GPH*, *Cg-AC* et *Cg-EF I* respectivement.

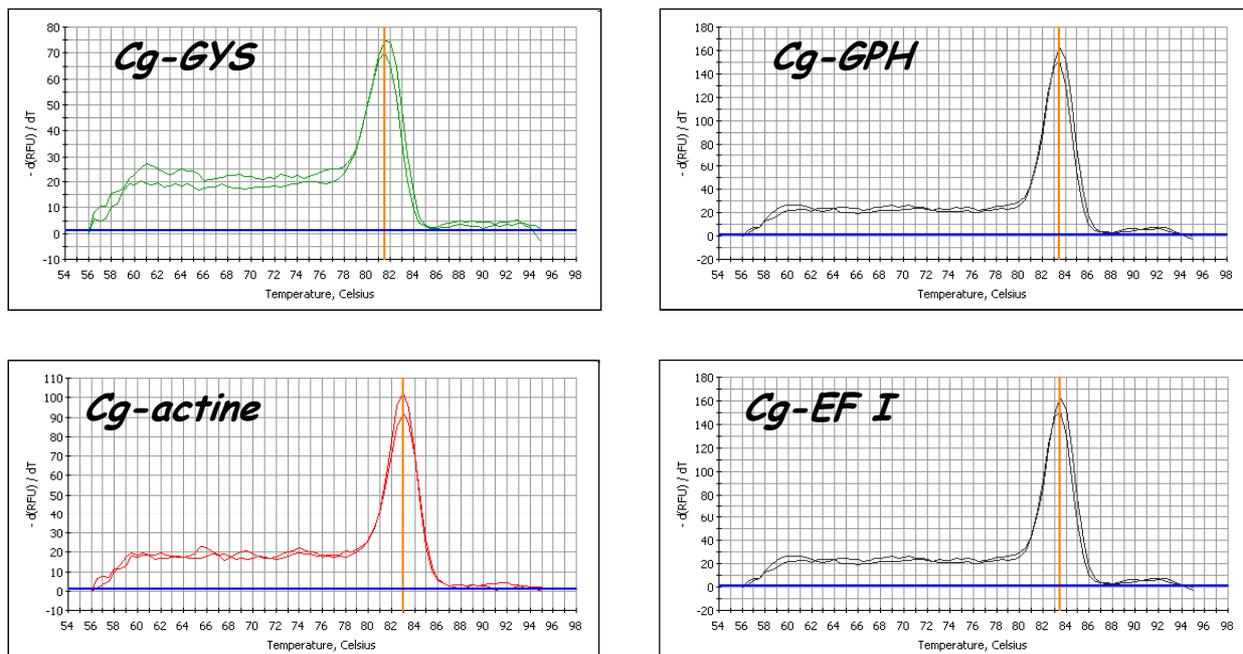
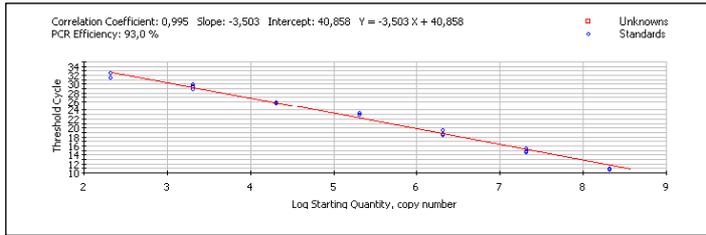


Figure 25 : Superposition des courbes de fusion obtenues avec les produits de PCR des RecADN et des ADNc *Cg-GYS*, *Cg-GPH*, *Cg-Actine* et *Cg-EF I*

3.3. Efficacités d'amplification, linéarité des gammes RecADN

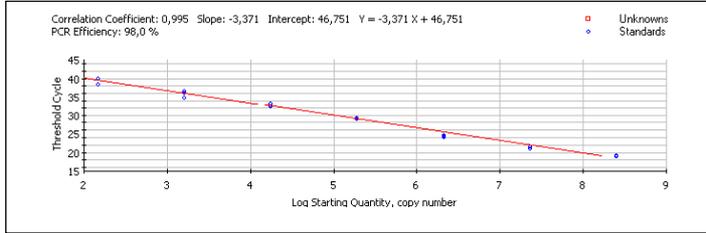
En PCR en temps réel, la méthode classique pour déterminer l'efficacité d'amplification est une méthode de dilutions en série analysée en triplicats (Rasmussen, 2001). Pour cela, une gamme de dilution de RecADN est préparée, variant de plusieurs ordres de grandeur (10^2 à 10^8 copies / μ l). Les valeurs de cycles seuil (Ct) relevées par analyse des résultats sur l'Icycler sont ensuite exprimées sur un graphe en fonction du log de la concentration en RecADN. Chacune des gammes standards amplifiées par PCR en temps réel présente une linéarité et une efficacité de PCR présentée en **figure 26**.



RecADN Cg-GYS

E_{lin} = 93,0%

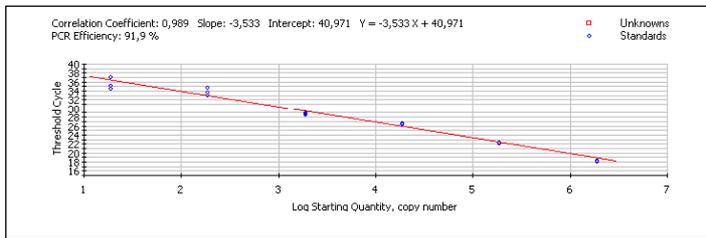
R² = 0,995



RecADN Cg-GPH

E_{lin} = 98,0%

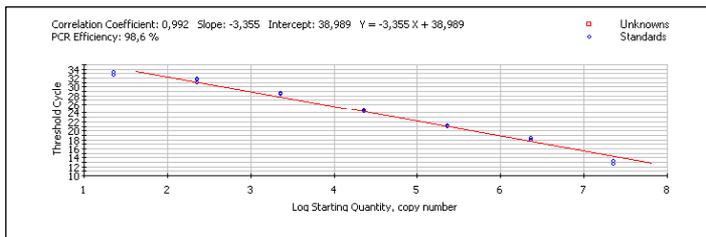
R² = 0,995



RecADN Cg-AC

E_{lin} = 91,9%

R² = 0,989



RecADN Cg-EFI

E_{lin} = 98,6%

R² = 0,992

Figure 26 : Courbes standards obtenues pour les 4 ADN recombinants utilisés : RecADN Cg-GYS, RecADN Cg-GPH, RecADN Cg-actine et RecADN Cg-EFI. E_{lin} : efficacité de PCR calculée à partir de la pente de la droite ($E = 10^{(-1/\text{pente})}$). R² est le coefficient de corrélation des points expérimentaux avec la droite.

Les efficacités sont mesurées d'après la pente de la droite de régression selon l'équation $E = 10^{(-1/\text{pente})}$. Elles sont égales à 93 %, 98 %, 92,7 % et 98,6 % pour RecADN, Cg-GYS, Cg-GPH, Cg-Actine et Cg-EF respectivement.

3.4. Comparaison des efficacités de PCR des standards RecADN et des ADNc

La quantification absolue des ARNm par PCR en temps réel présume que l'efficacité d'amplification des transcrits à doser dans les échantillons est comparable à celle des standards externes (RecADN). Pour cela 3 réplicats de 4 dilutions ont été amplifiés à partir des deux types d'ADN matrice (ADNc : dilutions 1/2, 1/5, 1/10, 1/100 ; RecADN : 10⁶ à 10² copies/μl) sur la même plaque de PCR. Les efficacités individuelles d'amplification (E_{reg}) ont été calculées par régression des données de fluorescence selon l'algorithme statistique

décrit dans le « matériel et méthodes ». Pour la GS, les efficacités moyennes sont de 2,05 (105 %) et 1,95 (95 %) pour les ADNc et les RecADN respectivement. Pour la GP elles sont respectivement de 2,03 (103 %) et 1,98 (98 %).

La comparaison des efficacités est effectuée par comparaison des moyennes sur l'ensemble des données ($n = 12$, $p < 0,05$) (**Tableau 6**). Il n'y a aucune différence statistique entre les efficacités d'amplification des ADNc natifs et celles des RecADN. Ceci est valable pour les quatre type de transcrits.

Tableau 6 : Comparaison des moyennes d'efficacités individuelles d'amplification pour les ADNc et les RecADN de chaque type de transcrit. Test de Student, $n = 12$, $p < 0,05$. NS : Non significatif.

	glycogène synthase		glycogène phosphorylase		actine		facteur d'élongation I	
	ADNc natif	RecADN	ADNc natif	RecADN	ADNc natif	RecADN	ADNc natif	RecADN
<i>Effectif</i>	12	12	12	12	12	12	12	12
<i>Moyenne</i>	2,05	1,95	2,03	1,98	2,01	2,10	2,08	1,98
<i>Ecartype</i>	0,15	0,12	0,16	0,20	0,19	0,25	0,12	0,12
<i>t-student</i>	1,79		-0,64		0,99		1,84	
p =	0,08 NS		0,52 NS		0,33 NS		0,08 NS	

4 Optimisation du dosage enzymatique de la GP

L'objectif visé ici était de pouvoir mesurer le ratio d'activité des deux formes de la GP dans un extrait tissulaire ou cellulaire d'huître. Les deux formes a et b de la GP sont en perpétuel équilibre de phosphorylation /déphosphorylation et cet équilibre est contrôlé par des kinases et des phosphatases spécifiques qui sont présentes dans les extraits tissulaires. Le tampon d'extraction utilisé pour préparer les échantillons à doser contient donc des inhibiteurs de ces kinases /phosphatases de façon à bloquer l'interconversion des formes a et b. L'optimisation de ce dosage a été réalisée en partie par A. Leroux au LPI (Ifremer, Brest). Elle est basée sur les travaux de San Juan Serrano *et al.* (1991, 1993, 1995a et b, 1998 a, b et c) portant sur la phosphorylase de la moule *M. galloprovincialis* et les travaux de Childress & Saktor (1970) réalisés sur la mouche *Phormia regina*.

4.1. Effet de la concentration en substrat : glycogène

L'objectif est d'une part d'optimiser la concentration de glycogène utilisée dans le dosage final de l'activité GP totale et GP a pour que ce substrat ne limite pas la vitesse de réaction. D'autre part, il est de caractériser le Km (constante de Michaélis) des deux formes a et b pour le glycogène.

Les activités GP totale et GP a ont donc été mesurées pour 5 concentrations de glycogène allant de 2,5 à 0,2 mg /ml, dans les conditions finales de dosage (35°C, 80 mM Pi, 6,4 ou 0 mM AMP pour les formes « totale » et « a » respectivement). L'activité de la GP b est obtenue par différence de l'activité totale et de l'activité GP a. D'après la droite de régression de Lineweaver et Burk (**Figure 27**), le Km de la GP a pour le glycogène est de 0,78 mg /ml et celui de la GP b est de 1,03 mg /ml.

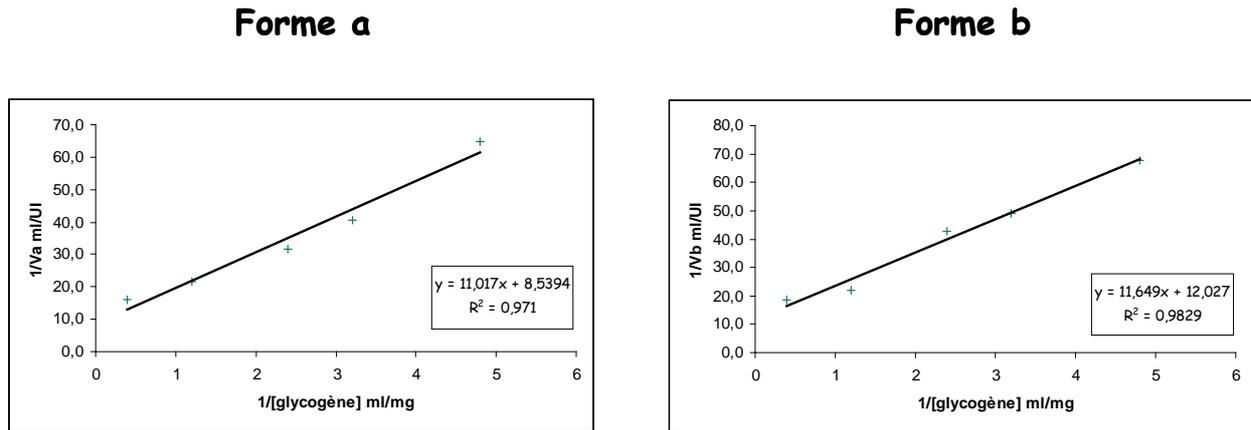


Figure 27 : Effet de la concentration en glycogène sur les activités des formes a et b de la Glycogène phosphorylase. Les graphes représentent le graphe en double inverse de Lineweaver et Burk et la régression linéaire dont l'équation indiquée permet le calcul des Km de la GP a et de la GP b pour le glycogène.

La vitesse maximale des deux formes de la GP est obtenue pour une concentration en glycogène supérieure à 1 mg/ml. Les conditions finales de dosage ont été fixées à 2mg/ml.

4.2. Effet de l'AMP sur l'activité GP mesurée

Pour doser soit l'activité de la forme « a » soit l'activité de la forme « b » de la GP, le principe du dosage repose sur la présence /absence d'AMP dans le milieu réactionnel. L'effet de l'AMP sur le dosage de l'activité de la GP a été testé sur des échantillons préparés à partir d'animaux entiers. Dans ces échantillons, les deux formes a et b de phosphorylase coexistent.

L'effet de l'AMP a été testé avec une gamme de 10 concentrations en AMP (1,6 mM à 10^{-4} mM). Le graphe de la **figure 28** représente l'activité GP exprimée en UI/ml mesurée dans les conditions finales de dosage en fonction du log de la concentration en AMP. L'ajout de 10^{-4} mM ($\log = -7$) à 0,033 mM ($\log = -4,48$) d'AMP n'a aucun effet sur l'activité GP mesurée. En revanche, à partir de 0,1 mM ($\log = -4$), l'AMP a un net effet positif sur l'activité GP. La forme « a » est AMP indépendante et son activité n'est pas régulée par le taux d'AMP. La forme b de l'enzyme est au contraire AMP dépendante, l'AMP jouant le rôle d'activateur allostérique. On peut donc penser que l'augmentation de l'activité (en rouge sur la courbe) est le reflet de l'activité GP b. Dans le dosage final de l'activité GP totale (a + b), la concentration en AMP choisie est 1,6 mM. Cette valeur est aussi celle utilisée pour le dosage de l'activité GP chez la moule *M. edulis* (San Juan Serrano *et al.*, 1998).

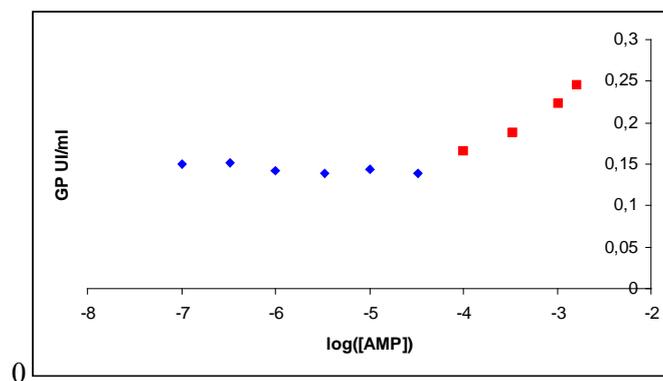


Figure 28 : Effet de l'AMP sur le dosage de l'activité GP totale. Activité GP en UI/ml en fonction du log de la concentration en AMP (Molaire) En bleu : activité non dépendante de l'AMP, en rouge : activité dépendante de l'AMP.

5 Optimisation du dosage enzymatique de la GS

5.1. Choix de la purification partielle de l'échantillon

La GS est soumise à l'influence d'effecteurs allostériques dont le plus puissant est le G6P. Il est capital de se débarrasser des inhibiteurs potentiels de l'enzyme pour pouvoir mesurer son activité réelle. Pour cela, plusieurs méthodes ont été testées. La première est une incubation sur résine échangeuse d'anions (DOWEX®1x8) qui permet d'éliminer les nucléotides phosphorylés AMP, ADP et ATP comme pour le dosage de la GP. La deuxième est une incubation sur résine AMBERLITE® XAD-16 qui permet la rétention de molécules organiques à poids moléculaires moyens. La troisième est une dialyse de l'échantillon sur colonne CENTRICON® Plus 20 (Millipore) qui permet l'élimination des petites molécules organiques et des sels. Pour comparaison, la concentration en nucléotides et la quantité d'UDP (Uridine-Di-Phosphate) formée par la GS ont été mesurées sur des extraits du même échantillon traités selon les trois méthodes.

Le **Tableau 7** donne le résultat des concentrations en AMP, ADP et ATP obtenues par chromatographie en phase liquide (HPLC) sur les 3 types d'extraits et l'extrait brut. La meilleure élimination de l'AMP est obtenue pour l'extrait préparé sur colonne CENTRICON® puisque la concentration du nucléotide passe de 0,547 mM dans l'extrait brut à 0,014 mM dans l'extrait traité (soit 97,4% d'AMP éliminé). L'ADP est éliminé sensiblement de la même façon dans les extraits préparés sur résine DOWEX® ou colonne CENTRICON® (91,7% et 89,4% d'élimination respectivement). L'ATP ne semble pas éliminé par ces types de traitements mais la concentration de départ de l'extrait brut était déjà très faible. Le traitement sur résine AMBERLITE® donne de moins bons résultats avec 80,9% d'AMP et 73% d'ADP éliminés après traitement.

Sur ces critères, les traitements DOWEX® et CENTRICON® semblent donc les plus appropriés. La méthode CENTRICON® est en revanche une méthode coûteuse, puisque chaque échantillon doit être traité individuellement sur une colonne neuve.

Tableau 7 : Concentration des nucléotides AMP, ADP et ATP mesurées par HPLC : soit pour un extrait tissulaire brut soit après 2h d'incubation sur résine DOWEX ou AMBERLITE, soit après dialyse sur Centricon Plus 20. Sont indiquées les valeurs en mM et les % d'élimination des nucléotides par les trois traitements par rapport à l'échantillon brut.

	Brut	Dowex	Amberlite	Centricon
AMP (mM)	0,547	0,018	0,105	0,014
% éliminé		96,7 %	80,9 %	97,4 %
ADP (mM)	0,032	0,003	0,009	0,003
% éliminé		91,7 %	73,0 %	89,4 %
ATP (mM)	0,002	0,004	0,003	0,005
% éliminé		0 %	0 %	0 %

Le dosage de l'activité de la GS (GS totale et GS I) a ensuite été effectué sur deux extraits d'animaux entiers préparés soit par incubation sur résine DOWEX®, soit sur résine AMBERLITE®. Le protocole du dosage est celui établi dans la partie « matériels et méthodes ». C'est un dosage en deux étapes. Dans la première étape, la GS forme de l'UDP à partir de l'UDPG (Uridine Di PhosphoGlucose). Dans la seconde, la quantité d'UDP formée est estimée. La quantité d'UDP formée est ici détectée soit par un système enzymatique qui produit du NAD⁺ de façon stœchiométrique, à partir de l'UDP et de NADH en excès (DO à 340 nm au spectrophotomètre, voir « matériels et méthodes »), soit par dosage direct de l'UDP par chromatographie en phase liquide (HPLC).

Tableau 8 : Formation de l'UDP par la GS totale (10 mM Glc-6-P) ou la GS I (0,1 mM Glc-6-P). Ech1 et Ech 2 : échantillons d'animaux entier traités sur résine DOWEX ou AMBERLITE. Les valeurs sont exprimées en μ mole /ml /min soit en UI /ml.

		Spectro UDP μ mole/ml/min		HPLC UDP μ mole/ml/min	
		GS totale	GS I	GS totale	GS I
Ech. 1	Amberlite	0,0151	0,0042	0,0127	0,0031
	Dowex	0,0024	-0,0011	-0,0045	-0,0009
Ech. 2	Amberlite	0,0419	0,0053	0,0550	0,0036
	Dowex	-0,0050	0,0020	-0,0002	0,0020

Les résultats du **Tableau 8** indiquent que pour les deux extraits préparés sur résine DOWEX®, la quantité d'UDP formée dans le dosage de l'activité GS totale ou GS I est faible voir nulle (valeurs de 0,0024 à -0,0050 UI /ml). Ces résultats sont répétables pour les deux types de détection (spectrophotomètre et HPLC). Il semble donc persister une inhibition de l'activité GS dans les extraits traités sur DOWEX®. Au contraire, la quantité d'UDP formée dans les extraits préparés sur résine AMBERLITE® est mesurable et répétable dans les deux types de détection (valeurs supérieures à 0,0127 UI /ml et 0,0031 UI /ml pour la GS totale et GS respectivement).

Par rapport à ce critère, le traitement AMBERLITE® semble donc le plus approprié pour le dosage de l'activité GS. C'est donc celui que nous avons retenu.

5.2. Effet de la concentration en substrat : UDPG

L'objectif est de déterminer une concentration non limitante de substrat UDPG dans le dosage de l'activité GS totale et GS I. Il est aussi de déterminer le Km des deux formes I et D pour l'UDPG.

Les activités GS totale et GS I ont donc été mesurées pour 5 concentrations d'UDPG allant de 0 à 20 mM dans les conditions finales de dosage (30°C, 5 mg/ml glycogène, 10 ou 0,1 mM G6P pour le dosage GS totale ou I respectivement). L'activité de la GS D est obtenue par différence d'activité GS totale moins l'activité GS I. D'après la droite de régression de Lineweaver et Burk, le Km de la GS I pour l'UDPG est de 2,74 mM et celui de la GS D est de 0,30 mM (**Figure 29**).

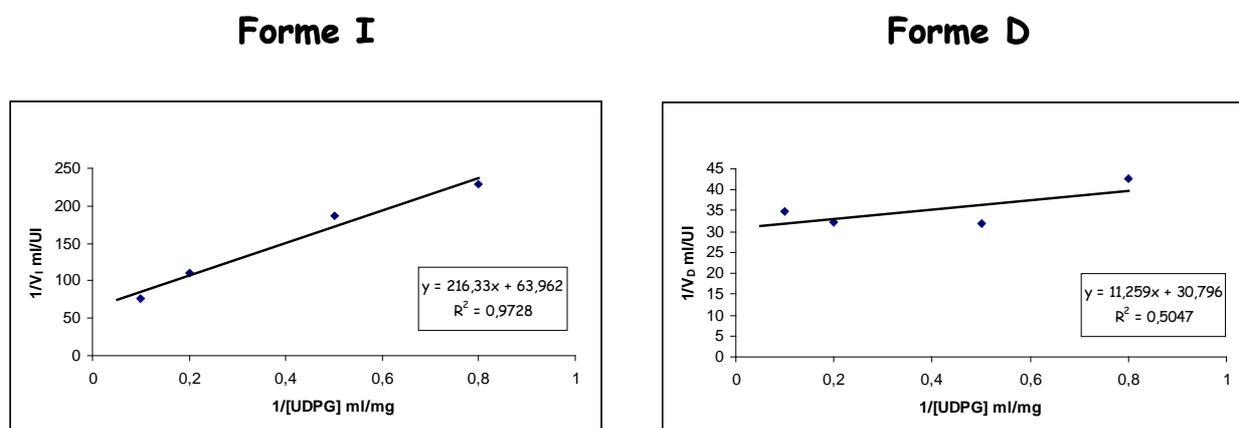


Figure 29 : Effet de la concentration en UDPG sur les activités des deux formes de la *glycogène synthase* : forme I et forme D. Les graphes sont les droites en double inverse de Lineweaver et Burk et la régression linéaire dont l'équation indiquée permet le calcul des Km de la GS I et de la GS D pour le glycogène.

La vitesse maximale de la GS I est atteinte avec une concentration finale en UDPG de 10 mM dans nos conditions de dosage. La vitesse maximale de la GS D est atteinte avec une concentration finale en UDPG plus faible qui est de 2 mM. La concentration de 10 mM d'UDPG a été choisie dans le protocole final de dosage.

5.3. Effet de la concentration en enzyme et temps d'incubation

L'objectif est de montrer la linéarité du dosage. Pour cela, le dosage de l'activité GS totale et GS I a été réalisé pour 4 dilutions du même extrait de départ (traité Amberlite). Ce dosage a été par ailleurs fait pour deux temps d'incubation à la première étape : 10 et 60 minutes (**Figure 30**). Les conditions de dosage sont les

conditions finales du dosage (30°C, 5 mg/ml glycogène, 10 ou 0,1 mM G6P pour GS totale ou I respectivement).

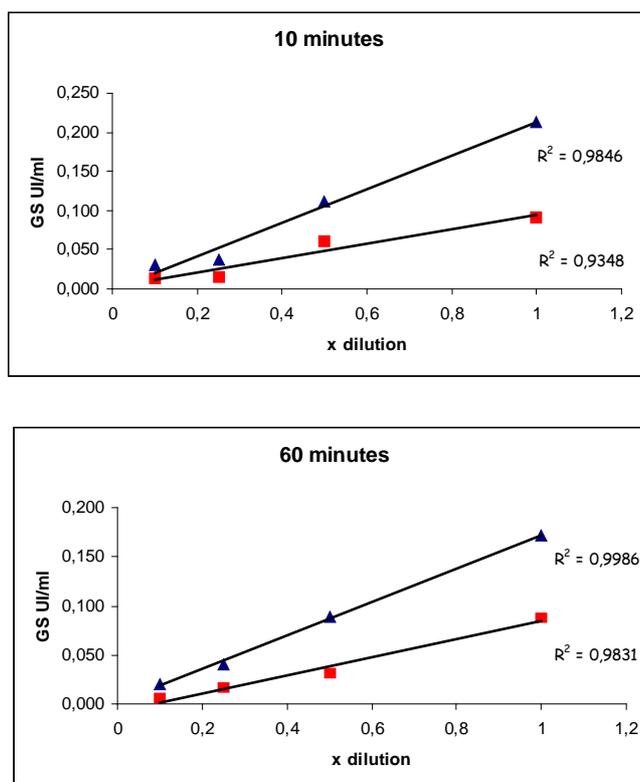


Figure 30 : Effet de la concentration en enzyme sur l'activité GS totale (triangles bleus) et l'activité GS I (carrés rouges) à 10 et 60 minutes d'incubation. R^2 = coefficient de corrélation des droites de régression.

Une bonne corrélation est obtenue pour les deux dosages que ce soit à 10 ou à 60 minutes ($R^2 > 0,93$). Cependant, la linéarité est meilleure pour la forme I à 60 minutes ($R^2 = 0,98$ au lieu de 0,93).

Par expérience, nous avons constaté que pour certains échantillons l'activité GS I est faible et non mesurable à 10 minutes d'incubation. C'est pourquoi nous sommes restés sur 60 minutes d'incubation malgré un risque de perte d'activité due à une possible dégradation de l'enzyme pendant ce temps.

6 Discussion

Caractérisation des séquences d'ADN complémentaire des enzymes clefs du métabolisme du glycogène chez l'huître

Les deux séquences complètes des ADNc de la GP (*Cg-GPH*) et de la GS (*Cg-GYS*) ont été caractérisées pour la première fois chez un mollusque marin. Leurs tailles sont respectivement de 3018 et 2408 paires de bases. Ces séquences codent respectivement une protéine de 855 et 695 acides aminés. Les séquences de la GP et de la Glycogène synthase caractérisées chez l'huître *C. gigas* montrent une forte homologie avec leur orthologues respectifs d'invertébrés et de vertébrés. Ceci suggère une bonne conservation de séquence à travers l'évolution.

Les motifs caractéristiques de la GP mammalienne (Bollen *et al.*, 1998) sont très bien conservés pour la séquence GP d'huître. En effet, le résidu sérine responsable de la phosphorylation /déphosphorylation de l'enzyme est conservé ainsi que les sites de fixation des substrats, les motifs impliqués dans le contrôle allostérique ou encore l'attachement des sous unités.

Les positions de sérines phosphorylables sont en partie conservées pour la GS d'huître. On retrouve en effet 4 positions sur les 9 et 7 positions décrites pour les formes mammaliennes du muscle et du foie respectivement (Poulter *et al.*, 1988 ; Browner *et al.*, 1989 ; Skurat et Roach, 1996). Ces sérines conservées correspondent aux 4 sites de phosphorylation de la protéine kinase GSK-3. Cette protéine kinase est impliquée dans la voie de signalisation de l'insuline et en conséquence sur le stockage du glycogène. En revanche, aucun des sites de phosphorylation des protéines kinases AMPc-dépendantes et de la protéine kinase A (PKA) ne semble conservé (sites 1a et 1b). L'absence de ces deux sites est également observées sur la séquence de GS du foie de rat (Bai *et al.*, 1990). Les protéines kinases AMPc-dépendantes et la PKA sont impliquées dans la réponse à la fixation membranaire du glucagon. Ces divergences indiquent probablement une évolution dans la régulation hormonale de la Glycogène synthase.

La caractérisation de ces séquences a permis de dessiner des amorces oligonucléotidiques spécifiques, qui sont nécessaires à la mise au point de la PCR en temps réel, pour le dosage du nombre de transcrits de la GS et de la GP.

Mise au point de la quantification absolue des ARNm par PCR en temps réel

La transcription inverse couplée à la PCR est une méthode de choix pour quantifier les transcrits de faible abondance (pour une revue voir Bustin, 2000). Les transcrits peuvent être quantifiés de façon relative à un gène de référence c'est à dire à un standard interne (*e.g.* Livak et Schmittgen, 2001). Ils peuvent aussi être quantifiés

par rapport à un standard externe, par exemple la séquence d'intérêt clonée dans un plasmide, dont la concentration est connue (e.g. Pfaffl & Hageleit, 2001 ; Pfaffl *et al*, 2002). L'utilisation de courbes standards externes telles que des dilutions d'ADN recombinants est une méthode sensible, exacte et hautement reproductible pour mesurer des quantités d'ARNm (Pfaffl & Hageleit, 2001). C'est pourquoi dans ce travail de thèse, après une première utilisation de la technique en quantification relative, l'ensemble des séquences d'intérêt a été cloné en vue de générer des courbes étalons de plasmides recombinants. L'ensemble des paramètres nécessaires à la validation de cette technique ont été évalués.

Les solutions mères de plasmides recombinants obtenues ont toutes une concentration de l'ordre de 10^{10} copies / μ l. La quantification des plasmides à 260 nm a été réalisée de façon à limiter les erreurs de détermination (2 dilutions, 5 mesures pour chacune). D'après la bibliographie, les efficacités d'amplification correctes sont obtenues, sur ce type de matrice, pour des concentrations allant de 10^2 à 10^8 copies / μ l environ (e.g. Pfaffl *et al*, 2002 ; Cai-Xia *et al*, 2006). C'est pourquoi les aliquotes ont été préparées de façon à couvrir cette gamme de concentration.

La spécificité des produits de PCR a été ensuite vérifiée à l'aide des courbes de fusion réalisées par l'appareil de PCR (Icycler, Biorad). Les températures d'hybridation des amplicons obtenus à partir d'ADN recombinants sont bien les mêmes que les températures des amplicons obtenus à partir d'ADNc. Ceci se vérifie pour les 4 RecADN comportant des fragments de séquence de GS, GP, AC et EF I.

En PCR en temps réel, la méthode actuelle pour déterminer l'efficacité d'amplification est une méthode de dilutions en série analysée en triplicats (Rasmussen, 2001). Les efficacités mesurées pour les plasmides recombinants RecADN GS, RecADN GP, RecADN AC et Rec ADN EF sont respectivement de 93 %, 98 %, 92,7 % et 98,6 %. Les coefficients de corrélation sont respectivement de 0,995, 0,995, 0,991 et 0,992 ce qui montre une excellente linéarité. Les efficacités sont considérées comme acceptables tant que supérieures à 90%. Les gammes mises au points sont donc dans les plages attendues.

En quantification absolue, l'exactitude des mesures de PCR en temps réel présume que les efficacités d'amplification des transcrits cibles sont identiques pour l'ensemble des échantillons à tester, mais aussi pour tous les standards RecADN (Souazé *et al*, 1996 ; Liu & Saint, 2002). La détermination des efficacités par la méthode des dilutions ne donne qu'une valeur globale de l'efficacité, alors que celle-ci peut varier en fonction de la concentration de départ des transcrits, donc probablement entre chaque échantillon. C'est pourquoi une méthode de calcul d'efficacité qui utilise la cinétique de fluorescence propre d'un échantillon (échantillon représenté par 15 μ l de mix réactionnel dans un puit de PCR) a été appliquée. Les données de fluorescence d'un puit sont facilement exportées du thermocycler (Wittwer *et al*, 1997) et du logiciel iCycler (Biorad). Le calcul des efficacités individuelles d'amplification de 4 transcrits a été fait pour des ADNc natifs (4 dilutions du 1/2 au 1/100^{ème}) et des ADN recombinant (4 dilutions de 10^6 à 10^3 copies / μ l). Les valeurs sont comprises entre $1,95 \pm 0,12$ (=95 \pm 6%) et $2,08 \pm 0,12$ (=108 \pm 6%). Il n'y a pas de différence entre l'efficacité mesurée pour les deux types d'ADN, quelles que soient leurs concentrations et le type de transcrit. Cette nouvelle estimation de l'efficacité des ADN recombinants montre une variabilité moindre et surtout valide la comparaison des valeurs

de Ct entre échantillons d'ADNc et standards RecADN. Elle apporte des informations jusqu'ici indisponibles avec la méthode des gammes de dilutions.

Nous avons donc mis au point pour la première fois, une méthode fiable de quantification des transcrits de la GS et de la GP chez l'huître. Cette méthode permet une mesure précise de la quantité d'ARNm. Cet outils est ensuite utilisé dans une partie des travaux reportés dans ce manuscrit.

Optimisation dosage enzymatique de la Glycogène phosphorylase

L'objectif est d'optimiser un protocole de dosage de l'activité des deux formes de la GP *a* et GP *b*. Les extraits enzymatiques sont préparés de façon à bloquer les enzymes d'intérêt dans leur état de phosphorylation initial (*in-vivo*). Ils sont ensuite traités sur une résine (Dowex) échangeuse d'anions afin d'éliminer les nucléotides adényliques (effecteurs allostériques de la GP). La mise au point a été faite sur la base des travaux précédemment publiés chez d'autres espèces (Childress & Sacktor, 1970 ; San Juan Serrano 1991, 1993, 1995a et b, 1998a et b). Pour mesurer distinctement l'activité de la GP *a* ou de la GP *b*, le dosage est effectué soit en présence d'AMP (GP totale), soit sans AMP (GP *a*). L'activité de la GP *b* est obtenue par différence de l'activité GP totale moins l'activité de la GP *a*.

Le dosage de l'activité GP est réalisé grâce à deux réactions enzymatiques couplées et catalysées par les enzymes G6PDH et PGM. Ces réactions doivent être le plus rapide possible pour que le dosage de l'activité GP ne soit pas limité par leurs vitesses. Les concentrations optimisées sont 0,5 UI /ml et 0,5 UI /ml de G6PDH et PGM dans le milieu réactionnel final. Pour que la quantité des substrats glycogène et Pi ne limitent pas la vitesse de réaction de la GP, les concentrations finales de 2 mg /ml pour le glycogène et 80 mM pour le Pi ont été choisies. A ces concentrations, les vitesses de réaction de la GP *a* et de la GP *b* sont maximales. La concentration d'AMP a utiliser dans le dosage de l'activité GP totale pour que la vitesse de réaction de la GP *b* soit maximale a été fixée à 6400 μ M. Par ailleurs, la constante de Michaelis (K_m) pour le glycogène est de 0,78 mg /ml pour la GP *a* et 1,03 mg /ml pour la GP *b*. Ces valeurs sont similaires à celles déterminées en 1993 par Hata *et al.* ($K_m = 0,61$ et 1 mg /ml pour GP *a* et GP *b* respectivement). La constante de Michaelis est inversement représentative de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. La GP *b* montre donc une affinité moindre pour le glycogène mais la différence n'est pas très importante. Les valeurs trouvées chez la moule sont en revanche beaucoup plus contrastées ($K_m = 0,05$ pour la GP *a* et 0,36 mg /ml pour la GP *b*) (San Juan Serrano *et al.*, 1995b). Il semble aussi que la GP d'huître présente une moindre affinité pour son substrat le glycogène que son orthologue chez la moule (K_m 12 fois plus élevé).

L'ensemble de ces résultats de mise au point font du protocole établi une méthode de dosage fiable de l'activité GP. Dans les chapitres suivants, l'activité GP est exprimée sous forme d'activité spécifique (UI /mg protéine).

Optimisation du dosage enzymatique de la glycogène synthase

Comme précédemment, l'objectif était ici de mettre au point un protocole de dosage de l'activité des deux formes de la GS *I* et *D*. Les extraits enzymatiques, préparés dans le même tampon que pour le dosage de l'activité GP, bloquent l'enzyme dans son état de phosphorylation initial (*in vivo*). La mise au point a été réalisée sur la base des travaux précédemment réalisés par Gabbott & Whittle (1986) et Passoneau & Rottenberg (1973). Pour mesurer distinctement l'activité des formes GS *I* et GS *D*, le milieu réactionnel contient soit du G6P en forte concentration (activité GS totale : GS *I* + GS *D*) soit très peu de G6P (activité GS *I*). L'activité GS *D* est obtenue par différence de l'activité GS totale et de l'activité GS *I*. Les dosages sont réalisés en deux étapes. La première réaction catalysée par la GS produit de l'UDP. La deuxième étape consiste à doser l'UDP formé par un système d'enzymes couplées : PK et LDH.

Le traitement des extraits tissulaires sur résine échangeuse d'anions (Dowex) n'a pas permis d'obtenir un dosage satisfaisant de l'activité GS. Il a donc fallu chercher une autre méthode de traitement. Sur les trois techniques testées : incubation sur résine Dowex, résine Amberlite ou dialyse sur colonne Centricon Plus 20, le traitement sur résine Amberlite fut retenu. En effet, bien que moins efficace que les deux autres techniques pour l'élimination des acides nucléiques, elle permet de réaliser la première étape du dosage (production d'UDP par la GS) de façon linéaire et reproductible.

Pour que la concentration en substrats glycogène et UDPG ne limite pas la vitesse de réaction pendant le dosage de l'activité GS, les concentrations à utiliser ont été déterminées à 5 mg /ml de glycogène et 10 mM d'UDPG. A ces concentrations, la vitesse des enzymes GS *I* et GS *D* est maximale.

La constante de Michaelis (K_m) de la GS *I* pour l'UDPG est de 2,74 mM et celui de la GS *D* est de 0,30 mM. Ces résultats sont très proches de ceux trouvés chez la moule *M. edulis* (Cook & Gabbott, 1978) où les K_m des GS du manteau pour l'UDPG sont de 2,8 mM et 0,30 mM pour GS *I* et GS *D* respectivement. Ils sont en revanche légèrement inférieurs à ceux de l'huître américaine (0,86 et 7,09 mM pour GS *I* et GS *D* respectivement).

La linéarité du dosage a été vérifiée et le temps d'incubation de 60 minutes a été choisi pour assurer une bonne reproductibilité du dosage de l'activité GS *I*.

7 Conclusion

Dans cette partie du travail, des outils moléculaires ont été caractérisés et des techniques d'analyses ont été optimisées pour l'huître.

D'une part, les séquences d'ADN complémentaires aux ARNm des gènes de la GP (*Cg-GPH*) et de la GS (*Cg-GYS*) ont été entièrement caractérisées (Bacca *et al*, 2005). Ces séquences montrent d'importantes similitudes avec celles décrites chez les vertébrés. L'obtention de ces séquences a permis le dessin d'amorces oligonucléotidiques spécifiques, utilisées en PCR en temps réel. La technique de mesure de la quantité des ARNm par PCR en temps réel a donc été mise au point pour les ARNm d'huître *Cg-GPH* et *Cg-GPH*. La quantification « absolue » a été choisie, avec la réalisation de gammes standards d'ADN recombinant. L'efficacité des réactions d'amplification des standards et des échantillons biologiques a été contrôlée et validée.

Les dosages d'activités GP et GS ont été optimisés pour l'huître à partir de données de la bibliographie. Ces dosages permettent de déterminer l'activité des formes phosphorylée /déphosphorylée de la GP (GP *a* et GP *b*) et de la GS (GS *D* et GS *I*).

Ces outils moléculaires et ces techniques de mesures ont été conçus pour mener à bien l'étude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *C. gigas*.

**PARTIE 2 : Premiers travaux sur les
variations annuelles du métabolisme du
glycogène**

1 Introduction

Les bivalves marins contiennent une grande quantité de glycogène et celui-ci montre d'importantes variations saisonnières corrélées au cycle annuel de reproduction (Gabbott, 1975 ; Bayne *et al.*, 1976, 1982 ; Mathieu & Lubet, 1993 ; Berthelin *et al.*, 2000b). Chez *C. gigas* le glycogène est principalement stocké dans les palpes labiaux et la région gonade-manteau (Berthelin, 2000). Les cellules de stockage du glycogène (cellules vésiculeuses) contenues dans ces deux tissus présentent les mêmes traits morphologiques et les mêmes variations saisonnières en terme de glycogène (Berthelin *et al.*, 2000a).

Chez l'huître creuse *C. gigas*, le glycogène est la principale source d'énergie allouée à la gamétogenèse et à la maturation (L-Fando *et al.*, 1972 ; Bayne *et al.*, 1982 ; Ruiz *et al.*, 1992a ; Mathieu & Lubet, 1993). Le cycle des réserves en glycogène de *C. gigas* comprend trois étapes : la première est l'utilisation des réserves en hiver et au printemps (fournit l'énergie pendant les différents stades de la gamétogenèse). Elles atteignent ensuite un minimum en été (période de reproduction et de ponte). Enfin, en automne, le métabolisme (re)basculer vers l'accumulation des réserves en glycogène (croissance somatique et régression des tubules gonadiques) (Berthelin, 2000).

Les enzymes GP et GS contrôlent respectivement les voies de dégradation et de synthèse du glycogène. Chez les mammifères, la régulation enzymatique de la GP et de la GS est un système réciproque de phosphorylation /déphosphorylation en cascade (Cohen, 1983, 1978 ; Voet *et al.*, 1999 ; Roach, 2002) auquel vient s'ajouter des régulations allostériques selon les tissus (voir partie bibliographique). Ces événements peuvent être déclenchés par la fixation d'hormones à leurs récepteurs membranaires (insuline, glucagon) ou par modifications des concentrations en métabolites comme le glycogène, le glucose et le G6P ou les acides nucléiques adényliques (ATP, AMP). Chez les vertébrés, l'AMP est l'activateur de la GP *b* (AMP dépendante). Les principaux inhibiteurs sont le glucose (conversion de GP *a* en GP *b*) et le G6P (inhibiteur allostérique de la GP *b*). L'activateur principal de la GS est le glucose (déphosphorylation de la GS) et le G6P (activateur allostérique de la GS *b* et activation par translocation de la GS *a* et *b*). La biosynthèse des enzymes du métabolisme du glycogène peut aussi être régulée de façon transcriptionnelle (Reynet *et al.*, 1996 ; Matthews *et al.*, 1998 ; Sparks *et al.*, 2006 ;) ou post-transcriptionnelle. Ces régulations semblent toutefois être de moindre importance par rapport aux régulations enzymatiques.

Chez les mollusques, les propriétés enzymatiques de la GP et de la GS ainsi que leurs variations saisonnières ont été étudiées chez les moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (e.g. Gabbott & Whittle, 1986 ; Whittle & Gabbott, 1986, San Juan Serrano *et al.*, 1991, 1995a et b, 1998a, b et c) et chez trois espèces d'huîtres : *O. edulis* (L-Fando *et al.*, 1972), *C. virginica* (Swift *et al.*, 1988) et *C. gigas* (Hata *et al.*, 1993). Chez *M. galloprovincialis*, la GP est finement régulée par la CEA et les nucléotides adényliques. L'activité catalytique de la GP *b*, forme dominante dans le manteau, est inversement proportionnelle à la CEA. L'ATP et l'ADP peuvent agir comme des activateurs de la GP *b* lorsque la concentration en AMP est faible (San Juan Serrano *et al.*, 1998b). L'AMP est un activateur de la GP *b* chez la moule et l'huître (San Juan Serrano *et al.*, 1991 ; Hata *et al.*, 1993). Mais chez la moule, contrairement aux autres organismes, une forte concentration

d'AMP inhibe la GP *b* (San Juan Serrano *et al.*, 1998b). Par ailleurs, le G6P agirait en synergie avec les nucléotides adényliques pour inhiber la GP *b* (San Juan Serrano *et al.*, 1998a). Pour la GS, moins étudiées chez les mollusques bivalves, les propriétés catalytiques semblent être en accord avec celles trouvés chez les vertébrés. Le G6P est l'activateur allostérique de la GS *D* (moins active et G6P dépendante) chez la moule (Gabbott & Whittle, 1986).

La biosynthèse des enzymes GS et GP n'a pas été étudiée chez les mollusques bivalves. Pourtant, chez *C. gigas*, il existe un véritable contrôle à long terme du stockage /déstockage du glycogène qui n'exclut pas la possibilité d'un contrôle transcriptionnel ou post-transcriptionnel de ces enzymes. Chez la grenouille, *Rana esculenta*, le contrôle annuel de la synthèse et de la dégradation du glycogène serait contrôlé à la fois par des mécanismes relatifs aux changements de la quantité d'enzymes et par des mécanismes enzymatiques (Scapin & Giuseppe, 1994).

Dans cette partie, nous nous intéressons donc aux variations du métabolisme du glycogène de *C. gigas* à l'échelle de la saison. Quel(s) type(s) de régulation(s) peut expliquer les variations du taux de glycogène annuel ? Existe-t-il un contrôle transcriptionnel de la biosynthèse des enzymes GS et GP chez l'huître ?

Les résultats des premiers travaux sur l'étude des variations saisonnières du métabolisme du glycogène de *C. gigas* sont reportés. Pour approfondir la compréhension de ce métabolisme, les taux de glycogène, de glucose, la concentration en nucléotides adényliques (ATP, ADP et AMP), la quantité de transcrits de la GP (*Cg-GPH*) et de la GS (*Cg-GYS*) mais aussi les activités enzymatiques GP et GS ont été étudiées sur un cycle entier de reproduction pour des huîtres élevées en milieu contrôlé, où le régime en microalgues était constant.

2 Variations annuelles des paramètres biochimiques

Les animaux utilisés pour réaliser cette étude sont issus de la manipulation expérimentale GIGAREPRO 1, décrite dans la partie « Matériel et Méthodes ». Le niveau trophique est fixe (8% poids sec algues / poids sec huître). Seules la photopériode et la température varient en fonction du temps d'après les valeurs moyennes du bassin de Marennes Oléron (Charente Maritime, France). La mesure des paramètres biochimiques a été faite chaque mois de Mars 2002 à Février 2003 à partir de 3 pools de 5 huîtres entières. La mesure des quantités d'ARNm a été réalisée sur des échantillons individuels de palpes et de région gonade manteau pour 15 huîtres issues du même conditionnement.

2.1. Variations du taux de glycogène et du taux de glucose libre

De mars 2002 à février 2003, le taux de glycogène (**Figure 31**) montre des variations significatives ($F = 11.94$, $p < 0.001$). Deux orientations saisonnières sont observées correspondant à une diminution du glycogène dans les huîtres d'avril (29.12 ± 2.83 mg /g chair) à juillet ($6,10 \pm 0,73$ mg /g chair) puis à une accumulation du glycogène de juillet à février (34.65 ± 5.89 mg /g chair).

Le taux de glucose libre (**Figure 31**) montre une variation significative de mars 2002 à février 2003 ($F = 5,73$, $p < 0,001$). Tout comme le glycogène, il diminue du mois d'avril ($8,81 \pm 1,31$ mg /g chair) au mois de juillet où il atteint son minimum. Il remonte ensuite du mois de juillet au mois d'octobre où il atteint des valeurs similaires à celles d'avril (9.05 ± 1.34 mg /g chair). Entre octobre et février, le taux de glucose reste constant.

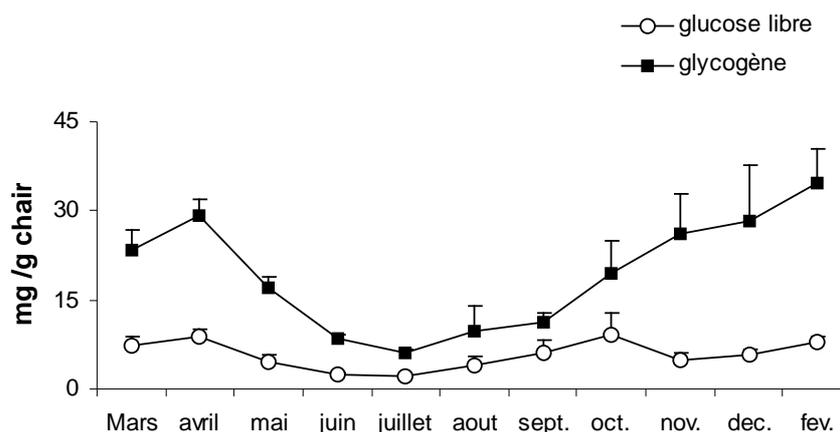


Figure 31 : Variations saisonnières du taux de glycogène et du taux de glucose libre de mars 2002 à février 2003 pour des huîtres élevées en conditions contrôlées, pendant un cycle moyen de température (similaire à Marennes-Oléron, Charente-Maritime). (n = 3, moyenne \pm ET).

2.2. Variations des taux d'ATP, ADP et AMP

Les nucléotides adényliques (ATP, ADP et AMP) ont été mesurés selon la méthode de Moal *et al.* (1989) pour les huîtres issues du conditionnement expérimental de mars 2002 à février 2003 (Delaporte, 2006).

La **Figure 32A** indique les concentrations en ATP de mars 2002 à février 2003. La teneur en ATP montre des variations significative ($F = 8,76$, $p < 0,001$). Elle est élevée de mars à mai et chute fortement de mai ($6,03 \pm 0,85$ mg /g poids sec) à juillet où elle atteint son minimum ($2,05 \pm 0,28$ mg /g poids sec). La concentration en ATP remonte ensuite progressivement de juillet à février ($5,97 \pm 1,87$ mg / g poids sec).

La concentration en ADP (**Figure 32B**) montre des variations significatives entre mars 2002 et février 2003 ($F = 3,77$, $p < 0,001$). De mars à mai, la teneur en ADP est constante et tourne autour de 3 mg /g poids sec. Elle augmente progressivement de mai ($2,92 \pm 0,38$ mg /g poids sec) à septembre ($5,25 \pm 0,97$ mg /g poids sec) puis se stabilise jusqu'à février ($3,35 \pm 0,70$ mg /g poids sec).

La concentration en AMP (**Figure 32C**) montre des variations significatives entre mars 2002 et février 2003 ($F = 9,20$, $p < 0 ;001$). La teneur en AMP est constante de mars à mai et tourne autour de 1,5 mg /g poids sec. Elle augmente fortement de mai ($1,28 \pm 0,25$ mg /g poids sec) à août ($3,33 \pm 0,78$ mg /g poids sec). Puis diminue du mois d'août jusqu'en février ($1,08 \pm 0,19$ mg /g poids sec).

Partie 2 : Variations annuelles du métabolisme du glycogène

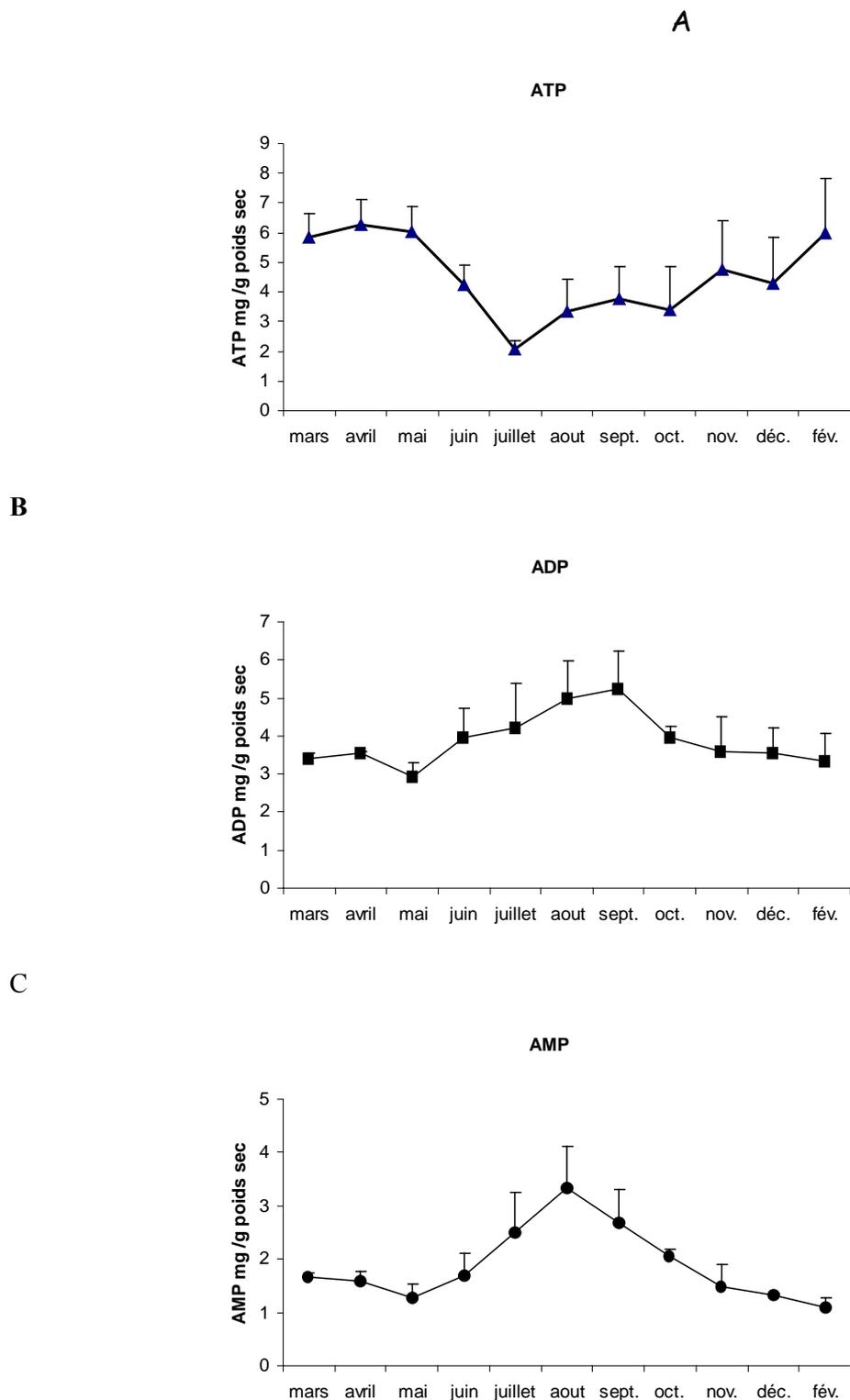


Figure 32 : Variations des concentrations en acides nucléiques adényliques de mars 2002 à février 2003 pour des huîtres élevées en conditions contrôlées, pendant un cycle moyen de température (similaire à Marennes-Oléron, Charente-Maritime). A : concentration en ATP en mg /g poids sec. B : concentration en ADP en mg /g poids sec. C : concentration en AMP en mg /g poids sec. D'après Delaporte et al. (2006). (n = 3, moyenne \pm ET).

3 Variations annuelles des ARNm Cg-GPH et Cg-GYS

Les résultats sont extraits d'une publication (Bacca *et al.*, 2005) jointe en annexe. Les données de PCR en temps réel sont exprimées en quantités relatives par rapport au Facteur d'Elongation I.

3.1. Quantité relative d'ARNm Cg-GPH

De mars 2002 à février 2003 (**Figure 33**), le niveau de transcrits de la GP (*Cg-GPH*) montre des variations saisonnières significatives dans les palpes labiaux comme dans la région gonade-manteau (**tableau 9**).

Dans les palpes, la quantité relative d'ARNm *Cg-GPH* montre un pic au mois de mai ($R_{Cg-GPH} = 3,13 \pm 0,43$). Elle reste ensuite faible et constante d'avril à février (**Tableau 9**). Dans la région gonade-manteau, la quantité relative d'ARNm *Cg-GPH* est légèrement plus élevée au mois de mars ($R_{Cg-GPH} = 1,07 \pm 0,35$) qu'aux autres mois (**Tableau 9**).

Les variations temporelles de la quantité de transcrits *Cg-GPH* sont différentes entre les deux tissus analysés ($t = -2,99$, $p < 0,05$). Ceci est la conséquence d'une forte différence d'ARNm *Cg-GPH* entre les deux tissus au mois de mai ($t = 5,76$, $p < 0,001$).

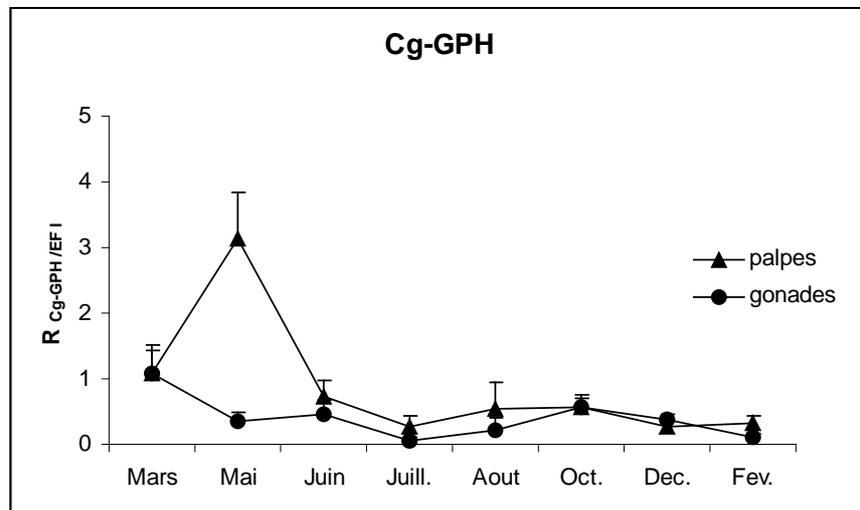


Figure 33 : Quantité relative de transcrits de la GP (R_{Cg-GPH}) dans les palpes (triangles noirs) et la région gonade-manteau (ronds noirs) ($n=15$, moyenne \pm ET) pour des huîtres élevées en conditions contrôlées, pendant un cycle moyen de température (similaire à Marennes-Oléron, Charente-Maritime).

Tableau 9 : Comparaison statistique des quantités relatives des transcrits de la GS (R_{Cg-GYS}) et de la GP (R_{Cg-GPH}) mesurées dans les palpes labiaux et la région gonade manteau d'huîtres élevées en conditions contrôlées (n=15, moyennes \pm ET). K = statistique de Kruskal Wallis. P = probabilité. * indique les différences significatives. Les lettres indiquent les groupes homogènes déterminés par la méthode des box-plots.

	R_{Cg-GPH} palpes	R_{Cg-GYS} palpes	R_{Cg-GPH} gonade	R_{Cg-GYS} gonade
Mars	1.08 \pm 0.43 (B)	0.10 \pm 0.04 (A)	1.07 \pm 0.35 (A)	0.09 \pm 0.06 (A)
Mai	3.13 \pm 0.43 (A)	0.07 \pm 0.04 (AB)	0.36 \pm 0.14 (C)	0.02 \pm 0.01 (BC)
Juin	0.72 \pm 0.26 (B)	0.02 \pm 0.01 (CD)	0.46 \pm 0.21 (BC)	0.03 \pm 0.01 (BC)
Juillet	0.28 \pm 0.16 (C)	0.01 \pm 0.001 (E)	0.05 \pm 0.04 (D)	0.002 \pm 0.001 (E)
Aout	0.54 \pm 0.40 (BC)	0.03 \pm 0.02 (BC)	0.21 \pm 0.20 (CD)	0.01 \pm 0.01 (CDE)
Octobre	0.58 \pm 0.19 (BC)	0.11 \pm 0.05 (A)	0.57 \pm 0.14 (B)	0.14 \pm 0.09 (A)
Décembre	0.28 \pm 0.09 (C)	0.04 \pm 0.02 (BCD)	0.37 \pm 0.09 (BC)	0.02 \pm 0.03 (CD)
Février	0.32 \pm 0.11 (BC)	0.01 \pm 0.002 (DE)	0.11 \pm 0.04 (D)	0.004 \pm 0.002 (DE)
K	36.1	36.4	45	40.5
P	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*

3.2. Quantité relative d'ARNm *Cg-GYS*

Pendant la période d'expérimentation de mars 2002 à février 2003 (**Figure 34**), le niveau de transcrits du gène de la GS (*Cg-GYS*) montre des variations saisonnières significatives dans les palpes labiaux et la région gonade-manteau (**tableau 9**).

Dans les palpes labiaux, la quantité relative d'ARNm *Cg-GYS* diminue progressivement du mois de mars ($R_{Cg-GYS} = 0,10 \pm 0,04$) au mois de juillet ($R_{Cg-GYS} = 0,01 \pm 0,001$). Elle augmente ensuite jusqu'à un maximum en octobre ($R_{Cg-GYS} = 0,11 \pm 0,05$). Entre octobre et février, la quantité d'ARNm *Cg-GYS* retombe à des valeurs faibles (**Tableau 9**).

La quantité relative d'ARNm de la région gonade-manteau montre des variations similaires à celle des palpes labiaux. Elle diminue de mars ($R_{Cg-GYS} = 0,09 \pm 0,06$) à juillet ($R_{Cg-GYS} = 0,002 \pm 0,001$) puis augmente entre juillet et octobre ($R_{Cg-GYS} = 0,14 \pm 0,09$) pour retomber à des valeurs faibles jusqu'en février (**Tableau 9**).

Les variations de la quantité de transcrits *Cg-GYS* entre les deux tissus analysés ne sont pas différentes significativement ($t = -1,23$, $p = 0,22$).

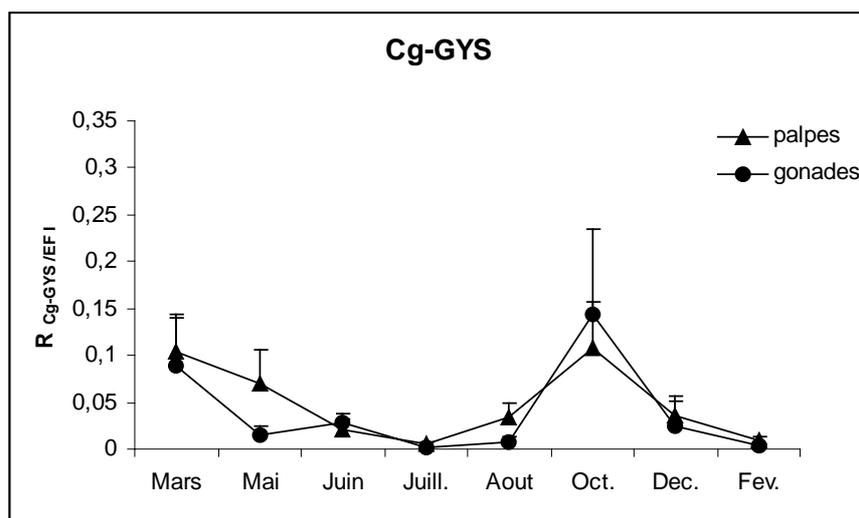


Figure 34 : Quantité relative de transcrits de la GS (R_{Cg-GYS}) dans les palpes (barres noires) et la région gonade-manteau (barres blanches) ($n=15$, moyenne \pm ET) pour des huîtres élevées en conditions contrôlées, pendant un cycle moyen de température (similaire à Marennes-Oléron, Charente-Maritime).

4 Variations annuelles des activités de la GP et de la GS

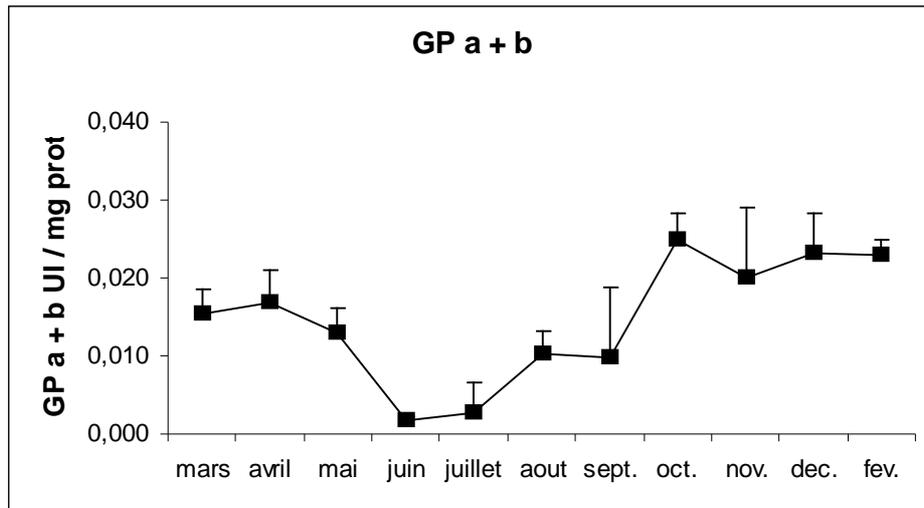
4.1. Activité de la GP

Pendant le conditionnement expérimental de mars 2002 à février 2003, l'activité spécifique GP totale GP_{a+b} (**Figure 35A**) montre des variations significatives (**Tableau 10A**). L'activité de dégradation du glycogène est élevée de mars à mai et chute fortement entre mai ($0,013 \pm 0,003$ UI /mg protéines) et juin ($0,003 \pm 0,001$ UI /mg protéines). Elle remonte progressivement de juin à octobre où elle atteint une valeur supérieure à mars ($0,025 \pm 0,003$ UI /mg protéines). L'activité GP totale reste forte et constante entre octobre et février (**Tableau 10A**).

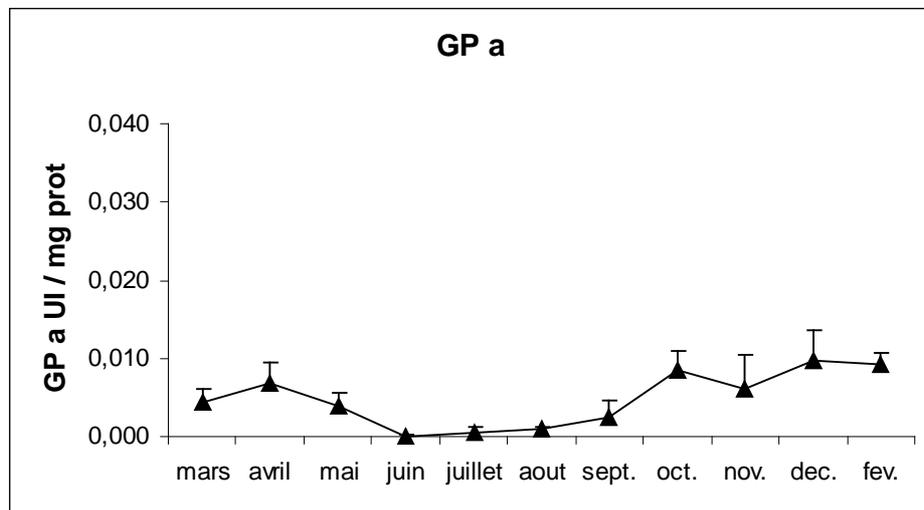
L'activité spécifique de la forme a (**Figure 35B**) varie significativement entre mars 2002 et février 2003 (**Tableau 10A**).

L'activité spécifique de la forme b (**Figure 35C**) varie significativement entre mars 2002 et février 2003 (**Tableau 10A**). Pour l'ensemble des mois analysés, l'activité GP b est supérieure à l'activité GP a ($F = 2,7$, $p < 0,05$).

A



B



C

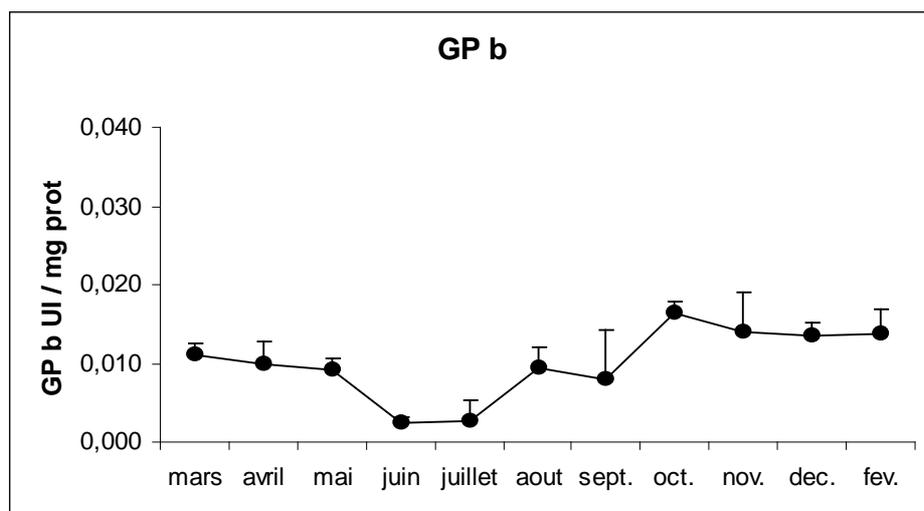


Figure 35 : Activités spécifiques GP a+b (A), GP a (B) et GP b (C) pour des huîtres élevées en milieu contrôlé, pendant un cycle moyen de température (similaire à Marennes-Oléron, France) (n=3, moyenne ± ET).

Tableau 10 : Comparaisons statistiques des activités spécifiques de la GP (a+b, a et b) et de la GS (I+D, I et D) pour des huîtres élevées en milieu contrôlé, similaire à Marennes Oléron (n=3, moyenne \pm ET). F = statistique de comparaison des variances. P = probabilité. * indique les différences significatives. Les lettres indiquent les groupes homogènes déterminés par le test LSD-Bonferroni.

A

	GP a+b	GP a	GP b
Mars	0.015 \pm 0.003 (BCD)	0.004 \pm 0.002 (BCDE)	0.011 \pm 0.002 (ABC)
Avril	0.017 \pm 0.004 (ABCD)	0.007 \pm 0.003 (ABC)	0.010 \pm 0.003 (BC)
Mai	0.013 \pm 0.003 (CD)	0.004 \pm 0.002 (CDEF)	0.009 \pm 0.001 (BC)
Juin	0.002 \pm 0.001 (F)	0.000 \pm 0.000 (F)	0.002 \pm 0.001 (E)
Juillet	0.003 \pm 0.004 (EF)	0.000 \pm 0.001 (EF)	0.003 \pm 0.003 (DE)
Août	0.010 \pm 0.003 (DE)	0.001 \pm 0.000 (EF)	0.009 \pm 0.003 (BC)
Septembre	0.010 \pm 0.009 (DEF)	0.002 \pm 0.002 (DEF)	0.008 \pm 0.006 (CD)
Octobre	0.025 \pm 0.003 (A)	0.008 \pm 0.002 (AB)	0.016 \pm 0.001 (A)
Novembre	0.020 \pm 0.009 (ABC)	0.006 \pm 0.004 (ABCD)	0.014 \pm 0.005 (AB)
Décembre	0.023 \pm 0.005 (AB)	0.010 \pm 0.004 (A)	0.014 \pm 0.002 (ABC)
Février	0.023 \pm 0.002 (AB)	0.009 \pm 0.001 (A)	0.014 \pm 0.003 (AB)
F	7.9	6.23	5.53
P	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*

B

	GS I+D	GS I	GS D
Mars	0.013 \pm 0.002 (CDE)	0.004 \pm 0.004	0.009 \pm 0.002 (CD)
Avril	0.017 \pm 0.007 (BCD)	0.010 \pm 0.008	0.007 \pm 0.001 (CDE)
Mai	0.015 \pm 0.006 (BCDE)	0.008 \pm 0.001	0.007 \pm 0.003 (CDE)
Juin	0.007 \pm 0.004 (E)	0.003 \pm 0.001	0.004 \pm 0.003 (DE)
Juillet	0.005 \pm 0.004 (E)	0.005 \pm 0.002	0.002 \pm 0.002 (E)
Août	0.011 \pm 0.002 (CDE)	0.005 \pm 0.002	0.006 \pm 0.002 (CDE)
Septembre	0.036 \pm 0.007 (A)	0.009 \pm 0.007	0.027 \pm 0.000 (A)
Octobre	0.019 \pm 0.009 (BCD)	0.012 \pm 0.010	0.008 \pm 0.002 (CD)
Novembre	0.022 \pm 0.004 (BC)	0.003 \pm 0.001	0.019 \pm 0.005 (B)
Décembre	0.015 \pm 0.003 (BCDE)	0.008 \pm 0.006	0.007 \pm 0.003 (CDE)
Février	0.023 \pm 0.008 (B)	0.014 \pm 0.011	0.009 \pm 0.004 (C)
F	5.48	1.01	13.38
P	< 0.001*	0.47	< 0.001*

4.2. Activité de la GS

L'activité spécifique de la GS totale (GS I+D) (**Figure 36A**) varie significativement entre mars 2002 et février 2003 (**Tableau 10A**). L'activité de synthèse du glycogène est élevée de mars à avril et chute progressivement entre avril (0,017 \pm 0,007) et juillet (0,005 \pm 0,004 UI /mg protéines). Elle remonte rapidement entre juillet et septembre où elle atteint son maximum (0,036 \pm 0,007 UI /mg protéines). L'activité GS totale retourne à ses valeurs du printemps dès le mois d'octobre, elle reste assez élevée et constante d'octobre à février (**Tableau 10B**).

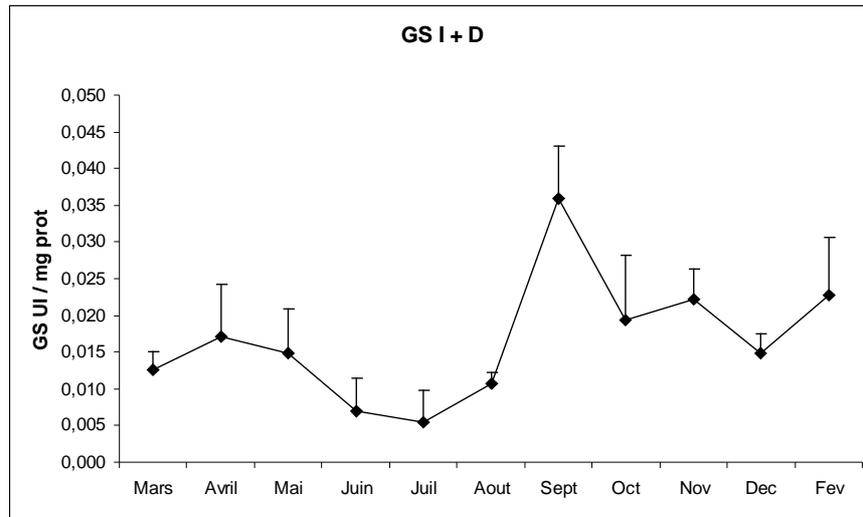
L'activité spécifique de la forme GS I (**Figure 36B**) ne montre aucune variation significative entre mars 2002 et février 2003 (**Tableau 10B**).

L'activité spécifique de la GS D (**Figure 36C**) montre des variations significatives entre mars 2002 et février 2003 (**Tableau 10B**). Elle diminue très progressivement de mars (0,009 \pm 0,002 UI /mg protéines) à

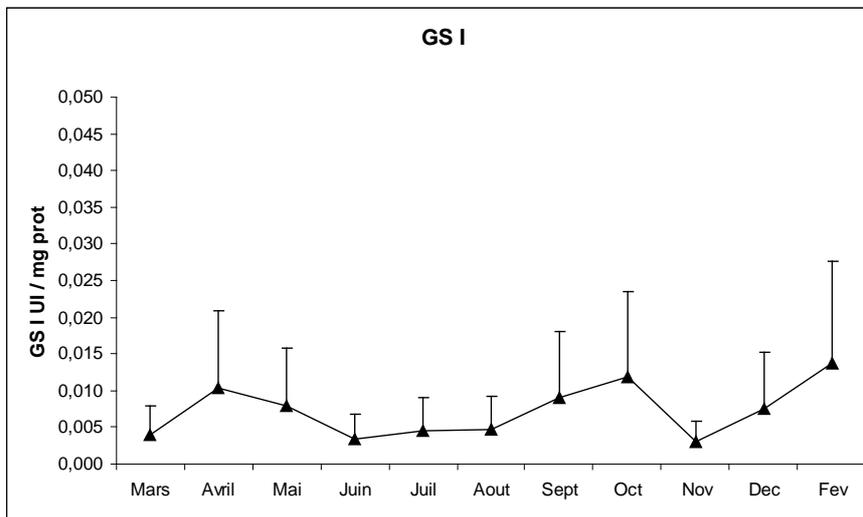
Partie 2 : Variations annuelles du métabolisme du glycogène

juillet ($0,002 \pm 0,002$ UI /mg protéines). Elle progresse ensuite fortement jusqu'à son maximum en septembre ($0,027 \pm 0,0001$ UI /mg protéines). Le profil automnal de l'activité GS *D* est irrégulier : l'activité GS *D* diminue entre septembre et octobre puis progresse aux mois de novembre pour chuter jusqu'en février (**Tableau 10B**).

A



B



C

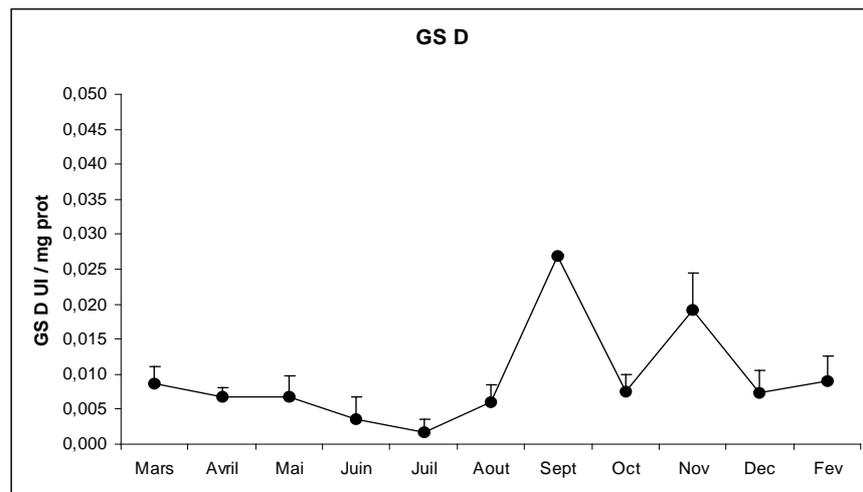


Figure 36 : Activités spécifiques GS *I+D* (A), GS *I* (B) et GS *D* (C) pour des huîtres élevées en milieu contrôlé, pendant un cycle moyen de température (similaire à Marennes-Oléron, France) (n=3, moyenne \pm ET).

5 *Corrélations*

Le **Tableau 11** indique les coefficients de corrélations calculés entre chaque paramètre mesuré dans cette expérimentation et qui sont significatifs au seuil de 5%.

Le taux de glycogène et le taux de glucose libre dans l'animal entier montrent une corrélation positive (Corrélation = 0,5). Ces deux taux sont également positivement corrélés avec le taux d'ATP (corrélation = 0,65 et 0,41 respectivement). Seul le taux de glycogène est négativement corrélé à l'AMP (corrélation = -0,64). Il existe une relation négative entre l'ATP et l'AMP (corrélation = -0,46) et une relation positive forte entre l'ADP et l'AMP (corrélation = 0,86).

Les activités enzymatiques de la GP totale et de la GP *a* (active) sont positivement corrélées au taux de glycogène (corrélation = 0,78 et 0,82 respectivement) et de façon moindre au taux de glucose (corrélation = 0,67). Il existe une corrélation négative entre les activités GP totale, GP *a* et l'AMP (corrélation = -0,34 et -0,43 respectivement) mais pas entre l'activité GP *b* et l'AMP. Les activités GP *a* et GP *b* sont corrélées à l'activité GP totale (corrélation = 0,91 et 0,96 respectivement).

Les activités de la GS totale et GS *I* (G6P indépendante, plus active) sont positivement corrélées au taux de glucose libre (corrélation = 0,48 et 0,46 respectivement), mais aussi au taux de glycogène (GS totale : corrélation = 0,38). La corrélation est positive entre l'ATP et l'activité GS *I* (corrélation = 0,39). L'activité GS *D* est positivement corrélée à la GS totale (corrélation = 0,73) mais pas à la GS *I*.

L'activité GP totale n'est pas anti-corrélée à l'activité GS totale, elles montrent même une corrélation positive (corrélation = 0,40).

Il semble exister une relation négative entre la quantité d'ARNm *Cg-GPH* des palpes labiaux et la concentration d'ADP (corrélation = 0,41). Une corrélation positive est montrée entre la quantité d'ARNm *Cg-GYS* et le taux de glucose libre (corrélation = 0,64).

Tableau 11 : Tableau des corrélations entre les différents paramètres biochimiques et moléculaires mesurés pour des huîtres élevées en conditions contrôlées, pendant un cycle moyen de température (similaire à Marennes-Oléron, Charente-Maritime). Comparaison sur l'ensemble des mois analysés par régression linéaire. Coefficient de corrélation donné pour $p < 0,05$.

	glucose	glycogène	ATP	ADP	AMP	GP totale	GS totale	GP a	GS I	GP b	GS D	Cg-GPH	Cg-GYS
glucose		0,50	0,41	NS	NS	0,67	0,48	0,66	0,46	0,62	NS	NS	0,64
glycogène			0,65	NS	-0,54	0,78	0,38	0,82	NS	0,66	NS	NS	NS
ATP				NS	-0,46	NS	NS	NS	0,36	NS	NS	NS	NS
ADP					0,86	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0,42	NS
AMP						-0,34	NS	-0,43	NS	NS	NS	NS	NS
GP totale							0,4	0,91	NS	0,96	NS	NS	NS
GS totale								0,39	0,65	0,38	0,73	NS	NS
GP a									0,44	0,76	NS	NS	NS
GS I										NS	NS	NS	NS
GP b											NS	NS	0,46
GS D												NS	NS
Cg-GPH													0,41
Cg-GYS													

6 Discussion

6.1.1. Variations annuelles du glycogène, du glucose et des nucléotides adényliques

Les taux de glycogène, de glucose libre et de nucléotides adényliques (ATP, ADP et AMP) ont été déterminés dans l'animal entier. Le glycogène et le glucose reflètent l'orientation du métabolisme vers la synthèse ou vers l'utilisation du glycogène. La concentration des nucléotides adényliques et la CEA sont considérés comme une mesure du statut énergétique de la cellule (Swedes *et al.*, 1975 ; De Luca-Abbott *et al.*, 2000 ; Moal *et al.*, 2003). Des valeurs fortes d'ATP révèlent une CEA élevée. Chez les mollusques, les variations de la CEA sont fréquemment associées aux cycles de reproduction et de croissance (Skjoldal & Barkati, 1982 ; Moal *et al.*, 2003). Le taux de glycogène est positivement corrélé à la concentration en ATP, comme chez les deux espèces de moules *M. edulis* (Skjoldal & Barkati, 1982) et *M. galloprovincialis* (Blanco *et al.*, 2006).

Après analyse de ces différents paramètres biochimiques plusieurs phases distinctes qui dépendent du cycle de reproduction peuvent être observées pour ces huîtres élevées en conditions contrôlées :

Une première phase se situe entre mars et avril. A cette époque, le taux de glycogène est élevé, le taux de glucose également. La concentration en ATP est élevée alors que la concentration en ADP et en AMP est faible. L'huître dispose de ses réserves maximales en énergie (Moal *et al.*, 1991 a et b).

Une deuxième phase débute au mois d'avril. Le taux de glycogène, mais aussi le taux de glucose libre commencent à chuter. L'animal utilise ses réserves, il est entré en phase de gamétogenèse active. Un mois après, c'est le taux d'ATP qui chute progressivement jusqu'en juillet où il atteint sa valeur minimale. Le mois de juillet correspond à la période de ponte (Enriquez-Diaz, 2004). L'utilisation des réserves en glycogène et la diminution de l'ATP peuvent être considérées comme la conséquence d'une forte demande énergétique, non compensées par l'apport nutritionnel, et associées à la gamétogenèse (Moal *et al.*, 1991 a et b). Ces résultats sont en accord avec les études de Ruiz *et al.* (1992a et b), Li *et al.* (2000) et Berthelin *et al.* (2000b).

Une troisième phase démarre à partir des mois de juillet-août. Le taux de glycogène recommence à augmenter parallèlement au glucose et à l'ATP. Les analyses histologiques de la gonade montrent que les huîtres ont inversé leur orientation germinale vers le somatique. Les huîtres sont donc en phase de repos sexuel et présentent une reprise de croissance somatique (Enriquez-Diaz, 2004). A partir d'octobre, l'augmentation du glycogène s'intensifie, aux dépens du glucose libre. C'est probablement à cette époque que l'enzyme de synthèse du glycogène entre en véritable action. L'animal reconstitue par ailleurs ses réserves en ATP puisque le taux de celui-ci augmente jusqu'en février à l'inverse de l'AMP et l'ADP.

6.1.2. Variations annuelles des ARNm *Cg-GPH* et *Cg-GYS*

Pour savoir si la biosynthèse des enzymes de contrôle du métabolisme du glycogène présente des variations saisonnières, les niveaux de transcrits *Cg-GPH* et *Cg-GYS*, correspondant respectivement aux ARNm de la GP et de la GS, ont été mesurés par PCR en temps réel dans deux tissus de stockage du glycogène : palpes labiaux et région gonade-manteau (Berthelin, 2000). La méthode de calcul utilisée pour exprimer les quantités de transcrits *Cg-GPH* et *Cg-GYS* (par rapport à l'EF1) est celle décrite par Bacca *et al.* (2005).

Palpes et gonade sont constituées de cellules, appelées cellules vésiculeuses, spécialisées dans le stockage du glycogène (Berthelin *et al.*, 2000a). La région gonade manteau se différencie des palpes labiaux par une importante variation saisonnière du nombre de ces cellules. En effet, lors de la période de gamétogenèse, des cellules gonadiques envahissent progressivement l'organe au détriment des cellules vésiculeuses (Berthelin *et al.*, 2000a).

Dans les palpes labiaux, la quantité d'ARNm *Cg-GPH* montre un maximum au mois de mai. En dehors de ce mois, la quantité reste faible tout au long du cycle. Au mois de mai, les animaux sont en période d'utilisation du glycogène et de l'ATP. Il y a donc une concordance entre l'orientation du métabolisme et ce maximum d'ARNm du gène de la GP. Dans la région gonade-manteau, les variations de la quantité d'ARNm *Cg-GPH* sont de moindre amplitude par rapport aux palpes. Il n'existe aucun maximum printanier pour cet organe. En période de gamétogenèse, la diminution du nombre de cellules vésiculeuses dans la gonade pourrait expliquer cette différence. Les cellules germinales n'étant pas spécialisées dans le stockage /déstockage du glycogène, elles expriment probablement moins le gène de la GP.

Les analyses montrent un maximum de *Cg-GYS* en octobre dans les palpes labiaux comme dans la région gonade manteau. En octobre, les huîtres accumulent rapidement du glycogène et de l'ATP. Les deux tissus sont constitués en majeure partie de cellules vésiculeuses (Berthelin, 2000). Il y a là aussi une concordance entre l'orientation du métabolisme et la quantité d'ARNm *Cg-GYS*.

Les périodes de forte abondance des transcrits *Cg-GPH* ou *Cg-GYS* s'opposent par rapport aux phases de reproduction ou de croissance des huîtres. Ces résultats suggèrent l'implication d'un contrôle transcriptionnel dans la synthèse /dégradation saisonnière du glycogène. Des contrôles de ce type existent chez les mammifères (Vali *et al.*, 2000, Petit *et al.*, 2002, Spark *et al.*, 2006). Cette opposition saisonnière de transcrits est probablement sous l'influence d'un facteur externe (photopériode, température) ou endocrine (hormone de type insuline /leptine et/ou glucagon). En effet, dans cette expérimentation, l'apport en algues était constant à 8% de poids sec d'algues /poids sec d'huître. La ressource trophique ne peut donc pas être le seul facteur forçant l'orientation saisonnière du métabolisme du glycogène.

6.1.3. Variations annuelles des activités de la GP et de la GS

Compte tenu de l'influence des effecteurs allostériques (nucléotides adényliques, G6P, Pi...) sur les activités catalytiques de la GP et de la GS, le dosage des activités a été effectué après purification partielle des échantillons sur résines échangeuses d'anions DOWEX (GP) ou Amberlite XAD (GS).

Cette étude permet de décrire pour la première fois, les variations annuelles des activités de synthèse et de dégradation du glycogène, parallèlement aux variations du taux de glycogène et du glucose libre.

Les activités GP totale, GP *a* et GP *b* montrent trois phases au cours du cycle annuel. La première phase qui correspond à la phase d'énergie maximale (mars à avril) présente des activités GP totale, *a* et *b* élevées alors que le taux de glycogène, de glucose et d'ATP sont forts (AMP et ADP faibles). La deuxième phase de forte demande énergétique et d'utilisation des réserves montre une diminution des activités GP totale, *a* et *b* jusqu'en juin-juillet. Lors de la troisième phase de restauration des réserves, les activités GP augmentent progressivement jusqu'en octobre. Elles restent élevées mais constantes entre octobre et février (croissance somatique). Si les fortes activités GP observées dans la deuxième phase du cycle vont dans le sens de la dégradation du glycogène printanier, en automne ces activités sont également fortes, alors que l'animal accumule du glycogène. Dans ces analyses *in vivo*, plus le taux de glycogène est élevé, plus les activités GP *a* et GP *b* sont fortes. Ces résultats s'opposent à ceux trouvés chez *R. esculenta* (Scapin & Giuseppe, 1994) mais d'autres travaux semblent indiquer une activation de la GP par le glycogène notamment dans le muscle humain (Munger *et al.*, 2003). Tout au long du cycle, l'activité GP *b* est supérieure à celle de la GP *a*, comme c'est le cas chez la moule *M. galloprovincialis* (San Juan Serrano *et al.*, 1991). La GP *b* est considérée comme la forme la moins active de la GP. Toutefois chez la moule, elle montre la même vitesse maximum que la GP *a* (San Juan Serrano *et al.*, 1995a et b). La simple observation des variations d'activités spécifiques GP ne suffit donc pas à expliquer les variations du stock de glycogène. Ces résultats nécessitent d'être couplés à l'analyse précise des effets *in vivo* et *in vitro* des effecteurs allostériques (ATP, ADP, AMP et G6P).

Les activités spécifiques GS totale et GS *D* montrent trois phases au cours du cycle annuel. L'activité GS *I* ne montre aucune variation saisonnière. Les activités GS totale et GS *D* sont élevées lors de la première phase (énergie maximale) puis chutent lors de la deuxième jusqu'en juillet (ponte) où elles atteignent un minimum. La phase d'accumulation du glycogène est marquée par une forte activité GS totale et GS *D*. Il y a donc une concordance entre l'activité GS et la synthèse du glycogène. Les activités GS *I* et GS *D* sont faibles et égales de mars à juillet, puis l'activité GS *D* est supérieure pendant la phase d'accumulation du glycogène. La GS *D* qui contribue seule aux variations saisonnières de la GS totale, est G6P dépendante. Le G6P pourrait augmenter lors de la phase d'accumulation du glycogène, comme il est suggéré chez la moule par San Juan Serrano *et al.* (1998a). Or, les variations de la GS totale montrent justement des corrélations positives avec celles du glycogène et du glucose libre. La GS *D* pourrait alors être activée par le G6P à cette saison. La relation positive qui semble exister entre l'activité GS et le taux de glucose libre va dans le même sens qu'un ensemble de

travaux sur la GS de mammifères (Munger *et al.*, 1993, Halse *et al.*, 2003) et de bivalves marins (L-Fando *et al.*, 1972, Gabbott & Whittle, 1982-1986, Swift *et al.*, 1988). Chez d'autres espèces de bivalves, il existe aussi une corrélation négative entre le glycogène et l'activité GS totale, c'est le cas par exemple chez la moule *M. galloprovincialis* (Goromosova, 1976), la moule *M. edulis* (Gabbott & Whittle, 1982) et l'huître *O. edulis* (L-Fando *et al.*, 1972).

A l'échelle du cycle entier, les niveaux d'ARNm *Cg-GPH* et *Cg-GYS* ne sont pas corrélés aux activités spécifiques GP totale et GS totale, respectivement. Cependant, les périodes de maximums d'abondance de chacun des ARNm correspondent aux phases d'utilisation du glycogène (*Cg-GPH*) ou de synthèse (*Cg-GYS*). S'il existe des variations annuelles des quantités de transcrits *Cg-GPH* et *Cg-GYS*, l'existence d'un contrôle transcriptionnel saisonnier reste cependant à confirmer.

L'anti-corrélation entre les activités GP et GS, qui pourrait justifier l'alternance des phases d'utilisation et de stockage du glycogène au cours de l'année, n'est pas montrée. Ces activités ne présentent donc pas d'opposition saisonnière marquée, comme c'est le cas lors des cycles annuels de reproduction des grenouilles *Rana ridibunda* et *R. esculenta* (Castineiras *et al.*, 1977, Scapin & Giuseppe, 1994). Ceci suggère qu'*in vivo*, plusieurs niveaux de régulation interviennent dans le contrôle de la synthèse et de la dégradation du glycogène.

Il reste donc à comprendre par quel(s) mécanisme(s) l'huître module l'orientation de son métabolisme du glycogène afin de répondre aux besoins énergétiques de la reproduction et de la croissance.

6.1.4. Hypothèses sur la régulation saisonnière du glycogène

Chez les mammifères, la bascule métabolique de la dégradation vers la synthèse du glycogène au niveau cellulaire (et *vice versa*) passe par la régulation opposée des deux enzymes GP et GS, orchestrée par des protéines phosphatases et kinases (Bollen & Stalmans, 1992). S'ajoutent à ces régulations par phosphorylation, le contrôle d'effecteurs allostériques. Ce sujet est très documenté, cependant il existe des différences essentielles entre les mammifères et les bivalves marins comme le rôle même du glycogène. Alors qu'il est destiné au maintien de l'homéostasie du glucose et au fonctionnement des muscles chez les mammifères, il est le support énergétique de la reproduction chez les bivalves. Il ne serait donc pas étonnant de trouver de profondes différences dans les mécanismes de régulation de ces enzymes.

Dans cette expérience nous avons pu mesurer séparément les activités des enzymes phosphorylées GP *a*, GS *D* et déphosphorylées GP *b* et GS *I*. Les activités spécifiques telles que nous les mesurons, renseignent sur la quantité d'enzymes présentes *in vivo* (le tampon d'extraction utilisé permet de bloquer les enzymes dans leur état de phosphorylation d'origine). Cependant, ce dosage ne permet pas de déterminer l'impact des effecteurs

Partie 2 : Variations annuelles du métabolisme du glycogène

présents *in vivo*, les extraits de tissus étant partiellement purifiés de façon à éliminer ces effecteurs. Après une étude précise des effets allostériques *in vitro* sur les activités GS et GP (détermination des constantes d'inhibition ou d'activation), la poursuite du travail serait de déterminer avec précision, la concentration des effecteurs allostériques *in vivo*. Le cumul de ces deux types d'informations permettra à terme de préciser quel(s) effecteur(s) sont susceptible(s) de modifier les activités catalytiques de la GS et de la GP chez l'huître.

Pour le moment, nous pouvons formuler des hypothèses quant au fonctionnement de la régulation du métabolisme du glycogène.

Hypothèses sur l'utilisation printanière du glycogène

Le taux de glycogène diminue dès le mois d'avril et jusqu'au mois de juillet. La quantité d'ARNm *Cg-GPH* montre un maximum en mai dans les palpes et l'activité GP totale est également forte à cette saison, ce qui pourrait suggérer l'existence d'une activation de la biosynthèse de GP au printemps. Les activités GP *a* et GP *b* sont extrêmement bien corrélées en fonction du temps. Cela veut dire qu'à l'échelle de la saison, le ratio GP *a* /GP *b* n'est probablement pas modifié. Chez les mollusques, les processus de phosphorylation seraient lents, du fait de la faible activité des phosphorylase kinases (Ebberink & Salimans, 1982 ; Chih & Ellington, 1986).

L'activité GP *b* est toujours supérieure à celle de la GP *a*. Or la GP *b* est impliquée dans la réponse à des demandes énergétiques progressives, à l'inverse de la GP *a* qui semble plus impliquée dans la réponse à des demandes énergétiques aiguës (Johnson *et al.*, 1989 ; Dombradi *et al.*, 1986 ; San Juan Serrano *et al.*, 1998c). La reproduction peut être considérée comme une demande énergétique progressive. La diminution du glycogène au printemps coïncide avec une élévation du taux d'AMP (et une diminution d'ATP) qui illustre l'augmentation de la demande énergétique due à la gamétogenèse.

L'AMP est justement un puissant activateur de la GP *b*, tout en restant sans effet sur la GP *a* (Bollen *et al.*, 1998 ; San Juan Serrano *et al.*, 1998b). Chez la moule *M. galloprovincialis*, des concentrations en AMP supérieures à 1,6 mM ont cependant un effet inhibiteur sur l'activité catalytique de la GP *b*. Chez *C. gigas*, une activation maximale de l'activité GP est obtenue pour une concentration en AMP de 1,6 mM (Partie 1 de ce manuscrit). Il est donc probable qu'*in vivo*, l'augmentation de la concentration en AMP observée de mai à août active fortement la GP *b*, participant à la dégradation active du glycogène. Lorsque la concentration d'AMP diminue à nouveau (août), cette activation allostérique diminuerait également réduisant l'activité de dégradation du glycogène. Par ailleurs, le G6P agirait en synergie avec l'AMP pour inhiber la GP *b* (San Juan Serrano *et al.*, 1998).

Hypothèses sur la synthèse automnale du glycogène

Le taux de glycogène augmente du mois de juillet (période de ponte) au mois de février. Il s'accumule donc de façon progressive lorsque l'animal est en repos sexuel ou au démarrage d'un nouveau cycle de reproduction. La quantité d'ARNm *Cg-GYS* montre un maximum en octobre dans les palpes et la gonade. L'activité GS totale est elle aussi élevée du mois de septembre à février et montre un maximum en septembre, ce qui pourrait suggérer l'existence d'une activation de la biosynthèse de GS en automne. Par ailleurs, les activités GS *I* et GS *D* ne sont pas corrélées au cours du cycle. Ceci suggère l'existence d'une modulation de l'équilibre des formes phosphorylée /déphosphorylée en fonction de la saison. En période d'accumulation du glycogène, la GS *D* montre une activité plus élevée que celle de la GS *I* (qui reste constante toute l'année). Or, si la GS *D* est la forme considérée comme la moins active, elle est aussi dépendante du G6P. Lors de cette expérimentation, seul le taux de glucose a été mesuré. Cependant, en période de stockage actif du glycogène, le glucose disponible est d'abord phosphorylé en G6P et s'accumule probablement avant d'être métabolisé. L'accumulation transitoire du G6P pourrait donc jouer le rôle d'activateur allostérique de la GS *D* et conduire à l'augmentation de la synthèse du glycogène. Le contrôle métabolique de la synthèse du glycogène par le G6P est décrit chez les vertébrés (*e.g.* Härndahl *et al.*, 2006). La glucokinase (Hexokinase du foie) et les transporteurs du glucose modulent la concentration cellulaire en G6P (Seoane *et al.*, 1996). Le rôle de la phosphorylation de la GS serait d'adapter son activité au flux de G6P contrôlé par ce couple (Shulman *et al.*, 1995). L'augmentation de G6P aurait pour second effet d'inhiber l'activité GP *b* et par conséquent l'utilisation du glycogène.

7 Conclusion

L'étude des variations du métabolisme du glycogène a été réalisée à partir d'animaux élevés en milieu contrôlé. Seules la température et la photopériode montraient des variations saisonnières (selon les valeurs moyennes du bassin de Marennes Oléron, Charente Maritime). L'apport en algues était constant à 8% poids sec d'algues / poids sec d'huître.

L'analyse des paramètres biochimiques tels que le taux de glycogène, de glucose, et des nucléotides adényliques nous permet de définir trois phases énergétiques du cycle de reproduction. Ces événements énergétiques sont parfaitement corrélés aux événements de la reproduction.

Phase 1 : Phase d'énergie maximale où glycogène, glucose et ATP sont élevés. L'huître amorce sa gamétogenèse.

Phase 2 : Phase de fortes demandes énergétiques et d'utilisation du glycogène où glucose et ATP chutent. L'ADP et l'AMP augmentent. L'huître est en gamétogenèse active.

Phase 3 : Phase d'accumulation du glycogène où glucose et ATP augmentent. L'ADP et l'AMP diminuent. Après la ponte, l'huître résorbe ses gamètes résiduels puis entre en phase de repos sexuel.

Partie 2 : Variations annuelles du métabolisme du glycogène

Des variations saisonnières de la quantité des ARNm *Cg-GPH* et *Cg-GYS* sont observées pour la première fois chez un bivalve marin, laissant supposer l'existence d'un contrôle de la biosynthèse des enzymes GP et GS à l'échelle de la saison.

Les variations des activités GP et GS montrent trois phases qui se superposent aux phases énergétiques du cycle. Ces activités sont positivement corrélées au taux de glycogène (GP) et de glucose libre (GS). Il n'existe pas d'opposition saisonnière entre les activités GP et GS qui pourrait justifier l'alternance des phases de synthèse et de dégradation du glycogène. Alors que la GP ne semble pas montrer de régulation par phosphorylation (GP *b* toujours dominante), l'augmentation de la GS *D* serait associée à l'accumulation automnale du glycogène (GS *I* constante).

L'effet *in vitro* des effecteurs allostériques AMP et G6P sur les activités catalytiques de la GP et de la GS reste à déterminer. Les hypothèses construites à partir des informations de la bibliographie et des données biochimiques permettent d'imaginer un système de régulation du métabolisme du glycogène chez l'huître. Ces hypothèses suggèrent qu'*in vivo*, plusieurs niveaux de régulation interviennent dans le contrôle de la synthèse et de la dégradation du glycogène. Le contrôle de la GP et de la GS par des effecteurs allostériques prendrait toute son importance chez l'huître, comparé aux vertébrés, en raison des variations progressives du statut énergétique, liées à la reproduction.

Le contrôle de ces variations est probablement tenu par des facteurs externes (température, photopériode) et des facteurs internes (métabolites, hormones).

**Partie 3 : Effet *in vivo* du niveau
trophique et effet *in vitro* du glucose
et de l'insuline sur le métabolisme du
glycogène**

1 Introduction

Les résultats du chapitre précédent montrent clairement que le métabolisme du glycogène de l'huître présente d'importantes variations saisonnières. La capacité de mise en réserve du glycogène augmente de l'automne à la fin de l'hiver pendant le repos sexuel et les premiers stades de la gamétogenèse. L'orientation du métabolisme ne reflète pas, comme chez la moule, l'augmentation des métabolites circulants due à une augmentation de la nourriture disponible (Mathieu & Lubet, 1993). En effet, en milieu naturel, la synthèse des réserves a lieu alors que les quantités de phytoplancton dans l'eau sont faibles. En milieu expérimental, le cycle d'accumulation /utilisation des stocks de glycogène a lieu même lorsque la quantité de nourriture est constante. Chez l'huître *C. gigas*, il semble donc exister une régulation stricte des réserves énergétiques liée au cycle de reproduction.

Chez de nombreuses espèces animales produites en aquaculture, la quantité trophique joue un rôle sur le taux de glycogène ou sur la phosphorylation du glucose. C'est le cas par exemple chez la tanche d'eau douce *Tinca tinca* (De Pedro *et al.*, 2001), chez la perche commune *Perca fluviatilis* (Borrebaek & Christophersen, 2001), la daurade royale *Sparus aurata* (Bonamusa *et al.*, 1992 ; Panserat *et al.*, 2000 ; Caseras *et al.*, 2000), la truite arc en ciel *Oncorhynchus mykiss* et la carpe commune *Cyprinus carpio* (Panserat *et al.*, 2000). Les poissons sont pourtant réputés pour leur faible utilisation du glucose (Wilson, 1994). C'est également le cas chez la crevette *Litopenaeus vannamei* (Sanchez-Paz *et al.*, 2007). Chez la moule *M. galloprovincialis*, les variations saisonnières du glycogène sont corrélées à la teneur en chlorophylle a (Blanco *et al.*, 2006). La supplémentation en micro-algues pendant la phase de grossissement des huîtres d'élevage provoque une augmentation de leur composition en glycogène (Pennarun *et al.*, 2003).

Les bivalves marins sont exposés à de fortes fluctuations de paramètres environnementaux. La température et la photopériode contrôlent majoritairement le cycle gamétogénétique mais aussi les stratégies de croissance et d'allocation des ressources de *C. gigas* (Fabioux *et al.*, 2005). Même si les variations saisonnières de température et de photopériode ont plus d'effets que la quantité de nourriture sur les paramètres physiologiques de l'huître (Delaporte *et al.*, 2006), la concentration de phytoplancton joue un rôle primordial dans le déterminisme de la gamétogenèse (Enriquez-Diaz, 2004). Les huîtres élevées dans une ration trophique riche produisent une gonade hypertrophiée mais avec une efficacité de ponte réduite (Enriquez-Diaz, 2004). A l'inverse les huîtres élevées avec un faible niveau trophique produisent une gonade plus réduite avec une émission de gamètes totale pendant l'été. Les huîtres nourries avec un régime en algues de 12% (poids sec algues /poids sec huître) ont des réserves automnales en glucides plus importantes que des huîtres nourries avec 4% d'algues (Delaporte *et al.*, 2006). Le niveau trophique a donc une incidence sur les stocks de glycogène mis en place à la période de repos sexuel. La nourriture influence par ailleurs très fortement les fonctions du bilan énergétique de l'huître. Plus celle-ci est intense, plus le bilan est déficitaire en période estivale (Pouvreau *et al.*, 2003). La modélisation des paramètres énergétiques de populations d'huîtres montre que la quantité de

nourriture disponible est un facteur important affectant la productivité des élevages (Wilson-Ormond *et al.*, 1993).

Chez les mammifères, la régulation nutritionnelle du métabolisme du glycogène est relayée par les actions synergiques du glucose et de l'insuline. Après un repas, le taux de glucose sanguin augmente provoquant la libération d'insuline par les cellules β du pancréas. Dans le foie, l'augmentation post-prandiale de la synthèse de glycogène est d'abord sous le contrôle de la phosphorylation du glucose par la Glucokinase (Hexokinase du foie, enzyme clef de l'entrée de glycolyse) (Seaone *et al.*, 1996). L'activité de la Glucokinase est elle même induite au niveau transcriptionnel par l'insuline (Iynedjian, 1993) et au niveau post-transcriptionnel par le glucose (Payne *et al.*, 2005). Le glucose est considéré comme la principale petite molécule inhibitrice de la GP (Bollen *et al.*, 1998). Il se lie à la forme GP *a* de l'enzyme en favorisant sa conformation T qui est moins active et plus facilement déphosphorylée. A l'opposé, le glucose renforce l'activité de la GS en modifiant sa localisation sub-cellulaire (Guinovart *et al.*, 1997). L'insuline régule de façon opposée les enzymes GS et la GP en modifiant l'équilibre des formes phosphorylée /déphosphorylée. Il en résulte une activation de la synthèse du glycogène et une inhibition de sa dégradation. Le G6P régule aussi la GS par un mécanisme de phosphorylations en cascade.

Chez les mollusques, la principale difficulté pour étudier l'effet des métabolites et des hormones sur les enzymes du métabolisme du glycogène vient de l'absence de lignées cellulaires. Si des primo cultures de cellules de cœur d'huître *C. gigas* ont pu être maintenues plusieurs mois sous certaines conditions (Chen & Men, 1999), ce n'est pas le cas des cellules vésiculeuses dissociées. Le principal problème vient des nombreuses contaminations des cultures par des champignons, des bactéries et des protozoaires. Quelques travaux reportent cependant des résultats de recherche d'effet du glucose ou de l'insuline sur le métabolisme du glycogène. Chez le mollusque d'eau douce *L. stagnalis*, le glucose seul n'a aucun effet sur l'activité GS *in vitro* tandis que chez l'huître américaine *C. virginica* et la moule *M. edulis* la GS est activée par le glucose de façon dose dépendante (Swift *et al.*, 1988, Whittle & Gabbott, 1986). Le principal facteur non endocrine de régulation du stockage des nutriments chez *M. edulis* est le taux de glucose circulant (Mathieu & Lubet, 1993). Des effets biologiques d'insuline mammaliennes ou de poisson ont été mis en évidence sur le métabolisme du glycogène pour différentes espèces de mollusques, en particulier une activation de la GS (Plisetskaya *et al.*, 1978, 1979 ; Rusakov & Kasakov, 1979). Cependant ces résultats n'ont pas été confirmés chez la moule *M. edulis* (Gabbott, 1983 ; Gabbott & Whittle, 1986). Les plus récents travaux sur l'huître *C. gigas* montrent que l'insuline porcine stimule *in vitro* l'incorporation du glucose dans le glycogène des cellules vésiculeuses en culture (Berthelin, 2000). Le glucose stimulerait directement cette incorporation mais uniquement pour des cellules dissociées d'huîtres en période de mise en réserve (Berthelin, 2000).

Le but de ce chapitre est d'une part d'étudier la régulation nutritionnelle du métabolisme du glycogène *in vivo* chez l'huître. Pour cela, trois enzymes clefs du métabolisme ont été étudiées dans les palpes labiaux d'huîtres nourries avec différentes rations en algues : l'HK qui catalyse la première étape de la glycolyse (phosphorylation du glucose), la GP et la GS, enzymes de dégradation et de synthèse du glycogène, respectivement. Pour chacune des enzymes, la quantité d'ARNm, la stabilité des ARNm et les activités

Partie 3 : Effet du niveau trophique, du glucose et de l'insuline

enzymatiques ont été analysées. D'autre part, des travaux préliminaires concernant l'effet du glucose et de l'insuline sur la régulation du métabolisme du glycogène de l'huître ont été menés *in vitro* sur des primo cultures de cellules dissociées de palpes labiaux. L'ensemble de ces travaux a pour objectif de décrire les réponses mises en jeu face à la variation du facteur trophique des huîtres en période de mise en réserve du glycogène.

2 Effet du niveau trophique sur le métabolisme du glycogène

L'expérimentation réalisée pour répondre à la question de l'effet du niveau trophique a été réalisée en milieu contrôlé (voir matériel et méthodes). Les huîtres ont été nourries pendant 16 jours selon trois régimes en algues : 0%, 6% et 12% de poids sec d'algues par poids sec d'huître (algues DW). La mesure des paramètres a été effectuée sur les palpes labiaux de 6 fois 4 pools d'huîtres à 0, 2, 3, 8 et 16 jours d'expérimentation.

2.1. Effet du niveau trophique sur le taux de glycogène

Sur les 16 jours d'expérimentation, les huîtres non nourries (0% algues) montrent une diminution temporelle du taux de glycogène ($F = 3,86$, $P < 0,05$) (**Figure 37**). Le taux de glycogène des palpes diminue en effet après 8 jours d'élevage et jusqu'à la fin du conditionnement. A l'inverse, les huîtres nourries avec la ration la plus forte en algues (12% d'algues DW) accumulent du glycogène ($F = 4,01$, $p < 0,05$). En effet, il y a plus de glycogène dans leurs palpes labiaux après 16 jours comparé au jour 3 ($t = -3,97$, $p < 0,05$). Les huîtres nourries à 6% d'algues DW montrent un taux de glycogène constant ($P = 1,79$ et $2,85$, $P = 0,20$).

Un effet positif du niveau trophique est observé après 8 et 16 jours de conditionnement ($F = 20,15$ et $6,92$, $P < 0,05$). Le taux de glycogène est en effet plus élevé dans les palpes labiaux des huîtres nourries à 6% ou 12% qu'à jeun.

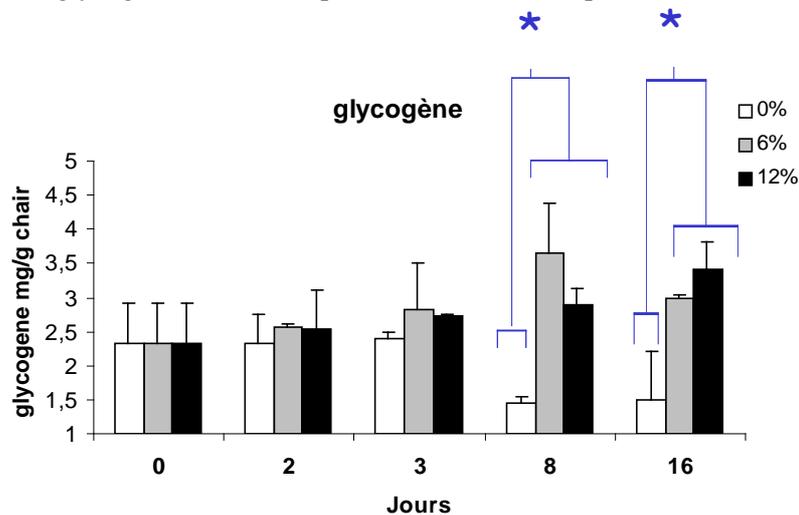


Figure 37 : Effet du niveau trophique sur le taux de glycogène mesuré dans les palpes labiaux d'huîtres élevées en conditions contrôlées pendant 16 jours à 0%, 6% et 12% de poids sec d'algues /poids sec d'huître. (moyenne \pm ET, $n = 4$). Les étoiles indiquent les différences entre les 3 conditions trophiques pour un jour donné (ANOVA, $P < 0,05$).

2.2. Effet du niveau trophique sur la quantité d'ARNm *Cg-HK*, *Cg-GYS* et *Cg-GPH*

Le gène *EF I* a été amplifié sur chaque échantillon en tant que gène de référence (à expression constante). Sur l'ensemble de l'expérimentation, le coefficient de variation de l'*EF I* est de 3%. Aucun des facteurs « temps » et « niveau trophique » n'a d'effet sur la quantité de transcrits *EF I* ($F = 1,90$ et $0,31$, $p = 0,12$ et $0,73$ respectivement). Les résultats sont donc exprimés en nombre absolu de copies d'ARNm.

2.2.1. Quantité d'ARNm *Cg-HK*

En 16 jours, la quantité d'ARNm *Cg-HK* varie uniquement pour les huîtres nourries à 6% et 12% d'algues DW ($F = 29,35$ et $8,26$ respectivement, $P < 0,01$). Dans les deux cas, le niveau de transcrits *Cg-HK* montre des valeurs maximales au 8^{ième} jour d'alimentation mais retourne à son niveau initial au 16^{ième} jour (**Figure 38A**). Au jour 8, la quantité de transcrits *Cg-HK* est plus forte pour les huîtres nourries à 6% que pour les huîtres nourries à 0% et 12% d'algues DW ($F = 5,06$, $P < 0,05$). En dehors du jour 8, la quantité d'ARNm *Cg-HK* est identique pour les trois niveaux d'alimentation.

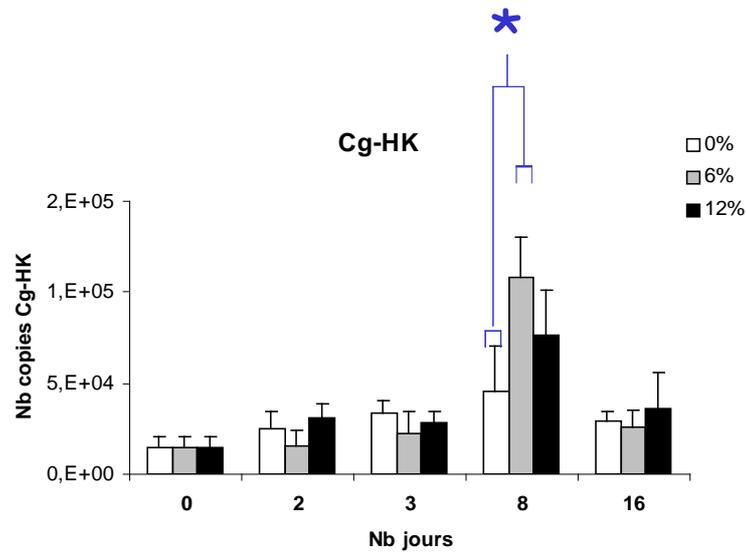
2.2.2. Quantité d'ARNm *Cg-GYS*

En 16 jours, la quantité d'ARNm du gène codant la GS (*Cg-GYS*) varie uniquement pour les huîtres nourries à 6% et 12% d'algues DW ($F = 16,76$ et $34,00$ respectivement, $P < 0,01$). Dans les deux cas, le niveau de transcrits *Cg-GYS* montre une augmentation significative dès le 8^{ième} jour (**Figure 38B**). Les huîtres nourries à 6% d'algues DW montre une quantité d'ARNm *Cg-GYS* identique aux jours 8 et 16. Les huîtres nourries à 12% d'algues DW ont un niveau de transcrits *Cg-GYS* maximal au jour 16. Un effet positif du niveau trophique est observé aux jours 8 et 16 ($F = 54,78$ et $33,15$ respectivement, $P < 0,01$).

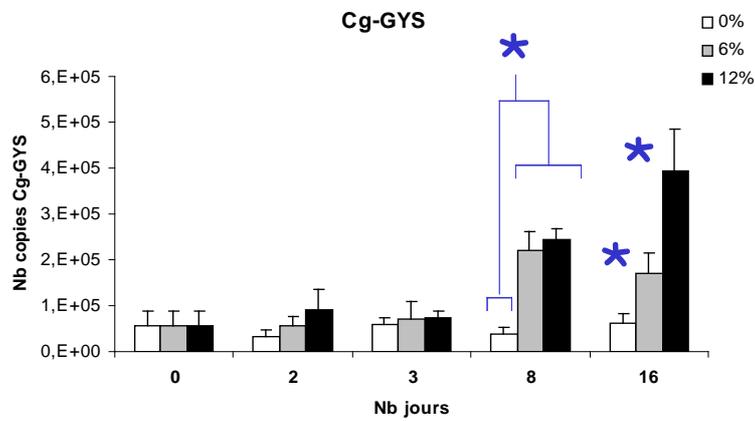
2.2.3. Quantité d'ARNm *Cg-GPH*

En 16 jours, la quantité d'ARNm du gène codant la GP (*Cg-GPH*) varie avec le temps pour les trois niveaux d'alimentation ($F = 13,19$, $13,24$ et $7,60$ respectivement, $P < 0,01$). Une augmentation du niveau de transcrit est observée pour ces trois conditions et devient significative au jour 8 de l'expérimentation (**Figure 38C**). La quantité d'ARNm *Cg-GPH* diminue ensuite et revient à ses valeurs initiales. Il n'existe cependant aucun effet du niveau trophique quelque soit la durée d'expérimentation.

A



B



C

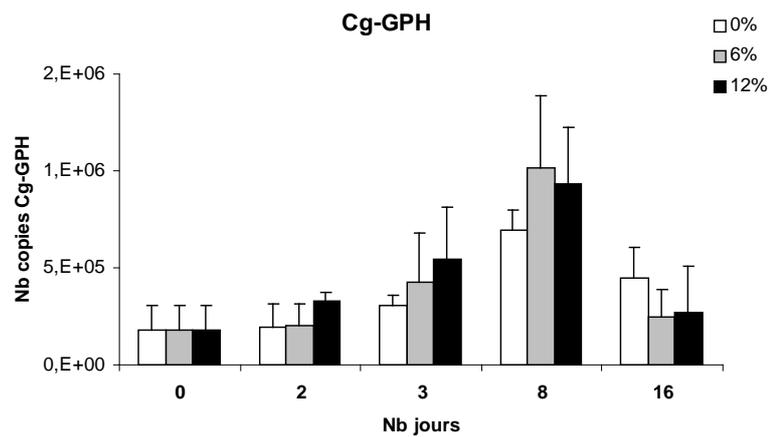


Figure 38 : Effet du niveau trophique sur la quantité d'ARNm *Cg-HK* (A), *Cg-GYS* (B) et *Cg-GPH* (C) mesurée dans les palpes labiaux d'huîtres élevées en conditions contrôlées pendant 16 jours à 0%, 6% et 12% de poids sec d'algues /poids sec d'huître. (moyenne \pm ET, n = 4). Les étoiles indiquent les différences entre les 3 conditions trophiques pour un jour donné (ANOVA, $P < 0,05$).

2.3. Effet du niveau trophique sur la stabilité des ARNm *Cg-GYS* et *Cg-GPH*

La stabilité des ARNm *Cg-GYS* et *Cg-GPH* a été mesurée à partir de cellules de palpes dissociées aux jours 0 et 16 de l'expérimentation et mises en primo culture dans du milieu L15 avec antibiotiques. L'activité globale de transcription de ces cellules a été interrompue par un traitement à l'actinomycine D (inhibiteur de transcription : voir « matériel et méthodes »). La quantité d'ARNm d'intérêt est ensuite suivie par quantification en PCR temps réel.

Le **Tableau 12** reporte les temps de demi-vie des ARNm *Cg-GYS* et *Cg-GPH* pour les huîtres témoins (jour 0) et les huîtres prélevées après 16 jours d'alimentation à 0%, 6% et 12% d'algues DW. La durée de demi-vie des ARNm *Cg-GPH* diminue après 16 jours d'alimentation à 12% d'algues DW ($F = 6,38$, $P < 0,05$) indiquant un effet négatif de l'alimentation sur la stabilité de cet ARNm. Au contraire, la demi-vie de l'ARNm *Cg-GYS* augmente après 16 jours d'alimentation à 12% d'algues DW ($F = 14,85$, $P < 0,01$).

Tableau 12 : Temps de demi-vie des ARNm *Cg-GYS* et *Cg-GPH* après 16 jours d'alimentation à 0%, 6% ou 12% d'algues. Les mesures sont réalisées à partir de cellules dissociées de palpes traitées à l'actinomycine D. (moyenne \pm ET, $n = 4$). Les temps sont indiqués en heures \pm E.T.

	Témoins	0% algues	6% algues	12% algues
Cg-GYS	9,28 \pm 0,23	9,99 \pm 2,83	9,14 \pm 0,74	14,19 \pm 1,02
Cg-GPH	3,60 \pm 0,68	3,21 \pm 0,70	3,31 \pm 0,52	0,80 \pm 0,38

2.4. Effet sur les activités spécifiques HK, GS totale et GP totale, GP *a*

2.4.1. Activité HK

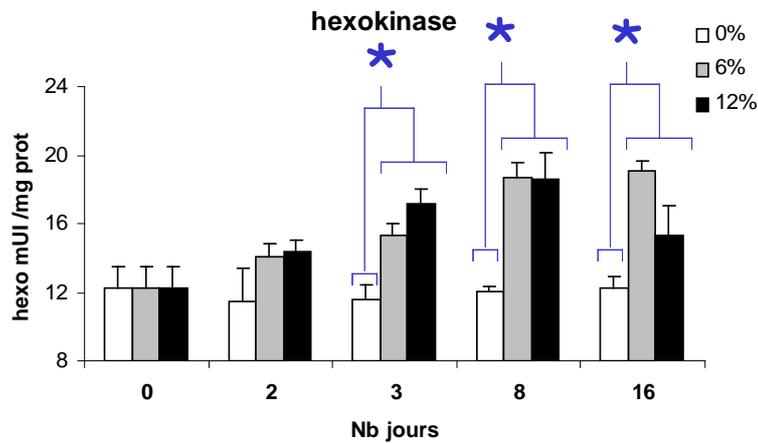
Pendant les 16 jours d'expérimentation, l'activité spécifique HK mesurée dans les palpes labiaux (**Figure 39A**) montre une augmentation significative pour les huîtres nourries à 6% et 12% d'algues DW ($F = 43,10$ et $13,39$ respectivement, $P < 0,01$). Cette augmentation est effective dès le deuxième jour pour les huîtres nourries à 6% et au 8^{ième} jour pour les huîtres nourries à 12% d'algues DW. L'activité HK des huîtres non nourries reste constante tout au long de l'expérimentation ($F = 0,35$, $P = 0,84$).

Un effet positif du niveau trophique apparaît dès le deuxième jour où l'activité HK est plus forte pour les huîtres nourries qu'à jeun ($F = 5,07$, $P < 0,05$). A la fin de l'expérimentation (jour 16) les huîtres nourries ont toujours une activité HK plus forte que les huîtres non nourries ($F = 29,13$, $P < 0,01$).

2.4.2. Activité GS totale

Pendant les 16 jours d'expérimentation, l'activité GS totale mesurée dans les palpes labiaux (**Figure 39B**) montre une augmentation significative pour les huîtres nourries à 6% et 12% d'algues DW ($F = 9,47$ et $14,18$ respectivement, $P < 0,01$). Cette augmentation est significative dès le troisième jour pour les huîtres nourries à 6% d'algues et au 8^{ième} jour pour les huîtres les plus nourries. Un effet positif du niveau trophique est observé aux jours 8 et 16 après le début de l'expérimentation ($F = 17,77$ et $5,03$, $P < 0,05$).

A



B

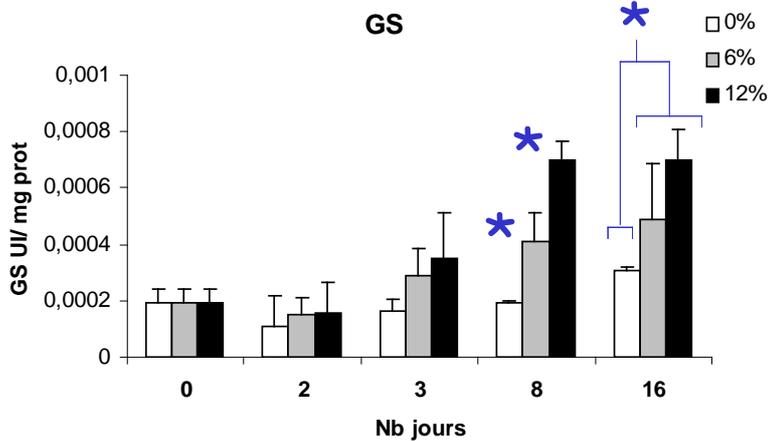


Figure 39 : Effet du niveau trophique sur l'activité HK (A) et de la GS totale (B) mesurée dans les palpes labiaux d'huîtres élevées en conditions contrôlées pendant 16 jours à 0%, 6% et 12% de poids sec d'algues /poids sec d'huître. (moyenne \pm ET, $n = 4$). Les étoiles indiquent les différences entre les 3 conditions trophiques pour un jour donné (ANOVA, $P < 0,05$).

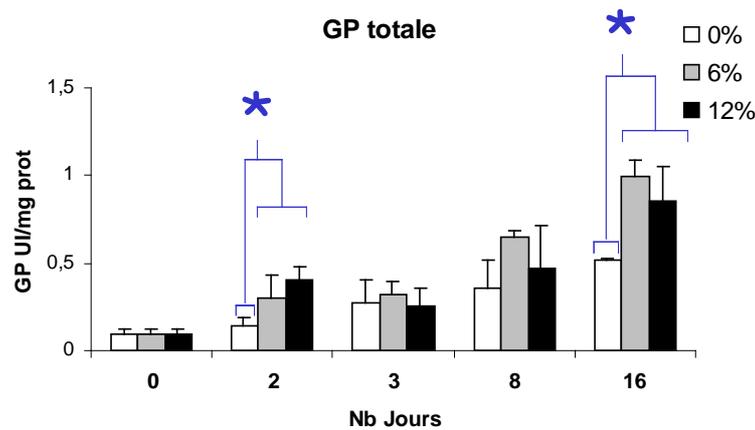
2.4.3. Activité GP totale et GP a

Pendant les 16 jours d'expérimentation, l'activité GP totale mesurée dans les palpes labiaux (**Figure 40A**) montre une augmentation significative pour les huîtres des trois conditions trophiques ($F = 10,60, 74,59$ et $12,33$ respectivement, $P < 0,01$). Cette augmentation est significative dès le troisième jour pour les huîtres à jeun et dès le deuxième jour pour les huîtres nourries à 6% et 12% d'algues DW. L'activité GP totale est maximale dans les trois conditions au 16^{ième} jour d'expérimentation.

Un effet positif du niveau trophique est observé au deuxième jour et au 16^{ième} jour ($F = 8,04$ et $10,58$ respectivement, $P < 0,05$). Au jour 16, l'activité totale de dégradation du glycogène est plus forte pour les huîtres nourries que non nourries mais il n'y a pas d'effet « dose ».

Pendant les 16 jours d'expérimentation, l'activité spécifique de la GP a (active) (**Figure 40B**) montre une augmentation significative pour les huîtres nourries avec 6% d'algues DW ($F = 8,51, P < 0,05$). Cette activité GP a est en effet maximale après 16 jours de conditionnement. Un effet positif du niveau trophique est observé sur l'activité GP a au jour 16 ($F = 6,07, P < 0,05$).

A



B

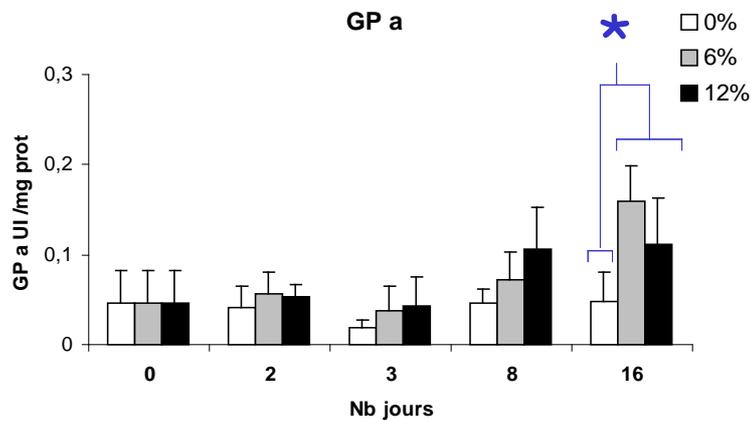


Figure 40 : Effet du niveau trophique sur l'activité spécifique GP totale (A) et GP a (B) mesurée dans les palpes labiaux d'huîtres élevées en conditions contrôlées pendant 16 jours à 0%, 6% et 12% de poids sec d'algues /poids sec d'huître. (moyenne \pm ET, n= 4). Les étoiles indiquent les différences entre les 3 conditions trophiques pour un jour donné (ANOVA, $P < 0,05$).

3 Effet *in vitro* du glucose sur le métabolisme du glycogène

Pour comprendre quels pourraient être les facteurs impliqués dans la réponse du métabolisme du glycogène au niveau trophique, l'effet *in vitro* du glucose a été testé sur des cellules dissociées de palpes labiaux. Les cellules ont été prélevées sur des huîtres en période de mise en réserve et cultivées pendant 24h dans du milieu L15 avec 0 mM, 0,5 mM ou 10 mM de glucose (voir « Matériel et méthodes »). La viabilité cellulaire a été contrôlée avec un test MTT (**Tableau 13**). Ces expérimentations sur cellules sont les premières réalisées au laboratoire.

Partie 3 : Effet du niveau trophique, du glucose et de l'insuline

Tableau 13 : Viabilité cellulaire exprimée en pourcentage selon la méthode du test MTT pour 5×10^6 cellules dissociées de palpes sur 24h avec 0, 0,5 ou 10 mM de glucose. (moyenne \pm ET, n = 3).

	glucose		
	0 mM	0,5 mM	10 mM
0 h	100,0 \pm 5,3	100,0 \pm 4,3	100,0 \pm 2,6
6 h	93,5 \pm 1,3	93,9 \pm 2,0	86,9 \pm 2,3
12 h	85,4 \pm 2,4	84,7 \pm 1,9	83,3 \pm 0,1
24 h	78,1 \pm 3,1	78,4 \pm 0,5	79,1 \pm 0,9

Malgré plusieurs essais, la viabilité cellulaire tombe en dessous de 80% à 24h de culture quelle que soit la concentration de glucose ajoutée au milieu de culture. La survie des cellules maintenues à 10 mM de glucose est inférieure à celle des cellules maintenues à 0 et 0,5 mM à 6h de culture. Dans les résultats suivants, seules sont présentées les mesures réalisées entre 0 et 12h de culture.

3.1. Effet du glucose sur la quantité d'ARNm *Cg-GYS* et *Cg-GPH*

Les quantités d'ARNm sont exprimées en nombre absolue de copies pour 1 μ g d'ARN totaux extraits à partir de 5×10^6 cellules.

3.1.1. Quantité d'ARNm *Cg-GYS*

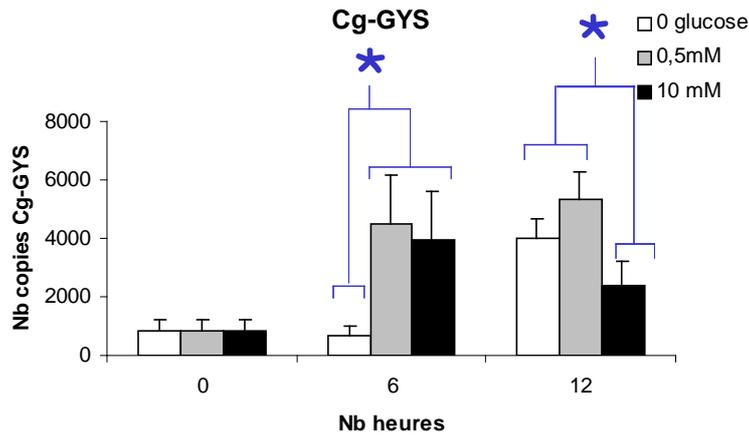
La quantité de transcrits *Cg-GYS* montre un profil de variations similaires à celui des transcrits *Cg-GPH*. Les cellules témoins, sans glucose, montrent une augmentation du niveau de transcrits *Cg-GYS* au cours des 12h de culture (F = 21,90, P < 0,01) (**Figure 41A**). Le niveau de transcrits *Cg-GYS* augmente aussi pour les cellules cultivées dans du milieu L15 avec 0,5 mM et 10 mM de glucose (F = 13,04 et 6,41 respectivement, P < 0,05). Dans les deux cas, le niveau de transcrit augmente entre 0 et 6h de culture et reste constant entre 6 et 12h. Un effet opposé de la concentration en glucose est observé à 6h et 12h de culture de la même façon que pour *Cg-GPH* (F = 6,74 et 7,47 respectivement, p < 0,05).

3.1.2. Quantité d'ARNm *Cg-GPH*

La condition témoin sans glucose montre une augmentation du niveau de transcrits *Cg-GPH* au cours des 12h de culture (F = 616,7, P < 0,01) (**Figure 41B**). Le niveau de transcrits *Cg-GPH* montre aussi une augmentation pour les cellules cultivées dans du milieu L15 avec 0,5 mM et 10 mM de glucose (F = 18,55 et 17,10 respectivement, P < 0,01). Pour les deux concentrations en glucose, le niveau de transcrit augmente entre

0 et 6h de culture et reste constant entre 6 et 12h. Un effet opposé de la concentration en glucose est observé à 6h et 12h de culture ($F = 9,10$ et $7,20$ respectivement, $P < 0,05$). Cet effet n'est pas dose dépendant. A 6h, il y a plus de transcrits *Cg-GPH* pour les cellules cultivées avec glucose que sans mais cet effet reste transitoire puisqu'à 12h de culture, la plus petite quantité de *Cg-GPH* est mesurée pour les cellules maintenues à 10 mM de glucose.

A



B

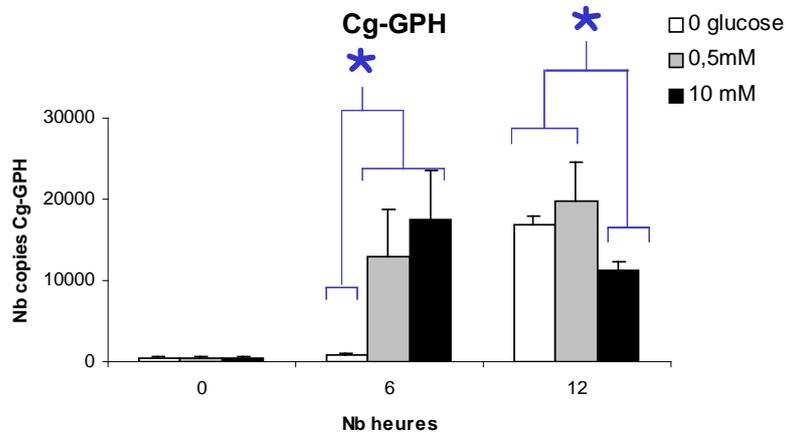


Figure 41 : Effet *in vitro* du glucose sur la quantité d'ARNm *Cg-GYS* (A) et *Cg-GPH* (B) de 0 à 24h de culture avec 0, 0,5 ou 10 mM de glucose. (moyenne \pm ET, $n = 4$). Les étoiles indiquent les différences entre les 3 concentrations en glucose pour un temps donné (ANOVA, $P < 0,05$).

3.2. Effet du glucose sur les activités GS et GP

La mesure des activités enzymatiques sur des cellules dissociées de palpes en primo culture est délicate car la quantité d'enzyme présente dans les échantillons préparés est faible. La mesure des activités des formes GP *a* et GS *I* n'a pas pu être réalisée car ces activités étaient en dessous du seuil critique de détection.

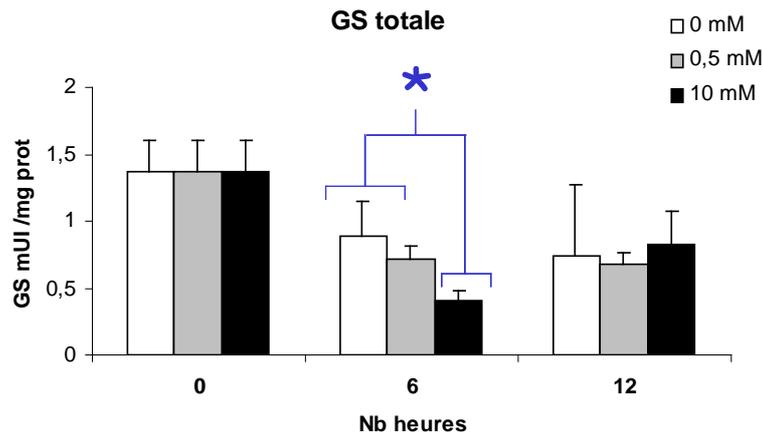
3.2.1. Activité GS

La condition témoin sans glucose ne montre pas de variation d'activité spécifique GS totale au cours des 12 premières heures de culture ($F = 1,06$, $P = 0,43$) (**Figure 42A**). L'activité GS varie pour les cellules cultivées avec 0,5 mM et 10 mM de glucose entre 0 et 12h de culture ($F = 5,02$ et $7,33$ respectivement, $P < 0,05$). En effet, l'activité GS totale diminue de façon significative dès 6h de culture pour les conditions 0,5 mM et 10 mM de glucose et se stabilise jusqu'à 12h de culture. Un effet négatif de la concentration de glucose est observé à 6h de culture pour les cellules maintenues à 10 mM de glucose ($F = 7,79$, $P < 0,05$). Cet effet, bien que non statistique entre les trois concentrations de glucose testées, semble dose dépendant. Cet effet disparaît à 12h de culture.

3.2.2. Activité GP

La condition témoin sans glucose ne montre pas de variation d'activité spécifique GP totale au cours des 12 premières heures de culture ($F = 1,78$, $P = 0,25$) (**Figure 42B**). Il n'y a pas non plus de variations de cette activité de 0 à 12h de culture avec 0,5 et 10 mM de glucose ($F = 1,91$ et $2,06$, $P = 0,24$ et $0,24$ respectivement). Un effet du glucose est observé à 6h de culture sans effet dose ($F = 60,70$, $P < 0,01$). Tandis que l'activité GP est inhibée pour les cellules maintenues à 0,5 mM de glucose comparé aux cellules témoins sans glucose, l'activité GP des cellules maintenues à 10 mM de glucose est plus forte à 6h de culture. Cet effet disparaît totalement à 12h de culture.

A



B

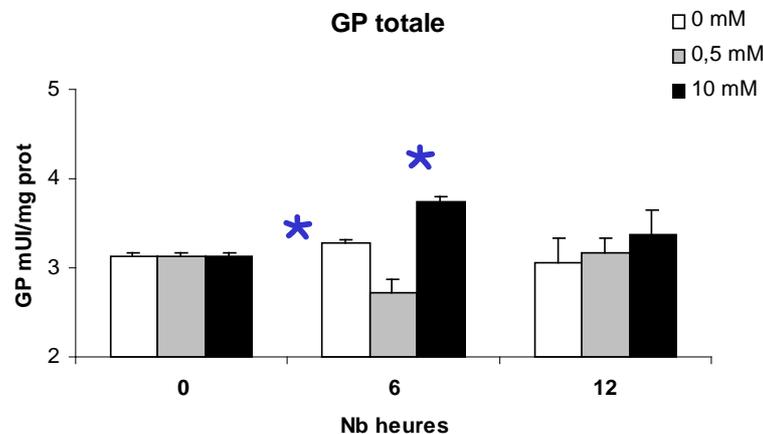


Figure 42 : Effet *in vitro* du glucose sur les activités spécifiques GS totale (A) et GP totale (B) pour des cellules de palpes labiaux mises en primo culture de 0 à 24h avec 0 mM, 0,5 mM ou 10 mM de glucose. (moyenne \pm ET, n = 4). Les étoiles indiquent les différences entre les 3 concentrations en glucose pour un temps donné (ANOVA, $P < 0,05$).

4 Effet *in vitro* de l'insuline sur le métabolisme du glycogène

L'effet *in vitro* de l'insuline porcine a été testé sur des cellules dissociées de palpes labiaux. Les cellules ont été prélevées sur des huîtres en période de mise en réserve et cultivées pendant 24h dans du milieu L15 en présence de 0,5 mM de glucose et 0 M, 10^{-8} M ou 10^{-6} M d'insuline (voir « Matériel et méthodes »). La viabilité cellulaire a été contrôlée avec un test MTT (**Tableau 14**).

Tableau 14 : Viabilité cellulaire exprimée en pourcentage selon la méthode du test MTT pour 5×10^6 cellules dissociées de palpes sur 24h de culture avec 0, 10^{-8} ou 10^{-6} M d'insuline porcine. (moyenne \pm ET, n = 3).

	Insuline		
	0	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶
0 h	100,0 ± 6,0	100,0 ± 4,6	100 ± 7,3
3 h	108,3 ± 3,6	92,7 ± 3,8	102,9 ± 0,6
6 h	107,8 ± 3,4	91,9 ± 2,6	103,7 ± 1,6
12 h	96,1 ± 2,9	83,7 ± 2,37	93,8 ± 0,3
24 h	75,7 ± 4,3	65,42 ± 1,84	71,4 ± 0,6

La viabilité cellulaire tombe en dessous de 76% à 24h de culture quel que soit la concentration d'insuline ajoutée au milieu de culture. Dans les résultats suivants, seules sont présentées les mesures réalisées entre 0 et 12h de culture, soit à des valeurs de viabilités comprises entre 84 et 96%.

4.1. Effet de l'insuline sur la quantité d'ARNm *Cg-GYS* et *Cg-GPH*

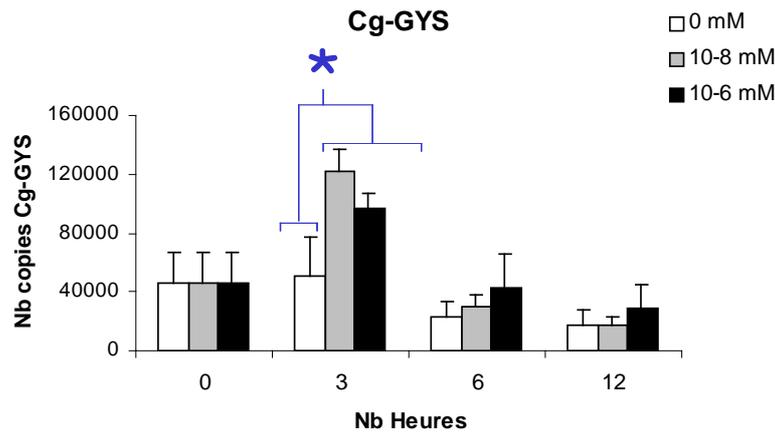
4.1.1. Quantité d'ARNm *Cg-GYS*

Les cellules mises en cultures pendant 12h sans insuline ne montrent aucune variation du niveau de transcrits *Cg-GYS* (F= 1,89, P = 0,15). Les cellules mises en cultures avec 10⁻⁸ et 10⁻⁶ M d'insuline montrent des variations de *Cg-GYS* (F = 8,06 et 17,93 respectivement, P < 0,01). Le niveau de transcrits *Cg-GYS* montre en effet un maximum à 3h de culture pour ces deux conditions (**Figure 43A**). Un effet positif de la concentration d'insuline est donc observé à 3h de culture (F = 4,99, P < 0,05). Cet effet n'est pas dose dépendant, il disparaît totalement entre 3h et 12h de culture.

4.1.2. Quantité d'ARNm *Cg-GPH*

Les cellules mises en cultures pendant 12h sans insuline ou avec 10⁻⁸ et 10⁻⁶ M d'insuline porcine ne montrent aucune variation du niveau de transcrits *Cg-GPH* (F= 1,08, 2,61 et 3,11, P = 0,39, 0,09 et 0,06 respectivement). Aucun effet de la concentration d'insuline n'est observé quelle que soit la durée de mise en contact des cellules avec le milieu de culture (**Figure 43B**).

A



B

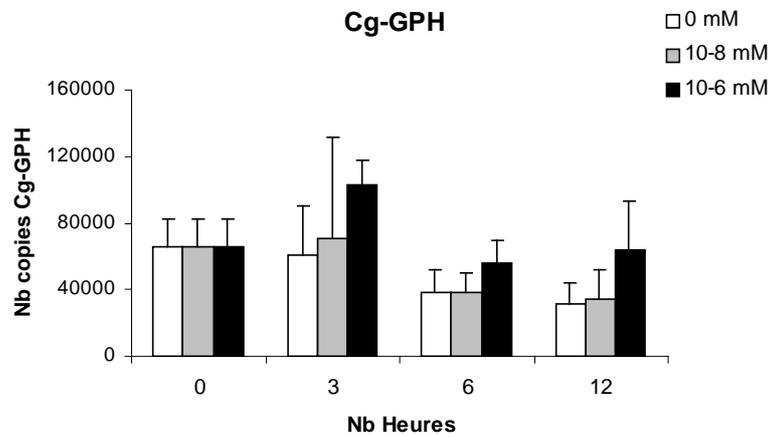


Figure 43 : Effet *in vitro* de l'insuline porcine sur la quantité de transcrits *Cg-GYS* (A) et *Cg-GPH* (B) de cellules de palpes labiaux mises en primo culture de 0 à 24h avec 0,5 mM de glucose et 0, 10⁻⁸ ou 10⁻⁶ M d'insuline. (moyenne \pm ET, n = 4). Les étoiles indiquent les différences entre les 3 concentrations en Insuline (ANOVA, $P < 0,05$).

4.2. Effet de l'insuline sur l'activité GS totale

Les cellules cultivées sans insuline comme celles cultivées avec 0 M, 10⁻⁸ M ou 10⁻⁶ M d'insuline montrent des variations de leur activité GS totale entre 0 et 12h de culture ($F = 4,92, 4,37$ et $6,65$ respectivement, $P < 0,01$). Cette activité diminue en effet dès 3h de culture pour les cellules sans insuline, dès 6h pour les cellules avec 10⁻⁸ M d'insuline et dès 12h pour les cellules avec 10⁻⁶ M d'insuline (**Figure 44**). Aucun effet *in vitro* de l'insuline n'est observé sur l'activité GS totale.

Partie 3 : Effet du niveau trophique, du glucose et de l'insuline

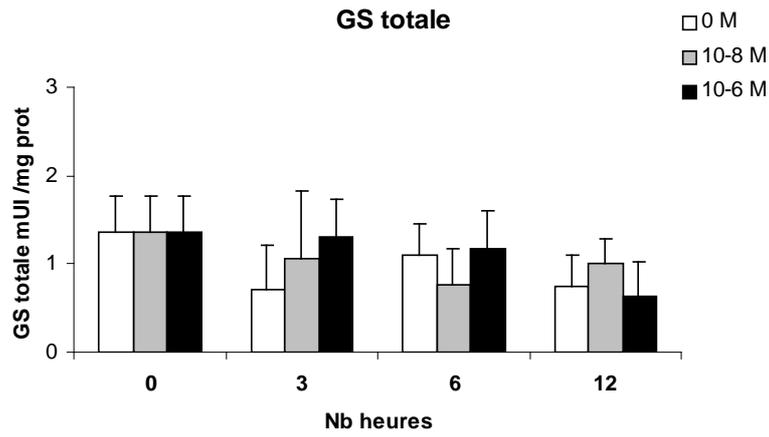


Figure 44 : Effet *in vitro* de l'insuline porcine sur l'activité spécifique de la GS totale pour des cellules mises en culture avec 0,5 mM de glucose et 0, 10⁻⁸ ou 10⁻⁶ M d'insuline. (moyenne \pm ET, n = 4).

L'activité GP totale était en dessous du seuil critique de détection de notre technique de dosage et n'a pas pu être réalisée sur ces échantillons.

5 Discussion

5.1. Effet *in vivo* du niveau trophique sur le métabolisme du glycogène

L'expérience menée a permis d'étudier la réponse trophique d'huître nourries à 0%, 6% et 12% de poids sec d'algues /poids sec d'huître pendant 16 jours sous conditions contrôlées, à la température de 11°C. Les palpes labiaux ont été choisis comme tissu d'étude car c'est un organe de stockage de glycogène de l'huître (Berthelin, 2000 ; Bacca *et al.*, 2005). Les huîtres d'élevage prélevées à l'Aber Wrac'h (Finistère Nord, Bretagne) au mois de janvier ne présentaient pas de développement gonadique apparent. La période d'expérimentation correspond à la période de maximum énergétique décrite dans la partie 2 de ce manuscrit.

5.1.1. Augmentation du taux de glycogène

Les résultats montrent une relation positive entre l'apport en algues et la quantité de glycogène des palpes en 16 jours de conditionnement. Les huîtres maintenues sans nourriture pendant 16 jours voient leur taux de glycogène diminuer alors que les huîtres alimentées avec 6% d'algues maintiennent leur réserves et les huîtres alimentées à 12% d'algues augmentent leur réserves en glycogène. Cet effet de l'alimentation est similaire à celui montré sur l'animal entier (Delaporte *et al.*, 2006). Nous n'avons pas mesuré l'évolution du taux de glucose circulant dans l'hémolymphe au cours de ce conditionnement. Cependant, nous pouvons supposer que la concentration en glucose circulant varie avec le niveau trophique, comme c'est le cas chez l'oursin (Worrell *et al.*, 2001).

Les régimes en algues imposés aux huîtres modifient l'expression et les activités de trois enzymes clefs du métabolisme des glucides : HK, GP et GS. Les questions immédiates sont : comment varient-elles avec le niveau en algues et quels sont leurs rôles dans l'augmentation du taux de glycogène. Est abordé l'effet du niveau trophique sur la voie de phosphorylation du glucose, de synthèse du glycogène et la voie d'utilisation du glycogène. Un dernier paragraphe propose un mécanisme explicatif de l'augmentation du glycogène dans les palpes.

5.1.2. Activation de la phosphorylation du glucose

L'HK est la première enzyme de la voie de la glycolyse (son produit est le G6P). Dans le foie de vertébrés, la Glucokinase (Hexokinase IV) est fortement impliquée dans le contrôle métabolique de la synthèse du glycogène (Ferrer *et al.*, 2003).

Après 8 jours d'alimentation à 6% ou 12% d'algues DW, les quantités d'ARNm *Cg-HK* mesurées dans les palpes sont plus élevées que pour les huîtres mises à jeun. Une augmentation rapide de l'activité HK est également observée dès le deuxième jour d'alimentation pour les huîtres nourries à 6% et 12% d'algues DW et jusqu'à la fin du conditionnement. Cette régulation nutritionnelle est similaire à celle trouvée dans la bibliographie notamment chez la truite arc en ciel (Fideu *et al.*, 1983 ; Panserat *et al.*, 2000) et la daurade royale *Sparus aurata* (Caseras *et al.*, 2000 ; Meton *et al.*, 2004 ; Panserat *et al.*, 2000). Nos résultats suggèrent une régulation transcriptionnelle de l'activité HK par la modulation de l'abondance des ARNm *Cg-HK*. Rappelons que chez les vertébrés supérieurs, l'activité HK est régulée par l'insuline au niveau transcriptionnel (Noussipiel & Iynedjian, 1992 ; Iynedjian, 1993). Chez la daurade, l'utilisation du glucose de l'alimentation serait également forcée par l'augmentation de l'abondance des ARNm de la Glucokinase du foie (Meton *et al.*, 2004).

5.1.3. Activation de la synthèse du glycogène

L'effet du niveau trophique sur la quantité d'ARNm *Cg-GYS* est identique à celui observé pour les ARNm *Cg-HK*. Les huîtres nourries montrent une plus grande quantité d'ARNm *Cg-GYS* que les huîtres à jeun aux 8^{ème} et au 16^{ème} jour de conditionnement. Un effet « dose » est même observé à la fin de l'expérimentation avec un niveau de transcrits *Cg-GYS* maximum pour le niveau 12%. Par ailleurs, la stabilité des ARNm *Cg-GYS* varie avec le niveau trophique. En effet après 16 jours de nutrition à 12% d'algues DW, le temps de demi-vie des ARNm *Cg-GYS* augmente de $9,3 \pm 0,2$ heures à $14,2 \pm 1,0$ heures. Le temps de demi-vie des ARNm *Cg-GYS* des huîtres à jeun et nourries à 6% d'algues DW reste inchangé. Les résultats supposent l'implication de la stabilité des ARNm *Cg-GYS* dans l'augmentation de leur l'abondance (contrôle post-transcriptionnel). Il existe quelques cas de régulation nutritionnelle de la GS au niveau du gène. Ainsi, un régime pauvre en glucose induit une chute de l'activité GS du muscle squelettique humain, par diminution de l'abondance de l'ARNm *GYS1* (Sparks *et al.*, 2006). La mise à jeun puis la ré-alimentation de rats conduit à l'augmentation du niveau de transcrits de la GS du foie, par augmentation de la vitesse de transcription du gène correspondant (Nur *et al.*, 1995).

Une augmentation rapide de l'activité GS totale est également observée à partir du troisième jour d'alimentation. Cette augmentation a lieu jusqu'à la fin de l'expérimentation avec un effet « dose ». Les huîtres non nourries gardent une activité GS totale constante tout au long du conditionnement. La question de la régulation enzymatique de la GS n'a pas pu être étudiée dans cette expérience. En effet, l'activité de la GS *I*

(déphosphorylée, G6P indépendante) était trop faible pour être mesurée dans les palpes labiaux. Cette faiblesse de l'activité GS *I* signifie sans doute que la GS *D* (moins active, phosphorylée, G6P dépendante) est la forme dominante *in vivo* pour ces huîtres. Cette observation a déjà été faite sur l'animal entier en période de synthèse du glycogène (Partie 2 de ce manuscrit).

L'augmentation de l'activité GS semble corrélée à l'abondance des ARNm *Cg-GYS* et peut-être à leur stabilité, suggérant un contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel de la GS par le niveau trophique. Les rôles de la régulation enzymatique et allostérique de la GS dans la réponse trophique restent à déterminer. L'ensemble de ces résultats confirme l'effet positif du niveau trophique sur l'activité de synthèse du glycogène visible chez l'animal par l'augmentation du taux de glycogène.

5.1.4. Modulation de l'utilisation du glycogène

La voie de dégradation du glycogène est catalysée par la GP. Chez l'huître, cette voie est impliquée dans le support énergétique de la reproduction (Bayne *et al.*, 1982) et dans la réponse aux stress, comme le stress hypoxique (David *et al.*, 2005).

Cas des huîtres à jeun

Le taux de glycogène des huîtres à jeun diminue entre 0 et 16 jours de conditionnement, ce qui suggère la compensation énergétique de l'absence de nourriture par l'utilisation du glycogène. La quantité de transcrits *Cg-GPH* augmente de façon transitoire au 8^{ème} jour mais une augmentation de l'activité GP totale n'est observée qu'après 16 jours de conditionnement. Ces résultats suggèrent une activation de la biosynthèse de GP, bien qu'une relation directe ne soit pas établie entre ARNm et activité. L'activité GP *a* reste constante pendant les 16 jours de conditionnement, les variations d'activité GP totale sont donc probablement dues à celle de l'activité GP *b*. Par ailleurs, l'activité GP *b* (0,45 UI/mg protéines) est neuf fois supérieure à l'activité GP *a* (0,05 UI/mg protéines), après 16 jours sans alimentation. La GP *b* est considérée comme la forme la moins active de la GP, mais serait impliquée dans la réponse à des demandes énergétiques progressives (San Juan Serrano *et al.*, 1998c). La GP *b*, dont l'activité catalytique dépend de l'AMP, serait activée lorsque la concentration en AMP augmente et celle du G6P diminue (San Juan Serrano *et al.*, 1998a et b, Partie 2 de ce manuscrit). Ce cas de figure est envisageable pour des huîtres restées à jeun pendant 16 jours. L'utilisation du glycogène provoquée par l'absence de nourriture serait donc entraînée par une possible activation de la biosynthèse de GP et une conversion enzymatique de la GP *a* vers la GP *b*.

Cas des huîtres nourries

Pour les huîtres alimentées à 6% et 12 % d'algues, la quantité de glycogène des palpes labiaux se maintient ou augmente après 16 jours de conditionnement, respectivement. Les profils de variations des niveaux de transcrits et des activités enzymatiques GP totale sont toutefois assez similaires à ceux des huîtres à jeun. Ils suggèrent l'augmentation de la biosynthèse de GP. Le temps de demi-vie des ARNm *Cg-GPH* diminue de $3,6 \pm 0,7$ heures à $0,8 \pm 0,4$ heures pour les huîtres nourries à 12% d'algues. Cette perte de stabilité constatée au 16^{ème} jour pourrait coïncider avec la chute d'ARNm *Cg-GPH* observées entre le 8^{ème} et le 16^{ème} jour. Même si la vitesse de transcription du gène n'est pas connue, une régulation post-transcriptionnelle du gène de la GP est ici envisageable. Dans cette expérience, l'effet de cette régulation potentielle n'est pas observé sur l'activité GP totale. Celle-ci augmente à partir du deuxième jour de nutrition et devient maximale au jour 16. Pour les huîtres nourries, l'activité GP *a* augmente avec le temps d'alimentation, à 6% comme à 12% d'algues. L'activité GP *a* reste toujours inférieure à l'activité GP *b*. L'augmentation d'activité GP serait donc la résultante d'une augmentation conjointe des activités GP *a* et GP *b*. Si l'activité GP est le reflet des besoins énergétiques de l'huître, ces résultats suggèrent que ceux-ci augmentent, malgré l'apport en algues. Une augmentation des dépenses énergétiques pourrait être due au démarrage de la gamétogenèse (multiplication des gonies). L'apport en algues pourrait représenter une condition environnementale propice au démarrage de la gamétogenèse, à l'opposé de la mise à jeun. Ce processus déclencherait des besoins énergétiques spécifiques au bout de plusieurs jours de conditionnement. Le glycogène est considéré comme le support énergétique de la reproduction chez les mollusques bivalves (L-Fando *et al.*, 1972 ; Bayne *et al.*, 1982 ; Ruiz *et al.*, 1992a et b ; Mathieu & Lubet, 1993).

L'activité GP des huîtres nourries serait donc sous l'influence de plusieurs facteurs : celle de l'alimentation, qui tend probablement à la réduire et celle d'une demande énergétique spécifique, qui tend probablement à l'augmenter. Le facteur trophique ne semble pas être le facteur forçant de la GP dans cette expérimentation, bien qu'une inhibition post-transcriptionnelle de sa biosynthèse soit suspectée. L'augmentation de l'activité GP totale n'empêche toutefois pas l'accumulation du glycogène observée dans les palpes des huîtres nourries à 12% d'algues.

5.1.5. Hypothèses sur la réponse trophique

Chez les mammifères, le système de régulation réciproque de la synthèse et de l'utilisation du glycogène est bien décrit ainsi que les effets du glucose de l'alimentation sur le métabolisme du glycogène (voir Partie Bibliographique). Chez l'huître, la régulation du métabolisme du glycogène est mal connue. Dans la deuxième partie de ce manuscrit nous avons décrit ses variations saisonnières. Dans cette partie, nous cherchons à décrire le contrôle du métabolisme du glycogène par le niveau d'alimentation.

L'alimentation des huîtres à 12% d'algues pendant 16 jours induit une augmentation du taux de glycogène des palpes labiaux, preuve finale de son effet positif sur ce métabolisme. Les résultats suggèrent une augmentation de la production de G6P par activation transcriptionnelle de l'HK. L'activité de synthèse du glycogène pourrait être augmentée par une activation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de la GS. L'effet du niveau trophique sur l'activité catalytique de la GP n'est pas élucidé, bien qu'un effet d'inhibition post-transcriptionnelle soit suspecté.

L'effet de effecteurs allostériques dans le contrôle de la réponse trophique reste à déterminer. La mesure des concentrations en G6P et en nucléotides adényliques n'a pas été réalisée dans cette expérience. Une augmentation de G6P consécutive à l'activation de l'HK aurait des effets positifs sur l'activité GS *D* et négative sur la GP *b* (forme dominante de la GP dans les palpes). Par ailleurs, une augmentation de la CEA, ou une diminution de l'AMP, pourrait induire une inhibition synergique de la GP *b in vivo*. Ces effets viendraient renforcer la voie de synthèse du glycogène et inhiber celle de sa dégradation.

L'ensemble de ces résultats suppose que la réponse trophique des huîtres est orchestrée par l'augmentation du taux de glucose circulant et par un probable signal hormonal de type insuline (hypoglycémiant). Cependant, l'effet direct du glucose et de l'insuline n'a pas encore été démontré sur les enzymes du métabolisme du glycogène. Cette question fait l'objet du paragraphe suivant.

5.2. Effet *in vitro* du glucose et de l'insuline sur le métabolisme du glycogène

Des travaux ont été conduits *in vitro* concernant l'effet du glucose et de l'insuline sur le métabolisme du glycogène. Pour cela, des cellules de palpes labiaux ont été dissociées et mises en culture dans du milieu L15 (voir matériel et Méthodes). Les concentrations en glucose et insuline testées étaient celles déjà utilisées dans les travaux de Berthelin (2000) sur l'incorporation du glucose marqué dans les cellules vésiculeuses de palpes.

Le maintien des cellules en vie doit encore être amélioré, la viabilité n'étant pas assez suffisante au-delà de 24h. A 24h, les cellules affichent un peu moins de 80% de survie, ce qui reste assez élevé mais suggère que des processus cellulaires sont modifiés par les conditions de culture. L'effet du glucose et de l'insuline *in vitro* a été testé plusieurs fois sur des cellules de palpes labiaux au cours de ce travail de thèse. Les graphes représentés sont représentatifs de l'ensemble des travaux effectués sur ce sujet.

5.2.1. Effet du glucose

L'ajout de 0,5 mM et 10 mM de glucose à des cellules de palpes provoque une augmentation très forte des ARNm *Cg-GPH* et *Cg-GYS* après 6h de primo culture comparé aux cellules témoins sans glucose. Cet effet est cependant transitoire et disparaît après 12h de culture. L'activité GP totale semble inhibée par 0,5 mM de glucose après 6h de culture alors qu'elle semble activée par 10 mM de glucose. Tout effet disparaît à 12h de

Partie 3 : Effet du niveau trophique, du glucose et de l'insuline

culture. L'activité GS totale est inhibée de façon dose dépendante par le glucose à 6h de culture mais cet effet disparaît également après 12h de culture. Si le glucose semble montrer un effet positif sur le niveau de transcrits des gènes de la GS et de la GP à 6h de primo culture, cet effet ne semble pas se répercuter sur les activités enzymatiques correspondantes. Il n'a pas été possible de mesurer les différentes activités GS *I* et GS *D* ou encore GP *a* et GP *b* car ces activités étaient en dessous des seuils limites de détection de notre technique de dosage enzymatique.

Ces résultats sont assez différents de ceux connus chez les vertébrés. Dans le foie de vertébrés, le glucose induit une activation de la GS et une inhibition concomitante de la GP via un système de régulation en cascade (Stalmans *et al.*, 1974 ; Hers *et al.*, 1970 ; Alemany & Cohen, 1986 ; Massillon *et al.*, 1995). Il n'a pas d'effet direct sur la quantité d'ARNm des gènes de la GS et de la GP mais il provoque une activation de la synthèse du glycogène par activation transcriptionnelle de l'HK (Seoane *et al.*, 1996) et modification des formes phosphorylées /déphosphorylées de la GS et de la GP. Chez le mollusque *Lymnaea stagnalis*, le glucose n'a pas non plus d'effet direct sur la GS *in vitro* (Hemminga *et al.*, 1985). D'après Berthelin (2000), le glucose n'aurait d'effet *in vitro* chez *C. gigas*, que lorsque les huîtres sont en période de synthèse du glycogène. Des travaux sur des cellules vésiculeuses semblent indiquer que le transport du glucose subit également des variations saisonnières (A.C. Hanquet, com. Pers.). Si la capacité de transport du glucose est faible, il n'aura pas d'effet sur les enzymes cytoplasmiques GS et GP. Les huîtres utilisées dans cette expérience de primo culture ont été utilisées au mois de février et proviennent de Plougastel (Finistère, France). C'est une saison limite entre la synthèse du glycogène et le démarrage de la gamétogenèse.

La question de l'effet direct du glucose sur le métabolisme du glycogène chez *C. gigas* n'est donc pas résolue. Il faudra tester cet effet pendant la phase de démarrage de la mise en réserve (octobre-novembre). L'expérimentation *in vitro* est aussi à améliorer d'un point de vue technique pour obtenir de meilleures viabilités cellulaires. Les concentrations de glucose testées (0,5 mM et 10 mM) sont proches des valeurs physiologiques trouvées dans l'hémolymphe de *M. edulis* (0 à 1,5 mM) (Lenoir, 1989).

5.2.2. Effet de l'insuline porcine

L'effet de l'insuline porcine a été testé sur des cellules de palpes. Les cellules furent maintenues dans 0,5 mM de glucose avec 0 M, 10^{-8} M ou 10^{-6} M d'insuline. Les mêmes problèmes de viabilité cellulaire furent rencontrés et les résultats sont donnés uniquement jusqu'à 12h de culture.

Un effet positif des deux concentrations d'insuline sur la quantité de transcrits *Cg-GYS* est observé à 3h de culture cellulaire. En revanche, il n'y a aucun effet mesuré sur l'activité GS totale. Il n'y a pas d'effet de l'insuline sur la quantité d'ARNm *Cg-GPH*. L'activité GP totale n'a pas pu être mesurée en raison de valeurs trop faibles. L'effet positif de l'insuline sur la quantité d'ARNm de la GS à 3h de primo culture suggère un effet ponctuel au niveau de la transcription du gène. Un résultat similaire est trouvé à partir de cellules hépatiques de

rat où l'insuline crée un pic d'ARNm GS à 4h de culture (Okubo *et al.*, 1991). L'absence de corrélation entre l'ARNm *Cg-GYS* et l'activité GS totale ne valide pas un effet fonctionnel de l'insuline porcine sur la synthèse du glycogène. Pourtant, Berthelin (2000) a montré un effet positif de l'insuline porcine à 10^{-12} , 10^{-8} et 10^{-6} M sur l'incorporation du glucose dans le glycogène. A noter cependant que l'auteur avait placé les cellules dissociées de palpes labiaux dans un milieu de culture sans potassium, afin de créer des conditions forçant l'entrée du glucose dans la cellule (favorise un flux sortant passif de K^+ et un flux entrant de Na^+ couplé avec le transport actif du glucose).

Certains travaux reportent l'effet d'insulines mammaliennes en présence de glucose sur l'activité GS totale de mollusques (Plisetskaia *et al.*, 1977, 1978, 1979) et sur la synthèse du glycogène (Berthelin, 2000). En revanche, ces résultats n'ont pas toujours été confirmés comme chez la moule *M. edulis* (Gabbott & Whittle., 1986). Il semble que les molécules apparentées à l'insuline des mollusques soient assez différentes de celles des vertébrés (voir partie bibliographique). C'est pourquoi, il est probable que l'absence d'effet sur l'activité GS soit due à un problème de spécificité de la molécule porcine sur les récepteurs à l'insuline d'huître. De plus, nous avons suggéré un effet saisonnier au niveau des transporteurs du glucose. L'insuline est l'hormone de réponse à l'augmentation du taux de glucose circulant. L'absence d'effet de l'insuline porcine sur l'activité GS pourrait aussi être la conséquence d'un faible transport du glucose.

L'expérience nécessite d'être approfondie à la fois en essayant de se placer à la saison de démarrage de la mise en réserve du glycogène et en améliorant les conditions de primo culture. Par ailleurs, il serait intéressant de tester l'effet de molécules insuline-likes d'organismes moins éloignés phylogénétiquement. Des travaux récents ont démontrés l'existence de molécules insuline-like endogène chez l'huître (P.Favrel, com. Pers.). Le récepteur ayant déjà été partiellement cloné (Gricourt *et al.*, 2003). L'ensemble de ces travaux suggèrent un véritable rôle de l'insuline chez l'huître.

6 CONCLUSION

Nous avons montré qu'après 16 jours d'alimentation à 6% et 12% d'algues, le taux de glycogène des palpes labiaux augmente et devient supérieur à celui d'huîtres non nourries. Nous avons donc cherché à comprendre quels mécanismes sont mis en jeu pour activer la synthèse du glycogène.

Un effet positif de l'alimentation en algues est observé sur l'HK et la GS. Cet effet est probablement transcriptionnel et post-transcriptionnel (pour la GS). L'effet du niveau trophique sur la GP est probablement masqué par une demande énergétique accrue en fin de conditionnement et qui s'apparente au démarrage de la gamétogenèse. Une inhibition post-transcriptionnelle de la GP par le niveau trophique est cependant suspectée. L'effet des effecteurs allostériques n'a pas été étudiée mais pourrait favoriser la voie de synthèse du glycogène comparée à la voie d'utilisation. En supposant que l'effet du niveau trophique observé *in vivo* est relayé par le taux de glucose et d'insuline circulant chez l'huître, nous avons cherché à mettre en évidence les mécanismes d'action de ces molécules *in vitro*. Aucun effet fonctionnel du glucose et de l'insuline porcine n'a pu être mis en

Partie 3 : Effet du niveau trophique, du glucose et de l'insuline

évidence sur les marqueurs du métabolisme du glycogène. La technique de maintien des cellules vésiculeuses de palpes reste cependant à améliorer. Ces résultats devront aussi être couplés à une détermination des capacités de transport membranaire du glucose.

**Partie 4 : Comparaison du métabolisme
du glycogène et du glucose d'huîtres
Résistantes et Sensibles aux
mortalités estivales**

1 Introduction

En France, l'ostréiculture constitue la première production de mollusques et repose essentiellement sur l'espèce *Crassostrea gigas* (ou huître japonaise). Le phénomène des mortalités estivales de *C. gigas* fut décrit dès 1945 au Japon (Koganezawa, 1974). En France, la filière de production d'huîtres connaît des mortalités massives depuis une vingtaine d'années (Renault *et al.*, 1994 ; Gouletquer *et al.*, 1998 ; Soletchnik *et al.*, 1999). Cependant, aucun pathogène spécifique n'a pu être systématiquement associé à ce phénomène. La cause des mortalités résulte en fait d'interactions complexes entre plusieurs facteurs environnementaux, physiologiques et en relation avec des pathogènes. Le programme national multidisciplinaire MOREST (MORTalités ESTivales d'huîtres) initié par l'IFREMER (2001-2005) a progressivement classé l'importance de ces facteurs en couplant des études réalisées sur estran et de façon expérimentale (Samain *et al.*, 2004a, 2004b, 2007 ; Soletchnik *et al.*, 2005). Les mortalités apparaissent lorsque la température dépasse les 19°C, suite à l'intervention d'un stress associé à la maturation des huîtres ou aux pratiques d'élevages (pathogène, pollution) (Soletchnik *et al.*, 2005, 2007 ; Gouletquer *et al.*, 1998 ; Gay *et al.*, 2004). Les résultats du programme MOREST démontrent également l'existence d'une importante composante génétique dans la survie estivale. Degremont et ses collaborateurs (2005) ont montré dans leur expérimentation que 45% de la variance observée dans la mortalité sur estran était expliquée par l'origine génétique des huîtres (familles). A travers une sélection divergente sur le caractère survie, des familles d'huîtres Résistantes (R) et Sensibles (S) aux mortalités estivales ont été produites (Degremont, 2003 ; Degremont *et al.*, 2005). De façon surprenante, l'héritabilité de ce trait est élevée, ce qui traduit l'existence d'un nombre limité de gènes d'intérêts portés par un seul locus. *A contrario*, il existe une complexe interaction de facteurs affectant la survie des huîtres. La forte héritabilité de la résistance ou de la sensibilité en font un bon modèle d'études pour la compréhension des mécanismes de survie estivale et de façon plus générale pour comprendre l'origine de la susceptibilité aux agents pathogènes.

Quelle(s) fonction(s) physiologique(s) héréditaire(s) de l'huître pourrai(en)t être différentes(s) et conduire à deux phénotypes de survie estivale ? Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au métabolisme du glycogène et à ce qui concerne la stratégie énergétique des huîtres. D'autres travaux rattachés au programme MOREST ont aussi été menés sur la fonction de reproduction des huîtres (Samain *et al.*, 2007a) ou encore sur leurs mécanismes de défense immunitaire (Delaporte, 2005).

Sur le plan énergétique, la période estivale est particulièrement difficile pour les huîtres creuses. La température augmente les coûts métaboliques globaux et les huîtres sont en gamétogenèse puis en maturation. Une hypothèse généralement avancée propose qu'en phase active de gamétogenèse, une huître consacre une très grande partie de son énergie à la reproduction, au détriment des fonctions de défense (Perdue *et al.*, 1981). L'animal doit trouver des stratégies d'apports en énergie via

Partie 4 : Comparaison d'huîtres Résistantes et Sensibles aux mortalités

l'alimentation ou l'utilisation de ses réserves (glucides, lipides et recyclage des acides aminés). Des différences d'investissement énergétique dans la reproduction (nombre et qualité des gamètes, taille de la gonade) peuvent probablement engendrer des différences de disponibilité énergétique en été. Ainsi, l'affaiblissement énergétique des huîtres pourrait les placer dans l'incapacité de répondre à un stress supplémentaire (pathogène ou pollution). Ces différences de stratégies de reproduction ont justement été observées sur plusieurs sites, entre les lots d'huîtres R et S (Moal *et al.*, 2003 ; Enriquez-Diaz *et al.*, 2003 ; Delaporte *et al.*, 2005 ; Samain *et al.*, 2007). Elles indiquent que les huîtres S présenteraient un effort de reproduction supérieur à celui des huîtres R (comparaison des indices de surface gonadique).

Le métabolisme du glycogène est central dans l'apport d'énergie. La première partie de ce travail de thèse fut de caractériser la GP et la GS puis de développer des connaissances sur le fonctionnement de ce métabolisme chez l'huître. Dans cette partie, l'objectif est d'appliquer ces acquis à la recherche de différences d'allocations d'énergie, entre les huîtres R et les huîtres S, en comparant les voies d'utilisation et de synthèse du glycogène. Les flux énergétiques ne sont pas exclusivement représentés par le métabolisme du glycogène, c'est pourquoi nous avons élargi cette comparaison au métabolisme des glucides. Ainsi, en collaboration avec le Muséum National d'Histoire Naturelle de Concarneau (Finistère, France), les niveaux de transcrits et activités enzymatiques des principaux marqueurs de la glycolyse (HK, PK), de la voie des pentoses phosphates (G6PDH) et l'enzyme reliant le métabolisme du glycogène au G6P (PGM) ont été étudiés chez les huîtres R et S.

Sont reportés, la comparaison du métabolisme des huîtres R et S :

- En conditions naturelles sur trois périodes de l'année pour le métabolisme du glycogène
- En conditions expérimentales reproduisant la période estivale pour le métabolisme des glucides dans l'animal entier, puis en fonction de deux conditions trophiques dans deux tissus d'intérêt : palpes labiaux et gonade-manteau.

2 *Comparaison du métabolisme du glycogène d'huîtres sélectionnées pour leur Résistance ou leur Sensibilité aux mortalités estivales, en conditions naturelles*

Des huîtres de phénotypes R et S, sélectionnées dans le cadre du programme MOREST, ont été suivies sur estran pendant un an (Baie des Veys, Normandie, France). Le suivi des animaux et les prélèvements ont été assurés par A.C. Hanquet-Dufour (LBBM Université de Caen, UMR PE2M) dans le cadre de son travail sur le transport du glucose chez l'huître. La mesure des paramètres a été effectuée sur les palpes labiaux de 3 fois 12 palpes labiaux aux mois d'octobre, novembre, mars, avril, juin et juillet (2004-2005).

2.1. ARNm *Cg-GYS* et activité GS totale

La quantité relative d'ARNm de la GS (*Cg-GYS*) varie en fonction de la saison pour les huîtres R comme les huîtres S élevées en Baie des Veys de mars à novembre ($F = 14,04$ et $10,80$ respectivement, $p < 0,01$). La quantité de transcrits *Cg-GYS* montre deux pics pour les deux types d'huîtres en avril et en octobre (**Figure 45**). En avril, le niveau de *Cg-GYS* est maximal (huîtres R : $Cg-GYS = 2,11 \pm 0,62$), en octobre, il est deux fois moins élevé. En été, le niveau de ce transcrit est faible. La quantité minimale est obtenue en juin, elle est 14 fois plus faible qu'en avril (huîtres R : $Cg-GYS = 0,15 \pm 0,06$). La seule différence entre les huîtres R et S est observée au mois de juillet où le niveau minimum d'ARNm *Cg-GYS* est plus faible pour les huîtres R comparé aux huîtres S ($t = -2,81$, $p < 0,05$).

L'activité spécifique GS totale varie en fonction de la saison pour les huîtres R et S élevée sur estran ($F = 14,26$ et $6,27$ respectivement, $p < 0,01$). Cette activité est forte de mars à juillet pour les deux souches d'huîtres (**Figure 45**). Elle est en revanche très faible en automne (octobre-novembre). Il n'y a pas de différence d'activité de synthèse du glycogène entre les huîtres R et S quel que soit le mois analysé.

2.2. ARNm *Cg-GPH* et activité GP totale

La quantité d'ARNm de la GP (*Cg-GPH*) varie également en fonction de la saison pour les deux souches d'huîtres R et S ($F = 95,06$ et $123,16$ respectivement, $p < 0,01$). Pour les deux phénotypes, la quantité d'ARNm *Cg-GPH* est élevée de mars à juin puis chute entre juin et octobre (**Figure 45**). Des niveaux très bas d'ARNm sont observés en octobre-novembre (8 fois inférieurs à ceux observés en

Partie 4 : Comparaison d'huîtres Résistantes et Sensibles aux mortalités

juin). Au mois d'avril, la quantité d'ARNm *Cg-GPH* des huîtres S est supérieure à celle des huîtres R ($t = -61,05$, $p < 0,01$).

L'activité spécifique GP totale varie également entre mars et novembre pour les huîtres R et S ($F = 66,92$ et $13,33$ respectivement, $p < 0,01$). L'activité de dégradation du glycogène diminue du printemps à l'automne (novembre) où elle atteint des valeurs minimales (**Figure 45**). Il n'y a aucune différence d'activité GP totale entre les huîtres R et S quel que soit le mois analysé.

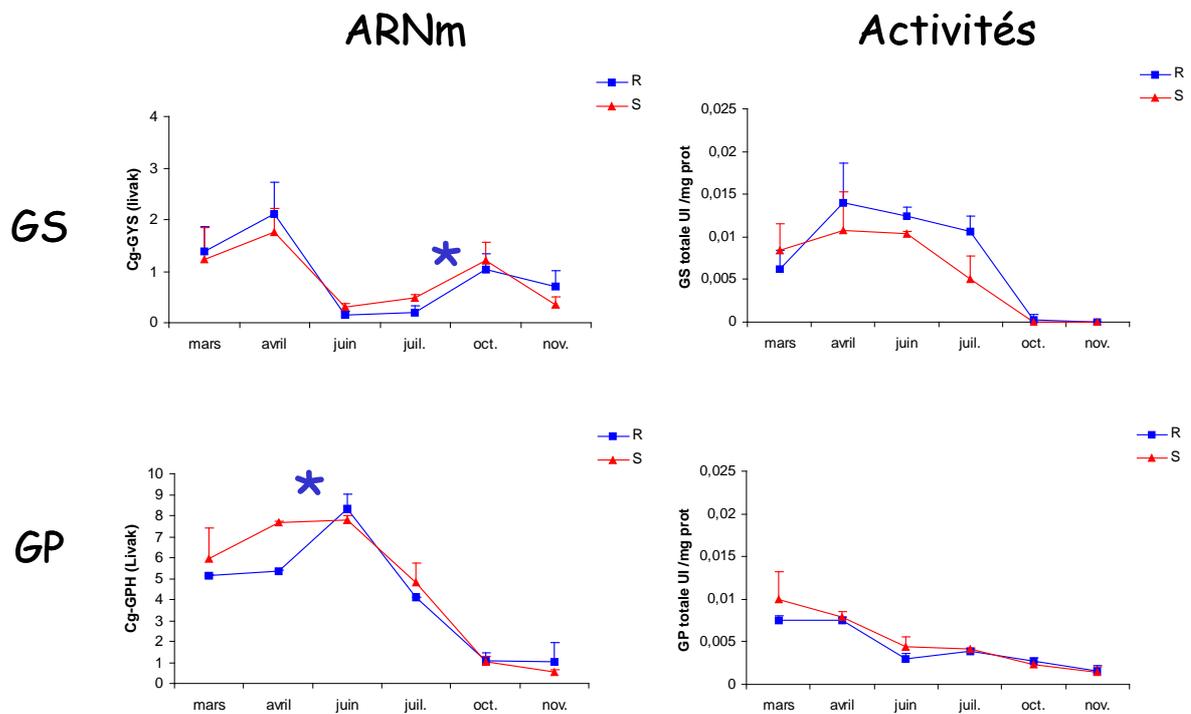


Figure 45 : Variations des quantités d'ARNm *Cg-GYS* et *Cg-GPH* et des activités spécifiques GS totale et GP totale en fonction des caractères Résistantes « R » et Sensibles « S » d'huîtres élevées *in situ* en Baie des Veys. (moyenne \pm ET, $n = 3$). Les étoiles représentent les différences entre R et S (Test t , $p < 0,05$).

2.3. Discussion

Le suivi sur estran des huîtres R et S âgées de 18 mois a été réalisé en Baie des Veys (Normandie, France). Les huîtres élevées en Normandie montrent un cycle de reproduction (Berthelin, 2000 ; Lambert *et al.*, 2003) légèrement décalé par rapport à des huîtres élevées dans le bassin de Marennes Oléron (Deslous-Paoli *et al.*, 1981) ou dans des conditions expérimentales imitant les conditions de température et de photopériode de Marennes Oléron (Pouvreau *et al.*, 2003 ; Fabioux *et al.*, 2005 ; Delaporte *et al.*, 2006). Les huîtres élevées dans les conditions de Marennes Oléron pondent en effet vers la mi-juillet alors que les huîtres élevées en Baie des Veys pondent plus tardivement à la fin du mois d'août. Ce décalage peut être attribué aux différences de réchauffement printanier caractérisant les deux lieux. En effet, la température comme la photopériode module entièrement le cycle gamétogénétique de l'huître (Fabioux *et al.*, 2005).

Partie 4 : Comparaison d'huîtres Résistantes et Sensibles aux mortalités

Les profils saisonniers de transcrits *Cg-GYS* et *Cg-GPH* concordent avec les variations annuelles des stocks en glycogène décrites pour les huîtres élevées en Normandie (Berthelin, 2000 ; Hanquet, Com. pers.). Le glycogène s'accumule de septembre jusqu'aux mois de mars-avril pour diminuer d'avril à juillet-août. Les périodes de forte abondance des transcrits *Cg-GPH* ou *Cg-GYS* s'opposent dans le temps comme pour les huîtres élevées en conditions expérimentales, cependant il n'y a pas d'opposition saisonnière entre les activités spécifiques de la GS et de la GP.

Dans cette expérience, bien qu'il existe de ponctuelles différences en terme de quantité d'ARNm, il n'y a aucune différence d'activité GS ou GP entre les huîtres R et S, quel que soit le mois d'analyse. Il n'y aurait donc aucune différence de fonctionnement entre les voies de synthèse et de dégradation du glycogène pour ces huîtres en Baie des Veys. Cependant, ce résultat n'est représentatif que du seul site de la Baie des Veys. D'autre part, nous n'avons pas étudié les enzymes clefs des autres voies du métabolisme des glucides, qui peuvent être, tout autant que la GS et la GP, impliquées dans la répartition des flux énergétiques.

Les différences de stratégies de reproduction entre des huîtres R et S élevées en Baie des Veys au stade 18 mois (milieu trophique riche) ont été caractérisées (Samain *et al.*, 2007b). Il y aurait peu de différences entre les deux lots d'huîtres pendant la phase de maturation des gamètes, hormis une légère avance temporelle des huîtres S par rapport aux huîtres R. Les mêmes observations ont été faites sur les huîtres R et S de ce conditionnement (Hanquet, Com. Pers.). Pourtant, d'une façon plus générale, sur l'ensemble des sites étudiés, les huîtres R ont un développement gonadique plus régulier que celui des huîtres S et des pontes totales. Les huîtres S investiraient plus dans la reproduction que les huîtres R. Mais en Baie des Veys, la faible montée en température bloque les processus de ponte.

Dans le paragraphe suivant, un ensemble plus large de paramètres biochimiques et d'enzymes a été étudié en milieu expérimental pour des huîtres R et S présentant des différences d'investissement dans la reproduction.

3 Comparaison du métabolisme des glucides d'huîtres R et S en conditions expérimentales

Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec A. Van Wormhoudt (Dr CNRS, MNHN Concarneau). Elle permet l'élargissement de la comparaison des huîtres R et S au métabolisme des glucides via l'étude de la quantité de transcrits et des activités spécifiques des marqueurs du métabolisme du glycogène mais également des marqueurs d'autres voies métaboliques du glucose (glycolyse, néoglucogenèse).

3.1. Comparaison des huitres R et S en période critique

Des huîtres R et S sélectionnées dans le cadre du programme MOREST ont été mises en conditionnement expérimental d'avril 2003 à Septembre 2003 (voir expérimentation GIGAREPRO2 dans « Matériel et Méthodes »). Les paramètres du métabolisme énergétique, du glycogène et des glucides ont été suivis pour 3 pools de 5 huîtres R ou S par mois, nourries avec une alimentation constante de 12% de poids sec d'algues par poids sec d'huître. La température et la photopériode étaient régulées pour reproduire celles du bassin de Marennes Oléron (Charente Maritime, France). La période d'étude choisie ici (mai à juillet) correspond à la période dite « critique » qui précède les mortalités estivales (rapportées en juillet dans cette expérimentation).

3.1.1. Taux de glucides, d'ATP et d'AMP

Le taux de glucides exprimés en % du poids sec d'huître, les taux d'ATP et d'AMP exprimés en pourcentage des nucléotides adényliques ont été déterminés sur une période allant de mai à juillet. Il n'y a pas de différences entre les huîtres R et S pour ces trois paramètres quel que soit le mois analysé.

Les trois paramètres montrent des variations sur les 3 mois d'analyses que ce soit pour les huîtres R ou S (**Figure 46**) (glucides, F = 9,3 et 21,78 ; ATP, F = 16,93 et 7,69 ; AMP, F = 23,25 et 8,69, respectivement pour R ou S, $p < 0,05$). Le taux de glucides diminue entre mai et juillet et atteint un minimum que ce soit pour les huître R et S. Le taux d'ATP diminue également entre mai et juillet pour les huîtres R et S. Le minimum est atteint en juillet mais il n'y a pas de différence entre les huîtres R et S. A l'opposé des glucides et de l'ATP, le taux d'AMP augmente entre mai et juillet pour les deux souches d'huîtres.

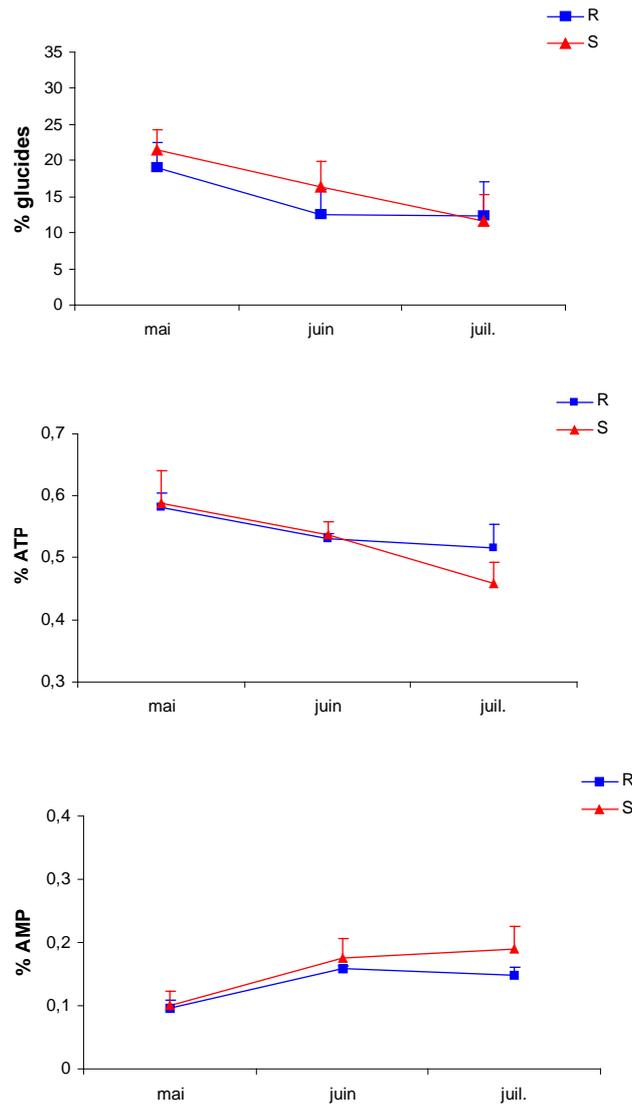


Figure 46 : Variations des taux de glucides, d'ATP et d'AMP de mai à juin en fonction du caractère R et S d'huîtres élevées en conditions expérimentales. (moyenne \pm ET, n = 3).

3.1.2. HK

L'HK est la première enzyme de la voie de la glycolyse. Elle permet la phosphorylation du glucose d'origine nutritionnelle en G6P. Il n'y a pas de différence de quantité d'ARNm de l'HK (*Cg-HK*) entre les huîtres R et S. Par contre, en juin, l'activité spécifique de l'HK est plus forte pour les huîtres R que S ($t = 6,33$, $p < 0,01$).

Pour les huîtres Résistantes seule la quantité d'ARNm *Cg-HK* diminue au cours des trois mois d'expérimentation ($F = 8,5$, $p < 0,05$) (**Figure 47**). Pour les huîtres Sensibles, ni la quantité d'ARNm *Cg-HK* ni l'activité spécifique HK ne varient de mai à juillet.

3.1.3. GP

La seule différence reportée entre les huîtres R et S se situe au mois de juillet où l'activité GP totale des huîtres S est plus élevée que celle des huîtres R ($t = -3,51$, $p < 0,05$). Il n'y a pas de différence au niveau de l'abondance des ARNm *Cg-GPH*.

Si le niveau de transcrits *Cg-GPH* reste constant pour les huîtres R de mai à juillet ($F = 3,03$, $p = 0,12$), il diminue pour les huîtres S ($F = 12,55$, $p < 0,01$) (**Figure 47**). L'activité GP totale ne varie pas non plus entre mai et juillet pour les deux souches d'huîtres ($F = 0,38$ et $0,10$, $p = 0,69$ et $0,90$ respectivement).

3.1.4. GS

La GS est l'enzyme de synthèse du glycogène. Il n'y a aucune différence de quantité d'ARNm et d'activité GS totale entre les huîtres R et S.

Les huîtres R et S élevées en conditions expérimentales montrent une diminution temporelle de leurs quantités d'ARNm *Cg-GYS* entre mai et juillet ($F = 5,30$ et $31,21$ respectivement, $p < 0,05$) (**Figure 47**). L'activité GS totale ne varie pas entre mai et juillet que ce soit pour les huîtres R ou S ($F = 0,41$ et $2,92$, $p = 0,68$ et $0,09$ respectivement). Les valeurs observées sont par ailleurs extrêmement faibles et ne dépassent pas les $0,09$ UI /mg protéines (**Figure 47**).

3.1.5. PGM

La PGM est l'enzyme bidirectionnelle qui relie le métabolisme du glucose (glycolyse) au métabolisme du glycogène. Elle permet la conversion du G6P en G1P et *vice versa*. En mai, il y a beaucoup plus de transcrits de la PGM (*Cg-PGM*) chez les huîtres R que S ($t = 5,05$, $p < 0,05$). Cette différence n'est pas observée sur l'activité PGM correspondante qui reste identique entre les deux lots d'huîtres.

Seule la quantité d'ARNm *Cg-PGM* des huîtres R diminue entre mai et juillet ($F = 81,47$, $p < 0,01$) (**Figure 47**). Elle reste constante pour les huîtres S ainsi que l'activité PGM des deux lots d'huîtres.

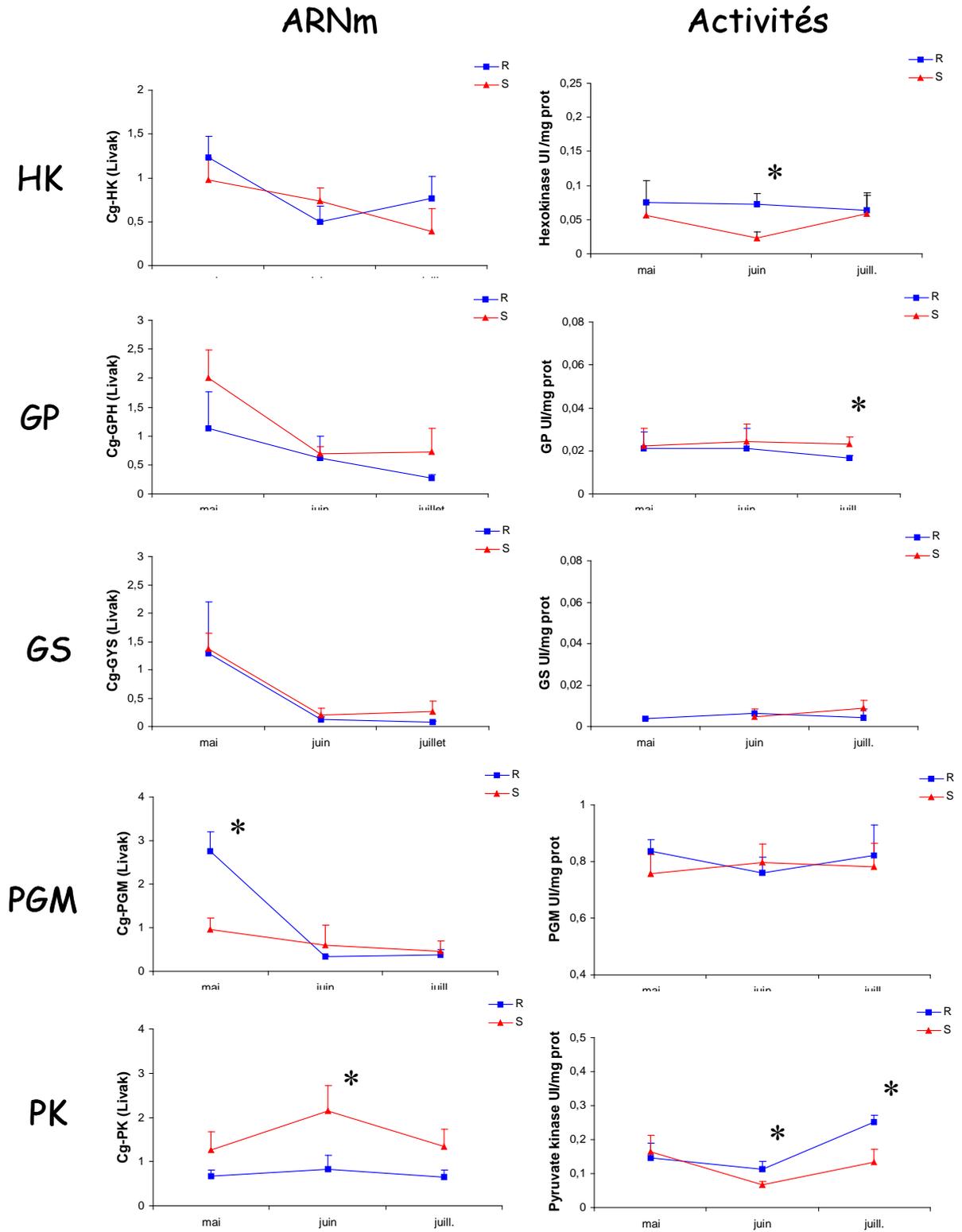


Figure 47 : Variations des quantités relatives d'ARNm *Cg-HK*, *Cg-GPH*, *Cg-GYS*, *Cg-PGM*, *Cg-PK* et des activités spécifiques HK, GP totale, GS totale, PGM et PK en fonction du caractère R ou S d'huîtres élevées en conditions expérimentales de mai à juillet. (moyenne \pm ET, n= 3). Les étoiles représentent les différences entre R et S (Test t, $p < 0,05$).

3.1.6. PK

La PK est l'enzyme de fin de glycolyse. Elle permet la formation de pyruvate qui peut ensuite être métabolisé via le cycle de Krebs et conduire à la fabrication d'ATP. Il y a plus de transcrits de la PK (*Cg-PK*) en juin pour les huîtres S que pour les huîtres R ($t = -3,82$, $p < 0,05$). De plus, l'activité PK des huîtres R est plus forte que celle des S en juin et en juillet ($t = 3,75$ et $4,09$ respectivement, $p < 0,05$).

Le niveau de transcrit *Cg-PK* ne varie pas au cours du temps pour aucune des huîtres R ou S ($F = 0,5$ et $2,53$, $p = 0,63$ et $0,38$ respectivement). Les activités PK des huîtres R et S augmentent au cours des trois mois d'expérimentation ($F = 13,63$ et $8,96$ respectivement, $p < 0,01$) (**Figure 47**).

3.1.7. Discussion : caractérisation énergétique des huîtres R et S en condition estivale expérimentale

Les huîtres R et S ont été nourries avec 12% de poids sec d'algues par poids sec d'huître, ce qui constitue une condition trophique riche. La période d'analyse va du mois de mai au mois de juillet, ce qui correspond à la période de gamétogenèse active dans ce cycle (Delaporte *et al.*, 2007, soumis). Des pontes partielles ont été observées en juin pour les huîtres S. Par ailleurs, les huîtres S semblent développer plus de gonade que les huîtres R, tel qu'il est suggéré par la teneur totale des huîtres en lipides. Une hausse rapide de la mortalité est notée au mois de juillet, plus importante pour les huîtres S que R (Delaporte *et al.*, 2007, soumis).

Il n'y a pas de différence de quantité de glucides, d'ATP ou d'AMP entre les huîtres R et S de mai à juillet, suggérant que le bilan des huîtres R et S est identique. Ces observations sont également valables pour des huîtres R et S maintenues dans d'autres conditions expérimentales (Enriquez-Diaz, 2004 ; Delaporte, 2005) et sur d'autres sites ostréicoles (Huvet *et al.*, 2007). L'analyse des paramètres biochimiques indique qu'entre mai et juillet, les taux de glucides totaux et d'ATP diminuent tandis que le taux d'AMP augmente. Ces profils de variations caractérisent la Phase 2 du cycle énergétique décrit précédemment (Partie 2). Les huîtres sont donc soumises à de fortes demandes énergétiques liées à la gamétogenèse.

La mesure des paramètres biochimiques ne permet pas d'évaluer les flux de l'énergie issue de l'alimentation, du glycogène ou du recyclage des acides aminés aux différentes fonctions de défense, de croissance et de reproduction. De ces allocations, et donc des stratégies énergétiques de l'animal, peut dépendre la survie de l'animal face à un stress.

3.1.8. Discussion : Comparaison des huîtres R et S en condition estivale expérimentale

C'est dans le but d'étudier les différences de flux d'énergie entre les huîtres R et S que nous avons déterminé les niveaux relatifs de transcrits et les activités spécifiques des enzymes impliquées dans le contrôle de la voie d'entrée du glucose par la phosphorylation du glucose (HK), de la voie de synthèse /dégradation du glycogène (PGM, GS, GP) et dans la voie d'entrée du cycle de Krebs (fabrication d'énergie à partir du glucose) (PK).

Dans cette étude expérimentale, il existe trois différences fonctionnelles entre les huîtres R et les huîtres S. En juin, les huîtres R montrent une activité HK plus forte que celle des huîtres S. L'HK est l'enzyme d'entrée de glycolyse et nous savons qu'elle est positivement contrôlée par le niveau trophique (Partie 3 de ce manuscrit). Par ailleurs, la quantité d'ARNm et l'activité PK des huîtres R est plus élevée que celle des huîtres S, en juin et juillet. A l'inverse, les huîtres S montrent une meilleure activité GP que les huîtres R en juillet. Ces observations peuvent trouver plusieurs explications.

Une différence de nutrition ?

Dans le cadre du programme MOREST, les premiers résultats sur la comparaison des différences entre les huîtres R et S font apparaître une augmentation des signaux de stress principalement chez les huîtres S (protéines HSP 70 et Espèces Oxygénées Réactives) (Samain *et al.*, 2007a et Delaporte *et al.*, soumis). Il est donc très probable que les huîtres S soient fortement perturbées pendant la gamétogenèse. De plus, Le Moullac et ses collaborateurs (in prep.) ont montré que les huîtres S ont leur capacité d'ingestion qui diminue en conditions expérimentales stressantes, contrairement aux huîtres R. Une forte baisse de l'indice de Walne et Mann un mois avant la mortalité pourrait traduire un amaigrissement, résultant de la diminution de l'ingestion dans un contexte de fortes demandes énergétiques liées à la reproduction et à la température. Par conséquent, la faiblesse des activités HK et PK observée pour les huîtres S, comparées aux huîtres R, pourrait traduire ce problème de nutrition des huîtres S. En effet, la diminution des apports trophiques conduirait à une diminution du taux de glucose circulant et donc à une baisse de l'activité de glycolyse. Le manque de substrat énergétique conduirait alors les huîtres S à puiser dans leurs réserves en glycogène, pourtant quasi épuisées. C'est pour cela que l'activité GP serait plus forte pour les huîtres S au mois de juillet, comparativement aux huîtres R.

Dans cette expérimentation, nous n'avons pas mesuré la capacité d'ingestion des huîtres. Nous pouvons donc formuler une seconde hypothèse à partir des résultats.

Une différence d'acquisition d'énergie ?

L'HK et la PK contrôlent respectivement les voies d'entrée et de sortie de la glycolyse. Cette voie débouche sur la fabrication d'énergie, via le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire.

S'il n'existe pas de différence en terme d'ingestion entre les deux lots d'huîtres, il se peut donc que les huîtres R présentent une meilleure activité glycolytique que les huîtres S. Les huîtres S montrant de leur côté une plus forte utilisation du glycogène, à une époque où celui-ci est quasiment épuisé. Vu l'implication de la glycogénolyse dans le support énergétique de la reproduction, cela suppose que le métabolisme des huîtres S est plus largement tourné vers la reproduction que celui des huîtres R. Dans le cadre du programme MOREST, certains travaux montrent en effet une absence de réaction aux conditions estivales de la part des huîtres S et un maintien de leurs allocations énergétiques à la reproduction (Huvet *et al.*, 2007). A contrario, les huîtres R feraient profit de l'abondance de nourriture pour fabriquer plus d'énergie et « assurer la survie ». Elles pourraient ainsi répondre aux demandes énergétiques liées aux processus de reproduction et à l'élévation de la température.

3.2. Réponse trophique des huîtres R et S en période critique

Des huîtres R et S étudiées ici sont issues du conditionnement expérimental de 2003 (voir expérimentation GIGAREPRO2 dans « Matériel et Méthodes ». Les niveaux d'ARNm de l'HK, la GP, la GS, et la PK ont été mesurés au mois de juin dans deux tissus caractérisés de « réserves en glycogène » : les palpes et la région gonade-manteau. Ces mesures ont été effectuées sur des animaux mis à jeun pendant un mois (0%) ou nourris avec un régime algal constant de 4% ou 12% de poids sec d'algues /poids sec d'huître. Le mois de juin correspond à la période critique qui précède les épisodes de mortalité estivale (observés en juillet dans cette expérimentation). La **Figure 48** représente l'ensemble des résultats.

3.2.1. HK

Palpes labiaux

Le niveau d'ARNm *Cg-HK* est plus fort pour les huîtres R que S alimentées avec 12% d'algues DW ($t = -8,39$, $p < 0,01$). La quantité relative de transcrits *Cg-HK* des palpes augmente avec le niveau trophique pour les huîtres R ($F = 185$, $p < 0,01$) mais reste constante pour les huîtres S ($F = 3,04$, $p = 0,09$). Elle montre un maximum à 12% d'algues DW.

Gonade-Manteau

Les niveaux maximums sont observés après un mois de mise à jeun, il y a plus d'ARNm pour les huîtres R que S dans cette condition ($t = -2,98$, $p < 0,05$). A l'opposé, la quantité de transcrits *Cg-HK* diminue avec le niveau trophique dans la région gonade-manteau pour les huîtres R et S ($F = 163$ et $7,73$ respectivement, $p < 0,05$).

3.2.2. GP

Palpes labiaux

Pour les huîtres nourries à 12% d'algues DW, il y a plus de transcrits *Cg-GPH* pour les huîtres R que pour les huîtres S ($t = -3,02$, $p < 0,05$). Il n'y a pas d'effet du niveau trophique sur la quantité d'ARNm *Cg-GPH* des palpes que ce soit pour les huîtres R ou S ($F = 4,48$ et $4,32$, $p = 0,09$ et $0,10$ respectivement).

Gonade-manteau

Il n'y a aucune différence entre R et S pour ce transcrit. La quantité d'ARNm *Cg-GPH* des huîtres R augmente avec le niveau trophique dans la région gonade-manteau ($F = 5,51$, $p < 0,05$). Celle des huîtres S reste constante quel que soit le niveau trophique ($F = 2,97$, $p = 0,06$).

3.2.3. GS

Palpes labiaux

Il n'y a aucune différence entre R et S dans ce tissu. La quantité d'ARNm *Cg-GYS* des palpes augmente avec le niveau trophique pour les huîtres R ($F = 16,22$, $p < 0,01$) mais reste constante pour les huîtres S ($F = 3,51$, $p = 0,06$).

Gonade_manteau

Les huîtres R mises à jeun pendant un mois montrent une quantité de transcrits GP plus forte que celle des huîtres S de la même condition ($t = -2,97$, $p < 0,05$). La quantité de transcrits *Cg-GYS* de la gonade diminue avec le niveau trophique pour les huîtres R ($F = 18,95$, $p < 0,01$). Elle reste constante pour les huîtres S ($F = 0,79$, $p = 0,48$).

3.2.4. PK

Palpes labiaux

Il n'y a aucune différence entre R et S pour ce transcrit et dans ce tissu. La quantité de transcrits *Cg-PK* des palpes labiaux augmente avec le niveau trophique pour les huîtres S ($F = 6,14$, $p < 0,05$). Elle reste constante pour les huîtres R ($F = 3,29$, $p = 0,09$).

Gonade-manteau

Il n'y a pas de différence significatives entre les huîtres R et les huîtres S. De façon inverse, le niveau d'ARNm *Cg-G6PDH* diminue avec le niveau trophique pour les huîtres R comme S ($F = 9,10$ et $14,35$ respectivement, $p < 0,05$).

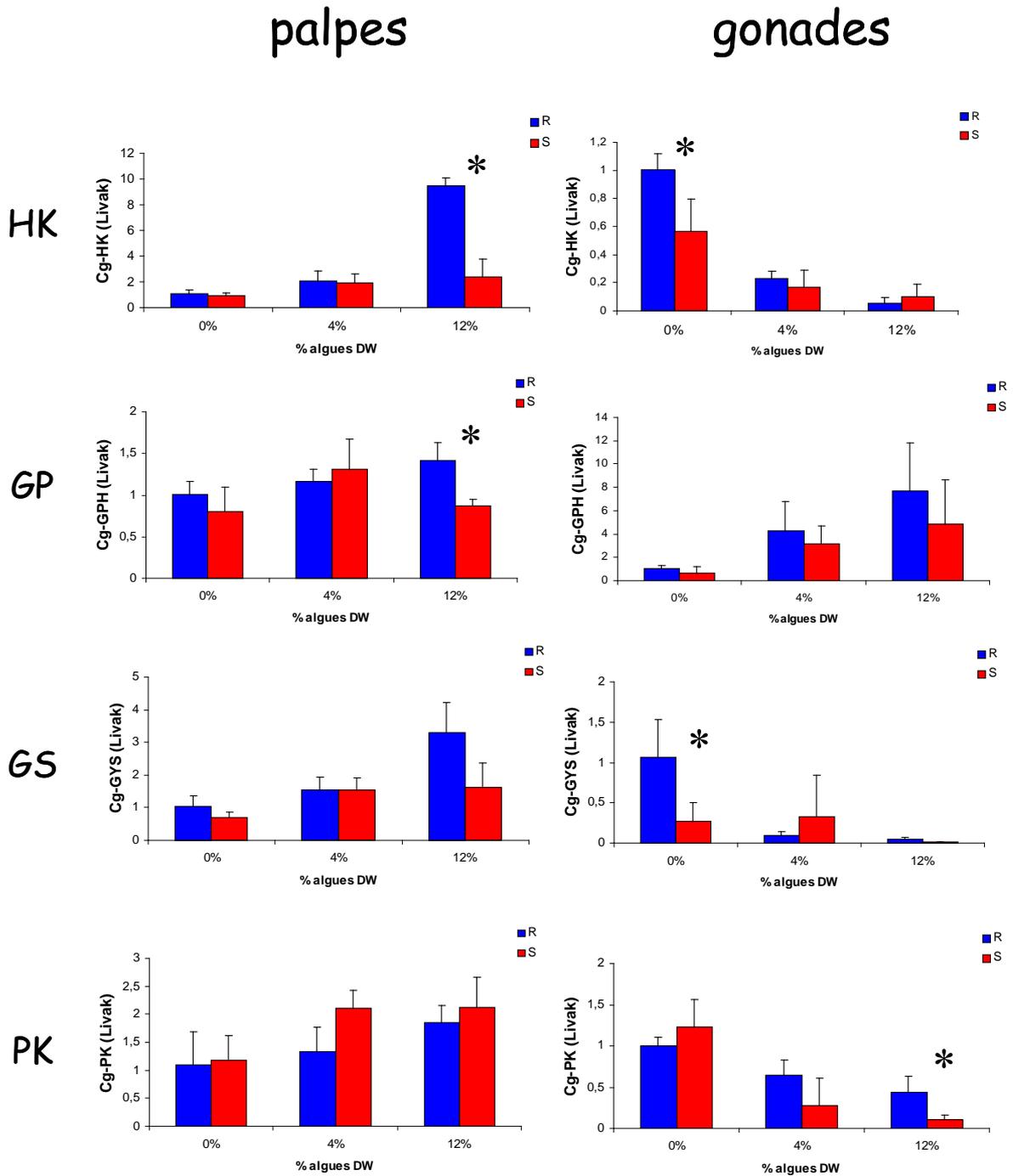


Figure 48 : Réponse trophique des huîtres R et S en période critique. Quantités d'ARNm (Livak & Schittgen, 2001) *Cg-HK*, *Cg-GP*, *Cg-GYS* et *Cg-PK* des palpes labiaux et de la région gonade-manteau (moyennes \pm ET, n = 4). Les étoiles représentent les différences entre R et S (Test t, $p < 0,05$).

Lorsque les réserves de l'huître sont au plus bas, comme en période estivale, l'apport de nourriture revêt un caractère primordial dans l'équilibre du bilan énergétique. Palpes et région gonadomanteau sont les deux tissus de stockage du glycogène caractérisés chez l'huître (Berthelin, 2000). Les niveaux relatifs de transcrits de l'HK, de la GP, de la GS et de la PK ont été déterminés dans ces deux tissus. Nous n'avons pas pu mesurer les activités enzymatiques correspondantes par manque d'échantillon.

3.2.5. Discussion : Réponse trophique dans les palpes labiaux

Les différences de quantités d'ARNm reportées entre les huîtres R et les huîtres S sont significatives pour les huîtres fortement nourries (12% d'algues). Il y a en effet plus d'ARNm *Cg-HK*, *Cg-GPH* pour les huîtres R nourries à 12% d'algues que pour les huîtres S nourries au même niveau. La même tendance est observée pour l'ARNm *Cg-GYS*. L'interprétation des résultats peut être faite de deux manières, comme vu précédemment. Soit les huîtres S présentent une diminution de leur capacité d'ingestion en juin, et l'apport en glucose n'augmente pas avec le niveau en algues, conduisant à une plus faible expression du gène de l'HK, par rapport aux huîtres R. Soit, les huîtres R présentent de meilleures performances que les huîtres S, par exemple en ayant un taux de biosynthèse de l'HK et de la GP supérieur aux S, ce qui pourrait conduire à une meilleure utilisation du glucose fourni par l'alimentation et par le glycogène.

Pour les huîtres R, les variations d'ARNm *Cg-HK* et *Cg-GPH* induites par le niveau en algues sont similaires à celles décrites dans la Partie 3 de ce manuscrit. Les huîtres S répondent au niveau trophique par une augmentation du niveau d'ARNm *Cg-PK*. La PK n'a pas été étudiée préalablement chez l'huître, mais chez les mammifères, l'expression du gène de la PK est positivement contrôlée par l'alimentation, spécialement par les glucides alimentaires (Yamada & Noguchi, 1999). L'activité PK augmenterait aussi en réponse à la nutrition chez les poissons, mais il n'existe pas de données claires sur les mécanismes de cette régulation (*e.g.* Borrebaek & Christophersen, 2000). Cette augmentation du niveau d'ARNm *Cg-PK* ne va pas dans le sens d'une possible diminution de l'ingestion des huîtres S. Cependant, la PK, comme la GP serait contrôlée à la fois par le taux de glucose circulant (donc par l'ingestion de nourriture) et par les besoins énergétiques liés à la reproduction ou à un stress environnemental. Les huîtres S semblent montrer plus de signaux de perturbations physiologiques que les huîtres R et s'investissent plus largement dans la reproduction (Samain *et al.*, 2007b ; Delaporte *et al.*, soumis). La demande énergétique des huîtres S est donc probablement plus élevée que celle des huîtres R.

L'ensemble de ces résultats nécessite confirmation par l'analyse des activités enzymatiques correspondantes.

3.2.6. Discussion : Réponse trophique dans la gonade

Dans la gonade, les différences entre les huîtres R et les huîtres S sont principalement observées pour les animaux à jeun (0% d'algues). Les niveaux d'ARNm *Cg-HK* et *Cg-GYS* sont plus élevés pour les huîtres R que S. Il y a également plus d'ARNm *Cg-PK* pour les huîtres R nourries à 12% que pour les huîtres S. Ces résultats continuent d'alimenter les deux hypothèses concernant la perturbation alimentaire des huîtres S et le probable avantage glycolytique des huîtres R.

Pour les 4 niveaux d'ARNm étudiés, la réponse au niveau trophique de la gonade est opposée à celle des palpes labiaux, pour les huîtres R comme pour les huîtres S. L'effet de la quantité d'algues est négative sur les niveaux de transcrits de l'HK, de la GS et de la PK. Il est positif sur la quantité d'ARNm de la GP. Quelles peuvent être les raisons de cette opposition de réponse entre les deux tissus ?

Palpes et gonade sont fonctionnellement différents. En effet, comparée aux palpes labiaux, la région gonade-manteau est à la fois un organe de stockage du glycogène (lors des premières phases du cycle de reproduction), puis un organe de reproduction. Le tissu de réserve, qui contient les cellules vésiculeuses impliquées dans le stockage du glycogène est très réduit dans la gonade, au mois de juin (Berthelin, 2000). Il est remplacé progressivement par des gamètes (Delaporte, 2005). Le tissu gonadique est envahi par des tubules remplis d'ovocytes ou de spermatozoïdes (Fabioux *et al.*, 2005). Les gènes de l'HK, la GS et la PK ne sont probablement pas beaucoup exprimés dans ces types cellulaires. Le niveau trophique joue un rôle dans le déterminisme de la gamétogenèse en favorisant l'investissement énergétique des huîtres vers la reproduction (Enriquez-Diaz, 2004 ; Delaporte, 2005). Il se peut donc, que pour les huîtres les plus nourries, le rapport du nombre de cellules exprimant les gènes du métabolisme des glucides sur les cellules gonadiques soit inférieur à celui des huîtres les moins nourries. L'effet du niveau trophique sur les quantités d'ARNm du métabolisme des glucides serait donc dilué, comparé aux palpes.

Le gène de la GP est fortement exprimé dans les palpes et dans la gonade, comparées à 4 autres tissus d'huître (branchies, glande digestive, muscle, bord de manteau) (Bacca *et al.*, 2005). Dans la gonade des huîtres R, l'abondance de l'ARNm *Cg-GPH* augmente avec le niveau trophique, suggérant une élévation de l'utilisation du glycogène. Nous avons vu dans la Partie 3 que le contrôle de la GP pourrait être dominé par la demande énergétique de la reproduction, plus que par le niveau trophique. Ce contrôle prendrait encore plus d'importance dans la gonade. Ces résultats peuvent être rapprochés des résultats obtenus dans MOREST, qui montrent que plus les huîtres sont nourries, plus l'investissement dans la reproduction est fort, et plus le risque de mortalité est fort, que ce soit pour les huîtres R ou S (Samain *et al.* 2007a).

4 Conclusion

L'objectif de cette partie du travail était de comparer le métabolisme des glucides d'huîtres Résistantes et Sensibles aux mortalités estivales et de mettre en évidence de possibles différences de stratégies énergétiques en relation avec leur caractère de survie estivale. L'huître creuse développe sa gamétogenèse pendant les blooms planctoniques printaniers de façon plus ou moins importante selon l'intensité du bloom. A la fin du printemps, l'huître se trouve dans une situation énergétique délicate avec des besoins métaboliques au maximum et des réserves en glycogène au minimum. A ce moment la nourriture en provenance directe du milieu est cruciale.

Un premier suivi dans les conditions naturelles de la Baie des Veys à trois périodes du cycle de reproduction aboutit à l'absence de différences entre les huîtres R et S, en terme de régulation du métabolisme du glycogène. De fortes conditions trophiques réduisent les différences de reproduction observées généralement entre les huîtres R et S (Samain *et al.*, 2007a). Les résultats de ce suivi en conditions naturelles ne sont donc représentatifs que de ce seul site. Les variations des paramètres du métabolisme du glycogène présentent un décalage temporel avec les variations décrites dans le cycle expérimental imitant les conditions de Marennes Oléron. Ceci serait dû à des cycles de températures décalés entre ces expérimentations.

En conditions expérimentales, des huîtres R et S présentant des différences d'investissement dans la reproduction ne montrent aucune différence en terme de stocks de constituants biochimiques entre mai et juillet. Cependant, il existe probablement des différences d'allocation de l'énergie entre les deux lots d'huîtres. Ces différences sont suggérées par les quantités d'ARNm et les activités enzymatiques de plusieurs enzymes du métabolisme des glucides, à l'échelle de l'animal entier et des tissus de stockage du glycogène.

Une diminution de l'apport alimentaire des huîtres S pourrait d'une part conduire à une plus faible quantité de glucose circulant et donc à une plus faible utilisation de celui-ci. Les huîtres S ont déjà montré une diminution de leur capacité d'ingestion, sous certaines conditions, en période estivale (Le Moullac *et al.*, in prep). Une perturbation physiologique les rendrait incapables de répondre favorablement à une augmentation du niveau trophique. Pour appuyer cette hypothèse, il faudrait vérifier le comportement alimentaire des huîtres R et S en conditions expérimentales lorsque la température augmente.

S'il n'existe pas de différence de capacité d'ingestion entre les deux lots d'huîtres, les différences de quantités d'ARNm et d'activités enzymatiques observées entre les huîtres R et S peuvent être dues à des différences de biosynthèse des enzymes (expression du gène, traduction) et/ou des différences dans les paramètres enzymatiques (K_m) de l'HK et de la PK. Le marqueur montrant le plus de différentiel R/S est l'HK. Il existe possiblement une modification génétique qui rend l'HK des

huîtres R plus active que celle des huîtres S. Cette modification pourrait également moduler le système d'expression de ce gène entre les deux lots d'huîtres. Les huîtres R auraient alors de meilleures performances glycolytiques que les huîtres S. Elles auraient plus d'énergie disponible que les huîtres S.

Enfin, les résultats obtenus dans la gonade, supposent que ce tissu n'est pas le lieu d'expression majoritaire de l'HK et de la GS. Il est possible que le petit nombre de cellules vésiculeuses présentes à cette saison explique l'opposition de réponse entre les palpes et la gonade, le signal exprimé par les cellules vésiculeuses étant « dilué ». Seule la GP, fortement exprimée dans la gonade (Bacca *et al.*, 2005) montre une réponse positive au niveau trophique (pour les huîtres R comme S). Ceci rappelant que plus la nourriture est abondante, plus l'investissement énergétique dans la reproduction est intense. En effet, l'excédent d'énergie apporté par une forte ration alimentaire est systématiquement investi dans le développement d'une gonade plus volumineuse (Delaporte, 2005).

D'après nos résultats, couplés à ceux du programme MOREST, les huîtres Résistantes aux mortalités pourraient adopter une stratégie d'utilisation du glucose alimentaire plus efficace que celle des huîtres Sensibles (meilleure capacité d'ingestion ou meilleur taux métabolique). Les huîtres R feraient profit de l'abondance de nourriture pour fabriquer plus d'énergie et « assurer la survie ».

**PARTIE 5 : Discussion générale,
conclusion et perspectives**

1 *Discussion générale*

1.1. Obtention d'outils moléculaires et techniques d'analyses spécifiques à l'huître

Au cours de notre étude, nous avons caractérisé les séquences complètes des ARNm *Cg-GPH* et *Cg-GYS* codant respectivement les enzymes GP et GS. **Ces séquences montrent une forte homologie avec leurs orthologues respectifs d'invertébrés et de vertébrés.** La position de phosphorylation par la Phosphorylase kinase (résidu 14), les sites de fixation des substrats (site actif) ainsi que les motifs impliqués dans le contrôle allostérique (sites des nucléotides et des nucléosides) ou l'attachement des sous unités de la GP sont très conservés. Les 9 positions de sérines phosphorylables décrites pour la GS de vertébrés sont en partie conservées pour la GS d'huître (Poulter *et al*, 1988 ; Browner *et al*, 1989 ; Skurat et Roach, 1996). Aucun des sites de phosphorylation de la GS impliqués dans la réponse au glucagon ne sont conservés chez l'huître (sites de la protéine kinase A et des protéines AMPc-dépendantes).

L'obtention des séquences *Cg-GPH* et *Cg-GYS* a rendu possible l'analyse du niveau d'expression des gènes de la GP et de la GS chez *C. gigas*. Les ARNm peuvent être quantifiés de façon relative à un gène de référence c'est à dire à un standard interne (*e.g.* Livak et Schmittgen, 2001). Ils peuvent aussi être quantifiés par rapport à la séquence d'intérêt clonée dans un plasmide, dont la concentration est connue (*e.g.* Pfaffl & Hageleit, 2001 ; Pfaffl *et al*, 2002). **Cette méthode de quantification absolue des ARNm a été choisie pour mesurer le nombre exact de copies d'ARNm *Cg-GPH* ou *Cg-GYS* présents dans des tissus ou des primo-cultures de cellules de palpes.** Associée à un algorithme précis de traitement de données, elle atteint un niveau de précision supérieur à celui des méthodes de quantification relatives utilisées jusqu'alors.

Les dosages des activités GP et GS ont été optimisés pour *C. gigas*, afin de mesurer l'activité des formes phosphorylées (GP *a*, GS *D*) et déphosphorylées (GP *b*, GS *I*). Le Km de la GP *a* pour le glycogène est de 0,78 mg /ml et de 1,03 mg /ml pour la GP *b*. Ces valeurs sont similaires à celles déterminées en 1993 par Hata *et al.* chez *C. gigas*. Le Km de la GS *I* pour l'UDPG est de 0,30 mM et celui de la GS *D* est de 2,74 mM. Ces valeurs sont très proches de celles trouvées chez la moule *M. edulis* (Cook & Gabbott, 1978). L'effet *in vitro* des effecteurs allostériques G6P, AMP et ATP n'a pas été étudié avec précision sur le dosage des activités GP et GS. Les constantes d'inhibition et d'activation restent en effet à déterminer.

1.2. Première description des variations annuelles du métabolisme du glycogène

Trois phases du cycle des paramètres énergétiques ont été décrits en milieu contrôlé. Ces événements énergétiques sont parfaitement corrélés aux événements de la reproduction.

La **phase 1** (mars-avril) est qualifiée « d'énergie maximale » et correspond à des taux de glycogène, de glucose et d'ATP élevés. L'huître amorce sa gamétogenèse. La **Phase 2** (avril-juillet) est une période de fortes demandes énergétiques et d'utilisation du glycogène où le glucose libre et l'ATP chutent de façon opposée à l'ADP et l'AMP. L'huître est alors en gamétogenèse active. Après la ponte (juillet), la **Phase 3** correspond à l'accumulation du glycogène où le glucose libre et l'ATP augmentent alors que l'ADP et l'AMP diminuent. L'huître résorbe ses gamètes puis entre en phase de croissance somatique. Ces phases correspondent à celles décrites par Delaporte (2005).

Le taux de glycogène est positivement corrélé à la concentration en ATP comme chez *M. edulis* (Skjoldal & Barkati, 1982) et *M. galloprovincialis* (Blanco *et al.*, 2006). Les orientations saisonnières du métabolisme du glycogène ne sont pas entièrement corrélées aux variations de la ressource trophique comparé à *M. edulis*.

Les ARNm *Cg-GPH* et *Cg-GYS* sont préférentiellement exprimés dans les palpes labiaux et la région gonade manteau (Bacca *et al.*, 2005). Ce résultat, associé aux travaux de Berthelin (2000) défini ces deux tissus comme les lieux de l'utilisation et du stockage du glycogène chez l'huître. Ils présentent cependant des différences de variations saisonnières liées à leur spécificité fonctionnelle, la région gonade manteau étant constituée à la fois de cellules vésiculeuses et de cellules gonadiques impliquées dans la reproduction.

Des variations saisonnières de la quantité des ARNm *Cg-GPH* et *Cg-GYS* sont observées pour la première fois chez un bivalve marin, laissant supposer l'existence d'un contrôle de la biosynthèse des enzymes GP et GS à l'échelle de la saison. Les périodes de forte abondance des transcrits *Cg-GPH* ou *Cg-GYS* s'opposent dans le temps et marquent les phases 2 (*Cg-GPH*) et 3 (*Cg-GYS*) du cycle énergétique.

Chez les vertébrés, la bascule métabolique de la dégradation vers la synthèse du glycogène (et l'inverse) passe par la régulation opposée des deux enzymes GP et GS orchestrée par des protéines kinases et phosphatases spécifiques (pour une revue, Bollen & Stalmans, 1992). Chez *C. gigas*, les variations des activités GP et GS montrent trois phases qui se superposent aux phases énergétiques du cycle. Ces activités sont positivement corrélées au taux de glycogène (GP) et de glucose libre (GS). **Il n'existe pas d'opposition saisonnière entre l'activité GP et GS** qui pourrait justifier au cours du cycle, l'alternance des phases de synthèse et de dégradation du glycogène. Alors que la GP ne semble pas montrer de régulation par phosphorylation (GP *b* toujours dominante), l'augmentation de la GS *D*

Partie 5 : Discussion générale, conclusion et perspectives

serait associée à l'accumulation automnale du glycogène (GS I constante). Les variations de l'une ou l'autre des activités ne suffisent donc pas seules à expliquer les variations du taux de glycogène annuel. Ces résultats nécessitent d'être couplés à l'analyse précise des effets *in vivo* et *in vitro* des effecteurs allostériques (ATP, ADP, AMP et G6P).

La **Figure 49** propose une hypothèse de régulation des enzymes GP et GS au cours du cycle annuel de reproduction.

Lors de la Phase 2 (utilisation du glycogène), la biosynthèse de la GP pourrait être activée et conduire à une augmentation de l'activité GP totale (étape ❶). L'équilibre des formes de la GP tendrait de manière invariable vers la GP *b* dans l'animal entier et dans les palpes labiaux (étape ❷). L'élévation du taux d'AMP en phase de gamétogenèse active conduirait à l'activation allostérique de la GP *b* (étape ❸). La probable diminution du G6P à cette époque activerait également la GP *b* tout en inhibant la GS *D*. L'utilisation du glycogène serait donc favorisée par rapport à sa synthèse (étape ❹).

De la même façon, lors de la phase 3 (accumulation du glycogène), la biosynthèse de la GS pourrait être activée et conduire à une augmentation de l'activité GS totale (étape ❺). L'équilibre des formes de la GS tend vers la GS *D* en période de synthèse du glycogène (étape ❻). L'élévation présumée du taux de G6P conduirait alors à l'activation allostérique de la GS *D* et à l'inhibition concomitante de la GP *b* (étape ❼). Par ailleurs, le taux d'ATP agirait de façon synergique au G6P pour inhiber la GP *b*. La synthèse de glycogène serait donc favorisée par rapport à son utilisation (étape ❽).

Le contrôle de la GP et de la GS par des effecteurs allostériques prendrait toute son importance chez l'huître, comparé aux vertébrés, en raison des variations progressives du statut énergétique, liées à la reproduction. Ces hypothèses suggèrent qu'*in vivo*, **plusieurs niveaux de régulation interviennent dans le contrôle de la synthèse et de la dégradation du glycogène.**

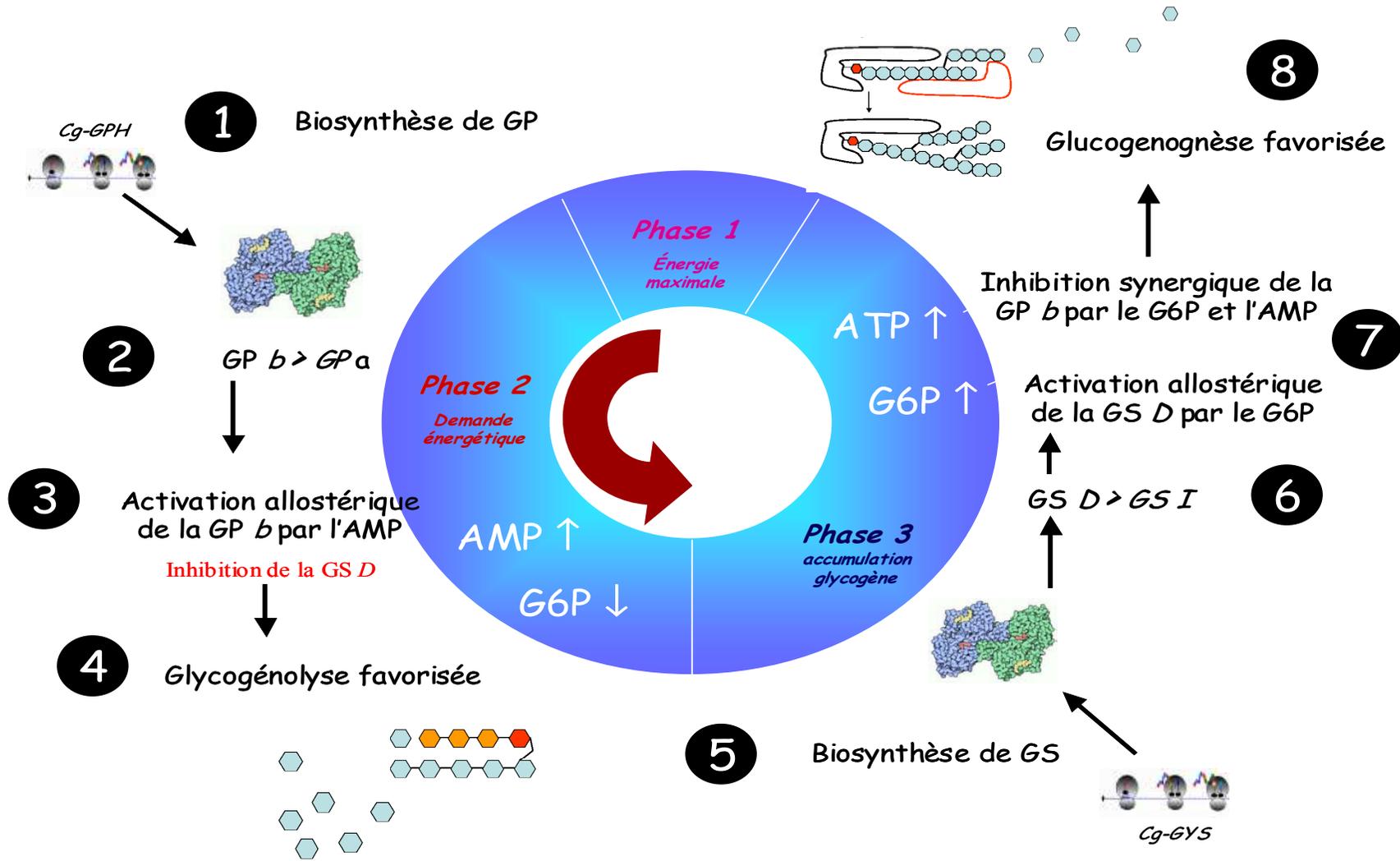


Figure 49 : Schéma explicatif des variations annuelles de la GP et de la GS. Les différentes phases du cycle énergétique sont représentées dans un cercle.

1.3. Contrôle métabolique de la réponse trophique

Effet du niveau trophique *in vivo*

Dans cette partie du travail, nous avons cherché à décrire le contrôle métabolique impliqué dans la réponse trophique du métabolisme du glycogène. En phase de croissance somatique, le stockage des nutriments serait proportionnel à la quantité de nourriture disponible. Pour le vérifier et pour décrire les régulations mises en jeu dans ce processus, nous avons soumis des huîtres à 3 régimes alimentaires de 0%, 6% et 12% de poids sec d'algues par poids sec d'huître, pendant la phase de croissance somatique. **L'apport en algues a un effet positif sur le stockage du glycogène** dans les palpes labiaux. Les résultats suggèrent une augmentation de la production de G6P par **activation transcriptionnelle de l'HK**. L'activité de synthèse du glycogène pourrait être augmentée par une **activation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de la GS**. L'effet du niveau trophique sur l'activité catalytique de la GP n'est pas élucidé, bien qu'un effet d'inhibition post-transcriptionnelle soit suspecté. L'apport en algues pourrait représenter une condition environnementale propice au démarrage de la gamétogenèse. Ce processus déclencherait des besoins énergétiques spécifiques au bout de plusieurs jours de conditionnement. L'activité GP des huîtres nourries serait donc sous l'influence de plusieurs facteurs : celle de l'alimentation, qui tend probablement à la réduire et celle d'une demande énergétique spécifique, qui tend probablement à l'augmenter.

L'effet des effecteurs allostériques dans le contrôle de la réponse trophique reste à déterminer. Une augmentation de G6P consécutive à l'activation de l'HK aurait des effets positifs sur l'activité GS *D* et négative sur la GP *b* (forme dominante de la GP dans les palpes). Par ailleurs, une augmentation de la CEA, soit une diminution de l'AMP, pourrait induire une inhibition synergique de la GP *b in vivo*. Ces effets viendraient renforcer la voie de synthèse du glycogène et inhiber celle de sa dégradation.

L'ensemble de ces résultats présume que la réponse trophique des huîtres est orchestrée par l'augmentation du taux de glucose circulant et par un probable signal hormonal de type insuline (hypoglycémiant).

Effet du glucose et de l'insuline *in vitro*

L'effet direct du glucose et de l'insuline n'a pas été démontré sur les activités GP et GS. Des travaux préliminaires ont été conduits à partir de primo cultures de cellules de palpes labiaux pour des huîtres situées en période maximum énergétique. Bien que le maintien de ces cellules dans des conditions optimales de survie ne soit pas encore complètement maîtrisé, le glucose semble montrer

un effet positif sur la quantité absolue de transcrits *Cg-GYS* et *Cg-GPH* à 6h de culture qui n'est pas répercuté sur les activités enzymatiques correspondantes. Les huîtres utilisées pour cette expérimentation se trouvaient à la période limite entre la synthèse du glycogène et le démarrage de la gamétogenèse. Le basculement vers la reproduction pourrait diminuer la capacité de transport du glucose et réduire l'effet du glucose sur les enzymes cytoplasmiques GP et GS.

Aucun effet de l'insuline porcine n'a été montré sur l'activité GS, en présence de glucose. Cette absence d'effet soulève la question de la saison (capacité de transport du glucose) et du choix de l'hormone hétérologue testée. Des travaux récents suggèrent l'existence d'une molécule insuline-like chez *C. gigas* (Gricourt *et al.*, 2003 ; Hamano *et al.*, 2005 ; Favrel, com. pers.) et ouvrent de nouvelles possibilités d'études.

1.4. Application à l'étude d'huîtres Résistantes et Sensibles aux mortalités estivales

Les phénomènes de mortalités estivales de *C. gigas* ont été étudiés à travers le programme national multidisciplinaire MOREST (Mortalités ESTivales). **L'existence d'une composante génétique aux variations pour la survie estivale a été observée et nous permet aujourd'hui de disposer d'huîtres Résistantes (R) et Sensibles (S) aux mortalités estivales** (Dégremont *et al.*, 2005). La forte héritabilité estimée pour ce caractère, dont les facteurs déterminants sont multiples, permet de suspecter qu'il puisse être sous le contrôle d'un très petit nombre de gènes. D'après le modèle d'interactions proposé entre l'environnement, l'huître et des pathogènes opportunistes, une hiérarchie de facteurs, conduisant aux mortalités, permet de montrer qu'aucun d'entre eux ne peut provoquer à lui seul les mortalités, mais que leur combinaison est nécessaire. Sur le plan énergétique, la période estivale est particulièrement difficile pour les huîtres. Face à l'augmentation de la température, des processus de maturation des gamètes et à d'éventuels autres stress, l'huître doit trouver des apports en énergie via l'utilisation du glycogène ou de l'alimentation. Dans ce travail, nous avons cherché à mettre en évidence des différences de stratégies énergétiques entre les huîtres R et S en analysant les quantités d'ARNm et les activités de l'HK, la GS, la GP, la PGM et la PK.

Les huîtres R et S élevées dans la Baie des Veys et présentent un développement gonadique similaire ne montrent aucune différence de quantité d'ARNm ni d'activités GP et GS aux trois phases du cycle analysées. **En conditions estivales expérimentales, les huîtres R, dont le développement gonadique est plus faible que celui des huîtres S, montrent une composition en glucides, ATP et AMP identique à celle des huîtres S**, suggérant un bilan énergétique identique. Cependant, **des différences d'allocation de l'énergie sont suggérées par les quantités d'ARNm et les activités enzymatiques de plusieurs enzymes du métabolisme des glucides**. Le marqueur montrant le plus de différentiel R/S est l'HK. En période critique, les huîtres R ont des quantités d'ARNm *Cg-HK* (palpes et gonade) et une activité HK (animal entier) supérieures à celle des huîtres S. Une utilisation

renforcée du glucose de l'alimentation des huîtres R résulterait soit d'une diminution de la capacité d'ingestion des huîtres S, soit de meilleures performances glycolytiques des huîtres R. Une étude plus approfondie de l'HK entre les huîtres R et S est à envisager.

Les huîtres R feraient profit de l'abondance de nourriture pour fabriquer plus d'énergie et « assurer la survie ». Elles auraient plus d'énergie disponible et pourraient répondre de façon plus adaptée aux stress environnementaux (pathogènes, pollutions) et ainsi survivre.

2 Conclusion générale et perspectives

Les objectifs principaux de cette thèse étaient d'étudier pour la première fois l'ensemble des voies de synthèse et de dégradation du glycogène en relation avec le cycle de vie de l'huître creuse *C. gigas*. Très peu de données étaient disponibles sur les mécanismes enzymatiques qui contrôlent l'orientation de ce métabolisme et aucune donnée n'existait au niveau moléculaire. Etant donné l'implication du glycogène dans le support énergétique de la reproduction, il semble important de comprendre les mécanismes régulant l'aspect énergétique du cycle de l'huître afin de mieux maîtriser les élevages.

L'obtention des séquences *Cg-GYS* et *Cg-GPH* correspondants aux ARNm des gènes codant les enzymes GS et GP a permis d'étudier de façon quantitative, le niveau de régulation moléculaire de ces enzymes (PCR en temps réel). C'est le couplage des dosages d'activités enzymatiques GS /GP et des quantités d'ARNm *Cg-GYS* et *Cg-GPH* qui nous a permis de donner une première description du fonctionnement annuel des voies de synthèse et de dégradation du glycogène chez *C. gigas*.

Des variations saisonnières de la quantité des ARNm *Cg-GPH* et *Cg-GYS* sont observées pour la première fois chez un bivalve marin, laissant supposer l'existence d'un contrôle de la biosynthèse des enzymes GP et GS à l'échelle de la saison. Plusieurs niveaux de régulation interviendraient dans le contrôle saisonnier de la synthèse et de la dégradation du glycogène, comme dans l'accumulation du glycogène induite par une augmentation de l'apport en algues. Le contrôle de la GP et de la GS par des effecteurs allostériques prendrait toute son importance chez l'huître, comparé aux vertébrés, en raison des variations progressives du statut énergétique, liées à la reproduction. L'effet exact de ces effecteurs sur les paramètres enzymatiques de la GS et de la GP reste cependant à déterminer *in vitro* et *in vivo*. La détermination des concentrations *in vivo* en G6P, AMP et ATP devra également être poursuivie afin de découvrir la véritable implication du contrôle allostérique chez l'huître, et ceci dans les différents compartiments de réserve en glycogène (palpes labiaux et gonade).

L'activation de l'HK par le niveau trophique a clairement été montrée dans ce travail, suggérant l'importance de cette enzyme dans le contrôle de la synthèse du glycogène. L'étude de ses variations saisonnières devra être poursuivie avec celle des transporteurs membranaires du glucose, pour analyser toutes les voies métaboliques impliquées dans la régulation du glycogène. Une étude conjuguant l'ensemble de ces voies permettrait la compréhension de l'effet *in vitro* du glucose et de molécules hypoglycémiantes sur le métabolisme du glycogène de *C. gigas*.

L'HK est le marqueur montrant le plus de différentiel entre les huîtres Résistantes (R) et Sensibles (S) aux mortalités estivales. Une plus forte utilisation du glucose de l'alimentation des

huîtres R résulterait soit d'une diminution de la capacité d'ingestion des huîtres S, soit de meilleures performances glycolytiques des huîtres R. Les huîtres R feraient profit de l'abondance de nourriture pour fabriquer de l'énergie et « assurer la survie », comparées aux S. Une modification génétique défavorable de l'HK n'est pas exclue pour les huîtres S et reste à déterminer. Il serait intéressant de rechercher le polymorphisme de l'HK et de le cartographier. Chez la drosophile, un QTL (Quantitative Trait Loci) impliqué dans le stockage du glycogène et les performances de vols contrôlerait les variations de l'HK, de la GS et de la PGM (Montooth *et al.*, 2003). Par ailleurs, la recherche de QTL visant à déterminer l'architecture génétique qui contrôle la survie estivale a été engagée, pour un ensemble de gènes montrant des différences de quantité d'ARNm entre R et S (IFREMER, LaTremblade).

Si nous avons décrit les variations saisonnières du métabolisme du glycogène, nous n'avons pas encore pu aborder le mécanisme qui permet l'alternance des phases de croissance somatique (synthèse du glycogène) et de fabrication des gamètes (utilisation du glycogène) à l'échelle de l'animal. La synchronisation de la reproduction est relayée par des facteurs neuroendocriniens chez de nombreux organismes (Sastry, 1979 ; Pearse, 1999). Chez les mammifères, une communication hormonale entre le système nerveux central et les adipocytes contrôle les fonctions reproductives, le stockage des graisses et la prise alimentaire (Schneider, 2004). Chez le mollusque *L. stagnalis*, une communication assez proche régulerait le stockage du glycogène, les fonctions reproductives et la prise alimentaire via le Neuropeptide Y et un facteur produit par les cellules à glycogène (De Jong-Brink *et al.*, 2001). Il existe donc probablement ce type de boucles de contrôle chez l'huître. Il reste à déterminer quelles neurohormones probablement produites par les ganglions cérébroïdes ou encore par les cellules vésiculeuses sont impliquées dans ce contrôle chez *C. gigas*.

Références bibliographiques

- A -

Abdraba A.M. (1999) Partial characterization of insulin-like peptides in *Otala lactea* (Mollusca: Pulmonata) and involvement in the brain in protein and polysaccharides synthesis by the mantle. *PhD thesis*. York University, Toronto.

Abdraba A.M. and Saleuddin A.S.M. (2000) Localization and immunological characterization of insulin-like peptides in the land snail *Otala lactea* (Mollusca: Pulmonata). *Canadian Journal Zoology*. 78, 1515-1526.

Adam C.L. and Mercer, J.G. (2004) Appetite regulation and seasonality: implications for obesity. *Proceeding in Nutrition Society*. 63, 413-419.

Agius L. (1994) Control of glucokinase translocation in rat hepatocytes by sorbitol and the cytosolic redox state. *Biochemistry. J.* 298, 237-243.

Aiston S., Andersen B., Agius L. (2003) Glucose 6-phosphate regulates hepatic glycogenolysis through inactivation of phosphorylase. 52(6), 1333-9.

Aiston S., Green A., Mukhtar M. and Agius L. (2004) Glucose-6-phosphate causes translocation of phosphorylase in hepatocytes and inactivates the enzyme synergistically with glucose. *Biochemistry. J.* 377, 195-204.

Alemay S. & Cohen P. (1986) Phosphorylase a is an allosteric inhibitor of the glycogen and microsomal forms of rat hepatic protein phosphatase I. *FEBS letters*. 198, 194-202.

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Reserch*. 25:3389-3402.

Applebaum S.W. and Schlesinger H.M. (1973) Regulation of Locust Phosphorylase. *Biochemistry Journal*. 135, 37-41.

Azpiazu I., Manchester J., Skurat A.V., Roach P.J. and Lawrence J.C. (2000) Control of glycogen synthesis is shared between glucose transport and glycogen synthase in skeletal muscle fibers. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 78(2), E234-243.

-B-

Bacca H., Huvet A., Fabioux C., Daniel J.Y., Delaporte M., Pouvreau S., Van Wormhoudt A., Moal J. (2005) Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140(4), 635-646.

Baden S.P., Depledge M.H., Hagerman L. (1994) Glycogen depletion and altered copper and manganese handling in *Nephrops norvegicus* following starvation and exposure to hypoxia. *Marine Ecology. Progress Series*. 103, 65-72.

Bai G., Zhang Z., Werner R., Nutall F.Q., Tan A.W.H., Lee E.Y.C. (1990) The primary structure of rat liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. Absence of phosphorylation sites 1a and 1b. *Journal of biological Chemistry*. 265, 7843-7848.

Bar T., Stahlberg A., Muszta A., Kubista M. (2003) Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 31, e105.

Bashamohideen M. and Parvatheswararao V. (1972) Adaptations to osmotic stress in fresh-water euryhaline teleost *Tilapia mossambica*. IV. Changes in blood glucose, liver glycogen and muscle glycogen levels. *Marine Biology*. 16, 68-74.

Bayne B.L. (1976) Aspects et reproduction in bivalve molluscs. In: *Estuarine Process*. (M. Wiley ed.) Academic Press. 432-448.

Bayne B.L., Bubel A., Gabbott P.A., Livingstone D.R., Lowe D.M. and Moore M.N. (1982) Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* (L.). *Marine Biology Letters*. 3, 89-105.

Becker J.U. (1982) Mechanisms of regulation of glycogen phosphorylase activity in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of General Microbiol.* 128, 447-454.

Bell G.I., Burant C.F., Takeda J. and Gould G.W. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *Journal of Biological Chemistry*. 268(26), 19161-19164.

Berthelin C. (2000) Etude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. Thèse, *Université de Caen*.

Berthelin C., Kellner K. and Mathieu M. (2000a) Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Marine Biotechnology*. 2, 136-145.

Berthelin C., Kellner K. and Mathieu M. (2000b) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 125(3), 359-369.

Références bibliographiques

Blanco S.L., Suarez M.P. and San Juan F. (2006) Seasonal change of nucleotides in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mantle tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 143(B), 384-390.

Bollen M. and Stalmans W. (1992) The structure, role and regulation of type I protein phosphatases. *Critical Reviews of Biochemistry and Molecular Biology*. 27, 227-281.

Bollen M., Keppens S. and Stalmans W. (1998) Specific features of glycogen metabolism in liver. *Biochemistry*. J. 336, 19-31.

Bonamusa L., Garcia de Frutos P., Fernandez F. and Baanante I.V. (1992) Nutritional effect on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1(2), 113-124.

Boquist L., Falkmer S. and Mehrotra B.K. (1971) Ultrastructural search for homologous of pancreatic beta-cells in the intestinal mucosa of the mollusc, *Buccinum undatum*. *General Comparative Endocrinology*. 17, 236-239.

Borrebaek B. and Christophersen B. (2000) Hepatic glucose phosphorylating activities in perch (*Perca fluviatilis*) after different dietary treatments. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 125B, 387-395.

Borrebaek B. and Christophersen B. (2001) Activities of glucose phosphorylation, glucose-6-phosphate and lipogenic enzymes in the liver of perch, *Perca fluviatilis*, after different dietary treatment. *Aquaculture Research*. 32(1), 221-224.

Broggiolo W., Stocker H., Ikeya T., Rintelen F., Fernandez R., Hafen E. (2001) An evolutionarily conserved function of the drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology*. 11(4), 213-221.

Brown, M.R., Crim, J.W., Arata, R.C., Cai, H.N., Chun, C., and Shen, P. (1999) Identification of a *Drosophila* brain-gut peptide related to the neuropeptide Y family. *Peptides*. 20, 1035-1042.

Browner, M.F., Nakano, K., Bang, A.G. and Fletterick, R.J. (1989) Human muscle glycogen synthase cDNA sequence: A negatively charged protein with an asymmetric charge distribution. *Proceedings of National Academy of Science of the USA*. 86, 1443-1447.

Bustin S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25, 169-193.

-C-

Cai-Xia H., Hong-Xiang L., De-Ming Z. (2006) The quantification of prion gene expression in sheep using real time RT-PCR. *Virus Genes*. 33, 359-364.

Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., and Burn, P. (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269, 546-549.

Carabaza A., Ciudad C.J., Baque S. and Guinovart J.J. (1992) Glucose has to be phosphorylated to activate glycogen synthetase, but not to inactivate glycogen phosphorylase in hepatocytes. *FEBS Letters*. 296, 211-214.

Cardell R.R., Michaels J.E., Hung J.T., Cardell E.L. (1985) SERGE, the subcellular site of initial hepatic glycogen deposition in the rat: a radioautographic and cytochemical study. *Journal of cellular Biology*. 101(1), 201-206.

Cardenas M.L. and Goldbetter A. (1996) The glucose-induced switch between glycogen phosphorylase and glycogen synthase in the liver: outlines of a theoretical approach. *Journal of Theoretical Biology*. 182, 421-426.

Caseras A., Meton I., Fernandez F., Baanante I.V. (2000) Glucokinase expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochemistry and Biophysical Acta*. 1493, 135-141.

Castineiras M.J., Guinovart J.J., Itarte E. and Rosell-Perez M. (1977) Seasonal variations in frog liver glycogen metabolism. *Revista Espanola de Fisiologia*. 33(4), 311-316.

Chandler D.P. Wagon C.A., Bolton Jr. H. (1998) Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Applied Environmental Microbiology*. 64, 669-677.

Chavez-Villalba J.E., Mingant C., Cochard J-C., La Penne M. (2001) Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Abert Benoit (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis*. 30, 1-12.

Chen S.N. and Wen C.M. (1999) Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Röding. *Methods of Cellular Science*. 21, 183-192.

Chervoneva I., Hyslop T., Iglewicz B., Johns L., Wolfe H.R., Schulz S., Leong E., Waldman S. (2006) Statistical algorithm for assuring similar efficiency in standards and samples for absolute quantification by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. 348(2), 198-208.

Références bibliographiques

Chih C.P. and Ellington W.R. (1986) The role of glycogen phosphorylase in the control of glycolysis during contractile activity in the phasic adductor muscle of the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus*. *Physiological Zoology*. 59, 696-705.

Childress C.C. and Sacktor B. (1970) Regulation of glycogen metabolism in insect flight muscle. Purification and properties of glycogen phosphorylase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 245(10), 2927-2936.

Chipperfield P.N.J. (1953) Observations on the breeding and settlement of *Mytilus edulis*. In british waters. *Journal of Marine Biology Association*. 32, 449-476.

Chock P.B., Rhee S.G., Stadtman E.R. (1980) Interconvertible enzyme cascade in cellular regulation. *Annual Review of Biochemistry*. 49, 813-843.

Cid E., Gomis R.R., Geremia R.A., Guinovart J.J., Ferrer J.C. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 33614-33621.

Cohen P. (1978) Hormonal control of muscle glycogen metabolism. *Current Topics in Cellular Regulation*. 14, 117-196.

Cohen P. (1983) Control of enzyme activity. *Chapman and Hall*. London. 42-71.

Cohen P. (1986) Muscle glycogen synthase. In: The enzymes. *Academic Press- New York* 17, 462-497.

Cook P. and Gabbott P.A. (1978) Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L. I. Purification, interconversion and kinetic properties of the I and D forms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 60B, 419-421.

Costentin, J. (2003) Physiological and neurobiological aspects of eating. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. 187, 1367-1376; discussion 1376-1367.

Coulon I. (1993) Mise au point d'un système contrôlé de culture de cellules de cœur d'huître *Crassostrea gigas* : application au test de la toxicité des produits chimiques en milieu aquatique. *Thèse de 3ème cycle ; Institut National Agronomique de Paris-Grignon*.

Crerar M.M., Hudson J.W., Matthews K.E., David E.S. and Golding G.B. (1988) Studies on the expression and evolution of the glycogen phosphorylase gene family in the rat. *Genome*. 30(4), 582-590.

Cuenda A., Nogues M., Gutierrez-Merino C., de Meis L. (1993) Glycogen phosphorylation can form a metabolic shuttle to support calcium uptake by sarcoplasmic reticulum membranes in skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196, 1127-1132.

-D-

David E., Tanguy A., Pichavant K., Moraga D. (2005) Response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal*. 272(21), 5635-5652.

Defossez J.M. and Hawkins J.S. (1997) Selective feeding in shellfish: size-dependent rejection of large particles within pseudofaeces from *Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussates*. *Marine Biology*. 129, 139-147.

Degremont L. (2003) Etudes des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance des juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de Doctorat-Université de Caen*.

Degremont L., Bédier E., Soletchnik P., Ropert M., Huvet A., Moal J. (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.

De Jong-Brink M., Reid C.N., Tensen C.P., Ter Maat A. (1999) Parasites flicking the NPY gene on the host's switchboard: why NPY? *FASEB Journal*. 13, 1972-1984.

De Jong-Brink M., Ter Maat A., Tensen C.P. (2001) NPY in invertebrates: molecular answers to altered functions during evolution. *Peptides*. 22(3), 309-315.

Delaporte M. (2005) Modulation des paramètres hématocytaires par la nutrition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. *Université Rennes I. Thèse 3103*. 361 pp.

Delaporte M., Soudant P., Lambert C., Moal J., Pouvreau S., Samain J.F. (2006) Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture*. Vol. 254 (1-4), 571-582.

Delaporte M., Soudant P., Lambert C., Jegaden M., Moal J., Pouvreau S., Degremont L., Boudry P. and Samain J.F. (soumis) Characterization of differences between two genetic stocks of *Crassostrea gigas* oysters, selected for high and low survival to summer mortalities and fed different ration under controlled conditions.

De Luca-Abbott S., Creese R.G., Lewis G.D., Wells R.M.G. (2000) Adenylate energy charge and total adenylate nucleotide pool as biomarkers of sublethal stress in cockle, *Austrovenus stutchburyi*. *J. Ecotoxicology*. 6, 35-44.

De Martinez N.R., Garcia M.C., Salas M. and Candela J.L.R. (1973) Proteins with insulin-like activity isolated from oyster (*Ostrea edulis* L.) hepatopancreas. *General Comparative Endocrinology*. 20, 305-311.

Références bibliographiques

De Pedro N., Guijarro A.I., Delgado M.J., Lopez-Patino M.A., Pinillos M.L. and Alonso-Bedate M. (2001) Influence of dietary composition on growth and energy reserves in tench (*Tinca tinca*) *Journal of Applied Ichthyology*. 17(1), 25-29.

Deslous-Paoli J.M., Heral M., Berthome J.P., Razet D. and Garnier J. (1981) Natural reproduction of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oleron basin in 1979 and 1981: biochemical and energetic aspects. *Revue des travaux de l'institut des Pêches Maritimes*. 45, 319-327.

De Zwaan A. (1977) Anaerobic energy metabolism in bivalve molluscs. *Oceanographic Marine Biology*. 15, 103-187.

De Zwaan A. and Zandee D.I. (1972) Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common sea mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 43B, 47-53.

Dombradi V. (1981) Structural aspects of the catalytic and regulatory function of glycogen phosphorylase. *International Journal of Biochemistry*. 13, 125-139.

Dombradi V., Devay P., Friedrich P. and Bot G. (1986) Regulation of glycogen phosphorylase in *Drosophila melanogaster* by reversible phosphorylation-dephosphorylation. *Insect Biochemistry*. 16, 557-565.

-E-

Ebberink R.H.M. and Salimans M. (1982) Control of glycogen phosphorylase activity in the posterior adductor muscle of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Comparative Physiology*. 148(1), 27-33.

Eble A.E. and Scro R. (1996) General anatomy. The eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Edited by Maryland sea Grant College*, University of Maryland System, College Park.

Eckelbarger K.J. and Davis C.V. (1996) Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*. 127, 79-87.

Enriquez-Diaz M. (2004) Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale*. 216 pp.

Enriquez-Diaz M., Pouvreau S., Fabioux C., Le Coguic Y., Cochard J.C. and Le Pennec M. (2003) Reproductive strategy : Variability of reproductive pattern in two populations genetically determined of *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*. 22(1), 328.

-F-

Fabioux C., Huvet A., Le Souchu P., Le Pennec M., Pouvreau S. (2005) Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*. 250, 458-470.

Fernandez I., Herrera-Alvarez L., Pardos F., Benito J. (2002) Gut-associated cells of *Derocheilocaris remanei* (Crustacea, Mystacocarida). *Journal of Morphology*. 251(3), 276-283.

Fernandez-Almonacid R. and Rosen O.M. (1987) Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor. *Molecular and Cellular Biology*. 7(8), 2718-2727.

Fernandez-Novell J.M., Arino J., Vilaro S. and Guinovart J.J. (1992) Glucose induces the translocation and the aggregation of glycogen synthase in rat hepatocytes. *Journal of Biochemistry*. 281, 443-448.

Fernandez-Novell J.M., Roca A., Bellido D., Vilaro S. and Guinovart J.J. (1996) Translocation of and aggregation of hepatic glycogen synthase during the fasted to refeed transition in rats. *European Journal of Biochemistry*. 238, 570-575.

Fernandez-Novell J.M., Bellido D., Vilaro S. and Guinovart J.J. (1997) Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes. *Journal of Biochemistry*. 321, 227-231.

Ferrer J.C., Baqué S. and Guinovart J.J. (1997) Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose. *FEBS Letters*. 415, 249-252.

Ferrer J.C., Favre C., Gomis R.R., Fernandez-Novell J.M., Garcia-Rocha M., de la Iglesia N., Cid E. and Guinovart J.J. (2003) Control of glycogen deposition. *FEBS Letters*. 546, 127-132.

Fideu M.D., Soler G., Ruiz-Amil M. (1983) Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 74(4), 795-799.

Field M.L., Khan O., Abbaraju J., Clark J. (2006) Functional compartmentation of glycogen phosphorylase with creatine kinase and Ca²⁺ ATPase in skeletal muscle. *Journal of Theoretical Biology*. 238, 257-268.

Fisher E.H., Heilmeyer L.M.G. and Haschke R.H. (1971) Phosphorylase and the control of glycogen degradation. *Current Topic in Cellular Regulation*. 4, 21-249.

Flyod P.D., Li L., Rubakhin S.S., Sweedler J.V., Horn C.C., Kupfermann I., Alexeeva V.Y., Ellis T.A., Dembrow N.C., Weiss K.R. and Vilim F.S. (1999) Insulin prohormone processing, distribution and relation to metabolism in *Aplysia californica*. *Journal of Neuroscience*. 19(18), 7732-7741.

Références bibliographiques

Francois J.M., Thompson-Jaeger S., Skroch J., Zellenka U., Spevak W., Tatchell K. (1992) GAC1 may encode a regulatory subunit for protein phosphatase type 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. 11(1), 87-96.

Fredriksson J., Ridderstrale M., Groop L., Orho-Melander M. (2004) Characterization of the human skeletal muscle glycogen synthase gene (GYS1) promoter. *European Journal of Clinical Investigation*. 34(2), 113-21.

Friedman D.L., and Lerner J. (1963) Studies on UDPG- α -glucan transglucosylase. III. Interconversion of two forms of muscle UDPG- α -glucan transglucosylase by a phosphorylation/dephosphorylation reaction sequence. *Biochemistry*. 2, 669-675.

Friedman C.S. and Hedrick R. (1991) Pacific oyster nocardiosis: Isolation of the bacterium and induction of laboratory infection. *Journal of Invertebrate Pathology*. 57, 109-120.

Friedman C.S., Beaman B., Chun J., Goodfellow M. Gee A. and Hedrick R. (1998) *Nocardia crassostreae* sp. Nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, 237-246.

Fritsch H.A.R., Van Noorden S. and Pearse A.G.E. (1976) Cytochemical and immunofluorescence investigations on insulin-like producing cells in the intestine of *Mytilus edulis* L. (bivalvia) *Cellular Tissue Research*. 165, 365-369.

Fruhbeck, G., and Salvador, J. (2000) Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia*. 43, 3-12.

Fujita N., Kaku K., Okubo M., Nagasaka Y., Kaneko T. (1996) Insulin stimulates protein synthesis of glycogen synthase in rat hepatoma H4 cells associated with acceleration of translation rate. *Endocrinology*. 43(3), 313-320.

-G-

Gabbott P.A. (1975) Storage cycle in marine bivalve molluscs : a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: *Proceedings of 9th European Marine Biology Symposium*. (H. Barnes ed.). Aberdeen University Press.

Gabbott P.A. and Whittle M.A. (1986) Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L.-II. Seasonal changes in glycogen synthetase activity in mantle tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 83B, 197-207.

Gäde G. et Auerswald L. (2003) Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General Comparative Endocrinology*. 132(1), 10-20.

Galtsoff P.S. (1964) The american oyster *Crassostrea virginica*. *Fisheries Bulletin Fish. Wild. Serv.* 64, 1-480.

Garcia-Rocha M., Roca A., De la Iglesia N., Baba O., Fernandez-Novell J.M., Ferrer J.C. and Guinovart J.J. (2001) Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Journal of Biochemistry.* 357, 17-24.

Gay M., Renault T., Pons A.M., Le Roux F. (2004) Two vibrio splendidus related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Disease of Aquatic Organisms.* 62(1-2), 65-74.

Geddes R. and Stratton G.C. (1977) The influence of lysosomes on glycogen metabolism. *Biochemical Journal.* 163(2), 193-200.

Geraerts W.P.M. (1992a) Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells in *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinology.* 86, 433-444.

Geraerts W.P.M., Smit A.B., Li K.W. and Hodijk P.L. (1992b) The light green cells of *Lymnaea*: A neuroendocrine model system for stimulus-induced expression of multiple peptide genes in a single cell type. *Experimentia.* 48, 464-473.

Gérard A., Naciri-Graven Y., Boudry P., Launay S., Heurtebise C., Ledu C., Phelipot P. (1995) Controlling gametogenesis in flat and japenese oysters. Relationship between reproduction and genetics, La reproduction Naturelle et Contrôlée des bivalves Cultivés en France. *IFREMER*, Plouzané (France), pp. 99-112.

Gomih Y.K. and Grillo T.A. (1976) Insulin-like activity of the extract of digestive gland and the pylorus of the giant African snail *Achatina fulica*. A preliminary report. *In : the evolution of pancreatic islets* (Grillo T.A., Leibson L. and Epple A., eds.). pp. 153-162.

Gomot A. and Gomot L. (1995) Neurohormonal control of body and shell growth of the snail *Helix*. *In: Allemand D., Cuif J.P. (eds.), Biomineralization 93, Bull. De l'institut océanographique.* 14(2), 141-149.

Goromosova S.A. (1976) Glycogen synthetase and fructose diphosphatase activity in the tissues of mollusks (*Mytilus galloprovincialis*) and crustaceans (*Balanus improvisus*, *Carcinus maena*). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* (Engl. Transl.). 12, 331-334.

Gouletquer P. (1997) Natural reproduction cycle of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*, La reproduction Naturelle et Contrôlée des bivalves cultivés en France. *IFREMER*, Nantes.

Gouletquer P. (1998) Shellfish culture in France : present status and new approaches to optimise production. *Proceedings of the 19th annual shellfish conference*, 69-80.

Références bibliographiques

Graf R., Neuenschwander S., Brown M.R. and Ackerman U. (1997) Insulin-mediated secretion of androsterooids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homologue from ovaries of bloodfed *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*. 6(2), 151-163.

Greenway S.K. and Storey. (1999) The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 242, 259-272.

Gricourt L., Bonnec G., Boujard D., Mathieu M., Kellner K. (2003) Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *General Comparative Endocrinology*. 134, 44-56.

Grimmelikhuijzen C.J., Leviev I., Carstensen K. (1996) Peptides in the nervous systems of cnidarians: structure function and biosynthesis. *International Review of Cytology*. 167, 37-89.

Grizel H. and Heral M. (1991) Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons.CIEM*. 47, 399-403.

Guinovart J.J., Gomez-Foix A.M., Seoane J., Fernandez-Novell J.M., Bellido D. and Vilaro S. (1997) Bridging the gap between glucose phosphorylation and glycogen synthesis in the liver. *Biochemistry Society Trans.* 25, 157-160.

Guo X., Hedgecock D., Hersberger W.K., Cooper K. and Allen S.K. (1998) Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolution*. 52, 394-402.

-H-

Hagerman L., Sondergaard T., Weile K., Hosie D., Uglow R.F. (1990) Aspects of blood physiology and ammonia excretion in *Nephrops norvegicus* under hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 97A, 51-55.

Halse R., Fryer L.G., McCormack J.G., Carling D. and Yeaman S.J. (2003) Regulation of glycogen synthase by glucose and glycogen : a possible role of AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 52(1), 9-15.

Hamano K., Awaji M. and Usuki H. (2005) cDNA structure of an insulin-related peptide in the Pacific oyster and seasonal changes in the gene expression. *Journal of Endocrinology*. 187, 55-67.

Härndahl L., Schmoll D., Herling A.W. and Agius L. (2006) The role of glucose-6-phosphate in mediating the effects of glucokinase overexpression on hepatic glucose metabolism. *FEBS Journal*. 273, 336-346.

Hata K. (1984) Studies of glycogen and glycogen phosphorylases in bivalves. *PhD. Thesis*. Tohoku University, Sendai, Japan.

Hata K., Yokoyama I., Suda M., Hata M. and Matsuda K. (1987) Purification and properties of glycogen phosphorylase from the adductor muscle of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 87B, 747-753.

Hata K., Hata M., Matsuda K. (1993) Purification and properties of glycogen phosphorylase from the adductor muscle of the oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105(B), 481-486.

Helmreich E., Cori C.F. (1964) The role of adenylic acid in the activation of phosphorylase. *Biochemistry*. 51, 131-138.

Hemminga M.A., Whittle M.A., Gabbott P.A. (1982) Glycogen synthase in the mantle tissue of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* : Interconversion of kinetic forms and evidence for activity regulation by a concerted push-pull mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 82B, 536-543.

Hemminga M.A., Maaskant J.J., Van der Plas J., Gabbott P.A. (1985) The hyperglycemic factor of the CNS of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*: interaction with glucose stimulation of glycogen synthesis and evidence for its release during anaerobiosis. 59(2), 301-307.

Hems D.A. and Whitton P.D. (1980) Control of hepatic glycogenolysis. *Physiological Reviews*. 60, 1-50.

Herlin-Houtteville P. and Lubet P. (1974) Analyse expérimentale, en culture organotypique, de l'action des ganglions cérébro-pleuraux et viscéraux sur le manteau de la moule mâle. *C.R. Académie des Sciences de Paris*. 278, 2469-2472.

Hers H.G., De Wulf H. and Stalmans W. (1970) The control of glycogen metabolism in the liver. *FEBS Letters*. 12(2):73-82.

Hers H.G. (1976) The control of glycogen metabolism in the liver. *Annual Review of Biochemistry*. 45, 167-189.

Hudson J.W., Golding G.B. and Crerar M.M. (1993) Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *Journal of Molecular Biology*. 234(3), 700-721.

Huijing F. and Larner J. (1966) On the effect of adenosine 3',5' cyclophosphate on the kinase UDPG: alpha-1,4-glucan alpha-4-glucosyl transferase. *Biochemical and Biophysical Research Community*. 23, 259-263.

Références bibliographiques

Huvet A., Royer J., Moal J., Burgeot T., Lapègue S., Boulo V., Nicolas J.L., Lambert C., Van Wormhoudt A., Samain J.F. (2007) *In* : Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Samain J.F. and McCombie H. (eds). Éd. Ifremer/Quæ, pp. 185-227.

-I-

Ibarguren I. (1990) Control de la glucolisis en el mejillon gallego (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). *Doctoral thesis*. University of Santiago de Compostela. Spain.

Iynedjian P.B. (1993) Mammalian glucokinase and its gene. *Biochemistry*. J. 293, 1-13.

-J-

Johnson L.N., Stura E.A., Wilson K.S., Sansom M.S.P. and Weber I.T. (1979) Nucleotide binding to glycogen phosphorylase b in the cristal. *Journal of Molecular Biology*. 134, 639-653.

Johnson L.N., Acharya K.R., Stuart D.I., Bardford N.G., Oikonomakos N.G., Hajdu J. and Varvill K.M. (1987) Phosphate-recognition sites in catalysis and control of glycogen phosphorylase b. *Biochemical Society Transactions*. 15, 1001-1005.

Johnson L.N., Hadju J., Acharya K.R. Stuart D.I., Mcclaughlin P.I., Oikonomakos N.G., Bradford D. (1989) Glycogen phosphorylase b. In: Herve G., editor. *Allosteric Enzymes*. Boca raton, FL: CRC Press, pp. 10-156.

-K-

Kahn H.R., Griffond B. and Saleuddin A.S.M. (1992) Insulin-like peptide(s) in the central nervous system of the snail *Helisoma duryi*. *Brain Research*. 580, 111-114.

Kaushik S. (1999) Nutrition glucidique: intérêt et limites des apports de glucides. *In* : Guillaume J., Kaushik S., Bergot P., Métailler R. (eds), Nutrition et alimentation des poissons et crustacés, 171-186. INRA Editions, Paris.

Kellner-Cousin K., Mialhe E. and Mathieu M. (1994) Identification of insulin-like peptides in cerebral ganglia neurosecretory cells of mussel *Mytilus edulis*. *Tissue and Cell*. 26(6), 891-899.

Kim S.K. et Rulifson E.J. (2004) Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by drosophila *copora cardiaca* cells. *Nature*. 431(7006), 316-320.

Kimura K.D., Tissenbaum H.A., Liu Y., Ruvkunt G. (1997) *Daf-2*, an insulin receptor like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 277, 942-946.

Klaslow H.R. and Lesikar D.D. (1984) Isozymes of glycogen synthase. *FEBS letters*. 172, 294-298.

Klinov S.V. et Kurganov B.I. (2001) Combined kinetic mechanism describing activation and inhibition of muscle glycogen phosphorylase b by adenosine 5'-monophosphate. *Biophysical chemistry*. 92(1-2), 89-102.

Koganezawa A. (1974) Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. In.(Ed.), *Third US-Japan Meeting on Aquaculture*. Tokyo, Japan. Journal, 29-34.

Koshela P. and Pasanen S. (1975) Effect of thermal acclimatation on seasonal liver and muscle glycogen content in the frog *Rana temporaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 50A, 723-727.

Krebs E.G. (1981) Phosphorylation and dephosphorylation of glycogen phosphorylase: a prototype for reversible covalent modification. *Current Topic in Cellular Regulation*. 18, 401-419.

Krishnamoorthy R.V., Lakshmi G.J., Biesiot P. and Venkataramiah A. (1979) Variations in glycogen and caloric energies of the american oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) from natural reefs in the Mississippi Sound. *Proceedings of Indian Academic Science*. 88B, 397-409.

-L-

Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gelebart F., Cordevant C. (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms*. 46, 139-145.

Lagneux M., Lwoff L., Meister M., Goltzené F., Hoffmann J. (1990) cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* encoding a novel member of the superfamily of insulins. *European Biochemistry*. 187, 249-254.

Lambert C., Soudant P., Choquet G., Paillard C., Frouel S., Dégremont L., Delaporte M., Moal J., Boudry P., Soletchnik P., Ropert M., Bédier E., Renault T., Gagnières B., Huvet A., Samain J.F. (2003) Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions. *J. Shellfish Res.* 22(1), 339.

Lango-Reynoso F. (1999) Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Océanol. Biol. Brest*, UBO pp. 139.

Lardans V., Coppin J.F., Vicogne J., Aroca E., Delcroix M., Dissous C. (2001) Characterization of an insulin receptor-related receptor in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1510, 321-329.

Références bibliographiques

Lehninger A., Nelson D., Cox M. (1994) Principes de Biochimie. Deuxième édition (Tr, Fr). Editions Flammarion, collection Médecine-Science. 1035 p.

Leloir L.F. and Cardini C.E. (1957) Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *Journal of the American Chemical Society*. 79, 6340-6354.

Lenoir F., Robbins L., Mathieu M., Lubet P. et Gabbott P.A. (1989) Isolation, characterization and glucose metabolism of glycogen cells from the labial palps of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*. 101, 495-501.

Leung P.S., Shaw C., Maule A.G., Thim L., Johnston C.F., Irvine G.B. (1992) The primary structure of neuropeptide F (NPF) from the garden snail, *H. aspersa*. *Regulation of Peptides*. 41(1), 71-81.

Lewin B. (1996) Genes VI. *Oxford University Press. USA; New Ed edition*. 1280 p.

L-Fando J.J., Garcia-Fernandez M.C. and R-Candela J.L. (1972) Glycogen metabolism in *Ostrea edulis* (L.) Factors affecting glycogen synthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 43B, 807-814.

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

Liu W. & Saint D.A. (2002) Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 294, 347-353.

Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method. *Methods*. 25,402-408.

Lorenz M.W. (2004) Adipokinetic hormone inhibits the formation of energy stores and egg production in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology*. 137B(2), 197-206.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Tarr A.L., and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.

Lubet P. (1959) Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinidés. *Revue des Travaux de l'Institut scientifique des Pêches maritimes*. 23, 389-548.

Lubet P. (1978) Nutrition des lamellibranches (Huîtres, Moules). *Oceanis*. 4, 23-54.

-M-

- Madsen N.B., Shechosky S. and Fletterick R.J. (1983) Site-site interactions in glycogen phosphorylase b EC-2.4.1.1. probed by ligands specific for each site. *Biochemistry*. 22, 4460-4465.
- Madsen N.B. (1986) Glycogen phosphorylase. *In the Enzymes* : Enzyme control by phosphorylation (Edited by Boyer P.O. and Krebs E.G.), vol. 17, pp. 365-393.
- Maniere G., Rondot I., Bullesbach E.E., Gautron F., Vanhems E. and Delbecq J.P. (2004) Control of ovarian steroidogenesis by insulin-like peptides in the blowfly (*Phormia regina*). *Journal of Endocrinology*. 181 147-156.
- Marchand C.R. and Colard C. (1992) Presence of cells and fibers immunoreactive toward antibodies to different peptides or amine in the digestivetract of the snail *Helix aspersa*. *Journal of Morphology*. 207, 185-190.
- Marques M. and Falkmer S. (1976) Effets of mammalian insulin on blood glucose level, glucose tolerance and glycogen content of musculature and hepatopancreas in a gastropod mollusc, *Stromphocheilus oblongus*. *General Comparative Endocrinology*. 82, 8-13.
- Massillon D., Bollen M., De wulf H., Overloop K., Vanstapel F., Van Heckel P. and Stalmans W. (1995) Demonstration of a glycogen/glucose-1-phosphate cycle in hepatocytes from fasted rats. Selected inactivation of phosphorylase by 2-deoxy-2-fluoro- α -D-glucopyranosylfluoride. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 19351-19357.
- Masumura M., Satake S., Saegusa H. and Mizoguchi A. (2000) Glucose stimulates the release of bombyxin, an insulin-related peptide of the silk-worm *Bombyx mori*. *General Comparative Endocrinology*. 118(3), 393-399.
- Mathieu M. (1987) Etude expérimentale des contrôles exercés par les ganglions nerveux sur la gamétogenèse et les processus métaboliques associés chez la moule *Mytilus edulis* (L.) (mollusque lamellibranche). *Thèse de doctorat d'Etat, Université de Caen*.
- Mathieu M. and Lubet P. (1993) Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves – a brief review. *Invertebrate Reproduction and Development*. 23, 123-129.
- Matthews C.C., Carlsen R.C., Froman B., Tait R., Gorin F. (1998) Nerve-dependant factors regulating transcripts levels of glycogen phosphorylase in skeletal muscle. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 18(3), 319-338.
- Maule A.G., Shaw C., Halton D.W., Thim L., Johnston C.F., Fairweather I., Buckanan K.D. (1991) Neuropeptide F: a novel parasitic flatworm regulatory peptide from *Moniezia expansa* (Cestoda: Cyclophyllidae). *Parasitology*. 102, 309-316.

Références bibliographiques

McCarthy J.E. (1998) Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiology and Molecular biology Review*. 62(4), 1492-553.

Meton I., Caseras A., Fernandez F., Baanante I.V. (2004) Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B. 138(2), 145-153.

Moal J., Le Coz J.R., Samain J.F. & Daniel J.Y. (1989) Nucleotides in bivalves : extraction and analysis by high performance liquid chromatography (HPLC). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 93B, 307-316.

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

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

Moal J., Bedier E., Fleury P.G., Langlade A., Lecoquic Y., Degremont L., Boudry P., Le Coz J.R., Pouvreau S., Enriquez-Diaz M., Lambert C., Soudant P. and Samain J.F. (2003) Genetic variability in reproduction and summer mortality in *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*. 22, 345-352.

Montooth K.L., Marden J.H. and Clark A.G. (2003) Mapping determinants of variation in energy metabolism, respiration and flight in drosophila. *Genetics Society of America*. 165, 623-635.

Morishima I. and Ueno T. (1990) Structural and kinetic properties of glycogen phosphorylase a from fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 96B, 591-595.

Morisson, T.B., Weiss, J.J., Wittwer, C.T. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-962.

Mosman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and toxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65, 55-63.

Mounier C. and Posner B.I. (2006) Transcriptional regulation by insulin : from the receptor to the gene. *Canadian Journal of Pharmacology*. 84, 713-724.

Munger R., Temler E., Jallut D., Haesler E. and Felber J.P. (2003) Correlations of glycogen synthase and phosphorylase activities with glycogen concentration in human muscle biopsies. Evidence for a double-feedback mechanism regulating glycogen synthesis and breakdown. *Metabolism*. 42, 36-43.

Mustonen, A.M., Nieminen, P., and Hyvarinen, H. (2002) Effects of low-dose leptin and gender on the physiology of the mouse (*Mus musculus*) *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*. 86, 166-173.

Mutalik V.K., Singh A.P., Edwards J.S. and Venkatesh K.V. (2004) Robust global sensitivity in multiple enzyme cascade system explains how the downstream cascade structure may remain unaffected by cross talk. *FEBS letters*. 558, 79-84.

-N-

Nery L.E.M. and Santos E.A. (1993) Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* dana, 1851 (crustacea decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 106B, 747-753.

Newgard C.B., Hwang P.K. and Fletterick R.J. (1989) The family of glycogen phosphorylases : structure and fonction. *Critical Review of Biochemistry and Molecular Biology*. 24, 69-99.

Nicolas J.L., Garnier M., Gay M. and Le Roux F. (2002) *Vibrio* associated with juvenile oyster during summer mortality in France. *Journal of Shellfish Research*. 21, 419.

Ni H.T., LaPorte D.C. (1995) Response to a glycogen synthase gene to stress. *Molecular Microbiology*. 16(6), 1197-205.

Nijhout H.F. & Grunert L.W. (2002) Bombyxin is a growth factor for wing imaginal disks in Lepidoptera. *PNAS*. 99 15446–15450.

Nordlie R.C. and Foster J.D. (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annual Review of Nutrition*. 19, 379-406.

Nouspikel T. and Iynedjian P.B. (1992) Insulin signalling and regulation of glucokinase gene expression in cultured hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*. 210(1), 365-373.

Nur T., Sela I., Webster N.J., Madar Z. (1995) Starvation and refeeding regulate glycogen synthase gene expression in rat liver at the postranscriptional level. *Journal of Nutrition*. 125(10), 2457-2462.

-O-

Okubo M., Villar-Palasi C., Nagasaka Y., Larner J., Larner A.C., Bai G., Lee E.Y.C. (1991) Long-term effects of insulin on the enzyme activity and messenger RNA of glycogen synthase in rat hepatoma H4 cells: an effect of insuline on glycogen synthase mRNA stability. *Arch. Biochem. Biophys*. 288(1), 126-130.

Panserat S., Medale F., Blin C., Breque J., Vachot C., Plagnes-Juan E., Gomes E., Krishnamoorthy R. and Kaushik S. (2000) Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream and common carp. *American Journal of Physiology*. 278, R1164-R1170.

Passoneau J.V. & Rottenberg D.A. (1973) An assessment of the methods for the measurement of glycogen synthetase activity including a new direct one-step assay. *Analytical Biochemistry*. 51, 528-541.

Payne V.A., Arden C., Wu C., Lange A.J., and Agius L. (2005) Dual role of phosphofructokinase-2/fructosebiphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes. *Diabetes*. 54, 1949-1957.

Pearse J.S., Pearse V.B., Davis K.K. (1999) Seasonal reproduction, marine invertebrates. In : *Encyclopedia of reproduction*. (Ed. Knobil E., Neill J.D.), Academic Press, San Diego, pp. 352-360.

Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269, 540-543.

Pennarun A.L., Prost C., Haure J. and Demaimay M. (2003) Comparaison of two Microalgal diets. 1. Influence on the biochemical and fatty acid compositions of raw oysters (*Crassostrea gigas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(7), 2006-2010.

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

Petit J.M., Tobler I., Allaman I., Bordely A.A., Magistretti P.J. (2002) Sleep deprivation modulates brain mRNAs encoding genes of glycogen metabolism. *European Journal of Neuroscience*. 16(6), 1163-7.

Pfaffl M.W., Mircheva Georgieva T., Penchev Georgiev I., Ontsouka E., Hageleit M. and Blum J.W. (2002) Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, IGF-binding proteins 1,2 and 3 in the bovine species. *Domestic Animal Endocrinology*. 22, 91-102.

Pfaffl M.W. & Hageleit M. (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*. 23, 275-282.

Pipe R.K. (1987) Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* : An ultrastructural study. *Marine Biology*. 95, 405-414.

Plisetskaia E.M. (1977) Insulin in molluscs and its role in regulating carbohydrate metabolism. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 13(5), 600-606.

Plisetskaia E.M., Kazakov V.K., Soltitskaya L. and Leibson L.G. (1978) Insulin producing cells in the gut of freshwater bivalve molluscs *Anodonta cygnaea* and *Union pictorum* and the role of insulin in the regulation of their carbohydrate metabolism. *General Comparative Endocrinology.* 35(2), 133-145.

Plisetskaia E.M., Soltitskaya L.P. and Leibson L.G. (1979) Participation of insulin in metabolic regulation in marine bivalve molluscs. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 15, 243-248.

Poulter L., Ang S.G., Gibson B.W., Williams D.H., Holmes C.F., Caudwell F.B., Pitcher J., Cohen P. (1988) Analysis of the in vivo phosphorylation state of rabbit skeletal muscle glycogen synthase by fast-atom-bombardment mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry.* 175(3), 497-510.

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

-R-

Rajpara S.M., Garcia P.D., Roberts R., Eliassen J.C., Owens D.F., Maltby D., Myers R.M., Mayeri E. (1992) Identification and molecular cloning of a neuropeptide Y homolog that produces prolonged inhibition in *Aplysia*. *Neuron.* 9, 505-513.

Rasmussen R. (2001) Quantification in the Light Cycler instrument. *In.* Meuer S., Wittwer C. and Nakagawara K. (eds), *Rapid cycle real-time PCR: Methods and applications.* Springer, Heidelberg, pp. 21-34.

Renault T., Le Deuff R.M., Cochenec N. and Maffart P. (1994) Herpesvirus associated with mortalities among pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Rev. Med. Vétérin* 145(10), 735-742.

Rex E., Harmych S., Puckett T., Komuniecki R. (2004) Regulation of carbohydrate metabolism in *Ascaris suum* body wall muscle: a role for the FMRamide AF2, not serotonin. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 133, 311-313.

Reynet C., Kahn C.R., Loeken M.R. (1996) Expression of the gene encoding glycogen phosphorylase is elevated in diabetic rat skeletal muscle and is regulated by insulin and cyclic AMP. *Diabetologia.* 39(2), 183-189.

Références bibliographiques

Roach P.J., Takeda Y. and Lerner J. (1976) Rabbit skeletal muscle glycogen synthase. I. Relationship between phosphorylation state and kinetic properties. *Journal of Biological Chemistry*. 251, 1913-1919.

Roach P.J. Cheng C., Huang D., Lin A., Mu J., Skurat A.V., Wilson W. and Zhai L. (1998) Novel aspects of the regulation of glycogen storage. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 9(2-4),139-51.

Roach, P.J. (2002) Glycogen and its metabolism. *Current Molecular Medicine*. 2, 101-120.

Robbins I., Lenoir F., Mathieu M. (1990) A putative neuroendocrine factor that stimulates glycogen mobilization in isolated glycogen cells from the marine mussel *Mytilus edulis*. *General Comparative Endocrinology*. 79, 449-458.

Robbins I., Lenoir F., Mathieu M. (1990) Neuroendocrine factors affecting the glycogen metabolism of purified *Mytilus edulis* glycogen cells: partial characterization of the putative glycogen mobilization hormone-demonstration of a factor that stimulates glycogen synthesis. *General Comparative Endocrinology*.82(1), 45-52.

Roovers E., Vincent M.E., Van Kesteren E., Geraerts W.P.M., Planta R.J., Vreugdenhil E. and Van Heerikhuizen H. (1995) Characterization of a putative molluscan insulin-related peptide receptor. *Gene*. 162, 181-188.

Rosa R. and Nunes M.L. (2002) Biochemical changes during the reproductive cycle of the deep-sea decapod *Nephrops norvegicus* on the south coast of Portugal. *Marine Biology*. 141, 1001-1009.

Rosell-Perez M. and Lerner J. (1963) Studies on UDPG- α -glucan transglucosylase. V. Two forms of the enzyme in dog skeletal muscle and their interconversion. *Biochemistry*. 3, 81-88.

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

Ruiz C., Martinez D., Mosquera G., Abad M., and Sanchez J.L. (1992b) Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrao (Galicia, Spain). *Marine Biology*. 112, 67-74.

Rusakov Y.I. and Kasakov V.K. (1979) Preparation of insulin-like substance from molluscs. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 15, 535-537.

-S-

Saltiel A.R. & Kahn C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414, 799-806.

Saks V.A., Belikova Y.O., Kuznetsov A.V., Khuchua Z.A., Branishte T.H., Semenovskiy M.L., Naumov V.G. (1991) Phosphocreatine pathway for energy transport : ADP diffusion and cardiomyopathy. *American Journal of Physiology*. 261, 30-38.

Samain J.F., Boudry P., Degremont L., Soletchnik P., Ropert M., Bedier E., Martin J.L., Moal J., Mathieu M., Pouvreau S., Lambert C., Escoubas J.M., Nicolas J.L., Le Roux F. (2004a) Summer mortality in the pacific oyster *Crassostrea gigas*, overview of 3-year results of cooperative "MOREST" Project. *Journal of shellfish. Resources*. 23(1), 309-310.

Samain J.F., Boudry P., Degremont L., Soletchnik P., Ropert M., Bedier E., Moal J., Mathieu M., Lambert C., Escoubas J.M., Nicolas J.L., Le Roux F., Bacher C., Renault T. and Burgeot T. (2004b) The programme MOREST (summer mortality of *Crassostrea gigas* oyster). Plouzane (France). *In Actes de colloques 38. IFREMER*. p. 23-30.

Samain J.F., Degremont L., Soletchnik P., Haure J., Bédier E., Ropert M., Moal J., Huvet A., Bacca H., Van Wormhoudt A., Delaporte M., Costil K., Pouvreau S., Lambert C., Boulo V., Soudant P., Nicolas J.L., Le Roux F., Renault T., Gagnaire B., Geret F., Boutet I., Burgeot T., Boudry P. (2007) Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*. 268(1-4), 227-243.

Samain J.F. et McCombie H. (2007) Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Éd. Ifremer/Quæ, 332 p.

Sanchez-Paz A., Garcia-Carreno F., Hernandez-Lopez J., Muhlia-Almazan A., Yepiz-Plascencia G. (2007) Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 340(2), 184-193.

San Juan Serrano F., Fernandez M., Sanchez J.L., Garcia L.O. (1991) Purification and molecular properties of glycogen phosphorylase b from mantle tissue of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 98(B), 33-39.

San Juan Serrano F., Fernandez Gonzalez M., Sanchez Lopez J.L., Garcia Martin L.O. (1993) A kinetic study of glycogen phosphorylase b from mantle tissue of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 106(B), 925-32.

San Juan Serrano F., Fernandez Gonzalez M., Sanchez Lopez J.L., Garcia Martin L.O. (1995a) Molecular mechanism of the control of glycogenolysis by calcium ions and cycle AMP in the mantle of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 110B, 577-582.

Références bibliographiques

- San Juan Serrano F., Fernandez Gonzalez M., Sanchez Lopez J.L., Garcia Martin L.O. (1995b) Modification of kinetic parameters of glycogen phosphorylase from mantle tissue of *Mytilus galloprovincialis* by a phosphorylation mechanism. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*. 27, 911-916.
- San Juan Serrano F., Sanchez Lopez J.L., Garcia Martin L.O. (1995c) Caffeine inhibition of glycogen phosphorylase from *Mytilus galloprovincialis* mantle tissue. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*. 27, 911-916.
- San Juan Serrano F., Suarez Alonso P., Blanco Lopez S.C. and Garcia Martin O. (1998a) Regulation of *Mytilus galloprovincialis* glycogen phosphorylase by glucose and glucose-6-phosphate. *Journal of Shellfish Resources*. 17(1), 159-163.
- San Juan Serrano F., Sanchez Lopez J.L., Garcia Martin L.O. (1998b) ATP and energy charge regulate glycogen phosphorylase from *Mytilus galloprovincialis* mantle. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 120, 483-491.
- Santiago D., Santiago P.A., Block A.M.C.B. and Sagardia F. (1974) Kinetics of glycogen phosphorylase a from the muscle of the blue crab, *Callinectes danae*. *Archs.Biochem. Biophys.* 163, 688-698.
- Sastry A.N. (1979) Pelycypoda (excluding Ostreidae). In: reproduction of marine invertebrates (A.C. Giese and J.S. Pearse eds). *Academic Press*. 113-292.
- Satake S., Masumura M., Ishizaki H., Nagata K., Kataoka H., Suzuki A. and Mizoguchi A. (1997) Bombyxin, an insulin-related peptide of insects, reduces the major storage carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 118, 349-357.
- Scapin S. & Giuseppe G. (1994) Seasonal variations of glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of frog *Rana esculenta*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 107B, 189-195.
- Schneider, J.E. (2004) Energy balance and reproduction. *Physiology and Behavior*. 81, 289-317.
- Schot L.P.C., Boer H.H., Swaab D.F. and Van Norrden S. (1981) Immunocytochemical demonstration of peptidergic neurons in the central nervous system of the Pond snail *Lymnaea stagnalis* with antisera raised to biologically active peptides of vertebrates. *Cellular Tissue Research*. 216, 273-291.
- Seoane J., Gomez-Foix A.M., O'Doherty R.M., Gomez-Ara C., Newgard C.B. and Guinovart J.J. (1996) Glucose-6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 23756-23760.

Sevala V.M., Sevala V.L., Saleuddin A.S.M. (1993) Hemolymph insulin-like peptides (ILP) titers and the influence of ILP and mammalian insulin on the amino acid incorporation in the mantle collar in *Helisoma* (Mollusca). *The Biological Bulletin*. 185, 140-148.

Shearer J. and Graham T.E. (2002) New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen. *Canadian Journal of Applied Physiology*. 27, 179-203.

Shih H.M. and Towle H.C. (1992) Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Evidence for a common factor required for carbohydrate regulation of hepatic genes. *Journal of Biological Chemistry*. 267(19), 13222-8.

Shulman R.G., Bloch G. and Rothman D.L. (1995) In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis. *Proceedings of National Academic Science*. 92, 8535-8542.

Skjoldal H.R. & Barkati S. (1982) ATP content and adenylate energy charge of the mussel *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle in Lindaspollene, western Norway. *Marine Biology*. 70, 1-6.

Skurat A.V. and Roach P.J. (1996) Multiple mechanisms for the phosphorylation of C-terminal regulatory sites in rabbit muscle glycogen synthase expressed in COS cells. *Journal of Biochemistry*. 313, 45-50.

Smit A.B., Vreugdenhil E., Ebberink R.H.M., Geraerts W.P.M., Klootwijk J., Joosse J. (1988) Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*. 331, 535-538.

Smit A.B., Spijker S., Van Minnen J., Burke J.F., De Winter F., Van Elk R. and Geraerts W.P.M. (1996) Expression and characterization of molluscan insulin-related peptide VII from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Neurosciences*. 70(2), 589-596.

Soderling T.R. and Park C.R. (1974) Recent Advances in glycogen metabolism. In: *Advances in cyclic nucleotide research*. Ed. by Greengard P. and Robinson G.A. Raven Press-New York, 283-329.

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

Soletchnik P., Lambert C. and Costil K. (2005) Summer mortality of *Crassostrea gigas* in relation to rearing environment conditions. *Journal of Shellfish Resources*. 24(1), 197-207.

Sonetti D., Van Heumen W.R.A. and Roubos E.W. (1992) Light and electron-microscopic immunocytochemistry of a molluscan insulin-related peptide in the central nervous system of *Planorbis corneus*. *Cellular Tissue Research*. 267, 473-481.

Références bibliographiques

Soniat T.M. and Ray S.M. (1985) Relationship between possible available food and the composition condition and reproductive state of oysters from Galveston Bay, Texas. *Contributions in Marine Science*. 28, 109-121.

Sornin J.M., Deslous-Paoli J.M. and Hesse O. (1988) Experimental study of the filtration of clays by the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg): adjustment of particule size for best retention. *Aquaculture*. 69, 355-366.

Souazé F., Ntodou-Thomé A., Tran C.Y., Rostene W., Forgez P. (1996) Quantitative RT-PCR : limits and accuracy. *Biotechniques*. 21, 280-285.

Sparks L.M., Xie H., Koza R.A., Mynatt R., Bray G.A., Smith S.R. (2006) High-fat/low-carbohydrate diets regulate glucose metabolism via a long-term transcriptional loop. *Metabolism, Clinical and Experimental*. 55, 1457-1463.

Sprang S.R., Goldsmith R.J., Fletterick S.G., Whitters S.G. and Madsen M.G. (1982) Catalytic site of glycogen phosphorylase : structure of the T state and specificity for α -D-glucose. *Biochemistry*. 21, 5364-5371.

Stalmans W., De Wulf H., Lederer B. and Hers H.G. (1970) The effect of glucose and of a treatment by glucocorticoids on the activation in vitro of liver glycogen synthetase. *European Journal of Biochemistry*. 15(1):1-8.

Stalmans W. and Hers H.G. (1973) Glycogen synthesis from UDPG. In : *The Enzymes* (Edited by Boyer P.D.). Vol9, 3rd edn. pp. 309-361.

Stalmans W., DeWulf H., Hue H. and Hers H.G. (1974) The sequential inactivation of glycogen phosphorylase and activation of glycogen synthetase in liver after the administration of glucose to mice and rats. The mechanism of the hepatic threshold to glucose. *European Journal of Biochemistry*. 41, 127-134.

Stryer L. (1995) *Biochemistry*. 4th edition. New York: W.H. Freeman.

Suarez M.P., Alvarez C., Molist P., San Juan F. (2005) Particular aspect of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis*, cultured in Estuary of Vigo. *Journal of Shellfish Research*. 24, 531-540.

Sucic J.F., Selmin O., Rutherford C.L. (1993) Regulation of the Dictyostelium glycogen phosphorylase 2 gene by cyclic AMP. *Developmental Genetics*. 14(4), 313-22.

Sunnarborg S.W., Miller S.P. Unnikrishnan I. And LaPorte D.C. (2001) Expression of the yeast glycogen phosphorylase gene is regulated by stress response elements and by the HOG MAP kinase pathway. *Biotechnology and Applied Microbiology*. 18(16), 1505-1514.

Swedes J.S., Sedo R.J., Atkinson D.E. (1975) Relation of growth and protein synthesis to the adenylate energy charge in an adenine-requiring mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 250, 6930-6938.

Swift M.L., Thomas T.P., Humphrey C.L. (1988) Characteristics of glycogen synthase activity in the oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 90B, 361-365.

-T-

Tager H.S., Markese J., Kramer K.J., Speirs R.D., Childs C.N. (1976) Glucagon-like and Insulin-like hormones of the insect neurosecretory system. *Biochemistry*. 156(3), 515-520.

Tensen C.P., Cox K.J., Burke J.F., Leurs R., van der Schors R.C., Geraerts W.P., Vreugdenhil E., Heerikhuizen H. (1998) Molecular cloning and characterization of an invertebrate homologue of a neuropeptide Y receptor. *European Journal of Neuroscience*. 10, 3409-3416.

Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Pfaffl M.W. (2003) Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research*. 31(20), e122.

-U-

Unnikrishnan I., Miller S., Meinke M., Laporte D.C. (2003) Multiple positive and negative elements involved in the regulation of expression of GYS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 29 : 26450-26457.

-V-

Vaandrager S.H., Van Marrewijk W.J.A. and Beenackers A.M.Th. (1987) Kinetic properties of glycogen phosphorylases a, ab and b from flight muscles of the locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry*. 17, 695-700.

Vali S., Carlsen R., Pessah I., Gorin F. (2000) Role of the sarcoplasmic reticulum in regulating the activity-dependant expression of the glycogen phosphorylase gene in contractile skeletal muscle cells. *Journal of Cell Physiology*. 185, 184-199.

Van der Horst D.J., Vroemen S.F. and Van Marrewijk W.J.A. (1997) Metabolism of stored reserves in insect fat body: hormonal signal transduction implicated in glycogen mobilization and biosynthesis of the lipophorin system. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 117B, 463-474.

Van Minnen J. and Schallig H.D.F.H. (1990) Demonstration of insulin-related substances in the central nervous system of pulmonates and *Aplysia californica*. *Cell and Tissue Research*. 260, 381-386.

Références bibliographiques

Van Schaftingen E., Veiga-da-Cunha M. and Niculescu L. (1997) The regulatory protein of glucokinase. *Biochemical Society Transactions*. 25(1):136-40.

Vardanega-Peicher, M., Curi, R., Souza, H.M., Borba-Murad, G.R., Siqueira, V.L., Galende, S., and Bazotte, R.B. (2003) Comparative effect of physiological levels of leptin and insulin on cyclic AMP-induced stimulation of hepatic glycogen breakdown. *Polish Journal of Pharmacology*. 55, 659-662.

Vazquez-Baanante I. And Rossell-Perez M. (1979a) In vitro studies of Pecten maximus glycogen phosphorylases and the interconversion of their forms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 62B, 381-387.

Vazquez-Baanante I. And Rossell-Perez M. (1979b) Kinetics of the D and I glycogen synthetase forms and their interconversion, in the sea scallop Pecten maximus. *Revista Espanola de Fisiologia*. 35(1), 41-9.

Villar-Palasi, C. and Larner, J. (1960) "Insulin-mediated effect on the activity of UDPG-glycogen transglucosylase of muscle." *Biochimica and Biophysica Acta*. 39, 171-173.

Villar-Palasi C. and Guinovart J.J. (1997) The role of glucose-6-phosphate in the control of glycogen synthase. *FASEB Journal*. 11, 544-558.

Voet D., Voet J.G. and Pratt C.W. (1999) *Fundamentals of biochemistry*, John Wiley and Sons, New York. 426-465.

Vroemen S.F., Van Marrewijk W.J., Van der Horst D.J. (1995) Stimulation of glycogenolysis by three locust adipokinetic hormones involves Gs and cAMP. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 107(2), 165-171.

-W-

Wade, G.N., and Jones, J.E. (2004) Neuroendocrinology of nutritional infertility. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 287, R1277-1296.

Waechter M., Le Roux F., Nicolas J.L., Marissal E. and Berthe F. (2002) Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *C.R. Biologies*. 325, 231-238.

Whittle M.A. (1982) Glycogen synthetase in the mussel *Mytilus edulis* L. Ph.D. Thesis University of Wales.

Whittle M.A. and Gabbott P.A. (1986) Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L. III. Regulation by glucose in a mantle tissue slice preparation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 83B, 209-214.

Williamson B.D., Favis R., Brickey D.A., Rutherford C.L. (1996) Isolation and characterization of glycogen synthase in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.* 19(4), 350-64.

Wilson R. (1994) Utilization of dietary carbohydrates by fish. *Aquaculture.* 124, 67-80.

Wilson I.G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology.* 63, 3741-3751.

Wilson R. (1998) Distinguishing the type I and type II isozymes of hexokinase: the need for a reexamination of past practice. *Diabetes.* 47(10), 1544-1548.

Wilson-Ormond E., Powell E.N., Hofmann E.E. and Klinck J.M. (1993) Food availability to natural oyster populations : Food, flow and flux. *Journal of Shellfish Resources.* 12(1), 149-150.

Wittwer C.T., Ririe K.M., Andrew R.V., David D.A., Gundry R.A., Balis U.J. (1997) The light-cycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 22, 176-81.

Worrell R.L., Watts S.A., Gower B. (2001) Glucose levels in the coelomic fluid vary with diet in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Gulf of Mexico Science.* 19(2), p. 193.

-Y-

Yamada K. and Noguchi T. (1999) Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Journal of Biochemistry.* 337, 1-11.

Yoshida I., Moto K., Sakurai S., Iwami M. (1998) A novel member of a bombyxin gene family: structure and expression of a bombyxin G1 gene, an insulin related peptide gene of the silkworm *Bombyx mori*. *Development genes and Evolution.* 208, 407-410.

-Z-

Zammit V.A. and Newsholme E. A. (1976) The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, octopin dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphate kinase, glutamate oxaloacetate transaminase, and arginine kinase in relation to carbohydrate utilization in muscle of marine invertebrate. *Journal of Biochemistry.* 160, 447-462.

Zhao A.Z., Shinoara M.M., Huang D., Shimizu M., Eldar-Finkelman H., Krebs E.G., Beavo J.A., Bornfeldt K.E. (2000) Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. 275(15), 11348-54.

Références bibliographiques

Zhou G., Pennington J.E. and Wells M.A. (2004) Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonadotrophic cycle. *Insect biochemistry and molecular biology*. 34, 919

Annexes

ANNEXE 1

Tableau 1 : Composition des tampons de réaction des dosages d'activités spécifiques

	TPR HK	TPR G6PDH	TPR PK	TPR PGM
Tampon Tris	100 mM			
EDTA	1 mM			2 mM
MgCl ₂	2 mM		5 mM	
Tampon imidazole-HCl			100 mM	
KCl			50 mM	
Tampon Tris-HCl		100 mM		
Imidazole				5 mM
Tampon Tris-acetate				40 mM
B-mercaptoethanol				1,4 mM
NaF				10 mM
Acetate de Mg				5 mM
pH	8,0	7,5	7,2	7,2

Tableau 2 : Concentration des réactifs utilisés dans les différents dosages.

Réactifs	HK	G6PDH	PK	PGM
glucose	5 mM			
glucose-6-phosphate		3,3 mM		
glucose-1-phosphate				0,5 mM
glucose-1,6-diphosphate				0,5 mM
ATP	1 mM			
ADP			2 mM	
PEP			10 mM	
NADP+	0,2 mM	0,4 mM		0,2 mM
NADH			0,15 mM	
Lactate Deshydrogenase				
G6PDHase	1 UI /ml			1 UI /ml

ANNEXE 2

Tableau 1 : Composition du tampon de réaction pour le dosage de la GP (TPR GP). Le pH est ajusté à 7. Le tampon est aliquoté et conservé à -20°C .

	TPR GP
Tris acetate	40 mM
imidazole	5 mM
EDTA	2 mM
NaF	10 mM
B-mercaptoethanol	1,4 mM
acetate de magnesium	5 mM

Le phosphate inorganique (Pi) est le substrat absent dans les blancs réactionnels. Le dosage de l'activité GP a est réalisé sans AMP. Les réactifs sont préparés à l'avance à des concentrations dix fois supérieures et conservés à -20°C .

Tableau 2 : Concentration des réactifs utilisés pour le dosage de l'activité GP totale et GP a.

Réactifs	GP totale	GP a
glycogène	2 mg /ml	2 mg /ml
glucose-1,6-diphosphate	5 μM	5 μM
AMP	6,4 μM	
Pi	80 mM	80 mM
NADP+	0,6 mM	0,6 mM
PGM	0,5 UI /ml	0,5 UI /ml
G6PDHase	0,5 UI /ml	0,5 UI /ml

ANNEXE 3

Les tampons sont aliquotés et conservés à -20°C .

Tableau 1 : Composition des tampons de réaction pour le dosage de la Glycogène synthase (TP1 et TP2 GS).

	TP1 GS	TP2 GS
Trizma base (sigma)	50 mM	50 mM
MgCl ₂	12,75 mM	
EDTA	1 mM	0,5 mM
NaF	10 mM	
B-mercaptoethanol	2,5 mM	
KCl		50 mM
pH	8,0	8,0

L'étape 1 permet la synthèse d'UDP par la GS de l'extrait enzymatique. Le dosage de l'activité GS I est réalisé en présence de 0,1 mM de glucose-6-phosphate contre 10 mM pour la GS totale. L'incubation est de 10 minutes à 27°C (le temps d'incubation peut varier en fonction du type d'échantillon). L'étape est arrêtée par 5 minutes à 70°C . Les blancs réactionnels sont des échantillons incubés à 70°C avant l'étape 1.

La deuxième étape consiste à doser l'UDP formé par un système d'enzymes auxiliaires. Les enzymes PK (Sigma) et LDH (Sigma) sont préparées dans du tampon enzymatique (TPZ, voir annexe ?) et conservées à -20°C trois mois maximum. Les réactifs sont préparés à l'avance à des concentrations dix fois supérieures et conservés à -20°C .

Tableau 2 : Concentration des réactifs utilisés pour le dosage de l'activité GS totale et GS I

		GS totale	GS I
Etape 1 dans TP1 GS	glycogène	10 mM	10 mM
	UDP-glucose	5 mg /ml	5 mg /ml
	glucose-6-phosphate	10 mM	0,1 mM
Etape 2 dans TP2 GS	phosphoenolpyruvate	1 mM	1 mM
	sulfate de magnesium	6 mM	6 mM
	NADH	0,15 mM	0,15 mM
	PK	6 UI /ml	6 UI /ml
	LDH	7 UI /ml	7 UI /ml

ANNEXE 4

Cinétique mesurable d'une PCR

Des limitations technologiques rendent inaccessibles les cycles précoces d'amplification de l'ADN et généralement une large portion de la partie exponentielle. Le profil apparent (mesurable) adopte plusieurs phases distinctes, plus ou moins développées en fonction des choix méthodologiques.

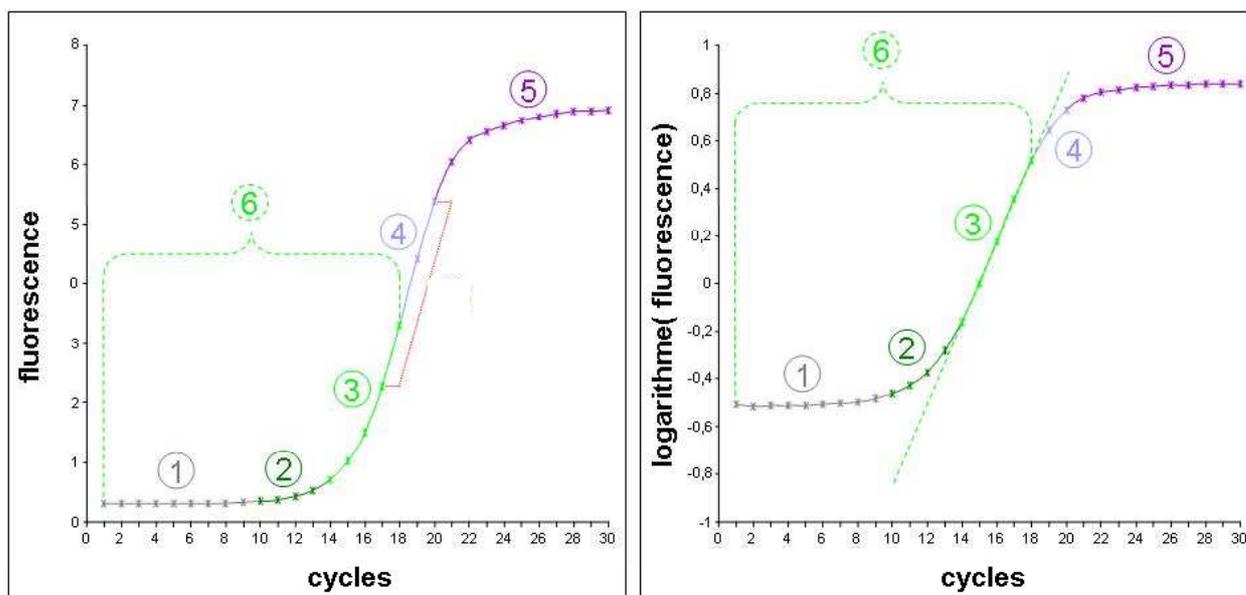


Figure 1 : Exemple de cinétique mesurée sur un thermocycler en temps réel. La courbe représente la cinétique d'amplification de l'ADN cycle par cycle représentée par la fluorescence (à gauche) ou le log de la fluorescence (à droite).

- 1) Bruit de fond de la fluorescence aspécifique du marqueur fluorescent (ici SYBR Green). Son niveau dépend de la nature du marqueur et du soluté de l'échantillon.
- 2) Phase où la mesure de fluorescence est encore biaisée par le bruit de fond. Elle adopte tout de même un profil d'exponentielle.
- 3) Phase exponentielle d'amplification où la quantité initiale d'ADNc de l'échantillon est mesurable sans biais. Dans le graphe de gauche, elle adopte l'apparence d'une droite appelée segment quantifiable. Cette phase est assez courte en durée (nombre de cycles).
- 4) Phase où la cinétique est limitée par l'enzyme de synthèse (polymérase). L'accumulation des amplicons se fait alors de façon constante et devient linéaire sur le graphe de gauche (en log).

Annexe 4

5

Phase d'amortissement (plateau) de la cinétique dû à l'apparition de facteurs limitants et non constants (dNTPs, fluorophore ect...). L'activité enzymatique peut se dégrader, la qualité de fluorescence aussi.

6

Phases de la cinétique qui répondent réellement à une phase exponentielle mais seule la phase 3 est réellement exploitable du fait de la technique de mesure (seuil de détection de la fluorescence et bruit de fond).

ANNEXE 5

Algorithme statistique du calcul d'efficacité individuelle

Il est admis que malgré le caractère exponentiel de l'amplification dès le premier cycle de PCR, la vraie phase initiale exponentielle est en dessous du seuil de détection des appareils de PCR en temps réel. Cependant, une méthode récente permet de déterminer plus finement le démarrage de cette phase.

Pour chaque réaction individuelle (chaque puit), l'efficacité d'amplification peut être calculée. Les données de fluorescence sont d'abord extraites du logiciel iCycler (Biorad). Elles sont représentées par des valeurs de fluorescence associées à des valeurs de nombre de cycles de PCR.

1.1. Détermination statistique de la phase de bruit de fond

La première étape consiste à déterminer de façon statistique les valeurs de fluorescence qui appartiennent encore au bruit de fond (phase 1, **Annexe 4**). Cette phase est caractérisée par une apparence de droite. Une régression linéaire de l'ensemble des données de fluorescence est donc effectuée selon l'équation du modèle de Tichopad *et al.* (2003).

$$Y_{lin} = a + \beta x$$

Y_{lin} est la fluorescence et x le nombre de cycle associé.

L'estimation statistique des points de cette phase est basée sur l'inspection des résidus standardisés résultant de la régression des points expérimentaux sur cette équation. Les résidus non usuels et les points extrêmes sont déterminés à l'aide du logiciel Statgraphics Plus (Test de Grubbs, $p < 0,05$). **Le premier point extrême trouvé correspond au premier point expérimental qui sort de la phase de bruit de fond et par conséquent au premier point de la phase exponentielle d'amplification** (Tichopad *et al.*, 2003).

1.2. Calcul d'efficacité d'amplification dans la phase exponentielle redimensionnée

L'efficacité d'amplification peut donc être estimée avec les 6 ou 7 points situés après ce point de début de phase exponentielle (Chervoneva *et al.*, 2006). Pendant cette phase, les points expérimentaux suivent une loi mathématique définie par Chervoneva *et al.* (2006) :

$$Y = Y_0 + E^{(n - n_0)}$$

Y est la fluorescence, **n** le nombre de cycle de PCR associé, **n₀** est le nombre de cycle nécessaire avant d'arriver à la phase exponentielle, **Y₀** est la fluorescence associée à **n₀**, **E** est l'efficacité d'amplification constante et inconnue.

La régression exponentielle est effectuée avec le logiciel Statgraphics Plus et donne la valeur de **E**. Le coefficient de corrélation de la régression doit toujours être supérieur ou égal à 0,98 (Chervoneva *et al.*, 2006).

Liste des figures et tableaux

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Anatomie interne de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	7
Figure 2 : Cycle de développement de <i>Crassostrea gigas</i>	10
Figure 3 : Variations saisonnières du tissu de réserve dans la région gonade-manteau.	12
Figure 4 : Schéma récapitulatif des voies métaboliques de synthèse et de dégradation du glycogène.	15
Figure 5 : Etapes de la synthèse et de la dégradation du glycogène. Bollen <i>et al.</i> , 1998.	16
Figure 6 : Représentation schématique du métabolisme du glycogène dans le foie et le muscle de vertébrés.	20
Figure 7 : Schéma détaillé de la glycolyse.	22
Figure 8 : Schéma de l'utilisation mitochondriale du pyruvate via le cycle de Krebs	23
Figure 9 : Evènements de dégradation des ARN messagers.	29
Figure 10 : Changement de conformation allostérique du site actif de la GP.	31
Figure 11 : Sites de phosphorylation de la GS	34
Figure 12 : Contrôle du métabolisme hépatique par phosphorylation enzymatique et par les métabolites	37
Figure 13 : Mécanismes d'action de l'insuline sur le métabolisme du glycogène de mammifère	40
Figure 14 : Schéma représentant la transduction du signal pour un récepteur au glucagon.....	44
Figure 15 : Modèle de la communication entre le statut énergétique, la prise alimentaire et la reproduction à l'échelle de l'organisme chez les vertébrés.....	46
Figure 16 : Représentation schématique du rôle du NPY et du facteur leptine-like chez le mollusque <i>Lymnaea stagnalis</i>	47
Figure 17 : Evolution de la production d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> (tonnes/an)	3
Figure 18 : Principe de la RACE PCR d'après le kit SMART RACE amplification kit (BD bioscience).....	58
Figure 19 : Principe de la réalisation des gammes d'ADN plasmidique pour la quantification absolue en PCR en temps réel.....	62
Figure 20 : Calcul du temps de demi-vie d'un ARNm par blocage de la transcription à l'actinomycine D et mesure des ARNm par PCR en temps réel.....	67

Figure 21 : Comparaison des parties N-terminales (A) et C-terminale (B) des séquences peptidiques de la GP de muscle (PYGM), de foie (PYGL) et de cerveau (PYGB) humain avec la GP d’huître (Cg-GPH).....	74
Figure 22 : Représentation graphique de l’analyse phylogénétique de la GP	75
Figure 23 : Comparaison des séquences peptidiques de muscle (GYS1-human) et foie (GYS2-human) humain avec la séquence de GS d’huître (Cg-GYS).....	77
Figure 24 : Représentation graphique de l’analyse phylogénétique de la GS.....	78
Figure 25 : Superposition des courbes de fusion obtenues avec les produits de PCR des RecADN et des ADNc <i>Cg-GYS</i> , <i>Cg-GPH</i> , <i>Cg-Actine</i> et <i>Cg-EFI</i>	80
Figure 26 : Courbes standards obtenues pour les 4 ADN recombinants utilisés : RecADN <i>Cg-GYS</i> , RecADN <i>Cg-GPH</i> , RecADN <i>Cg-actine</i> et RecADN <i>Cg-EFI</i>	81
Figure 27 : Effet de la concentration en glycogène sur les activités des formes a et b de la GP.....	83
Figure 28 : Effet de l’AMP sur le dosage de l’activité GP totale.....	84
Figure 29 : Effet de la concentration en UDPG sur les activités GS I et GS D.....	86
Figure 30 : Effet de la concentration en enzyme sur l’activité GS totale et l’activité GS I à 10 et 60 minutes d’incubation.....	87
Figure 31 : Variations saisonnières du taux de glycogène et du taux de glucose libre de mars 2002 à février 2003 pour des huîtres élevées en conditions contrôlées.....	96
Figure 32 : Variations des concentrations en acides nucléiques adényliques de mars 2002 à février 2003 pour des huîtres élevées en conditions contrôlées	98
Figure 33 : Quantité relative de transcrits de la GP (R_{Cg-GPH}) dans les palpes et la région gonade-manteau pour des huîtres élevées en conditions contrôlées.....	99
Figure 34 : Quantité relative de transcrits de la GS (R_{Cg-GYS}) dans les palpes et la région gonade-manteau pour des huîtres élevées en conditions contrôlées.....	101
Figure 35 : Activités spécifiques GP a + b (A), GP a (B) et GP b (C) pour des huîtres élevées en milieu contrôlé.....	102
Figure 36 : Activités spécifiques GS I + D (A), GS I (B) et GS D (C) pour des huîtres élevées en milieu contrôlé.....	105
Figure 37 : Effet du niveau trophique sur le taux de glycogène mesuré dans les palpes labiaux d’huîtres élevées en conditions contrôlées	119
Figure 38 : Effet du niveau trophique sur la quantité d’ARNm <i>Cg-HK</i> (A), <i>Cg-GYS</i> (B) et <i>Cg-GPH</i> (C) mesurée dans les palpes labiaux d’huîtres élevées en conditions contrôlées.....	121

Liste des figures et tableaux

- Figure 39 : Effet du niveau trophique sur l'activité HK (A) et de la GS totale (B) mesurée dans les palpes labiaux d'huîtres élevées en conditions contrôlées 123
- Figure 40 : Effet du niveau trophique sur l'activité spécifique GP totale (A) et GP a (B) mesurée dans les palpes labiaux d'huîtres élevées en conditions contrôlées 125
- Figure 41 : Effet *in vitro* du glucose sur la quantité d'ARNm *Cg-GYS* (A) et *Cg-GPH* (B) de 0 à 24h de culture..... 127
- Figure 42 : Effet *in vitro* du glucose sur les activités spécifiques GS totale (A) et GP totale (B) pour des cellules de palpes labiaux mises en primo culture de 0 à 24h 129
- Figure 43 : Effet *in vitro* de l'insuline porcine sur la quantité de transcrits *Cg-GYS* (A) et *Cg-GPH* (B) de cellules de palpes labiaux mises en primo culture de 0 à 24h. 131
- Figure 44 : Effet *in vitro* de l'insuline porcine sur l'activité spécifique de la GS totale pour des cellules mises en culture avec 0,5 mM de glucose. 132
- Figure 45 : Variations des quantités d'ARNm *Cg-GYS* et *Cg-GPH* et des activités spécifiques GS totale et GP totale en fonction des caractères R et S d'huîtres élevées *in situ* en Baie des Veys..... 146
- Figure 46 : Variations des taux de glucides, d'ATP et d'AMP de mai à juin en fonction du caractère Résistantes R et S d'huîtres élevées en conditions expérimentales..... 149
- Figure 47 : Variations des quantités relatives d'ARNm *Cg-HK*, *Cg-GPH*, *Cg-GYS*, *Cg-PGM*, *Cg-PK* et des activités spécifiques HK, GP totale, GS totale, PGM et PK en fonction du caractère R et S d'huîtres élevées en conditions expérimentales de mai à juillet..... 151
- Figure 48 : Réponse trophique des huîtres R et S en période critique. Quantités relatives (méthode Livak) des transcrits *Cg-HK*, *Cg-GP*, *Cg-GYS* et *Cg-PK* des palpes labiaux et de la région gonade-manteau 157
- Figure 49 : Schéma explicatif des variations annuelles du métabolisme du glycogène..... 168

Tableau 1 : Expérimentations analysées : Année, lignée des huîtres, durée d'expérimentation et nom attribué aux conditionnements.....	50
Tableau 2 : Historique des huîtres et caractéristiques des conditionnements réalisés : Type et quantité d'algues, température, photopériode et pas d'échantillonnage.....	51
Tableau 3 : Séquences des différentes amorces utilisées pour la PCR en temps réel	59
Tableau 4 : Amorces, taille des fragments amplifiés et poids moléculaire des plasmides recombinants (avec inserts) pour les 4 gènes clonés	63
Tableau 5 : Concentrations en insert des solutions mères de plasmides linéarisés (GS7-lin, GP6-lin, AC7-lin, EF1-lin)	79
Tableau 6 : Comparaison des moyennes d'efficacités individuelles d'amplification pour les ADNc et les RecADN de chaque type de transcrit.	82
Tableau 9 : Comparaison statistique des quantités relatives de transcrits Glycogène synthase (R_{Cg-GYS}) et Glycogène phosphorylase (R_{Cg-GPH}) mesurées dans les palpes labiaux et la région gonade manteau d'huîtres élevées en conditions contrôlées	100
Tableau 10 : Comparaisons statistiques des activités spécifiques de la GP (a+b, a et b) et de la GS (I+D, I et D) pour des huîtres élevées en milieu contrôlé.	103
Tableau 11 : Tableau des corrélations entre les différents paramètres biochimiques et moléculaires mesurés pour des huîtres élevées en conditions contrôlées.....	107
Tableau 12 : Temps de demi-vie des ARNm <i>Cg-GYS</i> et <i>Cg-GPH</i> après 16 jours d'alimentation à 0%, 6% ou 12% d'algues	122
Tableau 13 : Viabilité cellulaire exprimée en pourcentage selon la méthode du test MTT avec 0, 0,5 ou 10 mM de glucose.	126
Tableau 14 : Viabilité cellulaire exprimée en pourcentage selon la méthode du test MTT avec 0, 10^{-8} ou 10^{-6} M d'insuline porcine	129

Publications scientifiques

Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes

H. Bacca^a, A. Huvet^{a,*}, C. Fabioux^a, J.-Y. Daniel^a, M. Delaporte^a, S. Pouvreau^a,
A. Van Wormhoudt^b, J. Moal^a

^aUMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané, France

^bUMR 5178, Station de Biologie Marine du Muséum National d'Histoire Naturelle, BP225, 29900 Concarneau, France

Received 5 August 2004; received in revised form 22 December 2004; accepted 2 January 2005

Abstract

To investigate the control at the mRNA level of glycogen metabolism in the cupped oyster *Crassostrea gigas*, we report in the present paper the cloning and characterization of glycogen phosphorylase and synthase cDNAs (*Cg-GPH* and *Cg-GYS*, respectively, transcripts of main enzymes for glycogen use and storage), and their first expression profiles depending on oyster tissues and seasons. A strong expression of both genes was observed in the labial palps and the gonad in accordance with specific cells located in both tissues and ability to store glucose. *Cg-GPH* expression was also found mainly in muscle suggesting ability to use glycogen as readily available glucose to supply its activity. For seasonal examinations, expression of *Cg-GYS* and *Cg-GPH* genes appeared to be regulated according to variation in glycogen content. Relative levels of *Cg-GYS* transcripts appeared highest in October corresponding to glycogen storage and resting period. Relative levels of *Cg-GPH* transcripts were highest in May corresponding to mobilization of glycogen needed for germ cell maturation. Expression of both genes would likely be driven by the oyster's reproductive cycle, reflecting the central role of glycogen in energy storage and gametogenic development in *C. gigas*. Both genes are useful molecular markers in the regulation of glycogen metabolism and reproduction in *C. gigas* but enzymatic regulation of glycogen phosphorylase and synthase remains to be elucidated.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Bivalve; *Crassostrea gigas*; Energy; Gene; Expression; Glycogen; Oyster; Regulation; Reproduction

1. Introduction

Glucose constitutes an important nutrient which is provided either from the diet, from glycogen storage or from amino acids and lactate via gluconeogenesis (Felber and Golay, 1995). In marine bivalves, glycogen is the major source of glucose reserves stored in specific vesicular cells (Berthelin et al., 2000b) and is known to play a central role in providing energy for maintenance and gametogenic development of bivalves (Bayne et al., 1982; Gabbott and Whittle, 1986; Ruiz et al., 1992; Mathieu and Lubet, 1993). A seasonal cycle of storage and mobilization of energetic reserves, especially glycogen but also stored lipids, was previously correlated with the annual reproductive cycle of

bivalves (Berthelin et al., 2000b). Indeed, glycogen content was positively associated with fecundity in oysters and negatively associated with gametogenic rate (Deslous-Paoli et al., 1981). Glycogen content is also positively linked with survival: survival of oysters during summer (Perdue et al., 1981; Berthelin et al., 2000a) or survival of crustacea following anoxic stress (Hervant and Mathieu, 1995; Oliveira and da Silva, 2000).

Glycogen is a polysaccharide with $\alpha(1-4)$ glucosidic bonds plus secondary $\alpha(1-6)$ glucosidic branches spaced every 7–20 residues along the principal chain. In vertebrates, glycogen is mainly found in the liver and in skeletal muscle where it constitutes stores of readily available glucose to supply tissues. Its major role to sustain and regulate available glucose is well-known and changes in glycogen metabolism are associated with important human diseases such as hypoglycemia and myopathy (Blass et al., 1988).

* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 22 46 93; fax: +33 2 98 22 46 53.
E-mail address: ahuvet@ifremer.fr (A. Huvet).

The glycogen pathway is directly under the control of two unidirectional enzymes: glycogen phosphorylase (glycogenolysis) and glycogen synthase (glycogenesis). Glycogen phosphorylase is a homodimeric or tetrameric enzyme that removes glucose residues from $\alpha(1-4)$ linkages within glycogen molecules to produce glucose-1-phosphate (Childress and Sacktor, 1970; Morishima and Sakurai, 1985; San Juan et al., 1991; for review see King, 1996). Covalent modifications by phosphorylation (by a phosphorylase kinase) lead to regulation of its activity. Phosphorylation of phosphorylase-b to phosphorylase-a greatly enhances its activity towards glycogen breakdown as observed in immediate adaptive response of mussels to thermal stress (San Juan et al., 1993). The enzyme is activated by AMP and is inhibited by a variety of allosteric effectors that include glucose, ATP (Kasvinsky et al., 1978; San Juan et al., 1998). Glycogen synthase is a tetrameric enzyme that catalyses the transfer of the glucose molecule from UDP-glucose to a terminal branch of the glycogen molecule (Cohen, 1986). The activity of glycogen synthase is inversely regulated by phosphorylation of serine residues. The unphosphorylated and most active form is synthase-a while the phosphorylated glucose-6-phosphate-dependent form is synthase-b. Both synthase forms were reported in molluscs as I and D respectively, in *Mytilus edulis* (Gabbott and Whittle, 1986) and in *Crassostrea virginica* (Swift et al., 1988). This enzymatic regulation controls part of glycogen metabolism, especially short-term regulation. In addition, long-term regulation of carbohydrate metabolism can be influenced by the expression of genes encoding enzymes implicated in the glucose pathway (Nordlie et al., 1999), such as genes encoding glycogen synthase and glycogen phosphorylase (Towle, 1995; Vali et al., 2000). In bivalve molluscs and especially in the oyster, the long term regulation of glycogen metabolism has never been studied yet. Long-term regulation is under the control of exogenous or endogenous factors especially insulin and epinephrine (Reynet et al., 1996). In *Mytilus edulis*, distinct neuro-endocrine factors were reported to stimulate the start of both gametogenesis and glycogen breakdown and feedback from gonad maturation to storage metabolism was suspected (Mathieu et al., 1991). In adult oysters, seasonal variation in glycogen storage correlated with the annual reproductive cycle were not totally explained by changes in the concentration of extracellular glucose (Mathieu and Lubet, 1993; Berthelin et al., 2000a) suggesting the role of some other factors (neuroendocrine, external factors).

To contribute to our knowledge of glucose storage processes in oysters and to develop specific molecular markers of glycogen metabolism, we report in the present paper the cloning and characterization of glycogen phosphorylase and glycogen synthase cDNAs and the assay by real time PCR analysis of their expression in different oyster tissues and seasons. The use of these genes in understanding relationships between glycogen metabolism and reproduction of *C. gigas* is then discussed.

2. Material and methods

2.1. Biological material

In order to take into account the influence of environmental effects and age of oysters, experimental cross was performed at the hatchery at the IFREMER Laboratory in La Tremblade (France) from 30 wild oysters collected in the Marennes-Oléron Bay (Dégremont, 2003). These oysters were then cultured at the IFREMER station in Bouin (France). One-year-old cupped oysters (mean total weight = 17 ± 5 g), of same age and same environmental background, were conditioned in experimental raceways, at the IFREMER Laboratory in Argenton (France), from February 2002 to February 2003 in 300-L raceways with 20 μ m-filtered running seawater. Oysters were fed on a mixed diet of three micro-algal species (33% by weight *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*, 33% *Isochrysis galbana* (T-ISO), 33% *Tetraselmis chui*) at a daily ration equal to 8% dry weight algae/dry weight oyster. Temperature and photoperiod were regulated to follow the mean natural cycles recorded in Marennes-Oléron Bay during the last ten years (Soletchnik et al., 1998).

For cloning cDNAs, oysters were randomly collected from raceways in March and November 2002 and immediately dissected. Collected tissues (labial palps, gonad) were lysed in RNA extraction buffer (Chomczynski and Sacchi, 1987).

For gene expression analysis, 15 oysters were randomly collected at eight different times (March 2002, May, June, July, August, October, December and January 2003). Six tissue samples (labial palps, mantle, gonad, digestive gland, muscle and gills) were immediately dissected from each oyster. Collected tissues were lysed in RNA extraction buffer (Chomczynski and Sacchi, 1987).

For biochemical analysis, three pools of five animals were sampled at the same time as samples were taken for gene expression analysis and were frozen in liquid nitrogen and then wholly ground with a Danguomeau homogeniser at -180 °C.

2.2. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated using the procedure of Chomczynski and Sacchi (1987), then treated with DNase I (Sigma) (1 U/ μ g RNA) and precipitated with absolute ethanol after sodium acetate (3 M, pH 5.2) treatment. RNA concentrations were measured at 260 nm using the conversion factor 1 OD = 40 μ g/mL RNA.

Samples of polyadenylated RNA were reverse-transcribed from 1 μ g of total RNA denatured for 10 min at 70 °C. Reactions were carried out in a total volume of 25 μ L and the concentrations of the reaction components were as follows: 1X M-MLV Reverse Transcriptase buffer, 0.2 mM dNTPs, 4 mM DTT, 0.5 μ g oligo(dT) primer, 25 U ribonuclease inhibitor and 50 U M-MLV Reverse Tran-

scriptase. Reverse transcription was carried out for 10 min at 25 °C, 20 min at 42 °C and then 5 min at 94 °C.

2.3. PCR, cloning and sequencing

Degenerated PCR primers, forward primer GPF (5'-GCN GCN TGY TTY YTN GAY WSN ATG GC-3'), reverse primer GPR (5'-AAV AWR TTR TCR TTN GGR TAN ARN AC-3'), and forward primer GSF (5'-GAR TTY CAR AAY YTN CAY GC-3'), reverse primer GSR (5'-GCN GGN GTR TAN CCC CAN GG-3'), were designed based on conserved glycogen phosphorylase and synthase protein sequences, respectively, from human (Genbank Accession No.: P06737, P11217 and P11216 for glycogen phosphorylase; NP_068776 and NP_002094 for glycogen synthase), rat (P09811 and P09812; NP_037221 and XP_341859), *Drosophila melanogaster* (Q9XTL9; Q9VFC8) and *Caenorhabditis elegans* (Q9N5U1; Q9U2D9). Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a total volume of 25 µL with 1 µg of cDNAs, 1 µM of each primer, 1X Taq buffer, 0.25 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ and 0.5 U Taq polymerase (Qbiogene). Amplification was performed for 35 cycles at 94 °C for 30 s, 47 °C for 1 min, 72 °C for 2 min 30 s and a final extension step at 72 °C for 5 min. PCR products were run on 1% agarose gels with TAE buffer in 1X TAE buffer (Tris, acetic acid, and 0.5 M EDTA pH8) followed by staining with ethidium bromide. PCR products of expected size were gel-extracted (QIAquick gel extraction kit, Qiagen), cloned with a TOPO-TA cloning kit (Invitrogen) and then sequenced (Qbiogene).

5' and 3' ends of the partial glycogen phosphorylase transcript were isolated from cDNA using gene-specific primers with the Smart Race cDNA Amplification Kit (BD Biosciences). Reactions were performed for each 5' (reverse primer: 5'-CAG GTT CCT CAA CCT GCC AAC CAT C-3') and 3' ends (forward primer: 5'-TAC CGT GTC TCG CTG GCT GAG AAG A-3'). For the partial glycogen synthase transcript, a cDNA library constructed in λ-ZAP II from *C. gigas* mantle-edge mRNA was screened as described by Huvet et al. (2004) using specific nested primers for each 5' (reverse primers: 5'-ACT CAT ATC TCC CAG CCG TGA-3'; 5'-TGT CTT ATC CAG ATC AAA GTC-3' and 5'-GGC GTG AGT CGT GAA GAT GG-3') and 3' ends (forward primers: 5'-TGG CCT TGA CTA CGA GGA CTT-3' and 5'-GGG CTG TCA CCT TGG GGT GT-3'). PCR products were electrophoresed as described above and fragments of largest size were gel-extracted, subcloned into pCR 2.1[®] TOPO plasmid and sequenced as described above.

2.4. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses were carried out using a range of glycogen phosphorylase and synthase protein sequences from vertebrates and invertebrates. For most of vertebrates, the three characterised gene sequences (liver, muscle and

brain forms) were included in the analysis. The sequences were aligned using CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). An unrooted distance base phylogenetic tree was constructed in PHYLIP (Felsenstein, 1993) using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). One thousand bootstrap trials were run using the Seqboot program from the PHYLIP package.

2.5. Relative quantification of gene expression

The presence of glycogen phosphorylase and glycogen synthase mRNA was investigated using real time PCR analysis. The detection technique for newly synthesised PCR products used SYBR Green I fluorescence dye (Morisson et al., 1998). Specific primers were designed with the assistance of primer 3 software (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) from glycogen synthase mRNA sequence (forward primer GSaF: 5'-GAC GCC AAC GAC CAA ATC-3'; reverse primer GSbR: 5'-TTC AGG AAC TCG GGG TGA-3') and glycogen phosphorylase mRNA sequence (forward primer GPfR: 5'-AGA CGG TCC CCG ATG ATT-3'; reverse primer GPeF: 5'-GGC AGC TCC TGG CTA TCA-3'). Amplifications of actin and elongation factor I cDNA were performed in order to confirm the steady-state level of expression of housekeeping genes allowing an internal control for gene expression. Actin and elongation factor I primers were those used by Huvet et al. (2003) and Fabioux et al. (2004b), respectively.

The real time PCR amplifications were carried out in triplicates in a total volume of 15 µL with 1X SYBR[®] Green Master Mix (Qiagen), 10 nM of fluorescein, 0.33 µM each of forward and reverse primers and 5 µl of the 1:5 diluted cDNA using iCycler iQ thermocycler (Biorad). After Taq Polymerase activation at 95 °C for 15 min, amplification was performed for 45 cycles at 95 °C for 30 s, at 60 °C for 1 min with a single fluorescence measurement, and a final melting curve program by decreasing 0.5 °C each 10 s from 95 °C to 55 °C. Each run included a positive cDNA control (one sample of the present experiment analyzed in each amplification plate), negative controls (each total RNA sample with DNase I treatment) and blank controls (water) analyzed for each primer pair.

For gene expression calculation, the threshold value (Ct) was determined for each target as the number of cycles at which the fluorescence rises appreciably above the background fluorescence. PCR efficiency (*E*) was determined for each primer pair by determining the slope of standard curves obtained from serial dilution analysis of cDNA. The individual real time PCR efficiencies (*E*) for target or reference gene were calculated according to: $E=10^{(-1/\text{slope})}$. When efficiencies are equal, the ratio becomes: $R=2^{-(\text{CP}_{\text{target}}-\text{CP}_{\text{reference}})}$. The relative expression ratio (*R*) of a target gene (glycogen synthase, glycogen phosphorylase) was calculated based on the Ct deviation of this target gene versus the reference gene, corresponding to

K	A	W	G	I	T	V	K	T	F	A	Y	T	N	H	T	V	L	383
AAG	GCC	TGG	GGA	ATC	ACG	GTG	AAG	ACG	TTC	GCC	TAC	ACG	AAC	CAC	ACA	GTC	CTC	1199
P	E	A	L	E	R	W	P	V	S	M	L	E	K	I	L	P	R	401
CCC	GAG	GCC	TTG	GAG	AGG	TGG	CCG	GTG	TCC	ATG	CTG	GAG	AAG	ATC	CTT	CCC	CGC	1253
H	L	Q	I	I	Y	L	I	N	H	N	F	L	Q	E	V	A	K	419
CAC	CTG	CAG	ATT	ATC	TAC	CTG	ATT	AAC	CAC	AAC	TTC	CTC	CAG	GAA	GTA	GCA	AAA	1307
K	Y	P	G	D	A	G	R	M	R	R	M	S	I	V	E	E	D	437
AAA	TAT	CCA	GGT	GAT	GCA	GCC	AGA	ATG	CGA	CGA	ATG	TCC	ATT	GTA	GAG	GAG	GAT	1361
G	E	K	R	I	N	M	A	Y	L	S	I	V	G	S	H	A	V	455
GGA	GAG	AAG	AGG	ATC	AAT	ATG	GCG	TAT	CTC	AGC	ATC	GTC	GGC	TCG	CAC	GCT	GTC	1415
N	G	V	A	A	L	H	S	E	I	I	K	S	E	T	F	R	E	473
AAT	GGA	GTG	GCA	GCG	TTA	CAC	TCA	GAA	ATC	ATC	AAG	AGC	GAA	ACG	TTC	CGT	GAG	1469
F	Y	E	M	Y	P	E	R	F	Q	N	K	T	N	G	I	T	P	491
TTT	TAC	GAG	ATG	TAT	CCA	GAG	CGC	TTC	CAA	AAC	AAA	ACA	AAC	GGG	ATC	ACA	CCA	1523
R	W	L	L	L	C	N	P	G	L	S	D	I	I	A	E	K		509
CGT	CGT	TGG	TTG	TTA	CTG	TGC	AAT	CCT	GGA	CTG	TCT	GAC	ATT	ATC	GCA	GAG	AAA	1577
I	G	E	E	W	V	T	D	L	Y	Q	L	Q	N	L	K	K	F	527
ATC	GGG	GAG	GAA	TGG	GTC	ACA	GAC	TTG	TAC	CAA	CTA	CAG	AAT	CTC	AAA	AAG	TTT	1631
A	D	D	E	N	F	L	R	N	I	I	K	V	K	Q	E	N	K	545
GCT	GAT	GAT	GAA	AAC	TTC	CTG	AGG	AAC	ATC	ATC	AAA	GTC	AAA	CAG	GAA	AAC	AAA	1685
M	K	L	A	E	Y	I	Q	E	N	Y	N	I	K	V	N	T	S	563
ATG	AAG	TTG	GCT	GAG	TAC	ATC	CAG	GAG	AAC	TAC	AAC	ATC	AAG	GTC	AAC	ACG	TCC	1739
S	I	F	D	I	H	V	K	R	I	H	E	Y	K	R	Q	L	L	581
TCC	ATC	TTT	GAC	ATC	CAT	GTC	AAG	CGG	ATC	CAC	GAG	TAC	AAG	AGA	CAG	CTG	CTC	1793
N	C	F	H	I	I	T	L	Y	N	R	L	K	R	D	P	N	Q	599
AAT	TGC	TTC	CAC	ATC	ATC	ACG	CTC	TAC	AAC	CGC	CTC	AAG	CGT	GAC	CCA	AAC	CAG	1847
A	F	V	P	R	T	I	M	V	G	G	K	A	A	P	G	Y	H	617
GCC	TTT	GTT	CCC	AGG	ACT	ATC	ATG	GTC	GGA	GGA	AAG	GCA	GCT	CCT	GGC	TAT	CAC	1901
M	A	K	L	I	I	K	L	I	N	S	V	A	K	V	I	N	N	635
ATG	GCC	AAA	CTG	ATC	ATC	AAG	CTG	ATC	AAC	AGT	GTA	GCC	AAG	GTC	ATC	AAC	AAC	1955
D	P	I	I	G	D	R	L	K	V	V	Y	L	E	N	Y	R	V	653
GAT	CCA	ATC	ATC	GGG	GAC	CGT	CTC	AAG	GTG	GTG	TAT	CTG	GAG	AAC	TAC	CGT	GTC	2009
S	L	A	E	K	I	I	P	A	A	D	L	S	E	Q	I	S	T	671
TCG	CTG	GCT	GAG	AAG	ATC	ATT	CCG	GCA	GCT	GAC	CTC	AGC	GAA	CAG	ATC	TCG	ACA	2063
A	G	T	E	A	S	G	T	G	N	M	K	F	M	L	N	G	A	689
GCA	GGA	ACC	GAG	GCT	TCT	GGA	ACA	GGA	AAC	ATG	AAG	TTC	ATG	TTG	AAC	GGG	GCA	2117
L	T	I	G	T	L	D	G	A	N	V	E	M	R	E	E	M	G	707
CTG	ACT	ATC	GGA	ACT	CTG	GAC	GGT	GCT	AAT	GTA	GAG	ATG	AGA	GAG	GAG	ATG	GGG	2171
D	E	N	I	F	I	F	G	M	K	V	D	E	V	E	E	L	K	725
GAT	GAA	AAT	ATC	TTT	ATC	TTT	GGA	ATG	AAG	GTT	GAT	GAA	GTA	GAG	GAA	CTG	AAG	2225
R	S	G	Y	H	P	Q	E	Y	Y	E	R	N	T	D	L	K	Q	743
CGC	AGT	GGG	TAC	CAC	CCA	CAA	GAA	TAC	TAC	GAG	CGT	AAC	ACG	GAC	TTA	AAG	CAG	2279
V	L	D	Q	I	S	R	G	F	F	S	P	E	E	P	G	M	F	761
GTG	CTT	GAC	CAG	ATC	TCA	AGG	GCC	TTC	TTC	TCT	CCC	GAG	GAG	CCC	GGC	ATG	TTC	2333
T	D	I	Y	N	S	V	M	Y	N	D	R	F	X	P	S	K	D	779
ACT	GAT	ATA	TAC	AAC	TCT	GTG	ATG	TAC	AAC	GAC	AGG	TTC	TNG	CCT	TCT	AAA	GAT	2387

Fig. 1 (continued).

2.7. Statistical analysis

Comparisons of levels of transcripts between different tissues or seasons were performed by median comparisons procedure using the Kruskal–Wallis test with STAT-GRAPHICS 5.0 software. Multiple comparisons were made with *t*-distribution test at the 5% level using UNISTAT 5.5 software.

3. Results

3.1. Isolation of the glycogen phosphorylase and glycogen synthase cDNAs from *C. gigas*

For glycogen phosphorylase, a fragment of expected size was amplified from labial palps sampled in March with degenerated primers GPF and GPR. The 5' and 3' ends were

```

Y E D Y I K C Q D S V S E V F K D P 797
TAT GAA GAT TAC ATC AAG TGC CAA GAC AGC GTC AGT GAA GTA TTC AAG GAT CCT 2441

L Q W A K M C V L N I A S S V N F Q 815
CTG CAA TGG GCC AAG ATG TGT GTC CTC AAC ATT GCA TCG TCG GTA AAT TTC CAG 2495

P T E Q F L N M A R D I W G V E P N 833
CCG ACA GAA CAA TTT CTG AAT ATG GCA AGG GAC ATC TGG GGG GTG GAA CCC AAT 2549

D I K L P P P H E G L D S M D S K P 851
GAT ATT AAG CTG CCG CCC CCA CAC GAG GGC CTA GAC TCA ATG GAT AGC AAA CCA 2603

P Q K K * 856
CCA CAG AAG AAA TGA gatctcagctgatagccactagaaacaatataactttttaaactttctgttg
ttgctttgtgtggaatttattaacataggtcttatataaaagtttagcaatattacatgtaactggatgag 2741

gagaattgcagtagagattgacatactgggttttagttgaagtgaaattgttgcaggccattggacatac 2813

tcagctctgtggtagcatcacattgtaagcatcagcttgaattaatatttggctggtctgtagagcatttg 2885

acttgcctgtctaaagcatttttagtgcctttattgatgtgctgttatgtgtgtaaatcaactatggtat 2957

taaacagtttcattcaaaatctatataaaaatttaagaaaatttgaaaaaaaaaaaaaaaaa 3018

```

Glycogen synthase

```

M R R R N S F Y R 9
tcggcagcaggctgagacagtgaaaattatggct ATG AGA AGA CGA AAC AGT TTT TAC AGA 61

S F K D A C P E F E E M L M D R G A 27
AGT TTT AAA GAT GCA TGT CCG GAA TTT GAA GAG ATG CTT ATG GAC AGA GGG GCC 115

T A A A Q N K W V F E I A W E V A N 45
ACT GCA GCT GCA CAA AAC AAA TGG GTG TTT GAA ATC GCC TGG GAA GTA GCA AAT 169

K V G G I Y T V I K S K A P V S V A 63
AAA GTT GGT GGT ATC TAC ACT GTC ATC AAG TCC AAG GCC CCG GTC AGT GTA GCT 223

E L G E Q Y C L L G P Y N E A C V R 81
GAG TTA GGA GAA CAG TAC TGT CTG CTG GGT CCC TAT AAC GAG GCA TGT GTC AGA 277

T E V E I L E P S H Y V Y R Q T L Q 99
ACG GAG GTG GAG ATC CTG GAG CCC TCC CAC TAT GTC TAC AGA CAG ACG CTA CAG 331

T M R D A G I K V H F G R W L I D G 117
ACC ATG AGG GAC GCA GGT ATC AAG GTT CAT TTT GGT CGC TGG CTG ATA GAC GGA 385

Y P K V I L F D I G S A A W K L D E 135
TAT CCT AAA GTC ATT TTG TTT GAC ATC GGA TCT GCT GCT TGG AAG CTG GAT GAA 439

F K H E L W E K A S I G I P W H D R 153
TTC AAA CAT GAG CTG TGG GAG AAA GCC AGC ATA GGA ATC CCC TGG CAC GAC CGC 493

E S N D A V I F G A L V A W F I G E 171
GAG TCG AAC GAC GCC GTC ATA TTC GGG GCT CTA GTA GCC TGG TTT ATT GGT GAG 547

F R K N L T D Q P I V V T H F H E W 189
TTT CGG AAG AAT CTG ACT GAT CAG CCG ATT GTA GTG ACC CAC TTT CAC GAG TGG 601

L A G A G L M D L R T R K V D C I T 207
TTG GCT GGG GCG GGG CTG ATG GAC CTG CCG ACC AGG AAG GTC GAC TGC ATC ACC 655

```

Fig. 1 (continued).

obtained by RACE-PCR. The total isolated glycogen phosphorylase sequence of 3018 bp (Genbank accession number AY496065) comprised a 5' untranslated region of 50 bp, an open reading frame of 2569 bp, a stop codon (TGA), and a 3' untranslated region of 399 bp. The deduced amino acid sequence is 855 aa long (Fig. 1). It contains the phosphorylase pyridoxal-phosphate attachment site (consensus: E-A-[SC]-G-x-[GS]-x-M-K-x(2)-[LM]-N), six N-glycosylation sites and 12 putative protein kinase phosphorylation sites or which one is cAMP- and cGMP-dependent, determined by homology. The amino acid sequence was 68% similar to that of vertebrates (*Gallus gallus*, *Ovis aries*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapi-*

ens) whatever the tissue source (liver, muscle and brain form) and 68% and 66% similar to those of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, respectively. Analysis of the phylogenetic relationships between glycogen phosphorylase enzymes showed several distinct clusters corresponding to Protozoa (*Giardia intestinalis*, *Dictyostelium discoideum*), Protostomia with Ecdysozoa (*C. elegans*, *D. melanogaster*) and Lophotrochozoa (*C. gigas*) and to Deuterostomia based on three categories corresponding to liver, muscle and brain forms isolated in species (Fig. 2).

For glycogen synthase, a fragment of expected size was amplified from labial palps sampled in November using degenerated primers GSF and GSR. The 5' and 3' ends were

I	F	T	T	H	A	T	L	L	G	R	Y	L	C	A	G	S	S	225
ATC	TTC	ACG	ACT	CAC	GCC	ACA	CTG	CTG	GGG	AGA	TAC	CTG	TGT	GCT	GGC	AGC	TCA	709
D	F	Y	N	N	I	D	K	Y	N	L	V	K	E	A	G	D	R	243
GAC	TTC	TAC	AAC	AAT	ATA	GAC	AAG	TAT	AAC	TTA	GTC	AAG	GAG	GCC	GGT	GAC	CGT	763
Q	I	Y	H	C	Y	C	M	E	R	T	A	V	H	S	S	Q	V	261
CAG	ATA	TAC	CAC	TGT	TAC	TGC	ATG	GAG	AGG	ACC	GCT	GTC	CAC	TCT	TCT	CAG	GTG	817
F	I	S	V	S	E	I	T	E	V	E	A	E	H	L	L	K	R	279
TTT	ATC	AGT	GTG	TCC	GAG	ATC	ACT	GAG	GTG	GAG	GCA	GAG	CAC	CTG	CTC	AAA	CGG	871
K	P	N	M	I	V	P	P	N	G	L	N	V	V	K	F	S	T	297
AAG	CCC	AAC	ATG	ATC	GTC	CCA	CCT	AAC	GGA	TTA	AAT	GTG	GTC	AAA	TTT	AGT	ACC	925
I	H	E	F	Q	N	M	H	A	I	C	K	E	K	I	H	D	I	315
ATC	CAT	GAG	TTC	CAG	AAT	ATG	CAT	GCC	ATC	TGC	AAG	GAG	AAG	ATC	CAC	GAC	ATC	979
V	R	G	H	F	Y	G	H	Y	D	F	D	L	D	K	T	L	Y	333
GTC	AGG	GGG	CAT	TTT	TAT	GGG	CAC	TAT	GAC	TTT	GAT	CTG	GAT	AAG	ACA	CTA	TAC	1033
F	F	T	A	G	R	Y	E	F	S	N	K	G	A	D	M	F	I	351
TTT	TTC	ACG	GCT	GGG	AGA	TAT	GAG	TTT	TCC	AAC	AAA	GGA	GCG	GAC	ATG	TTC	ATA	1087
E	S	L	A	R	L	N	F	Y	L	K	Q	A	N	S	E	A	T	369
GAA	TCA	CTG	GCA	AGA	CTA	AAC	TTT	TAT	CTC	AAG	CAA	GCT	AAC	AGT	GAG	GCG	ACA	1141
V	V	A	F	L	I	F	P	T	K	T	N	N	F	N	V	E	S	387
GTG	GTG	GCT	TTC	CTG	ATC	TTC	CCC	ACC	AAG	ACC	AAC	AAC	TTC	AAC	GTG	GAG	TCC	1195
L	R	G	Q	A	I	S	K	Q	L	K	E	T	V	H	H	V	Q	405
CTG	CGG	GGC	CAG	GCC	ATC	TCC	AAA	CAG	CTG	AAG	GAG	ACC	GTG	CAC	CAC	GTA	CAG	1249
T	Q	I	G	K	R	I	F	E	Q	S	L	K	G	K	I	L	T	423
ACA	CAG	ATC	GGC	AAG	AGG	ATC	TTT	GAA	CAG	AGC	CTG	AAG	GGC	AAA	ATT	CTA	ACT	1303
G	D	E	I	L	E	Q	E	D	I	V	K	L	K	R	C	I	Y	441
GGA	GAT	GAA	ATT	CTG	GAA	CAA	GAA	GAT	ATA	GTG	AAA	CTT	AAG	AGG	TGT	ATC	TAC	1357
S	A	Q	R	N	S	L	P	P	I	C	T	H	N	V	N	E	D	459
TCT	GCT	CAG	AGA	AAC	AGC	TTA	CCT	CCT	ATA	TGT	ACG	CAC	AAT	GTT	AAT	GAA	GAC	1411
A	N	D	Q	I	L	N	A	L	R	R	C	Q	L	F	N	R	K	477
GCG	AAC	GAC	CAA	ATC	CTT	AAT	GCC	CTT	CGA	CGA	TGT	CAA	CTT	TTC	AAC	AGA	AAA	1465
E	D	R	V	K	V	V	F	H	P	E	F	L	N	S	T	N	P	495
GAG	GAC	AGA	GTG	AAG	GTG	GTA	TTT	CAC	CCC	GAG	TTC	CTG	AAC	TCC	ACC	AAC	CCT	1519
L	F	G	L	D	Y	E	D	F	V	R	G	C	H	L	G	V	F	513
TTG	TTT	GGC	CTT	GAC	TAC	GAG	GAC	TTT	GTC	CGG	GGC	TGT	CAC	CTT	GGG	GTG	TTC	1573
A	S	Y	Y	E	P	W	G	Y	S	P	A	E	C	T	V	Y	G	531
GCT	TCG	TAC	TAC	GAG	CCC	TGG	GGC	TAT	TCA	CCA	GCT	GAG	TGC	ACC	GTG	TAC	GGG	1627
I	P	S	I	S	T	N	L	S	G	F	G	C	F	M	Q	E	H	549
ATC	CCA	AGT	ATT	TCC	ACG	AAC	CTC	TCA	GGC	TTC	GGC	TGT	TTC	ATG	CAG	GAA	CAC	1681
I	N	D	P	K	S	Y	G	L	Y	I	V	D	R	R	Y	K	S	567
ATC	AAT	GAT	CCC	AAG	TCC	TAT	GGA	CTC	TAT	ATT	GTA	GAC	CGC	CGA	TAT	AAG	AGT	1735
P	D	E	S	I	H	Q	L	T	Q	Y	M	Y	D	F	T	C	L	585
CCA	GAC	GAA	TCA	ATC	CAT	CAG	CTG	ACT	CAG	TAT	ATG	TAT	GAT	TTC	ACC	TGT	TTA	1789
S	R	R	Q	R	I	I	Q	R	N	R	T	E	R	L	S	D	L	603
TCC	CGG	CGA	CAG	CGT	ATC	ATT	CAG	AGA	AAT	CGT	ACG	GAG	CGC	CTC	AGT	GAC	CTC	1843
L	D	W	R	N	L	G	V	Y	Y	R	K	A	R	Q	I	A	V	621
CTA	GAC	TGG	AGG	AAC	CTG	GGA	GTG	TAC	TAC	AGA	AAA	GCC	CGC	CAG	ATT	GCT	GTA	1897

Fig. 1 (continued).

obtained by PCR using a *C. gigas* mantle-edge cDNA library as the template. The total isolated glycogen synthase sequence was 2408 bp long corresponding to a deduced sequence of 695 aa (Genbank accession number AY496064). It comprised a 5' untranslated region of 34 bp, an open reading frame of 2085 bp, a stop codon (TGA), and a 3' untranslated region of 286 bp (Fig. 1). It contains four N-glycosylation sites, nine putative protein kinase phosphorylation sites or which one is cAMP- and cGMP-dependent and one amidation site, determined by homology. The

amino acid sequence was 53% similar to that of vertebrates (*Gallus gallus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*) and 61% and 50% similar to *D. melanogaster* and *C. elegans*, respectively. Analysis of the phylogenetic relationships between glycogen synthase enzymes showed three distinct clusters corresponding to Protozoa (*Giardia lamblia*) and Protostomia (*C. elegans*, *D. melanogaster* and *C. gigas*), and to Deuterostomia in which one cluster corresponded to liver form and the other one to muscle and brain forms (Fig. 2).

A	R	G	Y	P	D	L	A	A	K	E	E	E	I	L	Q	E	K	639
GCC	CGG	GGA	TAC	CCT	GAC	CTT	GCT	GCC	AAG	GAG	GAG	GAG	ATC	CTA	CAG	GAA	AAG	1951
R	F	M	Y	P	R	P	A	S	E	P	S	S	P	S	A	S	R	657
AGG	TTC	ATG	TAC	CCT	CGG	CCG	GCC	TCC	GAA	CCT	TCC	TCA	CCC	TCG	GCC	TCG	CGC	2005
S	S	T	P	A	P	S	E	H	G	D	D	E	D	D	D	I	D	675
AGC	TCC	ACC	CCA	GCC	CCC	TCG	GAA	CAT	GGG	GAC	GAT	GAA	GAT	GAC	GAT	ATC	GAC	2059
E	D	E	E	N	A	E	M	S	S	N	P	E	S	D	M	P	M	693
GAG	GAT	GAA	GAG	AAT	GCG	GAA	ATG	AGT	TCT	AAC	CCA	GAG	TCC	GAC	ATG	CCG	ATG	2113
F	K	*																696
TTT	AAG	TGA																2181
gg	ttaattac	ctggtg	tattgag	tagt	gaggtg	tttggctt	tataccac	agaaa	gctttata	tataact	g							2253
agt	gttggc	gagtg	caact	caaat	gagttg	acctcatt	tttaac	attttatt	tttgc	tttctt	cttttt	ttttct						2325
ct	cttctag	ttag	caat	caaat	gtttc	acaac	atag	atg	tcg	ttgtg	aggt	aaaa	att	ta	ca	aaaa	aaaa	2397
aaaa	aaaaaaaa																	2408

Fig. 1 (continued).

3.2. Tissue specific expression of glycogen synthase and phosphorylase genes

Over an annual period, no significant differences in Ct values (related to 1 µg total RNA) were observed for the two house keeping genes (actin, elongation factor I) among sampling dates (Kruskal Wallis test: $P=0.86$ and 0.2 for elongation factor I and actin, respectively) but results of elongation factor I appeared more stable over the period (coefficient of variation=6% against 9.4% for actin). Therefore, the expressions of the *C. gigas* glycogen synthase and phosphorylase genes were expressed relative to the expression of the *C. gigas* elongation factor I gene, and analysed in various tissues by real time PCR in October and in May. Both genes were expressed, relative to elongation factor I, at different levels depending on the tissues (Fig. 3). For glycogen synthase, two distinct groups were statistically evident: during October, transcripts were mainly found in the gonad ($R_{GS}=0.20\pm 0.13$) and labial palps ($R_{GS}=0.11\pm 0.04$) whereas they ranged from 4.5 to 12 times less in muscle, mantle, gills and digestive gland. For glycogen phosphorylase, level of transcripts, relative to elongation factor I transcripts, was significantly higher during May at the 1% level in palps ($R_{GP}=3.13\pm 0.70$) and muscle ($R_{GP}=2.42\pm 0.81$) than those observed in other tissues.

3.3. Seasonal expression of glycogen synthase and phosphorylase genes

During the experimental conditioning of *C. gigas* from March 2002 to January 2003, glycogen content showed a strong decrease from March (mean value= 23.41 ± 3.32 mg glycogen/g wet weight; Fig. 4) to July where the minimal value was observed (mean value= 6.10 ± 0.73 mg glycogen/g wet weight). Thereafter, glycogen content increased until a maximal value in January (mean value= 34.65 ± 5.89 mg glycogen/g wet weight).

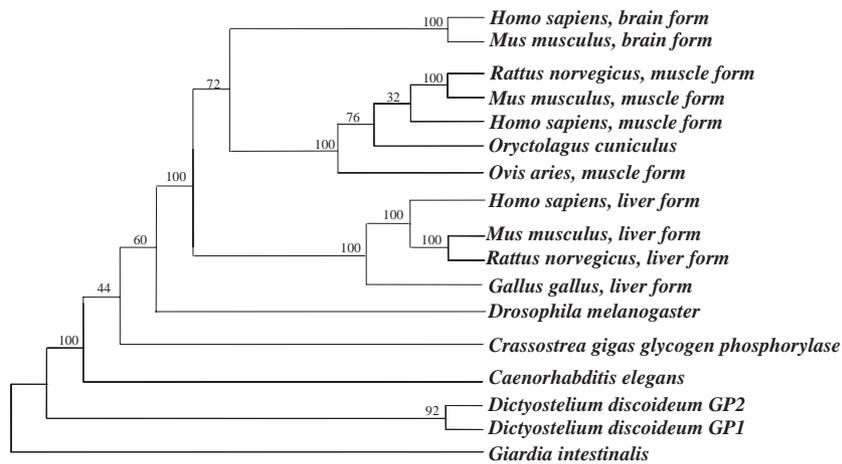
Levels of both mRNAs were assayed by real time PCR in oyster labial palps and the gonad during experimental conditioning. Both mRNA levels showed significant variation in the labial palps and gonad, depending on the month of sampling (Table 1). For both tissues, the level of glycogen synthase was highest in October (R_{GS} palps= 0.11 ± 0.05 , R_{GS} gonad= 0.20 ± 0.13) and not significantly different from values observed during March and May (only during May for labial palps). Its lowest level, close to zero, was observed in July (R_{GS} palps= 0.01 ± 0.002 , R_{GS} gonad= 0.002 ± 0.001 ; Fig. 4), grouping statistically with values observed in the labial palps during January and in the gonad during August and January (Table 1).

The relative level of the glycogen phosphorylase transcript observed in labial palps (Fig. 4) was high from March to June with a value significantly higher in May compared to all other analysed months (R_{GP} palps= 3.13 ± 0.70). In other months, the relative level of glycogen phosphorylase transcript was low with a minimal value observed in July (R_{GP} palps= 0.28 ± 0.16) that was not significantly different from values observed in August, October and January (Table 1). In the gonad, glycogen phosphorylase expression was maximum in March (R_{GP} gonad= 1.07 ± 0.35 , $P<0.001$) but low during the annual cycle. As observed in the labial palps, the minimum value for glycogen phosphorylase mRNA level was observed in July (R_{GP} gonad= 0.05 ± 0.04), grouping statistically with values observed during August and January.

Comparing both tissues, mRNA level of glycogen synthase and phosphorylase genes was significantly higher in the labial palps than in the gonad in May and January ($P<0.05$). In June, a significantly higher level of glycogen phosphorylase transcripts ($P<0.05$) was observed in the labial palps compared to the gonad. During other months, no significant differences in transcript levels between the labial palps and the gonad were detected.

Comparing both genes, level of glycogen phosphorylase transcripts appeared significantly higher than level of

Glycogen phosphorylase



Glycogen synthase

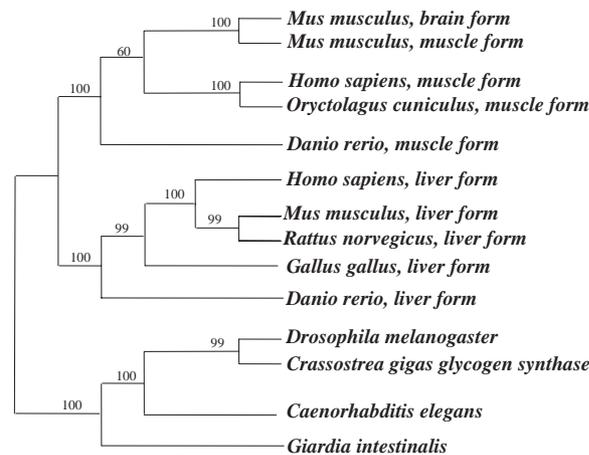


Fig. 2. Graphical representation of phylogenetic analysis of the glycogen phosphorylase (above) and synthase (below) enzymes. Sequence alignment was based on Clustal W (Thompson et al., 1994) and an unrooted distance base phylogenetic tree was constructed by PHYLIP (Felsenstein, 1993) using the unweighted-pair group method with arithmetic means (UPGMA). One thousand bootstrap trials were run using the Seqboot program from the PHYLIP package. Number at each node represents the percentage values given by bootstrap analysis. Genbank accession number of glycogen phosphorylase sequences are: *Giardia intestinalis* (AAK69600), *Dictyostelium discoideum* GP1 (Q00766) and GP2 (P34114), *Caenorhabditis elegans* (Q9N5U1), *Drosophila melanogaster* (Q9XTL9), PHS1 *Gallus gallus* liver form (NP_989723), PHS2 *Ovis aries* muscle form (O18751), PHS2 *Oryctolagus cuniculus* muscle form (P00489), PHS1 *Rattus norvegicus* liver form (P09811), PHS2 *R. norvegicus* muscle form (P09812), PHS1 *Homo sapiens* liver form (P06737), PHS2 *H. sapiens* muscle form (P11217), PHS3 *H. sapiens* brain form (P11216), PHS1 *Mus musculus* liver form (Q9ET01), PHS2 *M. musculus* muscle form (Q9WUB3), PHS3 *M. musculus* brain form (Q8CI94). Genbank Accession N^o of glycogen synthase sequences are: *Giardia lamblia* (EAA42246), *Caenorhabditis elegans* (Q9U2D9), *D. melanogaster* (Q9VFC8), *Danio rerio* liver form (CAI20631) and muscle form (NP_957474), *G. gallus* liver form (XP_416432), *O. cuniculus* muscle form (P13834), *R. norvegicus* liver form (NP_037221) and muscle form (XP_341859), *H. sapiens* liver form (NP_068776) and muscle form (NP_002094), *M. musculus* liver form (NP_663547), muscle form (NP_109603) and brain form (P54859).

glycogen synthase transcripts whatever the analyzed sample (mean difference=19.2±10.8; P<0.05).

4. Discussion

4.1. Glycogen synthase and glycogen phosphorylase genes of *C. gigas*

The deduced amino acid sequences of glycogen synthase and phosphorylase of *C. gigas* have high homology with their invertebrate and vertebrate ortho-

logues, suggesting a high degree of conservation through evolution. Phylogenetic analysis showed that *C. gigas* glycogen phosphorylase clustered with other Protostomia glycogen phosphorylase-related enzymes and possessed the phosphorylase pyridoxal-phosphate attachment site considered as a signature pattern of glycogen phosphorylases. In a same manner, the phylogenetic tree showed that *C. gigas* glycogen synthase was closely related to Protostomia glycogen synthase-related enzymes (*D. melanogaster*, *C. elegans*) and that Deuterostomia glycogen synthase-related enzymes clustered into two groups depending on the tissue specific form (liver *versus* muscle

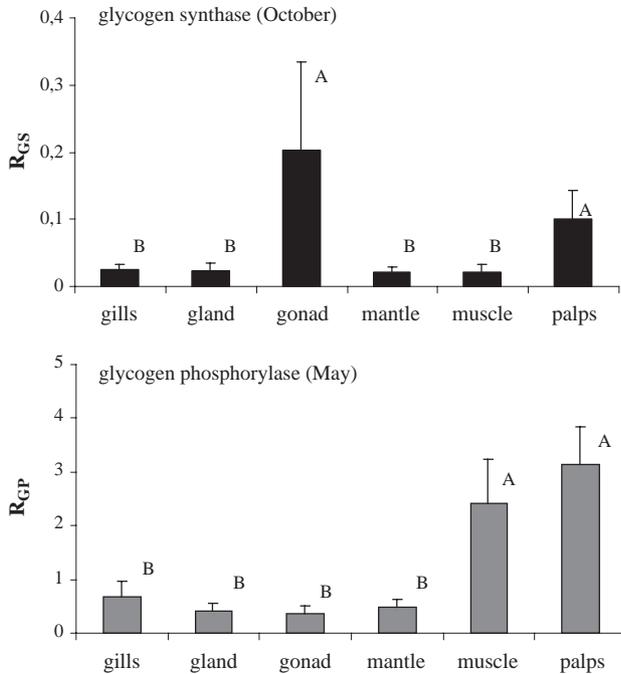


Fig. 3. Ratio of glycogen synthase (R_{GS}) and glycogen phosphorylase (R_{GP}) transcripts relative to elongation factor I transcript in six oyster tissues in October and May, respectively. Data represent mean values for 15 oysters per tissue and are expressed as mean \pm standard deviation. Multiple comparisons were made using a *t*-distribution test at the 5% level and homogenous groups share alphabetic letters.

and brain). These results suggest that our isolated sequences are oyster glycogen phosphorylase and synthase orthologues and can be designated as a *C. gigas* glycogen phosphorylase gene (*Cg-GPH*) and a *C. gigas* glycogen synthase gene (*Cg-GYS*), respectively. These genes are the first glycogen phosphorylase- and synthase-related genes isolated in the phylum Mollusca.

4.2. Tissue expression of *Cg-GYS* and *Cg-GPH*

In our experiment, both *Cg-GYS* and *Cg-GPH* were transcribed at different apparent rates depending on the tissues. Preferential expression of *Cg-GYS* was observed in the labial palps and the gonad in October. This is in accordance with the high level of glycogen content observed in these two tissues and their glycogen storage ability, previously characterised in oysters (Berthelin et al., 2000a,b). Indeed, specific cells located in the labial palps and in the gonad were reported to be involved in glycogen storage (Berthelin et al., 2000b).

The level of *Cg-GPH* transcripts appeared high in labial palps and in muscle in May corresponding to glycogen degradation and mobilization of glucose and energy. In contrary to labial palps, muscle is not considered as a glycogen storage compartment in oysters since glycogen content does not exceed 5% of its total biochemical content (Berthelin et al., 2000a). However, in many species, muscle is a place of active glycogenolysis to quickly provide ATP to

muscular contractile activity and this activity is known to modulate expression of the glycogen phosphorylase gene in rats (Vali et al., 2000). In oysters, most tissues were capable of slight glycogen hydrolysis and/or glucose formation (Berthelin et al., 2000a,b) such as gills, mantle, digestive gland where we observed a weak expression of both *Cg-GYS* and *Cg-GPH*, and muscle where we observed a weak expression of *Cg-GYS*. Lastly, a weak mRNA level of *Cg-GPH* was observed in the gonad in May. According to Fabioux et al. (2004a), oysters were in maturation stage in May and their gonads were mainly constituted by germ cells. Only few specific storage cells, containing glycogen, remained in the gonad in May which could be at the origin of the low value of *Cg-GPH* transcripts.

4.3. Seasonal expression of *Cg-GYS* and *Cg-GPH*

During our experimental conditioning, translatable mRNA for genes *Cg-GYS* and *Cg-GPH* appeared to be seasonally regulated and correlated to glycogen content suggesting that the expression of genes encoding glycogen synthase and phosphorylase were strongly implicated in regulation of glycogen content as observed in mammals (Towle, 1995; Vali et al., 2000). Since a seasonal cycle of storage and mobilization of glycogen was previously

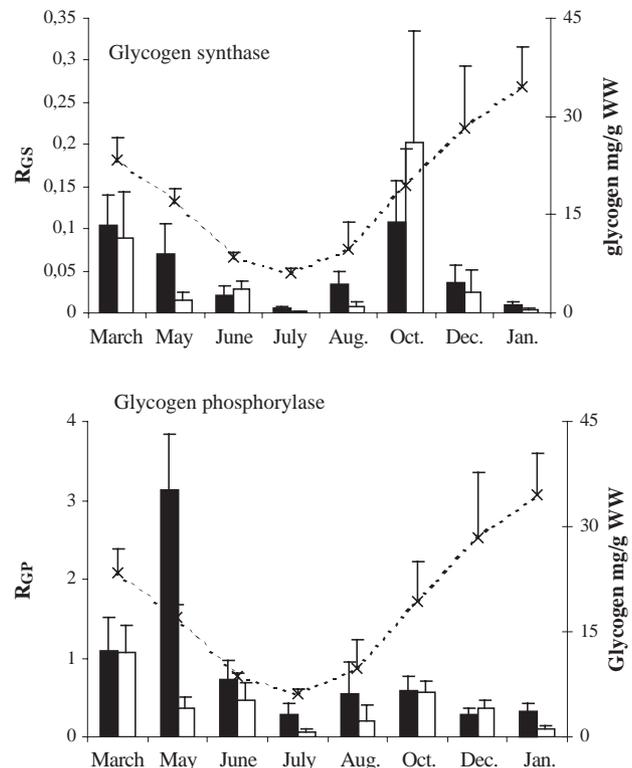


Fig. 4. Ratio of glycogen synthase (R_{GS}) and glycogen phosphorylase (R_{GP}) transcripts relative to elongation factor I transcripts in labial palps (black bar) and gonad (white bar) during experimental conditioning from March to January. Glycogen (mg glycogen/g wet weight of whole animals) levels estimated for tissues are represented by a curve. Data represent mean values for 15 oysters per sample and are expressed as mean \pm standard deviation.

Table 1

Statistical comparison of ratio of glycogen synthase (R_{GS}) and glycogen phosphorylase (R_{GP}) transcripts relative to elongation factor I transcripts in labial palps and gonad during experimental conditioning from March to January

	R_{GS} labial palps	R_{GP} labial palps	R_{GS} gonad	R_{GP} gonad
March	0.10±0.04 (A)	1.08±0.43 (B)	0.09±0.06 (A)	1.07±0.35 (A)
May	0.07±0.04 (AB)	3.13±0.70 (A)	0.02±0.01 (BC)	0.36±0.14 (C)
June	0.02±0.01 (CD)	0.72±0.26 (B)	0.03±0.01 (BC)	0.46±0.21 (BC)
July	0.01±0.001 (E)	0.28±0.16 (C)	0.002±0.001 (E)	0.05±0.04 (D)
Aug.	0.03±0.02 (BC)	0.54±0.40 (BC)	0.01±0.01 (CDE)	0.21±0.20 (CD)
Oct.	0.11±0.04 (A)	0.58±0.19 (BC)	0.20±0.13 (A)	0.57±0.14 (B)
Dec.	0.04±0.02 (BCD)	0.28±0.09 (C)	0.02±0.03 (CD)	0.37±0.09 (BC)
Jan.	0.01±0.002 (DE)	0.32±0.11 (BC)	0.004±0.002 (DE)	0.11±0.04 (D)
<i>K</i>	36.4	36.1	40.5	45
<i>P</i>	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*

Analysis was performed using the Kruskal–Wallis test. Test and probability values were given as *K* and *P*, respectively. Multiple comparisons were made using *t*-distribution test at the 5% level and homogenous groups share similar alphabetic letters.

correlated with the annual reproductive cycle of bivalves (Berthelin et al., 2000b), it can be postulated that the observed seasonal variations of *Cg-GYS* and *Cg-GPH* mRNA levels are closely linked to reproductive stages of oyster. According to histological data obtained with the same sampling (Fabioux et al., 2004a, in press), active gametogenesis began in March in our experiment. First gonadic tubules, composed by active mitotic germ cell, developed among a dense connective conjunctive tissue. Oysters entered maturation stage in April with differentiation of gonia into meiotic germ cell. In the same time, a switch from glycogen storage towards glycogen use seems to occur with a strong increase of *Cg-GPH* and a decrease of *Cg-GYS* and of glycogen content. In females, glycogen would be mobilized for vitellogenesis due to oocytes maturation with the accumulation of yolk and other nutritive substances (Dohmen, 1983) while in males, energy such as glycogen might be mobilized for active production of germ cells. In our conditioning, spawning occurred in July (Fabioux et al., 2004a). The end of reproduction led to very low levels of *Cg-GYS* and *Cg-GPH* transcripts observed in the degenerating gonad during July and August. Thereafter, levels of translatable mRNA for *Cg-GYS* and glycogen content began to increase, especially in October in the labial palps and the gonad. This increase coincided with a change from germinal to somatic development in the gonad. In October, reconstitution of a dense conjunctive tissue, mainly composed by specific storage cells, was observed (Fabioux et al., 2004a, in press).

In the gonad, annual variation of its cellular composition (somatic storage cells vs germinal cells) could be at the origin of the variations observed of the mRNA levels of both genes mainly expressed by a single cell type (i.e. the specific storage cell). In labial palps which are only constituted by storage cells, the observed seasonal variations of *Cg-GYS* and *Cg-GPH* mRNA levels appeared linked to the reproductive cycle, both being putatively controlled by the same exogenous or endogenous factors. During experimental conditioning, the food ration was constant (a mixed diet of three micro-algal species equal to

8% dry weight algae/dry weight oyster per day). Therefore, food availability could not be the parameter that affected seasonal variation in glycogen content and expression of *Cg-GYS* and *Cg-GPH* genes. Temperature and photoperiod were the only environmental parameters that varied during our annual conditioning. These parameters were demonstrated to drive reproductive internal-clock of *C. gigas* (Fabioux et al., in press). The putative role of temperature or photoperiod in the regulation of glycogen pathways, especially for the expression of *Cg-GYS* and *Cg-GPH* genes, via the control of reproductive cycle is therefore questioned.

To conclude, expression of *Cg-GYS* and *Cg-GPH* appeared to be seasonally regulated in oysters and might be strongly implicated in the regulation of glycogen content. Nevertheless, regulation on catalytic parameters also exists (as observed in frog, Scapin and Di Giuseppe, 1994). Molecular and kinetic study of both enzymes are necessary to conclude that *Cg-GYS* and *Cg-GPH* are useful molecular markers to study regulation of glycogen metabolism and reproduction in *C. gigas* as well as to elucidate the physiological significance of the difference of expression between both genes.

Acknowledgements

The authors are grateful to J.F. Samain, M. Mathieu and J.L. Nicolas for their support during the course of this work. The authors are indebted to Chris Langdon (Oregon State University) for helpful comments on the manuscript and for his help for editing the English language. We also acknowledge P. Favrel for his technical advice. We thank all the staff of the Argenton, Bouin and La Tremblade stations for providing experimental oysters under controlled conditions. This work was supported by the MOREST national project funded by IFREMER and by the Région Basse-Normandie, Bretagne, Pays de la Loire and Poitou-Charentes and the conseil général du Calvados.

References

- Bayne, B.L., Bubel, A., Gabbott, P.A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., 1982. Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* (L.). *Mar. Biol. Lett.* 3, 89–105.
- 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). *Comp. Biochem. Physiol.*, B 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. *Mar. Biotechnol.* 2, 136–145.
- Blass, J.P., Sheu, R.K., Cedarbaum, J.M., 1988. Energy metabolism in disorders of the nervous system. *Rev. Neurol.* 144, 543–563.
- Childress, C.C., Sacktor, B., 1970. Regulation of glycogen metabolism in insect flight muscle. Purification and properties of phosphorylases in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 245, 2927–2936.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Cohen, P., 1986. In: Boyer, P.D., Krebs, E.G. (Eds.), *The Enzymes*, vol. 17A. Academic Press, San Diego, CA, pp. 461–497.
- Dégremont, L., 2003. Genetic basis of summer mortality and relationship with growth in juvenile Pacific cupped oysters *Crassostrea gigas*. Thèse de l'Université de Caen. 322 pp.
- Deslous-Paoli, J.M., Héral, M., Berthome, J.P., Razet, D., Garnier, J., 1981. Natural reproduction of *Crassostrea gigas* thunberg in Marennes-Oleron basin in 1979 and 1981: biochemical and energetic aspects. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. Nantes* 45, 319–327.
- Dohmen, M.R., 1983. Gametogenesis. In: Verdonk, N.H., Van den Biggelaar, J.A.M., Tompa, A.S. (Eds.), *The mollusca*, Development, vol. 3. Academic Press, New York, pp. 1–48.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A., 2004a. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germ cell lineage in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 897–904.
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Minguant, C., Le Pennec, M., 2004b. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 592–598.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., in press. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*.
- Felber, J.P., Golay, A., 1995. Regulation of nutrient metabolism and energy expenditure. *Metabolism* 44, 4–9.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package, version 3.5c). Department of Genetics, SK, University of Washington, Seattle, WA.
- Gabbott, P.A., Whittle, M.A., 1986. Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* (L.). II: seasonal changes in the glycogen content and glycogen synthetase activity in the mantle tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B, 197–207.
- Hervant, F., Mathieu, J., 1995. Ventilatory and locomotory activities in anoxia and subsequent recovery of epigeal and hypogeal crustaceans. *C. R. Acad. Sci.*, III 318, 585–592.
- Huvet, A., Dubois, S., Daniel, J.Y., Quééré, 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., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F., Cunningham, C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progenies exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343, 211–220.
- Kasvinsky, P.J., Shechosky, S., Fletterick, R.J., 1978. Synergistic regulation of phosphorylase a by glucose and caffeine. *J. Biol. Chem.* 253, 9102–9106.
- Kepler, D., Decker, K., 1974. Glycogen determination with amyloglucosidase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, pp. 11–17.
- King, M.W., 1996. Chapter 3: Biochemistry pp. 77–112 and Practice Test pp. 247–330; in Review for the USMLE Step I. 2nd edition: ed. Thomas K. Barton; Appleton and Lange, Stamford, CT.
- Mathieu, M., Lubet, P., 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves—a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23, 123–129.
- Mathieu, M., Robbins, I., Lubet, P., 1991. The neuroendocrinology of *Mytilus edulis*. *Aquaculture* 94, 213–233.
- Morishima, I., Sakurai, S., 1985. Purification and characterization of glycogen phosphorylase b from fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 81, 453–458.
- Morisson, T.B., Weiss, J.J., Wittwer, C.T., 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24, 954–962.
- Nordlie, R.C., Foster, J.D., Lange, A.J., 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 19, 379–406.
- Oliveira, G.T., da Silva, R.S., 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 127, 375–381.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981. Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Washington State. *J. Shellfish Res.* 1, 9–16.
- Reynet, C., Kahn, C.R., Loeken, M.R., 1996. Expression of the gene encoding glycogen phosphorylase is elevated in diabetic rat skeletal muscle and is regulated by insulin and cyclic AMP. *Diabetologia* 39, 183–189.
- Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G., Abad, M., Sanchez, J.L., 1992. Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Mar. Biol.* 112, 67–74.
- San Juan Serrano, F., Fernandez Gonzalez, M., Sanchez Lopez, J.L., Garcia Martin, L.O., 1991. Purification and molecular properties of glycogen phosphorylase b from mantle tissue of mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 98, 33–39.
- San Juan Serrano, F., Fernandez Gonzalez, M., Garcia Martin, L.O., 1993. Effect of temperature on glycogen phosphorylase activity of *Mytilus galloprovincialis* mantle tissue. *Actas del IV congreso nacional de acuicultura, centro de investigaciones marinas, Pontevedra (Spain)*, pp. 425–430.
- San Juan Serrano, F., Suarez Alonso, P., Blanco Lopez, S.L., Garcia Martin, L.O., 1998. Regulation of *Mytilus galloprovincialis* glycogen phosphorylase by glucose and glucose-6-phosphate. *J. Shellfish Res.* 17, 159–163.
- Scapin, S., Di Giuseppe, G., 1994. Seasonal variations of glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of the frog *Rana esculenta*. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 107, 189–195.
- Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D., Goulletquer, P., 1998. Hydrobiology of the Marennes-Oleron Bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. *Hydrobiologia* 386, 1–3.
- Swift, M.L., Akosah, K.O., Thomas, T.P., Humphrey, C.L., 1988. Characteristics of glycogen synthase activity in the digestive diverticula of the oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *J. Shellfish Res.* 7, 177–178.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Towle, H.C., 1995. Metabolic regulation of gene transcription in mammals. *J. Biol. Chem.* 270, 23235–23238.
- Vali, S., Carlsen, R., Pessah, I., Gorin, F., 2000. Role of the sarcoplasmic reticulum in regulating the activity-dependent expression of the glycogen phosphorylase gene in contractile skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 185, 184–199.

Transcriptional Regulation of Pyruvate Kinase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in the Adductor Muscle of the Oyster *Crassostrea gigas* During Prolonged Hypoxia

GILLES LE MOULLAC^{1*}, HÉLÈNE BACCA², ARNAUD HUVET²
JEANNE MOAL², STÉPHANE POUVREAU¹, AND ALAIN VAN WORMHOUDT³
¹UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFREMER, Site
Expérimental d'Argenton, Presqu'île du Vivier, Argenton en Landunvez,
France
²UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFREMER,
Centre de Brest, Plouzané, France
³UMR 5178 Biologie des Organismes et des écosystèmes Marins, Station de
Biologie Marine du Muséum National d'Histoire Naturelle, Concarneau,
France

ABSTRACT The response of *Crassostrea gigas* to prolonged hypoxia was investigated for the first time by analyzing the metabolic branch point formed by pyruvate kinase (PK) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). PK and PEPCK cDNAs were cloned and sequenced. The main functional domains of the PK sequence, such as the binding sites for ADP/ATP and phosphoenolpyruvate (PEP), were identified whereas the PEPCK sequence showed the specific domain to bind PEP in addition to the kinase-1 and kinase-2 motifs to bind guanosine triphosphate (GTP) and Mg²⁺, specific for all PEPCKs. A C-terminal extension was detected for the first time in eukaryota PK. Separation of mitochondrial and cytosolic fraction showed that more than 92% of the PEPCK enzyme activity was cytosolic in gills, digestive gland, mantle and muscle. PK and PEPCK mRNAs and enzyme activities have been measured in muscle during prolonged hypoxia for 20 days. Adaptation of PK in hypoxic muscle at transcriptional level occurred lately by decreasing significantly the PK mRNA level at day 20 while PK enzyme activity was inhibited by the high content of alanine. The PEPCK mRNA ratio in hypoxic muscle significantly increased at day 10 simultaneously to the PEPCK enzyme activity. Succinate accumulation observed at day 10 and day 20 confirmed the anaerobic pathway of muscle metabolism in oyster subjected to hypoxia. Regulation of *C. gigas* PEPCK in muscle occurred at gene transcription level while PK was first regulated at enzyme level with alanine as allosteric inhibitor, and then at molecular level under a fast effect of hypoxia. *J. Exp. Zool.* 307A:371–382, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

How to cite this article: Le Moullac G, Bacca H, Huvet A, Moal J, Pouvreau S, Van Wormhoudt A. 2007. Transcriptional regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during prolonged hypoxia. *J. Exp. Zool.* 307A:371–382.

Marine molluscs can experience oxygen limitations during emersion in the intertidal zone and during hypoxic periods near the sediment or due to algal blooming. However, most marine molluscs tolerate low oxygen levels. In bivalves, this tolerance is first based on a mechanism of water pumping/ventilation (Tran et al., 2000) which makes more oxygen available to the gills and improves its distribution to the tissues, helping to

maintain the rate of oxygen consumption. This mechanism remains functional until an oxygen

*Correspondence to: Gilles Le Moullac, IFREMER, Laboratoire Domestication de l'Huître Perlière, BP 7004 98719 Afaahiti, Tahiti, Polynésie Française. E-mail: Gilles.Le.Moullac@ifremer.fr

Received 12 January 2007; Revised 28 March 2007; Accepted 4 April 2007

Published online 7 May 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jez.390

threshold is reached below which bivalves can no longer maintain a sufficient rate of oxygen consumption. This threshold, around $2 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$, defines the hypoxic threshold (Bricker et al., '99). The reduction of feeding activity and oxygen consumption is a frequently observed response to hypoxia in bivalves (Sobral and Widdows, '97; Chen, '98; Hicks and McMahon, 2002).

Hypoxia and anoxia bring about a metabolic depression due to switching from aerobic to anaerobic less efficient energy production (Shick et al., '86, De Zwaan et al., '91). This metabolic switch affects the final step of the glycolysis at the level of phosphoenolpyruvate (PEP). In aerobic mode, PEP is the substrate of pyruvate kinase (PK) for the production of pyruvate. Pyruvate, a substrate of the Krebs cycle, is linked to ATP production via the respiratory mitochondrial chain. PEP can also be the substrate of gluconeogenesis which is essentially rate limited by PEP carboxykinase (PEPCK) (Schein et al., 2004). The metabolic switch is controlled by several mechanisms such as the phosphorylation of PK (Simpfendorfer et al., '97; Greenway and Storey, '99), and the level of alanine leads to a reduction in its activity. When this occurs, PEP becomes mainly a substrate for PEPCK leading to the formation of succinate. If the response to hypoxia and anoxia in aquatic invertebrates has been widely studied, there is a lack of information on hypoxia tolerance of *C. gigas* at the physiological and molecular levels. Recently the response of *C. gigas* to hypoxia has been investigated focusing on the analysis of the differential expression pattern of specific genes associated showing regulations of energy metabolism but without detecting change of PK and PEPCK gene expression (David et al., 2005). The cellular origin (cytosolic versus mitochondrial) of PEPCK allows to reveal some functional differences between cytosolic PEPCK (PEPCK-C) and mitochondrial PEPCK (PEPCK-M). Indeed, the activity of PEPCK-M and the turnover rate of mRNA appear to be constitutive (Weldon et al., '90; Hanson and Reshef, '97; Williamson, '74; Modarressi et al., '98) contrary to PEPCK-C.

This study was designed to determine the regulation level of the metabolic pathways in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* by (1) describing the sequence of *C. gigas* PK and PEPCK cDNAs, (2) localizing the origin of PEPCK enzyme activity (mitochondrial versus cytosolic) and (3) analyzing the mRNA levels and enzymatic activities of PK and PEPCK in muscle during a 20-day hypoxia. Succinate and alanine were quanti-

fied to validate the anaerobic pathway associated with the stimulation of PEPCK.

MATERIAL AND METHODS

Biological material

Sixteen-month-old oysters bred in the Ifremer experimental hatchery in Argenton (Finistère, France) were grown on in Aber Wrach (Finistère). Samples of oysters (individual weight $17.82 \pm 2.03 \text{ g}$) were collected at this site in October 2005 and placed in 300-l experimental tanks with $20 \mu\text{m}$ -filtered running seawater at the Ifremer laboratory in Argenton. The oysters were first adapted for 1 week to laboratory temperature (which was progressively increased up to 15°C) and fed with an algal diet composed of *Isochrysis* at saturation level corresponding to a daily ration of 12% dry weight algae/dry weight oyster.

Prolonged hypoxia

Oysters were kept in same open flow tanks as above. Hypoxia was permanently maintained for 20 days and compared to normoxia. Normoxic oysters were kept in tank supplied continuously with oxygen saturated seawater at around $8.53 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ and fed with an algal diet composed of *Isochrysis* supplied continuously at the concentration of $123 \pm 26 \times 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$. Hypoxic oysters were maintained in hypoxic seawater and fed with the same diet at $130 \pm 27 \times 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$. Hypoxia was obtained by bubbling nitrogen through oxygen-saturated seawater of the continuous renewal which allowed the oxygen level to be reduced to $1.96 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$. To avoid the retaken of oxygen in the seawater, floating PVC plates are put on the water surface. For gene expression and enzyme activity measurements, the muscle of oysters were dissected, frozen immediately, pooled by six and stored in liquid nitrogen at days 0, 2, 10 and 20 after the beginning of the experimental conditioning. Tissue samples for gene expression and enzyme assay were frozen in nitrogen liquid, powdered with a Danguomeau grinder and stored in liquid nitrogen. After each sampling, water renewal and algae distribution were adjusted to keep same environmental conditions.

Ecophysiological measurements

Measurement of clearance and oxygen consumption rates of the oyster populations subjected to normoxia and hypoxia, was carried out in tanks containing oysters and in control tank without

animals. Each tank was connected to a system that provided continuous measurement of dissolved oxygen and chlorophyll level (Blain et al., 2004). Values of these parameters were recorded every 2 hr 30 min and allowed for the evaluation of oxygen consumption and ingestion rates (IRs) of the oyster population in each tank. Taking into account the number of oysters, the IR and respiration rate (RR) were respectively expressed in $\text{cell h}^{-1} \text{ind}^{-1}$ and $\text{mg O}_2 \text{h}^{-1} \text{ind}^{-1}$.

$$\text{IR} = [(\text{Chl.}_{\text{control}} - \text{Chl.}_{\text{oyster}}) \times \text{FR}] / N,$$

$$\text{RR} = [(\text{O}_{2\text{control}} - \text{O}_{2\text{oyster}}) \times \text{FR}] / N,$$

where Chl. was the chlorophyll concentration (FFU l^{-1}), O_2 ($\text{mg O}_2 \text{l}^{-1}$) was the oxygen concentration, FR was the flow rate for sea water renewal (l h^{-1}), and N was the number of oysters.

Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated using extract-all reagent (Eurobio, France) at a concentration of 1 ml/50 mg tissue. Samples were then treated with DNase I (Sigma, France) (1 U/ μg RNA) and precipitated by sodium acetate (3M, pH 5.2) treatment followed by washing with absolute ethanol. RNA concentrations were measured at 260 nm using the conversion factor: 1 OD = 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA.

The polyadenylated RNA of samples were reverse-transcribed from 1 μg of total RNA denatured for 10 min at 70°C. Reactions were carried out in a total volume of 25 μl with the following concentrations of the reaction components: 1 \times M-MLV Reverse Transcriptase buffer, 0.2 mM dNTPs, 4 mM DTT, 0.5 μg oligo(dT) primer, 25 U ribonuclease inhibitor and 50 U M-MLV Reverse Transcriptase. Reverse transcription (RT) was carried out for 10 min at 25°C, 20 min at 42°C and then 5 min at 94°C.

PK and PEPCK cDNA cloning

For PK cloning, a cDNA library was first constructed in lambda-ZAP II from *C. gigas* hemocytes mRNA. A consensus sequence was then obtained by amplification with two primers deduced by alignment of known PK sequences (Hui7⁵¹⁸ 5' GAY CAN AAR GGN CCN GAR AR 3' ⁵⁵⁰ and Hui8R¹¹¹⁷ 5' TGN GCN AGR AAN ACY TTY TC 3' ¹⁰⁹¹). This consensus was 590 bp in length. The 5' end was obtained with the primer Hui1 (⁸⁹⁴ 5' ACA TGA TTT TCG CGT CCT TC 3' ⁹¹⁴), selected inside the polymerase chain reaction (PCR) fragment, and with the universal primer T7 present in the Bluescript cloning system of the

lambda phage. The 3' end was obtained in parallel using HuiREV (¹⁰⁵⁷ 5' ACC ATG ATA CCA TCC GAC TCC T 3' ¹⁰³⁵) and T3 primers. Two fragments were obtained, 1,400 and 1,200 bp long. The sequences were read on an ABI Prism 410 sequencer (Applied Biosystems, France), and two other primers (Hui3¹⁴¹⁵ 5' GTC GCC ATA GCA GCA GTG GA 3' ¹⁴³⁵ and Hui9r³⁹⁷ 5' CCT TCA ATC ACC ATC TTC TGT 3' ³⁷⁶) were used to complete sequencing.

For PEPCK cloning, a consensus fragment was obtained using two primers, cons5 (¹³⁹³ 5' TGG GAR GAY CCN AAR GGN GT 3' ¹⁴¹³) and cons4r (¹⁶⁸⁶ 5' CGG AAC CAR TTN ACR TGR AA 3' ¹⁶⁶⁶), on a mantle lambda ZAP II library (Lelong et al., 2000). The 3' end of PEPCK was obtained by PCR using nested primers (pepH1-M13¹⁴⁸⁹ 5' CAT GGC GTC ATG GTT GGA GC 3' ¹⁵⁰⁹ and pepFW-T7¹⁵⁰⁴ 5' GGA GCC TGC GTC AAA TCT GA 3' ¹⁵²⁴). The 5' end of PEPCK was obtained by RACE PCR (Boehringer Mannheim). Two successive PCR were realized with two oligonucleotide, first pepH4r-dT anchor (¹⁴⁹⁶ 5' CGC CAT GTT GCC AGC TGT AG 3' ¹⁴⁷⁶), and then pepH10r-anchor (¹¹⁸¹ 5' GCA TGG CAT TGG GGT TAG TT 3' ¹¹⁶¹) on total mRNA extracted from the mantle. The 750 bp fragment obtained was then sequenced and was truncated. This allowed to design a new primer pair (PepH13r-anchor⁵⁶⁸ 5' ACT GAA GGG GAT CAC ATA CA 3' ⁵⁴⁸) and the PCR amplification of the 500 bp 5' end. Two other primers: pepH11R¹²⁵⁹ 5' CCT CCA TTC CCT CCC AGA A 3' ¹²⁴⁰ and pepH9¹⁹¹⁸ 5' TTC CTG GAG GAC CAG GTC GG 3' ¹⁹³⁸ were used for final sequencing.

PK and PEPCK mRNA expression

For spatial localization of PK and PEPCK in gills, digestive gland, gonad, mantle and muscle, the levels of glycolytic gene transcripts were investigated (Table 1) by real-time PCR using an Icyler (Bio-Rad, France) using actin as internal control for gene expression (as in Huvet et al., 2004). No significant differences between Ct values were observed for the actin gene between gill, mantle, digestive gland, gonad and muscle ($P = 0.36$).

For the hypoxia experiment, actin was substituted for elongation factor I (EF1) as internal control (Fabioux et al., 2004) to analyze PK and PEPCK gene transcription. No significant differences between Ct values were observed for the two house-keeping genes actin ($P = 0.34$) and EF1

TABLE 1. Pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase expression (relative to actin) and enzyme activity in five oyster tissues

Organ	n	Pyruvate kinase		Phosphoenolpyruvate kinase		PEPCK origin (cytosolic/total activity, %)
		Gene expression ($\times 10^{-2}$)	Enzyme activity (U g ⁻¹ ww)	Gene expression ($\times 10^{-2}$)	Enzyme activity (U g ⁻¹ ww)	
Digestive gland	12	0.38 ± 0.08 ^b	4.7 ± 0.8 ^b	1.03 ± 0.20 ^b	0.28 ± 0.01 ^c	92
Gill	12	0.16 ± 0.02 ^c	0.3 ± 0.1 ^c	1.21 ± 0.20 ^b	0.04 ± 0.01 ^d	96
Gonad	12	0.51 ± 0.17 ^b	3.2 ± 1.1 ^b	0.99 ± 0.20 ^b	1.09 ± 0.20 ^b	ND
Mantle	12	0.21 ± 0.04 ^c	0.3 ± 0.1 ^c	0.97 ± 0.17 ^b	0.04 ± 0.01 ^d	99
Muscle	12	1.51 ± 0.43 ^a	10.9 ± 2.5 ^a	6.10 ± 1.10 ^a	2.73 ± 0.14 ^a	94

Data represent mean values for 12 pools of five oysters per tissue. Data are expressed as mean ± standard error. Within each column, homogenous groups are marked with the same alphabetic letters. ND, non determined.

($P = 0.95$) between normoxia and hypoxia. The coefficient of variation was 4.3 and 3.3% for actin and EF1. Therefore, the relative quantification value of the sample was normalized to the EF1 gene (because of its lower P -value and coefficient of variation).

The specific primers were synthesized as follows: (PK) PKHui1, 5'-ACATGATTTTCGCCTCCTTC-3'; PKHui2R, 5'-TCTCTGGGGGAATCTCAATG-3'; (PEPCK) PEPCKPEPH1, 5'-CATGGCGTCA TGGTTGGAGC-3', PEPCKPEPH2R, 5'-GTCAAG CCAGTGCTGTAGG-3'. The real-time PCR assay was performed in triplicate with 5 µl cDNA (1/5 dilution) in a total volume of 15 µl. The concentrations of the reaction components were 0.33 µM of each primer and 1 × iQ SYBR Green Supermix (Bio-rad). This reaction was performed as follows: activation at 95°C for 5 min followed by 45 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 60°C, and a melting curve program from 95 to 70°C that decreased the temperature by 0.5°C every 10 s. Each run included a positive cDNA control (one sample of the experimental mixture analyzed per amplification plate), negative controls (replicates of each total RNA sample without reverse transcriptase) and blank controls (water) for each primer pair. PCR efficiency (E) was determined by drawing standard curves from a serial dilution analysis of cDNA from samples to ensure that E ranged from 99 to 100% for each primer pair. The fluorescence threshold value was calculated using the Icycle iQ system software. Relative expression was normalized using Actin to investigate glycolytic genes in tissues and EF1 to investigate the effect of hypoxia in adductor muscle as controls: $QR = 2^{-(Ct_{target} - Ct_{reference})}$.

Tissular localization of PK and PEPCK and PEPCK cellular localization

At reception in the laboratory, spatial distribution for gene expression and enzyme activity measurements of PK and PEPCK were done using 12 oysters which were dissected to collect five tissues (gills, digestive gland, gonad, mantle and muscle). Tissue samples for gene expression and enzyme assay were frozen in nitrogen liquid, powdered with a Danguomeau grinder and stored in liquid nitrogen.

Cellular localization of PEPCK was analyzed on four tissues (muscle, digestive gland, gills and mantle) of *C. gigas*. After dissection the tissues were pooled and then homogenized by Potter in ice-cold buffer (1 g ww/4 ml) (10 mM Tris pH 7.2, 5 mM EDTA, and 250 mM sucrose). The homogenate was centrifuged at 900 × g for 10 min (4°C) and the resultant supernatant was centrifuged at 10,000 × g for 15 min (4°C). Cytosolic fraction (supernatant) was then centrifuged at 100,000 × g for 60 min (4°C). Mitochondrial fraction was centrifuged three times at 10,000 × g for 10 min (4°C). The pellet was resuspended in 2 ml buffer, sonicated and centrifuged at 18,000 × g for 20 min (4°C). PEPCK enzyme activity was assessed as described below. Cytochrome *c* oxidase (Sigma CYTOCOX1-1KT) was used as markers to control a possible cross-contamination between the two fractions.

Enzyme extraction and assay

Powdered frozen tissues were used for enzyme assay. Using a 1:5 w/v ratio for all tissues, the aliquots were homogenized in a buffer composed

of 50 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.2), 100 mM Na₃F, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA and 15 mM 2-mercaptoethanol. A few crystals of phenylmethylsulfonyl (PMSF) were added immediately before homogenization. The homogenates were centrifuged for 20 min at 20,000 × *g* at 5°C. Blanks were run and subtracted. Changes in NAD(P)H absorbance at 340 nm were monitored using a Biotek Microplate Reader. Assays were conducted at 30°C and initiated by mixing the 230 μl reagent preparation, with the homogenate (20 μl). The preparation for PK (EC 2.7.1.40) was as follows: 100 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.2), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM phosphoenol pyruvate, 2 mM ADP, 0.15 mM NADH, 0.2% 2 (v/v) rotenone-saturated ethanol, and 1 U/ml LDH. For PEPCK (EC 4.1.1.32) the preparation was: 100 mM imidazole-HCl buffer (pH 6.6), 30 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM PEP, 50 mM NaHCO₃, 1.25 mM IDP, 1 mM MnCl₂, 0.15 mM NADH and 2.5 U/ml MDH.

Alanine and succinate determination

Metabolites were extracted from 200 mg of the oyster powder prepared as described above with 2 ml of trichloro-acetic acid (TCA), neutralized with 1.2 ml of amine freon trioctylamine/trifluoro-trichloro-ethane, v:v, 1:5). Alanine was measured enzymatically according to standard procedures as described by Williamson ('74). Succinate was quantified with the succinate determination kit of R-Biopharm Inc (Marshall, MI).

Kinetics and statistics

Kinetic properties of PK enzyme were defined as Greenway and Storey (2000). The substrate affinity constant ($S_{0.5}$) is defined as the concentration of substrate at which the enzyme the enzyme reaction proceeds at 50% of its maximal velocity. $S_{0.5}$ is defined by fitting data from the double reciprocal plots (Lineweaver-Burk plot) of rate versus substrate (PEP) concentration. I_{50} is defined as the concentration of inhibitor (alanine) required to reduce enzymes activity to half its value in the absence of inhibitor. I_{50} values were obtained from the Dixon plots of rate versus inhibitor concentration.

Data are given as means ± SE of oyster pools in normoxic and hypoxic group at each time point. A one-way ANOVA followed by Fisher's test was used to determine if individual time point means differed from time 0 means within each oxygen level group. *t*-tests were utilized to determine if

there were differences between means of normoxic and hypoxic group at each time point. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statistical analyses were performed using Statview (SAS).

RESULTS

Molecular characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate kinase

The nucleotide sequence of *C. gigas* PEPCK (AM 076952) was 2,561 bp long. The deduced sequence of amino acids (Fig. 1A) compared with databases by using the Blast algorithm showed very high similarity with other PEPCK proteins. Comparison by multiple alignments indicated 53–63.4% identity between the PEPCKs of different vertebrate and invertebrate species (Fig. 1A). The putative deduced mature sequence encoded a 615 amino acid protein of 69.25 kDa molecular weight. The potential ATG codon initiator was present at nucleotide 193–195 from the 5' position of the PEPCK nucleotide sequence. The functional domains of the PEPCK identified on the sequence obtained from *C. gigas* were highly conserved. The oxaloacetate binding site, as well as the kinase-1 and kinase-2 motifs for binding GTP and Mg²⁺, respectively, were common to all PEPCKs (Matte et al., '97).

The total PK sequence isolated (AM 076953) was 2,121 bp long. The deduced sequence of amino acids (Fig. 1B) showed very high similarity with other PK proteins and encoded a 563 amino acid pre-protein of 61.345 kDa molecular weight. Comparison by multiple alignments indicated 58.6–65.7% identity between the PKs from different species of vertebrates and invertebrates (Fig. 1B) and showed that it is a M-type PK. The main functional domains of the sequence were identified. The ADP/ATP binding site was a highly conserved sequence of 389–420 residues (³⁸⁹TRAESSDVANAVLDGADCVMLSGETAKGDY PLEC⁴²⁰). The PEP binding site was composed of amino acids located at different positions in the sequence (Munoz and Ponce, 2003). These residues were Arg-117, Asp-157, Lys-317, Glu-319, Ala-340, Arg-341, Gln-376, Ser-409 and Glu-411 (Fig. 1B). The region involved in the formation of the binding site for fructose 1-6 biphosphate (F1,6BP) included 16 residues which were observed in the *C. gigas* sequence ⁴⁷¹MAAII-VITTSGRSAH⁴⁸⁶. A C-terminal extension was present that did not correspond to a functional motif as it is the case in bacteria.

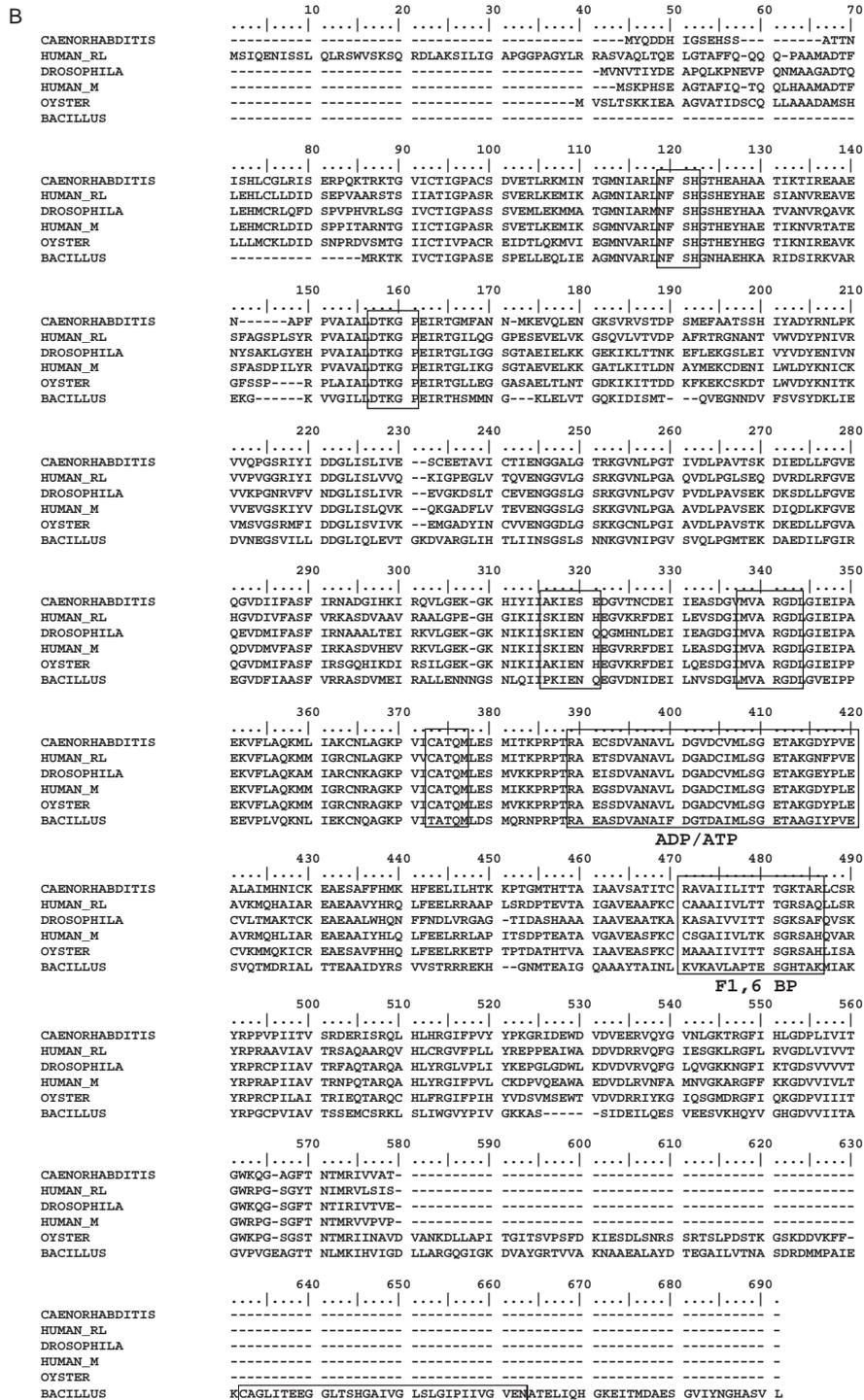


Fig. 1. Continued.

tissues ($P < 0.1\%$). The activity of the PEPCK was the highest in the muscle and the lowest in the digestive gland, the mantle and the gills (Table 1). PEPCK enzyme activity was mainly detected in cytosol representing 96, 92, 99 and 94% of the total PEPCK activity, respectively, in gills, digestive gland, mantle and muscle (Table 1).

Response to prolonged hypoxia

Hypoxia induced a significant depression of respiration and ingestion, since RR was significantly reduced ($P < 5\%$) by 83% from 0.60 ± 0.03 to $0.11 \pm 0.06 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ ind}^{-1}$, and IR decreased by 55%, from $48.44 \times 10^3 \pm 4.65$ to $26.65 \times 10^3 \pm 5.05 \text{ cell}$

$\text{h}^{-1}\text{ind}^{-1}$. The results are given as means \pm SE ($n = 16$).

The PK mRNA ratio in hypoxic muscle decreased during the experimental period, the change of PK mRNA ratio became significant at day 20 compared to day 0 (Fig. 2A). Differences with normoxia were significant at days 10 and 20. Inversely, the activity of PK enzyme did not change in hypoxic muscle, while the PK activity in normoxic muscle increased significantly at days 10 and 20 compared to day 0. The PK activity in normoxic muscle was significantly higher from hypoxic muscle at days 10 and 20 (Fig. 2B). The PEPCK mRNA ratio in hypoxic muscle significantly increased only at day 10 compared to day 0 and at day 10 was significantly higher than PEPCK mRNA ratio of normoxic muscle (Fig. 2C). Significant differences in PEPCK activity were observed at day 10 between normoxic and hypoxic conditions (Fig. 2D).

Alanine content in normoxic muscle decreased significantly at days 10 and 20 compared to day 0 (Fig. 3A). In hypoxic muscle, the level of alanine

remained high and unchanged. The level of alanine in normoxic and hypoxic muscle became significantly different at days 10 and 20 (Fig. 3A). Succinate level in hypoxic muscle increased significantly at day 20. The succinate content was significantly higher than at day 0 and higher than in normoxic muscle (Fig. 3B).

Hypoxia exposure led to significant change in the kinetic properties of PK enzyme activity in muscle. The PEP affinity constant ($S_{0.5}$) was strongly reduced by sixfold (Table 2). PK enzyme activity from hypoxic muscle also showed much greater inhibition by L-alanine, with the I_{50} value reduced to only 14% of the corresponding normoxic value.

DISCUSSION

The high similarity between the PEPCK sequence from *C. gigas* and PEPCK from other invertebrates and vertebrates, combined with the conservation of the PEPCK-specific domain, suggests that the cloned enzyme is a functional form

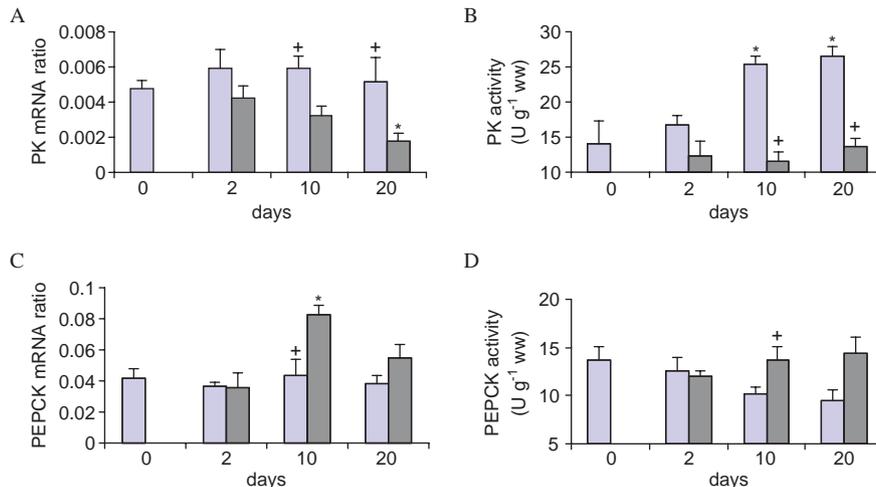


Fig. 2. The effects of oxygen on PK and PEPCK mRNA ratio and enzyme activity in *C. gigas* muscle in normoxia (gray) and hypoxia (dark). PK mRNA ratio (A), PK activity (B), PEPCK mRNA (C) ratio and PEPCK activity (D). Results are means \pm SE, $n = 6-8$. *, significant difference ($P < 0.05$) relative to day 0 within each group. +, significant difference ($P < 0.05$) between normoxia and hypoxia at each sampling day.

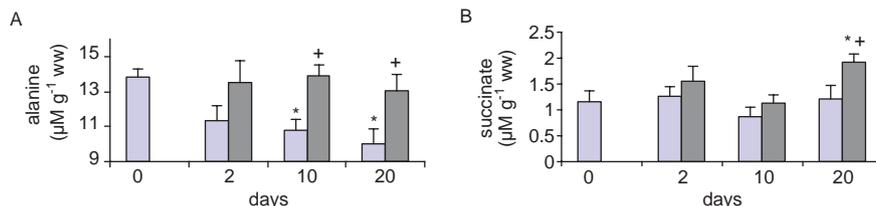


Fig. 3. The effects of oxygen on alanine and succinate in *C. gigas* muscle in normoxia (gray) and hypoxia (dark). Alanine (A), succinate (B). Results are means \pm SE, $n = 6-8$. *, significant difference ($P < 0.05$) relative to day 0 within each group. +, significant difference ($P < 0.05$) between normoxia and hypoxia at sampling each day.

TABLE 2. Kinetic properties of PK from adductor muscle of *C. gigas* in normoxia and hypoxia

	Normoxia	Hypoxia
S _{0.5} PEP (mM)	0.19 ± 0.02	1.14 ± 0.14 ^a
I ₅₀ L-alanine (mM)	9.30 ± 1.35	1.36 ± 0.26 ^a

The results are given as means ± SE (*n* = 20). All parameters were determined at 2 mM ADP. I₅₀ L-alanine was determined at 5 mM PEP. ^aSignificantly different from normoxic control.

of PEPCK. The PEPCK protein occurs in two isozyme forms in vertebrates: a cytosolic form (PEPCK-C) and a form present in the matrix of the mitochondria (PEPCK-M). In the putative signal peptide of the *C. gigas* PEPCK sequence there are three successive (Glu, Asp, Asp) residues, which provide a key element for determining the origin of this sequence. This residue pattern rules out a mitochondrial origin according to Roise and Schatz ('88). Our result confirmed the cytosolic origin of the PEPCK since we detected 93% of the activity in the cytosol in all analyzed tissues. This result contrast with crab muscle whose PEPCK enzyme activity is mainly detected in the mitochondrial fraction (Schein et al., 2004). The cytosolic oyster PEPCK form may be therefore a non-constitutive form as shown in other organisms. Indeed functional differences between PEPCK-C and PEPCK-M exist. Enzyme activity is regulated by nutritional and hormonal stimuli at the transcription level for the PEPCK-C gene. In contrast, the activity of PEPCK-M and the turnover rate of mRNA appear to be constitutive (Weldon et al., '90; Hanson and Reshef, '97; Modaresi et al., '98). In trout, the PEPCK-M expressed at a high level in the liver and is not regulated by dietary carbohydrate (Panserat et al., 2001).

The amino acid sequence of *C. gigas* PK was compared to Human (R/L and M), to invertebrate such as *Drosophila*, *Caenorhabditis* and *Bacillus* PK's. Amino acid sequence alignment revealed that PK is highly conserved from the bacillus to the more highly evolved vertebrate mammalian. The expression of these genes is tissue-specific and under developmental, dietary and hormonal control. In vertebrate tissues, there are four PK isozymes coded by two genes (L and M): R (in red blood cells), L (in liver), M1 (in skeletal muscle) and M2 (in kidney, adipose tissue and lung) (in Munoz and Ponce, 2003) which are characterized by their kinetic properties. The PK isoenzymes are

expressed in a tissue-specific manner reflecting the different metabolic requirements of the tissues (Imamura and Tanaka, '72). L and M2 isoforms are allosterically regulated by fructose 1,6 biphosphate (F1,6BP) (Boles et al., '97). The *C. gigas* PK sequence contained a motif suggesting this type of regulation due to the presence of an Arg-402 residue. Ikeda et al. ('97) converted the M1 isoenzyme of PK rat, a non allosteric isoenzyme, into an allosteric enzyme substituting Ala-398 with Arg. The spatial distribution of PK and PEPCK in *C. gigas* tissues showed that PK and PEPCK mRNA level were more elevated in muscle. This resulted in high enzymatic activities of PK and PEPCK in muscle as previously observed in *C. virginica* (Greenway and Storey, '99). The high level of PK enzymatic activity in the muscle would allow an intense glycolysis to quickly provide ATP for contractile activity. As fuel, glycogen in oyster muscle is low and reaches 5% of the total biochemical content (Berthelin et al., 2000). This low storage capacity is related to a low glycogen synthase expression in muscle compared to gonad and palps (Bacca et al., 2005). As muscle is not a storage tissue for glycogen, it needs to be supplied with glucose at high rate to maintain an aerobic pathway of energy production.

During hypoxia, the oysters present a metabolic depression expressed by a lower IR (45%) and a lower oxygen consumption (82%) than oysters maintained in normoxic conditions. This response is common to hypoxia tolerant organism (Sobral and Widdows, '97; Zhou et al., 2000; Alexander and McMahon, 2004) leading to a reduced energy metabolism and a shift to anaerobic metabolism. If the ecophysiological behavior of oysters was expected, our experiment showed contrasted results at cellular and molecular level. Long-term hypoxia led to changes which affect the enzymes controlling the metabolic pathways. For PEPCK, our results showed in hypoxic muscle a late induction at day 10 of gene expression and enzyme activity followed by an accumulation of succinate. The late induction of PEPCK gene expression and enzyme activity with a succinate accumulation indicated the anaerobic alternate pathway of energy production setting (De Zwaan et al., '83). Greenway and Storey ('99) observed also a 50% increase of PEPCK enzyme activity in mantle of anoxic *C. virginica* only in winter. The anaerobic pathway in facultative anaerobic marine invertebrates is the conversion of PEP to oxaloacetate in the reaction catalyzed by a GTP-dependent

PEPCK. Metal ion availability, nucleotide or PEP levels and also alanine, ITP and H^+ concentration would be effectors to control PEPCK activity (Zammit and Newsholme, '78). But in adductor muscle of *Perumytilus purpuratus*, PEPCK did not appear to be regulated by intracellular modulators (Vial et al., '95). Change in PEPCK gene expression and enzyme activity appeared simultaneous in hypoxic muscle suggesting as Vial et al. ('95) that a regulation of PEPCK of *C. gigas* could occur, as for vertebrates (Pilkis et al., '88) at a level of gene transcription.

Hypoxia also involved the decrease of mRNA relative value of PK. This decrease was late and only observed from day 10. At day 20, the decrease of PK mRNA relative value was 2.5 times lower than at day 0. PK enzyme activity remained weak and stable while in normoxia the PK enzyme activity increased significantly and was 2 times higher at day 10 compared to day 0. These differences between the response of the PK enzyme and the PK mRNA value suggest different levels of regulation. Change in PK enzyme activity in muscle was understandable taking into account the alanine content. Initially at day 0, alanine content in normoxic muscle was high (around $14 \mu M g^{-1} ww^{-1}$). Over the experimental period, alanine in normoxic muscle decreased significantly contributing to release PK activity. In hypoxia, the level of alanine remained high and thus the PK activity in hypoxic muscle remained low. Moreover the kinetic properties of PK are modified by hypoxia showing a low affinity for PEP and a greater sensitivity to alanine. This adaptation provides a method for making stable yet reversible changes to enzyme properties, allowing them a short-term response to oxygen level variations. The molecular basis of PK enzyme activity suppression in response to lack of oxygen are described in many species of marine molluscs (Storey, '93; Greenway and Storey, 2000) consisting in covalent modification via phosphorylation mechanism. The phosphorylation of PK which occurs in hypoxic environment reduces its affinity for PEP, reduces sensitivity to the allosteric activator fructose-1,6-biphosphate (F1,6BP) and greatly increases enzyme inhibition by alanine from anaerobic metabolism (Plaxton and Storey, '84, Storey, '93).

The late decrease of PK mRNA and increased of PEPCK mRNA corresponded to the switch from the aerobic to the anaerobic metabolic pathway. This could be linked to the nutritional status since the oyster reduced their feeding in hypoxia and

hence reduced the glycolytic flux. Our results suggested that the lack of oxygen such as a prolonged hypoxia at $2 mg O_2 l^{-1}$ applied on *C. gigas* oyster would induce a fast. In vertebrate and invertebrate, fasting stimulates the production of alanine (Muller et al., '71; Okama and Abe, '98). This corroborates our results showing a high level of alanine in muscle of hypoxic oyster over the experimentation. In vertebrate, fasting acts also on PK and PEPCK by suppression of PK gene expression in rats (Decaux et al., 1989) and by induction of PEPCK gene expression (Lemaigre and Rousseau, '94). These regulations are linked to glucose that stimulate transcription of the PK-M gene (Yamada and Noguchi, '99), and inhibits PEPCK gene expression but also accelerates the PEPCK mRNA degradation (Meyer et al., '91).

The present study provides evidence about the adaptation mechanisms of *C. gigas* muscle to prolonged hypoxia, using PK and PEPCK as indicators of metabolic pathways. Their cDNA sequences were characterized which allowed their relative mRNA levels to be measured. Regulation level in muscle was determined by comparing relative mRNA level and enzyme activity. It appears that the effects of hypoxia are more complex at the tissue level than at the level of the whole organism. The present work showed in *C. gigas* muscle that the PEP branchpoint lately switched (at day 10) from the aerobic to the anaerobic pathway of energy production. This was shown by the induction of PEPCK enzyme activity leading to the succinate accumulation. The PK enzyme activity was controlled by alanine. Alanine was high at the beginning of the experiment certainly due to a low trophic condition before this experimentation. Then, over the experimentation, while the trophic level was high, the level of alanine decreased in normoxic oyster allowing to "release" PK enzyme from the alanine inhibition. But in hypoxia the level of alanine remained high, contributing to inhibit PK enzyme activity. The high level of alanine would be due to the fasting effect on hypoxic oyster. At molecular level, the decrease of PK mRNA and the increase of PEPCK mRNA in hypoxic muscle confirmed the switch of the PEP metabolic branchpoint that would be an effect of fasting. Lastly, this study suggested that PEPCK enzyme activity was regulated by the level of PEPCK mRNA, while PK enzyme activity was immediately regulated by allosteric effector such as alanine, before to be regulated at the transcriptional level.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Morest national project funded by Ifremer, the Régions of Basse Normandie, Bretagne, Pays de Loire and Poitou-Charentes and the Conseil Général du Calvados. Our thanks to Jean-François Samain of the Morest Project and Michel Mathieu, Director of the UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins. Thanks also to Helen McCombie-Boudry for improving the English in this paper.

LITERATURE CITED

- Alexander JE, McMahon RF. 2004. Respiratory response to temperature and hypoxia in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Comp Biochem Physiol B* 137:425–434.
- Bacca H, Huvet A, Fabioux C, Daniel JY, Delaporte M, Pouvreau S, Van Wormhoudt A. 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comp Biochem Physiol B* 140:635–646.
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. 2000. Storage metabolism in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp Biochem Physiol B* 125:359–369.
- Blain S, Guillou J, Treguer P, Worther P, Delauney L, Follefant E, Gontier O, Hamon M, Leildé B, Masson A, Tartu C, Vuillemin R. 2004. High frequency monitoring of the coastal marine environment using the MAREL buoy. *J Environ Monit* 6:569–575.
- Boles E, Schulte F, Miosga T, Freidel K, Schülter E, Zimmermann FK. 1997. Characterization of a glucose repressed pyruvate kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1,6-biphosphate. *J Bacteriol* 179:2987–2993.
- Bricker SB, Clement CG, Pirhalla DE, Orlando SP, Farrow DRG. 1999. National Estuarine Eutrophication Assessment. Effects of Nutrient Enrichment in the Nation's Estuaries NOAA, National Ocean Service, Special Projects Office and the National Centers for Coastal Ocean Science Silver Spring, MD, p 71.
- Chen YL. 1998. The respiratory physiology and energy metabolism of freshwater mussels and their responses to lack of oxygen. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. PhD dissertation, p 88.
- David E, Tanguy A, Pichavant K, Moraga D. 2005. Response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J* 272:5635–5652.
- Decaux JF, Antoine B, Kahn A. 1989. Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem* 264:11584–11590.
- De Zwaan A, de Bont AMT, Hemelraad J. 1983. The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the anaerobic metabolism of the sea mussel *Mytilus edulis* L. *J Comp Physiol* 153:267–274.
- De Zwaan A, Cortesi P, van den Thillart G, Roos J, Storey KB. 1991. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: a biochemical analysis. *Mar Biol* 111:343–351.
- Fabioux C, Huvet A, Lelong C, Robert R, Pouvreau S, Daniel JY, Minguant C, Le Pennec M. 2004. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem Biophys Res Commun* 320:592–598.
- Greenway SC, Storey KB. 1999. The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *J Exp Mar Biol Ecol* 242:259–272.
- Greenway SC, Storey KB. 2000. Seasonal change and prolonged anoxia affect the kinetic properties of phosphofructokinase and pyruvate kinase in oysters. *J Comp Physiol B* 170:285–293.
- Hanson RW, Reshef L. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Nutr* 66:581.
- Hicks DW, McMahon RF. 2002. Respiratory responses to temperature and hypoxia in the nonindigenous Brown Mussel, *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae), from the Gulf of Mexico. *J Exp Mar Biol Ecol* 277:61–78.
- Huvet A, Herpin A, Dégremont L, Labreuche Y, Samain JF, Cunningham C. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progenies exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343:211–220.
- Ikeda Y, Tanaka T, Noguchi T. 1997. Conversion of non allosteric pyruvate kinase into an allosteric enzyme by a single amino acid substitution. *J Biol Chem* 272:20495–20501.
- Imamura K, Tanaka T. 1972. Multimolecular forms of pyruvate kinase from rat and other mammalian tissues. I. Electrophoretic studies. *J Biochem (Tokyo)* 71:1043.
- Lelong C, Mathieu M, Favrel P. 2000. Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor-beta superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Eur J Biochem* 267:3986–3993.
- Lemaigre FP, Rousseau GG. 1994. Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem J* 303:1–14.
- Matte A, Tari LW, Goldie H, Delbaere LTJ. 1997. Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* 272:8105–8108.
- Meyer S, Höppner W, Seitz HJ. 1991. Transcriptional and post-transcriptional effects of glucose on liver phosphoenolpyruvate-carboxykinase gene expression. *Eur J Biochem* 202:985–991.
- Modarelli S, Brechtel K, Crist B, Jungermann K. 1998. Human mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 gene. Structure, chromosomal localization and tissue-specific expression. *Biochem J* 333:359–366.
- Müller WA, Faloona GR, Unger RH. 1971. The effect of alanine on glucagon secretion. *J Clin Invest* 50:2215–2218.
- Munoz ME, Ponce E. 2003. Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comp Biochem Physiol* 135B:197–218.
- Okama E, Abe H. 1998. Effects of starvation and D- or L-alanine administration on the free D- and L-alanine levels in the muscle and hepatopancreas of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Physiol* 120A:681–686.
- Panserat S, Plagnes-Juan E, Brèque J, Kaushik S. 2001. Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 204:359–365.
- Pilkis SJ, El Magrabi MR, Claus TH. 1988. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Biochem* 57:755–783.

- Plaxton WC, Storey KB. 1984. Purification and properties of aerobic and anoxic forms of pyruvate kinase from red muscle organ of the channeled whelk, *Busycotypus canaliculatum*. *Eur J Biochem* 143:257–265.
- Roise D, Schatz G. 1988. Mitochondrial presequences. *J Biol Chem* 263:4509–4511.
- Schein V, Waché Y, Etges R, Kucarcsky LC, Van Wormhoudt A, Da Silva RSM. 2004. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and glucogenic activity in the crab muscle. *FEBS Lett* 561:202–206.
- Shick JM, Gnaiger E, Widdows J, Bayne BL, de Zwann A. 1986. Activity and metabolism in the mussel *Mytilus edulis* L. during intertidal hypoxia and aerobic recovery. *Physiol Zool* 59:627–642.
- Simpfendorfer RW, Vial MV, Monjalsve A. 1997. The adductor muscle pyruvate kinase from the intertidal bivalve *Mytilus chilensis* (Hupé): evidence of the presence of phosphorylated form of the enzyme during the entire tidal cycle. *J Exp Mar Biol Ecol* 213:169–179.
- Sobral P, Widdows J. 1997. Influence of hypoxia and anoxia on the physiological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Mar Biol* 127:455–461.
- Storey KB. 1993. Molecular mechanism of metabolic arrest in molluscs. In: Hochachka PW, Lutz PL, Sick T, Rosenthal M, van den Thillart G, editors. *Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation*. Boca Raton: CRC Press. p 253–269.
- Tran D, Boudou A, Massabuau JC. 2000. Mechanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can J Zool* 78:2027–2203.
- Vial MV, Oelckers KB, Rojas MC, Simpfendorfer RW. 1995. Purification, partial kinetic characterization and reactive sulfhydryl groups of the phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Perumytilus purpuratus* adductor muscle. *Comp Biochem Physiol* 112B:451–460.
- Weldon SL, Rando A, Matathias AS, Hod Y, Kalonick PA, Savon S, Cook JS, Hanson RW. 1990. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase from the chicken, comparison of the cDNA and protein sequences with the cytosolic isozyme. *J Biol Chem* 265:7308–7317.
- Williamson DH. 1974. Determination with alanine dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 2. Academic Press, New York, 1679–1682.
- Yamada K, Noguchi T. 1999. Review Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J* 337:1–11.
- Zammit VA, Newsholme E. 1978. Properties pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in relation to the direction and regulation of phosphoenolpyruvate metabolism in muscles of the frog and marine invertebrates. *Biochem J* 174:979–987.
- Zhou BS, Wu RSS, Randall DJ, Lam PKS, Ip YK, Chew SF. 2000. Metabolic adjustment in the common carp during prolonged hypoxia. *J Fish Biol* 57:1160–1171.

Résumé :

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les voies de synthèse et de dégradation du glycogène en relation avec la reproduction et les mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas*. Les séquences complètes des ARNm de la Glycogène phosphorylase (*Cg-GPH*) et de la Glycogène synthase (*Cg-GPH*) ont été caractérisées. Les périodes de forte abondance de ces transcrits marquent chacune une phase opposée du cycle énergétique du glycogène (utilisation ou accumulation respectivement). Il n'existe cependant aucune opposition saisonnière des activités enzymatiques correspondantes. Bien que l'apport en algues induise *in vivo* une activation de la synthèse du glycogène, aucun effet fonctionnel du glucose et de l'insuline porcine n'est observé *in vitro* sur les enzymes du métabolisme du glycogène. En contribution au projet national MOREST (Mortalités ESTivales de *C. gigas*), l'étude a été étendue à plusieurs marqueurs du métabolisme des glucides. Des huîtres sélectionnées pour leur Résistance (R) ou leur Sensibilité (S) aux mortalités auraient différentes stratégies énergétiques. L'avantage glycolytique observé pour les huîtres R leur permettrait peut-être de répondre plus favorablement à des stress environnementaux en période estivale.

Abstract :

Glycogen, the main form of glucose reserve in bivalves, is known to play a key energetic role in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) annual reproduction cycle. The aim of this work was to study the pathways of glycogen synthesis and utilization in order to explain the relationships between energy, reproduction and oyster summer mortality events. We first characterized full length mRNA sequences of Glycogen synthase (*Cg-GYS*) and Glycogen phosphorylase (*Cg-GPH*). Biochemical determination of enzymatic activities and adjustment of a RNA absolute quantification method allowed us to study several regulation levels for both markers. Quantities of *Cg-GYS* and *Cg-GPH* mRNAs showed seasonal variations, with opposite maximum periods, corresponding to glycogen accumulation or utilization. However, no difference was detected in the enzymatic activities of Glycogen synthase (GS) and Glycogen phosphorylase (GP), thus suggesting that several levels of regulation may exist in the control of *C. gigas* glycogen metabolism. Moreover, glycogen synthesis was up regulated *in vivo* by increasing algal diet but neither glucose nor porcine insulin had any effect *in vitro* on GS and GP activities. Finally, in contribution to the French project MOREST (*C.gigas* summer mortality), we extended this work by analyzing mRNAs quantities and enzymatic activities of several elements involved in the glucose metabolism. Oysters genetically selected for Resistance (R) or Susceptibility (S) to summer mortality may have different strategies of glucose utilization. The potential energetic advantage of R oyster compared to S oyster is discussed.