



Ifremer

## UNIVERSITE DE CAEN BASSE NORMANDIE

UFR : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée  
ECOLE DOCTORALE NORMANDE CHIMIE-BIOLOGIE

Présentée par

**Gilles LE MOULLAC**

et soutenue le

**15 Mai 2008**

En vue de l'obtention du

### DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE CAEN

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions  
(Arrêté du 07 août 2006)

## Adaptation du métabolisme respiratoire de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

### MEMBRES DU JURY

<b>Monsieur Jean-Charles MASSABUAU</b> , DR2 CNRS, Université Bordeaux 1	Rapporteur
<b>Madame Fuencisla SAN JUAN</b> , Professeur, Université de Vigo, Espagne	Rapporteur
<b>Monsieur Alain VAN WORMHOUDT</b> – DR2 CNRS Station Marine - Concarneau	Examineur
<b>Monsieur Jean François SAMAIN</b> , Docteur d'Etat, IFREMER - Brest	Examineur
<b>Monsieur Pascal FAVREL</b> , Professeur, Université de Caen	Examineur
<b>Monsieur Michel MATHIEU</b> , Professeur, Université de Caen	Directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Michel Mathieu, mon directeur de Thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant de présenter ces travaux dans le cadre d'une thèse d'Université.

Merci aux membres du Jury qui ont accepté d'examiner ce travail : Fuencisla San Juan, Jean Charles Massabuau, Pascal Favrel, Jean François Samain et Alain Van Wormhoudt.

Je remercie particulièrement, Jean François Samain qui m'a accueilli dans ce défi Morest et orienté ce travail. Il m'a permis de travailler grâce aux fonds qu'il a inlassablement récoltés et Alain Van Wormhoudt qui, plus qu'un directeur de recherche, est un ami, exigeant, qui m'a initié à la recherche et que je salue sincèrement..

Je n'oublie pas mes collègues du LPI d'Argenton et de Brest sans qui ce travail n'aurait pu exister. Les expérimentations sur les mollusques n'existent que s'il y a une production d'algues (merci Jean Paul et Isabelle). Qui dit expérimentation dit innovations (merci Pierrick). La station d'Argenton est performante grâce à ces équipements de qualité (bravo René, Christian, Stéphane). J'ai usé sans compter des capacités analytiques du laboratoire de Brest, et je remercie Jeanne, Arnaud, Jean René, Jean Yves et Claudie de leur disponibilité, leur aide et leurs conseils ainsi que Véronique. Je remercie aussi les stagiaires qui ont participé activement à ce travail : Fabienne, Aurélie, Florence, Olivier et Marie. Je n'oublie pas les thésards du laboratoire Benjamin, Rhym, Yannick et Hélène qui est devenue une compatriote en Polynésie.

Je dois à Dominique Buestel et Jean Claude Cochard, du Centre de Tahiti, cette ouverture professionnelle pour intégrer le projet huître perlière. Dans ce sens mon passage à Argenton avec Stéphane Pouvreau et René Robert me permit de découvrir les bases de la recherche sur la physiologie de la reproduction des bivalves.

Mais tout cela n'aurait pu se réaliser sans l'appui inconditionnel de mes proches : ma chère épouse Ah-You, qui avec abnégation me suit depuis longtemps, toujours, et m'a soutenu dans ce parcours exigeant ; nos enfants Paméla, Nelson, Nicolas et Eric qui ont participé à nos périples.

Enfin je pense à mon frère Paul trop tôt disparu et à mes parents qui m'ont transmis leur ténacité.

# Table des Matières

<b>PARTIE 1. INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Présentation de l'espèce.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Systématique.....	8
1.1.2 Anatomie.....	9
1.1.3 Répartition et culture.....	10
1.1.4 Reproduction.....	10
1.1.5 Vie larvaire.....	11
1.1.6 Cycle d'élevage.....	12
<b>1.2 Le métabolisme énergétique.....</b>	<b>12</b>
1.2.1 L'apport trophique.....	12
1.2.2 La respiration cellulaire.....	13
<i>Le bilan biochimique et énergétique.....</i>	<i>14</i>
<i>Le carrefour PEP.....</i>	<i>17</i>
<b>1.3 La respiration, de l'organisme à la cellule.....</b>	<b>18</b>
1.3.1 La respiration de l'huître.....	19
<i>Le système respiratoire.....</i>	<i>19</i>
<i>Les échanges gazeux et le transport d'oxygène.....</i>	<i>20</i>
<i>La consommation d'oxygène.....</i>	<i>21</i>
1.3.2 Ecophysiologie de la respiration.....	21
<i>Les facteurs externes.....</i>	<i>21</i>
<i>La température.....</i>	<i>21</i>
<i>L'environnement trophique.....</i>	<i>23</i>
<i>Les facteurs internes.....</i>	<i>25</i>
<i>La gamétogenèse.....</i>	<i>25</i>
<i>Les génomes.....</i>	<i>27</i>
<b>1.4 Les facteurs d'altération de la respiration.....</b>	<b>28</b>
1.4.1 La dégradation de l'environnement.....	28
1.4.2 L'hypoxie.....	30
1.4.3 Les sulfures.....	35
<b>1.5 Le projet.....</b>	<b>37</b>
<b>PARTIE 2. LE STRESS <i>IN SITU</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Introduction.....</b>	<b>42</b>
<b>2.2 Résultats.....</b>	<b>43</b>
Effect of sediment nearness on the metabolic enzyme activity and energy state of the oyster <i>Crassostrea gigas</i> (article 1).....	43
<b>2.3 Conclusion.....</b>	<b>44</b>
<b>PARTIE 3. L'HYPOXIE.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Introduction.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 Résultats.....</b>	<b>50</b>

3.2.1 Adaptation du comportement valvaire et énergétique de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> soumise à l'hypoxie en relation avec la température.....	50
3.2.2 Metabolic adjustments in the oyster <i>Crassostrea gigas</i> according to oxygen level and temperature (article 2).....	64
3.2.3 Transcriptional regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the adductor muscle of the oyster <i>Crassostrea gigas</i> during prolonged hypoxia (article 3).....	65
<b>3.3 Conclusions .....</b>	<b>66</b>
<b>PARTIE 4. LES SULFURES .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1 Introduction .....</b>	<b>70</b>
<b>4.2 Résultats .....</b>	<b>71</b>
Ecophysiological and metabolic adaptations to sulphide exposure of the oyster <i>Crassostrea gigas</i> . (article 4) .....	71
<b>4. 3 Conclusions .....</b>	<b>72</b>
<b>PARTIE 5. LES SPECIFICITES DES HUITRES R ET S .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1 Introduction .....</b>	<b>74</b>
<b>4.2 Résultats .....</b>	<b>75</b>
4.2.1 La filtration et la consommation d'oxygène en relation avec le niveau trophique.....	75
4.2.2 Les budgets énergétiques.....	76
4.2.3 Les ajustements métaboliques.....	77
4.2.4 Régulations différentielles de la PK et de la PEPCK dans le muscle adducteur.....	78
<b>4.6 Discussion-Conclusion.....</b>	<b>80</b>
<b>PARTIE 6. DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS, PERSPECTIVES....</b>	<b>85</b>
<b>5.1 Conclusion générale .....</b>	<b>86</b>
5.1.1 L'activité valvaire et l'écophysiologie de la respiration.....	86
5.1.2 Le bilan métabolique des stress respiratoires .....	87
5.1.3 Les régulations.....	88
5.1.4 Les modèles physiologiques des R et des S.....	89
<b>5.2 Perspectives .....</b>	<b>89</b>
<b>PARTIE 7. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>92</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>116</b>
Articles dans les revues à comité de lecture .....	117
Contributions Morest .....	117
Communications orales .....	118
Liste des figures .....	119
Liste des tableaux.....	121

---

## **Partie 1. Introduction générale**

---

La culture des bivalves est très ancienne. En Europe, les premières tentatives furent le fait des Romains qui créèrent l'ostréiculture. L'huître *Ostrea edulis*, seule espèce d'huître endémique des côtes françaises fut exploitée durant plusieurs siècles mais la pêche intensive ainsi que des épisodes de mortalités provoquées par l'apparition de parasites dans les gisements en 1920, 1960 et 1970 ont conduit au déclin de l'espèce. Dès 1860 pour faire face à la pénurie d'huîtres plates, des huîtres creuses *Crassostrea angulata* ont été importées dans le bassin d'Arcachon. Cette espèce rustique proliféra le long des côtes françaises où elle devint en ostréiculture l'espèce dominante (Héral, 1989). En 1971, cette espèce fut à son tour décimée par un virus du type Irodovirus provoquant la maladie des branchies (Comps et al, 1976). Dès juillet 1971, du naissain et des adultes de l'huître *Crassostrea gigas* furent importés du Japon et de Colombie Britannique pour soutenir les entreprises ostréicoles et permettre à nouveau le captage des larves. L'expansion de *C. gigas* fut rapide et aujourd'hui cette espèce représente 95% de la production d'huître en France (FAO, 2003). Cette production est basée sur le captage naturel du naissain dans les bassins d'Arcachon et de Marennes-Oléron et les productions de 5 écloséries.

Cependant, dès cette introduction, des mortalités chroniques affectent le naissain et les adultes (Maurer et al, 1986, Cheney et al, 2000). Plusieurs études montrent une grande variabilité des taux de mortalités dans des zones de cultures très proches, les taux variant de quelques % à plus de 60% pour des lots voisins, ainsi qu'une grande variabilité inter-annuelle (Maurer et Comps 1986; Sholz et al. 1973). Si les causes exactes de ce phénomène restent encore inconnues à ce jour, plusieurs facteurs susceptibles d'être impliqués dans ces mortalités ont été incriminés.

Le facteur environnemental le plus largement cité dans la littérature est la température élevée de l'eau, avec des valeurs supérieures à 19°C (Gouletquer et, 1998; Cheney et al, 2000).

L'état physiologique des huîtres en période estivale a permis d'avancer l'hypothèse d'un déséquilibre métabolique entraînant un déficit énergétique en relation avec les facteurs

environnementaux. Il s'agit d'un phénomène complexe dans lequel intervient le processus de reproduction de l'huître *C. gigas* chez les juvéniles lors de leur première maturation et chez les adultes (Perdue et al, 1981; Soletchnik et al, 1996; Berthelin et al, 2000).

Au plan génétique, il existe un paramètre génétique lié à ces mortalités et il a été montré que ce caractère est utilisable pour sélectionner les huîtres les plus résistantes (Beattie et al, 1980; Pajot et al, 1998; Boudry et al, 2002; Dégremont, 2003).

La présence d'un agent pathogène ne semble pas être systématiquement associée au phénomène des mortalités. Seuls certains épisodes de mortalités en France, ont pu être associés à la présence de souches bactériennes pathogènes du genre *Vibrio* (Lacoste et al, 2001; Le Roux et al, 2002; Waechter et al, 2002). La présence d'une infection bactérienne dans les huîtres moribondes n'indique pas si cette présence résulte de l'affaiblissement des huîtres ou est la cause des mortalités.

Les pratiques culturales représentent aussi une cause potentielle à l'origine des mortalités estivales. Confirmant les observations de Lodato (1997), Soletchnik et al (1999) ont ainsi montré que les taux de mortalité en 7 mois de culture pour les élevages à plat atteignaient 23% à 33% contre 8% à 19% pour les élevages sur tables dans le bassin de Marennes-Oléron. En complément à ce point, la manipulation des huîtres en période estivale pourrait les fragiliser et les rendre plus sensibles aux mortalités.

De nombreux paramètres semblent donc impliqués dans les mortalités estivales, et plusieurs facteurs peuvent être concomitants à l'apparition de ces mortalités. Il semble donc important de tenir compte à la fois du patrimoine génétique, des conditions environnementales (température, nourriture, salinité, oxygène...) qui agissent sur l'état physiologique des animaux (reproduction, résistance, état nutritionnel), en modulant la réponse de l'hôte face aux pathogènes. Afin de comprendre l'implication de chacun des paramètres et leurs interactions, l'IFREMER a initié un programme pluridisciplinaire (« MOREST » pour MORTalités ESTivales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*). En effet, à ce jour, il n'a pas été possible d'expliquer les mortalités par un seul facteur. Les mortalités semblent être la

conséquence des interactions entre trois composantes : l'hôte, le pathogène et l'environnement.

## 1.1 Présentation de l'espèce

### 1.1.1 Systématique

Selon Grassé (1960), la classification complète à laquelle appartient l'huître creuse est la suivante :

Embranchement :	<i>Mollusques</i>
Classe :	<i>Bivalves – Lamellibranches</i>
Ordre :	<i>Filibranchia</i>
Sous-Ordre :	<i>Anisomyaria</i>
Super-Famille :	<i>Ostreoidea</i>
Famille :	<i>Ostreidae</i>
Genre :	<i>Crassostrea</i>
Espèce :	<i>gigas</i>

Un *mollusque* est un animal à corps mou avec ou sans coquille. Un *bivalve* est un mollusque aquatique à symétrie bilatérale protégé par deux valves externes. La fermeture des valves est assurée par le muscle adducteur qui les relie l'une à l'autre. Un *filibranche* possède des branchies formées chacune de deux lames comportant des filaments réfléchis à jonctions ciliaires, conjonctives ou parfois vasculaires. Le manteau est soit ouvert, soit possédant une suture palléale. Le sous-ordre des *Anisomyaria* présente comme particularité un muscle adducteur antérieur absent ou plus petit que le postérieur. La prodissoconque possède une charnière crénelée et le manteau est ouvert. Les feuillets branchiaux sont lisses à filaments uniformes ou plissés à filaments non uniformes. Les *Ostreoidea* sont caractérisés par une coquille inéquivalve irrégulière, à valve gauche fixée. Le cartilage ligamentaire est logé dans une fossette triangulaire, et la charnière est édentulée. Les lobes palléaux sont libres, le pied et le byssus sont atrophiés. Les *Ostreidae* ont une valve gauche en général plus profonde que la droite avec des formes et des sculptures très variables, et les bords des valves sont assez



plissés. Le genre *Crassostrea* indique que la larve a une prodissoconque inéquivalve à charnière munie de deux crénelures à chacune de ses extrémités et le ligament est interne. Pour l'adulte, la coquille dissoconque est allongée et les dépôts crayeux sont feuilletés. La valve inférieure est subplissée ou plissée ce qui correspond à la valve creuse (équivalent à la valve gauche ou inférieure), alors que la valve supérieure est très rarement plissée.

### 1.1.2 Anatomie

#### *Coquille*

Elle est formée de trois parties distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur. Le périostracum : membrane organique très mince et colorée. Les couches prismatiques : prismes verticaux de carbonate de calcium (calcite) enrobés par une matrice protéique de conchyoline. La nacre : structure feuilletée constituée de cristaux d'aragonite.

#### *Manteau et cavité palléale*

Le manteau assure la formation de la coquille. Il s'agit d'une formation tégumentaire qui adhère étroitement au corps dans les régions dorsales et latéro-dorsales, puis se dilate au niveau de la base des branchies en deux lobes minces très élargis qui délimitent la cavité palléale. Cette cavité contient l'anus, les orifices rénaux et génitaux et les branchies (ou cténidies). Les branchies sont constituées de deux paires de rangées longitudinales de filaments, et elles sont soudées au manteau à leur base. Elles constituent le principal organe de la respiration et servent également à la filtration et à la rétention des particules en suspension.

#### *Masse viscérale*

La masse viscérale renferme les organes de la digestion, de l'excrétion et de la reproduction. Dans la partie antérieure des branchies, deux paires de palpes labiaux permettent le tri et l'orientation des nutriments vers la bouche. Un oesophage cilié très court donne sur un estomac contenant un stylet cristallin et dans lequel s'ouvre des conduits provenant de la glande digestive. L'intestin fait suite à l'estomac, et forme une large boucle pour se terminer par le rectum situé derrière le muscle adducteur. A proximité de ce muscle se trouve le coeur

qui est situé dans une cavité péricardique. Il est formé de deux oreillettes et d'un ventricule, qui par des artères et des artérioles distribuent le sang aux différentes parties du corps. L'appareil circulatoire est dit de type lacunaire car le sang n'est plus canalisé à proximité des organes, et il circule dans des espaces libres dans le tissu conjonctif. Le système nerveux est formé de plusieurs paires de ganglions nerveux (cérébroïdes pédieux et viscéraux). En période de reproduction, la gonade se développe pour envelopper à maturité l'appareil digestif.

### 1.1.3 Répartition et culture

Originnaire d'Asie, l'huître creuse *Crassostrea gigas* (connue aussi sous les noms d'huître du Pacifique ou d'huître japonaise) a été introduite en France à partir de 1966. De nos jours, *C. gigas* est présente dans 27 pays à travers le monde, et elle représente le mollusque le plus cultivé avec une production mondiale supérieure à 4,1 millions de tonnes en 2001. La Chine constitue le premier producteur mondial avec près de 3,5 millions de tonnes, suivi du Japon avec 231 000 tonnes, de la Corée avec 174 000 tonnes. Les 126 000 tonnes en 2001 de la France ont été produites sur l'ensemble du littoral. Cette activité exploite une superficie de 14 180 hectares du littoral français et concerne 3329 entreprises.

### 1.1.4 Reproduction

L'huître creuse est une espèce ovipare à hermaphrodisme successif protandrique (Buroker, 1983). Les sexes sont donc séparés même si quelques hermaphrodites peuvent être observés, et une sexualité alternative entraîne un changement de sexe dont le déterminisme n'est pas connu, changement qui a lieu en période hivernale (Quayle, 1969). Pendant l'hiver, le volume et l'activité de la gonade sont très réduits, et la gamétogenèse (mitoses goniales, prévitellogénèse) se déroule à un rythme très lent. Les cellules germinales se développent de façon active à la fin de l'hiver et la gamétogenèse s'accélère au printemps pour arriver à la maturité sexuelle en juillet (Lubet, 1991). D'un point de vue biochimique, ce cycle se caractérise par une phase de stockage en glycogène, qui sera métabolisé en lipides

(vitellogénèse) dans le mois qui précède la ponte (Gabbott, 1975; Deslous-Paoli, 1980; Maurer et Borel 1986). A maturité, le poids des gamètes atteint 7% du poids sec de chair pour des huîtres âgées d'un an, puis cette valeur augmente pour atteindre 60% puis 80% du poids sec à 2 ans et 3 ans respectivement (Deslous-Paoli et Héral, 1988). La fécondité chez *C. gigas* est donc dépendante de l'âge des animaux mais aussi des paramètres environnementaux trophiques et thermiques (Gouilletquer, 1995). Pour les femelles adultes, le nombre d'ovocytes peut atteindre 100 millions d'oeufs (Quayle, 1969). La maturité est suivie de l'expulsion des gamètes, qui peut être partielle ou totale, et la fécondation est externe.

En France, la ponte a lieu en période estivale avec une ponte principale dans le bassin de Marennes-Oléron, alors que dans le bassin d'Arcachon, plusieurs évènements de ponte sont possibles pendant l'été (His et Robert, 1985; Héral et Deslous-Paoli, 1991). Dans des régions ostréicoles où la température de l'eau est plus froide, Bretagne ou Normandie, l'émission des gamètes n'est que partielle ou absente, et de nombreux produits génitaux sont observés après la période estivale dans la gonade. Les gamètes sont alors résorbés en automne par cytolysse (atrésie) et phagocytose (Lubet, 1991).

### 1.1.5 Vie larvaire

Le développement embryonnaire précoce, de la fécondation au stade 4 cellules, est très bien connu chez l'huître creuse (Gérard et al, 1995). Les divisions cellulaires sont rapides et aboutissent à la formation d'un embryon de type morula, puis trochophore pour obtenir 24 heures après la fécondation une larve véligère en forme de D dont la taille est alors de 70 µm. A ce stade, la larve possède une coquille (Prodissochonche) et un velum, organe de nutrition et de locomotion. La forme des larves évolue parallèlement à leur croissance avec l'apparition d'une extension en forme de crochet qui correspond à l'umbo. Quelques jours avant la fin de la vie larvaire, l'organe sensoriel principal apparaît sous forme d'un point noir donnant à ce stade le nom de larve oeuillée. Lorsque la larve atteint une taille comprise entre 300 et 380 µm, un pied se développe d'où le nom de larve pédivéligère pour ce stade. Cet organe indique la

fin de la phase pélagique et il permet la recherche d'un substrat propice pour la fixation de la larve. La métamorphose s'achève par la disparition du pied et du velum et donne place à une huître appelée naissain. Au final, la phase larvaire dure de 15 à 28 jours pour des températures comprises entre 20 et 26°C (Héral et Deslous-Paoli, 1991).

### 1.1.6 Cycle d'élevage

Dans le milieu naturel, le littoral charentais et le bassin d'Arcachon permettent un recrutement annuel régulier sur lequel 70 % de la production française est basée (Gouilletquer et Héral, 1991). Pendant la période de reproduction, les professionnels disposent sur les parcs ostréicoles des collecteurs afin de procéder au captage des larves. Six à 18 mois après la fixation, les naissains sont « détroqués » puis mis en poche ostréicole pour être placés sur estran sur des tables en surélevé. La seconde source d'obtention du naissain provient des écloséries privées qui fournissent aux professionnels du naissain individualisé et calibré. D'autres pratiques culturelles consistent à semer les huîtres à plat ou à les disposer en eaux profondes. Concernant la culture en surélevé, le travail consiste à retourner les poches sur les tables pour empêcher la prolifération des algues, de changer la maille des poches jusqu'à ce que les huîtres aient atteint la taille commerciale.

## 1.2 Le métabolisme énergétique

### 1.2.1 L'apport trophique

L'alimentation des mollusques bivalves doit fournir l'ensemble des éléments nutritifs (glucides, lipides, protéines, vitamines, minéraux) nécessaires aux fonctions vitales et au développement. Ces éléments dépendent de la disponibilité en phytoplancton dans le milieu sous l'influence des conditions environnementales du milieu. Le milieu est filtré par le système ciliaire des branchies et les particules retenues sont acheminées vers la bouche en même temps pour y être ingérées, digérées puis assimilées au sein de l'organisme. Les

nutriments assimilés sont disponibles sous forme d'énergie et de matière organique et seront utilisés aux diverses fonctions de l'organisme (biodéposition, excrétion, respiration, croissance, reproduction, défenses immunitaires). L'alimentation influence considérablement l'effort de reproduction de l'huître (Chavez-Villalba *et al.* 2001 ; Enriquez-Diaz, 2004).

La nourriture doit permettre aux huîtres d'assurer leur reproduction qui est un processus nécessitant beaucoup d'énergie pour le développement de la gonade et qui peut représenter jusqu'à 55% du poids sec de l'animal (Perdue, 1983). Pendant la période de gamétogenèse active, les réserves en glycogène constituées au préalable chutent de façon drastique pour être au plus bas au moment de la ponte (Gabbott, 1975 ; Deslous-Paoli et Héral, 1988 ; Berthelin *et al.* 2000). Ces réserves représentent un support énergétique majeur de la gamétogenèse. Cependant, l'apport de la nourriture est prédominant. Enriquez-Diaz (2004) a montré que plus les huîtres ont de nourriture à leur disposition, plus elles investissent de l'énergie dans la reproduction en développant leur gonade. Le coût énergétique élevé de la reproduction influence considérablement la quantité d'énergie restante pour la croissance somatique. Ceci se traduit par un bilan énergétique pour la croissance souvent négatif à cette période. Puis, après l'émission des gamètes, la restructuration du tissu gonadique s'accompagne d'une nouvelle période de mise en réserve et un retour à un bilan énergétique positif.

### 1.2.2 La respiration cellulaire

Pour remplir les fonctions de croissance et de reproduction, les organismes vivants ont besoin d'énergie. Cette énergie est fournie aux cellules pour assurer les fonctions de synthèse et transport de molécules, de contraction, de mouvement,... la cellule a besoin d'énergie qu'elle puise dans son environnement immédiat (Figure 1).

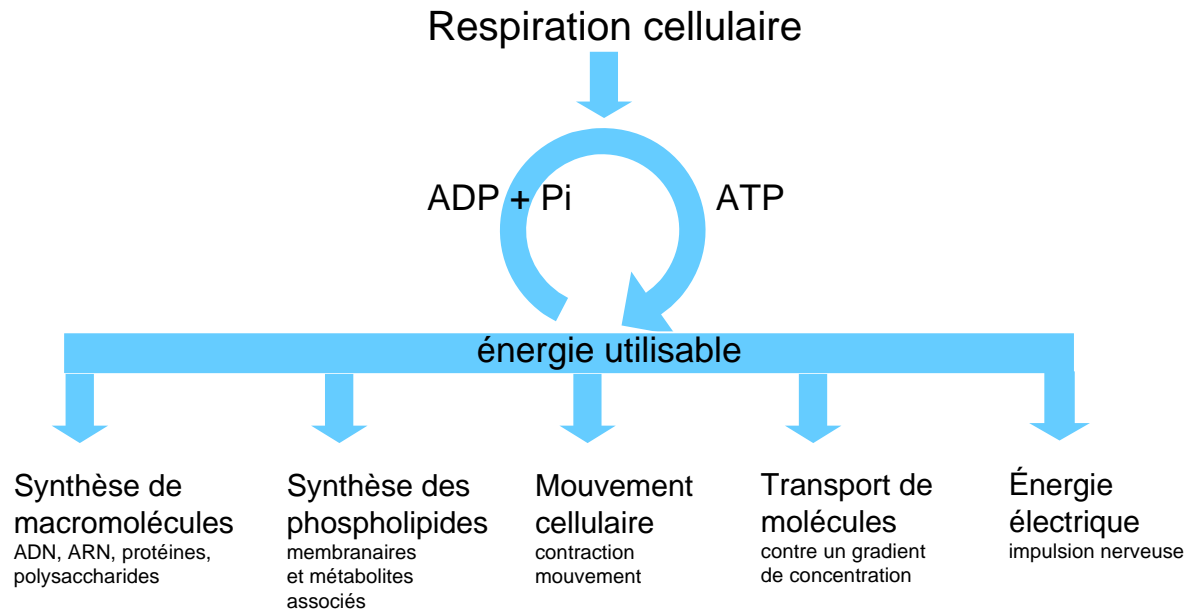


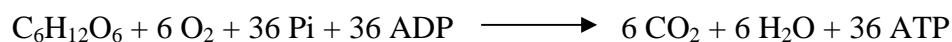
Figure 1: Diagramme des principales fonctions cellulaires

La cellule va utiliser des molécules organiques issues de la digestion. L'énergie qui est entreposée dans les molécules organiques doit être extraite afin que la cellule puisse s'en servir. Grâce à ses enzymes, les molécules complexes contenant beaucoup d'énergie potentielle sont dégradées en produits plus simples contenant moins d'énergie. L'énergie tirée de cette dégradation est alors utilisée. La respiration cellulaire aérobie est la voie catabolique la plus efficace pour la cellule. Elle requiert de l'oxygène, des molécules organiques et une chaîne de transport d'électrons. La respiration cellulaire anaérobie est moins efficace, elle se fait en absence d'oxygène et ne requiert pas de chaîne de transport d'électrons. C'est dans la mitochondrie que se font la plupart des réactions chimiques impliquées dans la respiration cellulaire.

#### *Le bilan biochimique et énergétique*

Toutes les macromolécules (protéines, lipides, glucides) peuvent être utilisées comme sources d'énergie, mais la principale source d'énergie reste le glucose qui provient du glycogène. Le but de la respiration cellulaire est donc d'extraire l'énergie des molécules complexes comme le glucose, et la convertir en ATP (Figure 2). L'ATP est l'intermédiaire énergétique de la cellule. Dans une cellule normoxique, l'utilisation métabolique d'une molécule de glucose est couplée à la synthèse de 36 molécules d'ATP à partir de 36 d'ADP

grâce à une série complexe de réactions enzymatiques dont le bilan équationnel est le suivant :



La respiration cellulaire qui comprend une série de réactions complexes est réalisée en 3 étapes : la glycolyse, le cycle de Krebs, et la chaîne de transport d'électrons. La glycolyse et le cycle de Krebs sont des étapes cataboliques où le glucose est dégradé. Le siège de la glycolyse est le cytoplasme, alors que le cycle de Krebs fonctionne dans la matrice de la mitochondrie. L'énergie relâchée à chaque étape de la chaîne est utilisée pour la synthèse de l'ATP. Les molécules d'ATP produites via la chaîne de transport d'électrons sont synthétisées par le processus de phosphorylation oxydative.

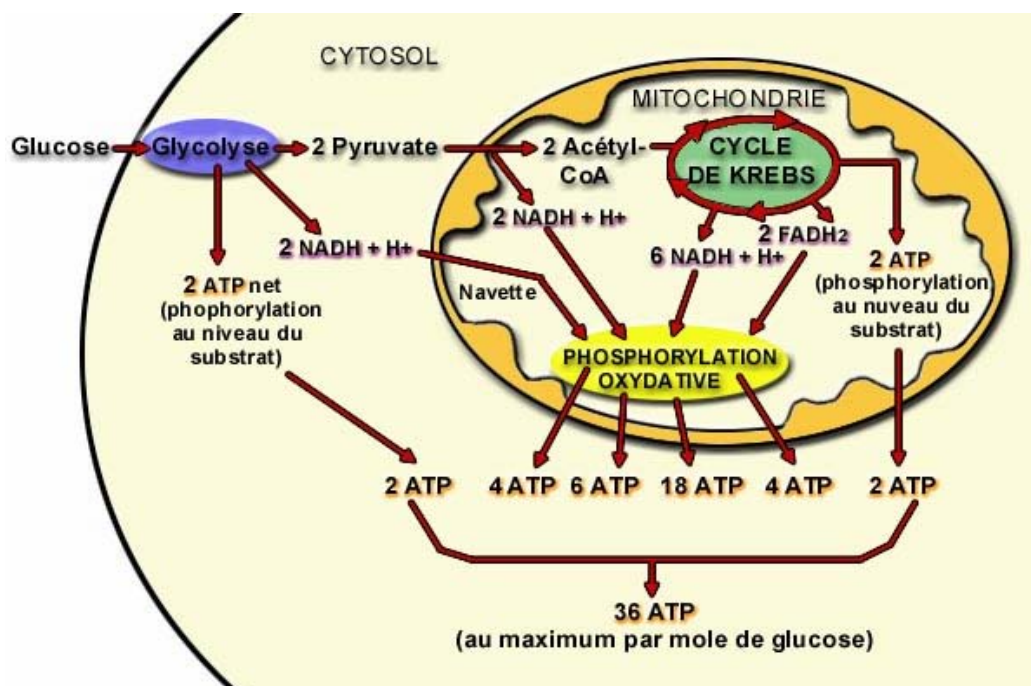


Figure 2: Représentation schématique du bilan énergétique cellulaire (<http://www.ustboniface.mb.ca/cusb/abernier/biologie/metabolisme/>)

La glycolyse est une succession de 10 étapes catalysées par des enzymes qui contrôlent la dégradation et la phosphorylation des intermédiaires et ne nécessite pas d'oxygène. Chez les eucaryotes, cette transformation a lieu dans le cytosol de la cellule. Il y a 3 étapes importantes dans la glycolyse. Ce sont les réactions catalysées par des enzymes à régulation allostérique : l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase. La modulation de l'activité de ces

enzymes est un moyen de contrôler le flux global de la glycolyse. Les molécules de glucose (6 carbones) sont transformées en molécules d'acide pyruvique (3 carbones), avec production d'énergie (sous forme de molécules d'ATP, adénosine triphosphate). Le bilan énergétique de la glycolyse est positif car il produit deux molécules d'ATP pour une molécule de glucose dégradée en deux molécules d'acide pyruvique ainsi que 2 NADH. Tous les intermédiaires métaboliques entre le glucide initial et le pyruvate final sont des composés phosphorylés.

*Le cycle de Krebs* se déroule dans les mitochondries. Les molécules de pyruvate produites par la glycolyse contiennent encore beaucoup d'énergie qui doit être extraite. Si l'oxygène est présent, le pyruvate est transporté dans la mitochondrie pour être oxydé et relâcher l'énergie. Cette énergie sera extraite en 8 étapes pour produire des intermédiaires énergétiques, chacune est catalysée par une enzyme spécifique dans la matrice mitochondriale. Le bilan énergétique est le suivant pour une molécule de pyruvate : 3 molécules de  $\text{NAD}^+$  sont réduites en NADH +  $\text{H}^+$  et une molécule de FAD est réduite en  $\text{FADH}_2$ ; 1 molécule d'ATP est produite par la phosphorylation au niveau du substrat.

*La chaîne de transport d'électrons*: La chaîne respiratoire est composée de cinq complexes multi-enzymatiques qui fonctionnent comme transporteurs d'électrons: le complexe I (NADH-CoQ réductase), le complexe II (succinate-CoQ réductase), le complexe III (ubiquinone-cytochrome c réductase) et le complexe IV (cytochrome c oxydase). Enfin, le complexe V, ou ATPase, assure la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique dans la matrice mitochondriale.

*La synthèse d'ATP* : Le fonctionnement de la chaîne respiratoire permet la création d'un gradient de pH entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire des mitochondries. L'ATP synthétase est chargée de réguler les flux d'ions de part et d'autre de la membrane et effectue la synthèse de l'ATP. En fonctionnement normal, elle expulse deux ions  $\text{H}^+$  pour chaque molécule d'ATP hydrolysée. Toutefois, le gradient électrochimique des ions  $\text{H}^+$  est tel que la pompe fonctionne à l'envers : l'entrée de deux ions  $\text{H}^+$  assure la synthèse d'une molécule d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique.



### *Le carrefour PEP*

Le phosphoénolpyruvate (PEP) est un composé important de la biochimie cellulaire. Cette molécule à trois atomes de carbones est un intermédiaire de la glycolyse et de la néoglucogenèse. Le PEP possède une liaison énoI-phosphate riche en énergie, c'est donc un composé à haut potentiel énergétique. Au sein de la glycolyse, le PEP est formé par l'action de l'énoIase. La conversion du PEP en pyruvate par la PK produit une molécule d'ATP, par transfert du radical phosphoryle à une molécule d'ADP. Au sein de la néoglucogenèse, le PEP est formé par la décarboxylation de l'oxaloacétate et l'hydrolyse d'une molécule de guanosine triphosphate (GTP).

La pyruvate kinase (PK) est l'enzyme terminale de la glycolyse et un régulateur clé de cette fonction et constitue une étape irréversible de la glycolyse. Son substrat est le PEP. L'enzyme catalyse le transfert direct du radical phosphoryl et de l'énergie, sur l'ADP. La PK est inhibée par une phosphorylation en présence d'AMP cyclique. La déphosphorylation favorise la fourniture d'énergie au détriment de la néoglucogenèse. L'activité de la PK est régulée par le PEP et le fructose 1,6-bisphosphate, un intermédiaire de la glycolyse. Le citrate et l'ATP provoquent des inhibitions allostériques. L'insuline active la PK pendant la phase d'alimentation par déphosphorylation de l'enzyme. Pendant le jeûne, le glucagon inactive la PK par une réaction de phosphorylation, alors que la néoglucogenèse se produit, de sorte que les deux processus ne sont pas simultanés. L'alanine, est aussi un inhibiteur de la PK phosphorylée. Chez les vertébrés, il y a 4 isozymes de la PK: R (red blood cells), L (liver), M1 (skeletal muscle) et M2 (reins, les tissus adipeux et les poumons) (dans Munoz et Ponce, 2003) qui ont des caractéristiques cinétiques propres. Les isoenzymes de la PK sont exprimés de manière tissu spécifique reflétant les différents besoins métaboliques des tissus (Imamura et Tanaka, 1972). Les isoformes L and M2 sont allostériquement régulés par le fructose 1,6 bisphosphate (F1,6BP) (Boles et al., 1997).

La phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) est une enzyme de la gluconéogenèse qui catalyse la formation du PEP à partir de l'oxaloacétate. C'est une étape de contrôle de la

néoglucogenèse, le processus par lequel les cellules synthétisent le glucose à partir des précurseurs métaboliques. Chez les vertébrés, deux isozymes de la PEPCK sont distingués et localisés respectivement dans les mitochondries (PEPCK-M) et dans le cytosole (PEPCK-C). Chez le crabe *C. granulata*, seule une PEPCK d'origine mitochondriale, a été mise en évidence pour la première fois au niveau enzymatique et de la synthèse d'ARN (Schein et al, 2004). L'origine cellulaire (cytosole vs mitochondrie) de la PEPCK permet de révéler des différences fonctionnelles entre la PEPCK-C et la PEPCK-M. En effet, l'activité de la PEPCK-M et la vitesse de renouvellement des ARNm apparaissent constitutif (Weldon et al, 1990, Hanson et Reshef, 1997, Modaressi et al, 1998).

L'importance de la température sur le fonctionnement des enzymes PK et PEPCK chez les invertébrés a été montrée (Wieser et Wright, 1979, Michaelidis et Storey, 1990, Sokolova et Pörtner, 2001). Les ajustements saisonniers se produisent au niveau des gènes (Bacca et al. 2005) et/ou par des changements du type des isoformes présentes. Les 2 isoenzymes de la PK du manteau et du muscle adducteur de l'huître *C. gigas* ont des propriétés cinétiques différentes (Mustafa et Hochachka, 1971). Chez les vertébrés, le jeûne provoque la baisse de l'expression des gènes codant pour la PK chez le rat (Decaux et al, 1989) et l'induction de l'expression du gène codant pour la PEPCK (Lemaigre et Rousseau, 1994). Ces régulations sont liées au glucose qui stimule la transcription de la PK-M (Yamada et Noguchi, 1999) et inhibe l'expression du gène codant pour la PEPCK mais accélère aussi la dégradation des ARNm de la PEPCK (Meyer et al, 1991).

### **1.3 La respiration, de l'organisme à la cellule**

La compréhension des phénomènes d'adaptation aux perturbations du milieu passe par l'étude des mécanismes physiologiques permettant le succès écologique des animaux face à des contraintes. La nature entropique du milieu affecte les fonctions physiologiques des huîtres. Les huîtres comme organismes intertidaux sont soumises naturellement à des situations extrêmes, elles sont donc confrontées à des situations respiratoires bien marquées.

L'anoxie qui conduit à l'arrêt du métabolisme aérobie est la conséquence attendue de l'exondation pendant la marée basse. Dès la remontée de la marée, l'animal se retrouve immergé et peut à nouveau filtrer pour se nourrir et respirer jusqu'à la prochaine marée basse. Mais c'est probablement pendant les périodes d'immersion que les huîtres subissent le stress respiratoire le plus intense sous l'effet de la dégradation du milieu. Au printemps, les huîtres qui ont une forte demande énergétique à cause de leur statut reproductif, en consacrent beaucoup afin de compenser les effets d'un milieu dégradé sur le métabolisme respiratoire. Cette dégradation est caractérisée par des eutrophisations, des pollutions chimiques ou organiques. L'état sanitaire du milieu génère aussi des infections microbiennes. Ces facteurs diminuent la capacité d'adaptation des huîtres à des milieux appauvris.

L'oxygène est l'élément clé des processus métaboliques. Les organismes marins vivent souvent dans des milieux où la teneur en oxygène est plus faible que la saturation. Ces organismes adoptent des comportements et/ou développent des mécanismes physiologiques qui leur permettent de s'adapter à de faibles teneurs en oxygène. L'hypoxie marine commence à 2.8 mg O<sub>2</sub>/mL selon Diaz et Rosenberg (1995). La teneur en oxygène s'exprime sous de multiples formes : retenons qu'à la salinité de 20‰, à 25°C et à la pression atmosphérique, 2.8 mg O<sub>2</sub>/mL = 23.9 Torr, 3.18 kPa soit 18% de la saturation de l'eau de mer. En milieu marin peu profond ou estuarien, l'écart des valeurs de concentration d'oxygène comprises entre la saturation et 2.8 mg/mL ne situe pas les organismes en zone hypoxique. Cependant afin de maintenir le niveau d'oxygénation de leur sang ils doivent augmenter l'effort de ventilation afin de compenser cette baisse de l'oxygène ambiant.

### 1.3.1 La respiration de l'huître

#### *Le système respiratoire*

La respiration des mollusques bivalves est associée à un courant d'eau en direction des branchies. Cette circulation d'eau appelée ventilation est assurée par des mouvements réguliers qui créent le courant d'eau, passant par les branchies. L'organisation anatomique des

branchies extrêmement plissée, permet d'obtenir une surface d'échange considérable dans un volume relativement peu important. La ventilation des branchies, c'est-à-dire les mouvements d'eau à leur niveau, est assurée par différents systèmes. Les mécanismes impliqués sont nombreux : contraction du manteau et donc de la cavité palléale où sont logées les branchies, cils vibratiles. Chez de nombreuses espèces, le mouvement d'eau au niveau des branchies s'effectue à l'inverse du mouvement du sang. Le système à contre-courant permet d'obtenir une meilleure extraction de l'oxygène. Il permet en effet le maintien d'un gradient à haute  $PO_2$  sanguine. Le système circulatoire se présente sous forme de lacune ou de canaux à l'intérieur de l'organisme. Le transport de l'oxygène vers les cellules est assuré par le mouvement du liquide lymphatique assuré par le battement cardiaque.

#### *Les échanges gazeux et le transport d'oxygène*

Le sang est le milieu de transport de l' $O_2$  et du  $CO_2$  mais il n'existe pas de mécanisme de transport actif de l' $O_2$  et du  $CO_2$ . Les échanges se font toujours par diffusion. Dans les systèmes branchiaux, la diffusion des gaz dissous s'effectue entre le sang et le milieu extérieur d'une part et entre le sang et les cellules d'autre part. Chez les huîtres, la diffusion de l' $O_2$  dissout entre l'hémolymphe et le milieu extérieur a lieu au niveau du système branchial. Le  $CO_2$  issu du métabolisme cellulaire diffuse la lymphe puis dans le milieu extérieur sous forme de  $HCO_3^-$ .

Chez la plupart des organismes, l'oxygène est fixé sur des molécules servant de transporteur. Si les pigments respiratoires des vertébrés et de certains invertébrés comme les arthropodes et les polychaètes sont connus, il n'en va pas de même chez les bivalves. Aucune molécule transporteuse d'oxygène n'a encore été formellement identifiée, cependant chez la moule verte *Perna canaliculus* une protéine de l'hémolymphe appelée pernin récemment caractérisée pourrait jouer ce rôle (Scotti et al, 2001). Ces auteurs ont identifié une molécule similaire chez l'huître *C. gigas* appelée cavortine (n° GenBank AAP1258). En l'absence d'informations formelles sur un éventuel transporteur d'oxygène dans le sang des bivalves, la

charge en oxygène du sang est la pression partielle ( $PO_2$ ) qui dépend de la concentration de l'oxygène dissout.

#### *La consommation d'oxygène*

La consommation d'oxygène chez les mollusques bivalves est régulée par de nombreux facteurs. La consommation d'oxygène est principalement associée à l'alimentation. De nombreux autres facteurs déterminent le besoin en oxygène dont la température, la salinité, le rythme tidal et des facteurs endogènes parmi lesquels la croissance, le statut reproductif, l'état immunitaire (McMahon, 1988, Burnett, 1997).

### 1.3.2 Ecophysiologie de la respiration

#### *Les facteurs externes*

##### *La température*

Le métabolisme général d'un organisme peut être évalué par la mesure de sa consommation en oxygène. Chez les ectothermes, ce métabolisme est soumis à la température. Cette relation bien connue se traduit par l'augmentation de la consommation d'oxygène sous l'effet de l'élévation de la température. Cette relation établie chez de nombreux mollusques bivalves marins est vérifiée chez *C. gigas* (Bougrier et al., 1995). Dans le milieu naturel, la respiration est modulée par le facteur saisonnier qui intègre le cycle annuel de la température en milieu tempéré et les variations de la richesse trophique du milieu (Sukhotin, 1992; Huang et Newell, 2002). En hiver, lorsque la température est basse, la consommation d'oxygène des mollusques bivalves est aussi la plus faible et inversement c'est en été que la consommation d'oxygène est la plus élevée (Huang et Newell, 2002). Des approches expérimentales ont permis de confirmer chez de nombreux bivalves que la consommation d'oxygène augmente simultanément avec la température (Aldridge et al, 1995, Marsden et Weatherhead, 1998, Haure et al, 1998, Hicks et McMahon, 2002) en respectant une progression allométrique (Bougrier et al, 1995). Ces observations concordent aussi chez les modèles tropicaux tels que l'huître perlière *Pinctada mazatlanica* (Saucedo et al, 2004). Il faut préciser toutefois que la

relation entre la consommation d'oxygène et la température est valable dans une gamme de température correspondant aux limites thermiques propres à chaque espèce.

D'une manière générale, la consommation d'oxygène augmente sous l'effet de la température (Figure 3). La relation température consommation d'oxygène est homogène quelque soit l'espèce lorsque les précautions expérimentales d'adaptation à la température de 1 à 3 semaines sont prises. La consommation d'oxygène est aussi dépendante de l'état nutritionnel. Les organismes nourris comme *C. gigas* (Bougrier et al, 1995), *O. edulis* (Haure et al, 1998), *P. perna* (Hicks et McMahon, 2002) et *P. mazatlanica* (Saucedo et al, 2004) consomment plus d'oxygène que les organismes à jeun comme *C. virginica* (Dame, 1972, Shumway et Koehn, 1982), *M. edulis* (Widdows, 1978) (Figure 3).

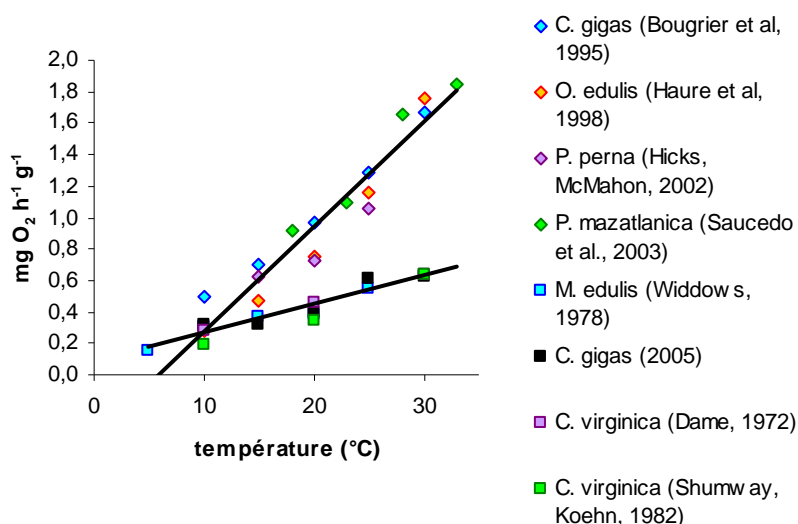


Figure 3: Effet de la température sur le métabolisme respiratoire chez des mollusques bivalves marins (méthodes standardisées). La relation à jeun concerne *C. gigas* (2005), *C. virginica* (Dame, 1972, Shumway and Koehn, 1982).

Les besoins en oxygène des organismes fouisseurs comme *M. lateralis* (Shumway, 1983) *Ruditape philipinarum* et *R. decussatus* (Bodoy et al, 1986) *D. polymorpha* (Aldridge et al, 1995) sont très élevés (Figure 4). Pour ces bivalves, les conditions expérimentales n'étaient pas standardisées. Ces mesures de respiration ont été faites pour la plupart hors d'un habitat reconstitué traduisant peut être un stress se traduisant par une surconsommation d'oxygène.

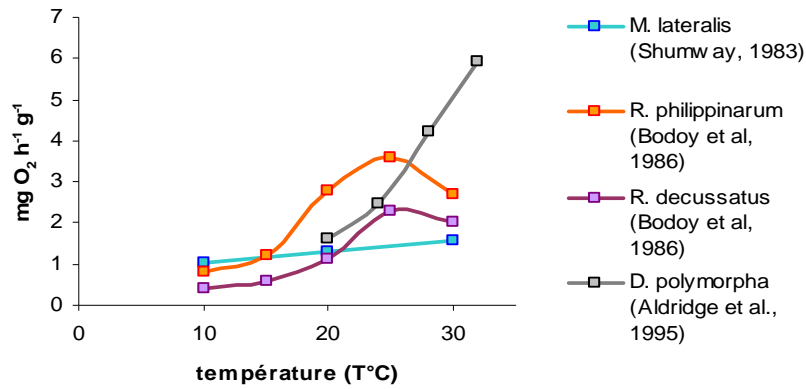


Figure 4: relations entre la température et la consommation d'oxygène chez des bivalves marins et d'eau douce (méthodes non standardisées)

#### *L'environnement trophique*

L'alimentation chez les bivalves est étroitement associée à la ventilation puisque l'organisme va capter les particules présentes dans l'eau qui circule dans laquelle il va puiser son oxygène. Les particules contenues dans l'eau sont dirigées vers la bouche par un mécanisme utilisant les cils placés sur les branchies. L'efficacité de ce mécanisme est lié à la taille des branchies puisqu'il a été montré chez de nombreux bivalves une relation allométrique entre la surface des branchies et le taux de filtration (Pouvreau et al, 1999). La richesse de l'environnement trophique est un facteur important qui régule le besoin en oxygène. En effet, chez *Pinctada fucata*, la consommation d'oxygène s'accroît avec la densité algale (Tomaru et al, 2002). Cette relation est aussi valable chez des juvéniles de *Saccostrea commercialis* (Kesarcodi-Watson et al, 2001). Les expérimentations menées sur l'huître *C. gigas* à Argenton dans le cadre du projet Morest (Enriquez-Diaz, 2004) ont permis de recueillir des données indicatives de la relation entre la richesse du milieu en algues et la consommation en oxygène tout en offrant une perspective de la relation avec la température (Figure 5).

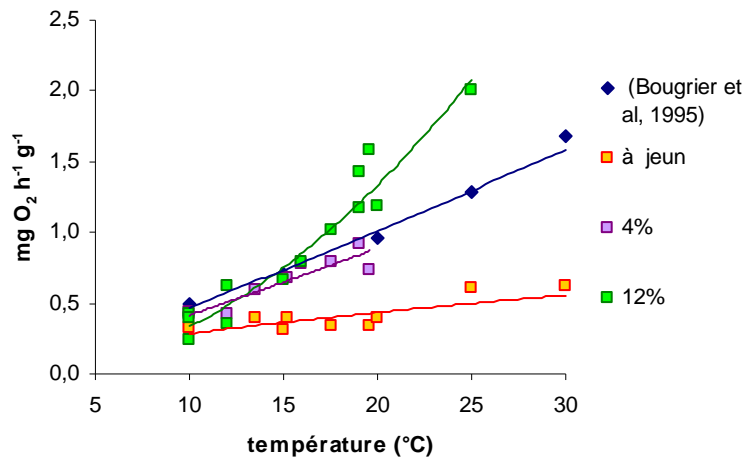


Figure 5: Relations entre la densité trophique et la consommation d'oxygène chez l'huître *C. gigas* en fonction de la température. L'apport trophique est exprimé en % de la ration d'algues (matière sèche) sur le poids sec des huîtres.

Ces données indiquent que le niveau métabolique augmente conjointement avec la densité trophique et la température. Les variations de consommation d'oxygène de *C. gigas* selon le niveau trophique reflètent probablement l'intensité de la gamétogenèse. En effet les huîtres nourries avec les régimes peu denses ont une gamétogenèse peu active ou même nulle alors que les animaux placés dans un environnement plus riche ont une gamétogenèse très active. A 15°C en avril, la gamétogenèse est peu active, et la consommation d'oxygène n'évolue pas entre les deux régimes 4% et 12% alors qu'à 19°C en juin, en pleine gamétogenèse, les huîtres nourries à 12% consomment une fois et demi plus d'oxygène qu'à 4% et 3 fois plus que les huîtres à jeun (Bourles, 2004, Lambert et al, 2007).

Un autre point de vue consiste à établir la relation entre le niveau trophique et la respiration (Figure 6). Ce lien significatif est toutefois la résultante de la relation entre le niveau trophique et l'ingestion.



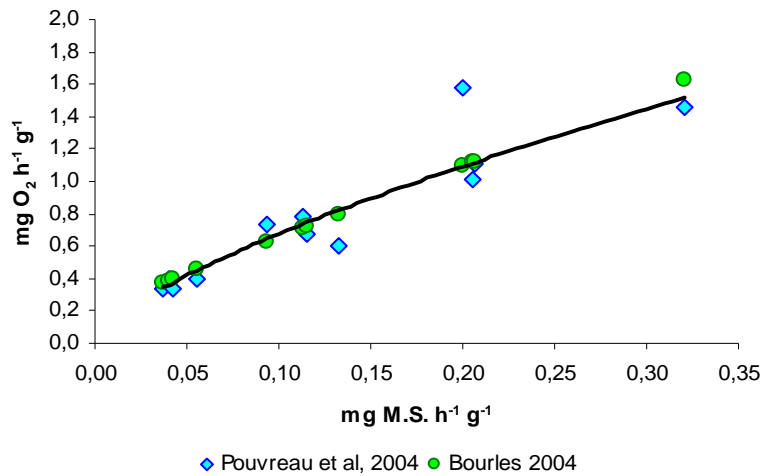


Figure 6: Respiration et consommation (les données présentées sont issues d'expérimentations réalisées à la station expérimentale d'Argenton dans le cadre du projet Morest)

La relation entre le niveau trophique et la respiration a été montrée chez de nombreux bivalves (Yukihira et al, 1998, Tomaru et al, 2002). Ces auteurs montrent toutefois une limite aux densités trophiques élevées, la consommation d'oxygène s'écroule signifiant que les capacités d'assimilation et de digestion sont saturées, l'animal produit des pseudofeces.

### *Les facteurs internes*

#### *La gamétogenèse*

La gamétogenèse engendre une surconsommation d'oxygène. Cela a été suggéré chez le bivalve *Spisula subtruncata* (Figure 7) en maturation (Rueda et Smaal, 2004).

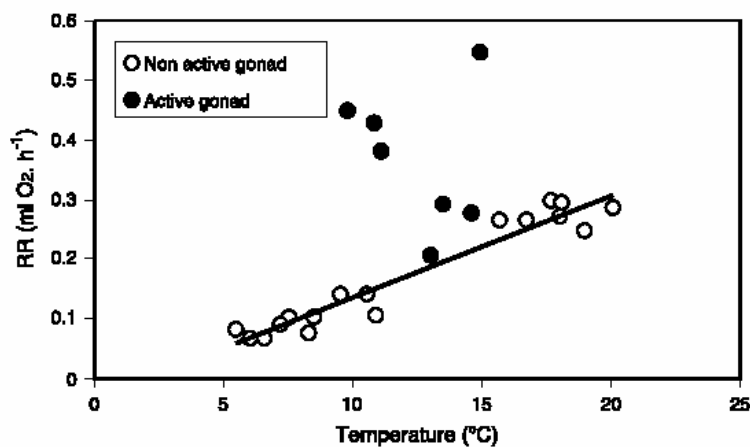


Figure 7: Effet de la gamétogenèse sur la consommation d'oxygène du bivalve *Spisula subtruncata* (Rueda et Smaal, 2004)

Chez *C. gigas*, une expérimentation consistant à mesurer le niveau métabolique de base, traduit par la consommation d'oxygène des huîtres à jeun depuis une semaine, a montré que cette consommation d'oxygène était significativement plus élevée chez les huîtres possédant une gonade largement développée que chez les huîtres ayant peu ou pas de gonade (Figure 8).

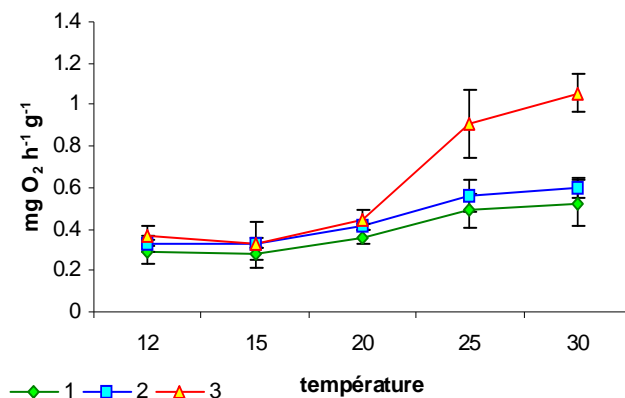


Figure 8: Effet du développement gonadique sur le métabolisme basal. Les stades 1, 2 et 3 représentent des stades visuels du développement gonadique (moyenne  $\pm$  SE, n=7). (Lambert et al, 2007)

Le coût métabolique associé à la construction de la gonade apparaît désormais évident (Lambert et al, 2007). Cette surconsommation d'oxygène se manifeste au delà de 20°C chez les huîtres en reproduction. Le développement majeur de la gonade se déroule lors de l'augmentation de la température, quand l'eau avoisine les 18-19°C. Ce déroulement résulte d'un métabolisme d'autant plus actif que l'état des réserves (et donc de la nourriture) est élevé.

Un autre aspect métaboliquement "coûteux" de la reproduction de l'huître *C. gigas* a été clairement mis en évidence en laboratoire. Il a été démontré que l'émission des gamètes constitue une phase de dépense énergétique qui se traduit par un arrêt de l'alimentation et un surcroît de la consommation d'oxygène, tout cela étant probablement lié à une activité valvaire accrue lors de l'expulsion des gamètes (Bourles, 2004). Ainsi, au cours de la ponte, les besoins métaboliques augmentent de près de 50% pendant au moins 36 heures, ce qui constitue sans nul doute un stade « critique » en terme énergétique.

### *Les génomes*

Une étude comparant les performances écophysologiques des huîtres creuses *C. gigas* et *C. angulata* et leurs hybrides indiquent que l'activité respiratoire et les besoins en oxygène sont similaires (Haure et al, 2003). Cependant il existe une variabilité physiologique des taux de consommation d'oxygène entre différentes souches d'huîtres creuses *C. gigas* originaires de France et du Japon. Les huîtres originaires de France ont une consommation d'oxygène significativement plus élevée que celles originaires du Japon (Gouletquer et al, 1999). Parmi les bivalves, les palourdes soumises à des anoxies naturelles provoquées par les fameuses malaïgues des étangs languedociens résistent plus ou moins bien. Il a été montré que cette résistance exprimée en survie est positivement liée au niveau d'hétérozygotie de marqueurs enzymatiques (Borsal et al, 1992). Au Canada, des stocks de moules originaires de sites différents ont des performances différentes particulièrement en terme de survie qui révèlent des niveaux de dépenses énergétiques différents. Parmi celles-ci, les moules dites sensibles ont une consommation d'oxygène significativement plus élevée que la population dite résistante (Tremblay et al, 1998a, 1998b). Cette résistance semble d'origine génétique puisque les auteurs ont observé une corrélation négative entre le niveau d'hétérozygotie et la demande métabolique et en particulier la consommation d'oxygène (Tremblay et al, 1998b). En France, concernant les huîtres *C. gigas*, le projet MOREST a généré des recherches en génétique ayant permis d'obtenir par sélection des huîtres caractérisées par leur sensibilité (S) ou leur résistance (R) aux mortalités estivales (Dégremont et al, 2005).

Ce patrimoine génétique est associé à l'effort de reproduction des huîtres. Les huîtres sensibles présentent un cycle reproducteur exacerbé semblable à celui observé pour les huîtres nourries aux niveaux trophiques riches. Tandis que les huîtres résistantes ont montré un cycle reproducteur modéré semblable à celui des huîtres élevées dans de conditions trophiques pauvres (Enriquez-Diaz, 2004, Delaporte, 2005). L'effort de reproduction plus important des huîtres S a donc probablement un coût métabolique plus important générant une demande en oxygène plus élevée.

Les huîtres sélectionnées R et S ont des capacités de défenses différentes montrant ainsi qu'il existe une base génétique déterminant les caractéristiques des hémocytes et particulièrement pour la production de Reactive Oxygen Species (ROS) (Delaporte, 2005, Lambert et al, 2007). Les gènes impliqués dans la détoxification des ROS sont modulés par des facteurs environnementaux comme l'hypoxie (David et al, 2005). On s'aperçoit donc qu'une part des bases génétiques de la sélection tourne autour de l'utilisation de l'oxygène : la consommation d'oxygène pour la gamétogenèse et les sous-produits de l'utilisation de l'oxygène dans les hémocytes pour la dégradation des particules étrangères lors de la phagocytose.

## **1.4 Les facteurs d'altération de la respiration**

### **1.4.1 La dégradation de l'environnement**

L'eutrophisation survient lors de l'augmentation de la concentration en nutriments et de la matière organique dissoute au dessus des niveaux habituels conduisant à une plus grande production de matière organique particulaire dans la colonne d'eau ou sur les fonds. La matière organique provient des bactéries et du plancton de la colonne d'eau ou des bactéries et des diatomées vivant à la surface des sédiments. En cas d'eutrophisation, les quantités de matières organiques produites sont trop importantes pour être recyclées en totalité par l'écosystème et sont relarguées au fond sous forme de fèces et autres particules de matière organique. La matière organique en sédimentation est en grande partie dégradée dans la colonne d'eau, un processus qui épuise l'oxygène. Si l'oxygène n'est pas fourni par le brassage des masses d'eau, la concentration en oxygène décroît conduisant à l'hypoxie et parfois à l'anoxie (Revue par Gray et al, 2002). L'eutrophisation est un problème autour de la Méditerranée et dans un nombre croissant de baies et d'estuaires (Nixon, 1990).

Dans les estuaires et les zones côtières, la matière organique sédimentée dérive aussi des fèces du zooplancton et des pseudo fèces des bivalves. Les travaux réalisés dans le bassin de Marennes Oléron mettent en évidence une source potentielle de stress environnemental aigu

pouvant avoir comme origine le compartiment sédimentaire. D'autre part, de nombreuses questions se posent quant au rôle joué par la matière organique particulaire dans l'équilibre de l'écosystème. Parmi les sources identifiables de cette matière organique (apports terrigènes, production primaire et secondaire...) la biomasse conchylicole constitue un maillon qu'il est difficile d'ignorer. En effet de par son activité alimentaire les biomasses conchylicoles vont contribuer à transformer la matière organique particulaire dont une partie non négligeable va constituer les biodépôts (fèces et pseudo-fécès). La présence d'élevages conchylicoles contribue de manière significative à l'enrichissement du compartiment sédimentaire en matière organique particulaire en accélérant sa sédimentation.

Lors d'hypoxies, la baisse de la teneur en oxygène est due à des phénomènes de stratification, à la salinité, à la température et à la demande en oxygène pour la minéralisation des sédiments et la respiration des végétaux aquatiques. Les sédiments sont souvent hypoxiques mais la plus forte demande en oxygène se situe au niveau de l'interface eau-sédiment (Diaz et Rosenberg, 1995). L'hypoxie favorise la production de substances toxiques comme les sulfures et l'ammoniaque dans les sédiments (Gray et al, 2002). Le caractère saisonnier de l'apparition des sulfures et de l'ammoniaque représente une source potentielle de stress dans les zones ostréicoles et coïncide avec les mortalités. Les effets spécifiques de l'hypoxie et des sulfures combinés sur les organismes marins sont difficiles à séparer (Vismann, 1991).

Ces effecteurs sont nocifs pour les huîtres. Ce type de problème se présente dans de nombreuses zones. Les crises anoxiques surviennent en été dans la lagune de Thau (Hérault, France) sur la côte méditerranéenne. Le foyer de l'anoxie se développe avec la production d'hydrogène sulfuré. Les concentrations en sulfures sont élevées atteignant  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  au fond (Chapelle et al, 2001). Dans la baie de Chesapeake sur la côte est des États-Unis, les valeurs de sulfures atteignent  $100 \mu\text{mol}$  à  $2000 \mu\text{mol}$  par litre de sédiment de surface et  $43 \mu\text{mol L}^{-1}$  dans les eaux de la baie (Roden and Tuttle, 1992). Dans les eaux profondes de Rhode Island, les niveaux de sulfures peuvent atteindre  $800 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Kennett et Hargraves, 1985).

## 1.4.2 L'hypoxie

Les organismes aquatiques sont caractérisés par leur type de consommation d'oxygène. On peut distinguer les animaux qui maintiennent une consommation d'oxygène indépendante de la concentration en oxygène dissous (au moins jusqu'à un certain niveau) et qui sont appelés les oxyrégulateurs de ceux qui réduisent leur consommation d'oxygène en même temps que la pression en oxygène baisse et qui sont nommés les oxyconformeurs (Dejours, 1981, Portner, 1985).

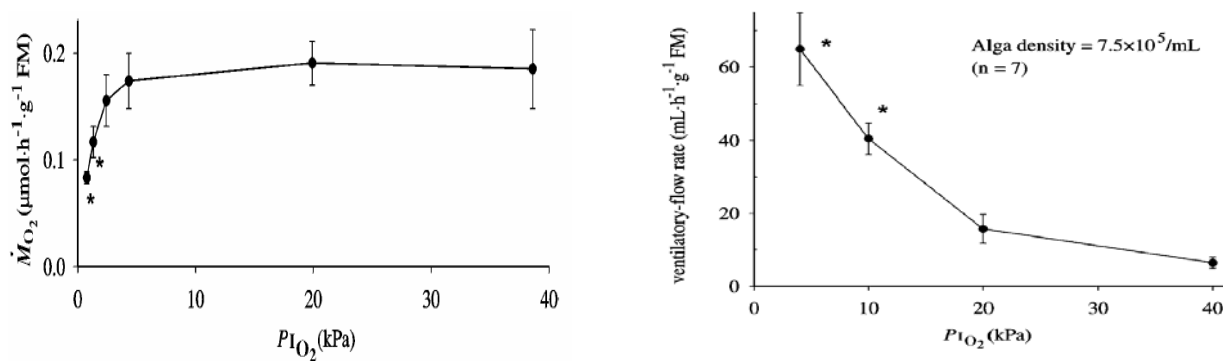


Figure 9 : Consommation d'O<sub>2</sub> (a) et activité ventilatoire (b) de *Corbicula fluminea* en relation avec le niveau d'oxygénation du milieu. (Tran et al, 2000)

Les principes de bases qui permettent aux oxyrégulateurs de maintenir leur consommation d'oxygène dans des conditions d'oxygénation variables allant de l'hyperoxie à l'hypoxie ont été étudiés notamment chez *Corbicula fluminea* (Tran et al, 2000). Ce bivalve d'eau douce maintient sa consommation d'O<sub>2</sub> jusqu'à une valeur d'oxygénation ambiante proche de l'hypoxie. En deçà de ce seuil l'animal réduit significativement sa consommation en O<sub>2</sub> (Figure 9a). Il a ainsi été déterminé que la clé de l'adaptation se situe au niveau de l'activité ventilatoire pour ne pas engendrer de changements de l'état d'oxygénation du sang (Figure 9b). Les ajustements de l'activité ventilatoire par *C. fluminea* sont indépendants de la concentration en algues et restent exclusivement dépendants du niveau d'oxygénation du milieu. En effet, de faibles pressions partielles en oxygène ( $P_{O_2}$ ) stimulent fortement l'activité ventilatoire en comparaison à des milieux équilibrés. La consommation d'oxygène des bivalves semble suivre une loi où la consommation d'oxygène est stable alors que la tension

en oxygène du milieu baisse jusqu'à un seuil critique. L'animal compense par une augmentation de l'activité ventilatoire (Tran et al, 2001). Cette adaptation respiratoire semble commune chez les animaux aquatiques puisque un comportement similaire a été décrit chez des poissons marins (Maxime et al, 2000).

La résistance à l'émersion des mollusques bivalves est basée sur la combinaison de 3 stratégies : (1) l'utilisation intermittente d'une respiration aérienne (McMahon, 1988, Demers et Guderley, 1994), (2) la baisse du rythme métabolique lors de la fermeture des valves (Flamme et al, 1981), (3) l'utilisation du métabolisme anaérobie conduisant à l'accumulation des métabolites finaux (De Zwaan, 1977, 1983). Ces stratégies représentent des mécanismes complémentaires pour faciliter la survie en condition d'exposition à l'air ou en hypoxie. Parmi les trois stratégies mises en œuvre par les moules, la première n'a pas encore été décrite chez l'huître.

Lorsque la disponibilité en oxygène passe au dessous d'un seuil critique chez la plupart des animaux le métabolisme anaérobie commence à se mettre en place. Chez la moule *M. galloprovincialis*, les voies fermentatives de production d'ATP sont induites lorsque la pression en oxygène du milieu ambiant se situe aux environs de 8 kPa. Une augmentation graduelle des produits anaérobiques (succinate et alanine) survient lorsque la tension en oxygène passe sous le seuil de 8 kPa pour atteindre un maximum à 4 kPa (De Zwaan et al, 1991).

L'hypoxie et l'anoxie provoquent une dépression métabolique due au passage d'aérobie à la production énergétique anaérobie qui a un rendement inférieur (Shicket al, 1986, De Zwaan et al, 1991). Ce commutateur métabolique est situé à la fin de la glycolyse au niveau du PEP. En mode aérobie, le PEP est le substrat de la PK pour la production du pyruvate. Le PEP peut également être le substrat de la gluconéogenèse qui est essentiellement régulé en partie par la PEPCK (Schein et al, 2004). Le changement métabolique vers les voies fermentatives est commandé par la phosphorylation réversible de la PK et des régulations allostériques menant à une réduction de l'activité enzymatique (Storey et Storey, 1990, Simpfendörfer et al, 1997).

Le pyruvate ne peut pas être oxydé ainsi il est converti en alanine. Quand ceci se produit, le PEP devient principalement un substrat pour la PEPCK menant à la formation du succinate (Figure 10). Un autre mécanisme de contrôle est l'ajustement de la quantité d'enzymes présentes dans les tissus par une modulation de l'expression des gènes. Ce contrôle est utilisé pour les changements métaboliques à long terme. Récemment l'étude de la réponse à l'hypoxie des huîtres *C. gigas* par une approche différentielle de l'expression des gènes a montré des sous-régulations dans le métabolisme énergétique et des sur-régulations dans la chaîne respiratoire (David et al, 2005).

La baisse d'activité de la PK est la réponse la plus prononcée parmi les enzymes impliquées dans la glycolyse. L'anoxie induit une baisse de l'activité de la pyruvate kinase dans tous les tissus de l'huître *C. virginica*, des changements de l'activité de cette enzyme sont aussi d'origine saisonnière (Greenway et Storey, 1999). Comme chez le bigorneau *Littorina littorea* (Greenway et Storey, 2001), ces changements d'activité sont liés à une modification des propriétés cinétiques de l'enzyme.

Des interactions entre la tolérance à l'exondation et le métabolisme sont mises en évidence par Demers et Guderley (1994). Ces auteurs ont montré que la durée d'acclimatation à la zone intertidale est un facteur qui conditionne l'adaptation de la réponse métabolique mesurée par l'activité de la PK et la présence des produits finaux du métabolisme anaérobie (succinate et alanine). La phase de récupération qui suit l'anoxie est d'une importance fonctionnelle considérable en durée et en efficacité puisque un grand nombre de réactions prennent place dont le rechargement du pool d'ATP ainsi que l'évacuation des produits finaux du métabolisme anaérobie (Figure 10). Ces produits sont soit excrétés, soit oxydés ou reconvertis en tant que substrats afin de réalimenter le cycle de Krebs.



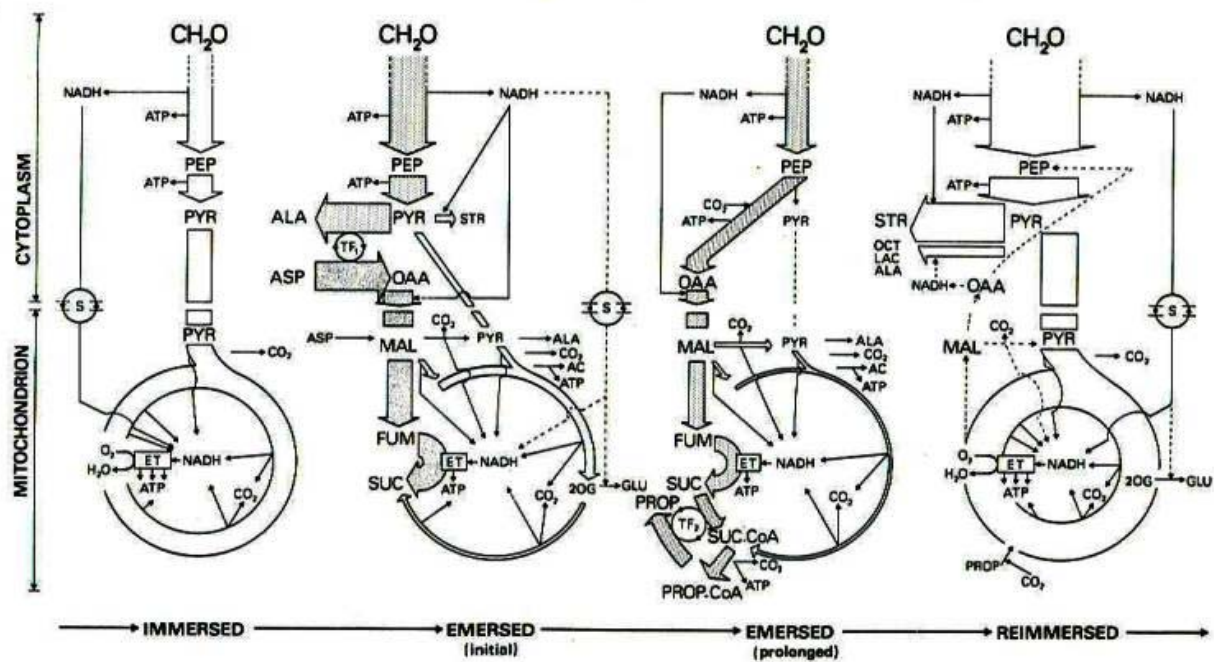


Figure 10: Diagramme illustrant les transitions des voies de dégradation du glycogène en relation avec les cycles tidaux (de Zwaan et Mathieu, 1992).

Tous les processus décrits plus hauts dont la finalité est la production d'énergie sous forme d'ATP, sont réalisés par une cascade d'enzymes. Chaque étape de la dégradation est signée par un métabolite. Le pyruvate signe la fin de la glycolyse. Il est produit à partir du PEP sous l'effet de l'activité de la PK. L'accumulation de pyruvate est un indicateur de la vitesse de la glycolyse. Si chez la plupart des invertébrés, le lactate est un produit final de l'anaérobie (Hammen et Ellington, 1982), chez les mollusques bivalves, les métabolites accumulés progressivement au cours de l'hypoxie jusqu'à l'anoxie sont principalement l'alanine et le succinate et ceci en dépit des différences d'espèce et de tolérance à l'hypoxie (De Zwaan et al, 1991). Selon l'origine des animaux : intertidale ou subtidale, l'efficacité métabolique n'est pas la même puisque les bivalves acclimatés à la zone intertidale produisent moins d'alanine et de succinate que les subtidaux. Ceci s'explique par exemple chez les moules qui sont aptes à la respiration aérienne et donc moins soumises aux anoxies (Demers et Guderley, 1994).

L'alanine est produite directement à partir du pyruvate sous l'effet de l'alanine déshydrogénase (ADH). Le succinate est issu de différentes chaînes de réaction: (i) la voie aérobie à partir du pyruvate, la voie alternative de production d'énergie impliquant le PEP via

la PEPCK, ou l'aspartate libre du cytosol. La cascade enzymatique est complexe mais caractérise l'origine de la voie métabolique et donc l'intensité et la durée du stress respiratoire. Il a en effet été montré chez l'huître *Crassostrea virginica* une réduction de l'activité de la PK en anoxie. La chute d'activité de cette enzyme est due à une baisse d'efficacité cinétique : baisse du  $V_{max}$ , réduction de l'affinité pour le PEP qui est le substrat de la PK, inhibition par l'alanine qui en trop grande quantité exerce une activité régulatrice sur la PK (Storey, 1993, Greenway et Storey, 1999). Au cours de l'anoxie, la concentration en aspartate diminue alors que le succinate augmente (Tableau 1) puisqu'il est produit à partir du pool d'aspartate libre dans le cytosol (Santini et al, 2001).

Tableau 1 : Effet de l'hypoxie et de l'anoxie sur la production de métabolites chez des invertébrés marins

	organismes	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Scapharca inaequalvis</i>	<i>Onchidium tumidium</i>	<i>Patella caerulea</i>
	auteur	De Zwaan et al, 1991		Santini et al, 2001	Ip et al, 1993
	Tissu/organe	Whole body	Whole body	Whole body	Foot muscle
		$\mu\text{mole g}^{-1} \text{ dw}$	$\mu\text{mole g}^{-1} \text{ dw}$	$\mu\text{mole g}^{-1} \text{ fw}$	$\mu\text{mole g}^{-1} \text{ dw}$
normoxie	succinate	0,2	2	0,07	0,1
	aspartate	16	22	3,56	10
	alanine	50	5	1,38	18
Hypoxie	succinate	16 (x 80)	13 (x 26)	11,4 (x 166)*	1,3 (x 13)
	aspartate	8 (x 0,5)	9 (x 0,41)	2,0 (x 0,5)*	2 (x 0,2)
Anoxie*	alanine	75 (x 1,5)	28 (x 5,6)	2,8 (x 2,5)*	30 (x 1,6)

En hypoxie, le fonctionnement de la chaîne respiratoire apparaît en mode de compensation puisque l'on assiste à une augmentation de l'activité de cytochrome c oxidase dans le muscle de la carpe pendant une hypoxie prolongée (Zhou et al, 2000). Des effets similaires des enzymes de la chaîne respiratoire ont été observés dans les muscles des grenouille pendant l'hibernation, et ceci a été associé à l'élargissement des mitochondries (Sato et al, 2001). Cet accroissement d'activité de la chaîne respiratoire pourrait être la conséquence d'une surrégulation de certains gènes de la chaîne respiratoire comme cela a été constaté chez la tortue qui est un organisme tolérant à l'anoxie (Storey, 2004). Récemment il a été montré chez l'huître *C. gigas* des effets similaires de surrégulation de certains gènes de la chaîne respiratoire (David et al, 2005).

### 1.4.3 Les sulfures

Les organismes habitant les environnements pollués par des sulfures ont développé des stratégies d'adaptation. Une augmentation de la consommation de l'oxygène à basses concentrations de sulfure a été enregistrée chez plusieurs invertébrés marins (Eaton et, 1993, Johns et al, 1997) tandis que chez d'autres la consommation d'oxygène reste inchangée (Encomio, 1998, Christensen et Colacino, 2000). Mais pendant une exposition prolongée, le métabolisme aérobie ne peut pas être conservé. Les vers marins *Arenicola marina* (Hauschild et Grieshaber, 1997) et *Urechis caupo* (Encomio, 1998), la palourde *Donax serra* (Laudien et al, 2002) et le crustacé *Cyprideis torosa* (Jahn et al, 1996) exposés aux sulfures s'orientent vers un métabolisme anaérobie, traduit par une diminution de l'activité enzymatique de la glycogène phosphorylase (Oeschger et Storey, 1993), une augmentation de l'alanine (Oeschger et Storey, 1993 ; Encomio, 1998 ; Laudien et al, 2002) et une production de succinate (Oeschger et Pedersen, 1994; Encomio, 1998 ; Laudien et al, 2002). Le métabolisme du vers *A. marina* en présence de 25 mM de sulfure devient anaérobie (Hauschild et

Grieshaber, 1997). Lors d'une intoxication aux sulfures l'oxygène est utilisé pour oxyder les sulfures dans les tissus (Johns et al, 1997, Hauschild et Grieshaber, 1997). La concurrence pour l'oxygène limite donc la quantité disponible pour le métabolisme aérobie générant une transition vers un métabolisme anaérobie. La tolérance aux sulfures dépend du niveau de la contamination de sulfure de l'habitat des bivalves (Jahn et Theede, 1997). Les bivalves des zones hautement contaminées ont des capacités plus élevées de survie lors d'une intoxication aux sulfures que ceux des zones faiblement contaminées. La tolérance du sulfure pourrait également être due à une meilleure protection de la cytochrome c oxydase par une diffusion plus lente de sulfure dans les tissus (Jahn et Theede, 1997).

## 1.5 Le projet

Dans le cadre du programme MOREST, l'objectif du présent travail est d'apporter des éléments sur l'interaction entre l'environnement et l'hôte particulièrement sur l'aspect énergétique en faisant l'hypothèse qu'un déficit énergétique peut résulter d'une mauvaise utilisation des réserves liée à un manque de disponibilité de l'oxygène dans le milieu (hypoxie, anoxie) ou à un détournement de l'oxygène pour accomplir d'autres réactions où l'oxygène serait impliqué. On pose l'hypothèse que dans certaines situations, les besoins en oxygène des huîtres en élevage pour la production d'énergie ne sont pas satisfaits, avec pour conséquence un déficit énergétique qui semble être une des causes des mortalités estivales (Samain et al. 2005). Il apparaît donc que la prise en compte de la respiration comme variable explicative des problèmes physiologiques des huîtres pendant la période de reproduction pourrait fournir quelques réponses.

Nous nous proposons d'étudier l'adaptation des huîtres *Crassostrea gigas* au milieu par la description de la fonction respiratoire en tentant de préciser les niveaux d'adaptation par une triple approche liant écophysiologie, biochimie et biologie moléculaire. L'objectif principal est de comprendre la réponse et les orientations métaboliques en relation avec les changements environnementaux et le statut reproducteur des huîtres. Cette hypothèse respiratoire propose un lien entre les causes présumées de l'état énergétique et les pratiques culturales et le milieu. Cette démarche est axée vers la recherche de marqueurs qui révéleront les spécificités des réponses métaboliques selon le type de stress respiratoire.

Il existe un effet de proximité du sédiment sur les huîtres qui réduit la survie et croissance. Une étude destinée à évaluer les effets de la proximité du sédiment sur le métabolisme énergétique a été réalisée sur le site expérimental de Fort Espagnol (La Trinité sur mer). Les huîtres ont été placées pendant 5 mois sur des tables situées à 10 et 60 cm du sédiment.

Les sédiments sont souvent hypoxiques mais la plus forte demande en oxygène provient de l'eau proche du fond. L'hypoxie favorise la diffusion à partir du sédiment de  $\text{H}_2\text{S}$  et de  $\text{NH}_4^+$  et leur apparition est synchrone aux épisodes de mortalité. Le déficit en oxygène et la présence de sulfures sont suspectés être à l'origine du déficit énergétique. Des expérimentations sont mises en œuvre pour déterminer le comportement respiratoire des huîtres dans un milieu où l'oxygène baisse. Ceci permet de déterminer le comportement respiratoire des huîtres, régulateur ou conformeur en relation avec la température, et dans le cas d'un comportement régulateur, il est important de déterminer la pression critique en oxygène ( $\text{PcO}_2$ ) qui déclenche la dépression métabolique. Trois expérimentations de 3 semaines de conditionnement en hypoxie sont conduites à 12°C, 15°C et 20°C pour décrire le comportement métabolique à la concentration en oxygène de 2 mg L<sup>-1</sup> et déterminer la sensibilité du système métabolique à la température. Enfin, l'intoxication par les sulfures est étudiée selon 2 modes. En premier lieu, la recherche d'un effet de la teneur en sulfures sur la filtration et la consommation d'oxygène. En second lieu, la recherche des effets d'une exposition prolongée (10 jours) sur le métabolisme énergétique. Les expérimentations sur l'effet de l'hypoxie et des sulfures sont réalisées avec du matériel biologique sélectionné pour la résistance R et la sensibilité S aux mortalités estivales. L'analyse des différences entre les R et les S fera l'objet d'un chapitre particulier.

Le clonage et le séquençage des gènes codant pour la PK et la PEPCCK ont pour but de mesurer l'expression de ces gènes dans le muscle adducteur des huîtres soumises à l'hypoxie prolongée et exposées aux sulfures. Cette approche permet la comparaison entre l'activité enzymatique et l'expression du gène pour déterminer le niveau de régulation de ces enzymes et le délai pour enclencher une régulation.

*Les indicateurs métaboliques*

La compréhension des phénomènes d'adaptation au milieu passe par l'étude des mécanismes physiologiques permettant le succès écologique des animaux face aux contraintes. Les huîtres qui appartiennent au groupe des mollusques sont des organismes vivant dans un milieu perturbé en permanence. L'environnement trophique et physico-chimique subit des variations naturelles saisonnières, hydrologiques (Diaz et Rosenberg, 1995). Les organismes vivant dans ce type d'habitat ont donc développé des stratégies leur permettant de s'adapter aux variations environnementales d'origine naturelle et particulièrement aux variations d'oxygénation du milieu (McMahon, 1988, Greenway and Storey, 1999, 2000). Vivant en zone intertidale, les huîtres subissent des exondations périodiques qui les placent en situation anoxique tout en assurant un niveau métabolique minimum nécessaire aux fonctions vitales (Gabbott, 1983, Greenway and Storey, 1999, 2000). L'exceptionnelle plasticité fonctionnelle des bivalves leur permet de stabiliser leur consommation d'oxygène dans un milieu variable (Tran et al, 2000). Lorsque le milieu s'appauvrit en oxygène, les bivalves maintiennent leur consommation en oxygène par une augmentation de leur ventilation. Cette adaptation permet de conserver une pression artérielle en oxygène et un débit sanguin constants. Cependant, ce système de compensation trouve ses limites au seuil d'oxygénation ( $P_{CO_2}$ ) du milieu où l'animal ne peut plus maintenir sa consommation d'oxygène (Tran et al, 2000). Les conséquences physiologiques et métaboliques des situations environnementales variables sur le métabolisme respiratoire des huîtres *C. gigas* n'ont fait l'objet que de peu d'études (David et al, 2005). Les indicateurs énergétiques liés au statut respiratoire sont à rechercher au niveau du métabolisme glucidique : c'est à dire des gènes, des enzymes et des métabolites issus des catalyses. Parmi les gènes impliqués dans la respiration et la régulation de la réponse cellulaire, la Pyruvate Kinase (PK) et la Phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) qui gèrent l'orientation métabolique entre l'aérobiose et l'anaérobiose sont des candidats permettant d'expliquer les choix métaboliques en relation avec le statut

respiratoire. L'impact métabolique est donc décrit par le fonctionnement de la PK et de la PEPCK au niveau de l'activité enzymatique et de l'expression des gènes, l'activité de la chaîne respiratoire est déterminée par la mesure de l'activité enzymatique du système de transport d'électron (ETS). Les orientations métaboliques sont validées par la quantification de certains métabolites comme l'alanine et le succinate principalement. L'aspartate est considéré comme une voie métabolique alternative aux glucides et sera considéré dans certaines expérimentations. Enfin le bilan énergétique est évalué par la mesure de la teneur en ATP et de la charge énergétique adénylique (CEA).



---

## **Partie 2. Le stress *in situ***

---

## 2.1 Introduction

Il est désormais établi que les mortalités estivales de l'huître *C. gigas* résultent de l'interaction de nombreux facteurs incluant la température, un stress physiologique associé à la maturation de la gonade, aux pratiques culturales, à des agents pathogènes et des pollutions (Gouletquer et al. 1998; Samain et al. 2007). L'élevage des huîtres près du sédiment ou "à plat" a un effet drastique sur la survie et la croissance des huîtres (Soltechnik et al. 2005; Gagnaire et al. 2006) et réduit la capacité de stockage du glycogène (Soltechnik et al. 2005). Les sédiments sont souvent hypoxiques et la demande en oxygène la plus élevée se situe dans la couche d'eau à l'interface du sédiment (Diaz et Rosenberg 1995). Des substances néfastes comme les sulfures et l'ammoniac sont générés lorsque le milieu est hypoxique et leur apparition est concomitante aux mortalités estivales.

Tous ces facteurs sont responsables d'une dépression métabolique qui se manifeste par une chute de l'ingestion et de la respiration chez de nombreux bivalves (Sobral and Widdows 1997; Encomio 1998, Hicks and McMahon 2002) et se traduit par une anaérobiose cellulaire (Shick et al. 1986; De Zwann et al. 1991; Encomio 1998; Laudien et al. 2002). Cette étude a été conçue pour évaluer les effets de la proximité du sédiment sur le métabolisme des huîtres *C. gigas* élevées d'Avril à Août à 2 niveaux de proximité du sédiment: 10 et 60 cm. L'état énergétique et le taux métabolique sont estimés par la mesure des constituants biochimiques : protéines, lipides et glucides et des activités des enzymes pyruvate kinase (PK), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et du système de transport d'électron (ETS). Un bilan métabolique est réalisé par la mesure de l'ATP et des intermédiaires métaboliques que sont l'alanine, le succinate et l'aspartate.

## 2.2 Résultats

Effect of sediment nearness on the metabolic enzyme activity and energy state of the oyster *Crassostrea gigas* (article 1).

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans "Aquatic Living Resources".

## Effect of sediment nearness on the metabolic enzyme activity and energy state of the oyster *Crassostrea gigas*

Gilles Le Moullac<sup>1,a</sup>, Pierre-Gildas Fleury<sup>3</sup>, Jean-René Le Coz<sup>2</sup>, Jeanne Moal<sup>2</sup> and Jean-François Samain<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IFREMER, UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques marins, Site Expérimental d'Argenton, 29840 Argenton en Landunvez, France

<sup>2</sup> IFREMER, UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques marins, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

<sup>3</sup> IFREMER, Laboratoire Environnement-Ressources, 12 rue des Résistants, BP 26, 56470 La Trinité sur Mer, France

Received 27 June 2007; Accepted 2 October 2007

**Abstract** – This study was designed to assess in situ the effects of sediment nearness on *Crassostrea gigas* metabolism. One year-old oysters were reared for 5 months (April-August) in plastic bags on metallic frames at 10 and 60 cm off the sediment at the beginning of April. The management of the energetic resources (storage, consumption) was estimated with respect to biochemical changes of proteins, lipids and carbohydrates. In order to evaluate the effect of the sediment nearness at cellular level, the metabolic rate was evaluated by assessing pyruvate kinase (PK) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) enzyme activities and electron transport system (ETS) activity. The metabolic pathways were assessed by measuring ATP and intermediary metabolites such as alanine, succinate and aspartate. Despite similar survival and growth at the two rearing levels, the protein, lipid and carbohydrate content were significantly lower in the oysters close to the bottom. In the oysters reared at 10 cm, PK activity was also significantly reduced and a significant negative correlation between alanine content and PK activity was revealed. The sediment nearness decreased significantly the ATP content in the oyster. There was a significant relationship between ATP and aspartate in these oysters. The use of aspartate contributed to complete the metabolic pathways along with carbohydrate allowing to maintain the same biological performance as the oyster reared far from the bottom. The energy state (proteins, lipids, carbohydrates and ATP contents) could suggest that the oysters close to the sediment were fed less but the metabolic enzyme activities allow to suggest an oxygen deficiency. However, the reduced PK activity, the absence of PEPCK activity stimulation and the utilization of aspartate suggest a transition stage to anaerobiosis.

**Key words:** Oyster / Sediment / Metabolism / Proteins / Lipids / Carbohydrate / Alanine / Succinate / Aspartate

**Résumé** – Effet de la proximité du sédiment sur les activités enzymatiques métaboliques et l'état énergétique de l'huître *Crassostrea gigas*. Cette étude est conçue pour évaluer in situ les effets de la proximité du sédiment sur le métabolisme de l'huître *Crassostrea gigas*. Des huîtres âgées d'un an ont été élevées pendant 5 mois (avril-août) dans des poches grillagées en plastique posées sur des cadres métalliques à 10 et 60 cm du sédiment au début d'avril. La gestion des ressources énergétiques (stockage, consommation) est estimée par la mesure des protéines, des lipides et des glucides des huîtres entières. Afin d'estimer l'effet de la proximité de sédiment au niveau cellulaire, le flux métabolique est évalué par la mesure des activités enzymatiques de la pyruvate kinase (PK) et de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et l'activité du système de transport d'électron (ETS). Les voies métaboliques sont contrôlées en dosant les teneurs en ATP et les métabolites intermédiaires tels que l'alanine, le succinate et l'aspartate. Bien que les taux de survie et de croissance soient semblables aux deux niveaux d'élevage, les teneurs en protéines, lipides et glucides sont significativement plus faibles dans les huîtres élevées à 10 cm. Chez les huîtres élevées à 10 cm, l'activité de PK est significativement réduite et une corrélation négative significative entre le contenu d'alanine et l'activité de PK est révélée. La proximité du sédiment abaisse significativement le contenu en ATP. Une relation significative entre la teneur en ATP et l'aspartate est aussi mise en évidence. L'utilisation de l'aspartate apparaît donc comme une voie métabolique complémentaire de la glycolyse permettant de maintenir les mêmes performances biologiques que les huîtres éloignées du sédiment. Le statut énergétique défini par la teneur en protéines, lipides, glucides et ATP pourrait suggérer que les huîtres près du sédiment aient été moins nourries.

<sup>a</sup> Corresponding author: Gilles.Le.Moullac@ifremer.fr

mais les activités enzymatiques métaboliques laissent suggérer une insuffisance de l'oxygène. La réduction de l'activité de PK associée à la teneur en alanine, l'absence de stimulation de l'activité de PEPCK et l'utilisation de l'aspartate suggèrent une étape de transition vers l'anaérobiose.

## 1 Introduction

Important mortality outbreaks have been reported in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* populations on the French coasts 15 years in the past (Goulletquer et al. 1998; Soletchnik et al. 1999). The syndrome is known as summer mortality and generally associated with temperatures over 19 °C and coincides with the period of sexual ripeness (Soletchnik et al. 1999, 2005). Some authors suggest that mortalities occurring in Pacific oyster are the result of multiple factors, including elevated temperature, physiological stress associated with gonadal maturation, aquaculture practices, pathogens and pollutants (Goulletquer et al. 1998; Samain et al. 2007). A seasonal cycle of storage and mobilization of energy reserves, especially glycogen was previously correlated with the annual reproductive cycle of bivalves (Berthelin et al. 2000). Indeed, glycogen content was positively associated with fecundity in oysters and negatively associated with gametogenic rate (Deslous-Paoli 1980). Glycogen content is also positively linked with survival of oysters during summer (Perdue et al. 1981; Berthelin et al. 2000).

Sediment is often hypoxic but the highest oxygen demand can be in the water close to the bottom (Diaz et Rosenberg 1995). Moreover, toxic substances like sulphides and ammonia in the sediment are generated under hypoxic conditions and their appearance is synchronous with the summer oyster mortality. The combined effects of hypoxia and sulfides on marine organism are difficult to separate (Vismann 1991). Nearness to the sedimentary has a drastic effect on oyster survival and growth (Soletchnik et al. 2005; Gagnaire et al. 2006). For the oyster *C. gigas*, the sediment nearness reduces the store of lipids and glycogen (Soletchnik et al. 2005). All these factors are responsible for the metabolic depression which results in the fall of ingestion and breathing. The reduction of feeding activity and oxygen consumption occurs in bivalves exposed to hypoxia and sulphide exposure (Sobral and Widdows 1997; Encomio 1998, Hicks and McMahon 2002). Metabolic depression in bivalves is achieved by a transition from aerobiosis to anaerobiosis (Shick et al. 1986; De Zwann et al. 1991; Encomio 1998; Laudien et al. 2002).

This study was designed to assess effects of sediment nearness on *Crassostrea gigas* metabolism. Oysters were reared at 10 and 60 cm above the sediment in plastic bags from April to August. Energetic resources were estimated with respect to changes of proteins, lipids and carbohydrates. In order to evaluate the effects of the sediment nearness at cellular level, the metabolic pathways were evaluated by assessing pyruvate kinase (PK) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) enzyme activities and electron transport system (ETS) activity. The metabolic pathways were assessed by measuring ATP and the intermediary metabolites alanine, succinate and aspartate.

## 2 Material and method

### 2.1 Experimental design and sampling

Oyster used in this study were raised at *Fort Espagnol*, in the middle of *Rivière d'Auray* estuary in Southern Brittany. Temperature was measured twice a day at high tides. The one-year wild oysters used in this study were collected in the Arcachon Basin. Bags containing 300 live oysters were put on iron frames at 10 cm and 60 cm off the bottom. At each sampling date, oysters were counted in one bag and shell measurements were recorded from 30 individuals. Dry meat weight was recorded after freeze-drying for 48 h.

### 2.2 Biochemical composition

At each sampling date, whole-oyster soft tissue was dissected and combined in 3 pools of 10 animals each. The tissues were then frozen and stored in liquid nitrogen. Pooled tissues were ground with a Danguomeau homogenizer. For total lipid, protein and carbohydrate analyses, 600 mg of the wet homogenate was suspended with 3 ml of distilled water and divided into three aliquots (200  $\mu$ l for carbohydrate and protein analysis and 400  $\mu$ l for total lipid analysis). Total lipid contents were estimated according to Bligh and Dyer (1959) after extraction in a dichloromethane-ethanol-water mixture. The purified lipids were placed in a pre-weighed Teflon cup, dried under a nitrogen stream, and lipid content was estimated by weighing. Carbohydrate and protein contents were measured by colorimetry as described by Dubois et al. (1956) and Lowry et al. (1951), respectively. Results are expressed as milligrams of carbohydrate, lipid and protein per gram of wet weight.

### 2.3 PK and PEPCK activities

The activity of PK in oyster tissues was determined as described by Greenway and Storey (1999). Frozen tissues were prepared at a 1:5 w/v ratio in a buffer composed of 50 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.2), 100 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA and 15 mM 2-mercaptoethanol. A few crystals of phenylmethylsulfonyl (PMSF) were added immediately prior to sonication. The homogenates were centrifuged for 20 min at 20 000 g at 5 °C. The assays were made in duplicate at room temperature and initiated by mixing the enzyme buffer with the 20  $\mu$ l homogenate in 250  $\mu$ l total microplate well volume. The preparation for pyruvate kinase (PK; EC 2.7.1.40) was as follows: 100 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.2), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM phosphoenolpyruvate, 2 mM ADP, 0.15 mM NADH, 0.2% 2 (v/v) rotenone-saturated ethanol, and 1 U ml<sup>-1</sup> LDH. For phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK; EC 4.1.1.32) the preparation was: 100 mM imidazole-HCl buffer (pH 6.6), 30 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM phosphoenolpyruvate, 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM IDP,

1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0.15 mM NADH, and 2.5 U  $\text{ml}^{-1}$  MDH. Blanks were run and subtracted. Changes in NAD(P)H absorbance at 340 nm were monitored using a Biotek microplate reader.

## 2.4 Electron transport system activity

ETS activity was determined following the method of Owens and King (1975), where INT-tetrazolium is reduced to INT-Formazan when substituted for oxygen as the terminal electron acceptor. Reagents were freshly made daily and kept on ice and all assay procedures were carried out in an ice bath. Frozen tissue powder was diluted in ETS B solution (75  $\mu\text{M}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.5  $\text{mg ml}^{-1}$  polyvinylpyrrolidone, and 0.2% (v/v) Triton X-100 in 0.1 M phosphate buffer pH 8.5) and sonicated. Then samples were centrifuged for 15 min (4 °C, 3000 g). One hundred fifty microliters supernatant was transferred to another tube containing 400  $\mu\text{l}$  substrate solution (1.2  $\text{mg ml}^{-1}$  NADH, 0.2  $\text{mg ml}^{-1}$  NADPH in ETS B solution) and 250  $\mu\text{l}$  INT solution (2  $\text{mg ml}^{-1}$  INT-tetrazolium in double distilled water pH 8.5). Samples were incubated for 20 min at room temperature after which the reaction was stopped with 400  $\mu\text{l}$  quench solution (50% formalin, 50% 1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). The absorbance of each sample was then measured in duplicate spectrophotometrically at 490 nm using a Biotek microplate reader. The absorbance value was corrected by a blank, containing 150  $\mu\text{l}$  sample, 400  $\mu\text{l}$  ETS B, 250  $\mu\text{l}$  INT solution and 400  $\mu\text{l}$  quench solution. ETS ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$ ) was then calculated by the following equation given by Garcia-Esquivel et al. (2001):

$$ETS = (E_{\text{corr}} \times V_{\text{hom}} \times 60/T \times V_{\text{rxn}})/(V_{\text{inc}} \times ww \times 31.8)$$

$E_{\text{corr}}$  = measured absorbance, corrected with the buffer and reagent blank,  $V_{\text{hom}}$  = volume of the total homogenate (ml), 60 = factor used for to express the activity per hour,  $T$  = time of incubation (min),  $V_{\text{rxn}}$  = final volume in the assay (ml),  $V_{\text{inc}}$  = volume of the homogenate used in the reaction assay (ml),  $ww$ : wet weight of the sample in the total homogenate (g),  $31.8 E_{490\text{nm}} \text{ cm}^{-1}$ : the molar extinction coefficient of INT-formazan at 490 nm is  $15.9 \text{ mM}_{\text{INT}}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  assuming that 2 molecules of INT-formazan are formed per each mole of oxygen.

## 2.5 Metabolite determination

Metabolites and nucleotides were extracted from 200 mg of the frozen oyster powder with 2 ml of trichloroacetic acid (TCA), neutralized with 1.2 ml of amine from trioctylamine/trifluoro-trichloro-ethane, v:v, 1:5). ATP nucleotides were analysed by high-performance liquid chromatography on a reverse phase column with a counter-ion (tributylamine) according to Moal et al. (1989). Alanine and aspartate were measured enzymatically according to the procedure described by Williamson (1974) and Mollering (1985) respectively. Succinate was quantified with the succinate determination kits of R-Biopharm Inc (Marshall, MI, USA).

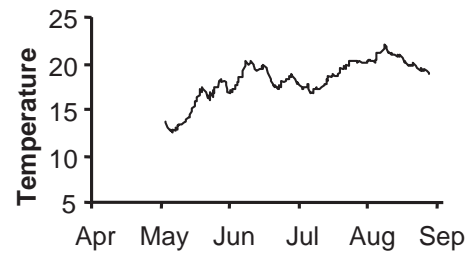


Fig. 1. Temperature variations during the experimental period.

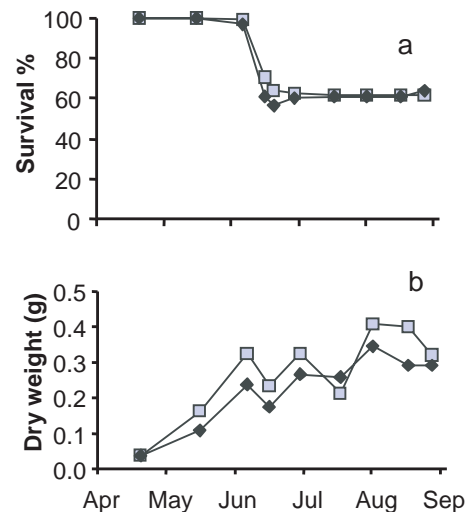


Fig. 2. (a) Survival and (b) growth of oyster according to the rearing height and sampling date. (grey) 60 cm and (black) 10 cm.

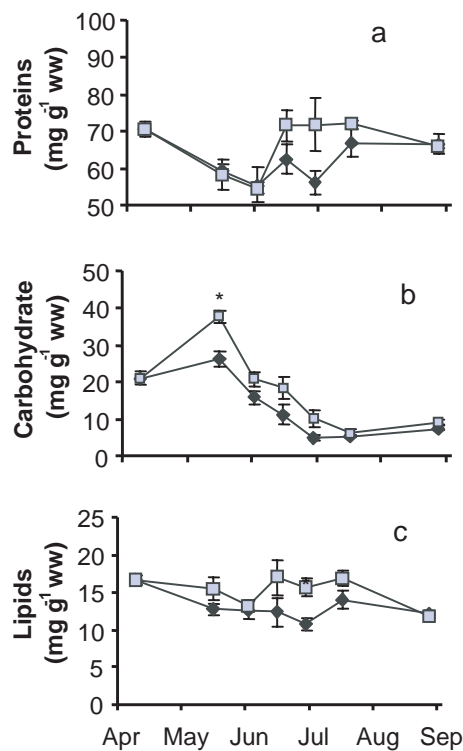
## 2.6 Statistics

Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed for biochemical and metabolic parameters to test the effect of sampling date and rearing level. Student's  $t$ -test was used as post-tests to compare the effect of the rearing level at specific sampling dates. Correlation between some variables was tested using the critical value table for Pearson's Correlation Coefficient; at the alpha level of 5% and  $df = 17$ , the null hypothesis was rejected when  $r = 0.456$ . Statistical analyses were performed using Statview (SAS).

## 3 Results

### 3.1 Biological performance

This experiment was characterized by a mortality of 40% simultaneously on both rearing levels during the first fortnight of June (Fig. 1). Two weight loss episodes were observed in June and July; the first occurred during the first fortnight of June from the oysters reared at the two levels, and the second occurred on 19-July with the oysters reared at 60 cm off the bottom (Fig. 2). Mortality was simultaneous to the first weight loss when the temperature reached 19 °C.



**Fig. 3.** The effects of rearing level and sampling date on proximal composition (a) proteins (b) lipids and (c) carbohydrate in *Crassostrea gigas* whole oyster. (grey) 60 cm and (black) 10 cm. Results are means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \*, significant difference ( $p < 0.05$ , Student  $t$ -test) between the rearing levels at each sampling day.

### 3.2 Proximate composition of oyster tissue

The variations in total protein in the oyster tissues are shown (Fig. 3a). The ANOVA revealed significant changes in total protein content according to the sampling date ( $p < 0.01$ ) and the rearing level ( $p < 0.05$ ) (Table 1). The level of protein decreased from 9-April until 3-June in oyster at the two rearing level before to be restored on 17-June in the oyster reared at 60 cm. The level of total protein was significantly lower in the oysters reared at 10 cm of the bottom.

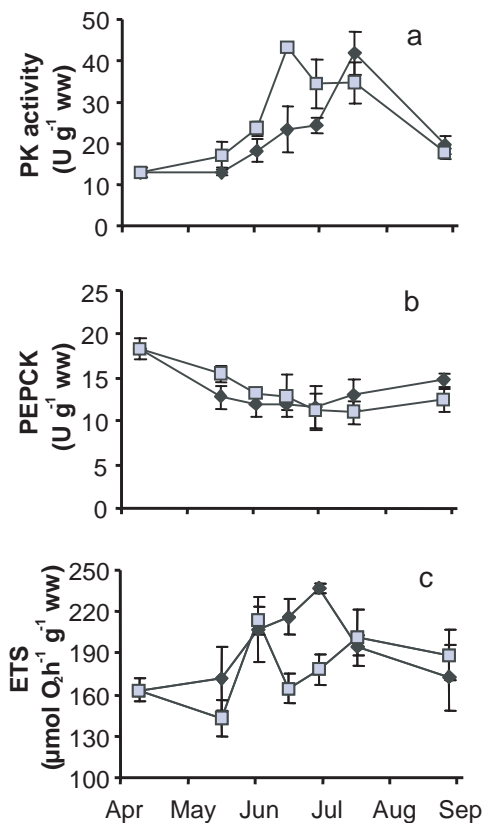
Changes in carbohydrate content are plotted (Fig. 3b) showing significant changes according to the sampling date ( $p < 0.0001$ ) and the rearing level ( $p < 0.0001$ ) (Table 1). Carbohydrate levels increased from 9-April to 17-May before declining until 17-June. Carbohydrate level was maximal on 17-May and significantly higher in oyster reared at 60cm off the bottom (Fig. 3b). The level of carbohydrate was significantly lower in the oysters reared at 10 cm off the bottom from 17-May to 30-June. Lipid content changed significantly in the oyster tissues according to the sampling date ( $p < 0.01$ ) and the rearing level ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3c, Table 1). Lipid levels were significantly lower in the oysters reared at 10 cm off the bottom.

**Table 1.** Results of two-way ANOVA for biological data content according to the sampling date and the rearing level.

	Proteins		Carbohydrates		Lipids		PK activity		PEPCK activity		ETS activity		Aspartate		Alanine		Succinate		ATP		
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Sampling date	6	5.24 **	57.77 ****	3.59 **	15.96 ****	4.71 **	3.37 *	4.03 **	28.64 ****	6.78 ****	7.78 ****										
Rearing level	1	4.62 *	23.08 ****	11.47 **	5.57 *	0.001 ns	3.36 ns	0.59 ns	25.18 ****	9.91 ****	25.21 ****										
Sampling date $\times$ Rearing level	6	1.72 ns	2.82 *	1.62 ns	3.18 *	0.63 ns	1.82 ns	0.96 ns	4.13 **	2.73 *	1.9 ns										

Significant levels : \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ); ns = non significant.





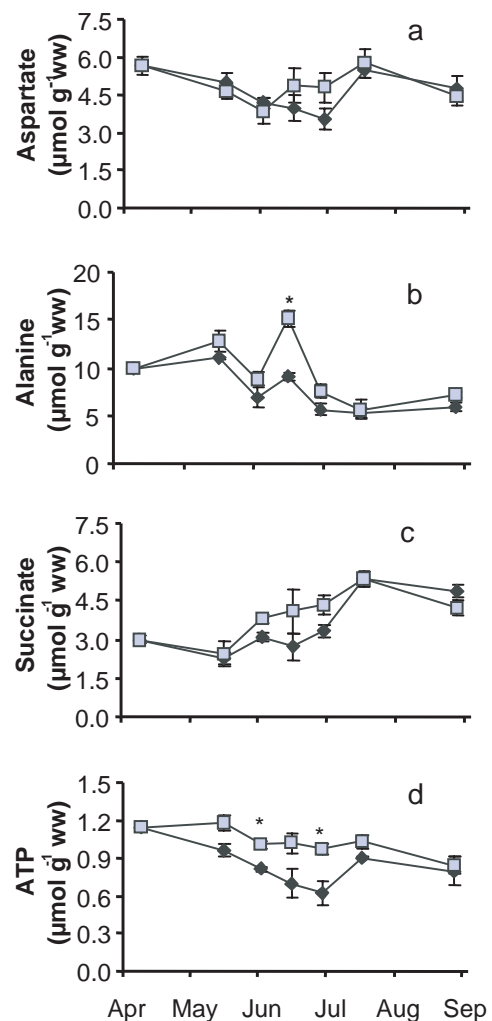
**Fig. 4.** The effects of rearing level and sampling date on (a) PK (b) PEPCK enzyme activity and (c) ETS activity in *C. gigas* whole oyster. (grey) 60 cm and (black) 10 cm. Results are means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \*, significant difference ( $p < 0.05$ , Student  $t$ -test) between the rearing levels at each sampling day.

### 3.3 PK, PEPCK and ETS enzyme activity

Figure 4a displays PK enzyme activity in the oyster tissues as a function of sampling date. Two ways ANOVA revealed that PK enzyme activity changed according to the sampling date ( $p < 0.0001$ ) and the rearing level ( $p < 0.05$ ) (Table 1). The PK enzyme activity increased significantly from 5-April until 17-June and 19-July in the oyster reared at 60 cm and 10 cm off the bottom, respectively. The PK enzyme activity was significantly lower in the oysters reared at 10 cm off the bottom. The PEPCK activity changed significantly according to the sampling date ( $p < 0.05$ ) (Table 1). The PEPCK enzyme activity was the highest in late spring (Fig. 4b). ETS activity (Fig. 4c) varied significantly with sampling date ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

### 3.4 Metabolite content

The aspartate content in oyster tissues changed significantly over time ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5a, Table 1). Alanine concentration varied significantly with the sampling date ( $p < 0.0001$ ) and the rearing level ( $p < 0.0001$ ) (Table 1). The mean level of alanine was higher in oyster reared at 60 cm



**Fig. 5.** The effects of rearing level and sampling date on (a) aspartate (b) alanine (c) succinate (d) ATP content in *C. gigas* whole oyster. (grey) 60 cm and (black) 10 cm. Results are means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \*, significant difference ( $p < 0.05$ , Student  $t$ -test) between the rearing levels at each sampling day.

off the bottom (Fig. 5b). Succinate content changed according to the sampling date ( $p < 0.001$ ) and the rearing level ( $p < 0.01$ ) (Table 1). Succinate was significantly higher in off-bottom oyster (Fig. 5c).

The ATP content changed significantly with both sampling date ( $p < 0.0001$ ) and the rearing level ( $p < 0.0001$ ) (Table 1). The level of ATP decreased significantly from the 9-April to 1-July in oyster reared at 10 cm off the bottom and the mean level of ATP was lower in oyster reared at 10 cm off the bottom. On 19-July, the ATP content in on bottom oyster increased close to those in the 60 cm off bottom oysters (Fig. 5d).

PK was inversely correlated with alanine concentration in oysters at 10 cm. For the oysters reared at 10 cm off the bottom the relationship between alanine and PK activity was significant, the Pearson correlation coefficient was  $r = -0.510$  ( $df = 17$ ,  $p < 0.05$ ).

Aspartate content was highly correlated to ATP, the Pearson correlation coefficient was  $r = 0.77$  ( $df = 17$ ,  $p < 0.05$ ).



## 4 Discussion

### 4.1 Effect of temporal changes

Summer mortalities of oyster occur most often when temperatures reach 19 °C for the first time during the reproductive process of oysters (Soletchnik et al. 2006). In our experiment, the episode of mortality coincided with the temperature reaching 19 °C and with a weight loss of oysters. One hypothesis to explain the weight loss of oysters would be the mortality of large ripe oysters. Alternatively, it could be represent a spawning episode.

Limited glycogen content has often been associated with mortality events (Mori 1979; Perdue et al. 1981). Mori et al. (1965) and Mori (1979) linked oyster mortality event at eutrophic environment considering that low carbohydrate content and high gonad development are combined factors increasing the mortality risk. In the present study, mortality occurred in early June when carbohydrate content was still high in the oysters of both rearing levels. Protein content of the oysters decreased during the first two months (April–May) but recovered later in the year. Glycogen stores increased until April. The mortality occurring in early June was not linked to low carbohydrate content. The decrease of carbohydrate in the oyster tissues corresponded to the mobilization of glycogen during the vitellogenesis process (Berthelin et al. 2000) and muscle needs (Dunphy et al. 2006). Significant changes in lipid content were observed but are small compared to drastic increases during gametogenesis observed in another study (Soletchnik et al. 2006).

The PK activity in the oyster *C. gigas* seemed linked to seasonal changes and to the reproductive process. As in some other invertebrates, the oyster *Crassostrea virginica* (Greenway and Storey 1999, 2000), the periwinkle *Littorina littorea* (Greenway and Storey 2001), the horse mussel *Modiolus modiolus* (Lesser and Kruse 2004), the PK activity in *C. gigas* is subjected to season. During the gametogenesis which is held in spring, the PK activity increased; then with the end of this process corresponding to the major spawning in summer, the PK activity decreased. Part of the seasonal effect on the PK activity could be due to temperature by changing the kinetic properties. In summer the affinity of PK for PEP may decrease and the sensitivity to alanine inhibition increase due to the changing isoenzyme pattern of PK (Greenway and Storey 2000). The changes of the PEPCK activity in oyster during this experiment did not seem linked to season. In *Littorina littorea*, changes are tissue specific, Greenway and Storey (2001) observed significant changes of PEPCK enzyme activity only in the digestive gland between winter and summer but not in the foot muscle. So the absence of variations of PEPCK in our study may be related to the mixing of tissues.

The changes of ETS activity along the experimental period resulted of numerous factors. In the oyster *C. gigas*, ETS activity is closely related to temperature (Le Moullac et al. 2007, in press). These relationships were already shown in other bivalves (Madon et al. 1998; Fanslow et al. 2001). Besides the regulation by temperature, ETS is submitted to feeding (Garcia Esquivel et al. 2002) and pH (Simcic and Brancelj 2006).

### 4.2 Effect of the rearing level

Previous studies in the Marennes-Oléron Bay (Charente Maritime, France) have shown a drastic effect of nearness to bottom on oyster survival, growth and glycogen storage (Soletchnik et al. 1999, 2005). In our study, the rearing level induced differences in protein, lipid and carbohydrate contents that were lower in oyster reared at 10 cm than in the oyster reared at 60 cm off the bottom. For protein, the effect of rearing level occurred after the mortality event. But for carbohydrates and lipids, the difference appeared during the first month of experiment while carbohydrates were being stored. Experimentally, Delaporte et al. (2006) have shown that the biochemical composition of oysters was related to the food level. Differences in carbohydrate and lipid storage were also observed in situ according to the sediment nearness (Soletchnik et al. 2005). We therefore suggest that the oyster reared close to the sediment fed less than those reared farther from the sediment. Reduced ingestion could be related either to differences in food availability or to metabolic depression due to noxious compounds diffusing from the sediment in the water column.

From mid May until the end of June corresponding to the reproductive process, the PK activity and the ATP level in the oysters reared close to the bottom were lower than in oyster farther from the sediment. The nearness of the sediment affected the metabolic pathways of energy production involving a differential regulation of PK enzyme. The molecular basis of PK regulation in response to lack of oxygen is well known and similar in many species of marine molluscs (Plaxton and Storey 1984; Simpfendörfer et al. 1997; Storey 1993; Greenway and Storey 2000; Greenway and Storey 2001): phosphorylation of PK reduces its affinity for PEP, reduces its sensitivity to the allosteric activator fructose-1,6-biphosphate (F1,6BP) and greatly enhances enzyme inhibition by alanine. A negative relationship between PK and alanine was observed only in the oysters reared close to the bottom may indicate that PK of these oysters was more sensitive to alanine. When PK activity is inhibited in hypoxia, PEP is converted to oxaloacetate by PEPCK and ultimately in succinate accumulation (de Zwann and Mathieu 1992). In this experiment, the PEPCK activities were not elevated in the oysters close to the bottom and succinate did not accumulate. The oysters reared close to the sediment could have triggered an additional pathway based on the utilisation of aspartate to produce ATP. This pathway of energy production along with carbohydrate can complement a response to oxygen depletion (de Zwann 1983). In a simultaneous carbohydrate and aspartate degradation, all metabolic pathways show specific alteration leading to a low ATP production. This metabolic situation should be transitory since it is an immediate response to oxygen depletion (de Zwann and Mathieu 1992). In the present experimentation, this metabolic behavior spanned the whole month of June.

The ETS activity measures the activity of the chain of transport of electrons (Madon et al. 1998; Fanslow et al. 2001). During the present study, the activity of the electron transport system (ETS) was episodically stimulated in oysters reared close to the bottom. And although the oxygen level was not measured, the response of ETS could be due to hypoxic events; hypoxia stimulated ETS activity in the oyster *C. gigas*

(Le Moullac et al. in press). The stimulation of the ETS activity in hypoxic oyster could probably be linked to some up-regulated genes of the respiratory chain as in anoxia tolerant organisms such as the cytochrome c oxidase III and NADH dehydrogenase 3, 4, 5 and 6 were recently identified after 7–10 days of hypoxia exposure in *C. gigas* (David et al. 2005). Despite the increase of ETS activity in oyster reared close to the bottom, the ATP level was the lowest.

This study showed that the metabolism of oysters reared close to the sediment was altered involving oysters in a metabolic depression. The energy state (proteins, lipids, carbohydrates, ATP) could suggest that the oysters close to the sediment were fed less but depressed metabolic enzyme activities suggest an oxygen deficiency. According to De Zwann and Mathieu (1992), the reduced PK activity, the absence of PEPCK activity stimulation and the utilization of aspartate represent a transition stage to anaerobiosis. An alternate pathway of energy production based on the use of the aspartate as fuel would be established resulting in a low ATP production. Oxygen and the sedimentary compounds like ammonium and sulphides were not measured, however each separately or in combination can be involved in depression of metabolism.

**Acknowledgements.** This work was supported by the *Morest* national project funded by Ifremer, the *Régions de Basse Normandie, Bretagne, Pays de Loire and Poitou-Charentes* and the *Conseil Général du Calvados*. Our thanks also to Michel Mathieu, director of the UMR 100, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques marins.

## References

- Berthelin C., Kellner K., Mathieu M., 2000, Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comp. Biochem. Physiol.* 125, 359–369.
- Bligh E.G., Dyer W.J., 1959, A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- 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.
- de Zwann A., 1983, Carbohydrate catabolism in bivalves. In: Hochacka P.W. (Ed.) *The Mollusca* (vol. 1) *Metabolic biochemistry and molecular biomechanics*. Academic Press, NY, pp. 137–175.
- de Zwann A., Cortesi P., van den Thillart G., Roos J., Storey K.B., 1991, Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia tolerant marine molluscs: a biochemical analysis. *Mar. Biol.* 111, 343–351.
- de Zwann A., Mathieu M., 1992, Cellular Biochemistry and endocrinology. In: Gosling E. (Ed.) *The mussel mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 223–293.
- Delaporte M., Soudant P., Lambert C., Moal J., Pouvreau S., Samain J.F., 2006, Impact of food availability on energetic storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254, 571–582.
- Deslous-Paoli J.M., 1980. Contribution à l'étude de la biologie de l'huître *C.gigas* Thunberg dans le bassin et les claires de Marennes-Oléron. Thèse de 3ème cycle, Université d'Aix-Marseille II.
- Diaz R.J., Rosenberg R., 1995, Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Ocean. Mar. Biol.: Annual Review* 33, 245–303.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Dunphy B.J., Wells R.M.G., Jeffs A.G., 2006, Oxygen consumption and enzyme activity of the subtidal flat oyster (*Ostrea chilensis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): responses to temperature and starvation. *NZ J. Mar. Freshwater Res.* 40, 149–158.
- Encomio V.G., 1998, Respiratory and metabolic response to sulfide and hypoxia in the marine echiuran worm, *Urechis caupo*. San Francisco University, PhD Thesis.
- Fanslow D.L., Nalepa T.F., Johengen T.H., 2001, Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, lake Huron. *Hydrobiologia* 448, 61–70.
- Gagnaire B., Soletchnik P., Madec P., Geairon P., Le Moine O., Renault T., 2006, Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oléron Basin, France; Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 254, 606–616.
- Garcia-Esquivel Z., Bricelj V.M., Gonzalez-Gomez M.A., 2001, Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 263, 77–103.
- Garcia-Esquivel Z., Bricelj V.M., Felbeck H., 2002, Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 133A, 63–77.
- Gouilletquer P., Soletchnik P., Le Moine O., Razet D., Geairon P., Faury N., Taillade S., 1998, Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). *Cons. int. Explor. Mer.* CM 1998 / CC 14.
- Greenway S.C., Storey K.B., 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 S.C., Storey K.B., 2000, Seasonal change and prolonged anoxia affect the kinetic properties of phosphofructokinase and pyruvate kinase in oysters. *J. Comp. Physiol. B* 170, 285–293.
- Greenway S.C., Storey K.B., 2001, Effects of seasonal change and prolonged anoxia on metabolic enzymes of *Littorina littorea*. *Can. J. Zool.* 79, 907–915.
- Hicks D.W., McMahon R.F., 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.
- Laudien J., Schieck D., Brey T., Portner H.O., Arntz W.E., 2002, Survivorship of juvenile clams *Donax serra* (Bivalvia, Donacidae) exposed to severe hypoxia and hydrogen sulphide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 271, 9–23.
- 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.

- Le Moullac G., Quéau I., Le Souchu P., Pouvreau S., Moal J., Le Coz J.R., Samain J.F., 2007, Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature. *Mar. Biol. Res.* in press.
- Lesser M.P., Kruse V.A., 2004, Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 137A, 495-504.
- Lowry O.H., Rosenbrough N., Farr A.L., Randall R.J., 1951, Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Madon S.P., Schneider D., Stoeckel J.A., 1998, In situ estimation of zebra mussel metabolic rates using the electron transport system (ETS) assay. *J. Shellfish Res.* 17, 195-203.
- 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). *Comp. Biochem. Physiol.*, 93B, 307-316.
- Mollering H., 1985, L-Aspartate and L-asparagine. In: Bergmeyer H.U. (Ed.) *Methods in Enzymatic Analysis*. 8 N° 3. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 350-357.
- Mori K., Tamate H., Imai T., Itikawa O., 1965, Changes in the metabolism of lipids and glycogen of the oyster during the stages of sexual maturation and spawning. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* 25, 65-88.
- Mori K., 1979, Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53, 361-369.
- Owens T.G., King F.D., 1975, The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.* 30, 27-36.
- Perdue J.A., Beattie J.H., Chew K.K., 1981, Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *J. Shellfish Res.* 1, 9-16.
- Plaxton W.C., Storey K.B., 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.
- Samain J.F., Dégremont L., Soletchnik P., Haure J., Bédier E., Ropert M., Moal J., Huvet A., Bacca H., Van Wormhoudt A., et al., 2007, Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227-243.
- Simcic T., Brandcelj A., 2006, Effects of pH on electron transport system (ETS) activity and oxygen consumption in *Gammarus fossarum*, *Asellus aquaticus* and *Niphargus sphagnicolus*. *Freshwater Biol.* 51, 686-694.
- Shick J.M., Gnaiger E., Widdows J., Bayne B.L., 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 R.W., Vial M.V., Monsalve A., 1997, The adductor muscle pyruvate kinase from the intertidal bivalve *Mytilus chilensis* (Hupé): evidence of the presence of a 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.
- Soletchnik P., Le Moine O., Faury N., Razet D., Geairon P., Goulletquer P., 1999, Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oléron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquat. Living Resour.* 12, 131-143.
- Soletchnik P., Lambert C., Costil K., 2005, Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J. Shellfish Res.* 24, 197-207.
- Soletchnik P., Faury N., Goulletquer P., 2006, Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). *Aquaculture* 252, 328-338.
- Storey K.B., 1993, Molecular mechanism of metabolic arrest in molluscs. In: Hochachka P.W., Lutz P.L., Sick T., Rosenthal M., van den Thillart G. (Eds.) *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. CRC Press; Boca Raton; pp. 253-269.
- Vismann B., 1991, Sulfide tolerance: Physiological mechanisms and ecological implications. *Ophelia* 34, 1-27.
- Williamson D.H., 1974, Determination with alanine dehydrogenase. In: Bergmeyer H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 2. Academic Press, New York, pp.1679-1682.

## 2.3 Conclusion

Les mortalités observées au cours de cette expérimentation ont toutes les caractéristiques du syndrome des mortalités estivales : la température atteint et dépasse 19°C et la perte de poids enregistrée pourrait correspondre soit à une émission de gamètes soit à la mortalité de grosses huîtres matures. Cependant ces mortalités ne sont pas associées à un déficit des réserves énergétiques puisque le contenu glucidique est encore élevé au moment des mortalités.

L'effet du niveau d'élevage sur l'état des réserves glucidiques et l'accumulation de lipides est apparu rapidement. Ces différences pourraient être la conséquence d'une réduction de l'ingestion par les huîtres élevées près du sédiment sous l'effet d'un déficit trophique ou d'une dépression métabolique répondant à des eaux de mauvaise qualité. La proximité du sédiment affecte les voies métaboliques de production d'énergie impliquant une régulation différentielle de l'activité de la PK. La sensibilité de la PK à l'alanine chez les huîtres élevées proches du sédiment est l'indice d'une phosphorylation de la PK qui se produit sous l'effet d'un déficit en oxygène. Les changements de l'activité PK semblent fortement liés au processus reproductif. L'activité de la PK augmente pendant la gamétogenèse puis baisse lorsque le processus reproductif est révolu. L'absence d'induction de l'activité de la PEPCCK indique que la voie alternative de production d'énergie par l'utilisation des glucides n'est pas activée. Certains indices suggèrent que les huîtres ont déclenché une voie complémentaire de production d'énergie basée sur l'utilisation de l'aspartate pour produire de l'ATP. Cette voie de production d'énergie simultanée à celle des glucides permet de pallier à un déficit en oxygène (de Zwann 1983, De Zwann et Mathieu, 1992). Ces voies de dégradation simultanées des glucides et de l'aspartate conduisent malgré tout à une faible production d'ATP. Cette situation métabolique devrait être transitoire puisque selon de Zwann and Mathieu (1992) c'est une réponse immédiate à un déficit en oxygène. Dans notre expérimentation, cette situation a perduré tout le mois de juin.

L'activité ETS de la chaîne respiratoire a été stimulée épisodiquement chez les huîtres élevées près du sédiment. Bien que l'oxygène n'ait pas été mesuré, la stimulation de l'activité ETS pourrait être une réponse à un ou plusieurs épisodes hypoxiques. Il a en effet déjà été montré chez l'huître *C. gigas* une surrégulation de certains gènes de la chaîne respiratoire comme la cytochrome c oxidase III et les NADH dehydrogenase 3, 4, 5 and 6 lors d'expositions prolongées à l'hypoxie (David et al. 2005).

Cette étude a montré que le métabolisme des huîtres élevées près du sédiment a été altéré engageant les huîtres dans une dépression métabolique. Un déficit en oxygène et les composés sédimentaires séparément ou en combinaison pourraient avoir provoqué cette dépression métabolique. Cette étude suggère des travaux axés sur l'étude des facteurs environnementaux en milieu contrôlé afin de décomposer les effets d'un déficit en oxygène ou des sulfures sur le métabolisme des huîtres.

---

## Partie 3. L'hypoxie

---

### 3.1 Introduction

Nous avons vu précédemment (article 1) que la proximité du sédiment entraîne un déficit énergétique : le taux de glucides est plus faible mais suffisant pour un rendement énergétique moins bon car le stock d'ATP est plus faible. Les huîtres élevées près du sédiment semblent subir un stress respiratoire qui se manifeste au plan métabolique. La proximité du sédiment a eu pour effet de limiter la mise en réserve des glucides au début de l'expérimentation, puis pendant la gamétogenèse un déficit énergétique apparaît. Un déficit en oxygène et/ou les composés relargués du sédiment pourraient avoir provoqué une dépression métabolique. L'hypothèse d'un déficit en oxygène posée, il convient d'en préciser l'impact sur l'équilibre énergétique des huîtres. Une des traductions expérimentales de cette hypothèse devient une étude des effets de l'hypoxie pour définir les différents niveaux de réponse de l'organisme au gène par des approches multiples de l'éthologie à la régulation des gènes. La prise en compte de la température comme facteur supplémentaire peut fournir des informations sur l'impact des changements saisonniers qui ont été révélés dans la partie précédente.

L'information sur le comportement valvaire des bivalves est potentiellement un outil important pour le contrôle biologique de la qualité des eaux (Borcherding, 2006) et apparaît essentiel pour comprendre les choix métaboliques. De nombreux travaux ont montré que le comportement valvaire des bivalves d'eau douce et marins est perturbé par le cadmium, le cuivre, l'uranium (Curtis et al, 2000, Tran et al, 2003, 2005) et en hypoxie (Tran et al, 2005).

La tolérance des bivalves aux faibles niveaux d'oxygène est basée sur un mécanisme de pompage de l'eau permettant le maintien de la consommation d'oxygène. Ce mécanisme est fonctionnel tant que le seuil hypoxique n'est pas atteint et au dessous duquel l'organisme ne peut maintenir sa consommation d'oxygène. Le concept du point critique d'oxygène ( $P_{cO_2}$ ) permet de déterminer le seuil d'oxygène dissous au-dessous duquel un organisme ne peut maintenir sa consommation d'oxygène constante (Grieshaber et al. 1988). Ce concept inclut

des changements métaboliques vers les voies anaérobies de production d'énergie (Pörtner & Grieshaber 1993).

Le bilan résulte de l'équilibre entre l'assimilation et la consommation d'oxygène. Il devient important de préciser le rôle d'un déficit en oxygène sur l'équilibre énergétique des huîtres et les orientations métaboliques. Dans cette section, nous présentons les résultats précisant les voies métaboliques caractérisées par la mesure des activités de la PK et de la PEPCCK ainsi que l'accumulation de succinate et d'alanine. La charge énergétique adénylique et l'activité du système de transport d'électron sont mesurées. Une première expérimentation est réalisée pour caractériser le comportement respiratoire de l'huître *C. gigas* en relation avec le niveau d'oxygène dissous à différentes températures. Dans le cas d'un comportement régulateur, quelle est la valeur de la pression critique en oxygène, cette valeur est-elle liée à la température ?

Les niveaux de régulation des enzymes contrôlant les voies métaboliques PK et PEPCCK sont déterminés par la mesure de l'expression des gènes et des activités enzymatiques. Cette connaissance permet le niveau d'adaptation au stress. Pour atteindre cet objectif, les cDNAs de la PK et de la PEPCCK sont clonés et séquencés pour dessiner des amorces qui permettront de réaliser une mesure quantitative de l'expression de ces gènes. L'analyse des séquences fournit des informations sur les spécificités fonctionnelles. La détermination de l'origine cellulaire de la PEPCCK informera sur la capacité d'induction de cette enzyme puisque selon les espèces le modèle isoenzymatique est constitué de 1 ou de 2 isoformes localisées dans le cytosol et les mitochondries. Seule la forme cytosolique est inductible. Enfin, l'analyse des réponses tissulaires permet de cibler le tissu possédant les niveaux d'expression et d'activité les plus élevés.



Pour aborder ces multiples approches, 3 séries expérimentales sont réalisées pour tester l'effet de l'hypoxie à 3 températures différentes : en janvier (12°C), en juin (20°C) et en octobre (15°C). La valeur de la concentration en oxygène est fixée à 2mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> représentant la valeur de l'hypoxie (Diaz et Rosenberg, 1995). La durée de chaque expérimentation est fixée à 3 semaines pendant laquelle le niveau d'oxygénation est maintenu constant. Le matériel biologique est constitué de lot d'huîtres de 2 origines :

- le lot utilisé en janvier pour l'expérimentation à 12°C a été fourni par un ostréiculteur de l'Aber Benoît. Les huîtres de ce lot sont âgées de 18 mois.

- Les lots utilisés en juin et en octobre sont âgés de 12 mois en juin et de 17 mois en octobre. Ces huîtres ont été produites en écloserie à la Station de La Tremblade, puis ont été prégrossies à la station de Bouin.
- Une partie du lot a été placée à Fort Espagnol (La Trinité sur mer) pour accélérer la croissance et favoriser la gamétogenèse puis rapatrié à Argenton pour l'expérimentation de juin.
- Une autre partie a été placée à l'Aber Wrach pour être à l'abri des mortalités estivales pour le testage en octobre à Argenton.

## 3.2 Résultats

### 3.2.1 Adaptation du comportement valvaire et énergétique de l'huître *Crassostrea gigas* soumise à l'hypoxie en relation avec la température

Cette partie est consacrée à l'étude des effets de l'hypoxie sur le comportement valvaire et les paramètres écophysologiques. Cette approche écophysologique permet d'établir un bilan énergétique (Scope for Growth) populationnel à partir des mesures d'ingestion, d'assimilation et de respiration. La gestion des réserves énergétiques est déterminée par la mesure des constituants biochimiques protéines, lipides et glucides.

L'information sur le comportement valvaire des bivalves est potentiellement un outil important pour le contrôle biologique de la qualité des eaux (Borcherding, 2006) et apparaît essentiel pour comprendre les choix métaboliques. De nombreux travaux ont montré que le comportement valvaire des bivalves d'eau douce et marins est perturbé par le cadmium, le cuivre, l'uranium (Curtis et al, 2000, Tran et al, 2003, 2005) et en hypoxie (Tran et al, 2005).

Pour chacune de ces expérimentations, nous recueillons les données valvométriques fournies par 2 valvomètres sur chacun desquels 8 huîtres sont collées. Une approche écophysologique permet d'établir un bilan énergétique (Scope for Growth) populationnel à partir des mesures d'ingestion, d'assimilation et de respiration des lots expérimentaux. La gestion des réserves énergétiques est déterminée par la mesure des constituants biochimiques protéines, lipides et glucides.

## Matériel et méthodes

### *La valvométrie*

Les valvomètres de conception assez ancienne (Micrel, Hennebont, Morbihan) ont été prêtés par les stations Ifremer de La Tremblade et de la Trinité sur mer. Ces valvomètres entièrement autonomes fonctionnant avec des piles au lithium sont programmés à partir du logiciel

WINMEMO. La configuration du valvomètre est établie à l'aide d'un crayon infra rouge connecté à l'ordinateur et que l'on pose au centre du valvomètre. Ce crayon permet aussi de décharger les données dans l'ordinateur.

Le valvomètre est un disque en PVC où sont fixées 8 huîtres sur le pourtour avec une pâte durcissante (Patex), De son centre, 8 lames horizontales en PVC partent d'un récepteur, et arrivent sur la valve supérieure des huîtres, au niveau de l'extrémité opposée à la charnière. Un pointeau en vinyle réglable permet de régler la position du capteur lorsque l'huître est fermée. Lors de l'ouverture de l'huître, le pointeau soulève la lame de PVC. L'écart entre la tige et le récepteur central augmente. Un électro-aimant situé dans ce récepteur transforme l'écart en signal électrique.

Ces signaux sont stockés dans la mémoire du récepteur. Leur récupération est possible par ordinateur grâce au logiciel WINMEMO, et au crayon à infrarouge. Les données recueillies expriment l'ouverture de chaque huître à chaque enregistrement, le pas d'échantillonnage est fixé à 3 minutes. Les données standardisées sont traitées pour obtenir une ouverture moyenne des 8 huîtres fixées sur le valvomètre.

L'ouverture moyenne est analysée selon l'angle d'ouverture. En effet, la hauteur, contrairement à l'angle est fonction de la position du pointeau sur l'animal, et de la longueur de celui-ci. Pour éliminer ce biais, on assimile l'huître à un triangle rectangle. On peut alors calculer :  $\sin(\alpha) = H/L$

$\alpha$  : angle d'ouverture

L : distance entre la charnière et le pointeau positionné sur la valve supérieure de l'huître

H : valeur de l'ouverture de l'huître au niveau du pointeau

On a alors l'angle d'ouverture :  $\alpha = (\sin^{-1}(H/L) \times 180) / \pi$ , en degrés.

### *Le dispositif expérimental écophysiological*

Les expérimentations sont réalisées dans une salle expérimentale équipée de 8 bacs alimentés en eau de mer filtrée à 5  $\mu\text{m}$  et en algues à partir des réservoirs remplis chaque jour. Le renouvellement d'eau de mer et l'apport d'algues sont régulés à l'aide de débitmètres. Les algues circulent en permanence dans un circuit en boucle entre le réservoir et la salle expérimentale. L'hypoxie est créée par un barbotage d'azote gazeux dans l'eau de mer d'arrivée à l'entrée de chaque bac. Le débit d'azote est ajusté au niveau du détendeur et contrôlé à l'aide d'un débit mètre au niveau de chaque bac (Figure 11).

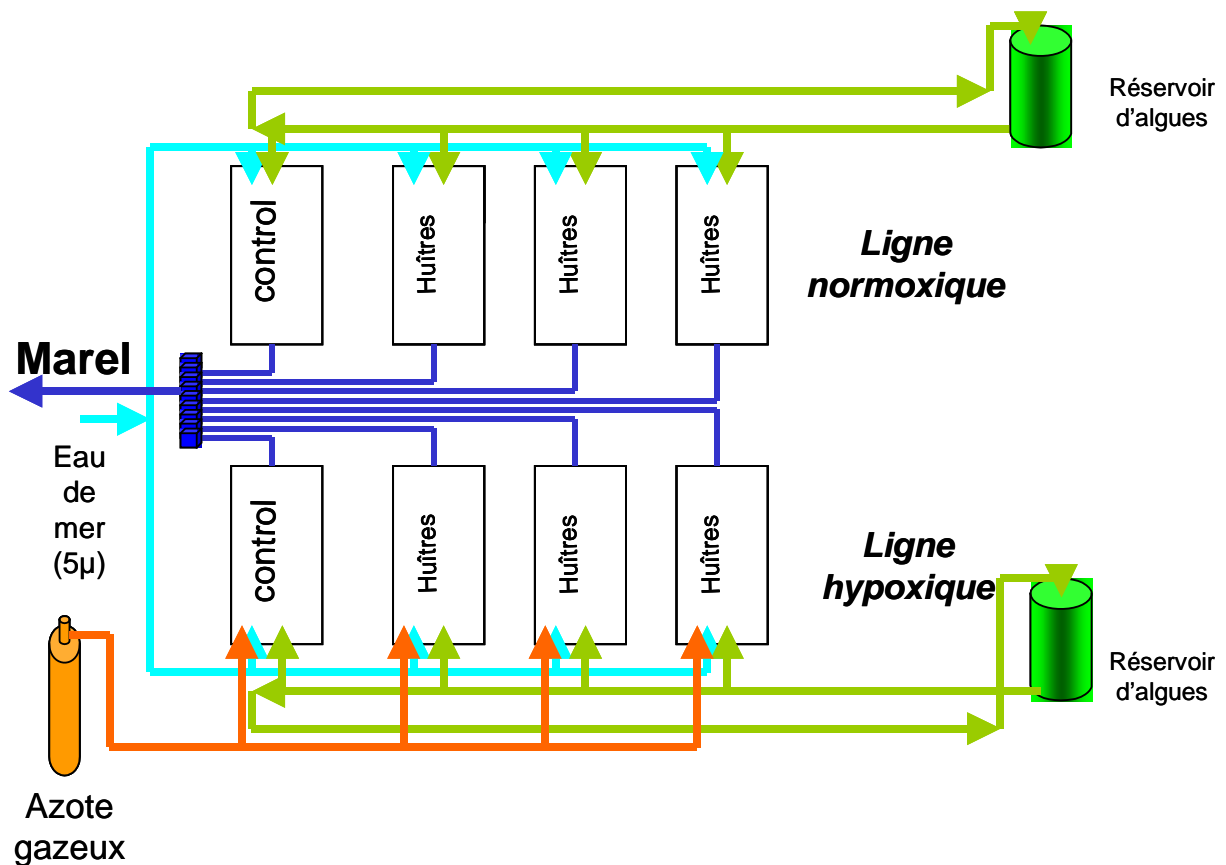


Figure 11 : Dispositif expérimental de conditionnement des huîtres en normoxie et en hypoxie

L'expérimentation écophysiological en grand volume présente des contraintes pour ne pas sous-estimer la mesure de consommation d'oxygène des huîtres en normoxie et aussi pour éviter la reprise d'oxygène dans les bacs en hypoxie. Pour cela il faut bloquer l'interface air-

eau avec des plaques flottantes en PVC cellulaire (Komacell) afin de préserver le milieu d'une reprise d'oxygène. Dans ce cas il convient d'employer des pompes immergées (maxi jet 500 watts) pour homogénéiser le milieu afin de ne pas créer de gradient de concentration en oxygène ou en phytoplancton, d'un bout à un autre du bac. Les conditions deviennent alors correctes pour préserver le niveau d'hypoxie, puisque les plaques flottantes évitent la reprise d'oxygène et mesurer aussi une respiration sous hypoxie.

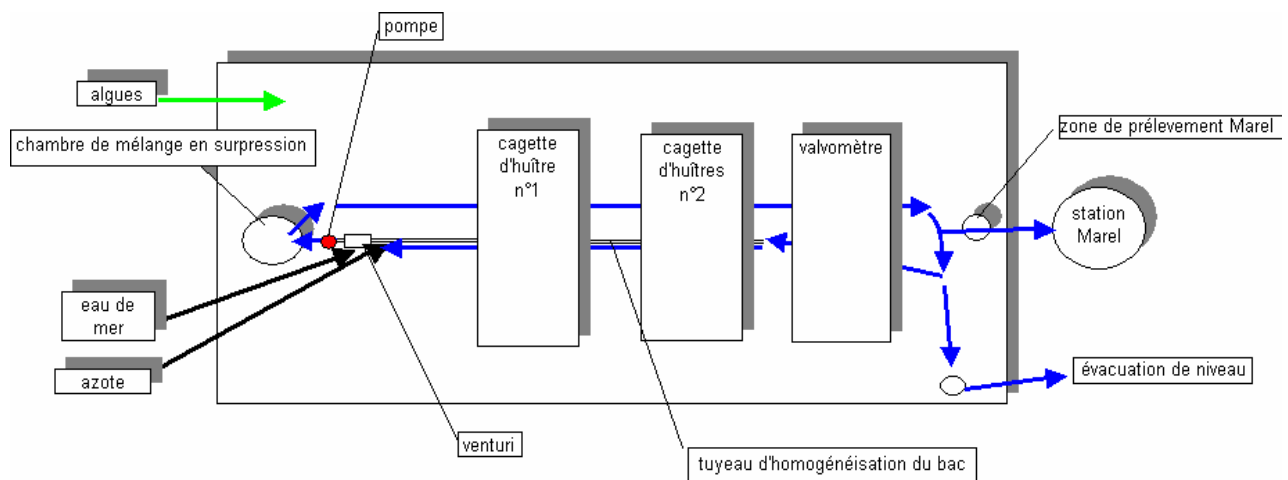


Figure 12 : Disposition des éléments d'un bac expérimental.

Différents paramètres physico-chimiques peuvent être mesurés pour chaque bac grâce à l'automate Marel (Blain et al, 2004). Un bac est analysé toutes les 20 minutes, en 3 étapes. Pendant les 15 premières minutes, l'eau du bac est prélevée, les capteurs sont désinfectés au chlore, ensuite, pendant 3 minutes, les capteurs sont rincés, enfin, l'analyse de l'eau s'effectue pendant la dernière minute, par passage successif au niveau de chaque capteur. Pour chaque paramètre, 5 mesures sont effectuées. L'ordinateur n'en retient que 3, dont il fait la moyenne. Ces données sont disponibles sur l'intranet d'Ifremer. Chaque bac est analysé toutes les 2h40. Ces paramètres disponibles sont la température (°C), la salinité (‰), la concentration en oxygène (mg O<sub>2</sub>/L) corrigée de la salinité, la fluorescence (FFU) associée à la concentration en chlorophylle a des algues, le pH et la turbidité (NTU).

L'ingestion des algues, l'efficacité d'assimilation et la consommation d'oxygène sont les paramètres du bilan énergétiques. Les mesures de consommation d'oxygène (RR) et d'algues (IR) sont déduites de la différence entre les bacs expérimentaux avec des huîtres et les bacs témoins.

$$OC = [(O_2 \text{ témoin} - O_2 \text{ huîtres}) \times FR]/PH.$$

$$IR = [(Chl. \text{ témoin} - Chl. \text{ huîtres}) \times FR]/PH$$

IR : vitesse d'ingestion (cellules d'algues  $h^{-1} g^{-1}$ )

Chl : cellules d'algues (cellules  $mL^{-1}$ )

OC : Consommation d'oxygène ( $mg O_2 h^{-1} g^{-1}$ )

$O_2$  : niveau d'oxygène ( $mg O_2 L^{-1}$ )

FR : renouvellement ( $L h^{-1}$ )

PH : poids humide (g de chair égouttée)

L'efficacité d'assimilation est obtenue par l'analyse des biodépôts. Le système d'homogénéisation du milieu génère un courant dans le bac qui finit par piéger les biodépôts dans un endroit précis du bac. Les biodépôts sont alors récupérés dans le fond des bacs par aspiration dans un flacon d'Erlenmeyer branché à une pompe électrique aspirante. Les biodépôts sont centrifugés 15 min à 4500 t/min. Le surnageant est jeté. Le culot est lavé 2 fois à l'acétate d'ammonium par centrifugation 15 min à 4500 t/min. Le culot est déposé dans une coupelle en aluminium prépesée et séché pendant 48 heures à 60°C. Le poids est noté. Puis les biodépôts secs sont brûlés au four à 450°C pendant 4 heures. Le poids est noté. La matière organique est calculée par la différence entre le poids sec et le poids brûlé des biodépôts.

L'efficacité d'absorption (AE, %) est alors obtenue selon l'équation de Conover (1966) par le rapport du % de matière organique (OC : organic content) de chaque échantillon sur le % de matière organique des algues apportées, en considérant la matière minérale comme un traceur.

$$AE = (OC_{\text{algues}} - OC_{\text{biodépôts}}) / ((1 - OC_{\text{biodépôts}}) \times OC_{\text{algues}})$$

Le bilan énergétique ou Scope for Growth (SFG) résulte de l'équation suivante :

$$SFG = (IR \times AE) - RR$$

Le SFG est exprimé en joules aussi les valeurs de consommation d'oxygène sont corrigés en joules par des facteur de correction (O<sub>2</sub> respiré : 13,8 J.mg O<sub>2</sub><sup>-1</sup> (Winberg, 1960), *Chaetoceros calcitrans* 12,7 J.mg PS<sup>-1</sup> (Whyte, 1987) *T isochrysis* aff. *Galbana* 19,8 J.mg PS<sup>-1</sup> (Whyte, 1987)).

### ***Les constituants biochimiques***

A chaque échantillonnage, les chairs des huîtres entières sont extraites et des pools de 5 huîtres sont constitués. Ces pools sont congelés et stockés dans l'azote liquide pour les analyses ultérieures. Avant les analyses, les échantillons sont broyés congelés sous azote liquide avec un broyeur à bille Danguomeau. Les lipides totaux, les protéines et les glucides totaux sont obtenus à partir d'un homogénat de 600 mg de poudre de chair congelée dans 3 mL d'eau distillée. Puis divisé en 3 aliquotes : 200 µL pour les glucides, 200 µL pour les protéines, et 400 µL pour les lipides totaux. Les lipides totaux sont estimés selon la méthode de Bligh & Dyer (1959) après extraction des lipides par un mélange de dichlorométhane/éthanol/eau. L'extrait lipidique est placé dans une coupelle en téflon prépesée, évaporé sous azote et les lipides totaux sont estimés par la différence de poids de la coupelle en téflon avant et après évaporation. Les dosages des glucides et des protéines sont réalisés selon les méthodes colorimétriques de Dubois *et al.* (1956) et Lowry *et al.* (1951), respectivement. Les résultats sont exprimés en mg de glucides, de lipides et de protéines par gramme de poids frais.

### ***Les analyses statistiques***

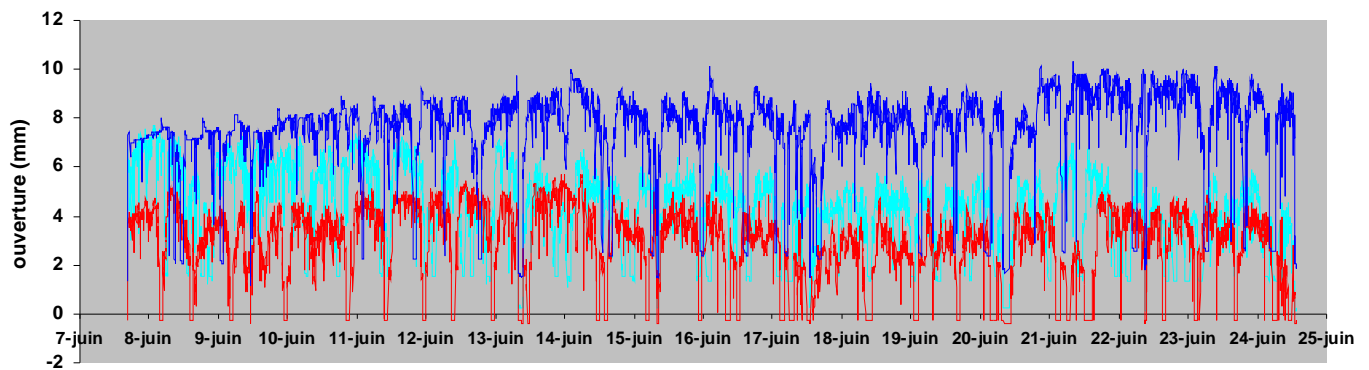
Les données de valvométrie sont des séries temporelles. Ces données sont analysées dans le but de déterminer l'ouverture moyenne selon la température et le niveau d'oxygène par une ANOVA à 2 facteurs : température × oxygène. L'analyse des rythmes d'ouverture est réalisée par une analyse spectrale qui est une méthode dérivée de la transformation de Fourier à l'aide du module XLSTAT installé dans le tableur MS Excel. La densité spectrale représente l'échelle des fréquences. L'échelle des périodes est une unité temporelle.

Les données de bioénergétique sont analysées par une ANOVA à 2 facteurs. Le test post hoc est un test de Student. Les valeurs des protéines, glucides et lipides sont comparées par un test de Student. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Statview (SAS).

## Résultats

### *La valvométrie*

Les 2 valvomètres utilisés identiques dans leur conception n'ont pas les mêmes capacités de mémoire. La faible capacité de la mémoire du valvomètre utilisé en hypoxie explique les blancs dans l'acquisition des données. Les rythmes d'activité valvaire des huîtres enregistrés pendant 20 jours sont perceptibles sur la Figure 1. En normoxie, on perçoit aisément plusieurs niveaux de rythmes d'activité (Figure 13-haut) alors qu'en hypoxie ces niveaux de rythmes semblent moins faciles à déceler (Figure 13-bas).





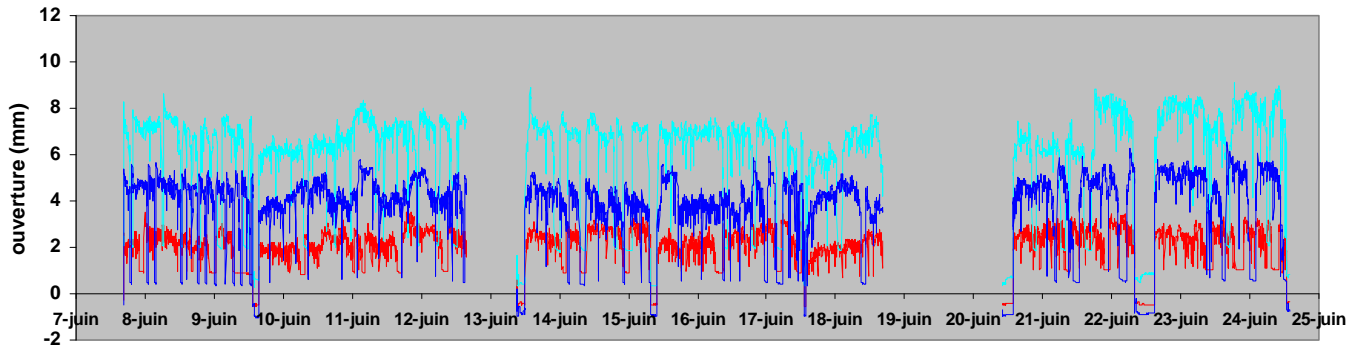


Figure 13 Exemples d'enregistrements valvométriques continu à 20°C représentatifs du comportement en normoxie (haut) et en hypoxie (bas).

### *Analyse des cycles d'ouvertures*

L'analyse spectrale permet de révéler les cycles d'activité des huîtres en normoxie (Figure 14a) et en hypoxie (Figure 14b). L'observation des spectres proposés permet de déceler les périodes des différents rythmes représentés par les pics de chaque spectre.

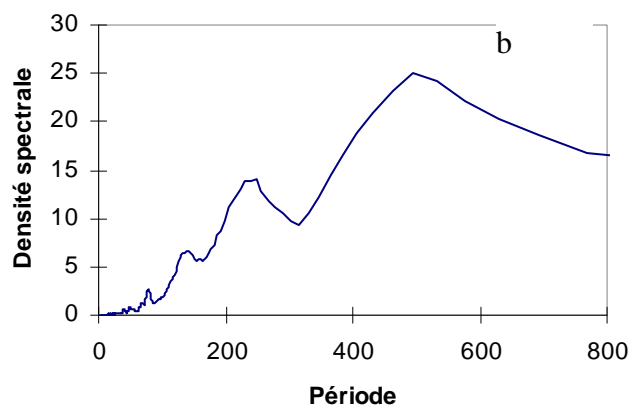
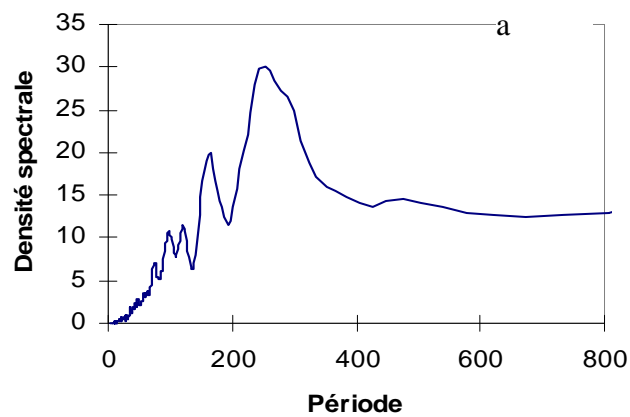


Figure 14 : exemples d'analyses spectrales des données valvométriques à 20°C en normoxie (a) en hypoxie (b)

En normoxie et en hypoxie, 5 niveaux de rythmes sont révélés. Ces cycles sont de l'ordre de 12h à 2h30 (Tableau 2). Mais en hypoxie, un rythme d'activité valvaire d'ordre 24h est détecté. Le test non paramétrique de Kolmogorov-Smirnov indique que la distribution des effectifs selon les rythmes en normoxie et en hypoxie n'est pas significativement différentes (D=0.286, P= 0.7904).

Tableau 2 : Valeurs horaires moyennes des différents niveaux de rythmes en normoxie et en hypoxie détectées en analyse spectrale

Période	normoxie	n	hypoxie	n
pic 1		0	24.70±0	7
pic 2	12.91±0.95	8	12.15±0.57	4
pic 3	8.25±0.60	4	8.64±0.69	4
pic 4	6.09±0.36	6	6.35±0.38	5
pic 5	4.76±0.44	7	4.98±0.12	3
pic 6	3.58±0.23	4	3.54±0.33	6
pic 7	2.83±0.04	2	2.64±0.21	4

#### *L'ouverture moyenne des huîtres*

Les valeurs d'ouvertures sont donc exprimées en degré afin de limiter l'impact de la longueur des valves sur l'ouverture. Cette standardisation permet une comparaison de meilleure qualité. Les valeurs moyennes résultent de la moyenne d'ouverture sur 24 heures. Il apparaît donc que la température a un effet significatif sur l'ouverture des huîtres puisque à 12°C, l'ouverture moyenne est significativement inférieure à l'ouverture à 15 et 20°C (F=80.03, P< 0.0001) (Figure 15). L'ouverture des valves des huîtres en hypoxie (Figure 15) est significativement plus faible (F=12.39, P=0.0007). Cependant, une interaction significative (F=7.03, P=0.0015) montre que l'effet hypoxie n'est pas significatif à 12°C.

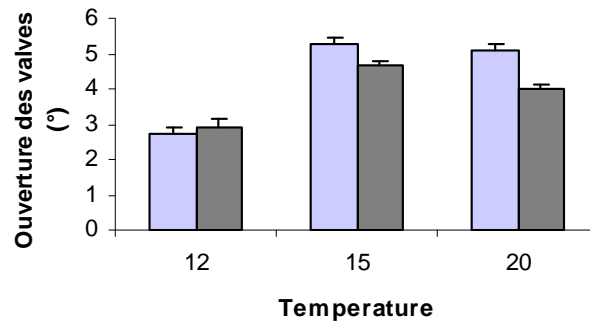


Figure 15 : Effet de la température et de l'hypoxie sur l'ouverture moyenne standardisée des huîtres normoxie (gris), hypoxie (noir).

### *Les bilans énergétiques populationnels*

La vitesse d'ingestion augmente significativement avec la température ( $F=326.58$ ,  $P<0.0001$ ). L'ingestion en normoxie a été de  $1.22 \cdot 10^6 \text{ cell h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ ww}$  à  $12^\circ\text{C}$ , de  $2.25 \cdot 10^6 \text{ cell h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ ww}$  à  $15^\circ\text{C}$  et de  $9.01 \cdot 10^6 \text{ cell h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ ww}$  à  $19^\circ\text{C}$ . Mais l'hypoxie a induit une dépression du métabolisme produisant une baisse significative de la vitesse d'ingestion de 55-60% ( $F=629.99$ ,  $P<0.0001$ ) quelque soit la température (Figure 16a). Les changements de l'efficacité d'assimilation (AE) ne suivent pas le même modèle. Les effets de la température sont négatifs induisant une baisse significative ( $F=10.82$ ,  $P=0.0002$ ). L'hypoxie provoque aussi une baisse significative de l'AE ( $F=19.83$ ,  $P<0.0001$ ) (Figure 16b). La consommation d'oxygène (OC) est fortement dépendante de la température. L'augmentation de l'OC sous l'effet de la température est significative ( $P<5\%$ ) ( $F=328.58$ ,  $P<0.0001$ ). L'hypoxie engendre une baisse significative de 76 to 87% de l'OC ( $F=626.99$ ,  $P<0.0001$ ) (Figure 16c). Le bilan énergétique change avec la température ( $F=15.63$ ,  $P<0.0001$ ) et le niveau d'oxygène ( $F=19.47$ ,  $P<0.001$ ). Une interaction significative souligne le bilan énergétique négatif en normoxie à  $15^\circ\text{C}$  ( $F=22.87$ ,  $P<0.001$ ) (Figure 16d).

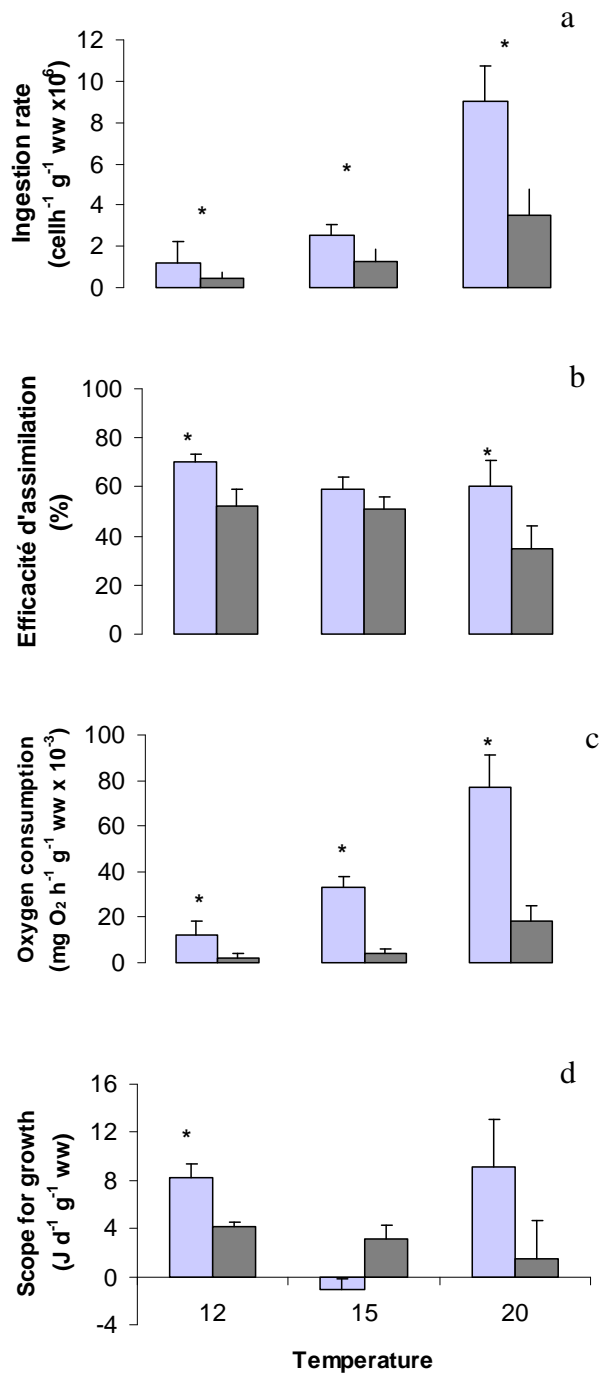


Figure 16 : Les changements bioénergétiques en normoxie (barres grises) et en hypoxie (barres noires) avec la température. (a) Ingestion, (b) efficacité d'assimilation, (c) consommation d'oxygène, (d) bilan énergétique. Moyenne  $\pm$  erreur standard.

### *Les changements biochimiques*

Après 20 jours à 12°C, les contenus protéiques et lipidiques des huîtres en normoxie et en hypoxie augmentent significativement de 60% (P<5%). Mais les huîtres en hypoxie n'accumulent pas de glucides. A 15°C, les lipides et les glucides des huîtres normoxiques s'accumulent significativement. A 20°C, le contenu en glucides des huîtres en hypoxie diminue significativement de 20% (P<5%) (Tableau 3).

Tableau 3: Composition biochimique des huîtres après 20 jours d'hypoxie selon la température (moyenne±erreur standard, n = 5-8)

Température	Conditions	Protéines (mg g <sup>-1</sup> ww)	Lipides (mg g <sup>-1</sup> ww)	Glucides (mg g <sup>-1</sup> ww)
12°C	Initial	70.54±3.31 <sup>b</sup>	17.81±2.19 <sup>a</sup>	16.23±1.50 <sup>b</sup>
	Normoxie	83.49±4.22 <sup>a</sup>	18.55±1.08 <sup>a</sup>	22.56±2.26 <sup>a</sup>
	Hypoxie	79.54±3.67 <sup>b</sup>	19.14±2.60 <sup>a</sup>	11.71±1.53 <sup>b</sup>
15°C	Initial	65.17±2.40 <sup>b</sup>	16.87±1.06 <sup>b</sup>	16.89±1.13 <sup>b</sup>
	Normoxie	71.85±3.30 <sup>ab</sup>	23.98±2.26 <sup>a</sup>	22.03±1.84 <sup>a</sup>
	Hypoxie	73.03±1.48 <sup>a</sup>	20.62±1.91 <sup>b</sup>	17.67±2.04 <sup>b</sup>
20°C	Initial	76.34±2.65 <sup>a</sup>	18.72±1.18 <sup>a</sup>	14.43±0.32 <sup>a</sup>
	Normoxie	78.97±1.74 <sup>a</sup>	22.55±1.21 <sup>a</sup>	16.35±1.66 <sup>a</sup>
	Hypoxie	67.54±1.48 <sup>b</sup>	19.06±1.73 <sup>a</sup>	13.05±1.32 <sup>a</sup>

### *La survie*

Il faut noter qu'aucune mortalité significative n'est survenue pendant la série des 3 expérimentations dans aucun des lots expérimentaux en normoxie et en hypoxie.

## Discussion

### *Le comportement valvaire*

Les rythmes valvaires des bivalves peuvent être corrélés aux rythmes circadiens (Salanki, 1966), tidaux (Morton, 1970) et mensuels (Brown et al., 1956). Chez les espèces vivant en lac ou bassin eutrophe, l'activité valvaire la plus intense a été détectée la nuit (McCorkle et al., 1979, Englund et Heino, 1994). Les huîtres *C. virginica* alimentées en continu restent ouvertes en moyenne 94.3% du temps, tandis que les huîtres à jeun sont ouvertes 35.1% du temps.

Cet aspect du comportement valvaire des huîtres quoique simple à résoudre a permis de montrer l'influence de la température sur l'ouverture. Il apparaît donc clairement qu'à 12°C les huîtres s'ouvrent peu mais il n'apparaît pas de différences d'ouverture entre 15 et 20°C en normoxie malgré des besoins métaboliques nettement supérieur à 20°C.

L'hypoxie a pour effet de réduire l'ouverture moyenne des huîtres à 15 et 20°C mais pas à 12°C. Chez la moule d'eau douce *C. fluminea*, une hypoxie à 4kPa induit un accroissement de l'ouverture valvaire (Tran et al, 2005). En effet à cette pression d'oxygène, ce bivalve hyperventile à la vitesse de 65 mL h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> alors qu'en normoxie la vitesse de filtration est de 16 mL h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (Tran et al, 2000). Le niveau d'hypoxie dans nos expériences était fixé à 2 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.

L'analyse des séries chronologiques des mouvements de valve chez *C. virginica* n'a pas permis de montrer une périodicité de l'activité valvaire (Higgins, 1980). Nos résultats montrent que l'huître *C. gigas* alimentée en continu en normoxie et en hypoxie a différents niveaux de périodes bien caractérisés. L'analyse spectrale est basée sur une méthode dérivée de la transformation de Fourier. Les spectres ont ainsi révélé les différents niveaux d'activité valvaires et leur période. Il est apparu entre 6 et 7 niveaux de rythmes d'activité valvaire des huîtres *C. gigas*. En normoxie il apparaît un rythme périodique de 12h et 5 autres niveaux de

rythme dont les fréquences s'accélèrent. En hypoxie, la différence essentielle révèle un rythme de 24h, puis une désynchronisation des huîtres entre elles car elles présentent des niveaux de rythmes différents.

### ***Le bilan énergétique et biochimique***

La température joue un rôle essentiel sur la croissance et la reproduction via l'énergie absorbée qui est fournie par les microalgues ingérées. L'ingestion est donc fortement modulée par la température mais ce paramètre environnemental dans notre expérience n'exerce pas de régulation sur l'efficacité d'assimilation. Les fonctions ainsi activées utilisent les molécules énergétiques (ATP) dont la formation est dépendante de l'oxygène. On perçoit donc l'importance de la température en été pour l'équilibre énergétique des huîtres. Le bilan énergétique dépend en grande partie de l'efficacité d'assimilation qui relativise l'effet de la température. Le bilan énergétique négatif obtenu à 15°C en normoxie est le résultat d'une consommation d'oxygène élevée. L'hypoxie réduit considérablement l'ingestion des huîtres et l'assimilation diminue significativement de 20% entraînant une baisse de la consommation d'oxygène. Le bilan énergétique est plus faible qu'en normoxie mais reste positif à toutes les températures testées.

Au plan biochimique, l'hypoxie diminue ou stoppe la capacité des huîtres à faire des réserves : les réserves glucidiques ne sont pas réalisées à 12°C et à 15°C. Ceci peut avoir de fâcheuses conséquences sur la capacité de reproduction.

### 3.2.2 Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature (article 2)

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans "Marine Biology Research".





ORIGINAL ARTICLE

## Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature

GILLES LE MOULLAC<sup>1</sup>, ISABELLE QUÉAU<sup>1</sup>, PIERRICK LE SOUCHU<sup>1</sup>,  
STÉPHANE POUVREAU<sup>1</sup>, JEANNE MOAL<sup>2</sup>, JEAN RENÉ LE COZ<sup>2</sup> &  
JEAN FRANÇOIS SAMAIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFREMER, Site Expérimental d'Argenton, Presqu'île du Vivier, 29840 Argenton en Landunvez, France, and <sup>2</sup>UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

### Abstract

The purpose of this study was to examine the responses of the oyster *Crassostrea gigas* to oxygen levels at subcellular and whole organism levels. Two experiments were carried out. The first experiment was designed to measure the clearance and oxygen consumption rates of oysters exposed at different concentrations of oxygen at 15, 20 and 25°C for 20 h. The goal of this first part was to estimate the hypoxic threshold for oysters below which their metabolism shifts towards anaerobiosis, by estimating the oxygen critical point (PcO<sub>2</sub>) at 15, 20 and 25°C. The second experiment was carried out to evaluate the metabolic adaptations to hypoxia for 20 days at three temperatures: 12, 15 and 20°C. The metabolic pathways were characterized by the measurement of the enzymes pyruvate kinase (PK) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), the alanine and succinate content and the adenylate energy charge. Respiratory chain functioning was estimated by the measurement of the activity of the electron transport system (ETS). The values of PcO<sub>2</sub> were 3.02 ± 0.15, 3.43 ± 0.20 and 3.28 ± 0.24 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> at 15, 20 and 25°C, respectively. In whole oysters, hypoxia involved the inhibition of PK whatever the temperature, but PEPCK was not stimulated. Succinate accumulated significantly only at 12°C and alanine at 12 and 15°C. A negative relationship between the PK activity and the alanine content was only found in hypoxic oysters. Finally, hypoxia increased significantly the activity of ETS. With high PcO<sub>2</sub> values, the metabolic depression occurred quickly, showing that oysters had a low capacity to regulate their respiration when oxygen availability is reduced, particularly in the summer.

**Key words:** Alanine, hypoxia, oysters, phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate kinase, succinate, temperature

### Introduction

Important mortality outbreaks have been reported in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) populations on the French coasts over the past 15 years (Gouletquer et al. 1998; Soletchnik et al. 1999). The syndrome is known as summer mortality and is generally associated with temperatures above 20°C and coincides with the period of gonad maturation. Some authors suggest that mortalities occurring in the Pacific oyster are the result of multiple factors, including elevated temperatures, physiological stress associated with gonadal maturation, genetics, aquaculture practices, pathogens and pollutants (Degremont et al. 2005; Labreuche et al. 2006; Samain et

al. 2007). Sediment nearness has been shown to affect both the growth and the survival of oysters (Soletchnik et al. 1999, 2006), and could result from a respiratory stress. Indeed, sediment is often hypoxic, but the highest oxygen demand can be in the water close to the bottom (Diaz & Rosenberg 1995).

Marine molluscs can experience oxygen limitations during immersion in the intertidal zone and during hypoxic periods, on 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

Correspondence: G. Le Moullac, IFREMER, Département d'Aquaculture Tropicale, BP 700 498719 Afaahiti, Tahiti, French Polynesia.  
E-mail: Gilles.Le.Moullac@ifremer.fr

Published in collaboration with the University of Bergen and the Institute of Marine Research, Norway, and the Marine Biological Laboratory, University of Copenhagen, Denmark

(Accepted 6 August 2007; Printed 23 November 2007)

ISSN 1745-1000 print/ISSN 1745-1019 online © 2007 Taylor & Francis  
DOI: 10.1080/17451000701635128

to the tissues, helping to maintain the rate of oxygen consumption (OC). This mechanism remains functional until an oxygen threshold is reached, below which bivalves cannot maintain their rate of OC. This threshold, around  $2 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ , defines the hypoxic threshold (Diaz & Rosenberg 1995; Bricker et al. 1999). The reduction in feeding activity and OC is a commonly observed response to hypoxia in bivalves (Sobral & Widdows 1997; Hicks & McMahon 2002).

Aquatic animals can be subjected to moderate or even severe hypoxia and are characterized by the adaptation of their OC. One distinguishes the oxyregulators from the oxyconformers. The former maintain an OC independent of the dissolved oxygen (DO) concentration (at least until a certain level), whereas in the latter, OC decreases as the oxygen partial pressure of the water declines (Dejours 1981; Pörtner et al. 1985). The basic principles that allow regulators to maintain their oxygen uptake under variable conditions of DO from hyperoxia to hypoxia have been studied in many aquatic invertebrates (Bayne 1971a; Taylor & Brand 1975a,b; Tran et al. 2000). The concept of the critical oxygen point ( $\text{PcO}_2$ ) was introduced to characterize the threshold of DO below which an oxyregulator cannot maintain its rate of oxygen uptake (Grieshaber et al. 1988). This concept includes metabolic changes towards an anaerobic pathway of energy production (Pörtner & Grieshaber 1993).

Hypoxia and anoxia bring about a metabolic depression due to the switch from aerobic to anaerobic energy production leading to a lower ATP yield per unit glucose (Shick et al. 1986; De Zwaan et al. 1991). Metabolic rate depression is a concordant decline in energy supply and energy demand and thus involves the down-regulation of many ATP-dependent cellular processes. This metabolic switch is located at the end of glycolysis at the level of phosphoenolpyruvate (PEP). In aerobic mode, PEP is the substrate of pyruvate kinase (PK) for the production of pyruvate. PEP can also be the substrate of gluconeogenesis, which is essentially rate limited by phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Schein et al. 2004). The metabolic switch from aerobic to anaerobic pathways is controlled by the reversible phosphorylation of PK and allosteric regulation that leads to a reduction in its activity (Storey & Storey 1990; Simpfendorfer et al. 1997). Pyruvate cannot be oxidized so that it is converted into alanine. When this occurs, PEP becomes mainly a substrate for PEPCK, contributing to the formation of succinate (Zammit & Newsholme 1978). Another mechanism

of enzyme control is changes in the amount of enzyme present in tissues via modification of the enzyme turnover. This control used for the long-term metabolic changes of seasonal adjustment could have a role in the adaptation to prolonged hypoxia lasting several days. 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 down-regulations in energy metabolism and up-regulations in respiratory chain (David et al. 2005).

Although the response to hypoxia and anoxia in aquatic invertebrates has been widely studied, there is a lack of information on the hypoxia tolerance of *C. gigas*. The objective of the present study was to determine the sensitivity of oysters to hypoxia with temperature. A first experiment was carried out to characterize the behaviour of *C. gigas* under variable conditions of DO: (1) Is *C. gigas* a regulator or a conformer? If it is a regulator, what is the  $\text{PcO}_2$  value? (2) Is there a relationship between temperature and  $\text{PcO}_2$ ? The second experiment was designed to observe the effect of prolonged hypoxia on cellular functioning. The metabolic pathways were evaluated by assessing PK and PEPCK enzyme activities as well as succinate and alanine accumulation. The adenylate energy charge (AEC) and the activity of the respiratory chain were evaluated by measuring the electron transport system (ETS) activity.

## Material and methods

### *Experiment 1: Effect of DO on clearance rate (CR) and OC*

The oysters were collected in the Aber Wrach (Finistère, France) in August 2005 when the temperature was approximately  $17^\circ\text{C}$ . Before each experiment, the oysters were adapted to the experimental temperature in open flow tanks over a period of 3 weeks and fed with microalgae. Three temperatures were tested: 15, 20 and  $25^\circ\text{C}$ . The algae (*I. galbana*) were injected into sea water to give a concentration of algae of approximately  $50,000 \text{ cells ml}^{-1}$ . The oxygen level was controlled by the injection of nitrogen into sea water. The lowest DO concentration reached was 1.69, 1.27 and  $1.54 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$  at 15, 20 and  $25^\circ\text{C}$ , respectively (Table I). The nitrogen flow was controlled by a flow meter.

*Ecophysiological measurement system.* The laboratory of Argenton is fitted with an ecophysiological system, which allows the simultaneous monitoring of CR ( $\text{l h}^{-1}$ ) and OC ( $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1}$ ) in indivi-

Table I. The dissolved oxygen level tested for each temperature expressed as mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> and the percentage of oxygen saturation in sea water.

15°C		20°C		25°C	
mg O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup>	% saturation	mg O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup>	% saturation	mg O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup>	% saturation
1.69	20	1.27	16	1.54	23
1.99	24	2.00	25	1.93	28
2.47	30	3.02	38	3.03	45
2.85	34	4.08	51	3.60	53
3.43	41	5.09	64	4.90	72
5.00	60	6.16	77	5.80	85
8.34	100	8.00	100	6.80	100

dual open-flow chambers, for seven individuals. Individuals were placed, successively, in one of the seven individual chambers of the system and kept undisturbed in their respective chambers for at least 20 h. The first chamber was kept empty and used as a control. Flow rates (FR) in the individual chambers were constant and equal to 100 ml min<sup>-1</sup>. This value was chosen after a series of tests: the FR had to be low enough to allow us to detect filtration or respiration activity; and had to be high enough to prevent the bivalve from removing too much algae, and to allow us to detect accurately the time of variations in filtration and respiration activity. The out-flowing water of each chamber was analysed for phytoplankton (fluorescence) and oxygen concentrations, which were each recorded for 5 min continuously during 20 h.

CR, an indicator of feeding activity, is defined as the volume of water cleared of suspended particles per unit time. In this study, CR was estimated by using fluorescence recordings. CR was calculated as follows: (C1 - C2) × FR. C1 was the fluorescence level of the control chamber, C2 was the fluorescence of the experimental chamber containing one oyster. FR was the flow rate. The OC rate is defined as the quantity of oxygen consumed by the animal per unit time (mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup>). Differences in the oxygen concentration between reference and experimental chambers can be used to calculate the OC rate, as follows: (O2 - O1) × FR. O1 was the oxygen level of the control chamber, O2 was the oxygen level of the experimental chamber containing one oyster. CR and OC rates were thus calculated and an average was calculated for each animal. In order to compare CR and OC rates on the same basis, it was necessary to correct for weight differences. At the end of each experiment, oysters were freeze dried for 72 h and their dry weight obtained. The physiological rate was then converted to a 'standard' animal of 1 g tissue weight using the following equation: Y<sub>s</sub> = (W<sub>s</sub>/W<sub>e</sub>)<sup>b</sup> × Y<sub>e</sub>, where Y<sub>s</sub> was the physiological rate for an animal of standard weight, W<sub>s</sub> was the standard weight (1 g), W<sub>e</sub> was the observed

weight of the animal (g), Y<sub>e</sub> was the uncorrected (measured) physiological rate, and b was the weight exponent for the physiological rate function. The average b weight exponents are 0.66 and 0.75 for CR and OC, respectively, in bivalves (Savina & Pouvreau 2004).

#### Experiment 2: Effect of prolonged hypoxia

Three experiments were carried out in order to distinguish the differences in responses to hypoxia with temperature. Experiments were conducted in winter, summer and autumn when the sea water temperatures were, respectively, approximately 12, 20 and 15°C. The sites for oyster collection were chosen for their temperature at the time of collection in order to reduce the acclimation duration to the experimental temperature in the laboratory. The oysters came from north Brittany for the experiments during winter and autumn and south Brittany for the summer experiment.

*Experimental design.* The experiments were performed at the Ifremer laboratory in Argenton (Finistère, France). Oysters were placed in 300 l experimental tanks with 20 µm filtered running sea water. The oysters were first adapted for 1 week to the laboratory conditions at the experimental temperatures of 12, 15 and 20°C and fed with an algal diet composed of *Isochrysis* at a daily ration close to saturation level. The microalgae ration was standardized and calculated to supply continuously an algae biomass of 12% of the oyster biomass in dry weight.

Two different conditions were tested for 3 weeks: (1) normoxia, where oysters were kept in oxygen-saturated sea water and fed; (2) hypoxia, where oysters were maintained immersed in hypoxic sea water and fed. Hypoxia was obtained by bubbling nitrogen through the sea water, which allowed the oxygen level to be controlled at 2 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>. Each tank was connected to a system that provided measurements every 2 h 30 min to control DO and chlorophyll levels (Blain et al. 2004).

Sampling was carried out on days 10 and 20 to assess PK, PEPCK, ETS activities and the content of alanine, succinate and the AEC of both normoxic and hypoxic oysters. After each sampling, water renewal and algal distribution were adjusted to maintain the same environmental conditions.

**PK and PEPCK activities.** The activity of PK in oyster tissues was determined as described by Greenway & Storey (1999). Extracts for enzyme assay were prepared using ground up, frozen, pooled tissues. Then, 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 Na<sub>3</sub>F, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA and 15 mM 2-mercaptoethanol. A few crystals of phenylmethylsulphonyl were added immediately prior to homogenization. The homogenates were centrifuged for 20 min at 20,000 *g* at 5°C. Assays were conducted at room temperature (20°C) and initiated by mixing the enzyme preparation (250 µl total microplate well volume) with the homogenate. 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 MgCl<sub>2</sub>, 10 mM phosphoenol pyruvate, 2 mM ADP, 0.15 mM NADH, 0.2% 2 (v/v) rotenone-saturated ethanol, and 1 U ml<sup>-1</sup> lactate dehydrogenase (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 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM inosine disphosphate (IDP), 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.15 mM NADH and 2.5 U ml<sup>-1</sup> malate dehydrogenase (MDH). Blanks were run and subtracted. Changes in NAD(P)H absorbance at 340 nm were monitored using a Biotek microplate reader.

**ETS activity.** ETS activity was determined following the method of Owens & King (1975), where INT-tetrazolium is reduced to the optically active INT-formazan when substituted for oxygen as the terminal electron acceptor. Reagents were freshly made and kept on ice and all assay procedures were carried out in an ice bath. The powdered tissue was removed from liquid nitrogen storage, placed in ETS B solution (75 mg SO<sub>4</sub>, 1.5 mg ml<sup>-1</sup> polyvinylpyrrolidone and 0.2% (v:v) Triton X-100 in 0.1 M phosphate buffer pH 8.5) and sonicated. Then, samples were centrifuged for 15 min (4°C, 3000 *g*). Supernatant (150 µl) was transferred to another tube, to which 400 µl of substrate solution (1.2 mg ml<sup>-1</sup> NADH, 0.2 mg ml<sup>-1</sup> NADPH in ETS B solution) and 250 µl INT solution (2 mg ml<sup>-1</sup> INT-tetrazolium in double distilled water pH 8.5) were added. Samples were incubated for 20 min at room temperature (20°C), after which the reaction was stopped

with 400 µl quench solution (50% formalin, 50% 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). The absorbance of each sample was then measured spectrophotometrically at 490 nm. The absorbance value was corrected using a turbidity blank, which consisted of 150 µl samples, 400 µl ETS B, 250 µl INT solution and 400 µl quench solution. ETS was then calculated using the following equation (Garcia-Esquivel et al. 2001):

$$\text{ETS } \mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g ww}^{-1} = \{ (E_{\text{corr}} \times V_{\text{hom}} \times 60/T \times V_{\text{rxn}}) / (V_{\text{inc}} \times \text{ww} \times 31.8) \}$$

where  $E_{\text{corr}}$  = measured absorbance, corrected with the buffer and reagent blank,  $V_{\text{hom}}$  = volume of the total homogenate (ml), 60 = factor used to express activity/h,  $T$  = time of incubation (min),  $V_{\text{rxn}}$  = final volume in the assay (ml),  $V_{\text{inc}}$  = volume of the homogenate used in the reaction assay (ml),  $\text{ww}$  = wet weight of the sample in the total homogenate (g);  $31.8 E_{490\text{nm}} \text{ cm}^{-1}$ : the molar extinction coefficient of INT-formazan at 490 nm is  $15.9 \text{ mM}_{\text{INT}}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  assuming that two molecules of INT-formazan are formed per molecule of oxygen.

**AEC and metabolite determination.** Metabolites and nucleotides were extracted from 200 mg of the powdered oyster tissue prepared above with 2 ml of trichloro-acetic acid, neutralized with 1.2 ml of amine freon trioctylamine/trifluoro-trichloro-ethane, v:v 1:5). AEC analyses were conducted according to Moal et al. (1989). Extracted nucleotides were analysed by high-performance liquid chromatography on a reverse phase column with a counter-ion (tributylamine). AEC was calculated as follows:  $(\text{ATP} + 0.5 \text{ ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$  (Ivanovici 1980). Alanine was measured enzymatically according to standard procedures as described by Williamson (1974). Succinate was quantified with the succinate determination kit of R-Biopharm Inc. (Marshall, Michigan, USA).

### Statistics

The effect of DO on OC and CR was analysed using a one-way ANOVA. The post hoc protected least squares difference (PLSD) Fisher's test was used to determine which means differed significantly.  $\text{PcO}_2$  was determined as the crossing point of the regression lines of the two slopes of the relationship between the OC and the value of DO, the horizontal segment and the steeply sloping segment (Cochran & Burnett 1996). The  $\text{PcO}_2$  means were then compared 2 to 2 by a Student's *t*-test. Two-way ANOVA with replication was carried out to test for differences in PK activity, PEPCK activity, ETS activity, alanine, succinate and AEC between seasons and oxygen level. Post hoc comparison (PLSD

Fisher) tests were used to determine which means differed significantly. The relationship between the alanine content and the PK activity was tested using the critical value table for Pearson's Correlation Coefficient. Statistical analyses were performed using Statview (SAS).

## Results

### Experiment 1: Effect of DO on CR and OC

The changes in CR and OC corresponded to the decrease in DO. At each temperature, the oysters maintained their CR and OC until a threshold where they fell significantly (Figures 1, 2). This threshold corresponded to a value of DO that expressed the

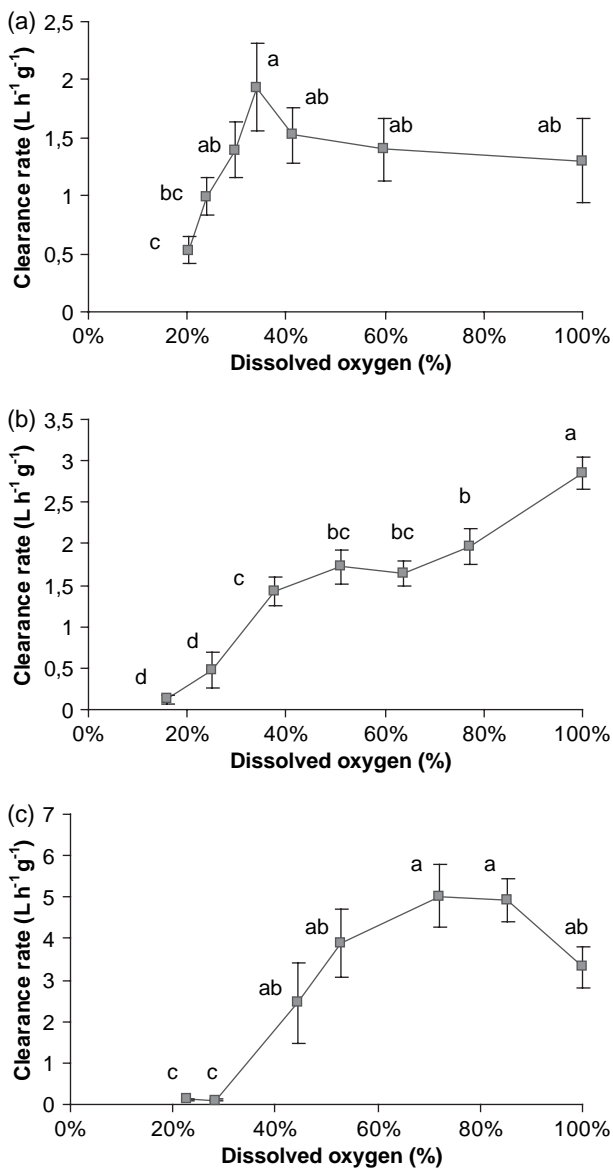


Figure 1. Effect of dissolved oxygen on clearance rate (CR) with temperature: (a) 15°C, (b) 20°C, (c) 25°C (means  $\pm$  standard error, n = 7).

PcO<sub>2</sub>. The PcO<sub>2</sub> occurred at  $3.02 \pm 0.15$ ,  $3.43 \pm 0.20$  and  $3.28 \pm 0.24$  mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> at 15, 20 and 25°C, respectively. At 20°C, the PcO<sub>2</sub> was significantly higher than at 15°C (Table II). When PcO<sub>2</sub> was expressed as the oxygen saturation level, there was a positive relationship with temperature (Table II).

### Experiment 2: Metabolic adjustments with temperature during prolonged hypoxia

*Enzyme activities.* PK activity differed significantly with temperature ( $F = 21.01$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 3a). Fisher's PLSD test revealed that PK activity at 12°C was significantly lower than at 15 and 20°C.

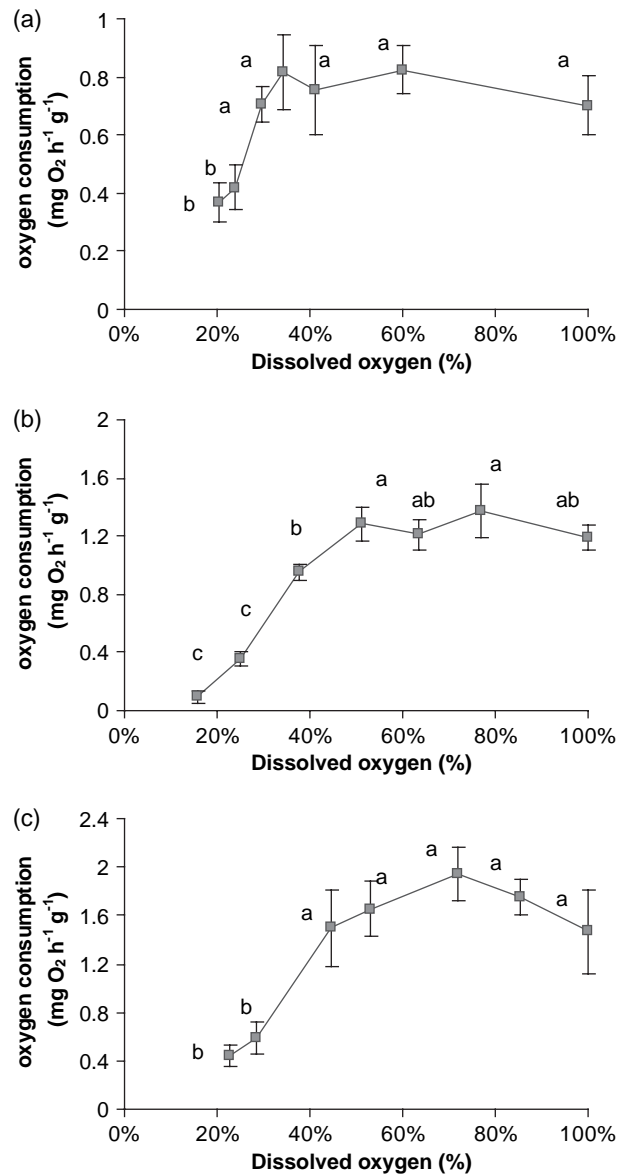


Figure 2. Effect of dissolved oxygen on oxygen consumption (OC) with temperature: (a) 15°C, (b) 20°C, (c) 25°C (means  $\pm$  standard error, n = 7).

Table II. Maximal oxygen consumption (OC max.) and critical oxygen pressure (PcO<sub>2</sub>).

Temperature	OC max. (mg O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	PcO <sub>2</sub> (mg O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	PcO <sub>2</sub> (% saturation)
15°C	0.752 ± 0.047 <sup>c</sup>	3.02 ± 0.15 <sup>b</sup>	36.2
20°C	1.264 ± 0.062 <sup>b</sup>	3.43 ± 0.20 <sup>a</sup>	42.9
25°C	1.666 ± 0.113 <sup>a</sup>	3.28 ± 0.24 <sup>ab</sup>	48.2

a, b, c indicate significant difference at the level of 5% within a column.

PK activities at 15 and 20°C were not significantly different. Hypoxia significantly inhibited PK activity ( $F=21.15$ ,  $P<0.001$ ). PEPCK activity did not change significantly with temperature ( $F=0.98$ , NS) and in hypoxia ( $F=0.22$ , NS). But a significant interaction ( $F=4.18$ ,  $P<0.05$ ) between temperature and oxygen revealed that at 20°C the PEPCK activity in hypoxic oysters was significantly lower than in normoxic oysters (Figure 3b). The ratio of

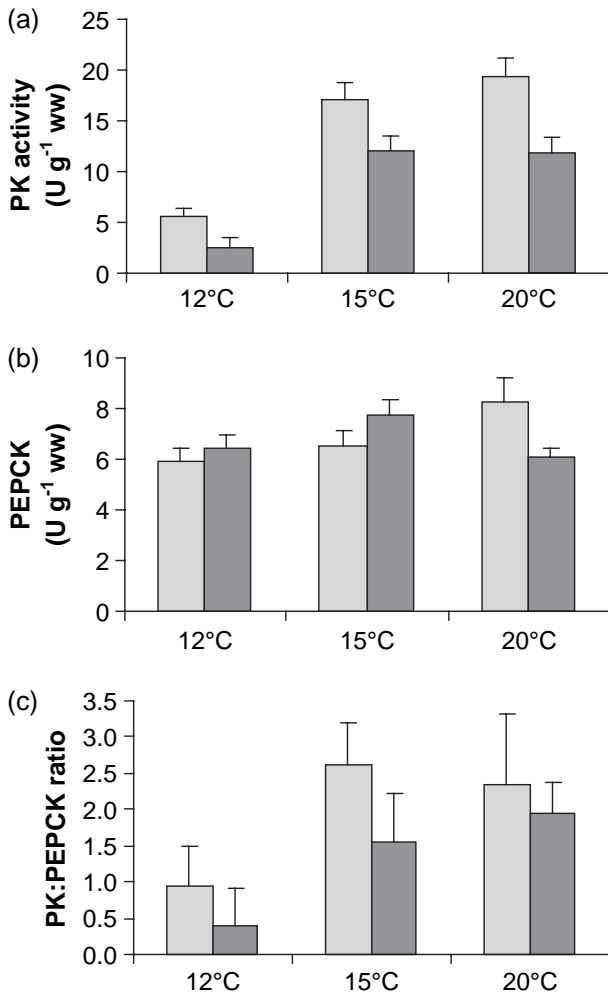


Figure 3. Effect of temperature and hypoxia on: (a) pyruvate kinase (PK) activity, (b) phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity, (c) PK/PEPCK ratio. Normoxia (grey) and hypoxia (dark) (means ± standard error, n = 12).

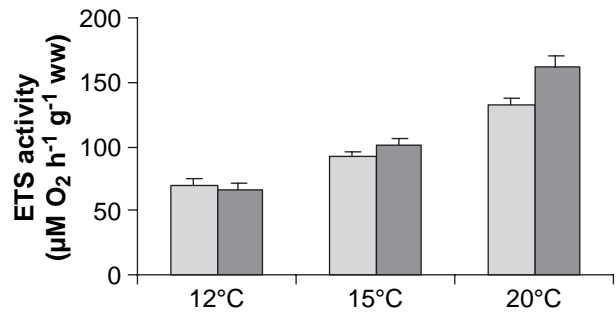


Figure 4. Effect of temperature and hypoxia on electron transport system (ETS) activity. Normoxia (grey) and hypoxia (dark) (means ± standard error, n = 12).

PK and PEPCK activities is considered to be an index of the anaerobic capacity of succinate production, where a lower ratio is associated with a higher anaerobic potential (Simpfendorfer et al. 1995). The anaerobic capacity decreased with an increase in temperature, the PK/PEPCK ratio increased with temperature ( $F=39.42$ ,  $P<0.0001$ ). In hypoxic oysters, the PK/PEPCK ratio was significantly lower

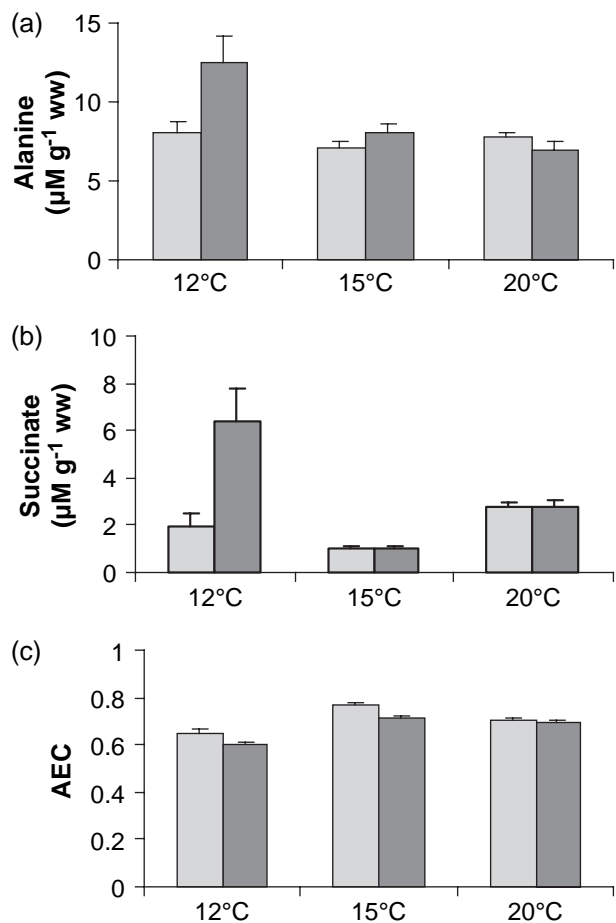


Figure 5. Effect of temperature and hypoxia on: (a) alanine, (b) succinate content and (c) adenylate energy charge (AEC). Normoxia (grey) and hypoxia (dark) (means ± standard error, n = 12).

( $F=10.94$ ,  $P<0.01$ ) (Figure 3c). ETS activity increased significantly with temperature ( $F=30.16$ ,  $P<0.0001$ ) and hypoxia stimulated significantly ETS activity ( $F=9.02$ ,  $P<0.01$ ) (Figure 4).

**Metabolite and AEC.** There were significant changes in alanine concentration depending on temperature ( $F=14.20$ ,  $P<0.0001$ ). The alanine content was maximal at 12°C and was significantly higher under hypoxic conditions than at 15 and 20°C (Figure 5a). Hypoxia involved a significant accumulation of alanine ( $F=5.39$ ,  $P<0.05$ ), especially at 12°C (Figure 5a). Succinate content changed with temperature ( $F=23.36$ ,  $P<0.0001$ ) and was the highest at 12°C under hypoxia (Figure 5b). Hypoxia resulted in a significant increase ( $F=4.98$ ,  $P<0.05$ ) in succinate concentration at 12°C (Figure 5b). There was a significant change in AEC with temperature ( $F=35.74$ ,  $P<0.0001$ ). AEC was the lowest at 12°C and maximal at 15°C (Figure 5c). Hypoxia involved a significant decrease in AEC ( $F=10.66$ ,  $P<0.01$ ), except at 20°C, where the level of AEC was similar to that in normoxia (Figure 5c).

**Regulation of PK by alanine.** There was a significant negative relationship between the alanine content and the PK activity only in hypoxic oysters ( $r=-0.356$ ,  $P<5\%$ ,  $df=37$ ); at  $df=37$  the null hypothesis was rejected when  $r=0.314$  at the alpha level of 5%. In normoxic oysters, this relationship between alanine content and PK activity did not appear ( $r=0.031$ , NS,  $df=37$ ).

## Discussion

### Effect of temperature

The relationship between temperature and maximum OC obtained in this experiment supports the model established by Bougrier et al. (1995) in *C. gigas*. This relationship is common for numerous temperate and tropical bivalves (Haure et al. 1998; Saucedo et al. 2004).

In invertebrates, the overall glycolytic capacity is increased in summer (Greenway & Storey 1999, 2001). The influence of temperature on the glycolytic capacity was related to the seasonal cycle of storage and mobilization of energetic reserves, especially glycogen, but also stored lipids, and is correlated with the annual reproductive cycle (Berthelin et al. 2000; Bacca et al. 2005). This study has confirmed the importance of temperature on the functioning of PK and PEPCK in *C. gigas*, as in other invertebrates (Wieser & Wright 1979; Michaelidis & Storey 1990; Sokolova & Portner 2001). Seasonal adjustments are mediated by the amounts

of enzyme and/or by the change in the type of isoform present. In *C. gigas* muscle, the regulation of PK can be achieved at different steps from the kinetic control via the allosteric effectors to the transcriptional level, whereas the regulation of PEPCK essentially seems to be at the transcriptional level (Le Moullac et al. 2007). The increase in PEPCK activity with temperature, which has a gluconeogenic role, could also suggest a higher rate of amino acid catabolism from dietary sources (Greenway & Storey 2001). The functionally linked enzymes PK and PEPCK were used to estimate the potential anaerobic capacity. These two enzymes probably compete for a common substrate, PEP, channelling it to aerobic (PK) or anaerobic (PEPCK) pathways, so that a low PK/PEPCK ratio is indicative of a relatively higher anaerobic capacity. We found that in the oyster *C. gigas* the PK/PEPCK ratio differed consistently in normoxic oysters with temperature, suggesting that the capability of oysters to survive anaerobiosis would be lower at 15 and 20°C than at 12°C (Sokolova & Pörtner 2001). ETS activity was used to estimate the potential respiratory capacity of marine zooplankton (Owens & King 1975). In bivalves, ETS activity has also been used to assess the oxygen demand to evaluate seasonal changes (Fanslow et al. 2001) and pH (Simicic & Brancelj 2006). Our results showed for the first time in the oyster *C. gigas* the relationship of ETS activity with temperature, whereas in this species, previous studies have already shown that OC and feeding regulate ETS activity (Garcia Esquivel et al. 2001, 2002).

### Effect of hypoxia

Bivalves are adapted to survive periodic hypoxia, the occurrence of which increases in estuaries, bays and lagoons. Faced with a decrease in oxygen tension, the organisms exhibit various models for the adaptation of their OC. Certain species called regulators seek to maintain their OC constant over a wide range of DO. Others reduce their OC with the decrease in DO and are called conformers (Prosser 1973). Our results showed that the oyster *C. gigas* acts as a regulator for OC. The mechanism that allows the bivalves to adopt this behaviour is carried out by an adjustment of the ventilatory activity that is the key to the adaptation to avoid changes in blood oxygenation (Bayne 1971b; Taylor & Brand 1975a,b; Tran et al. 2000). But this system of adaptation finds its limit at the oxygen threshold below which the organisms can no longer maintain their OC. The  $P_{CO_2}$  represents the limit of regulatory ability (Grieshaber et al. 1988). The concept of  $P_{CO_2}$  includes the setting

of an anaerobic energy metabolism (Pörtner & Grieshaber 1993). The relationship between temperature and  $P_{CO_2}$  relies only on the oxygen solubility depending on the water temperature. Nevertheless, the oysters were weak regulators, strongly dependent on oxygen and could regulate their OC over only a limited range of oxygen availability.

At a cellular level, hypoxia led to a metabolic depression in *C. gigas*. The PK activity was inhibited in hypoxic oysters; this inhibition was related to the alanine content. The molecular basis of PK activity suppression in response to a lack of oxygen is the same in many species of marine molluscs (Storey 1993; Greenway & Storey 2000). The phosphorylation of PK 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 & Storey 1984; Storey 1993; Greenway & Storey 2000, 2001). Recently we have shown in *C. gigas* that the adaptation to hypoxia of muscle PK was first allosteric by the content of alanine and then later at the transcriptional level after 10 days of hypoxia by decreasing the PK mRNA level. At the same time, the regulation of PEPCK in hypoxic muscle occurred at the gene level by significantly increasing the PEPCK mRNA level (Le Moullac et al. 2007). The accumulation of anaerobic end products in hypoxia, such as alanine and succinate, only occurred at 12°C, showing that the highest anaerobic capacity of oysters was at a low temperature. Hypoxia did not induce significant changes in PEPCK activity, especially at 12°C, whereas succinate accumulated, suggesting that succinate was derived from the aspartate utilization (De Zwann et al. 1991; Isani et al. 1995).

The stimulation of ETS activity, observed here for the first time in molluscs, could probably be linked to the up-regulation of some genes of the respiratory chain, as occurs in anoxia-tolerant vertebrates (Cai & Storey 1996; Storey 2004). Regulated genes of the respiratory chain in *C. gigas* were recently identified after 7–10 days of hypoxia exposure (David et al. 2005). In the carp, an increase in the activity of cytochrome c oxidase was observed in muscle after 7 days of hypoxia (Zhou et al. 2000). The stimulation of ETS activity could be responsible for the maintenance of AEC during gametogenesis and of the modest decline in AEC at 12 and 15°C in hypoxic oysters. In order for cells to survive under prolonged hypoxia or anoxia, they must maintain their energy requirement by coupling effectively the energy supply and demand. In bivalves, long-term anoxia is characterized by the maintained level of AEC due to the phosphoarginine contribution and the reduction in

ATP turnover (Isani et al. 1995). The maintenance of relatively constant concentrations of adenylates has also been reported in muscles from vertebrates showing anoxia tolerance (Chew & Ip 1992; Dalla Via et al. 1994; West & Boutilier 1998).

## Conclusion

This work has demonstrated that the oxygen level and temperature are important in the regulation of the energy metabolism of *C. gigas*. Although oysters act as regulators they had a low capacity to regulate their oxygen uptake due to high  $P_{CO_2}$  values. Metabolic depression can occur frequently, particularly in the summer. This work proposed useful biomarkers, such as the couple PK activity–alanine and ETS activity to assess in situ the effects of environmental degradation, such as hypoxia, on metabolic alterations. Further studies should be carried out to clarify the role of the trophic level on glycolytic enzymes and their regulation.

## Acknowledgements

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. The authors are grateful to Michel Mathieu, Director of UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, for his support during the course of these experiments and to Alan C. Taylor for improving the English in this paper.

## References

- Bacca H, Huvet A, Fabioux C, Daniel JY, Delaporte M, Pouvreau S, et al. 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140B:635–46.
- Bayne BL. 1971a. Oxygen consumption by three species of lamellibranch mollusc in declining ambient oxygen tension. *Comparative Biochemistry and Physiology* 40A:955–70.
- Bayne BL. 1971b. Ventilation, the heart beat and oxygen uptake by *Mytilus edulis* L., in declining oxygen tension. *Comparative Biochemistry and Physiology* 40A:1065–85.
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology* 125B:359–69.
- Blain S, Guillou J, Treguer P, Worther P, Delauney L, Folléant E, et al. 2004. High frequency monitoring of the coastal marine environment using the MAREL buoy. *Journal of Environmental Monitoring* 6:569–75.
- Bougrier S, Geairon P, Deslous-Paoli JM, Bacher C, Jonquières G. 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134:143–54.
- 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.
- Cai Q, Storey KB. 1996. Anoxia-induced gene expression in turtle heart up-regulation of mitochondrial genes for NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 5 and cytochrome c oxidase subunit 1. *European Journal of Biochemistry* 241:83–92.
- Chew SF, Ip YK. 1992. Biochemical adaptations of the mud-skipper *Boleophthalmus boddarti* to a lack of oxygen. *Marine Biology* 112:567–71.
- Cochran RE, Burnett LE. 1996. Respiratory responses of the salt marsh animals, *Fundulus heteroclitus*, *Leiostomus xanthurus*, and *Palaemonetes pugio* to environmental hypoxia and hypercapnia and to the organophosphate pesticide, azinphosmethyl. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 195:125–44.
- Dalla Via J, Van den Thillart G, Cattani O, De Zwaan A. 1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. II. Intermediary metabolism in blood, liver and muscle. *Marine Ecology Progress Series* 111:17–27.
- David E, Tanguy A, Pichavant K, Moraga D. 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal* 272:5635–52.
- Dégremont L, Bédier E, Soletchnik P, Ropert M, Huvet A, Moal J, et al. 2005. Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 249:213–29.
- Dejours P. 1981. *Principles of Comparative Respiratory Physiology*. Amsterdam: North-Holland.
- 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. *Marine Biology* 111:343–51.
- Diaz RJ, Rosenberg R. 1995. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Ocean Marine Biology: an Annual Review* 33:245–303.
- Fanslow DL, Nalepa TF, Johengen TH. 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia* 448:61–70.
- Garcia-Esquivel Z, Bricelj VM, Felbeck H. 2002. Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 133A:63–77.
- Garcia-Esquivel Z, Bricelj VM, Gonzalez-Gomez MA. 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 263:77–103.
- Gouilletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geiron P, Faury N, et al. 1998. Summer mortality of the cupped oyster *Crassostrea gigas* in the bay of Marennes Oléron (France). *ICES, Lisbon CM (CC)* 14:14–20.
- Greenway SC, Storey KB. 1999. The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 242:259–72.
- Greenway SC, Storey KB. 2000. Seasonal change and prolonged anoxia affect the kinetic properties of phosphofructokinase and pyruvate kinase in oysters. *Journal of Comparative Physiology* 170B:285–93.
- Greenway SC, Storey KB. 2001. Effects of seasonal change and prolonged anoxia on metabolic enzymes of *Littorina littorea*. *Canadian Journal of Zoology* 79:907–15.
- Grieshaber MK, Kreuzer U, Pörtner HO. 1988. Critical PO<sub>2</sub> of euryoxic animals. In: Acker H, editor. *Oxygen Sensing in Tissues*. Berlin: Springer. p 355.
- Haure J, Penisson C, Bougrier S, Baud JP. 1998. Influence of temperature on clearance and oxygen consumption rates of the flat oyster *Ostrea edulis*: determination of allometric coefficients. *Aquaculture* 169:211–24.
- 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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 277:61–78.
- Isani G, Cattani O, Zurzolo M, Pagnucco C, Cortesi P. 1995. Energy metabolism of the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, during long-term anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110:103–13.
- Ivanovici AM. 1980. Adenylate energy charge: an evaluation of applicability to assessment of pollution effects and directions for future research. Rapport procès verbal Réunion du Conseil International pour l'Exploration de la Mer 179:23–8.
- Labreuche Y, Lambert C, Soudant P, Boulo V, Huvet A, Nicolas JL. 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection* 8:2715–24.
- 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. *Journal of Experimental Zoology* 307A:371–82.
- Michaelidis B, Storey KB. 1990. Interactions of temperature and pH on the regulatory properties of pyruvate kinase from organs of a marine mollusc. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 140:187–96.
- Moal J, Le Coz JR, Samain JF, Daniel JY. 1989. Nucleotides in bivalves: extraction and analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Comparative Biochemistry and Physiology* 93B:307–16.
- Owens TG, King FD. 1975. The measurement of respiratory electron-transport-system activity in marine zooplankton. *Marine Biology* 30:27–36.
- Plaxton WC, Storey KB. 1984. Purification and properties of aerobic and anoxic forms of pyruvate kinase from red muscle organ of the channeled whelk, *Buccopecten canaliculatum*. *European Journal of Biochemistry* 143:257–65.
- Pörtner HO, Grieshaber MK. 1993. Critical PO<sub>2</sub> (s) in oxygen-forming and oxygen-regulating animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In: Bicudo JEPW, editor. *The Vertebrate Gas Transport Cascade: Adaptation to Environment and Mode of Life*. Boca Raton: CRC Press. p 330–57.
- Pörtner HO, Heisler N, Grieshaber MK. 1985. Oxygen consumption and mode of energy production in the intertidal worm *Sipunculus nudus* L.: definition and characterization of the critical PO<sub>2</sub> for an oxygen conformer. *Respiratory Physiology* 59:361–77.
- Prosser CL. 1973. *Comparative Animal Physiology*. Philadelphia: Saunders.
- Samain JF, Dégremont L, Soletchnik P, Haure J, Bédier E, Ropert M, et al. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process. *Aquaculture* 268:227–43.
- Saucedo P, Ocampo L, Monteforte M, Bervera H. 2004. Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *Aquaculture* 229:377–87.
- Savina M, Pouvreau S. 2004. A comparative ecophysiological study of two infaunal filter-feeding bivalves: *Paphia rhomboides* and *Glycymeris glycymeris*. *Aquaculture* 239:289–306.

- Schein V, Waché Y, Etges R, Kucarsky 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 Letters* 561:202–6.
- 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. *Physiological Zoology* 59:627–42.
- Simcic T, Brandcelj A. 2006. Effects of pH on electron transport system (ETS) activity and oxygen consumption in *Gammarus fossarum*, *Asellus aquaticus* and *Niphargus sphagnicolus*. *Freshwater Biology* 51:686–94.
- Simpfendorfer RW, Vial MV, Lopez DA, Verdala M, Gonzalez ML. 1995. Relationship between aerobic and anaerobic metabolic capacities and the vertical distribution of three intertidal sessile invertebrates: *Jehlius cirratus* (Darwin) (Cirripedia), *Perumytilus purpuratus* (Lamarck) (Bivalvia) and *Mytilus chilensis* (Hupé) (Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology* 111B:615–23.
- 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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 213:169–79.
- Sobral P, Widdows J. 1997. Influence of hypoxia and anoxia on the physiological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Marine Biology* 127:455–61.
- Sokolova IM, Pörtner HO. 2001. Temperature effects on key metabolic enzymes in *Littorina saxatilis* and *L. obtusata* from different latitudes and shore levels. *Marine Biology* 139:113–26.
- Soletchnik P, Faury N, Gouletquer P. 2006. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes–Oléron bay (France). *Aquaculture* 252:328–38.
- Soletchnik P, Le Moine O, Faury N, Razet D, Geairon P, Gouletquer P. 1999. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes–Oléron: spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquatic Living Resources* 12:131–43.
- 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 253–69.
- Storey KB. 2004. Molecular mechanisms of anoxia tolerance. *International Congress Series* 1275:47–54.
- Storey KB, Storey JM. 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Quarterly Review of Biology* 65:145–74.
- Taylor AC, Brand AR. 1975a. Effects of hypoxia and body size on the oxygen consumption of the bivalve *Arctica islandica* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 19:187–96.
- Taylor AC, Brand AR. 1975b. Comparative study of the respiratory responses of the bivalves *Arctica islandica* (L.) and *Mytilus edulis* L. to declining oxygen tension. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 190:443–56.
- Tran D, Boudou A, Massabuau JC. 2000. Mechanism for maintaining OC under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Canadian Journal of Zoology* 78:2027.
- West TG, Boutilier RG. 1998. Metabolic suppression in anoxic frog muscle. *Journal of Comparative Physiology* 168:273–80.
- Wieser W, Wright E. 1979. The effects of season and temperature on D-lactate dehydrogenase, pyruvate kinase and arginine kinase in the foot of *Helix pomatia* L. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 360:533–42.
- Williamson DH. 1974. Determination with alanine dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2. New York: Academic Press. p 1679–82.
- Zammit VA, Newsholme EA. 1978. Properties of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in relation to the direction and regulation of phosphoenolpyruvate metabolism in muscles of frog and marine invertebrates. *Biochemistry Journal* 174:979.
- Zhou BS, Wu RS, Randall DJ, Lam PK, Ip YK, Chew SF. 2000. Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. *Journal of Fish Biology* 57:1160–71.

*Editorial responsibility: Alan C. Taylor*

### 3.2.3 Transcriptional regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during prolonged hypoxia (article 3).

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans "Journal of Experimental Zoology Part A".

# Transcriptional Regulation of Pyruvate Kinase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in the Adductor Muscle of the Oyster *Crassostrea gigas* During Prolonged Hypoxia

GILLES LE MOULLAC<sup>1\*</sup>, HÉLÈNE BACCA<sup>2</sup>, ARNAUD HUVET<sup>2</sup>  
JEANNE MOAL<sup>2</sup>, STÉPHANE POUVREAU<sup>1</sup>, AND ALAIN VAN WORMHOUDT<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFREMER, Site  
Expérimental d'Argenton, Presqu'île du Vivier, Argenton en Landunvez,  
France  
<sup>2</sup>UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFREMER,  
Centre de Brest, Plouzané, France  
<sup>3</sup>UMR 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 Mg<sup>2+</sup>, 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  $15^\circ\text{C}$ ) 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 ( $\text{FFU l}^{-1}$ ),  $\text{O}_2$  ( $\text{mg O}_2 \text{l}^{-1}$ ) was the oxygen concentration, FR was the flow rate for sea water renewal ( $\text{l h}^{-1}$ ), 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/ $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}$  of total RNA denatured for 10 min at 70°C. Reactions were carried out in a total volume of 25  $\mu\text{l}$  with the following concentrations of the reaction components: 1  $\times$  M-MLV Reverse Transcriptase buffer, 0.2 mM dNTPs, 4 mM DTT, 0.5  $\mu\text{g}$  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 (Hui7<sup>518</sup> 5' GAY CAN AAR GGN CCN GAR AR 3' <sup>550</sup> and Hui8R<sup>1117</sup> 5' TGN GCN AGR AAN ACY TTY TC 3' <sup>1091</sup>). This consensus was 590 bp in length. The 5' end was obtained with the primer Hui1 (<sup>894</sup> 5' ACA TGA TTT TCG CGT CCT TC 3' <sup>914</sup>), 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 (<sup>1057</sup> 5' ACC ATG ATA CCA TCC GAC TCC T 3' <sup>1035</sup>) 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 (Hui3<sup>1415</sup> 5' GTC GCC ATA GCA GCA GTG GA 3' <sup>1435</sup> and Hui9r<sup>397</sup> 5' CCT TCA ATC ACC ATC TTC TGT 3' <sup>376</sup>) were used to complete sequencing.

For PEPCK cloning, a consensus fragment was obtained using two primers, cons5 (<sup>1393</sup> 5' TGG GAR GAY CCN AAR GGN GT 3' <sup>1413</sup>) and cons4r (<sup>1686</sup> 5' CGG AAC CAR TTN ACR TGR AA 3' <sup>1666</sup>), on a mantle lambda ZAP II library (Lelong et al., 2000). The 3' end of PEPCK was obtained by PCR using nested primers (pepH1-M13<sup>1489</sup> 5' CAT GGC GTC ATG GTT GGA GC 3' <sup>1509</sup> and pepFW-T7<sup>1504</sup> 5' GGA GCC TGC GTC AAA TCT GA 3' <sup>1524</sup>). The 5' end of PEPCK was obtained by RACE PCR (Boehringer Mannheim). Two successive PCR were realized with two oligonucleotide, first pepH4r-dT anchor (<sup>1496</sup> 5' CGC CAT GTT GCC AGC TGT AG 3' <sup>1476</sup>), and then pepH10r-anchor (<sup>1181</sup> 5' GCA TGG CAT TGG GGT TAG TT 3' <sup>1161</sup>) 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-anchor<sup>568</sup> 5' ACT GAA GGG GAT CAC ATA CA 3' <sup>548</sup>) and the PCR amplification of the 500 bp 5' end. Two other primers: pepH11R<sup>1259</sup> 5' CCT CCA TTC CCT CCC AGA A 3' <sup>1240</sup> and pepH9<sup>1918</sup> 5' TTC CTG GAG GAC CAG GTC GG 3' <sup>1938</sup> 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 <sup>-1</sup> ww)	Gene expression ( $\times 10^{-2}$ )	Enzyme activity (U g <sup>-1</sup> ww)	
Digestive gland	12	0.38 ± 0.08 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.8 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>c</sup>	92
Gill	12	0.16 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.21 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>d</sup>	96
Gonad	12	0.51 ± 0.17 <sup>b</sup>	3.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.09 ± 0.20 <sup>b</sup>	ND
Mantle	12	0.21 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.97 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>d</sup>	99
Muscle	12	1.51 ± 0.43 <sup>a</sup>	10.9 ± 2.5 <sup>a</sup>	6.10 ± 1.10 <sup>a</sup>	2.73 ± 0.14 <sup>a</sup>	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 Na<sub>3</sub>F, 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 MgCl<sub>2</sub>, 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 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM IDP, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 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 Mg<sup>2+</sup>, 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 (<sup>389</sup>TRAESSDVANAVLDGADCVMLSGETAKGDY PLEC<sup>420</sup>). 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 <sup>471</sup>MAAII-VITTSGRSAH<sup>486</sup>. A C-terminal extension was present that did not correspond to a functional motif as it is the case in bacteria.



**A**

	10	20	30	40	50	60	70	80
Caenorhabditis	-----MANE	CRSLRNMTD	G--FQVVTEV	VTHKLNHPI	FKGDFASLSP	KVQRQFVAEKA	ELMNFAGIYI	CDGSKQEYDD
Drosophila	MPELIEQSKI	ISGNVCGLQF	LHKLRQDNCG	LYSHIRGPI	SYGNVDLLT	GVRAFVEEIG	ALCQPDQVHI	CDGSEQENKV
Homocytto			MPPLQ	QNLNLSAKV	VQGSLSLQF	AVREFLENNA	ELCQPDHIIH	CPGSEENGR
Homomito	-----MA	ALYRPLRLN	WHGLSPLGWP	SCRSIQTLRV	LSGDLQQLPT	GIRDFVEHSA	RLCQPEGIHI	CDGTEAINTA
Crassostrea	-----MEDD	APFEMIEHEI	VIQKLGHPVI	VKGDHFMLPK	VKQKFLAKWV	YTKCFRALYI	CDGSHAEEAE	
Xenopus	-----MPSFY	VRAVGCPSRI	VRGWVESQKT	RCRGAHAVRV	LSGQMERLPP	AVREFVVKGA	ELCDQNIHI	CDGSATENET
	90	100	110	120	130	140	150	160
Caenorhabditis	IVDKLVERGV	LTPKAYENN	YLCRTDPRDV	ARVESKTVMV	TKDKYDSVCH	TPDGVPRIMG	QWMSEEQFVG	ELDSRFPGCM
Drosophila	LIKSLLEAGT	IVPLPKYDNC	WLARTNPADV	ARVESRTFIC	TERREETIPT	PVEGVKGTLG	NWISPSMDMA	AVQQRFPGCM
Homocytto	LLGQMEEEGI	LRRLKKYDNC	WLALTDPRDV	ARIESKTIVV	TQEQRDTVPI	PKTG-LSQLG	RWMSBEDFEK	AFNARFPFGCM
Homomito	TLTLLEQQGL	IRKLPKYDNC	WLARTDPKDV	ARVESKTIVV	TFSQRDTVPL	PPGGACGQLG	NWMSPADFOR	AVDERFPFGCM
Crassostrea	VTHKLIERG	LTKLKYDNC	YLCRTDPRDV	ARVESKTWIA	TDDKYETVPH	VRQGVGILG	QWKHTKEMEE	EVNSDLDDGCM
Xenopus	IVTVLQQEGM	LKKLHKYPNC	WLARTDPKDV	ARVESKTIVV	TENMRDTVPI	PTTVGKQQLG	NWMSPADFOR	AKAERFPFGCM
	170	180	190	200	210	220	230	240
Caenorhabditis	AGRPMYVVPY	SMGPIGGPLS	KNGIELTDSF	YVLLCMRMT	RMGTQVLEAL	GDN-DFVRC	IHSVGLPRPV	KQKVINHWPCN
Drosophila	KGRMTYVVPF	SMGPIGGPLS	KIGIELTDSA	YVVASMRIMT	RMGAAVLRLQ	AKKEEFVRA	LHSVGAPANG	QVQPS-WPCD
Homocytto	KGRMTYVVPF	SMGPIGGPLS	KIGIELTDSF	YVVASMRIMT	RMGTQVLEAL	GDG-EFVKC	LHSVGCPPLQ	KQPLVSNWPCN
Homomito	QGRMTYVLPF	SMGPIGGPLS	RIGVQLTDSA	YVVASMRIMT	RLGTQVLEAL	GDG-EFVKC	LHSVGCPPLQ	QGPVSNWPCN
Crassostrea	AGRMTYVVPF	SMGPIGGPLS	KIGVQLTDSN	YVLLCMRMT	RVSADIWEVL	GDN-DFVRC	VHSMGCPPLQ	QRKVINHWPCN
Xenopus	RGRTMYVLPF	SMGPIGGPLS	KYGVQLTDSF	YVVASMRIMT	RMGSQVLDAL	GDG-EFVKC	LHSVGCPPLQ	KAPLVSNWPCN
	250	260	270	280	290	300	310	320
Caenorhabditis	PEKVMIAHRP	KEREIVSFGS	GYGNSLLGK	KCFALRIACN	IGRDEGWLAE	HMLILGVTNP	E-GEEKFIAA	AFPSACGKTN
Drosophila	PERTIILHKP	AENLIVSYGS	GYGNSLLGK	KCFALRIGST	IARQEGWLAE	HMLILGITDP	KGEKK-YITA	AFPSACGKTN
Homocytto	PELTLIAHLP	DRREIISFGS	GYGNSLLGK	KCFALRMASR	LAKDEGWLAE	HMLILGITNP	EGEKK-YLAA	AFPSACGKTN
Homomito	PEKTLIGHVP	DQREIISFGS	GYGNSLLGK	KCFALRIASR	LARDEGWLAE	HMLILGITSP	AGKKA-LCAA	AFPSACGKTN
Crassostrea	PDKIMIGHFP	ARREIVSFGS	GYGNSLLGK	KCFALRIASV	IARDEGWLAE	HMLILGVTNP	KTGEEKFVCA	AFPSACGKTN
Xenopus	PEKTLIAHVP	DSREIVSFGS	GYGNSLLGK	KCFALRIASR	IARDEGWLAE	HMLILGITNP	AGRKR-YIAA	AFPSACGKTN
	330	340	350	360	370	380	390	400
Caenorhabditis	LAMLTPVTPG	WKVFCVGGDI	AWMKFGADGRL	YAINPEAGF	FGVAPGTSK	TNAMAMESCR	ANTIFTNVAE	TADGEYVWEG
Drosophila	LAMLNPSLAN	YKVFVCGDDI	AWMKFDSQGLV	RAINPENGF	FGVAPGTSME	TNPIMAMTVF	KNTIFTNVAE	TSDDGVVWEG
Homocytto	LAMMRPSLPG	WKVFCVGGDI	AWMKFDAQGLH	RAINPENGF	FGVAPGTSVK	TNPNAIKTIQ	KNTIFTNVAE	TSDDGVVWEG
Homomito	LAMMRPALPG	WKVFCVGGDI	AWMKFDSQGLV	RAINPENGF	FGVAPGTSAT	TNPNAMATIQ	SNTIFTNVAE	TSDDGVVWEG
Crassostrea	LAMIQPTIPG	YKVFVCGDDI	AWLRFDDKQGL	RAINPENGF	LGVLPGTGMK	TNPNAMLSFQ	NISIFTNVAE	TADGEYVWEG
Xenopus	LAMMRPSLPG	WKVFCVGGDI	AWMKFDSQGLV	RAINPENGF	FGVAPGTSK	TNPNALSTVE	RNTIFTNVAE	TSDDGVVWEG
	410	420	430	440	450	460	470	480
Caenorhabditis	LEKELKEAKG	YTDEQLKHEE	ITNWLSRERW	IGDEGKAAPH	NSRFTAPAKQ	CPNIHPDWEA	PQGVPIIDAV	FGRRRPEGVF
Drosophila	MESLAPNVQ	-----ITDNLKFPWT	-----	KDSGKPAAPH	NSRFTCPAAQ	CFIIDEAWED	PAGVPIASML	FGRRRPAQVP
Homocytto	IDPELASGVT	-----ITSWKNKREWS	-----	SEDGEPKAHP	NSRFTCPASQ	CFIIDAWEAS	PEGVPIEGII	FGRRRPAQVP
Homomito	IDQLPFGVVT	-----VTSWLKQPKWK	-----	PGDKEPCAHP	NSRFTCPAPARQ	CFIIMDPAWEA	PEGVPIIDAI	FGRRRPEGVF
Crassostrea	MEDEIDKNIA	-----ITNWLQQPKWK	-----	IGMPGNAAPH	NSRFTCPASQ	CFIHPKWEED	PKGVVPSALI	FGRRRPTGVF
Xenopus	LDQLPFGVVT	-----VTSWLKQSKWK	-----	PGDKEPCAHP	NSRFTCPAAQ	CFIMDDAWES	PEGVPIIDAI	FGRRRPEGVF
	490	500	510	520	530	540	550	560
Caenorhabditis	LVFESFSWEH	GILVGVGVKS	ETATAAEFTG	KVMHDPFAM	RPFPGYVNGK	YLAHLSLQK	AP-HKAPKIF	HVMNFRKIDK
Drosophila	LIYEARQDWH	GVFVGAAMRS	EATAAAEHKG	KVMHDPFAM	RPFPGYVNGF	YLAHLSLQK	R--GVQPKIF	HVMNFRKSAE
Homocytto	LVYEAALSWH	GVFVGAAMRS	EATAAAEHKG	KIIMHDPFAM	RPFPGYVNGK	YLAHLSLQK	HPAAKLPKIF	HVMNFRKIDK
Homomito	LVYEAALSWH	GVFVGAAMRS	EATAAAEHKG	KIIMHDPFAM	RPFPGYVNGF	YLAHLSLQK	RKGAQLPRIF	HVMNFRKIDK
Crassostrea	LVFESYSWQH	GVVGVGAMRS	EATAAAEHKG	KIIMHDPFAM	RPFPGYVNGK	YLAHLSLQK	-----PDRMPKSF	HVMNFRKIDK
Xenopus	LVFESYNWNH	GVVGVGAMRS	EATAAAEHKG	KVMHDPFAM	RPFPGYVNGF	YLAHLSLQK	RPGLQLPKIF	HVMNFRKIDK
	570	580	590	600	610	620	630	640
Caenorhabditis	HKFLWPGFGD	NIRVLDWILR	RVAGGEEELI	IETAIGYVPK	RGTINLDGLP	R-IDWNLMS	IPKDYVVEVD	DESRRFLDTQ
Drosophila	GKFLWPGFGE	NSRVLEWILR	RVNGE--SCY	VDSAIQHPIA	EGALNLDGK	DKVDVKEIFS	LPKFPWQEV	KDIRTYFESQ
Homocytto	GKFLWPGFGE	NSRVLEWIFN	RIDGK--AST	KLTPIGYIYK	EDALNLDGLG	H-INMMLFSL	ISKEFWEKEV	EDIEKYLEDD
Homomito	GKFLWPGFGE	NARVLDWICR	RLGEG--DSA	RETPIGLVPK	EGALDLSGLR	A-IDTTLQFL	LPKDFWQEV	RDIRSYLLETQ
Crassostrea	GKFLWPGFGD	NIRVLDWILR	RCAG-DESLA	VKSPIGYLPK	KGSLDITLGL	D-IKWDELFS	LPKHYVLDMM	RESKRLFLEDQ
Xenopus	GGFLWPGFGE	NARVLDWIFR	RVEGE--ESA	RQSAIGYLPA	EGALNLDGLG	G-VDTNALFS	LPKGFWEKEV	QDVGVLYLETQ
	650	660	670					
Caenorhabditis	VGSDLPQPIR	DELDKLEKRV	HAL-					
Drosophila	VGADLPASTY	QQLDELSSRV	DNL-					
Homocytto	VNADLPCEIE	RETLALKQRI	SQM-					
Homomito	VNADLPKEVL	AELAEALERRV	HKM-					
Crassostrea	VGTDFPQVIN	-ETHAQEKRI	EQQL					
Xenopus	VTDLLPQQIM	EELRGLGKRV	KQM-					

Fig. 1. Deduced amino acid sequences of the enzymes Phosphoenolpyruvate carboxykinase and Pyruvate kinase. (A) PEPCK: GTP-phosphoryl binding sites (boxed), kinase-1 and kinase-2 sites (boxed). *Caenorhabditis* (C71149); *Drosophila* (P20007); Human cytosolic (NP\_002582); human mitochondrial (NP\_004554); *Xenopus mitochondrial* (AM076952); *Crassostrea* (CAJ83705). (B) PK: ADP/ATP binding site (boxed), F1,6BP binding site (boxed). The residues involved for PEP binding site are dotted *Caenorhabditis* (CAA93424); Human R/L type P30613); *drosophila* (AF062478); human M type (P14618); oyster (AM076953); *Bacillus* (D31954).

### Tissue localization of PK and PEPCK and cellular localization of PEPCK

The level of PK activity was tissue-dependent (Table 1). The level of relative mRNA and enzyme activity was significantly different between the

tissues ( $P < 0.1\%$ ). PLSD Fisher test allowed to classify the tissues according to the mean level of PK activity (Table 1). This table indicates that the PK activity was the highest in the muscle and the lowest in the mantle and the gills. The PEPCK activity was significantly different between the

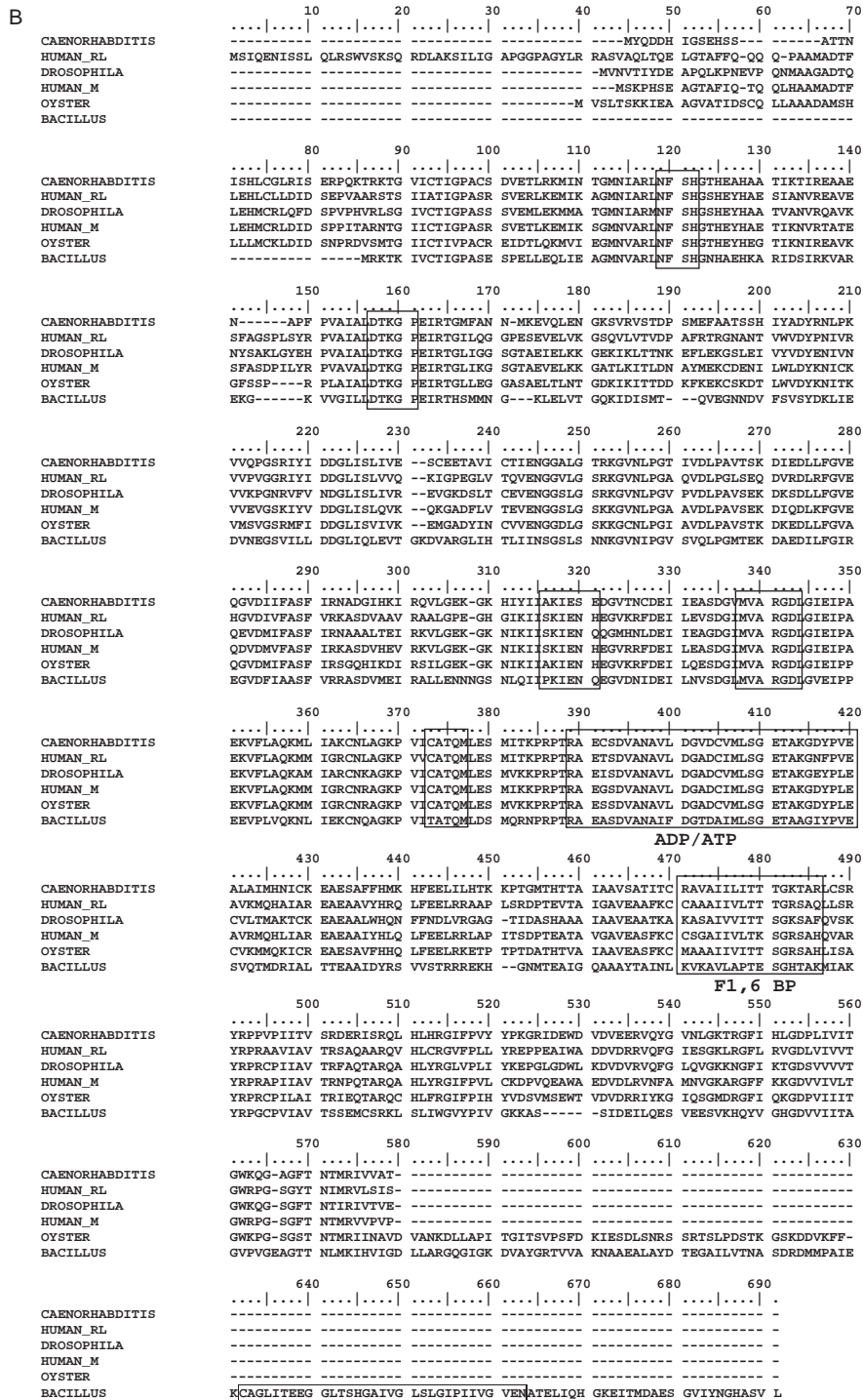


Fig. 1. Continued.

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  $0.60 \pm 0.03$  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

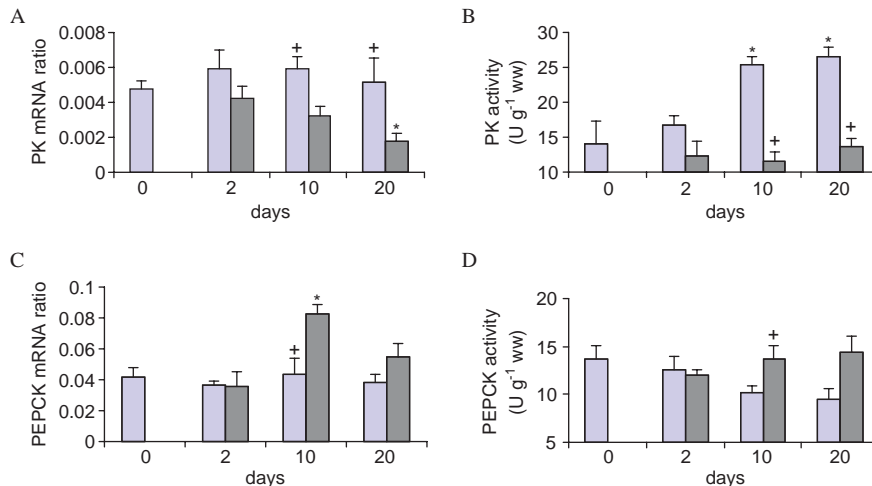


Fig. 2. The effects of oxygen on PK and PEPCK mRNA ratio and enzyme activity in *C. gigas* muscle in normoxia (gray) and hypoxia (dark). PK mRNA ratio (A), PK activity (B), PEPCK mRNA (C) ratio and PEPCK activity (D). Results are means  $\pm$  SE,  $n = 6-8$ . \*, significant difference ( $P < 0.05$ ) relative to day 0 within each group. +, significant difference ( $P < 0.05$ ) between normoxia and hypoxia at each sampling day.

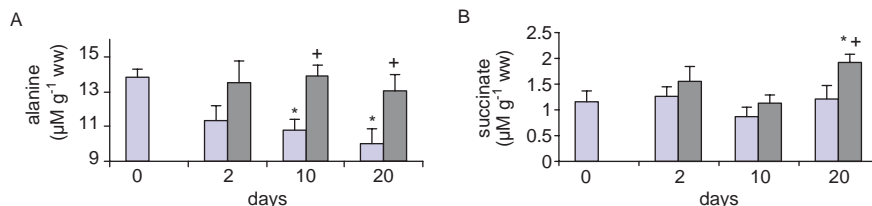


Fig. 3. The effects of oxygen on alanine and succinate in *C. gigas* muscle in normoxia (gray) and hypoxia (dark). Alanine (A), succinate (B). Results are means  $\pm$  SE,  $n = 6-8$ . \*, significant difference ( $P < 0.05$ ) relative to day 0 within each group. +, significant difference ( $P < 0.05$ ) 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 <sub>0.5</sub> PEP (mM)	0.19 ± 0.02	1.14 ± 0.14 <sup>a</sup>
I <sub>50</sub> L-alanine (mM)	9.30 ± 1.35	1.36 ± 0.26 <sup>a</sup>

The results are given as means ± SE (*n* = 20). All parameters were determined at 2 mM ADP. I<sub>50</sub> L-alanine was determined at 5 mM PEP. <sup>a</sup>Significantly 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.

### 3.3 Conclusions

L'ensemble des expérimentations précédentes démontre que l'hypoxie altère la physiologie de l'huître à tous les niveaux de son fonctionnement sans occasionner de mortalités.

L'ouverture des valves est réduite, et il se produit une désynchronisation des rythmes d'activités. Le comportement des huîtres est de type oxyrégulateur, mais la capacité de régulation est faible puisque le seuil hypoxique se situe entre 3,00 et 3,4 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. La dépression métabolique peut survenir fréquemment particulièrement en été.

Si le bilan énergétique (SFG) n'est pas un indicateur du risque hypoxique, la capacité de stockage des constituants biochimiques diminue. Le processus de reproduction à long terme s'en trouvera altéré puisque les réserves en glucides ne se réalisent pas à 12°C et 15°C.

La glycolyse est ralentie en hypoxie puisque la PK est inhibée. Cette inhibition est le résultat d'une augmentation de la sensibilité de la PK à l'alanine en hypoxie. Nous déterminons aussi que l'hypoxie induit une augmentation de l'activité de l'ETS au sein de la chaîne respiratoire.

La PK et de la PEPCK dans le muscle de l'huître *C. gigas* ont chacun un mode de régulation différent : la PEPCK apparaît régulée uniquement au niveau transcriptionnel alors que la PK est régulée d'abord au niveau de l'enzyme par l'alanine et une baisse de l'affinité pour le PEP avant de subir tardivement une régulation de niveau transcriptionnelle.

Ce travail propose donc des biomarqueurs utiles comme le couple PK-alanine et l'activité de l'ETS qui caractérisent une réponse à un stress respiratoire tel que l'hypoxie. Les changements observés pour ces biomarqueurs chez les huîtres en hypoxie suggèrent que ceux observés *in situ* chez les huîtres élevées près du sédiment (Article 1) sont aussi la réponse à un déficit en oxygène. Chez les huîtres élevées près du sédiment, les réserves glucidiques étaient plus faibles, la PK moins active sous l'effet d'une plus grande sensibilité à l'alanine et l'ETS était stimulé épisodiquement.



Les autres composés relargués du sédiment peuvent aussi altérer le métabolisme énergétique. Parmi ces composés, les sulfures sont les plus probables. La partie suivante permettra d'étudier expérimentalement les réactions des huîtres aux sulfures pour distinguer les spécificités de cette intoxication sur le métabolisme énergétique.

Nous avons ainsi déterminé que l'huître *C. gigas* a un comportement respiratoire de type oxyrégulateur. Mais c'est un oxyrégulateur qui résiste faiblement à la baisse du niveau d'oxygène dissous car les valeurs de  $P_{CO_2}$  aux 3 températures testées sont élevées entre 3.00 et 3.40 mg  $O_2 L^{-1}$ . Ce résultat indique que le risque de la dépression métabolique est élevé particulièrement l'été.

Au plan cellulaire, cette étude a confirmé l'importance de la température sur le fonctionnement de la PK et de la PEPCCK chez *C. gigas*. Les liens fonctionnels entre ces 2 enzymes permettent d'estimer le potentiel anaérobie des organismes, et nos résultats montrent que la capacité de résistance de l'huître *C. gigas* à l'anaérobiose est plus élevée à 12°C qu'aux autres températures. On peut estimer que l'accumulation en grande quantité de succinate en hypoxie à 12°C conforte ce résultat. L'effet de la température sur l'activité de la chaîne respiratoire confirme l'ETS en tant que biomarqueurs du potentiel respiratoire des invertébrés marins.

L'hypoxie provoque l'inhibition de l'activité de la PK et nos résultats confirment la corrélation négative avec la teneur en alanine. Le profil anaérobie typique avec accumulation d'alanine et de succinate n'est obtenu qu'à 12°C. Cependant l'absence de stimulation de la PEPCCK en hypoxie à cette température suggère que le succinate dérive de l'utilisation de l'aspartate.

Cette étude nous permet de confirmer que l'hypoxie provoque l'augmentation de l'activité enzymatique de l'ETS. La forte stimulation de l'ETS à 20°C en hypoxie pourrait avoir eu comme conséquence le maintien de la charge énergétique des huîtres soumises à l'hypoxie.

Ce travail a permis de démontrer expérimentalement que la température et le niveau d'oxygène sont des facteurs importants dans la régulation du métabolisme énergétique de *C. gigas*. L'approche expérimentale a permis de valider les hypothèses posées à l'issue l'expérimentation "Proximité du sédiment" (article 1).

Le séquençage des cDNA de la PK et de la PEPCK ont permis de dessiner des amorces pour mesurer l'expression des gènes codant pour ces enzymes. La PEPCK de l'huître *C. gigas* est d'origine cytosolique, ceci est révélé par certains motifs de la séquence nucléotidique et par la mesure de l'activité enzymatique dans chacune les 2 fractions cellulaires. Au plan fonctionnel, ce résultat est important puisque la PEPCK-C est régulée au niveau transcriptionnel par des stimuli nutritionnels et hormonaux (Weldon et al, 1990, Hanson and Reshef, 1997, Modaressi et al., 1998). L'analyse de la distribution spatiale de la PK et de la PEPCK chez *C. gigas* montre des niveaux d'expression plus élevés dans le muscle associés à des activités enzymatiques plus fortes. Nous avons donc pu montrer les niveaux de régulation de la PK et de la PEPCK dans le muscle de l'huître *C. gigas* soumis à une hypoxie stabilisée et prolongée. Ces régulations surviennent au niveau transcriptionnel pour la PEPCK alors que la PK est régulée d'abord au niveau de l'enzyme par un changement des propriétés cinétiques avant de subir une régulation de niveau transcriptionnelle.

---

## Partie 4. Les sulfures

---

## 4.1 Introduction

La production de substances toxiques tels que les sulfures et l'ammoniac dans les sédiments est favorisée par l'hypoxie, et leur apparition est synchronisée des mortalités estivales comme cela a été montré dans les zones ostréicoles de la baie des Veys et de Fort Espagnol dans l'estuaire de la rivière d'Auray (Burgeot et al, 2007). Ce type de problème est fréquemment rencontré dans de nombreuses zones littorales. Par exemple, des crises anoxiques surviennent dans la lagune de Thau. Une production d'hydrogène sulfuré se développe au sein du noyau anoxique. Les concentrations de sulfures dans les eaux hautement anoxiques du fond atteignent 300 $\mu$ M (Chapelle et al, 2001). Dans la baie de Chesapeake sur la côte est des Etats-Unis, les valeurs de sulfures à la surface des sédiments atteignent 100  $\mu$ M à 2000  $\mu$ M et 43  $\mu$ M dans les eaux de la baie (Roden and Tuttle, 1992). Dans les eaux profondes de Rhode Island, la concentration des sulfures atteint 800  $\mu$ M (Kennett and Hargraves, 1985). D'un point de vue physiologique, l'exposition aux sulfures augmente la sensibilité des organismes aux stress environnementaux. La réduction de l'activité alimentaire accompagnée d'une dépression métabolique est une des réponses fréquemment observées chez les invertébrés même en présence d'un niveau élevé d'oxygène (Torrans and Clemens 1982, Powell and Somero 1986, Johns et al. 1997). Le but de cette partie est d'examiner les niveaux d'adaptation de l'huître *C. gigas* aux sulfures. Deux expériences sont réalisées. La première permet de mesurer pendant 20 heures les vitesses de filtration et de consommation d'oxygène d'huîtres soumises à différentes concentrations de sulfures. La seconde est réalisée pour évaluer l'adaptation métabolique à une intoxication chronique aux sulfures pendant 10 jours. Enfin, cette étude a été conçue pour évaluer les niveaux de régulation de la PK et de la PEPCK dans le muscle adducteur.

## 4.2 Résultats

Ecophysiological and metabolic adaptations to sulphide exposure of the oyster *Crassostrea gigas*. (article 4)

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans "Journal of Shellfish Research".

## ECOPHYSIOLOGICAL AND METABOLIC ADAPTATIONS TO SULPHIDE EXPOSURE OF THE OYSTER *CRASSOSTREA GIGAS*

GILLES LE MOULLAC,<sup>1\*</sup> MARIE CHEIZE,<sup>2</sup> OLIVIER GASTINEAU,<sup>2</sup> JEAN-YVES DANIEL,<sup>2</sup> JEAN RENÉ LE COZ,<sup>2</sup> ARNAUD HUVET,<sup>2</sup> JEANNE MOAL,<sup>2</sup> STÉPHANE POUVREAU,<sup>1</sup> ALAIN VAN WORMHOUDT<sup>3</sup> AND JEAN FRANÇOIS SAMAIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFREMER, Site Expérimental d'Argenton, Presqu'île du Vivier, 29840 Argenton en Landunvez, France; <sup>2</sup>UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France; <sup>3</sup>UMR 5178, Biologie des Organismes et des Écosystèmes Marins, Station de Biologie Marine du Muséum National d'Histoire Naturelle, BP 225, 29900 Concarneau, France

**ABSTRACT** The purpose of this study is to examine the response of the oyster *Crassostrea gigas* to sulphide at different biological scales. A first experiment was designed to measure for 20 h the clearance (CR) and oxygen consumption (OC) rates of oysters exposed at different concentrations of sulphide (0, 3, 6, 12, 20, and 40  $\mu\text{M}$ ). The second experiment was carried out to evaluate the metabolic adaptations to chronic sulphide exposure for 10 days by measuring PK and PEPCK enzyme activities, succinate and alanine content, the adenylate energy charge (AEC), and the activity of the electron transport system (ETS) in whole oysters at above 20  $\mu\text{M}$ . PK and PEPCK mRNAs and enzyme activities have been measured in adductor muscle. When exposed to sulphide above 20  $\mu\text{M}$ , CR stopped, whereas oyster maintained their average OC rate between 1 and 2  $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ dw}$ . In the second experiment, sulphide exposure of oysters resulted in higher mortality, reduced the glycolytic flux by inhibiting the PK activity and decreased the ETS activity leading to a lower AEC. At day 10, a kind of recovery took place: the ETS activity and AEC of oysters exposed to sulphide increased to the level of the control oysters. In the adductor muscle, sulphide did not affect the transcriptional level of PK; PK was only regulated at enzyme level. Conversely, PEPCK was regulated only at transcriptional level. Nevertheless, muscle exhibited a wholly anaerobic metabolism by the significant increase of alanine and succinate contents followed by the significantly decrease of the ATP content during the 10 days of the experiment. This experiment showed that sulphide involved partially the whole oyster and wholly the adductor muscle in an anaerobic pathway of energy production; but oxygen was needed for the detoxification of the organism.

**KEY WORDS:** Oyster, sulphide, *Crassostrea gigas*, clearance rate, oxygen consumption, pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, alanine, succinate, electron transport system, AEC, ATP

### INTRODUCTION

Serious mortality outbreaks have been reported in *Crassostrea gigas* populations on the French coasts over the past 15 y (Goulletquer et al. 1998, Soletchnik et al. 1999). The syndrome is known as summer mortality and is generally associated with temperatures above 19°C and coincides with the period of gonad maturation. Some authors suggest that mortalities occurring in the Pacific oyster are the result of multiple factors, including elevated temperatures, physiological stress associated with gonadal maturation, genetic, aquaculture practices, pathogens, and pollutants (Samain et al. 2007, Dégremont et al. 2005). Another stress resulting from the close proximity to the bottom sediment has also been recorded and has been shown to affect growth and survival of oysters (Soletchnik et al. 1999, 2006). Sediment is often hypoxic, but the highest oxygen demand can be in the water close to the bottom (Diaz & Rosenberg, 1995). Hypoxia favors the production of toxic substances such as sulphides and ammonia in the sediment, and their appearance is synchronous with the mortality episodes. The seasonal character of ammonium and sulphide as well as the contributions of herbicides, domestic and agricultural manuring, represent a potential source of stress in the oyster zone and coincide with the period of mortality of oysters. Separately or in combination, these factors become noxious for oysters. This kind of problem can be illustrated in many areas.

For example, anoxic crises occur in summer in the lagoon of Thau (Hérault, France) close to the Mediterranean Sea. The core of the anoxia develops with the production of hydrogen sulphide. The sulphide concentrations are high in anoxic water reaching 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$  at the bottom (Chapelle et al. 2001). In the Chesapeake Bay on the east coast of the United States, sulphide values of surface sediment reach 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  to 2,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 43  $\mu\text{mol L}^{-1}$  in the bay water (Roden & Tuttle 1992). Similarly, in deep water off Rhode Island, the sulphide levels may reach 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Kennett & Hargraves 1985).

From a physiological point of view, sulphide exposure increases the susceptibility of organisms to other environmental stressors. The reduction of feeding activity and oxygen consumption is a frequently observed response to hypoxia and sulphide exposure in invertebrates (Sobral & Widdows 1997, Encomio 1998, Hicks & McMahon 2002). For some species, the metabolic depression caused by the switch from aerobic to anaerobic energy production, which has a lower energy yield is caused by hypoxia and anoxia (Shick et al. 1986, De Zwaan et al. 1991) or to sulphide exposure (Encomio 1998, Laudien et al. 2002). The metabolic switch is controlled by several means such as the phosphorylation of PK (Simpfendorfer et al. 1997, Greenway & Storey 1999), 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. At the mitochondrial level, the synthesis and degradation of the macroenzymes of the electron transport system (ETS) is a

\*Corresponding author. E-mail: Gilles.Le.Moullac@ifremer.fr

function of the respiratory requirements of marine organisms (Owens & King 1975).

The purpose of this study was to examine the adaptation levels of the oyster *C. gigas* to sulphide. Two experiments were carried out. The first was to measure for 20 h the clearance and oxygen consumption rates of oysters subjected to different concentrations of sulphide. The second was done to evaluate the metabolic adaptation to chronic sulphide intoxication for 10 days by measuring PK and PEPCK enzyme activities as well as alanine, succinate and lactate content in whole oysters. The adenylate energy charge (AEC) was measured, and the activity of the respiratory chain was evaluated by measuring the electron transport system (ETS) activity (Madon et al. 1998, Fanslow et al. 2001). Lastly, this study was designed to determine the regulation level of PK and PEPCK by analyzing the mRNA levels and enzymatic activities in the adductor muscle. The end products such as alanine, succinate and ATP were assayed to determine the metabolic status of the muscle.

## MATERIAL AND METHODS

### *Experiment 1: Dose Effect of Sulphide on Clearance and Oxygen Consumption Rates*

#### Biological Material

Oysters reared in Aber Wrach (Finistère, France) were collected in May 2006 and transported to the Ifremer Shellfish Laboratory located in Argenton (Finistère, France). They were acclimated to the laboratory conditions for one week in open-flow tanks before the experiments were carried out. Temperature, salinity, and oxygen were kept constant at 19°C, 35‰ and 7–8 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Phytoplankton was supplied at a concentration of approximately 30,000 cell mL<sup>-1</sup> of the unicellular algae *Isochrysis galbana*.

#### Incubation in the Presence of Sulphide

Stock solutions of hydrogen sulphide were prepared by dissolving Na<sub>2</sub>S 3H<sub>2</sub>O (Merck) in seawater in a 5-L plastic bottle and oxidation was prevented by bubbling nitrogen through the solution. The sulphide solutions were prepared to obtain the final concentrations that were assayed in the outflow: 3, 6, 12, 20, and 40 µM. Sulphide was continuously injected in the flow water supplying the measurement chambers (see later) using a peristaltic pump. The sulphide concentration was checked three times a day using a sulphide test adapted for seawater (Spectroquant kit from Merck). The different sulphide levels tested were constant over the time of the measurements of clearance and oxygen consumption rates.

#### Ecophysiological Measurement System

The laboratory is fitted with an ecophysiological system, which allows the simultaneous monitoring of the clearance rate (CR, L·h<sup>-1</sup>) and oxygen consumption rate (OC, mg O<sub>2</sub>·h<sup>-1</sup>) in 8 individual open-flow chambers of 0.8 L. Seven oysters were placed, successively, in one of the individual chambers. The eighth chamber was kept empty and used as a control. Flow rates in the individual chambers were constant and equal to 100 mL min<sup>-1</sup> of sea water filtered at 5 µm. The out-flowing water of each chamber was successively analyzed for phytoplankton (fluorescence) and oxygen concentrations, which were recorded each for 5 min continuously during 20 h.

CR, an indicator of feeding activity, is defined as the volume of water cleared of suspended particles per unit time. In this study, CR was estimated by using fluorescence recordings. CR was calculated as follows:  $(C1 - C2) \times FR$ . *C1* was the fluorescence level of the control chamber; *C2* was the fluorescence of the experimental chamber containing one oyster. *FR* was the flow rate. The OC rate is defined as the quantity of oxygen consumed by the animal per unit time (mg O<sub>2</sub>·h<sup>-1</sup>). Differences in the oxygen concentration between reference and experimental chambers can be used to calculate the OC rate, as follows:  $(O2 - O1) \times FR$ . *O1* was the oxygen level of the control chamber; *O2* was the oxygen level of the experimental chamber containing one oyster. CR and OC rate were thus calculated, and an average was calculated for each animal. To compare CR and OC rates on the same basis, it was necessary to correct for weight differences. At the end of each experiment oysters were freeze dried for 72 h, and their dry weight obtained. Physiological rate was then converted to a "standard" animal of 1 g tissue weight using the following equation:  $Y_s = (W_s/W_e)^b \times Y_e$ , where *Y<sub>s</sub>* is the physiological rate for an animal of standard weight, *W<sub>s</sub>* the standard weight (1g), *W<sub>e</sub>* the observed weight of the animal (g), *Y<sub>e</sub>* the uncorrected (measured) physiological rate, and *b* the weight exponent for the physiological rate function. The average *b* weight exponents are 0.66 and 0.75 for CR and OC respectively in bivalves (Savina & Pouvreau 2004).

### *Experiment 2: Effect of Chronic Exposure to Sulphide During Conditioning*

#### Biological Material and Experimental Design

The experiment was performed in June 2006. Oysters collected in south Brittany (La Trinité sur mer, Morbihan) were placed in 300-L experimental tanks supplied with 80 L h<sup>-1</sup> of 20 µm-filtered running seawater. The average mean weight of oysters was 6.88 ± 0.9 g. Eight hundred oysters were placed in each tank and were first adapted for one week to the laboratory temperature of 19°C and fed with an algal diet composed of *Isochrysis* at a daily ration close to saturation level. The medium was continuously homogenized using an immersed pump. Two different conditions were tested for 10 days: (1) 4 control tanks, where oysters were kept in air saturated seawater and fed; (2) 4 experimental tanks, where oysters were exposed to sulphide and fed. To limit the impact of oxygen on sulphides, the air-water interface was blocked with sheets of floating PVC covering 95% of surface. Mortality was checked daily in each tank. Recordings were made on day 0, 2, 4, and 10 for metabolic parameters in whole oyster and gene expression measurements in adductor muscle. Eight replicates of 6 pooled whole oysters were prepared, frozen immediately, and stored in liquid nitrogen. Frozen pooled oyster were then powdered with a Danguoumeau grinder and stored in liquid nitrogen. For gene expression and enzyme activity measurements, muscle were dissected, frozen immediately, 8 replicates of 6 pooled muscle were prepared, powdered with a Danguoumeau grinder and stored in liquid nitrogen.

#### Sulphide Exposure

Daily, 2g of Na<sub>2</sub>S 3H<sub>2</sub>O (Merck) were dissolved in seawater and put directly in the 300 L tanks in which sulphide concentration was increased to 50 µM. To prolong sulphide exposure, 50 L of 3 mM sulphide were prepared each day by dissolving

20 g of Na<sub>2</sub>S 3H<sub>2</sub>O in sea water and stored in a plastic bottle; oxidation was prevented by bubbling nitrogen through the solution. Sulphide was continuously supplied to the tanks using a peristaltic pump. The sulphide concentration was measured three times a day using the Spectroquant kit from Merck for sulphide. The immersed pumps ensured the homogenization of sulphides in the medium. Because of the large volume of the tanks, it was difficult to maintain the sulphide concentration of the water within precise limits. Nevertheless, the procedure used ensured that the oysters were exposed to sulphide concentration above 20 µM for at least 5 h each day.

#### PK and PEPCK Activities

Powdered frozen tissues were used for the enzyme assays. 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 Na<sub>3</sub>F, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, and 15 mM 2-mercaptoethanol. A few crystals of phenylmethylsulfonyl (PMSF) were added immediately prior to homogenization. The homogenates were centrifuged for 20 min at 20 000 g at 5°C. Assays were conducted at 30°C and initiated by mixing the 230 µL reagent preparation, with the homogenate (20 µL). The preparation for Pyruvate kinase (PK; EC 2.7.1.40) was as follows: 100 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.2), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM phosphoenol pyruvate, 2 mM ADP, 0.15 mM NADH, 0.2% (v/v) rotenone-saturated ethanol, and 1 U/mL LDH. For Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK; EC 4.1.1.32) the preparation was: 100 mM imidazole-HCl buffer (pH 6.6), 30 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM phosphoenolpyruvate, 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM IDP, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.15 mM NADH, and 2.5 U/mL MDH. Blanks were run and subtracted. Changes in NAD(P)H absorbance at 340 nm were monitored using a Biotek Microplate Reader.

#### Total RNA Extraction, cDNA Synthesis and PK and PEPCK mRNA Expression

Total RNA was isolated using Extract-all reagent (Eurobio) at a concentration of 1 mL/50 mg tissue. Samples were then treated with DNase I (Sigma) (1 U/µg RNA) and precipitated by sodium acetate (3M, pH 5.2) treatment followed by washing with absolute ethanol. 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 × 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.

Amplification of *elongation factor 1* cDNA (EFI) (Fabioux et al. 2004) was performed to confirm the steady-state level of expression of a housekeeping gene, providing an internal control for PK and PEPCK gene expression (Le Moullac et al. 2007a). The specific primers were synthesized as follows: (PK) PKHui1, 5'-ACATGATTTTCGCGTCCTTC-3'; PKHui2R, 5'-TCTCTGGGGAATCTCAATG-3'; (PEPCK) PEPCKPEPH1, 5'-CATGGCGTCATGGTTGGA GC-3', PEPCKPEPH2R, 5'-GTCAAGCCAGTGCTGT AGG-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 (Biorad). This reaction was performed as follows: activation at 95°C for 5 min followed by 45 cycles of 30 sec at 95°C, 1 min at 60°C, and a melting curve program from 95°C to 70°C that decreased the temperature by 0.5°C every 10 sec. 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. mRNA expression levels were calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method (Livak & Schmittgen 2001). The relative expression of a target gene (PK, PEPCK) was calculated based on the  $C_t$  deviation of this target gene versus the reference gene (EFI) and normalized to the positive control to avoid bias between the PCR. The  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  was calculated as follow:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t1} - \Delta C_{t2}$$

where  $\Delta C_{t1}$  =  $C_t$  sample (target gene) –  $C_t$  control (target gene)

and  $\Delta C_{t2}$  =  $C_t$  sample (EFI gene) –  $C_t$  control (EFI gene).

The relative quantification value (Qr) was then expressed as  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

#### Electron Transport System Activity

ETS activity was determined following the method of Owens and King (1975), where INT-tetrazolium is reduced to the optically active INT-Formazan when substituted for oxygen as the terminal electron acceptor. Reagents were freshly made and kept on ice and all assay procedures were carried out in an ice bath. Tissue powder was removed from liquid nitrogen storage, placed in ETS B solution (75 µM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1.5 mg mL<sup>-1</sup> polyvinylpyrrolidone, and 0.2% (v:v) Triton X-100 in 0.1 M phosphate buffer pH 8.5) and sonicated. Then samples were centrifuged for 15 min (4°C, 3000g). One hundred and fifty microliters supernatant were transferred in another tube to which 400-µL substrate solution (1.2 mg mL<sup>-1</sup> NADH, 0.2 mg mL<sup>-1</sup> NADPH in ETS B solution) and 250-µL INT solution (2 mg mL<sup>-1</sup> INT-tetrazolium in double distilled water pH 8.5) were added. Reactions were recorded spectrophotometrically at 490 nm for 20 min at 30°C. The absorbance value was corrected using turbidity blank.

#### Adenylate Energy Charge, Alanine, Succinate, and Lactate Determination

Metabolites and nucleotides were extracted from 200 mg of the oyster powder prepared 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). Extracted nucleotides were analyzed by high-performance liquid chromatography on a reverse phase column with a counter-ion (tributylamine). AEC was calculated as follows: AEC = (ATP + 0.5 ADP)/(ATP + ADP + AMP) (Moal et al. 1991).

Alanine was measured enzymatically according to standard procedures as described by Williamson (1974). Succinate was quantified with the succinate determination kit of R-Biopharm Inc. (Marshall, MI, USA).



### Statistics

A one-way ANOVA followed by a Fisher test was used to determine the effect of sulphide concentration on the clearance and respiration rates of oysters. Concerning the impact of the chronic sulphide exposure for 10 days, a one-way ANOVA followed by Fisher test was used to determine if individual time point means differed from day 0 means within each oxygen level group. T-tests were used to determine the differences between means of control and sulphide group at each time point.

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. Statistical analyses were performed using Statview (SAS).

## RESULTS

### Experiment 1: Dose Effect of Sulphide on Clearance Rate and Oxygen Consumption

Filtration rate was significantly reduced at sulphide concentrations between 6  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$  then stopped at concentrations over 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 1a). The adaptation of oxygen uptake of oysters to sulphide exposure revealed three steps using the *post hoc* test rank of Fisher (1) to low dose tested, at 3 and 5  $\mu\text{M}$  sulphide, the oysters increased their oxygen uptake signifi-

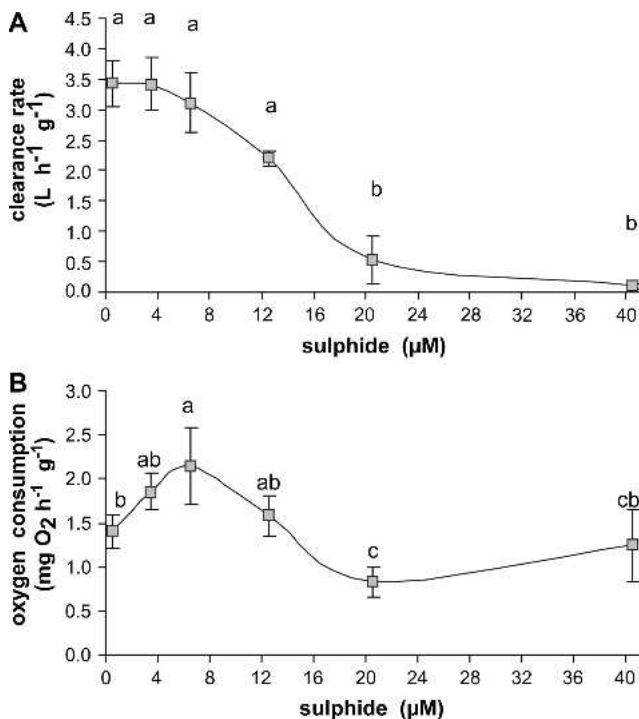


Figure 1. The effects of sulphide concentration on clearance rate (a), and oxygen consumption (b) of the oyster *C. gigas*. Results are means  $\pm$  SE,  $n = 7$ .

cantly, (2) at 12 and 20  $\mu\text{M}$ , the oxygen consumption decreased significantly, (3) then between 20 and 40  $\mu\text{M}$  oxygen uptake remained stable (Fig. 1b).

### Experiment 2: Effect of Chronic Exposure to Sulphides During Conditioning

#### Mortality

The mortality of oysters exposed to sulphide was significantly higher ( $P < 5\%$ ) than among control oysters. After 10 days of exposure to sulphide, the mortality of oysters was  $53 \pm 16.4\%$  whereas the mortality of control oysters was  $35 \pm 2.5\%$ . The mortality of sulphide-exposed oysters occurred precisely between days 4 and 6 (Fig. 2).

#### PK and PEPCK Enzyme Activity in the Whole Oysters

Chronic exposure to sulphide for 10 days induced a significant decrease of PK activity in whole oysters compared with control oysters (Fig. 3a). As early as day 2, PK activity in sulphide exposed oysters decreased significantly and values were reduced by half at day 2, 4, and 10. PK activity in control oysters was significantly lower at day 2, 4, and 10 than at day 0. PEPCK differed significantly at the 5% level (T-test) from that of control oysters only after 10 days of sulphide exposure (Fig. 3b).

#### Metabolite Content and AEC in the Whole Oysters

Chronic exposure to sulphide induced a significant increase of the alanine content in sulphide exposed whole oysters at day 4 ( $P < 5\%$ ). Succinate content did not change with sulphide exposure (Table 1). A comparison of AEC means showed significant differences at day 2 and 4 between control and sulphide exposed oysters ( $P < 5\%$ ) (Table 1).

#### ETS Activity in the Whole Oysters

The activity of the electron transport system decreased significantly in oyster exposed to sulphide for 10 days. The comparison of ETS means showed a significant difference at day 2 and 4 between control and sulphide exposed oysters ( $P < 5\%$ ). A significant decrease was recorded between the ETS mean at day 0 and ETS means at day 2 and 4 ( $P < 5\%$ ) (Fig. 4).

#### Regulation Level of the PEP Branchpoint in the Adductor Muscle

##### PK Gene Expression and Enzyme Activity

Chronic exposure to sulphide for 10 days did not induced a significant effect on PK mRNA values despite a slight increase

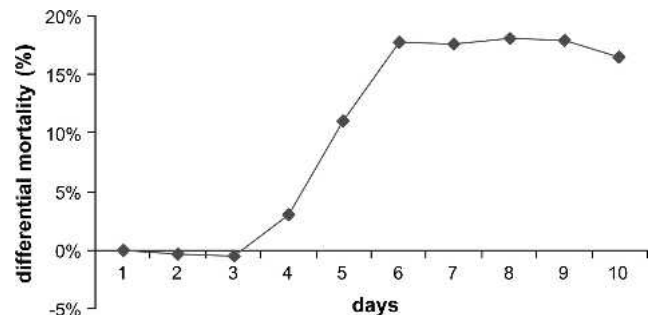
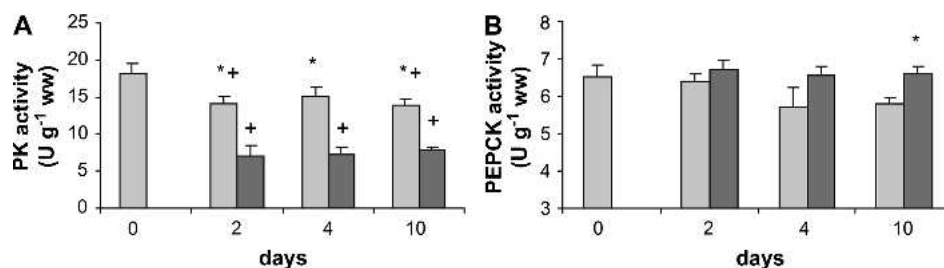


Figure 2. Differential mortality between sulphide and control treatments.



**Figure 3.** The effects of sulphide on (a) PK and (b) PEPCK enzyme activity in whole oyster. Control (grey) and sulphide (dark). Results are means  $\pm$  SE,  $n = 8$ . \*, significant difference ( $P < 0.05$ ) relative to day 0 within each group. +, significant difference ( $P < 0.05$ ) between control and sulphide at each sampling day.

in muscle of oyster exposed to sulphide (Fig. 5a). At enzyme level, sulphide exposure induced a significant decreased of PK enzyme activity in the adductor muscle (Fig. 5b). The Student *t*-test showed significant differences ( $P < 5\%$ ) between control and sulphide at day 2, 4, and 10.

The *elongation factor I*, used as an internal control for gene expression, did not revealed significant differences at the 5% level between treated and non-treated oysters (Student *t*-test).

#### PEPCK Gene Expression and Enzyme Activity

PEPCK gene expression was significantly upregulated in the adductor muscle of oyster exposed to sulphide. The PEPCK mRNA values in the adductor muscle increased significantly (Fig. 5c). The student *t*-test showed significant temporal changes leading to the increase of PEPCK mRNA value from day 0 to day 10 ( $P < 5\%$ ) (Fig. 5c). The student *t*-test showed also a significant increase of PEPCK mRNA value ( $P < 5\%$ ) in sulphide treatment at day 2 (Fig. 5c). At enzyme level, the exposure to sulphide did not change significantly the level of the PEPCK activity.

#### Metabolite and Energy Production in the Adductor Muscle

The alanine accumulated significantly in the muscle. The student *t*-test revealed that the alanine accumulation was significantly higher ( $P < 5\%$ ) at day 2 and 4 (Table 2). In the same way, succinate accumulated significantly in the muscle. The student *t*-test revealed that the succinate accumulated significantly ( $P < 5\%$ ) at day 2 and 4 (Table 2). ATP production decreased significantly in adductor muscle of oyster exposed to sulphide. The student *t*-test revealed that the ATP content remained significantly lower ( $P < 5\%$ ) from day 2 to day 10 (Table 2).

#### Kinetic properties of PK

Sulphide exposure led to significant change in the kinetic properties of PK enzyme activity in muscle. The PEP affinity constant ( $S_{0.5}$ ) was significantly ( $P < 5\%$ ) reduced by 1.6 fold (Table 3). PK enzyme activity from muscle of oyster exposed to sulphide also showed much greater inhibition by L-alanine, with the  $I_{50}$  value reduced to only 33% of the corresponding control value.

## DISCUSSION

#### Sulphide Affects Ecophysiological Behavior

Our results showed that oysters are able to react to sulphide exposures at several biological scales. Clearance rate and oxygen consumption were progressively affected by exposure to sulphide. Changes in oxygen consumption rate were recorded over the range of sulphide concentration tested for 20 h, but feeding stopped at concentrations above 20  $\mu\text{M}$  showing that oxygen consumption was driven independently of the mechanism of microalgae retention. Sulphide acted on *C. gigas* like hypoxia to cut hunger (Le Moullac et al. 2007a, 2007b).

The pattern of oxygen uptake according to the increase of sulphide concentration was first an increase up to a concentration of 6  $\mu\text{M}$ . A negative energy budget could be fear at the low doses of sulphide when the OC was accelerated, whereas feeding remained constant. Then the oxygen uptake decreased slightly to reach a mean oxygen uptake of approximately 1  $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  at sulphide concentration between 12 and 40  $\mu\text{M}$ . This may be caused by oxygen being used to oxidize sulphide entering the tissues rather than to an actual increase of the metabolic rate of the tissues (Johns et al. 1997, Hauschild & Grieshaber 1997). An increase in the rate of oxygen consumption during exposure to

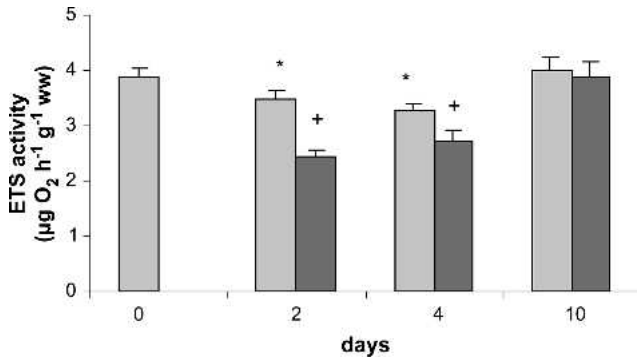
TABLE 1.

Alanine, succinate content and AEC in control and oyster exposed to sulphide during 10 days ( $n = 8$ , means  $\pm$  SE).

Days	Alanine ( $\mu\text{M g}^{-1} \text{ ww}$ )		Succinate ( $\mu\text{M g}^{-1} \text{ ww}$ )		AEC	
	Control	Sulphide Exposed	Control	Sulphide Exposed	Control	Sulphide Exposed
0	17.23 $\pm$ 1.69		1.98 $\pm$ 0.31		0.811 $\pm$ 0.006	
2	16.30 $\pm$ 1.47	18.12 $\pm$ 1.52	2.23 $\pm$ 0.14	2.46 $\pm$ 0.20	0.803 $\pm$ 0.005*	0.759 $\pm$ 0.017+
4	14.80 $\pm$ 1.19	24.52 $\pm$ 1.68 <sup>+</sup> *	1.18 $\pm$ 0.16	1.73 $\pm$ 0.26	0.817 $\pm$ 0.006*	0.764 $\pm$ 0.015+
10	12.79 $\pm$ 1.37	13.78 $\pm$ 0.66	1.65 $\pm$ 0.28	1.32 $\pm$ 0.22	0.807 $\pm$ 0.004	0.792 $\pm$ 0.008

+, significant difference ( $P < 0.05$ ) relative to day 0 within each group.

\*, significant difference ( $P < 0.05$ ) between control and sulphide at each sampling day.



**Figure 4.** The effects of sulphide on ETS activity in whole oyster. Control (grey) and sulphide (dark). Results are means  $\pm$  SE,  $n = 8$ . \*, significant difference ( $P < 0.05$ ) relative to day 0 within each group. +, significant difference ( $P < 0.05$ ) between control and sulphide at each sampling day.

low concentrations of sulphide has been already recorded in several marine invertebrates (Eaton & Arp 1993, Johns et al. 1997) whereas in others the oxygen consumption rate remained constant (Encomio 1998, Christensen & Colacino 2000).

#### *Oyster Exposed to Sulphide Exhibited Partially an Anaerobic Metabolism*

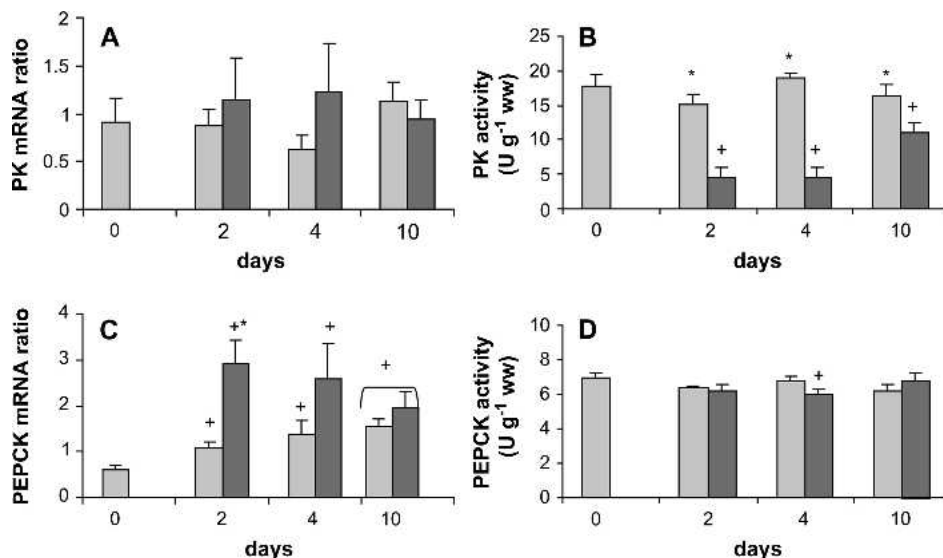
At the cellular level, our results showed the whole organism is partially involved towards an anaerobic metabolism of energy production. Sulphide exposure of oysters resulted in higher mortality, reduced the glycolytic flux by inhibiting the PK activity. Alanine content increased only on day 4 and we failed to detect any accumulation of succinate in sulphidic whole oysters. ETS activity decreased leading to a lower AEC. At day 10, a kind of recovery took place in the respiratory chain: the ETS activity and AEC of oysters exposed to sulphide increased to the level of the control oysters.

During extended sulphide exposure an aerobic-based metabolism cannot be sustained. Indeed, worms *Arenicola marina*

(Hauschild & Grieshaber 1997), *Urechis caupo* (Encomio 1998), clams *Mulinia lateralis*, and *Donax serra* (Shumway et al. 1983, Laudien et al. 2002), and the crustacean *Cyprideis torosa* (Jahn et al. 1996) exposed to sulphide exhibited an anaerobic metabolism, showing a decrease of total glycogen phosphorylase enzyme activity (Oeschger & Storey 1993), and an increase of alanine (Oeschger & Storey 1993, Encomio 1998, Laudien et al. 2002) and succinate production (Oeschger & Pedersen 1994, Encomio 1998, Laudien et al. 2002). The polychaete worm *A. marina* kept under normoxic conditions became anaerobic in the presence of 25  $\mu$ M sulphide (Hauschild & Grieshaber, 1997) that was close to the 20  $\mu$ M threshold where clearance rate decreased in *C. gigas* in the first experiment of this study.

#### *Muscle of Oyster Exposed to Sulphide Exhibited a Wholly Anaerobic Metabolism*

In muscle of oyster exposed to sulphide, the anaerobic pathway of energy production was clearly marked: inhibition of PK enzyme activity, increase of alanine and succinate followed by a decrease of ATP content during the 10 days sulphide exposure. However, the PEPCK enzyme activity was not stimulated. Sulphide did not affect the transcriptional level of PK; PK was only regulated at enzyme level. The nutritional restriction of oyster exposed to sulphide stimulated alanine production in muscle like fasting in vertebrate and invertebrate (Müller et al. 1971, Okama & Abe, 1998). Alanine is linked to the mechanism of PK inhibition, consisting in covalent modification *via* phosphorylation mechanism that greatly increases PK enzyme inhibition by alanine (Plaxton & Storey 1984, Storey 1993). Conversely, PEPCK was regulated only at transcriptional level. Nutritional restriction acts on PEPCK by inducing gene expression (Lemaigre & Rousseau 1994), because PEPCK gene expression is negatively linked to glucose (Meyer et al. 1991). But, the absence of change in PEPCK activity could be attributed to a loss of efficiency in the ARNm translation caused by sulphide.



**Figure 5.** Variation of PK and PEPCK mRNA ratio (relative to Elongation factor I) and enzyme activity in muscle in normoxia (grey) and sulphide exposed (dark). PK mRNA ratio (A), PK activity (B), PEPCK mRNA (C) ratio and PEPCK activity (D). Results are means  $\pm$  SE,  $n = 8$ . \*, significant difference ( $P < 0.05$ ) relative to day 0 within each group. +, significant difference ( $P < 0.05$ ) between control and sulphide at each sampling day.

TABLE 2.

Alanine, succinate and ATP content in the adductor muscle of control and oyster exposed to sulphide during 10 days ( $n = 8$ , means  $\pm$  SE).

Days	Alanine ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ww)		Succinate ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ww)		ATP ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ww)	
	Control	Sulphide Exposed	Control	Sulphide Exposed	Control	Sulphide Exposed
0	13.55 $\pm$ 1.21		1.68 $\pm$ 0.36		3.25 $\pm$ 0.34	
2	11.60 $\pm$ 0.82	16.22 $\pm$ 1.02*	1.17 $\pm$ 0.21	2.63 $\pm$ 0.34*	2.69 $\pm$ 0.15	1.85 $\pm$ 0.17**
4	10.63 $\pm$ 0.52 <sup>+</sup>	15.68 $\pm$ 1.52*	0.99 $\pm$ 0.20	1.85 $\pm$ 0.20*	2.44 $\pm$ 0.10 <sup>+</sup>	1.80 $\pm$ 0.14**
10	10.81 $\pm$ 0.68	10.82 $\pm$ 0.70	0.89 $\pm$ 0.18	1.22 $\pm$ 0.22	2.76 $\pm$ 0.09	2.45 $\pm$ 0.09**

<sup>+</sup>, significant difference ( $P < 0.05$ ) relative to day 0 within each group.

<sup>\*</sup>, significant difference ( $P < 0.05$ ) between control and sulphide at each sampling day.

### Tolerance and Adaptation of Oyster to Sulphides

Results lead to the conclusion that the physiology of the oyster can be severely affected by sulphide exposure. Sulphide exposure increases the susceptibility of organisms to other environmental stressors and the mortality rate of marine invertebrates increases when exposed to sulphide (Laudien et al. 2002, Robohm et al. 2005). This fact was confirmed in our experiment by the high mortality rates demonstrating the toxicity of sulphide for oyster. Organisms inhabiting sulphide contaminated environments have developed strategies to cope with sulphide. The long-term exposure of *C. gigas* to sulphide had as consequence a type of recovery where the activity of the respiratory chain became again normal that could favor the setting of a sulphide detoxification mechanism. In sulphidic areas, survival of *Arctica islandica* is because of the combination of several mechanisms where at cellular level glutathione oxidizes sulphide, and where in blood L-cysteine reactivates enzymes inhibited by sulphide (Butterworth et al. 2004). Otherwise, the tolerance of sulphide would also be caused by a better protection of cytochrome c oxidase by slower sulphide diffusion into the tissues (Jahn & Theede 1997).

### Sulphide, an Environmental Stressor Partially at the Origin of Summer Mortalities?

Our study establishes several factors that are important in helping us to obtain a better understanding of mortality events in the field. The significant mortality of control oysters must be judged within the context of summer mortalities (Gouletquer et al. 1998, Samain et al. 2007). The thermal and physiological

conditions were able to trigger mortality: the temperature was 20°C and the oysters were ripe (Soletchnik et al. 1999). In this study, we showed that sulphide may cause mortalities among cultivated oysters and could result from sulphide diffusing from the sediment into the water column. Indeed, keeping oysters in close proximity to the sediment decreases their survival and their growth rate, reduces the storage ability of energy compounds such as lipids and glycogen (Soletchnik et al. 1999, 2006), and alters the defense system (Gagnaire et al. 2006). Our study showed that sulphide exposure resulted in oyster adopting an anaerobic metabolism of energy production, whereas they needed oxygen for detoxification of sulphide compounds.

To conclude, this study has shown the effects of differing concentrations of sulphide on oysters. Firstly, the oxygen uptake was maintained, whereas filtration stopped, probably indicating that oxygen was used by the organism to detoxify sulphide by oxidation to thiosulphate. This assumption seems correct regarding the metabolic pathways. Indeed, the oysters exposed to the sulphide were anaerobic as shown by the inhibition of PK and the stimulation of PEPCK. PK and PEPCK were differentially regulated, PK was regulated at the protein level whereas PEPCK at gene level. The mechanism of PEPCK translation of mRNA into an active protein should be elucidated. At the mitochondrial level, there was a two-stage response. Firstly, the rapid reduction in the ETS activity implied a decrease in ATP production. Secondly after 10 days, a type of recovery took place, which could result in a better detoxification capacity of the organism, whereas the anaerobic state was able to maintain a supply of energy. Further studies should be carried out to detect and quantify the metabolic end products of sulphide detoxification. These compounds are useful markers of sulphide exposure. The mechanisms controlling sulphide tolerance to sulphide in this species and those which allow the gills to continue to take up oxygen even though feeding stops should be elucidated.

TABLE 3.

Kinetic properties of PK from adductor muscle of *Crassostrea gigas* control and exposed to sulphide.

	Control	Sulphide Exposed
S <sub>0.5</sub> PEP mM	0.33 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
I <sub>50</sub> L-alanine mM	11.33 $\pm$ 2.12	3.78 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>

The results are given as means  $\pm$  SE ( $n = 15-18$ ).

All parameters were determined at 2 mM ADP. I<sub>50</sub> L-alanine was determined at 5 mM PEP.

<sup>a</sup> Significantly different from control.

### ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Moresst national project funded by Ifremer, the Régions of Basse Normandie, Bretagne, Pays de Loire and Poitou-Charentes and the Conseil Général du Calvados. The authors also thank Michel Mathieu, director of the UMR 100, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins and Alan C. Taylor for improving the English in this paper.

## LITERATURE CITED

- Butterworth, K. G., M. K. Grieshaber & A. C. Taylor. 2004. Sulphide detoxification in the bivalve, *Arctica islandica* (L.) from two different habitats. *Ophelia* 58:101–113.
- Chapelle, A., P. Lazure & P. Souchu. 2001. Modélisation numérique des crises anoxiques (malaïgues) dans la lagune de Thau (France). *Oceanologica Acta* 24:87–97.
- Christensen, A. B. & J. M. Colacino. 2000. Respiration in the burrowing brittlestar, *Hemipholis elongate* Say (Echinodermata, Ophiuroidea): a study of the effects of environmental variables on oxygen uptake. *Comp. Biochem. Physiol.* 127:201–213.
- Dégremont, L., E. Bédier, P. Soletchnik, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, J. F. Samain & P. Boudry. 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 Zwaan, A., P. Cortesi, G. van den Thillart, J. Roos & K. B. Storey. 1991. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: a biochemical analysis. *Mar. Biol.* 111:343–351.
- Diaz, R. J. & R. Rosenberg. 1995. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Ocean. Mar. Biol.: an Annual Review* 33:245–303.
- Eaton, R. A. & A. J. Arp. 1993. Aerobic respiration during sulphide exposure in the marine echiuran worm *Urechis caupo*. *Physiol. Zool.* 66:1–19.
- Encomio, V. G. 1998. Respiratory and metabolic response to sulfide and hypoxia in the marine echiuran worm, *Urechis caupo*. San Francisco State University, Thesis, 74 pp.
- Fabioux, C., A. Huvet, C. Lelong, R. Robert, S. Pouvreau, J. Y. Daniel, C. Mingant & M. Le Pennec. 2005. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320:592–598.
- Fanslow, D. L., T. F. Nalepa & T. H. Johengen. 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia* 448:61–70.
- Gagnaire, B., P. Soletchnik, P. Madec, P. Geairon, O. Le Moine & T. Renault. 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oléron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 254:606–616.
- Gouletquer, P., P. Soletchnik, O. Le Moine, D. Razet, P. Geairon, N. Fauray & S. Taillade. 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). *Cons. Int. Explor. Mer*, CM 1998/CC 14, 20 p.
- Greenway, S. C. & K. B. Storey. 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, S. C. & K. B. Storey. 2000. Seasonal change and prolonged anoxia affect the kinetic properties of phosphofructokinase and pyruvate kinase in oysters. *J. Comp. Physiol.* 170B:285–293.
- Hauschild, K. & M. K. Grieshaber. 1997. Oxygen consumption and sulfide detoxification in the lugworm *Arenicola marina* (L.) at different ambient oxygen partial pressures and sulfides concentrations. *J. Comp. Physiol.* 167B:378–388.
- Hicks, D. W. & R. F. McMahon. 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.
- Jahn, A., I. Gamenick & H. Theede. 1996. Physiological adaptations of *Cyprideis torosa* (Crustacea, Ostracoda) to hydrogen sulphide. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142:215–223.
- Jahn, A. & H. Theede. 1997. Different degrees of tolerance to hydrogen sulfide in populations of *Macoma balthica* (Bivalvia, Telinidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 154:185–196.
- Johns, A. R., A. C. Taylor, R. J. A. Atkinson & M. K. Grieshaber. 1997. Sulphide metabolism in Thalassinidean Crustacea. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 77:127–144.
- Kennett, D. & P. E. Hargraves. 1985. Benthic diatoms and sulfide fluctuations: upper basin of Pettaquamscutt River, Rhode Island. *Est. Coast. Shelf. Science* 21:577–586.
- Laudien, J., D. Schiedek, T. Brey, H. O. Portner & W. E. Arntz. 2002. Survivor of juvenile clams *Donax serra* (Bivalvia, Donacidae) exposed to severe hypoxia and hydrogen sulphide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 271:9–23.
- Lemaigre, F. P. & G. G. Rousseau. 1994. Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem. J.* 303:1–14.
- Le Moullac, G., H. Bacca, A. Huvet, J. Moal, S. Pouvreau & A. Van Wormhoudt. 2007a. 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.
- Le Moullac, G., I. Quéau, P. Le Souchu, S. Pouvreau, J. Moal, J. R. Le Coz & J. F. Samain. 2007b. Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature. *Mar. Biol. Res.* (in press).
- Livak, K. J. & T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> method. *Methods* 25:402–408.
- Madon, S. P., D. W. Schneider & J. A. Stoeckel. 1998. *In situ* estimation of zebra mussel metabolic rates using the electron transport system (ETS) assay. *J. Shellfish Res.* 17:195–203.
- Meyer, S., W. Höppner & H. J. Seitz. 1991. Transcriptional and post-transcriptional effects of glucose on liver phosphoenolpyruvate-carboxykinase gene expression. *Eur. J. Biochem.* 202:985–991.
- Moal, J., J. R. Le Coz, J. F. Samain & J. Y. Daniel. 1991. Adenylate energy charge: a possible trophic index for management of oyster intensive aquaculture. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C:201–205.
- Müller, W. A., G. R. Faloona & R. H. Unger. 1971. The effect of alanine on glucagon secretion. *J. Clin. Invest.* 50:2215–2218.
- Oeschger, R. & K. B. Storey. 1993. Impact of anoxia and hydrogen sulphide on the metabolism of *Arctica islandica* L. (Bivalvia). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 170:213–226.
- Oeschger, R. & T. F. Pedersen. 1994. Influence of anoxia and hydrogen sulphide on the energy metabolism of *Scrobicularia plana* (da Costa) (Bivalvia). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 184:255–268.
- Okama, E. & H. Abe. 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.
- Owens, T. G. & F. D. King. 1975. The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.* 30:27–36.
- Plaxton, W. C. & K. B. Storey. 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.
- Robohm, R. A., A. F. J. Draxler, D. Wiczorek, D. Kapareiko & S. Pitchford. 2005. Effects of environmental stressors on disease susceptibility in American lobsters: a controlled laboratory study. *J. Shellfish Res.* 24:773–779.
- Roden, E. E. & J. H. Tuttle. 1992. Sulfide release from estuarine sediments underlying anoxic bottom water. *Limnol. Oceanogr.* 37:725–738.
- Samain, J. F., L. Dégremont, P. Soletchnik, J. Haure, E. Bédier, M. Ropert, J. Moal, A. Huvet, H. Bacca, A. Van Wormhoudt, M. Delaporte, K. Costil, S. Pouvreau, C. Lambert, V. Boulo, P. Soudant, J. L. Nicolas, F. Le Roux, T. Renault, B. Gagnaire, F. Geret, I. Boutet, T. Burgeot & P. Boudry. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster

- (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process. *Aquaculture* 268:227–243.
- Savina, M. & S. Pouvreau. 2004. A comparative ecophysiological study of two infaunal filter-feeding bivalves: *Paphia rhomboids* and *Glycymeris glycymeris*. *Aquaculture* 239:289–306.
- Simpfendorfer, R. W., M. V. Vial & A. Monjálve. 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.
- Shick, J. M., E. Gnaiger, J. Widdows, B. L. Bayne & A. de Zwann. 1986. Activity and metabolism in the mussel *Mytilus edulis* L. during intertidal hypoxia and aerobic recovery. *Physiol. Zool.* 59:627–642.
- Shumway, S. E., T. M. Scott & J. M. Shick. 1983. The effects of anoxia and hydrogen sulphide on survival, activity and metabolic rate in the coot clam, *Mulinia lateralis* (Say). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 71:135–146.
- Sobral, P. & J. Widdows. 1997. Influence of hypoxia and anoxia on the physiological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Mar. Biol.* 127:455–461.
- Soletchnik, P., O. Le Moine, N. Fauray, D. Razet, P. Geairon & P. Gouletquer. 1999. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oléron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquat. Living Resour.* 12:131–143.
- Soletchnik, P., N. Fauray & P. Gouletquer. 2006. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). *Aquaculture* 252:328–338.
- Storey, K. B. 1993. Molecular mechanism of metabolic arrest in molluscs. In: P. W. Hochachka, P. L. Lutz, T. Sick, M. Rosenthal, G. van den Thillart, editors. *Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation*. Boca Raton: CRC Press. pp. 253–269.
- Williamson, D. H. 1974. Determination with alanine dehydrogenase. In: H. U. Bergmeyer, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 2. New York: Academic Press. pp. 1679–1682.

### 4. 3 Conclusions

Les huîtres *C. gigas* réagissent aux sulfures à plusieurs niveaux biologiques. Le système de rétention des microalgues est clairement affecté à partir de 20µM alors que la consommation d'oxygène persiste. La présence de sulfures accroît la mortalité comme nous avons pu le montrer dans la 2<sup>ème</sup> expérience. Au niveau cellulaire, les voies métaboliques des huîtres soumises aux sulfures sont plutôt orientées vers une voie de production d'énergie de type anaérobie pendant les premiers jours : inhibition de la PK, stimulation de la PEPCK avec accumulation d'alanine. Pendant cette première phase, l'inhibition de l'activité ETS de la chaîne respiratoire est associée à la baisse de la charge énergétique. L'exposition prolongée aux sulfures (10 jours) permet une sorte de récupération puisque l'activité ETS n'est plus inhibée. Ceci suggère une adaptation des huîtres aux sulfures en activant un système de détoxification par oxydation des sulfures en thiosulfate qui requière de l'oxygène (Johns et al. 1997, Hauschild and Grieshaber, 1997). Dans le muscle adducteur, la PK est régulée au niveau de l'enzyme par une augmentation de la sensibilité à l'alanine et une baisse de l'affinité pour le PEP. La régulation de la PEPCK est transcriptionnelle. Cependant, un problème post-transcriptionnel pourrait expliquer l'absence de changement de l'activité enzymatique de la PEPCK. Nos résultats montrent que les huîtres sont sévèrement affectées par les sulfures. Les voies de production d'énergie sont de type anaérobie mais le besoin en oxygène persiste pour la détoxification des sulfures.

---

## **Partie 5. Les spécificités des huîtres R et S**

---



## 4.1 Introduction

Le caractère génétique de la résistance aux mortalités estivales a été souligné chez de nombreux bivalves. Par exemple, la résistance des clams aux anoxies naturelles causées par les malaïgues des lagunes du Languedoc est positivement corrélée au niveau d'hétérozygotie de marqueurs enzymatiques (Borsa et al, 1992). Chez la moule *Mytilus edulis*, le bilan énergétique est associé à la survie dont l'origine génétique est suggérée par la corrélation négative entre le niveau d'hétérozygotie de marqueurs enzymatiques et les besoins métaboliques notamment la consommation d'oxygène (Tremblay et al. 1998a and 1998b).

Concernant l'huître *C. gigas*, le projet Morest a généré des recherches en génétique dont l'un des buts était d'évaluer les bases génétiques de la résistance à la mortalité estivale. Des lignées sélectionnées caractérisées pour leur sensibilité (S) ou leur résistance (R) ont ainsi été créées (Degrémont et al, 2006). De nombreuses études ont ainsi permis de préciser en partie la physiologie propre de chacune de ces lignées. Ainsi il a été montré que la sélection associe la mortalité des huîtres à l'effort de reproduction. Des lots de familles d'huîtres R et S élevées dans des environnements communs ont montré une forte différence phénotypique de gamétogenèse. Les huîtres sensibles présentaient un effort de reproduction exacerbé alors que les huîtres résistantes montraient un effort de reproduction modéré (Enriquez-Diaz, 2004). Les huîtres S émettent tardivement leurs gamètes et seules des pontes partielles ont été détectées, alors que les huîtres R ont des fortes émissions synchrones. L'effort de reproduction plus important des huîtres S engendre une consommation d'oxygène plus intense (Samain et al. 2007, Lambert et al. 2007). Face à un déficit en oxygène, les huîtres S augmentent leur synthèse de HSP70 suggérant une forte sensibilité au stress (Samain et al, 2007). Les résultats exposés dans ce chapitre permettent de poursuivre la caractérisation des huîtres R et S. Dans cette partie nous présentons les résultats spécifiques montrant les différences entre les R et les S.

## 4.2 Résultats

### 4.2.1 La filtration et la consommation d'oxygène en relation avec le niveau trophique

L'approche écophysiological individuelle permet de mieux appréhender les niveaux d'adaptation au plan de la filtration et surtout de la consommation d'oxygène. Les mesures de filtration et de consommation d'oxygène ont été réalisées entre 19 et 20°C pendant l'été 2005. L'algue unicellulaire *Isochrysis galbana* a été utilisée pour assurer la fourniture alimentaire. Les huîtres qui ont été utilisées sont des R et S de 1 an produites en 2004 à Ronce les bains. Les huîtres ont été adaptées 1 semaine aux conditions expérimentales.

L'analyse de variance à 2 facteurs révèle que la filtration ne varie pas significativement entre les 2 niveaux trophiques à 35000 et à 50000 cell/mL. De même qu'il n'apparaît pas d'effet de l'origine génétique des huîtres sur la capacité de filtration ( $F=0,22$ ,  $P=0,64$ ) (Figure 17a).

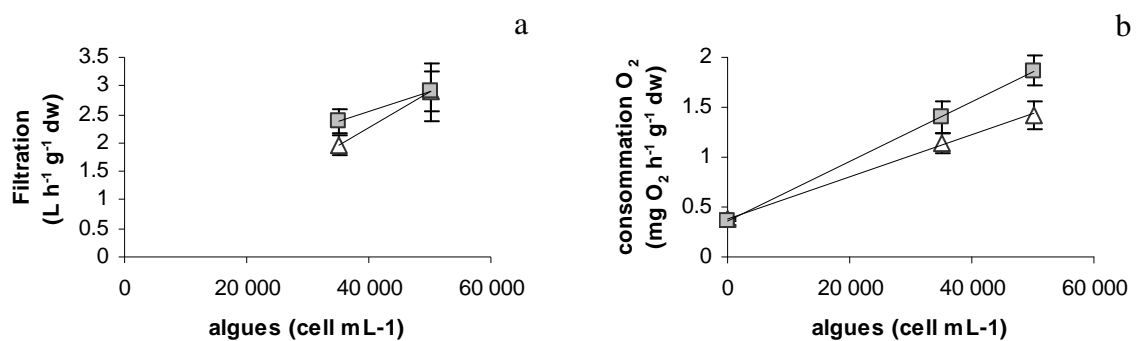


Figure 17: Filtration et consommation d'oxygène des huîtres S (carrés gris) et des huîtres R (triangles blancs) en relation avec le niveau trophique (0, 35000 et 50000 cell/ml) (moyenne±ES, n=14)

En revanche, la consommation d'oxygène augmente significativement en relation avec le niveau trophique ( $F=59,82$ ,  $P<0,0001$ ). Il apparaît aussi un effet lignée montrant que les huîtres S consomment significativement plus d'oxygène que les huîtres R ( $F=4,62$ ,  $P=0,035$ ) (Figure 17b).

## 4.2.2 Les budgets énergétiques

### *Hypoxie versus normoxie*

Les huîtres S entretiennent des stocks de lipides (F=9,48, P=0,0036) et de glucides (F=4,93, P=0,032) significativement plus importants que les huîtres R en normoxie et en hypoxie. L'hypoxie expérimentale a pour effet d'abaisser significativement les teneurs moyennes en protéines (F=21,42, P<0,0001), lipides (F=12,53, P=0,0009) et glucides (F=8,19, P=0,0064) des huîtres R et S. Il apparaît une interaction significative oxygène × lignée (F=4,457, P=0,040) montrant qu'en normoxie, le stock d'ATP est plus élevé chez les huîtres S que chez les huîtres R et qu'en hypoxie le stock d'ATP est plus élevé chez les huîtres R que les huîtres S. En normoxie, le bilan énergétique en terme d'ATP est en faveur des huîtres S, ce stock élevé d'ATP est associé à des stocks de glucides et de lipides plus importants que chez les huîtres R. En hypoxie, le stock d'ATP des huîtres S est significativement plus faible malgré des stocks de lipides et de glucides plus importants que chez les R (Tableau 4).

Tableau 4: valeurs moyennes de la teneur en protéines, lipides et glucides des huîtres entières R et S en normoxie et en hypoxie pendant la période expérimentale (moyenne±erreur standard)

Les stocks	Normoxie			Hypoxie		
	n	R	S	n	R	S
Protéines (mg g <sup>-1</sup> ww)	16	<b>74,27±1,98</b>	<b>72,96±2,30</b>	12	65,22±1,17	66,33±1,15
Lipides (mg g <sup>-1</sup> ww)	16	<b>19,74±0,83</b>	<b>21,68±0,83*</b>	12	15,50±0,64	19,51±1,50*
Glucides (mg g <sup>-1</sup> ww)	16	<b>15,18±0,51</b>	<b>16,71±1,17*</b>	12	12,02±0,85	14,58±1,09*
ATP (μM g <sup>-1</sup> ww)	16	0,885±0,046	0,988±0,031*	12	0,941±0,036*	0,786±0,030

en gras différence significative entre traitements (P<5%)

\* différence significative entre les R et S

## *Sulfures versus normoxie*

Les réserves en composants énergétiques sont soumises à l'effet des sulfures. Ceci se manifeste par une baisse significative de la teneur en protéines ( $F=22,94$ ,  $P<0,0001$ ), en lipides ( $F=22,97$ ,  $P<0,0001$ ) et en ATP ( $F=5,37$ ,  $P=0,0245$ ) mais pas des glucides. Cependant une interaction significative permet de révéler que les huîtres S en normoxie conservent plus de glucides que les huîtres R ( $F=4.87$ ,  $P=0,0318$ ) (Tableau 5).

Tableau 5: Valeurs moyennes de la teneur en protéines, lipides et glucides des huîtres entières R et S en normoxie et exposées aux sulfures pendant la période expérimentale (moyenne $\pm$ erreur standard)

Les stocks	Normoxie			Sulfures		
	n	R	S	n	R	S
Protéines (mg g <sup>-1</sup> ww)	16	<b>84,21<math>\pm</math>0,98</b>	<b>84,98<math>\pm</math>3,38</b>	12	74,77 $\pm$ 1,60	73,19 $\pm$ 1,21
Lipides (mg g <sup>-1</sup> ww)	16	<b>25,48<math>\pm</math>0,83</b>	<b>23,88<math>\pm</math>0,72</b>	12	21,22 $\pm$ 0,60	20,95 $\pm$ 0,70
Glucides (mg g <sup>-1</sup> ww)	16	10,21 $\pm$ 0,55	11,7 $\pm$ 0,66*	12	12,53 $\pm$ 0,99	11,54 $\pm$ 0,67
ATP ( $\mu$ M g <sup>-1</sup> ww)	16	<b>1,62<math>\pm</math>0,05</b>	<b>1,63<math>\pm</math>0,04</b>	12	1,51 $\pm$ 0,04	1,53 $\pm$ 0,05

en gras différence significative entre traitements ( $P<5\%$ )

\* différence significative entre les R et S

### 4.2.3 Les ajustements métaboliques

#### *Les activités PK et PEPCK des huîtres entières*

En normoxie, l'activité de la PK dans les huîtres entières est significativement plus importante chez les huîtres S que chez les huîtres R. Cet effet a été révélé par la prise en compte des valeurs obtenues au cours des 2 expérimentations en 2005 et 2006. Cependant cet effet résulte principalement des données de l'année 2005. D'autre part l'activité de la PEPCK dans les huîtres entières ne change pas significativement entre les lignée R et S quelques soient les conditions environnementales testées (Figure 18).

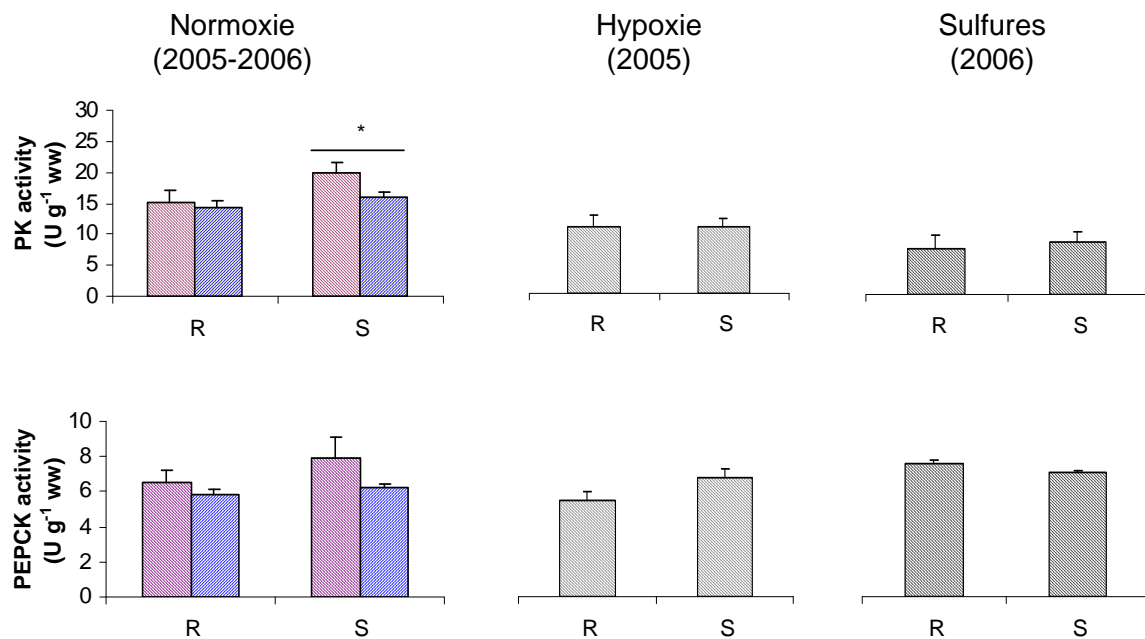


Figure 18: Activités de la PK et de la PEPCK dans les huîtres entières en normoxie (n=16), en hypoxie (n=12) et sous l'effet des sulfures (n=12) chez les huîtres R et S (moyenne±ES)

#### 4.2.4 Régulations différentielles de la PK et de la PEPCK dans le muscle adducteur.

*L'expression des gènes de la PK et de la PEPCK.*

En normoxie, l'expression des gènes codant pour la PK dans le muscle adducteur est équivalente entre les S que chez les R. Un effet lignée en hypoxie se traduit par une augmentation significative de l'expression de la PEPCK chez les S ( $F=6,57$ ,  $P=0,0137$ ). L'expression de la PEPCK est principalement soumise au stress : l'expression est faible et indifférente de l'origine génétique en condition normale, l'hypoxie provoque l'induction de l'expression de la PEPCK des huîtres S, enfin sous l'effet des sulfures l'expression de la PEPCK des 2 lignées est fortement induite (Figure 19).

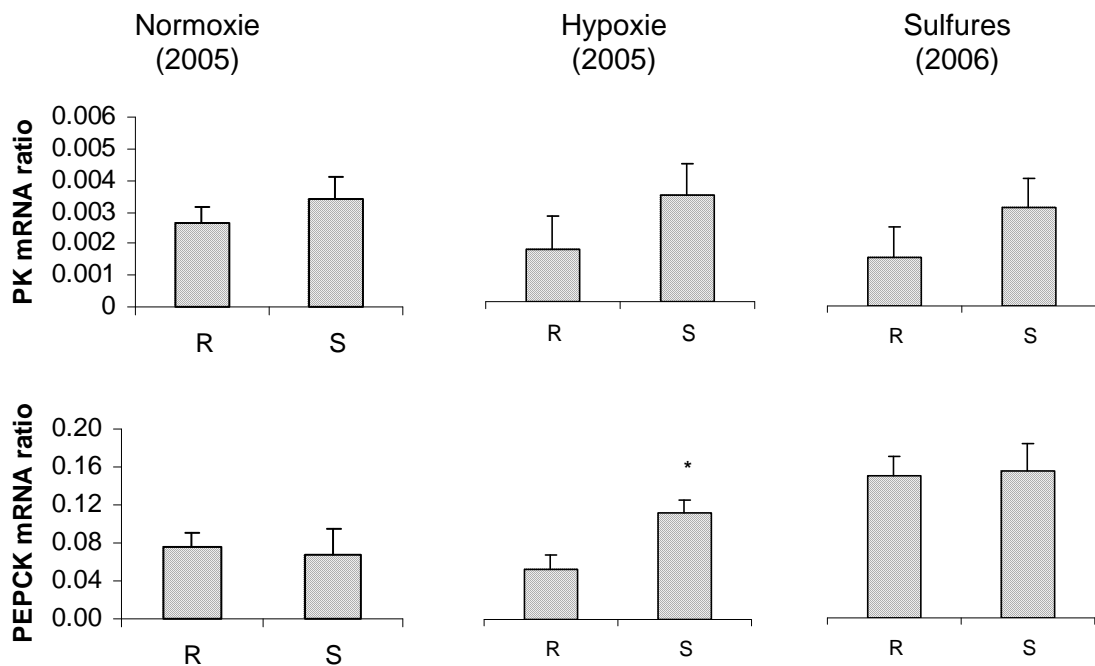


Figure 19 : Expression des gènes codant pour la PK et de la PEPCK dans les muscle adducteurs en normoxie (n=16), en hypoxie (n=12) et sous l'effet des sulfures (n=12) chez les huîtres R et S (moyenne±ES)

#### *Les activités enzymatiques de la PK et de la PEPCK.*

Les changements des niveaux d'expression des gènes codant pour la PK et la PEPCK ne se traduisent pas par des variations des activités enzymatiques. Aucune spécificité n'est révélée au niveau des enzymes dans le muscle adducteur.

#### *La signature métabolique.*

Chez les huîtres en condition normale, la production d'ATP repose sur les ressources trophiques et est équivalente chez les huîtres R et S. En condition normoxique, l'alanine est à un niveau significativement plus élevé chez les huîtres R ( $F=15.27$ ,  $P=0.0003$ ) que chez les huîtres S. Les sulfures provoquent une augmentation générale de l'alanine ( $F=11.077$ ,  $P=0.0016$ ) avec toutefois une teneur plus élevée dans le muscle des huîtres R. L'aspartate devient une source énergétique puisque le stock diminue significativement sous l'effet des sulfures. Cette ressource énergétique est exploitée sous l'effet des sulfures. La voie anaérobie

de production d'énergie est confirmée par l'accumulation significative de succinate chez les huîtres des 2 lignées. Il en résulte que le rendement énergétique en terme de production d'ATP est moins bon sous l'effet des sulfures (Tableau 6).

Tableau 6: Valeurs moyennes des métabolites dans le muscle des huîtres R et S en normoxie et exposées aux sulfures (moyenne±erreur standard).

Métabolites $\mu\text{M g}^{-1} \text{ ww}$	Normoxie			Sulfures		
	n	R	S	n	R	S
Alanine	16	12,93±0,68*	10,37±0,41	12	16,00±1,27*	12,47±11,28
Aspartate	16	<b>6,43±0,21</b>	<b>6,41±0,29</b>	12	4,47±0,48	5,42±0,39
Succinate	16	1,19±0,23	1,18±0,14	12	<b>1,71±0,23</b>	<b>2,10±0,30</b>
ATP	16	<b>2,89±0,20</b>	<b>2,70±0,08</b>	12	2,02±0,17	2,04±0,10

en gras différence significative entre traitements (P<5%)

\* différence significative entre les R et S

## 4.6 Discussion-Conclusion

### *Les spécificités en normoxie*

Nous confirmons que la consommation en oxygène des huîtres S est plus élevée que celle des huîtres R (Samain et al. 2007) et que l'écart entre les huîtres R et S s'accroît avec le niveau trophique. Un haut niveau trophique permet aux huîtres de conserver des réserves énergétiques importantes tout en continuant à alimenter les voies de production d'énergie. Si les stocks des protéines restent à des niveaux équivalents entre les 2 lignées, les autres composants énergétiques comme les glucides et les lipides sont stockés en quantités plus importantes chez les huîtres S.

L'accumulation de glucides en quantité plus élevée a été observée chez les huîtres S en conditions normoxiques au cours des 2 expérimentations en juin 2005 et en juin 2006. Cette ressource est connue pour son rôle central dans l'approvisionnement d'énergie utilisée pour la maintenance et la reproduction (Bayne et al, 1982; Gabbott et Whittle, 1986; Ruiz et al, 1992;

Mathieu et Lubet, 1993). Chez l'huître *C. gigas*, le stockage du glycogène est associé à l'expression d'un peptide apparenté à l'insuline (Hamano et al. 2005). La différence de capacité de stockage des glucides entre les R et les S pourrait reposer sur ce système ou des récepteurs impliqués. L'accumulation de glucides qui est le signe d'une activité glucogénique intense est réalisée par la glycogène synthase (GS) (Bacca et al, 2005). D'autre part, de nombreuses enzymes caractérisent le flux glycolytique dont la pyruvate kinase (PK). Nous avons donc pu déterminer que l'activité enzymatique de la PK dans les huîtres entières est plus élevée chez les huîtres S traduisant un flux glycolytique plus intense qui aboutit à un bilan final en ATP en faveur des huîtres S. Ceci favorise, entre autres, les réactions de synthèse et de transport de molécules qui nécessitent de l'énergie : l'effort de reproduction plus important des huîtres S résulte de cette activité métabolique (Martha-Enriquez, 2004, Delaporte et al, 2005, Samain et al, 2007).

La teneur en lipides qui est associé à la gamétogenèse (Berthelin et al. 2000) traduit l'effort de reproduction plus important des huîtres de lignée S.

### *Les spécificités en hypoxie*

Chez l'huître *C. gigas*, la dépression métabolique s'exprime par une restriction nutritionnelle qui engendre la baisse des réserves énergétiques. Les teneurs en protéines, lipides et glucides baissent significativement quelque soit l'origine génétique des huîtres. Mais des différences de gestion des lipides et des glucides persistent entre les huîtres R et S. Les huîtres S conservent des stocks plus élevés malgré la restriction nutritionnelle.

Le niveau des réserves glucidiques des huîtres S est l'indice que la capacité glucogénique est peu altérée par l'hypoxie. Le flux trophique a été fortement diminué mais pas stoppé ; de ce fait, les huîtres S privilégient le stockage de réserves énergétiques au détriment de la production d'énergie. Cette capacité des huîtres S à faire des réserves glucidiques en hypoxie pourrait aussi être soutenu par un niveau plus élevé d'insulin-like, ou de celui des récepteurs



impliqués (Hamano et al. 2005). En état de dépression métabolique, le stock d'ATP plus faible des S résulterait d'une utilisation plus intensive pour les besoins de maintenance, particulièrement de la gonade, qui restent importants chez les S justifiant ainsi une consommation d'ATP plus importante. En revanche, soumises à la baisse du flux trophique, les huîtres R continuent à produire de l'énergie sous forme d'ATP, mettant en œuvre simultanément les voies métaboliques aérobies et anaérobies qui utilisent l'ensemble des combustibles énergétiques : les protéines, lipides et glucides. Malgré l'inhibition de la PK en hypoxie, le stock d'ATP est plus élevé qu'en normoxie. On peut aussi suggérer que le stock d'ATP des huîtres R est moins entamé par un effort de reproduction plus faible que celui des huîtres S.

Régulation du carrefour PEP dans le muscle adducteur.

#### *L'alanine musculaire*

La teneur en alanine du muscle adducteur est associée à l'origine génétique des huîtres. En effet, le muscle adducteur des huîtres R contient plus d'alanine que celui des huîtres S en condition normale et sous l'effet de l'exposition aux sulfures, le dosage de l'alanine dans le cas de l'hypoxie n'a pu être réalisé. L'accumulation d'alanine a été signalée comme la manifestation d'un stress et est aussi la caractéristique d'un effet de jeûne chez les vertébrés et les invertébrés (Muller et al, 1971, Okama et Abe, 1998). Dans le cas des huîtres R et S, cet état pourrait correspondre aux capacités métaboliques propres à chacune de ces 2 lignées.

L'alanine est synthétisée dans le muscle à partir du pyruvate qui dérive soit de la dissociation du glycogène soit des acides aminés. Chez les vertébrés, l'alanine participe au cycle glucose-alanine entre le foie et le muscle. Le cycle glucose-alanine est un mécanisme d'élimination de l'azote des muscles squelettiques permettant de compléter l'approvisionnement en énergie.

L'alanine est transportée vers le foie où il est converti en glucose par la voie de la gluconéogenèse. Le résidu aminé de l'alanine est transformé en urée puis excrété.

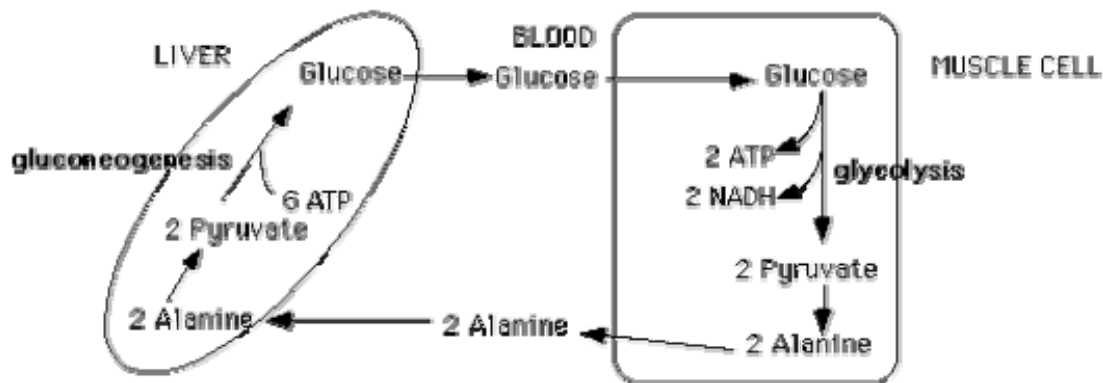


Figure 20 : diagramme du cycle glucose-alanine

La différence de gestion de l'alanine entre les R et les S pourrait se situer au niveau du pyruvate. Chez les S, le pyruvate serait plus complètement oxydé par la pyruvate déshydrogénase (PDH) pour alimenter le cycle de Krebs. Chez les R, le pyruvate serait détourné pour suivre la voie alternative de transamination pour former de l'alanine, sous l'effet d'une PDH moins active.

#### *Régulation de la pyruvate kinase*

L'hypoxie provoque une restriction nutritionnelle qui influence le métabolisme intermédiaire. Chez le rat, le jeûne provoque l'arrêt de l'expression du gène de la PK (Decaux et al, 1989). Cependant nos huîtres ne sont pas à jeun et les conséquences sur l'expression des gènes sont différentes. Au niveau de l'enzyme, l'hypoxie provoque la baisse de l'activité PK sans révéler de spécificité d'origine génétique. La régulation de l'activité enzymatique de la PK est réalisée par une phosphorylation et par l'alanine dont la teneur chez les R est plus élevée. Mais l'étude des propriétés cinétiques de la PK ne montre pas de différence entre les huîtres R et S. Les  $K_m$  (PEP) de la PK de l'extrait brut des muscles adducteurs des huîtres R et S sont similaires en conditions normales et sous l'influence des sulfures.

### *La phosphoénolpyruvate carboxykinase*

L'hypoxie provoque une régulation différentielle du gène de la PEPCK musculaire entre les S et les R ; l'expression du gène de la PEPCK est significativement induite chez les huîtres S. L'activité enzymatique de la PEPCK n'est pas associée aux changements du niveau d'expression. Il y a probablement un niveau de régulation intermédiaire entre l'expression du gène et l'activité enzymatique de la PEPCK.

La restriction nutritionnelle provoquée par l'hypoxie est probablement un des facteurs expliquant la surexpression du gène de la PEPCK. Chez les vertébrés à jeun, l'expression du gène de la PEPCK est induite (Lemaigre and Rousseau, 1994). Cette régulation est liée au glucose, en excès le glucose inhibe l'expression du gène de la PEPCK. L'application de ce principe chez l'huître *C. gigas* en état de quasi-jeûne aurait comme conséquence la surrégulation du gène de la PEPCK. C'est en effet le comportement qui a été observé sous l'effet de l'hypoxie chez les huîtres S. La régulation différentielle en hypoxie du gène de la PEPCK entre les R et les S pourrait reposer sur le mode de contrôle des réserves par l'insuline (Hamano et al, 2005, Gricourt et al, 2006).

---

**Partie 6. Discussion générale, conclusions,  
perspectives**

---

## 5.1 Conclusion générale

L'hypoxie est le seuil en oxygène qui déclenche un déséquilibre dans l'écosystème (Diaz et Rosenberg, 1995), le seuil hypoxique a été fixé à  $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ . L'hypoxie crée en premier lieu un appauvrissement de la faune dans la mesure où les espèces qui le peuvent, s'échappent. Les autres espèces comme les mollusques bivalves sont dans l'obligation de s'adapter déclenchant ainsi les mécanismes physiologiques permettant le succès écologique des animaux face aux contraintes.

### 5.1.1 L'activité valvaire et l'écophysiologie de la respiration

L'adaptation de l'huître *C. gigas* face au manque d'oxygène est réalisée en plusieurs étapes :

- La première réaction à l'hypoxie est une diminution de l'ouverture des valves que l'on révèle à 15 et 20°C. L'analyse des rythmes d'activité à 20°C a montré que les huîtres en hypoxie suivent les mêmes rythmes d'ouverture que les huîtres en normoxie mais de surcroît expriment un rythme de période 24h qui n'a pas été décelé chez les huîtres en normoxie.
- La seconde est le déclenchement de la dépression métabolique. Le comportement respiratoire de l'huître *C. gigas* est de type régulateur. Le seuil de déclenchement de la dépression métabolique se situe entre 3,0 et 3,4  $\text{mg L}^{-1}$  ce qui révèle une forte dépendance à l'oxygène (article 2). Le risque de dépression métabolique est donc élevé pendant la saison estivale puisque le seuil de déclenchement de l'anaérobiose entre 20 et 25°C se situe entre 43% et 48% de la saturation du milieu en oxygène.
- La dépression métabolique obtenue à  $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ , a pour conséquence la baisse de l'ingestion des microalgues et de la consommation d'oxygène respectivement de 50 et 70%, mais la dépendance à la température reste importante et influence le métabolisme même en hypoxie.

L'hypoxie engendre une baisse coordonnée de l'ingestion, de l'assimilation et de la consommation d'oxygène toutefois les bilans énergétiques restent positifs. En normoxie, le risque d'un bilan énergétique négatif est plus élevé. Deux phénomènes physiologiques peuvent générer un Scope For Growth négatif. La gamétogenèse génère un coût métabolique provoqué par une augmentation de la respiration, en effet il a été montré que la consommation d'oxygène augmente avec le développement de la gonade (Lambert et al, 2007). La régression des gonades engendre aussi une surconsommation d'oxygène associée à la dégradation des gamètes et l'apport de nutriments supplémentaire qui sont métabolisés pour fournir de l'énergie ou être restockés.

Les sulfures produisent un arrêt de la filtration à partir de 20 $\mu$ M alors que les modalités de la consommation d'oxygène sont plus complexes. On distingue 3 étapes : (i) la consommation d'oxygène s'accroît entre 0 et 6 $\mu$ M, (ii) la consommation d'oxygène décroît de 6 $\mu$ M à 20 $\mu$ M, (iii) la consommation d'oxygène reste stable jusqu'à 40 $\mu$ M. Un risque énergétique est à craindre jusqu'à 6  $\mu$ M où la consommation d'oxygène s'accroît alors que l'alimentation reste stable. Puis jusqu'à 40 $\mu$ M, l'oxygène consommé est utilisé pour la détoxification de l'organisme par l'oxydation des sulfures en thiosulfate et non pas pour participer au métabolisme énergétique, car les huîtres n'ingèrent plus.

### **5.1.2 Le bilan métabolique des stress respiratoires**

Sous l'effet des stress respiratoires contrôlés et *in situ*, il est apparu un phénomène récurrent : l'activité enzymatique de la PK est inhibée signifiant que la glycolyse est ralentie. Cette inhibition résulte d'une régulation allostérique par l'augmentation de la teneur en alanine dans les tissus, particulièrement dans le muscle adducteur, sous l'effet de l'hypoxie expérimentale et d'une intoxication aux sulfures. Ces réactions sont communes aux 2 stress respiratoires

expérimentaux que nous avons testés. Des spécificités apparaissent ensuite permettant de distinguer l'origine de la dépression métabolique : hypoxie vs sulfures.

En effet, ce qui distingue le stress hypoxique de l'intoxication aux sulfures, c'est la surrégulation de l'ETS en hypoxie alors que cette fonction est clairement inhibée sous l'effet des sulfures. L'hypoxie et les sulfures induisent respectivement le maintien et la baisse significative du stock d'ATP.

La proximité du sédiment engendre l'inhibition de la PK avec une teneur en alanine plus faible. Le contrôle de l'activité de la PK par l'alanine est toutefois révélé par la corrélation négative de ces 2 variables seulement chez les huîtres près du sédiment. L'ETS est momentanément surrégulée traduisant une cause probablement hypoxique de l'effet sédiment. Cependant le stock d'ATP est nettement déficitaire chez les huîtres près du sédiment. Le diagnostic est donc encore incertain sur les causes de ce déficit énergétique. L'effet sédiment pourrait être une combinaison hypoxie/sulfure qui conduirait les huîtres à exprimer une réponse plus complexe qui pourrait être détaillée par les approches de génomique et en particulier les puces à ADN. D'autre part, la quantification des sous produits de la dégradation des sulfures dans les tissus des huîtres devrait permettre de statuer sur l'éventualité de l'intoxication par les sulfures (Butterworth et al., 2004).

### 5.1.3 Les régulations

Les cDNA des gènes codant pour la PK et la PEPCK ont été clonés et séquencés dans le but d'en mesurer l'expression dans le muscle adducteur. Cette approche permet la comparaison des variations des activités enzymatiques et l'expression des gènes correspondant pour déterminer les niveaux de régulation de ces enzymes et le délai de déclenchement des régulations. En hypoxie, la PK musculaire subit une régulation immédiate au niveau de l'enzyme par un effet allostérique de l'alanine, la régulation transcriptionnelle intervient après

plusieurs jours. La PEPCK musculaire est régulée au niveau du gène, l'activité de l'enzyme étant déterminée par le niveau d'expression du gène de la PEPCK. Ce modèle n'est pas confirmé sous l'effet des sulfures, car l'augmentation de l'expression de la PEPCK n'est pas suivie d'un changement de l'activité enzymatique.

#### 5.1.4 Les modèles physiologiques des R et des S

Les huîtres S ont une consommation d'oxygène plus importante que les R pour des capacités de filtration égales entre les huîtres des 2 lignées. Cette surconsommation d'oxygène est la conséquence d'un effort de reproduction plus important des huîtres S. Le métabolisme de base des huîtres *C. gigas* est en effet étroitement corrélé au développement de la gonade (Lambert et al, 2007).

La capacité de stockage des glucides est plus importante pour les huîtres S, ceci conduit à une production d'ATP plus élevée via une glycolyse plus intense. Si la capacité de stockage du glycogène est sous le contrôle d'une insuline, il conviendrait donc d'explorer cette voie de stockage pour caractériser les capacités métaboliques propres des R et des S.

En normoxie, les huîtres R détournent une partie du flux glycolytique vers la production d'alanine qui peut ainsi entrer dans le cycle glucose-alanine (cycle de Cori) dont une des conséquences est l'élimination de la partie azotée de l'alanine sous forme d'urée. Dans ce domaine, les modalités de régulation de la PDH des huîtres des 2 lignées doivent être étudiées ainsi que le cycle de Cori entre le muscle et la glande digestive.

## 5.2 Perspectives

Le muscle adducteur des huîtres est l'organe métaboliquement le plus actif au regard de l'expression et de l'activité enzymatique de la PK et de la PEPCK qui varie avec la température et le niveau d'oxygène. Le muscle sera conforté comme tissu de référence de



l'état métabolique en complétant l'acquisition des connaissances sur la relation avec le niveau trophique. L'activité enzymatique de la PK doit être interprétée par rapport à l'alanine.

L'accumulation d'alanine chez les huîtres R ou sous l'effet d'un stress respiratoire conduit à poser l'hypothèse de sa participation dans la gluconéogenèse. Chez les vertébrés cette séquence est connue, l'alanine participe à la gluconéogenèse dans le foie par l'association de la glycolyse des muscles et de la gluconéogénèse du foie et constitue le cycle glucose-alanine. Le foie libère le glucose dans la circulation qui peut à nouveau être oxydé par les muscles. L'étude de cette fonction qui met en jeu le muscle, le foie et le sang, devrait être envisagée chez l'huître *C. gigas* avec le modèle biologique R/S et dans diverses conditions expérimentales telles que le niveau trophique, la température et les stress environnementaux.

Les espèces animales ont mis en place un système d'adaptation rapide et durable à de fortes baisses de concentration d'oxygène. Le stress hypoxique est " géré " par la stabilisation et l'activation d'une sous-unité (HIF-1 $\alpha$ ) du facteur de transcription central, HIF-1. Ce facteur transcriptionnel coordonne l'induction de plusieurs gènes et unités physiologiques (stimulation de l'angiogenèse, de l'érythropoïèse et de la glycolyse anaérobie) qui concourent à compenser la rareté d'oxygène (Gothié et Pouyssegur, 2002). HIF-1 reçoit un signal du système de détection de l'oxygène au travers d'une réaction redox et/ou d'une phosphorylation. Plusieurs douzaines de gènes cibles activés par HIF-1 $\alpha$  ont été identifiés dont ceux impliqués dans le transport du glucose et plusieurs enzymes de la glycolyse revues par Gothié et Pouyssegur (2002) (tableau 10). Les produits de ces gènes permettent soit une augmentation de la fourniture en oxygène soit une adaptation métabolique à la faible disponibilité en oxygène (Semenza, 1999).

Tableau 7 : Gènes réglés au niveau transcriptionnel (Gothié et Pouyssegur, 2002)

**Tableau 1 : Gènes réglés au niveau transcriptionnel par HIF-1.**

**Métabolisme du glucose**

Adénylate kinase 3, aldolase A, aldolase C, éno­lase 1, glucose transporteur 1, glucose transporteur 3, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, hexokinase 1, hexokinase 2, lactate déshydrogénase A, NIP3, phosphofru­ctokinase L, phosphoglycérate kinase 1, pyruvate kinase M, triosephosphate isomérase

L'étude du gène HIF-1 $\alpha$  ou d'un homologue, des transcripts et du facteur protéique constitue une approche intéressante qui permettrait d'évaluer le statut respiratoire des huîtres *C. gigas* et ainsi les risques physiologiques qu'encourent les stocks exposés à des hypoxies prolongées et aussi à des problèmes environnementaux. D'autre part l'étude de ce gène présente un intérêt scientifique indéniable puisque qu'il n'a été décrit chez les invertébrés que chez la mouche *Drosophila melanogaster* et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Jiang et al, 2001).

---

## **Partie 7. Bibliographie**

---

- Aldridge DW, Payne BS, Miller AC. 1995. Oxygen consumption, nitrogenous excretion, and filtration rates of *Dreissena polymorpha* at acclimation temperatures between 20 and 32°C. *Can J Fish Aquat Sci* 52: 1761-1767.
- Alexander JE, McMahon RF 2004. Respiratory response to temperature and hypoxia in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Comp Biochem Physiol* 137B: 425-434.
- Anonyme 2003. Données économiques maritimes françaises. Ifremer Brest. Service économique maritime (SEM).
- 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* 140 B: 635-646.
- Barré D. 1981. Implantation de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le bassin de Marennes-Oléron. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université de Toulouse : 150 p.
- Bayne BL. 1971. Ventilation, the heart beat and oxygen uptake by *Mytilus edulis* L. in declining oxygen tension. *Comp. Biochem Physiol* 40A: 1065-1085.
- Bayne BL, Widdows J. 1978. The physiological ecology of two populations of *Mytilus edulis* L. *Oecologia* 37: 137-162.
- Bayne BL, Bubel A, Gabbott PA, Livingstone DR, Lowe DM, Moore MN. 1982. Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* (L.). *Mar Biol Lett* 3: 89-105.
- Bayne BL, Newell RC. 1983. Physiological energetics of marine molluscs. In *The Mollusca*, Vol.4, Saleuddin ASM, Wilbur KM (Eds.), Academic Press, London, pp. 407-515.
- Beattie J, Chew K, Hershberger W. 1980. Differential survival of selected strains of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proc. Nat. Shellfish. Ass* 70: 184-189.
- Beiras R, Perez Camacho A, Albentosa M. 1995. Short-term and long-term alternations in the energy budget of young oyster *Ostrea edulis* L. in response to temperature change. *J Exp Mar Biol Ecol* 186: 221-236.
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp Biochem Physiol*. 125B, 359-369.

- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp Biochem Physiol.* 125 B: 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.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
- Boday A, Riva A, Maitre-Allain T. 1986. Comparaison de la respiration chez *Ruditapes decussatus* (L.) et *R. philippinarum* (Adam & Reeve) en fonction de la température. *Vie Milieu*, 36: 83-89.
- 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.
- Borcherding J, 2006. Ten years of practical experience with the Dreissena-Monitor, a biological early warning system for continuous water quality monitoring. *Hydrobiologia* 556: 417-426
- Borsal, Jouselin Y, Delay B. 1992. Relationships between allozymic heterozygosity, body size, and survival to natural anoxic stress in the *palourde Ruditapes decussatus* L. (Bivalvia: Veneridae). *J Exp Mar Biol Ecol* 155: 169-181.
- Boudry P, Collet B, Cornette F, Hervouet V, Bonhomme F. 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*, 204: 283-296.
- Bougrier S, Collet B, Geairon P, Geffard O, Héral M, Deslou-Paoli JM. 1998. Respiratory time activity of the japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Exp Mar Biol Ecol* 219: 205-216.
- Bougrier S, Geairon P, Deslous-Paoli JM, Bacher C, Jonquières G. 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134, 143-154.

- Bougrier S, Geairon P, Deslous-Paoli JM, Bacher C, Jonquière G. 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 134: 143-154.
- Bourles Y. 2004. Ecophysiologie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : Analyse bioénergétique de la gamétogenèse sous trois conditions trophiques distinctes. DEA, Université de Rennes, 20pp.
- Bower SM, Hervio D, McGladdery SE. 1994. Potential for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, to serve as a reservoir host and carrier of oyster pathogens. *Ices Council Meeting Papers, ICES-CM-1994/F*: 305pp.
- Brendon JD, Wells RMG, Jeffs AG. 2006, Oxygen consumption and enzyme activity of the subtidal flat oyster (*Ostrea chilensis*) and intertidal Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) responses to temperature and starvation. *NZ J. Mar. Freshwater Res.* 40, 149-158.
- 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, 71 p.
- Brown F, Benett MF, Webb M, Ralph CL, 1956, Persistent daily, monthly, and 27-day cycles of activity in the oyster and quahog, *J. Exp Zool*, 131, 235-262,
- Burnett LE. 1997. The challenges of living in hypoxic and hypercapnic aquatic environments. *Am. Zool*, 37: 633-640.
- Buroker NE. 1983. Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia*, 23: 271-279.
- Butterworth KG, Grieshaber MK, Taylor AC. 2004. Sulphide detoxification in the bivalve, *Arctica islandica* (L.) from two different habitats. *Ophelia*, 58, 101-113.
- Butterworth KG, Grieshaber MK, Taylor AC. 2004. Behavioral and physiological responses of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda), to sulphide exposure. *Mar Biol* 144: 1087-1095.
- Byrne RA, McMahon BR. 1991. Acid-base and ionic regulation, during and following emersion, in the freshwater bivalve, *Anodonta grandis simpsoniana* (Bivalvia: Unionidae). *Biol Bull* 181: 289-297.

- Cai Q, Storey KB. 1996. Anoxia-induced gene expression in turtle heart Up-regulation of mitochondrial genes for NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 5 and cytochrome *c* oxidase subunit 1. *Eur J Biochem.* 241, 83-92
- Calvo LMR, Luckenbach J, Allen S, Bureson EM. 1999. Comparative field study of *C.gigas* and *C. virginica* in relation to salinity in Virginia. *J Shellfish Res* 18: 465-473.
- Chapelle A, Lazure P, Souchu P. 2001. Modélisation numérique des crises anoxiques (malaïgues) dans la lagune de Thau (France). *Oceanologica Acta*, 24, 87-97.
- Chavez-Villalba J, Mingant C, Cochard JC, Le Pennec M, 2001. Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber Benoit (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis* 30: 1-12.
- 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.
- Cheney DP, MacDonald BF, Elston RA. 2000. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J Shellfish Res* 19: 353-359.
- Chew S.F, Ip YK. 1992. Biochemical adaptations of the mudskipper *Boleophthalmus boddarti* to a lack of oxygen. *Mar Biol.* 112, 567-571.
- Christensen AB, Colacino JM. 2000. Respiration in the burrowing brittlestar, *Hemipholis elongate* Say (Echinodermata, Ophiuroidea): a study of the effects of environmental variables on oxygen uptake. *Comp Biochem Physiol*, 127A: 201-213.
- Chu FLE, Volety AK, Constantin G. 1996. Comparison of *C. gigas* and *C. virginica*: effect of temperature and salinity on susceptibility to the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*. *J Shellfish Res.* 15: 375-380.
- Chu FLE, Volety AK, Constantin G. 1996. Comparison of *C. gigas* and *C. virginica*: effect of temperature and salinity on susceptibility to the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*. *J Shellfish Res.* 15: 375-380.
- Cochran RE, Burnett LE. 1996. Respiratory responses of the salt marsh animals, *Fundulus heteroclitus*, *Leiostomus xanthurus*, and *Palaemonetes pugio* to environmental hypoxia and hypercapnia and to the organophosphate pesticide, azinphosmethyl. *J Exp Mar Biol Ecol.* 195: 125-144.

- Comps M, Bonami JR, Vago C, Razet D. 1976. La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *Science et Pêche, Pêche maritime*. 256,: 13-15.
- Conover RJ. 1966. Factors affecting the assimilation of organic matter by zooplankton and the question of superfluous feeding. *Limnol Oceanogr* 11: 346–354.
- Conover RJ. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnol Oceanogr*, 11: 338-345.
- Coquard E. 2003. Etude des différences de gamétogenèse, d'écophysiologie et de bioénergétique de deux lignées génétiques d'huître creuse, *Crassostrea gigas* : Implication dans le phénomène des mortalités estivales. Univ Bretagne Occ., IUEM, Diplôme Universitaire Sciences de la mer, 72p.
- Curtis TM, Williamson R, Depledge MH, 2000, Simultaneous, long terme monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper, *Mar Biol.*, 136, 837-846,
- Dalla Via J, Van den Thillart G, Cattani O, De Zwaan A. 1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. II. Intermediary metabolism in blood, liver and muscle. *Mar Ecol Prog Series*, 111: 17–27.
- Dame RF. 1972. The ecological energies of growth, respiration and assimilation in the intertidal American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Biol* 17: 242-250.
- 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.
- De Zwaan A. 1977. Anaerobic energy metabolism in bivalve molluscs. *Ocean Mar Biol* 15: 103-187.
- De Zwaan A. 1983. Carbohydrate catabolism in bivalves. In *The Mollusca*, Vol. 1, Metabolic biochemistry and molecular biomechanics. PW Hochachka (ed) Academic Press. New York. Pp. 137-175.
- De Zwann 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 Physio* 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: 34-351.
- de Zwaan A., Mathieu M., 1992, Cellular Biochemistry and endocrinology. *In* Gosling E. (ed) *The mussel mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, 223-293.
- 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.
- Dégremont L. 2003. Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de l'Université de Caen.
- Dégremont L, Bédier E, Soletchnik P, Ropert M, Huvet A, Moal J, Samain JF, Boudry P. 2005. Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 249, 213-229.
- Dejours P. 1981. Principles of comparative respiratory physiology. Amsterdam, North-Holland Publ. Co.
- Delaporte M. 2005. Modulation des paramètres hématocytaires par la nutrition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. Thèse de l'Université de Rennes 1, 362pp.
- Delaporte M, Soudant P, Lambert C, Moal J, Pouvreau S, Samain JF. 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture*, 254, 571-582.
- Demers A, Guderley H. 1994. Acclimatization to intertidal conditions modifies the physiological response to prolonged air exposure in *Mytilus edulis*. *Mar Biol*. 118: 115-122.
- Deslous-Paoli JM. 1980. Contribution à l'étude de la biologie de l'huître *C.gigas* Thunberg dans le bassin et les claires de Marennes-Oléron. Thèse de 3ème cycle, Université d'AixMarseille II : 121 p.
- Deslous-Paoli JM, Héral M. 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat Living Resour*. 1: 239-249.

- Diaz RJ, Rosenberg R. 1995. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Ocean Mar Biol: an Annual Review*. 33, 245-303.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 28: 350-356.
- Dunphy B.J., Wells R.M.G., Jeffs A.G., 2006 Oxygen consumption and enzyme activity of the subtidal flat oyster (*Ostrea chilensis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): responses to temperature and starvation. *NZ J. Mar. Freshwater Res.* 40: 149-158.
- Eaton RA, Arp AJ. 1993. Aerobic respiration during sulphide exposure in the marine echiuran worm *Urechis caupo*. *Physiol Zool* 66, 1-19
- Emmet BT, Baden RL. 1984. The relationship between summer mortality in cultured blue mussels *Mytilus edulis* and the annual cycling of energy storage products. *J Shellfish Res.* 4: 93-101.
- Encomio VG. 1998. Respiratory and metabolic response to sulfide and hypoxia in the marine echiuran worm, *Urechis caupo*. San Francisco State University, Thesis, 74p.
- Englund V, Heino M, 1994, Valve movement of *Anodonta anatina* and *Unio tumidus* (*Bivalvia*, *Unionidae*) in an eutrophic lake, *Annales Zoologici Fennici*, 31, 257-262,
- Enriquez-Diaz MR (2004) Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, 193pp.
- Fanslow DL, Nalepa TF, Johengen TH. 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia* 448: 61-70.
- Floyd PD, Li L, Rubakhin SS, Sweedler JV, Horn CC, Kupfermann I, Alexeeva VY, Ellis TA, Dembrow NC, Weiss KR & Vilim FS 1999 Insulin prohormone processing, distribution, and relation to metabolism in *Aplysia californica*. *Journal of Neuroscience* 15 7732-7741.
- Friedman CS, Cherr GN, Clegg JS, Hamdoun AH, Jacobsen JL, Jackson SA, Uhlinger KR. 1998. Investigation of the stress response, summer mortality and disease resistance of oyster, *C. gigas* and *C. virginica*. *J Shellfish Res.* 17: 137-151.

- Friedman CS, Hedrick, RP. 1991. Pacific oyster nocardiosis: Isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *J Invertebr Pathol.* 57: 109-120.
- Gabbott PA, 1975. Storage cycle in marine bivalves molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen and gametogenesis. In: Proceedings 9th European Marine Biology symposium. (Eds: Barnes H). Aberdeen University Press. 191-211.
- Gabbott PA, Whittle MA. 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.
- Gagnaire B, Soletchnik P, Madec P, Geairon P, Le Moine O, Renault T. 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture*, 254, 606-616.
- Garcia-Esquivel Z., Bricelj V.M., Gonzalez-Gomez M.A., 2001, Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 263, 77-103.
- Garcia-Esquivel Z., Bricelj V.M., Felbeck H., 2002, Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 133A, 63-77
- Gérard A, Naciri-Graven Y, Boudry P, Launay S, Heurtebise S, Ledu C, Phélipot P. 1995. Contrôle de la gamétogenèse des huîtres creuses et plates. Relations “reproduction” et “génétique”. In : *La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France*. Rapport de groupe de travail. Direction des Ressources Vivantes de l’IFREMER, pp 99-112.
- Gothié E, Pouyssegur J. 2002. HIF-1 régulateur central de l’hypoxie. *Médecine/Science*, 1, 18, 70-78.
- Gouletquer P, Héral M. 1991. Aquaculture of *Crassostrea gigas* in France. In *The ecology of C.gigas in Australia, New Zealand, France and Washington State*. Sutherland J and Osman R (ed) Maryland Sea Grant College, MD, pp 13-19.
- Gouletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N, Taillade S. 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). *Cons. int. Explor. Mer*, CM 1998 / CC 14 : 20 p.

- Gouletquer P, Wolowicz M, Latala A, Geairon P, Huvet A, Boudry P. 1999. Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat of *Crassostrea gigas* of French, Japanese, Spanish and Taiwanese origins, *Aquat. Living Resources*, 12: 271-277.
- Grassé P. 1960. *Traité de zoologie. Mollusques Lamellibranches*. Paris, Masson et Cie (ed.), Tome V : 2219 p.
- Gray JS, Wu RSS, Or YY. 2002. Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Mar Ecol Prog Ser* 238: 249-279.
- 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.* 170 B, 285-293.
- Greenway SC, Storey KB. 2001. Effects of seasonal change and prolonged anoxia on metabolic enzymes of *Littorina littorea*. *Can J Zool* 79: 907-915.
- Grieshaber MK, Hardewig I, Kreutzer U, Pörtner HO. 1994. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev Physiol Biochem, Pharmacol*, 125 : 44-147.
- Grieshaber MK, Kreutzer U, Pörtner HO. 1988. Critical PO<sub>2</sub> of euryoxic animals. In : *Oxygen sensing in tissues*. Ed. H. Acker, Berlin, Springer Verlag. 355: 330-
- Gricourt L, Mathieu M, Kellner K. 2005. An insulin-like system involved in the control of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reproduction: hrIGF-1 effect on germinal cell proliferation and maturation associated with expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *Aquaculture* 251: 85-98.
- Grizel H. 1974. Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *CR Acad Sc.* 279: 783-785.
- Grizel H, Héral M. 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J Cons Int Explor Mer.* 47: 399-403.
- Guderley H, Demers A, Couture P. 1994. Acclimatization of blue mussel (*Mytilus edulis*, Linnaeus, 1758) to intertidal conditions: effects on mortality and gaping during air-exposure. *J Shellfish Res.* 13: 379-385.

- Hamano K, Awaji M, Usuki H. 2005. cDNA structure of an insulin-related peptide in the pacific oyster and seasonal changes in the gene expression. *J Endocrinol* 187: 55-67.
- Hammen CS, Ellington WR. 1982. Anaerobic energy metabolism of invertebrates. The American Physiological Society, San Diego, Ca. October 14-15, 1982, Federation proceedings, 43: 220-225.
- Hanson RW, Reshef L. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Nutr* 66: 581.
- Haure J, Penisson C, Bougrier S, Baud JP. 1998. Influence of temperature on clearance and oxygen consumption rates of the flat oyster *Ostrea edulis*: determination of allometric coefficients, *Aquaculture*, 169, 211-224.
- Haure J, Huvet A, Palvadeau H, Nourry M, Penisson C, Martin JLY, Boudry P. 2003. Feeding and respiratory time activities in the cupped oysters *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and their hybrids. *Aquaculture*, 218: 539-551.
- Hauschild K, Grieshaber MK. 1997. Oxygen consumption and sulfide detoxification in the lugworm *Arenicola marina* (L.) at different ambient oxygen partial pressures and sulfides concentrations. *J Comp Physiol* 167B: 378-388.
- Héral M. 1989. L'ostréiculture française traditionnelle. In : *Aquaculture*. Paris, Barnabé (Coord), Lavoisier (ed), 347-397.
- Héral M, Deslous-Paoli JM. 1991. Oyster culture in European countries. In *Estuarine and Marine bivalve mollusk culture*. Menzel W. (ed), CRC Press, Boca Raton, pp153- 190.
- Herrreid CF. 1980. Hypoxia in invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 67A, 311.
- 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.
- His E, Robert R. 1985. Développement des véligères de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. Etudes sur les mortalités larvaires. *Rev Trav Inst Pêches Marit*. 47: 3-88.
- Hochachka PW, Lutz PL. 2001. Mechanism, origin and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol*. 130B: 435-459.

- Huang SC, Newell RIE. 2002. Seasonal variations in the rates of aquatic and aerial respiration and ammonium excretion of the ribbed mussel, *Geukensia demissa* (Dillwyn). *J Exp Mar Biol Ecol.* 270: 241-255.
- 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.
- Ip YK, Chew SF, Lee CY, Wong WP, Lim ALL, Murphy DH. 1993. Effects of anoxia on the activities of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase, and the production of lactate and succinate in the intertidal pulmonate *Onchidium tumidum*. *Mar Biol.* 116: 103-107.
- Isani G, Cattani O, Zurzolo M, Pagnucco C, Cortesi P. 1995. Energy metabolism of the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, during long-term anoxia. *Comp Biochem Physiol.* 110: 103-113.
- Ivanovici AM. 1980, Adenylate energy charge : an evaluation of applicability to assessment of pollution effects and directions for future research. (1980) *Rapp. P-v Reun. Cons. Int Explor. Mer* 179, 23-28.
- Jahn A, Gamenick I, Theede H. 1996. Physiological adaptations of *Cyprideis torosa* (Crustacea, Ostracoda) to hydrogen sulphide. *Mar Ecol Prog Ser.* 142: 215-223.
- Jahn A, Theede H. 1997. Different degrees of tolerance to hydrogen sulfide in populations of *Macoma balthica* (Bivalvia, Telinidae). *Mar Ecol Prog Ser.* 154: 185-196.
- Jiang H, Guo R, Powell-Coffman JA. 2001. The *Caenorhabditis elegans* hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 7916-7921.
- Johns AR, Taylor AC, Atkinson RJA, Grieshaber MK. 1997. Sulphide metabolism in Thalassinidean Crustacea. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 77, 127-144.

- Jorgensen CB. 1990. Bivalves filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology. Olsen and Olsen, Fredenborg, Denmark.
- Kahn A. 1997. Transcriptional regulation by glucose in the liver. *Biochimie* 79: 113-118.
- Keitzmann T, Schmidt H, Probst I, Jungermann K. 1992. Modulation of the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate-carboxykinase gene by oxygen in rat hepatocyte cultures. *FEBS*, 311, 251-255.
- Kennett D, Hargraves PE. 1985. Benthic diatoms and sulfide fluctuations: upper basin of Pettaquamscutt River, Rhode Island. *Est. Coast. Shelf Science*, 21: 577- 586.
- Kesarcodi-Watson A, Klumpp DW, Lucas JS 2001. Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*), II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. *Aquaculture*, 203: 195–216.
- Labreuche Y, Lambert C, Soudant P, Boulo V, Huvet A, Nicolas JL. 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32, *Microbes Infect*, 8 2715-2724.
- Lacoste A, Jalabert F, Malham SK, Cueff A, Poulet SA. 2001. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied Env Microbiol.* 67: 2304-2309.
- Lambert C, Soudant P, Dégremont L, Delaporte M, Moal J, Boudry P, Jean F, Huvet A, Samain JF. 2007. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture*, 270, 276-288.
- Laudien J, Schiedek D, Brey T, Portner HO, Arntz WE. 2002. Survivor of juvenile clams *Donax serra* (Bivalvia, Donacidae) exposed to severe hypoxia and hydrogen sulphide. *J Exp Mar Biol Ecol.* 271: 9-23.
- 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.
- Le Roux F, Gay M, Lambert C, Waechter M, Poubalanne S, Chollet B, Nicolas JL, Berthe F. 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat Living Resour.* 15: 251-258.

- 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.
- Lesser M, Kruse VA. 2004. Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolusmodiolus*: metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 137A, 495-504.
- Littlewood DTJ. 1989. Aquatic and aerial respiration of *Crassostrea rhizophorae*. *Comp Biochem Physiol.* 93A: 773- 775.
- Lodato M. 1997. Mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas* sur les bancs ostréicoles de Perquis et Ronce (Bassin de Marennes-Oléron) : étude des pratiques culturales et des caractérisations biologiques et spatiales des élevages. Thèse de doctorat Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes : 127 p.
- Lowry OH, Rosenbrough N, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Lubet P. 1991. Reproduction des mollusques. 1. Les bivalves. In : *Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture*. Paris, Barnabé (Coord.), Lavoisier (ed.), pp 166-190.
- Lucas A. 1992. Bioénergétique des animaux aquatiques. Edition Masson. 179 pp.
- McCorkle S, Shirley TC, Dietz TH, 1979, Rhythms of activity and oxygen consumption in the common pond clam, *Ligumia subrostrata* (Say), *Can J Zool* 57, 1960-1964,
- Madon SP, Schneider D, Stoeckel JA. 1998. *In situ* estimation of zebra mussel metabolic rates using the electron transport system (ETS) assay. *J Shellfish Res.* 17: 195-203.
- Mallet A, Carver CEA, Freeman R. 1990. Summer mortality of the blue mussel in eastern Canada: Spatial, temporal, stock and age variation. *Mar Ecol Prog Ser.* 67: 35-41.
- Mangum CP, Van Winkle W. 1973. Response to aquatic invertebrates to declining oxygen conditions. *Am.Zool.* 13: 529-541.
- Marsden ID, Weatherhead MA 1998. Effects of aerial exposure on oxygen consumption by the New Zealand mussel *Perna canaliculus* (Gmelin, 1791) from an intertidal habitat. *J Exp Mar Biol Ecol.* 230: 15-29.



- Marteil L. 1976. La conchyliculture française, 2<sup>ème</sup> partie: biologie de l'huître et de la moule. Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes, tome XL, fasc.2, 149-346.
- Mathieu M., Lubet P. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves-a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23: 123-129.
- Matte A, Tari LW, Goldie H, Delbaere LTJ. 1997. Structure and Mechanism of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase. *J Biol Chem* 272: 8105-8108.
- Maurer D, Borel M. 1986. Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis*, 15: 125-134.
- Maurer D, Comps M. 1986. Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. In: *Pathology in Marine Aquaculture*. Vivarès C.P., Bonami J.R. and Jaspers E. (Ed.), European Aquaculture Society, Special Publication N° 9, Bredene, Belgium, pp 29-41.
- Maurer D, Comps M, His E. 1986. Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis*, 15: 309-317.
- Maxime V, Pichavant K, Bœuf G, Nonnotte G. 2000. Effects of hypoxia on respiratory physiology of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* 22: 51-59.
- Mazouni N, Gaertner, Deslous-Paoli JC, Landrein JM, Geringer S, d'Oedenberg M. 1996. Nutrient and oxygen exchanges at the water-sediment interface in a shellfish-farming lagoon (Thau, France). *J Exp Mar Biol Ecol.* 205, 91-113.
- Mc Mahon, 1988. Respiratory response to periodic emergence in intertidal mollusc. *Am Zool.* 28: 97-114.
- Menesguen A. 2001. L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France. Rapport IFREMER pour la commission européenne, DG/ENV/B1, 59 pp.
- 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.
- Michaelidis B, Gaitanaki C, Beis IS, 1988. Modification of pyruvate kinase from the foot muscle of *Patella caerulea* (L.) during anaerobiosis. *J Exp Zool.* 248: 264-271.

- Michaelidis B, Storey KB. 1990. Interactions of temperature and pH on the regulatory properties of pyruvate kinase from organs of a marine mollusc. *J Exp Mar Biol Ecol.* 140, 187-196.
- Moal J., Le Coz J.R., Samain J.F., Daniel J.Y., 1991, Adenylate energy charge: a possible trophic index for management of oyster intensive aquaculture. *Comp. Biochem. Physiol* 100C, 201-205.
- Modaressi S, Brechtl K, Crist B, Jungermann K. 1998. Human mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 gene. Structure, chromosomal localization and tissue-specific expression. *Biochem J.* 333: 359-366.
- Mori, K, Tamate H, Imai T, Itikawa O. 1965. Changes in the metabolism of lipids and glycogen of the oyster during the stages of sexual maturation and spawning. *Bull Tohoku Reg Fish Res Lab.* 25: 65-88.
- Mori K. 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *C. gigas*. *Mar Biol.* 53: 361– 369.
- Morton BS, 1970, The tidal rhythm and rhythm of feeding and digestion in *Cardium edule*, *J Mar Biol Ass (UK)* 50, 499-512,
- Müller WA, Faloon 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.
- Mustafa T, Hoachachka PW. 1971. Catalytic and regulatory properties of pyruvate kinases in organs of a marine bivalve. *J Biol Chem.* 246:3196-3203.
- Mustafa T, Hochachka PW. 1973. Enzymes in facultative anaerobiosis of mollusc-III. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its role in aerobic-anaerobic transition. *Comp. Biochem. Physiol. B* 45, 657-667.
- Myrand B, Gaudreault J. 1995. Summer mortality of blue mussels (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758) in the Magdalen Islands (southern Gulf of St Lawrence, Canada). *J Shellfish Res.* 14: 193-207.

- Myrand B, Guderley H, Himmelman JH. 2000. Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, Southern Gulf of St. Lawrence. Mar Ecol Prog Ser. 197: 193-207.
- Nilsson H, Rosenberg R. 1994. Hypoxic response of two marine benthic communities. Mar Ecol Prog Series, 115: 209-217.
- Nixon SW. 1990. Marine eutrophication: a growing international problem. Ambio 19:101.
- Oeschger R, Storey KB. 1990. Regulation of glycolytic enzymes in the marine invertebrate *Halicryptus spinulosus* (Priapulida) during environmental anoxia and exposure to hydrogen sulfide. Mar Biol. 106: 261-266.
- Oeschger R, Storey KB. 1993. Impact of anoxia and hydrogen sulphide on the metabolism of *Artica islandica* L. (Bivalvia). J Exp Mar Biol Ecol. 170: 213-226.
- Oeschger R, Pedersen TF. 1994. Influence of anoxia and hydrogen sulphide on the energy metabolism of *Scrobicularia plana* (da Costa) (Bivalvia). J Exp Mar Biol Ecol. 184: 255-268.
- 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.
- Ortmann C, Grieshaber MK, 2003, Energy metabolism and valve closure behaviour in the asian clam *Corbicula fluminea*, J Exp Biol, 206, 4167-4178,
- Owens T.G., King F.D., 1975, The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton. Mar. Biol. 30, 27-36.
- Page DS, Widdows J, Staff FJ. 1998. Effects of thermal stress and Tri(n)Butyl Tin on anaerobic energy metabolism in *Mytilus edulis*. Mar Environ Res. 46: 433-437.
- Pajot R, Hennequart F, Trintignac P, Glize P. 1998. Etude de familles de naissains pour la compréhension de mortalités "anormales" chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Rapport SMIDAP, Nantes. pp36.
- Pakay JL, Withers PC, Hobbs AA, Guppy M. 2002. *In vivo* downregulation of protein synthesis in the snail *Helix apersa* during estivation. J Physiol Regul Integr Comp Physiol 283: 197-204.

- Panserat S, Plagnes-Juan E, Brèque J, Kaushik S. 2001. Hepatic phosphoenolpyruvate carboxynase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). J Exp Biol 204:359-365.
- Perdue JA, Beattie JH, Chew KK. 1981. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. J Shellfish Res. 1: 9-16.
- Pilkis SJ, El Magrabi MR, Claus TH. 1988. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Ann Rev Biochem 57: 755-783.
- Plaxton WC, Storey KB. 1984. Purification and properties of aerobic and anoxic forms of pyruvate kinase from red muscle organe of the channeled whelk, *Busycotypus canaliculatum*. Eur J Biochem 143:257-265.
- Pörtner HO, Grieshaber MK. 1993. Critical PO<sub>2</sub> (s) in oxyconforming and oxyregulating animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production.
- Pörtner HO, Heisler N, Grieshaber MK. 1985. Oxygen consumption and mode of energy production in the intertidal worm *Sipunculus nudus* L.: definition and characterization of the critical PO<sub>2</sub> for an oxyconformer. Respiratory Physiol. 59: 361-377.
- Pouvreau S, Enriquez M, Le Souchu P, Connan JP, Le Roy B, Mingant C, Moal J, Delaporte M, Le Coz JR, Samain JF. 2003. Reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas*: Experimental approach. J Shellfish Res. 22: 351.
- Pouvreau S, Jonquières G, Buestel D 1999. Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particle size in a tropical lagoon habitat. Aquaculture 176: 295-314.
- Preedy VR, Smith DM, Sudgen PH. 1985. The effects of 6 hours of hypoxia on protein synthesis in rat tissues in vivo and in vitro. Biochem J 228, 179-185
- Quayle DB. 1969. Pacific oyster culture in British Columbia. Fish Res Board Can: 193 p.
- Quinn PG, Yeagley D. 2005. Insulin Regulation of PEPCK Gene Expression: A Model for Rapid and Reversible. Cur Drug Targets - Immune, Endocrine Metabolic Disorders. 5, 423-437.

- Ren JS, ID Marsden, AH. Ross, DR. Schiel, 2003. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *NZ J Mar Fresh Res.* 37: 171–182.
- Robert S, Bennett A, Bernard F, Blanchot J, Bougrier S, Buestel D, Caisey X, Geairon P, Jonquière G, Pellan A, Pouvreau S, Prou J, Remoissenet G, Tessier H, Tiapari J. 1994. Etude de la respiration et de la filtration de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*. PGRN, Action de recherche n° 8.
- Robohm RA, Draxler AFJ, Wieczorek D, Kapareiko D, Pitchford S. 2005. Effects of environmental stressors on disease susceptibility in American lobsters: a controlled laboratory study. *J Shellfish Res.* 24: 773-779.
- Roden EE, Tuttle JH. 1992. Sulfide release from estuarine sediments underlying anoxic bottom water. *Limnol. oceanogr.* 37, 725-738.
- Roise D, Schatz G. 1988. Mitochondrial presequences. *J Biol Chem.* 263: 4509-4511.
- Rueda JL, Smaal AC. 2004. Variation of the physiological energetics of the bivalve *Spisula subtruncata* (da Costa, 1778) within an annual cycle. *J Exp Mar Biol Ecol.* 301: 141-157.
- Ruiz C, Martinez D, Mosquera G, Abad M, Sanchez JL. 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.
- Salanki J, 1966, Daily activity rhythm of two Mediterranean Lamellibranch (*Pecten jacobus* and *Lithophaga lithophaga*) regulated by light-dark period, *Annales Instituti Biologici* (Tihany) 33, 135-142,
- Samain JF, Boudry P, Degremont L, Soletchnik P, Ropert M, Moal J, Mathieu M, Pouvreau S, Lambert C, Escoubas JM, Nicolas JL, Le Roux F, Renault T, Burgeot T, Bacher C. 2005. Summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, overview of three year results of the cooperative “Morest” project. *J Shellfish Research*, 23(1): 309.
- Samain JF, Dégremon 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 JL, Le Roux F, Renault T, Gagnaire B, Gélet 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 process. *Aquaculture*, in press.

- Santini G, Bruschini C, Pazzagli L, Pieraccini G, Moneti G, Chelazzi G. 2001. Metabolic response of the limpet *Patella caerulea* (L.) to anoxia and dehydration. *Comp Biochem Physiol.* 130A: 1-8.
- Sato I, Konishi K, Sunohara M, Mikami A. 2001. Enzyme activities and morphology of Japanese brown frog (*Rana japonica*) mitochondria in the tibialis anterior muscle during hibernation and active life. *Can J Zool.* 79: 1316–1321.
- Saucedo P, Ocampo L, Monteforte M, Bervera H. 2004. Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *Aquaculture* 229: 377-387.
- Savina M, Pouvreau S. 2004. A comparative ecophysiological study of two infaunal filter-feeding bivalves: *Paphia rhomboids* and *Glycymeris glycymeris*. *Aquaculture* 239:289-306.
- Schein V, Fernades Chitto AL, Etges R, Kucarsky LC, Van Wormhoudt A, Da Silva RSM. 2005. Effect of hypo-hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. *J Exp Mar Biol Ecol.* 316: 203-212.
- Schein V, Waché Y, Etges R, Kucarsky 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 letters* 561: 202-206.
- Scotti PD, Dearing SC, Greenwood DR, Newcomb RD. 2001. Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (Bivalvia: Mytilidae). *Comp Biochem Physiol.* 128B: 767-779.
- Sejra MK, Petersena JK, Jensenb KT, Rysgaard S. 2004. Effects of food concentration on clearance rate and energy budget of the Arctic bivalve *Hiatella arctica* (L) at subzero temperature. *J Exp Mar Biol Ecol*, 311, 171-183.
- Semenza GL. 1999. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Ann Rev Cell Dev Biol*, Vol. 15, 551-578.
- Shamseldin AA, Clegg JS, Friedman CS, Cherr GN, Pillai MC, 1997. Induced thermotolerance in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 16: 487-491.
- Shatkin G, Shumway SA, Hawes R. 1997. Considerations regarding the possible introduction of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to the Gulf of Maine: A review of global experience. *J. Shellfish Res.* 16: 463-477.

- 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.
- Sholz A, Westley R, Tarr M. 1973. Pacific oyster mass mortality studies; seasonal summary. Report n°4. Washington Department of Fisheries: 30 p.
- Shumway SA. 1982. Oxygen consumption in oysters : an overview. *Mar. Biol. Lett.*, 3, 1-23.
- Shumway SA. 1983. Factors affecting oxygen consumption in the coot clam *Mulinia lateralis* (Say). *Ophelia*, 22, 143-171.
- Shumway SA, Koehn RK. 1982. Oxygen consumption in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 9, 59-68.
- Silva AL, Wright SH. 1992. Integumental taurine transport in mussel gill : short term adaptation to reduced salinity. *J. Exp. Biol.*, 162, 265-279.
- Simcic T, Brandcelj A. 2006. Effects of pH on electron transport system (ETS) activity and oxygen consumption in *Gammarus fossarum*, *Asellus aquaticus* and *Niphargus sphagnicolus*. *Freshwater Biology*, 51: 686-694.
- Simpfendorfer RW, Vial MV, Monjsalve 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.
- Small AC, Wagenvoort A, Hemelraad J, Akkerman I, 1990. Response to stress of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to Dutch tidal waters. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 197-200.
- 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.
- Sokolova IM, Pörtner HO. 2001. Temperature effects on key metabolic enzymes in *Littorina saxatilis* and *L. obtusata* from different latitudes and shore levels. *Mar Biol* 139:113-126.
- Soletchnik P, Gouletquer P, Héral M, Razet D, Geairon P. 1996. Evaluation du bilan énergétique de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en baie de Marennes-Oléron (France). *Aquat Living Resour* 9 : 65-73.
- Soletchnik P, Razet D, Geairon P, Faury N, Gouletquer P. 1997. Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crasostea gigas* : réponses

- métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquat Living Resour* 10, 177-185.
- Soletchnik P, Le Moine O, Faury N, Razet D, Geairon P, Gouletquer P. 1999. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oléron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquat. Living Resour* 12: 131-143.
- Soletchnik P, Lambert C, Costil K, 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J. Shellfish Res.* 24, 197-207.
- Soletchnik P, Faury N, Gouletquer P. 2006, Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes–Oléron bay (France) *Aquaculture* 252, 328-338.
- Soletchnik P, Ropert M, Mazurié J, Fleury PG, Le Coz F. 2007. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring networks along the coast of France . *Aquaculture* (in press).
- Somero SN, Bowlus RD. 1983. Osmolytes and metabolic end products of molluscs : The design of compatible solute systems. In *The Mollusca. Environmental Biochemistry and Physiology*, Vol 2, PW Hochachkch, Wilbur KM (Eds). pp 77-98.
- Storey KB, Storey JM. 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q. Rev. Biol.* 65: 145-174.
- Storey KB. 1993. Molecular mechanism of metabolic arrest in molluscs. In: Hochachka PW, Lutz PL Sick T, Rosenthal M, van den Thillart G (eds) *Surviving Hypoxia : Mechanisms of Control and Adaptation*. CRC Press; Boca Raton; 253-269.
- Storey KB. 2004. Molecular mechanisms of anoxia tolerance. *Internat. Congress Series*, 1275, 47-54.
- Sukhotin AA. 1992. Respiration and energetics in mussels (*Mytilus edulis* L.) cultured in the White Sea. *Aquaculture*, 101, 41-57.
- Tomaru Y, Ebisuzaki S, Kawabata Z, Nakano SI. 2002. Respiration rate of the japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, feeding on *Pavlova lutheri* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture Res* 33: 33-36.
- Torrans EL, Clemens HP. 1982. Physiological and biochemical effects of acute exposure of fish to hydrogen sulfide. *Comp Biochem Physiol* 71C: 183-190.



- 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: 2027-203.
- Tremblay R, Myran B, Guderley H. 1998a. Thermal sensitivity of organismal and mitochondrial oxygen consumption in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L), to summer mortality. *J. Shellfish Res* 17: 141-152.
- Tremblay R, Myran B, Sevigny JM, Blier P, Guderley H. 1998b. Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.) to summer mortality. *Aquaculture*
- Truchot JP, Jouve-Duhamel A, 1983. Consommation d'oxygène de la crevette japonaise, *Penaeus japonicus*, en fonction de l'oxygénation du milieu : effets de la température et de l'acclimatation à des conditions ambiantes hypoxiques., *Bases biologiques de l'aquaculture*, Montpellier, 1983, Ifremer, Actes de colloques, n°1 : 245-254.
- Van den Berghe G. 1996. Disorders of gluconeogenesis. *J. Inherited Metabolic Diseases* 19: 470-477.
- 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.
- Vismann B. 1991. Sulfide tolerance: Physiological mechanisms and ecological implications. *Ophelia* 34: 1-27.
- Waechter M, Le Roux F, Nicolas JL, Marissal E, Berthe F. 2002. Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huitre creuse *Crassostrea gigas*: Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *CR Biol* 325: 231-238.
- Wang WX, Widdows J. 1993. Calorimetric studies on the energy metabolism of an infaunal bivalve, *Abra tenuis*, under normoxia, hypoxia and anoxia. *Mar Biol* 116: 73-79.
- Wang WX, Widdows J, Page DS, 1992. Effects of organic toxicants on the anoxic energy metabolism of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res* 32: 113-129.
- 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.

- West TG, Boutilier RG. 1998. Metabolic suppression in anoxic frog muscle. *J. Comp. Physiol.* 168, 273–280.
- Whitwam RE, Storey KB. 1990. Pyruvate kinase from the land snail *Otala lactea*: regulation by reversible phosphorylation during estivation and anoxia. *J Exp Biol* 154: 321-337.
- Whyte JC. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60: 231-241.
- Widdows J. 1978. Combined effect of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. *J Mar Biol Ass U.K* 58: 109-124.
- Widdows J, Bayne BL, Livingstone, Newell RIE, Donkin P. 1979. Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. *Comp Biochem Physiol* 62A: 301-308.
- Widdows J, Shick JM. 1985. Physiological response of *Mytilus edulis* and *Cardium edule* to aerial exposure. *Mar Biol* 85: 217-232.
- Wieser W, Wright E, 1979. The effects of season and temperature on D-lactate dehydrogenase, pyruvate kinase and arginine kinase in the foot of *Helix pomatia* L. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 360: 533-42.
- Williamson D.H., 1974, Determination with alanine dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 2. Academic Press, New York, 1679-1682.
- Willson LL, Burnett LE. 2000. Whole animal and gill tissue oxygen uptake in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Effect of hypoxia, hypercapnia, air exposure, and infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 246: 223-240.
- Yamada K, Noguchi T. 1999. Review Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J* 337: 1–11.
- Zammit VA, Newholmes 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 RS, Randall DJ, Lam PK, Ip YK, Chew SF. 2000. Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. *J Fish Biol.* 57, 1160-1171.

---

## **Annexes**

---

## Articles dans les revues à comité de lecture

- 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.
- Le Moullac G**, Fleury PG, Le Coz JR, Moal J, Samain JF. 2007. Effect of sediment nearness on the metabolic enzyme activity and energy state of the oyster *Crassostrea gigas*. Aquatic Living Resources, 20, 279-286.
- Le Moullac G**, Quéau I, Le Souchu P, Pouvreau S, Moal J, Le Coz JR, Samain JF, 2007. Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature. Marine Biology Research 3, 357-366.
- Le Moullac G**, Cheize M, Gastineau O, Daniel JY, Le Coz JR, Huvet, A Moal J, Pouvreau S, Van Wormhoudt A, Samain JF. 2008. Ecophysiological and metabolic adaptations to sulphide exposure of the oyster *Crassostrea gigas*. Journal of Shellfish Research, 27, 355-363.

## Contributions Morest

- Lambert C., Moal J., **Le Moullac G.**, Pouvreau S. 2007. Les risques associés à la physiologie de l'huître en période de reproduction. Défi Morest. Samain J.F. and McCombie H. (eds). Éd. Ifremer/Quæ. pp. 51-94.
- Burgeot T., Gagnaire B., Renault T, Haure J., Moraga D., David E., Boutet I., Sauriau P.G., Malet N., Bouchet V.12, Le Roux A., Lapègue S., Bouilly K., **Le Moullac G.**, Arzul G., Knoery J., Quiniou F., Bacher C., Soletchnik P. 2007. Les risques associés au stress environnemental. Défi Morest. Samain J.F. and McCombie H. (eds). Éd. 117

Ifremer/Quæ. pp. 95-139.

Moal J., Lambert C., Pouvreau S., **Le Moullac G.**, Samain J.F, 2007. Le facteur de risque température Défi Morest. Samain J.F. and McCombie H. (Eds). Éd. Ifremer/Quæ. pp. 271-289.

## Communications orales

**Le Moullac G**, Van Wormhoudt A. 2004. Effet de l'hypoxie et de l'émergence sur le métabolisme de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Communication orale aux journées MOREST, Novembre 2004, Caen.

**Le Moullac G**, 2005. Effet de la température sur le comportement écophysologique de *C. gigas* en relation avec la teneur en oxygène. Communication orale aux Journées Morest 23-25/11/2005 Aber Wrach.

**Le Moullac G**, 2005. Respiration et reproduction, la gamétogenèse est-elle coûteuse ?. Communication orale aux Journées Morest 23-25/11/2005 Aber Wrach.

**Le Moullac G**, 2005. Gestion des réserves énergétiques chez l'huître *C. gigas* : réponse au stress. Communication orale aux Journées Morest 23-25/11/2005 Aber Wrach.

Lambert C, Moal J, **Le Moullac G**, Pouvreau S. 2006. Les risques associés à la physiologie de l'huître en période de reproduction. Colloque Final 'Défi Morest', La Rochelle, Mars 2006.

Burgeot T, Gagnaire B, Renault T, Haure J, Moraga D, David E, Boutet I, Sauriau PG, Malet N, Bouchet V, Lapègue S, Bouilly K, **Le Moullac G**, Arzul G, Knoery J, Quiniou F, Bacher C, Soletchnik P. 2006. Caractérisation des facteurs de risques associés aux mortalités estivales, *Synthèse du thème 3*, Risque associé au stress environnemental Colloque Final 'Défi Morest', La Rochelle, Mars 2006.

## Liste des figures

<b>FIGURE 1: DIAGRAMME DES PRINCIPALES FONCTIONS CELLULAIRES .....</b>	<b>14</b>
<b>FIGURE 2: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU BILAN ENERGETIQUE CELLULAIRE .....</b>	<b>16</b>
<b>FIGURE 3: EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LE METABOLISME RESPIRATOIRE CHEZ DES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS (METHODES STANDARDISEES).....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURE 4: RELATIONS ENTRE LA TEMPERATURE ET LA CONSOMMATION D'OXYGENE CHEZ DES BIVALVES MARINS ET D'EAU DOUCE (METHODES NON STANDARDISEES).....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURE 5: RELATIONS ENTRE LA DENSITE TROPHIQUE ET LA CONSOMMATION D'OXYGENE CHEZ L'HUITRE C. GIGAS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE .....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURE 6: RESPIRATION ET CONSOMMATION (LES DONNEES PRESENTEES SONT ISSUES D'EXPERIMENTATIONS REALISEES A LA STATION EXPERIMENTALE D'ARGENTON DANS LE CADRE DU PROJET MOREST).....</b>	<b>27</b>
<b>FIGURE 7: EFFET DE LA GAMETOGENESE SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE DU BIVALVE SPISULA (RUEDA ET SMAAL, 2004).....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURE 8: EFFET DU DEVELOPPEMENT GONADIQUE SUR LE METABOLISME BASAL. LES STADES 1, 2 ET 3 REPRESENTENT DES STADES VISUELS DU DEVELOPPEMENT GONADIQUE (MOYENNE <math>\pm</math> SE, N=7). (LAMBERT ET AL, 2007) .....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURE 9 : CONSOMMATION D'O<sub>2</sub> (A) ET ACTIVITE VENTILATOIRE (B) DE CORBICULA FLUMINEA EN RELATION AVEC LE NIVEAU D'OXYGENATION DU MILIEU. (TRAN ET AL, 2000).....</b>	<b>33</b>
<b>FIGURE 10: DIAGRAMME ILLUSTRANT LES TRANSITIONS DES VOIES DE DEGRADATION DU GLYCOGENE EN RELATION AVEC LES CYCLES TIDAUX (DE ZWAAN ET MATHIEU, 1992). .....</b>	<b>36</b>
<b>FIGURE 11 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE CONDITIONNEMENT DES HUITRES EN NORMOXIE ET EN HYPOXIE .....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURE 12 : DISPOSITION DES ELEMENTS D'UN BAC EXPERIMENTAL.....</b>	<b>56</b>

<b>FIGURE 13 ENREGISTREMENTS VALVOMETRIQUES EN CONTINU REPRESENTATIFS DU COMPORTEMENT EN NORMOXIE (HAUT) ET EN HYPOXIE (BAS).....</b>	<b>60</b>
<b>FIGURE 14 : EXEMPLES D'ANALYSES SPECTRALES DES DONNEES VALVOMETRIQUES EN NORMOXIE (A) EN HYPOXIE (B).....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURE 15 : EFFET DE LA TEMPERATURE ET DE L'HYPOXIE SUR L'OUVERTURE MOYENNE STANDARDISEE DES HUITRES NORMOXIE (GRIS), HYPOXIE (NOIR). .....</b>	<b>62</b>
<b>FIGURE 16 : LES CHANGEMENTS BIOENERGETIQUES EN NORMOXIE (BARRES GRISES) ET EN HYPOXIE (BARRES NOIRES) AVEC LA TEMPERATURE. (A) INGESTION, (B) EFFICACITE D'ASSIMILATION, (C) CONSOMMATION D'OXYGENE, (D) BILAN ENERGETIQUE. MOYENNE±ERREUR STANDARD. ....</b>	<b>63</b>
<b>FIGURE 17: FILTRATION ET CONSOMMATION D'OXYGENE DES HUITRES S (CARRES GRIS) ET DES HUITRES R (TRIANGLES BLANCS) EN RELATION AVEC LE NIVEAU TROPHIQUE (0, 35000 ET 50000 CELL/ML) (MOYENNE±ES, N=14).....</b>	<b>104</b>
<b>FIGURE 18: ACTIVITES DE LA PK ET DE LA PEPCK DANS LES HUITRES ENTIERES EN NORMOXIE (N=16), EN HYPOXIE (N=12) ET SOUS L'EFFET DES SULFURES (N=12) CHEZ LES HUITRES R ET S (MOYENNE±ES) .....</b>	<b>107</b>
<b>FIGURE 19 : EXPRESSION DES GENES CODANT POUR LA PK ET DE LA PEPCK DANS LES MUSCLE ADDUCTEURS EN NORMOXIE (N=16), EN HYPOXIE (N=12) ET SOUS L'EFFET DES SULFURES (N=12) CHEZ LES HUITRES R ET S (MOYENNE±ES).....</b>	<b>108</b>
<b>FIGURE 20 : DIAGRAMME DU CYCLE GLUCOSE-ALANINE .....</b>	<b>112</b>

Liste des tableaux

<b>TABLEAU 1 : EFFET DE L'HYPOXIE ET DE L'ANOXIE SUR LA PRODUCTION DE METABOLITES CHEZ DES INVERTEBRES MARINS .....</b>	<b>37</b>
<b>TABLEAU 2 : VALEURS HORAIRES MOYENNES DES DIFFERENTS NIVEAUX DE RYTHMES EN NORMOXIE ET EN HYPOXIE DETECTEES EN ANALYSE SPECTRALE.....</b>	<b>61</b>
<b>TABLEAU 3: COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES HUITRES APRES 20 JOURS D'HYPOXIE SELON LA TEMPERATURE (MOYENNE±ERREUR STANDARD, N = 5-8) .....</b>	<b>64</b>
<b>TABLEAU 4: VALEURS MOYENNES DE LA TENEUR EN PROTEINES, LIPIDES ET GLUCIDES DES HUITRES ENTIERES R ET S EN NORMOXIE ET EN HYPOXIE PENDANT LA PERIODE EXPERIMENTALE (MOYENNE±ERREUR STANDARD) .....</b>	<b>105</b>
<b>TABLEAU 5: VALEURS MOYENNES DE LA TENEUR EN PROTEINES, LIPIDES ET GLUCIDES DES HUITRES ENTIERES R ET S EN NORMOXIE ET EXPOSEES AUX SULFURES PENDANT LA PERIODE EXPERIMENTALE (MOYENNE±ERREUR STANDARD).....</b>	<b>106</b>
<b>TABLEAU 6: VALEURS MOYENNES DES METABOLITES DANS LE MUSCLE DES HUITRES R ET S EN NORMOXIE ET EXPOSEES AUX SULFURES (MOYENNE±ERREUR STANDARD).....</b>	<b>109</b>
<b>TABLEAU 7 : GENES REGLES AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL (GOTHIE ET POUYSSEGUR, 2002) .....</b>	<b>120</b>



**TITRE** : Adaptation du métabolisme respiratoire de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

*Résumé*

---

Les mortalités estivales des huîtres résultent de l'interaction de nombreux facteurs. Une hypothèse respiratoire propose de lier les causes présumées de la baisse énergétique, les pratiques culturales et le milieu. Le présent travail a pour objectif de d'identifier des marqueurs métaboliques de stress. Les ADNc des gènes codant pour la PK et la PEPCK ont été clonés et séquencés pour en détecter les niveaux de régulation. La proximité du sédiment affecte les réserves énergétiques et les voies métaboliques de production d'énergie impliquant une régulation de la PK. Face à la chute d'oxygène, le comportement des huîtres est de type oxyrégulateur, avec une faible capacité de régulation. En hypoxie, la glycolyse est ralentie. La PK est inhibée via une augmentation de la sensibilité à l'alanine alors que l'activité ETS de la chaîne respiratoire est stimulée. La filtration est affectée dès 20µM de sulfures alors que la consommation d'oxygène persiste. A court terme, un métabolisme anaérobie avec inhibition de la chaîne respiratoire et baisse de la charge énergétique se met en place. Les niveaux de régulation des PK et PEPCK musculaires sont différents : la PEPCK apparaît régulée au niveau transcriptionnel alors que la PK subit une régulation allostérique, avant une régulation transcriptionnelle tardive. Cette étude révèle de nouvelles spécificités des huîtres R et S. En normoxie, le stock plus important des glucides des huîtres S est associé à une production d'ATP plus élevée via une activité PK plus intense. En hypoxie, l'expression de la PEPCK musculaire est stimulée chez les S. Dans toutes les situations respiratoires, les huîtres R produisent plus d'alanine.

**TITLE** : Adaptation of respiratory metabolism in the pacific oyster *Crassostrea gigas*.

*Abstract*

---

Summer mortality of the oyster result from the interaction of many factors. A respiratory assumption proposes a link between the supposed causes of the energy state, the cultivation methods and the medium. This work is focused towards the search for specific metabolic markers of environmental stresses. The cDNA of genes coding for PK and PEPCK were cloned and sequenced in order to detect their regulation level. The sediment nearness affects the state of energy reserves, the metabolic pathways of energy production implying a regulation of the PK. Face to the dissolved oxygen decline, oysters were oxyregulator but with a low regulation ability. In hypoxia, glycolysis was slowed down. PK activity was inhibited resulting from an increase in alanine sensitivity whereas ETS activity of the respiratory chain was stimulated. When exposed to sulphides, filtration of oyster was affected from 20µM whereas the oxygen consumption persisted. At short term, an anaerobic metabolic pathway associated to the inhibition of the respiratory chain and the fall of CEA took place. Muscular PK and PEPCK had different regulation levels: PEPCK appeared controlled at the transcriptional level and PK was first allosterically regulated before to be lately regulated at transcriptional level. Lastly, this study revealed new specificities of the oysters R and S. In normoxia, the more important stock of carbohydrate of the S oysters was correlated to a higher production of ATP via a more intense PK activity. In hypoxia, the expression of the muscular PEPCK was stimulated in S oyster. In all the situations, the oysters R produce more alanine.

**MOTS CLES** : bivalves, anoxie, expression génique, enzyme - - régulation

**DISCIPLINE** : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions

*UMR IFREMER 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins – IBFA  
UNIVERSITE DE CAEN - 14032 CAEN CEDEX*