



Université de Caen  
Basse-Normandie

## UNIVERSITE de CAEN – BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée  
Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement



EdNBISE  
Ecole doctorale Normande  
Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement

## THESE

Présentée par

**Anne-Caroline HANQUET**

et soutenue le

**6 mai 2009**

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ DE CAEN**

**Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions**  
(arrêté du 7 août 2006)

**Approches cellulaires et moléculaires de la gestion des réserves chez l'huître, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793).  
Suivi saisonnier du métabolisme énergétique et effet du niveau trophique sur la mise en réserve.**

### MEMBRES DU JURY

<b>Monsieur Michel AUFFRET</b> , Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
<b>Monsieur Alain VAN WORMHOUDT</b> , Directeur de Recherche CNRS, MNHN	Rapporteur
<b>Monsieur François LEBOULENGER</b> , Professeur, Université du Havre	Examineur
<b>Monsieur Franck RODET</b> , Maître de Conférences, Université de Lille 1	Examineur
<b>Madame Kristell KELLNER</b> , Maître de Conférences, Université de Caen	Examineur
<b>Monsieur Michel MATHIEU</b> , Professeur, Université de Caen	Directeur de thèse









Université de Caen  
Basse-Normandie

## UNIVERSITE de CAEN – BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée  
Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement



EdNBISE  
Ecole doctorale Normande  
Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement

## THESE

Présentée par

**Anne-Caroline HANQUET**

et soutenue le

**6 mai 2009**

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ DE CAEN**

**Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions**  
(arrêté du 7 août 2006)

**Approches cellulaires et moléculaires de la gestion des réserves chez l'huître, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793).  
Suivi saisonnier du métabolisme énergétique et effet du niveau trophique sur la mise en réserve.**

### MEMBRES DU JURY

**Monsieur Michel AUFFRET**, Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Rapporteur

**Monsieur Alain VAN WORMHOUDT**, Directeur de Recherche CNRS, MNHN

Rapporteur

**Monsieur François LEBOULENGER**, Professeur, Université du Havre

Examineur

**Monsieur Franck RODET**, Maître de Conférences, Université de Lille 1

Examineur

**Madame Kristell KELLNER**, Maître de Conférences, Université de Caen

Examineur

**Monsieur Michel MATHIEU**, Professeur, Université de Caen

Directeur de thèse







## AVANT-PROPOS

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'*Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement* sous la direction du professeur Michel Mathieu et sous l'encadrement du docteur Kristell Kellner dans le cadre de l'*UMR M 100 IFREMER, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins* de l'Université de Caen.

Cette étude a bénéficié du soutien financier du conseil régional de Basse Normandie et du syndicat mixte pour l'équipement du littoral (SMEL).



**ECOLE DOCTORALE NORMANDE DE BIOLOGIE INTEGRATIVE,  
SANTÉ, ENVIRONNEMENT  
ROUEN - CAEN - LE HAVRE**



Université de Caen  
Basse-Normandie

**UNIVERSITE DE CAEN BASSE-NORMANDIE  
UMR M 100 IFREMER  
PHYSIOLOGIE ET ECOPHYSIOLOGIE DES MOLLUSQUES MARINS  
IFR 146 – ICORE**

Université de Caen, Esplanade de la Paix 14032 CAEN Cedex  
Directeur : Pr. Michel MATHIEU (Université de Caen)  
Suivi Scientifique : Dr. Kristell KELLNER  
Participant : Anne-Caroline HANQUET



**SYNDICAT MIXTE POUR L'EQUIPEMENT DU LITTORAL (SMEL)**  
SMEL Siège administratif  
Maison du Département  
50008 Saint-Lô Cedex



**CONSEIL REGIONAL DE BASSE NORMANDIE**  
Abbaye aux Dames - Place Reine Mathilde  
BP 523 - 14035 CAEN Cedex







## REMERCIEMENTS

*Je souhaite tout d'abord témoigner ma profonde reconnaissance au Professeur Michel Mathieu, directeur du Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, de l'IFR 146 et responsable de l'UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins IFREMER-UCBN, de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire et de m'avoir fait confiance depuis plusieurs années jusqu'à l'achèvement de cette thèse.*

*Je remercie sincèrement les membres du jury, le Professeur Michel Auffret et le Directeur de recherche Alain Van Wormhoudt, d'avoir accepté de lire et de critiquer ce manuscrit en qualité de rapporteurs, ainsi que le Docteur Franck Rodet et le Professeur François Le Boulenger d'avoir bien voulu examiner ce travail.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Docteur Kristell Kellner de m'avoir patiemment guidé tout au long de ce travail. Il est indéniable que ses grandes qualités d'écoute, de persévérance, de rigueur et de critiques scientifiques ont contribué à l'accomplissement de ce travail de recherche.*

*Ce travail étant le fruit de nombreuses collaborations, j'exprime mes remerciements à toutes les personnes qui y ont participé et plus particulièrement à :*

*Jean-Louis Blin (Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral) pour son optimisme, son écoute, ses précieux conseils, et à Agathe...*

*l'équipe de l'IFREMER de Port en Bessin : Michel Ropert, Fabienne Rauflet, Aline Grangery pour nos fantastiques sorties en 4x4,*

*Jean-Marc Poncet qui m'a fait partagé tout son savoir sur la technique de cryopréservation et nos discussions sur bien d'autres sujets,*

*l'équipe d'IMOGERE (Installations de Mise en Oeuvre et de GEstion des Radioéléments) : Pierre Barbey, pour son aide et ses conseils sur le fonctionnement de la 'salle chaude' et Céline Ballandonne qui en plus d'être une excellente collègue de travail est devenue une véritable amie.*

*Clothilde Heude, Katherine Costil et Juliette Carpentier-Royer pour leur investissement dans ce travail et leur contribution dans la réflexion sur cette étude,*

*Hélène Bacca avec qui nous avons entamé une collaboration au sein du programme MOREST, s'est révélée être une excellente camarade en salle de manip. Je te remercie sincèrement pour ta confiance et ton aide précieuse. Je vous souhaite beaucoup de bonheur à Xavier et à toi.*

*J'aimerais également remercier l'ensemble de techniciens, ingénieurs et stagiaires de l'UMR 100 IFREMER Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins qui ont su*



*m'apporter en toutes circonstances leur soutien et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, qui ont participé de loin ou de près au développement de cette thèse. Je pense en particulier à Marie-Pierre Dubos, à Béatrice Adeline (merci encore pour ces nombreuses heures passées avec les lames d'histo), et à Sandra Sritharan qui m'a écouté pendant de longues heures lors des dissections des animaux. Merci à vous, j'ai été touchée par votre attention et votre soutien.*

*Je remercie tous les anciens doctorants et ceux encore présents au laboratoire, pour leur bonne humeur et les « pauses café » que nous nous sommes accordés et qui ont permis d'éclaircir certains points qui me semblaient parfois bien obscurs, orientant souvent nos conversations sur des sujets philosophiques. Ils se reconnaîtront : Juju et Guigui, Céc' et Fanou, Ptit gris, Banban, Tiquic, Bob, Brice, Aude Houdan-Fourmont, Tomtom, Amandine, Mimite et bien d'autres que j'ai eu la chance de croiser à Claude Bloch, puis en SC258... Un remerciement plus spécial à Amine, avec qui j'ai évolué et partagé d'inoubliables moments au sein du laboratoire. Nos routes nous amèneront certainement à nous éloigner mais je sais qu'il sera possible de provoquer des rencontres. Il y a enfin des amis merveilleux que l'on est fier de connaître tels que Mélanie et Thibaut Lavanant, qui m'ont épaulé et par leur soutien, leur écoute et leur regard extérieur, m'ont grandement aidé à avancer.*

*Certaines rencontres un peu à part nous marquent plus profondément... Christophe Fleury en fait parti. Il a été le coach de ces derniers mois, il m'a encouragé dans les moments difficiles, il m'a apporté un réel soutien. Pour certains, Christophe est d'une personnalité énigmatique, un virtuose dans son travail, un passionné par la recherche mais il est surtout un véritable et précieux ami. Merci Dr. Tof !*

*Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du Laboratoire d'Ecotoxicologie - Milieux Aquatiques du Havre pour leur accueil, leur dynamisme, leur bonne humeur et leur précieuse aide dans l'achèvement de ce travail de thèse, un profond remerciement en particulier à Jean-Michel Danger. J'exprime toute ma reconnaissance à Béatrice et à Patrice Rocher, Béatrice m'a encadré lors de mon DEA, elle a continué à m'épauler et m'a beaucoup apporté dans la réflexion sur mon travail de thèse.*

*Mes pensées se tournent évidemment vers ma famille qui m'a transmis le goût du dépassement de soi, les valeurs fortes de la vie, celles qui vous aident à prendre les meilleures décisions et ainsi à ne jamais rien regretter.*

*Damien, grâce à toi, la vie dévoile sa véritable saveur. Je t'aime.*

*Une douce pensée à notre jolie Sophie...*



*Un mandarin partit un jour dans l'au-delà. Il arriva d'abord en enfer. Il vit beaucoup de personnes attablées devant des plats de riz mais toutes mouraient de faim car elles avaient des baguettes longues de deux mètres et ne pouvaient s'en servir pour se nourrir. Puis, il alla au ciel. Là aussi, il vit beaucoup de personnes attablées devant des plats de riz. Toutes étaient heureuses et en bonne santé. Elles avaient également des baguettes longues de deux mètres mais chacune s'en servait pour nourrir la personne qui était assise en face d'elle.*

*« Les voyages du Mandarin », Conte chinois.*



## CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Les travaux réalisés pendant cette thèse ont donné lieu à des communications scientifiques.

- **Publications**

**Hanquet-Dufour, A.C., Kellner, K., Heude, C., Naimi A., Mathieu M. & Poncet J.M.** (2006) Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells: Viability and metabolic activity. *Cryobiology*. 53: 28-36.

**Kellner, K., Hanquet-Dufour, A.C., Jouaux, A. & Mathieu M.** Involvement of a sodium Glucose co-transport into vesicular cells of the oyster *Crassostrea gigas*. (en préparation).

**Hanquet-Dufour, A.C., Bacca, H., Kellner, K. & Mathieu M.** Impact of nutritional level on reserves management by resistant and sensitive oysters. (en préparation).

- **Participations aux Congrès**

- **Communications affichées**

**Dufour, A.C., Naimi, A., Kellner, K., Heude, C. & Mathieu M.** Cryopréservation de cellules de Mollusque. Application à l'étude de la gestion des réserves de l'huître creuse *Crassostrea gigas* élevée en milieux trophiques riche ou pauvre (I).  
Caen, 19 Mars 2004, Journée de l'Ecole doctorale Normande Chimie-Biologie.

**Hanquet-Dufour, A.C., Kellner, K., Heude, C. & Mathieu M.** Cryopréservation de cellules de Mollusque. Application à l'étude de la gestion des réserves de l'huître creuse *Crassostrea gigas* élevée en milieux trophiques riche ou pauvre (II).  
Le Havre, 18 Mars 2005, Journée de l'Ecole doctorale Normande Chimie-Biologie.

- **Communications orales**

**Hanquet-Dufour, A.C., Kellner, K., Heude, C. & Mathieu M.** Cryopréservation de cellules de Mollusque. Application à l'étude de la gestion des réserves de l'huître creuse *Crassostrea gigas* élevée en milieux trophiques riche ou pauvre (II).  
Le Havre, 18 Mars 2005, Journée de l'Ecole doctorale Normande Chimie-Biologie.

**Hanquet-Dufour, A.C., Heude, C., Kellner, K., Bacca, H. & Mathieu M.** Characterization of glucidic metabolism of pacific oyster, *Crassostrea gigas*, as a way to study the reserves management.  
Brest, 2-5 Octobre 2005, 8<sup>th</sup> international conference on shellfish restoration.



## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN :</b>	<b>A</b> cide <b>D</b> ésoxyribo <b>N</b> ucléique
<b>ADNc :</b>	<b>A</b> cide <b>D</b> ésoxyribo <b>N</b> ucléique <b>c</b> omplémentaire
<b>ADNg :</b>	<b>A</b> cide <b>D</b> ésoxyribo <b>N</b> ucléique <b>g</b> énomique
<b>AG :</b>	<b>A</b> ire <b>G</b> onadique
<b>APC :</b>	<b>A</b> cide <b>P</b> er <b>C</b> hlorique
<b>ARN :</b>	<b>A</b> cide <b>R</b> ibo <b>N</b> ucléique
<b>ARNm :</b>	<b>A</b> cide <b>R</b> ibo <b>N</b> ucléique <b>m</b> essenger
<b>ATP :</b>	<b>A</b> dénosine <b>T</b> riphosphate
<b>BET :</b>	<b>B</b> romure d' <b>E</b> thidium
<b>BSA :</b>	<b>S</b> erum <b>a</b> lbumine <b>b</b> ovine
<b>CNC :</b>	<b>C</b> omité <b>N</b> ational de la <b>C</b> onchyliculture
<b>Ct :</b>	<b>C</b> ycle <b>s</b> euil
<b>CT :</b>	<b>C</b> oupe <b>T</b> ransversale
<b>CV :</b>	<b>C</b> ellule <b>v</b> ésiculeuse
<b>DEPC :</b>	<b>D</b> i <b>E</b> thyl <b>P</b> yro <b>C</b> arbonate
<b>DO :</b>	<b>D</b> ensité <b>O</b> ptique
<b>dpm :</b>	<b>d</b> ésintégrations <b>p</b> ar <b>m</b> inute
<b>EBD :</b>	<b>E</b> au <b>B</b> idistillée
<b>FAO :</b>	<i><b>F</b>ood <b>A</b>gricultural <b>O</b>rganisation</i>
<b>GI :</b>	<b>G</b> onie indifférenciée
<b>Glc :</b>	<b>G</b> lucose
<b>GLuT :</b>	<i><b>G</b>Lucose <b>T</b>ransporter</i>
<b>GM :</b>	<b>G</b> onade- <b>M</b> anteau
<b>H :</b>	<b>H</b> eure
<b>Hepes :</b>	<b>N</b> -[2- <b>H</b> ydroxy <b>E</b> thyl] <b>P</b> ipérazine- <b>N'</b> -[2- <b>E</b> thane <b>S</b> ulfonic acide]
<b>IFREMER :</b>	<b>I</b> nstitut <b>F</b> rançais pour la <b>R</b> echerche et l' <b>E</b> xploitation de la <b>MER</b>
<b>KCl :</b>	<b>C</b> hlorure de <b>P</b> otassium
<b>KDa :</b>	<b>K</b> ilo <b>D</b> alton
<b>L15 :</b>	<b>M</b> ilieu <b>L</b> eibovitz
<b>LBBM :</b>	<b>L</b> aboratoire de <b>B</b> iologie et <b>B</b> iotecnologies <b>M</b> arines
<b>LH :</b>	<b>L</b> acune <b>h</b> émocytaire
<b>OM :</b>	<b>O</b> vocyte <b>m</b> ature
<b>M :</b>	<b>M</b> ole.L <sup>-1</sup>
<b>MFS :</b>	<i><b>M</b>ajor <b>F</b>acilitator <b>S</b>uperfamily</i>
<b>mg :</b>	<b>m</b> illigramme
<b>min :</b>	<b>m</b> inute
<b>mL :</b>	<b>m</b> illi <b>L</b> itre
<b>mM :</b>	<b>m</b> illi <b>M</b> ole.L <sup>-1</sup>
<b>MOREST :</b>	<b>M</b> ORTalités <b>E</b> STivales
<b>MTT :</b>	<b>3</b> -(4,5-di <b>M</b> éthyl <b>T</b> hiazol-2-yl)-2,5-diphényl <b>T</b> étrazolium bromide
<b>μCi :</b>	<b>m</b> icro <b>C</b> urie
<b>μg :</b>	<b>m</b> icrogramme
<b>μL :</b>	<b>m</b> icro <b>L</b> itre
<b>NaCl :</b>	<b>C</b> hlorure de <b>S</b> odium
<b>nmole :</b>	<b>n</b> anomole
<b>O :</b>	<b>O</b> vogonie
<b>pb :</b>	<b>p</b> aire de <b>b</b> ases
<b>QR :</b>	<b>Q</b> uantité <b>R</b> elative
<b>R :</b>	<b>H</b> uîtres <b>R</b> ésistantes aux mortalités estivales
<b>RT-PCR :</b>	<i><b>R</b>everse <b>T</b>ranscriptase-<b>P</b>olymerase <b>C</b>hain <b>R</b>eaction</i>
<b>S :</b>	<b>H</b> uîtres <b>S</b> ensibles aux mortalités estivales
<b>SDS :</b>	<b>S</b> odium <b>D</b> odécyl <b>S</b> ulfate



<b>SGLT :</b>	<b>S</b> odium- <b>GL</b> ucose <i>T</i> ransporter
<b>SMEL :</b>	Syndicat <b>M</b> ixte pour l' <b>E</b> quipement du <b>L</b> ittoral
<b>SPT :</b>	<b>S</b> permatide
<b>SPZ :</b>	<b>S</b> permatozoïde
<b>SYCAMAR :</b>	<b>S</b> ystème <b>C</b> ontrôlé d' <b>A</b> mbiance <b>MAR</b> ine
<b>T :</b>	Huîtres dîtes « <b>T</b> émoins »
<b>Taq :</b>	<b>T</b> hermus <b>a</b> quaticus
<b>To :</b>	Début du conditionnement
<b>ToE :</b>	Animaux prélevés sur le site naturel (Estran) au début du conditionnement
<b>TCA :</b>	Acide <b>T</b> ri <b>C</b> hloro <b>A</b> cétique
<b>Tf :</b>	Fin du conditionnement, durée 1 mois sur estran
<b>TfE :</b>	Animaux prélevés sur le site naturel (Estran) en fin de conditionnement, durée un mois
<b>TfA+ :</b>	Animaux prélevés au bout d'un mois de conditionnement ayant été soumis à une forte alimentation
<b>TfA- :</b>	Animaux prélevés au bout d'un mois de conditionnement ayant été soumis à un jeûne
<b>Tm :</b>	<i><b>M</b>elting <b>T</b>emperature</i>
<b>TG :</b>	Tubule <b>g</b> onadique
<b>TR :</b>	Tissu de <b>R</b> éserve



## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>I. CONTEXTE DE L'ETUDE ET PROBLEMATIQUE</b>	<b>3</b>
<b>II. REPRODUCTION ET METABOLISME ENERGETIQUE CHEZ <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> :</b>	<b>4</b>
<b>BILAN DES CONNAISSANCES</b>	
1. <b>Systématique</b>	<b>4</b>
2. <b>Anatomie de l'huître creuse</b>	<b>5</b>
3. <b>Cycle biologique et reproduction</b>	<b>7</b>
4. <b>Métabolisme énergétique</b>	<b>11</b>
<b>III. MECANISMES DE TRANSPORT DU GLUCOSE A TRAVERS LES MEMBRANES</b>	<b>16</b>
1. <b>Modes de transport à travers les membranes cellulaires</b>	<b>16</b>
1.1. Voie passive : diffusion	17
a. Mécanismes de diffusion simple	17
b. Diffusion facilitée par une protéine transmembranaire	18
1.2. Voie active : transport couplé à une dépense énergétique	18
a. Couplage du transport à l'hydrolyse d'ATP	19
b. Transport actif secondaire	20
c. Autres modes de transports actifs	21
2. <b>Les différentes superfamilles de protéines impliquées dans le transport du glucose</b>	<b>21</b>
2.1. Mécanismes de diffusion facilitée : la superfamille des MFS	21
a. La superfamille des MFS	21
b. Topologie des transporteurs de la superfamille des MFS	22
c. Mode de fonctionnement	23
d. Comparaison de séquence et phylogénie	23
e. Le transporteur facilité de glucose : GLuT	25
2.2. Mécanismes de transport actif primaire : la famille ABC	30
2.3. Mécanismes de transport actif secondaire : la famille des SSSF	32
a. La famille des SSSF	32
b. Topologie des transporteurs de la famille des SSSF	32
c. Mode de fonctionnement	33
d. Comparaison de séquence et phylogénie	33
e. Le cotransporteur Na <sup>+</sup> /glucose : SGLT	34
2.4. Mécanismes de transport couplé à une phosphorylation : la famille des PTS	38
3. <b>Mécanismes de transport du glucose dans le règne animal</b>	<b>39</b>
3.1. Transport du glucose chez les Vertébrés	39
a. Chez les Mammifères	39
b. Chez les Oiseaux	39
c. Chez les Téléostéens	40
d. Chez les Amphibiens	40
3.2. Transport du glucose chez les Invertébrés	41
a. Chez les Arthropodes	41
b. Chez les Plathelminthes et des Nématelminthes	41
c. Chez les Mollusques	41
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>45</b>
1. <b>Animaux</b>	<b>47</b>
2. <b>Expérimentation <i>in vivo</i></b>	<b>48</b>
2.1. Suivi saisonnier sur estran	48



2.2. Conditionnement artificiel	50
<b>3. Mesures biométriques</b>	<b>51</b>
<b>4. Histologie</b>	<b>51</b>
4.1. Réalisation des coupes transversales d'huîtres	51
4.2. Fixation, inclusion et coupe	52
4.3. Coloration : Trichrome de Prenant Gabe (Gabe, 1968)	52
4.4. Analyse d'images	53
<b>5. Dosages biochimiques</b>	<b>54</b>
<b>6. Préparation de la suspension cellulaire</b>	<b>54</b>
<b>7. Tests biologiques <i>in vitro</i></b>	<b>55</b>
<b>8. Cryopréservation des cellules vésiculeuses</b>	<b>58</b>
<b>9. Expression quantitative des SGLT</b>	<b>59</b>
<b>10. Analyse des résultats</b>	<b>62</b>
 <b>CHAPITRE I. CARACTERISATION DU TRANSPORT DU GLUCOSE : IMPLICATION DE TRANSPORTEURS MEMBRANAIRES</b>	 <b>63</b>
 <b>INTRODUCTION</b>	 <b>65</b>
 <b>RESULTATS</b>	 <b>71</b>
<b>1. Glycémie dans l'hémolymph</b>	<b>71</b>
<b>2. Préparation des suspensions de cellules vésiculeuses dissociées</b>	<b>71</b>
<b>3. Transport du glucose dans les cellules vésiculeuses : approche <i>in vitro</i></b>	<b>73</b>
3.1. Choix du traceur radioactif	73
3.2. Entrée du D-glucose en fonction de la concentration cellulaire	74
3.3. Cinétique d'entrée du glucose	74
3.4. Effet de la concentration du glucose sur l'entrée du glucose	76
3.5. Mise en évidence de différents systèmes de transport du glucose	79
<b>4. Expression de SGLT</b>	<b>87</b>
4.1. Séquence de SGLT	87
4.2. Mesure de l'expression de SGLT dans différents tissus et organe de l'huître	89
 <b>PRINCIPAUX RESULTATS</b>	 <b>91</b>
 <b>DISCUSSION</b>	 <b>92</b>
 <b>CHAPITRE II. VARIATIONS SAISONNIERES DE LA GAMETOGENESE ET DU METABOLISME DU GLUCOSE ET EFFET DU NIVEAU TROPHIQUE SUR LA GESTION DES RESERVES</b>	 <b>103</b>
 <b>INTRODUCTION</b>	 <b>105</b>
 <b>RESULTATS</b>	 <b>112</b>
<b>1. Suivi saisonnier du métabolisme énergétique et de la reproduction</b>	<b>112</b>
1.1. Suivi des paramètres environnementaux	112
1.2. Suivi biométrique des animaux	112
1.3. Suivi histologique de la gamétogenèse	113
1.4. Approche du métabolisme du glycogène	115
<b>2. Effet du niveau trophique sur le métabolisme énergétique et la reproduction</b>	<b>117</b>
2.1. Suivi des paramètres environnementaux	117
2.2. Suivi histologique de la gamétogenèse	117
2.3. Approche du métabolisme du glycogène	119



<b>PRINCIPAUX RESULTATS</b>	<b>121</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>122</b>
<b>CHAPITRE III. IMPLICATION DE LA COMPOSANTE GENETIQUE DANS LE METABOLISME GLUCIDIQUE ET LA REPRODUCTION</b>	<b>129</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>131</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>135</b>
<b>1. Suivi de la gamétogenèse chez les huîtres R et S</b>	<b>135</b>
1.1. Approche qualitative	135
a. Suivi sur estran	135
b. Réponse au conditionnement trophique	136
1.2. Approche quantitative	137
a. Suivi sur estran	137
b. Réponse au conditionnement trophique	138
<b>2. Approche du métabolisme du glycogène chez les huîtres R et S</b>	<b>139</b>
a. Suivi sur estran	139
b. Réponse au conditionnement trophique	141
<b>PRINCIPAUX RESULTATS</b>	<b>143</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>144</b>
<b>CHAPITRE IV. CRYOPRESERVATION, OUTIL POUR LA CONSERVATION A LONG TERME DE CELLULES VESICULEUSES</b>	<b>149</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>151</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>154</b>
<b>1. Phases d'abaissement de température</b>	<b>154</b>
<b>2. Toxicité et efficacité des agents cryoprotecteurs</b>	<b>154</b>
<b>3. Effet de la vitesse de descente en température</b>	<b>156</b>
<b>4. Effet de la température de transfert des échantillons dans l'azote liquide</b>	<b>158</b>
<b>5. Conditions finales de cryopréservation</b>	<b>158</b>
<b>6. Activité métabolique des cellules cryopréservées</b>	<b>159</b>
<b>7. Constitution d'une banque de cellules vésiculeuses</b>	<b>161</b>
<b>PRINCIPAUX RESULTATS</b>	<b>162</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>163</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>179</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>205</b>
<b>INDEX DES FIGURES</b>	<b>229</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX</b>	<b>232</b>







# **INTRODUCTION GENERALE**



## INTRODUCTION GENERALE

1

<b>I. CONTEXTE DE L'ETUDE ET PROBLEMATIQUE</b>	<b>3</b>
<b>II. REPRODUCTION ET METABOLISME ENERGETIQUE CHEZ <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> :</b>	<b>4</b>
BILAN DES CONNAISSANCES	
1. Systématique	4
2. Anatomie de l'huître creuse	5
3. Cycle biologique et reproduction	7
4. Métabolisme énergétique	11
<b>III. MECANISMES DE TRANSPORT DU GLUCOSE A TRAVERS LES MEMBRANES</b>	<b>16</b>
1. Modes de transport à travers les membranes cellulaires	16
1.1. Voie passive : diffusion	17
a. Mécanismes de diffusion simple	17
b. Diffusion facilitée par une protéine transmembranaire	18
1.2. Voie active : transport couplé à une dépense énergétique	18
a. Couplage du transport à l'hydrolyse d'ATP	19
b. Transport actif secondaire	20
c. Autres modes de transports actifs	21
2. Les différentes superfamilles de protéines impliquées dans le transport du glucose	21
2.1. Mécanismes de diffusion facilitée : la superfamille des MFS	21
a. La superfamille des MFS	21
b. Topologie des transporteurs de la superfamille des MFS	22
c. Mode de fonctionnement	23
d. Comparaison de séquence et phylogénie	23
e. Le transporteur facilité de glucose : GLuT	25
2.2. Mécanismes de transport actif primaire : la famille ABC	30
2.3. Mécanismes de transport actif secondaire : la famille des SSSF	32
a. La famille des SSSF	32
b. Topologie des transporteurs de la famille des SSSF	32
c. Mode de fonctionnement	33
d. Comparaison de séquence et phylogénie	33
e. Le cotransporteur Na <sup>+</sup> /glucose : SGLT	34
2.4. Mécanismes de transport couplé à une phosphorylation : la famille des PTS	38
3. Mécanismes de transport du glucose dans le règne animal	39
3.1. Transport du glucose chez les Vertébrés	39
a. Chez les Mammifères	39
b. Chez les Oiseaux	39
c. Chez les Téléostéens	40
d. Chez les Amphibiens	40
3.2. Transport du glucose chez les Invertébrés	41
a. Chez les Arthropodes	41
b. Chez les Plathelminthes et des Nématelminthes	41
c. Chez les Mollusques	41



## INTRODUCTION GENERALE

### I. CONTEXTE DE L'ETUDE ET PROBLEMATIQUE

Les Mollusques Bivalves sont actuellement une ressource économique mondiale très importante. Avec près de 4,5 millions de tonnes produites par an, les huîtres représentent plus du tiers de la production mondiale de Mollusques (CNC, 2005).

Originaire du Japon, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), a été introduite en France dans les années soixante dix afin de reconstituer le parc ostréicole français décimé par plusieurs épizooties consécutives (Grizel *et al.*, 1974 ; Comps & Duthoit, 1976). L'huître creuse est de loin l'espèce prédominante puisqu'elle représente plus de 98% de la production française d'huîtres (FAO, 2003). La France avec près de 130 000 tonnes par an se situe au premier rang européen et au quatrième rang mondial des producteurs d'huîtres. La région Basse-Normandie est, avec la Bretagne et le Poitou-Charentes, l'une des plus importantes régions ostréicoles françaises : près de 35 000 tonnes sont produites par an et plus de 335 entreprises sont concernées par cette activité.

Malgré une très bonne implantation de cette espèce introduite, des épisodes de mortalité surviennent certaines années en période estivale. Différentes études ont montré qu'un seul facteur ne permet pas d'expliquer ces mortalités estivales (défi MOREST, Samain & McCombie, 2007) impliquant certainement plusieurs paramètres concomitants. Ainsi, les facteurs environnementaux (trophiques, physico-chimiques, toxiques), l'aspect zootechnique (pratiques culturales), le patrimoine génétique, l'état physiologique et le rôle des agents infectieux constituent un ensemble qui détermine la survie des huîtres en élevage (Dégremont, 2003). Une hypothèse actuellement retenue dans le cadre de l'étude de ces mortalités repose sur un affaiblissement du métabolisme général de l'huître en été, alors que l'animal se trouve en période de forte croissance et de gamétogenèse active (période d'émission des gamètes) ou en phase de restructuration de la gonade. A cette période, les huîtres présentent une croissance très active et subissent d'importants stress thermiques (fortes variations de température sur les parcs). La dépense énergétique liée à ces événements est soutenue par l'alimentation mais également par la mobilisation de réserves préalablement stockées par l'animal. L'efficacité de la mise en réserve semble donc primordiale pour lui permettre de franchir cette période critique.

La production française repose aujourd'hui essentiellement sur cette espèce et cette situation de quasi-monoculture rend l'ostréiculture particulièrement vulnérable à tout nouveau risque d'épizootie et justifie la nécessité d'une connaissance approfondie de la physiologie de cet animal. Ces données sont également nécessaires pour maîtriser toutes les étapes du conditionnement des géniteurs et de la production de naissain en éclosier ou



sur estran et constitue une des thématiques prioritaires de l'UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins.

Au-delà de l'importance économique de *Crassostrea gigas*, sa position phylogénétique clé parmi les Lophotrochozoaires, les huîtres constituent un modèle d'étude pertinent des bases physiologiques et génétiques (i.e. croissance, reproduction et survie) fortement corrélées aux conditions environnementales. Dans ce contexte, l'UMR 100 PE2M vise à approfondir les connaissances concernant les différentes voies métaboliques chez cet animal. Dans ce cadre de recherche, ce travail s'insère dans l'une des thématiques du Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines qui concerne l'étude des mécanismes énergétiques de mise en réserve et de mobilisation du glycogène en relation avec la reproduction de l'huître creuse.

Après une description préalable du modèle biologique, cette introduction se poursuivra par une revue bibliographique des connaissances sur les mécanismes de transport de glucose à travers la membrane cellulaire répertoriés au sein du règne animal.

## II. REPRODUCTION ET METABOLISME ENERGETIQUE CHEZ *CRASSOSTREA*

### *GIGAS* : BILAN DES CONNAISSANCES

#### 1. Systématique :

Embranchement : **Mollusques**

Classe : **Bivalves – Lamellibranches**

Ordre : **Eulamellibranches**

Super – famille : **Ostréidés**

Famille : **Crassostréidés**

Genre : ***Crassostrea***

Espèce : ***gigas***

L'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), est un métazoaire triploblastique coelomate bilatérien appartenant au clade des protostomiens lophotrochozoaires (**Figure 1**). Le développement, les plans du corps et les gènes des animaux de ce groupe présentent des caractéristiques considérées comme ancestrales (Tessmar-Raible & Arendt, 2003). D'un point de vue évolutif, ces animaux occupent donc une place particulièrement importante.



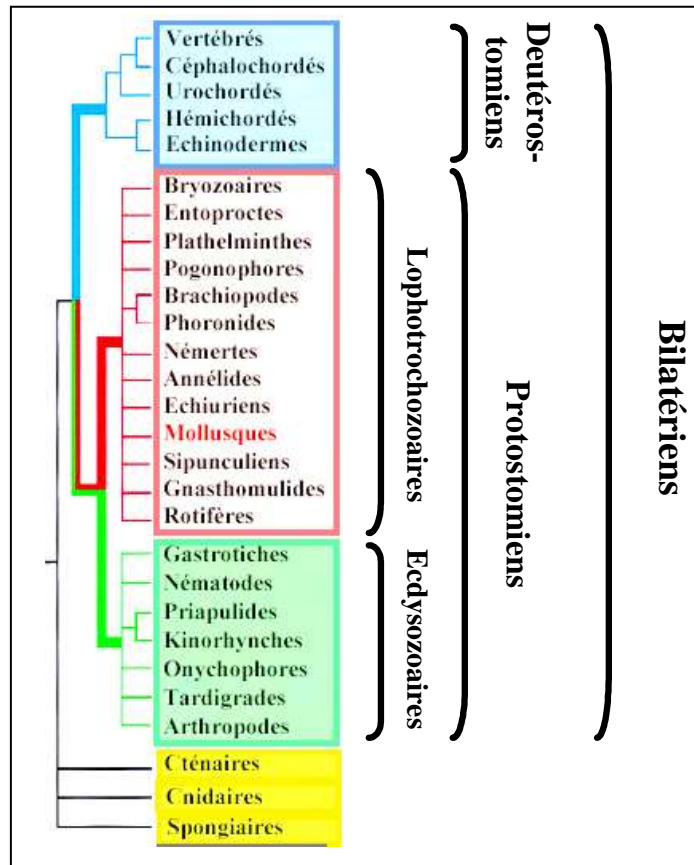


Figure 1. Phylogénie des métazoaires basée sur l'analyse de l'ARNr 18S (Adoutte et al., 2000).

## 2. Anatomie de l'huître creuse :

L'huître creuse est un animal à corps mou dont la coquille est constituée de deux valves asymétriques liées au niveau de la charnière et maintenues fermées par le muscle adducteur. Le manteau est constitué de deux lobes soudés au niveau de la charnière, formant le capuchon céphalique. Ce capuchon recouvre la bouche et les quatre palpes labiaux (**Figure 2**) qui interviennent dans le tri et dans l'apport des particules alimentaires vers la cavité buccale. La gonade recouvre la glande digestive et se développe saisonnièrement.



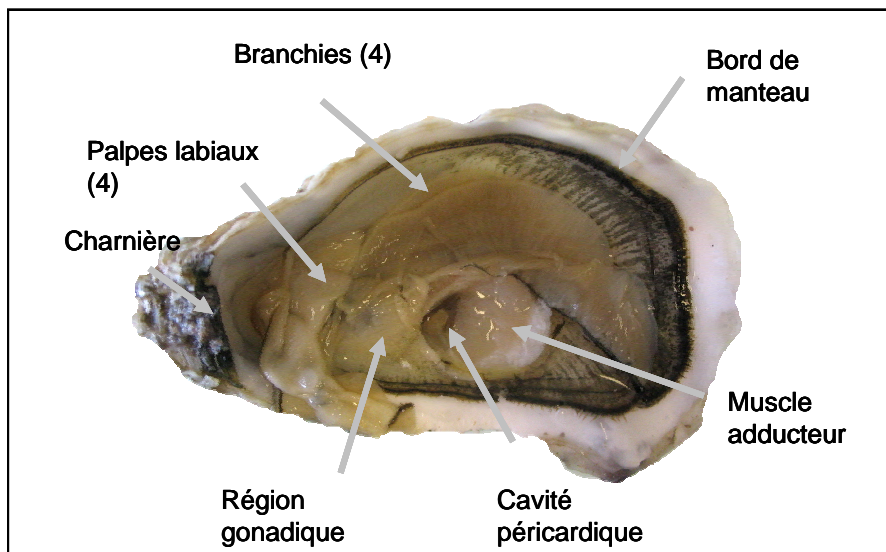


Figure 2. Anatomie de l'huître creuse (valve gauche creuse).

L'huître possède deux paires de branchies soudées à leur base, s'étendant de l'anus aux palpes labiaux, impliquées dans la respiration mais également dans la nutrition. Des filaments ciliés recouvrant les branchies permettent de créer un mouvement continu de l'eau favorisant ainsi l'arrivée de l'oxygène et l'acheminement de particules alimentaires vers les palpes labiaux.

Le système digestif est formé de la bouche, de l'estomac, de l'intestin, de la glande digestive, du rectum et de l'anus. L'estomac contient un stylet cristallin qui, à l'aide d'enzymes digestives, permet le broyage et la lyse des particules alimentaires. La glande digestive est formée de nombreux diverticules digestifs qui entourent l'estomac et les replis de l'intestin. L'intestin se termine par le rectum accolé au muscle adducteur.

L'appareil circulatoire est lacunaire. L'hémolymph joue un rôle dans le transport des nutriments, de l'oxygène et des déchets métaboliques. Le cœur est logé dans une enveloppe péricardique. Il est constitué par un ventricule où aboutissent quatre veines branchiales dont les extrémités renflées forment les oreillettes.

Le système nerveux est réduit et n'est constitué que de quelques ganglions nerveux reliés par des connectifs.



### 3. Cycle biologique et reproduction :

Le cycle de développement de *Crassostrea gigas* présente différentes étapes qui sont illustrées dans la **Figure 3** :

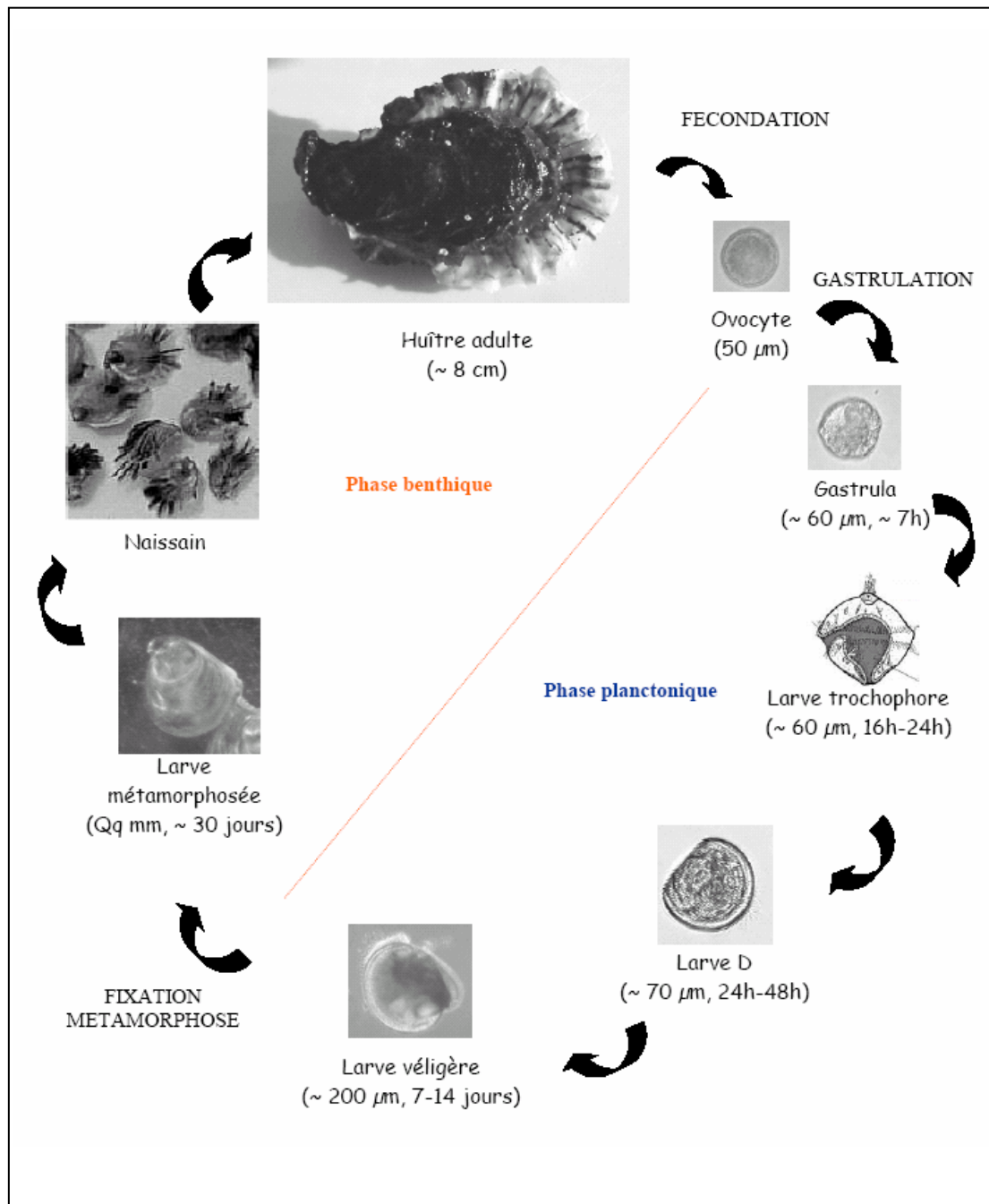


Figure 3. Cycle de développement de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.  
(D'après Fabioux, 2004).



Chez *Crassostrea gigas*, la fécondation est externe. Suite à la segmentation de l'œuf et après 6 heures de développement embryonnaire, l'embryon devient une larve pélagique trochophore. Après 24 heures, après l'apparition de la bouche, du prototroche (organe locomoteur), de l'ébauche coquillière et de l'anus, la larve atteint ainsi un stade appelé larve D. Après la transformation du prototroche en vélum et la croissance de la coquille, la larve se transforme en larve véligère (formation de deux valves). Son système nerveux s'organise, des organes larvaires apparaissent (manteau, cœur, ébauches branchiales, tractus digestif) pour donner le stade larvaire pédivéligère. La fixation est suivie d'une étape de métamorphose au cours de laquelle les organes se réorganisent et l'animal prend alors le nom de naissain.

L'huître creuse est un animal hermaphrodite à tendance protandre de type alternatif irrégulier. Elle acquiert sa maturité sexuelle dès la première année, puis réinitie une nouvelle gamétogenèse chaque année. La gonade est située sous le manteau et autour de la glande digestive, dans une région contenant à la fois des tubules gonadiques et du tissu conjonctif à fonction de stockage vésiculeux (tissu mixte) (**Figure 4**). La gamétogenèse se déroule de manière centripète au sein de tubules gonadiques dont le diamètre augmente au cours de la maturation sexuelle.

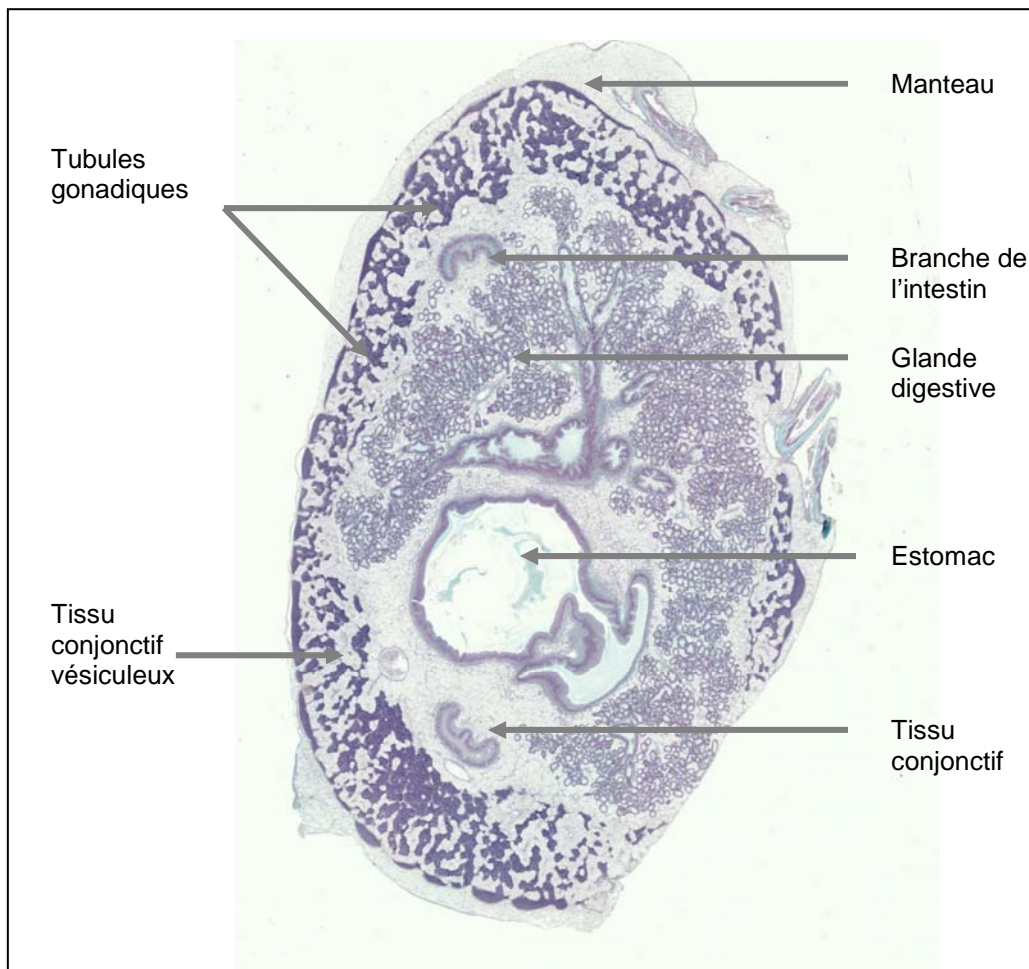


Figure 4. Coupe transversale de la masse viscérale d'huître creuse *Crassostrea gigas*. X7. Coloration au trichrome de Prenant Gabe (Hématoxyline, éosine, vert lumière, Annexe I).



Le cycle de reproduction de l'huître a été décrit (Heude-Berthelin *et al.*, 2001) et se divise en 4 stades suivant le rythme des saisons (**Figure 5**) :

- **Stade 0** : Ce stade correspondant au repos sexuel survient sur les côtes de la Manche en automne et au début de l'hiver. Les tubules gonadiques sont réduits et ne présentent qu'une seule assise cellulaire formée de cellules germinales quiescentes. Durant cette période, le sexe n'est pas identifiable.
- **Stade I** : Il débute en hiver et se prolonge jusqu'au printemps selon les animaux. Le stade I se caractérise par la prolifération des cellules souches qui se différencient en gonies (spermatogonies ou ovogonies). Ces gonies à leur tour entrent dans une phase de multiplication intense. Les tubules gonadiques commencent à se développer. En fin de stade I, les huîtres peuvent être sexées.
- **Stade II** : Au printemps, les tubules gonadiques se développent massivement et les cellules germinales poursuivent leur maturation. Les ovocytes entament leur vitellogenèse. Les spermatocytes puis les spermatozoïdes apparaissent dans les tubules mâles. Le volume de la gonade augmente très nettement.
- **Stade III** : Le stade IIIA correspond à la période de maturité sexuelle et s'observe au début de l'été. La gonade atteint sa taille maximale, les tubules gonadiques sont chargés en cellules germinales matures (spermatozoïdes ou ovocytes vitellogéniques). Le stade IIIB a lieu en période estivale. Les gamètes matures sont observables dans les tubules gonadiques.

(Le stade IIIC correspond, chez certaines espèces, à la réinitiation d'une nouvelle gamétogenèse). Enfin, le stade IIID correspond à un état particulier de la gonade observé chez certains animaux dans les cas de pontes partielles. En plus des nouvelles cellules germinales quiescentes, les tubules gonadiques contiennent alors des gamètes résiduels qui seront progressivement lysés par des hémocytes qui envahissent la gonade.

En période estivale, l'émission des produits génitaux dépend des conditions thermiques et trophiques (Mann, 1979 ; Lubet, 1980 ; Deslous-Paoli *et al.*, 1982 ; Héral *et al.*, 1986 ; Maurer & Borel, 1986). Elle peut être totale dans les zones où les eaux sont plus chaudes (région méditerranéenne ou Charente-maritime), alors qu'elle n'est que partielle ou absente lorsque les eaux sont plus froides (Normandie, par exemple). Ces émissions partielles se traduisent par la présence de gamètes résiduels dans les tubules gonadiques qui sont progressivement lysés au cours de l'automne et de l'hiver suivant (**Figure 6**) mais persistent encore parfois concomitamment à la réinitiation d'une nouvelle gamétogenèse.



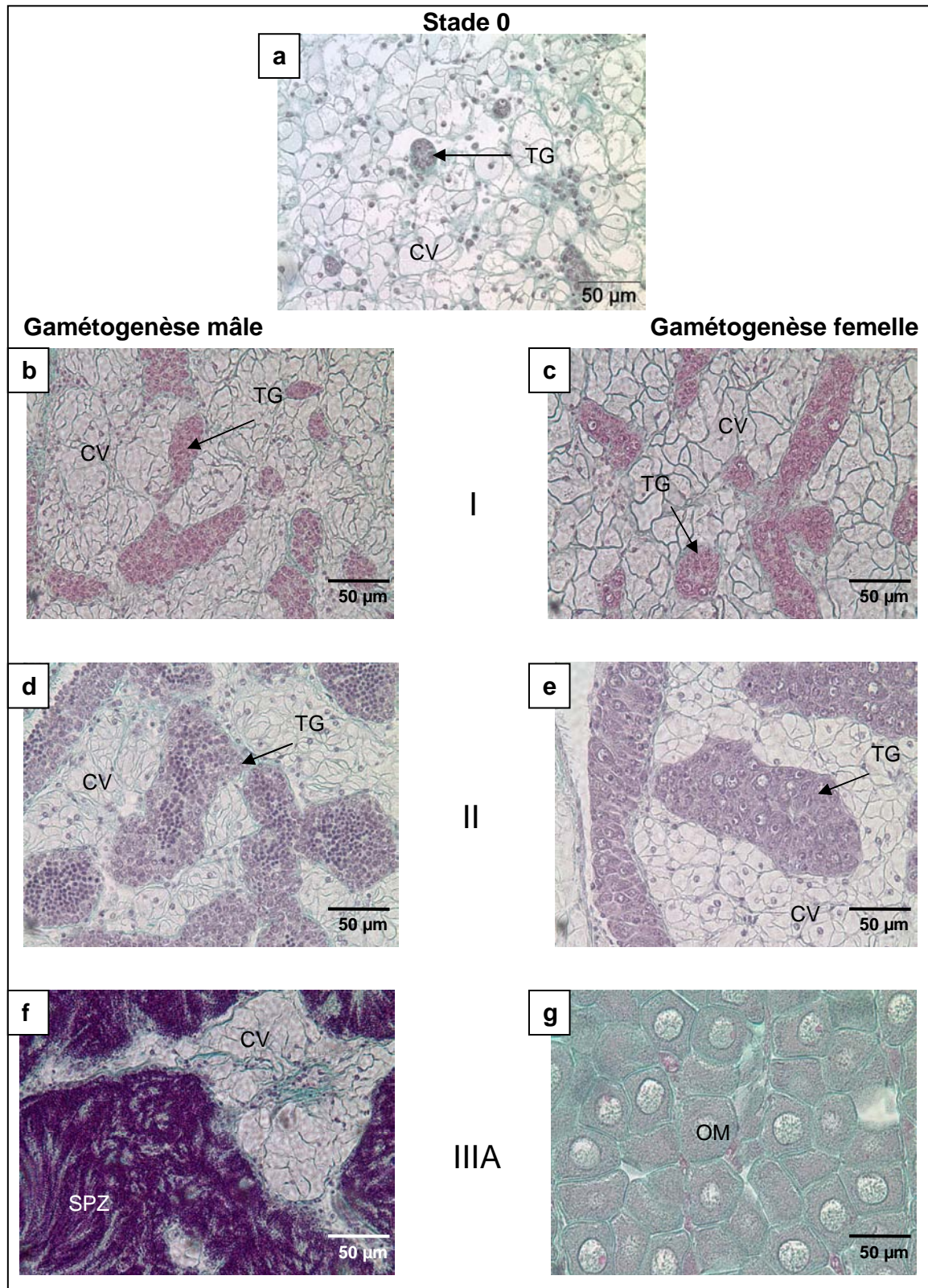


Figure 5. Gamétogenèse mâle et femelle chez *Crassostrea gigas*. X400. (a) : Stade 0, repos sexuel. (b) et (c) : Stade I, multiplication des gonies. (d) et (e) : Stade II, développement des tubules gonadiques. f et g : Stade III, maturation sexuelle. (CE : canal évacuateur de gamète, CV : cellule vésiculeuse, GI : gonie indifférenciée, LH : lacune hémocytaire, OM : ovocyte mature, SPR : spermatozoïde résiduel, SPZ : spermatozoïde, TG : tubule gonadique).



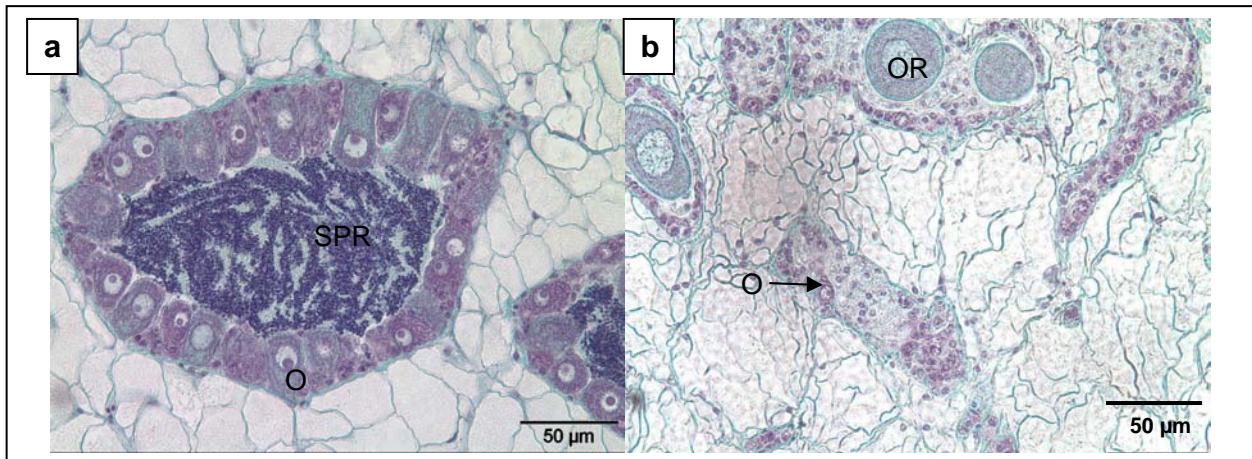


Figure 6. Tubules gonadiques contenant des gamètes résiduels chez *Crassostrea gigas*. X400. (a) gamètes résiduels mâles chez une femelle et (b) gamètes résiduels femelles chez une femelle. (O : ovogonie, OR : ovocyte résiduel et SPR : spermatozoïde résiduel).

Enfin, des cas d'hermaphroditismes simultanés peuvent être observés (Figure 7).

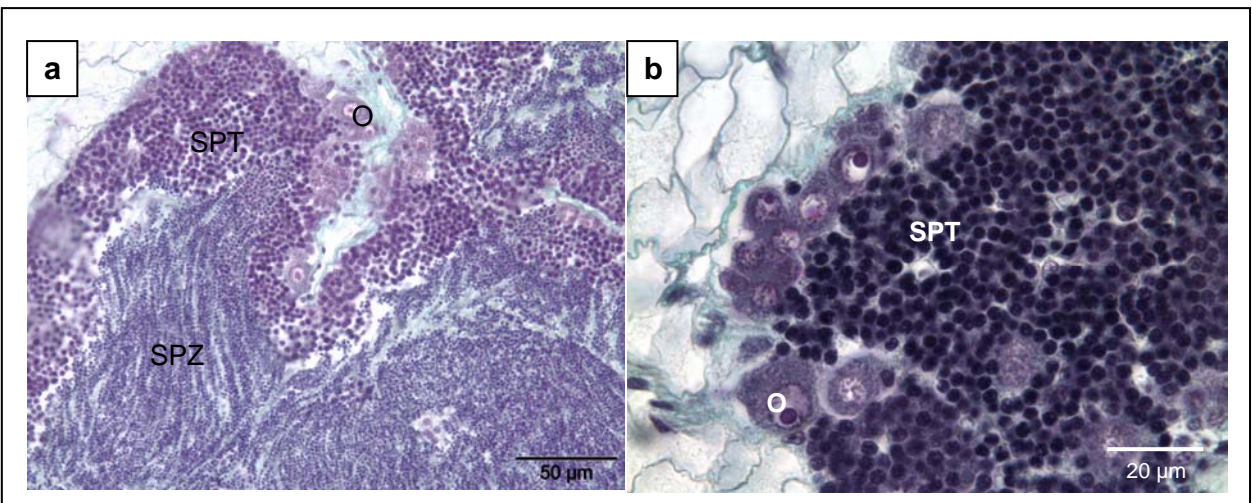


Figure 7. Cas d'hermaphrodisme chez *Crassostrea gigas*. (a) X400 et (b) X1000. (O : ovogonie, SPT : spermatide et SPZ : spermatozoïde).

#### 4. Métabolisme énergétique :

Chez *Crassostrea gigas*, l'alimentation s'effectue par filtration du phytoplancton au niveau branchial, les nutriments sont stockés dans la glande digestive puis redistribués dans l'organisme pour fournir de l'énergie ou pour constituer des réserves. Ces réserves sont essentiellement stockées sous forme de glycogène dans des cellules vésiculeuses.

Il existe une grande diversité de types cellulaires de réserve chez les mollusques (Tableau 1).



Tableau 1. Types cellulaires de réserve chez les mollusques répertoriés dans la littérature.

<b>Pectinidés</b>	<b>Cellules musculaires</b> Réserves sous forme protéique et plus faiblement en glycogène <b>Stockage secondaire dans la glande digestive</b> Réserves sous forme lipidique	Barber & Blake, 1981 Epp <i>et al</i> , 1988 Barber & Blake, 1981
<b>Vénéridés</b>	<b>cellules musculaires extragonadiques</b> atrophiées et dégénérées lors du développement des lignées germinales <b>cellules vésiculeuses intragonadiques</b> mettant en réserve du glycogène, mobilisé au début de la gamétogenèse	Medhioub & Lubet, 1988  Medhioub & Lubet, 1988
<b>Mytilidés</b>	Tissu de réserve formé de cellules spécialisées : Chez <i>Mytilus edulis</i> : 2 types de cellules : <b>cellules adipogranuleuses (ADG cells)</b> et <b>cellules vésiculeuses (VCT cells ou cellules à glycogène)</b> cellules adipogranuleuses (ADG cells) situées dans le manteau contenant des réserves en lipides, protéines et petites quantités de glycogène Forte activité de synthèse protéique (Réticulum endoplasmique rugueux abondant), nombreux ribosomes circulants et appareils de golgi abondants Cellules vésiculeuses (VCT) dans le manteau et dans les palpes labiaux. Grandes vésicules endoplasmiques contenant presque exclusivement du glycogène	Lubet, 1959  Houteville, 1974 Pipe, 1987 Lenoir, 1989 Livingston & Clarke, 1983  Lubet, 1959 Lenoir, 1989
<b>Ostréidés</b>	Chez <i>Crassostrea angulata</i> et <i>Crassostrea virginicata</i> , <b>un seul type de cellules de réserve</b> type intermédiaire entre VCT et ADG	Galstoff, 1964 Bargeton, 1942 Eckelbarger & Davies, 1996

Chez les Pectinidés, il n'existe pas de cellules spécialisées dans le stockage des réserves, c'est le muscle adducteur qui assure le rôle de tissu de réserve.

Chez les Vénéridés, les cellules musculaires et des cellules spécifiques de réserve interviennent dans le stockage des nutriments.

Chez la moule bleue, *Mytilus edulis*, deux catégories de cellules de réserves ont été caractérisées dans le manteau : les cellules adipogranuleuses (C.A.D.G.) et les cellules vésiculeuses (C.V.) ou cellules à glycogène (Lenoir, 1989 ; Mathieu & Lubet, 1993). Les cellules adipogranuleuses contiennent des granules protéiques, des gouttelettes lipidiques et du glycogène stocké de manière diffuse dans le cytoplasme. Les cellules vésiculeuses sont constituées d'une grande vésicule occupant la totalité de la cellule et contenant uniquement du glycogène. Le glycogène stocké dans ces cellules sert de support énergétique à la gamétogenèse (Zandee *et al.*, 1980 ; Bayne *et al.*, 1982). Le contenu des cellules de réserves varie au cours de l'année. Les nutriments stockés sont libérés lors de la gamétogenèse, cette mobilisation des réserves est suivie d'une phase de mise en réserve active durant la période de repos sexuel (Pipe, 1987).



Chez *Crassostrea gigas*, Heude-Berthelin (2000) a caractérisé le tissu spécialisé dans le stockage des réserves. Celui-ci est localisé principalement au niveau de la région gonadique et des palpes labiaux, et plus secondairement autour de la glande digestive et à la base des branchies. Ce tissu de réserve est constitué de cellules somatiques spécialisées : les cellules vésiculeuses (**Figure 8**). Elles sont de formes polygonales, leur cytoplasme est chargé en vésicules de réserve, et elles possèdent un noyau de petite taille et excentré. Les cellules sont imbriquées les unes dans les autres dans le tissu conjonctif. Le diamètre cellulaire moyen des cellules dissociées est de 16  $\mu\text{m}$  et la densité est comprise entre 1,037 et 1,048 g/cm<sup>3</sup>. La coloration Schiff a permis de mettre en évidence une forte teneur en polysaccharides de nature glycogénique dans le cytoplasme. Une étude ultrastructurale montre que ce glycogène est dispersé sous forme de fines particules dans le cytoplasme ou bien séquestré dans des vésicules (**Figure 9**). Ces cellules contiennent également des vésicules lipidiques et des granules protéiques, elles présentent donc des caractéristiques intermédiaires des deux types cellulaires connus chez la moule *Mytilus edulis* (Galtsoff, 1964 ; Mathieu & Lubet, 1993 ; Berthelin *et al.*, 2000a).

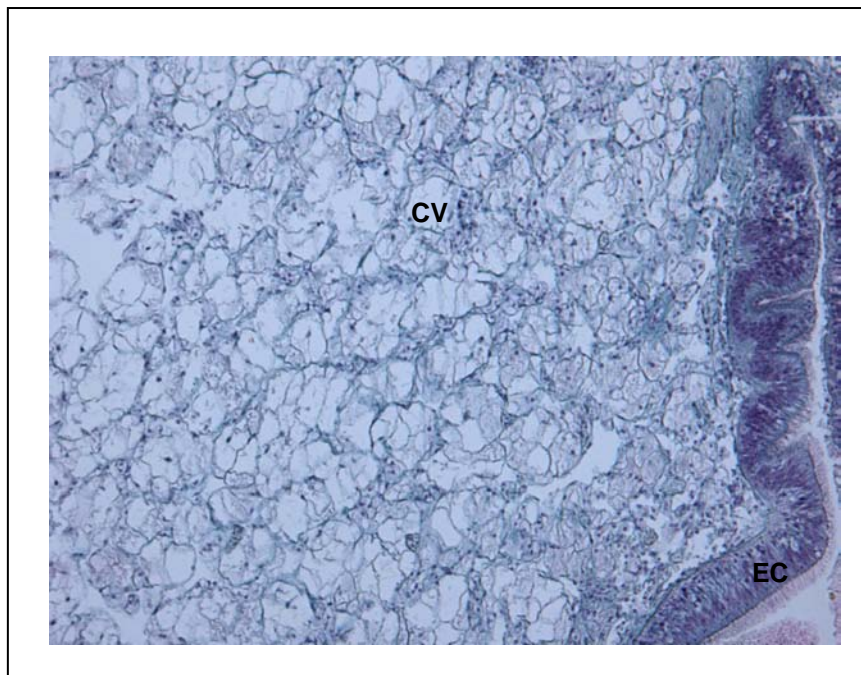


Figure 8. Tissu de réserve des palpes labiaux constitué presque exclusivement de cellules vésiculeuses chez *Crassostrea gigas*. X100. (CV : cellules vésiculeuses, EC : épithélium cilié).



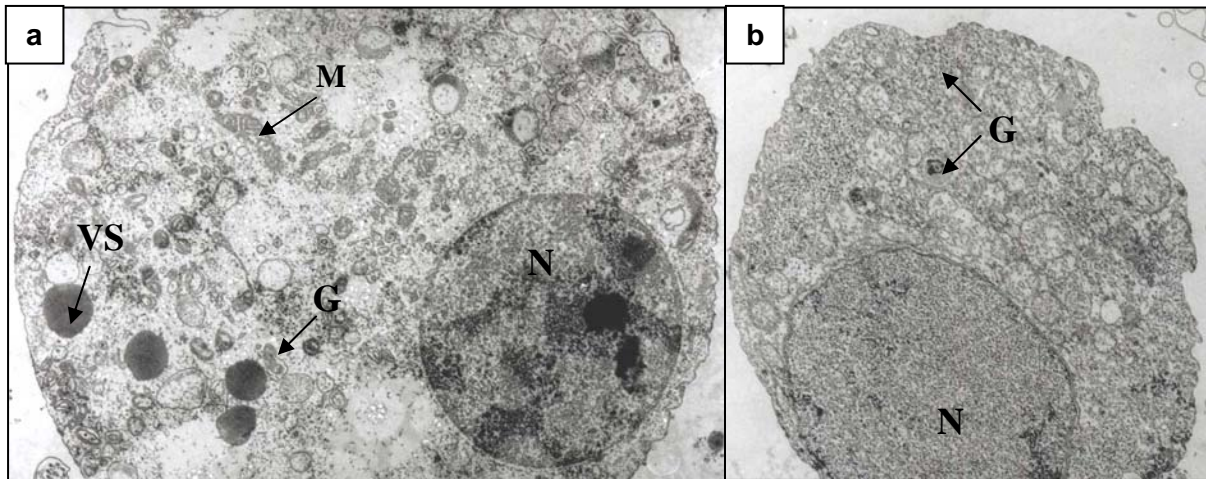


Figure 9. Ultrastructure des cellules vésiculeuses isolées chez *Crassostrea gigas* (a et b). x8600. VS : vésicule sombre, G : glycogène, N : noyau, M : mitochondrie. D'après Berthelin et al., 2000a.

Chez l'huître creuse, comme chez la plupart des bivalves, le glycogène contenu dans le tissu de réserve joue un rôle central comme support énergétique du métabolisme général et de la gamétogenèse (Bayne *et al.*, 1982 ; Gabbott & Whittle, 1986 ; Ruiz *et al.*, 1992 ; Mathieu & Lubet, 1993). Le développement du tissu vésiculeux dans l'aire gonadique est inversement corrélé à l'évolution de la gamétogenèse (Berthelin *et al.*, 2000a).

L'observation histologique du tissu de réserve au cours de la gamétogenèse a permis de différencier quatre stades de développement du tissu de réserve (Berthelin *et al.*, 2000b) (**Figure 10**) :

- **Stade A** : Ce stade est associé à la période de repos sexuel et/ou de résorption des gamètes résiduels en automne. Le tissu conjonctif vésiculeux de la région gonade-manteau est alors envahi de nombreux hémocytes et de macrophages. Il se restructure progressivement de manière centrifuge contrairement au développement des tubules gonadiques, c'est-à-dire à partir de la glande digestive vers les canaux évacuateurs de gamètes.
- **Stade B** : À la fin de l'hiver, le tissu vésiculeux présente un développement maximal et les cellules de réserve qui le forment lui confèrent une structure en pavement uniforme très caractéristique.
- **Stade C** : Lors du développement des tubules gonadiques au printemps, le tissu conjonctif vésiculeux régresse, il est progressivement réduit à quelques travées autour des tubules gonadiques et des lacunes hémocytaires.
- **Stade D** : En période de maturité sexuelle, le tissu de réserve est fortement résorbé. Il n'est plus observable qu'autour des lacunes hémocytaires.



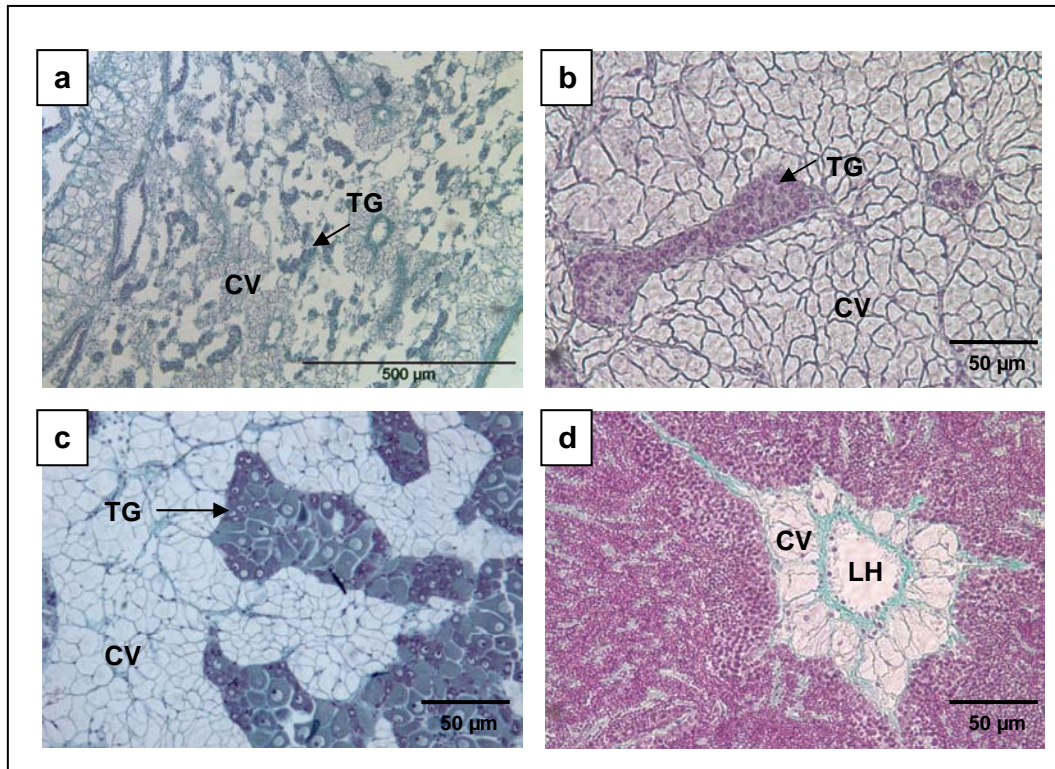


Figure 10. Evolution qualitative du tissu de réserve dans la région gonadique au cours du cycle sexuel chez *Crassostrea gigas*. (a) X100 : stade A, restructuration du tissu de réserve. (b) X400 : stade B, développement maximal du tissu de réserve. (c) X400 : stade C, tissu de réserve présentant plus ou moins de lacunes. (d) X400 : stade D, tissu de réserve réduit autour des lacunes hémoctaires. (LH : lacune hémoctaire, CV : cellule vésiculeuse, TG : Tubule gonadique).

Le métabolisme des cellules vésiculeuses varie au cours du cycle annuel de reproduction (Berthelin *et al.*, 2000a). Au printemps, les réserves en glycogène sont mobilisées, le tissu de réserve régresse en faveur du développement des tubules gonadiques. Puis en période estivale, la quantité de glycogène est faible, alors que les huîtres atteignent leur maturité sexuelle. Enfin, en automne et jusqu'à la fin de l'hiver, le métabolisme des cellules vésiculeuses est orienté vers le stockage tandis que l'huître démarre une nouvelle gamétogenèse. La constitution des réserves a donc lieu à la période où la quantité en phytoplancton dans le milieu naturel est la plus faible.

La mise en réserve ne dépend pas uniquement du taux de glucose circulant lié aux conditions trophiques mais fait très certainement intervenir une régulation endocrine. Cette régulation peut s'exercer sur les différentes étapes de la mise en réserve comme l'entrée du glucose dans les cellules ou l'activité des enzymes de la glycogénogenèse / glycogénolyse.

Dans ce contexte, deux études ont été menées en parallèle au sein des équipes de l'Unité mixte de recherche Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins. La première, réalisée par Hélène Bacca (L.P.I. de Plouzané, UMR PE2M), a eu pour objectif de



caractériser et de mesurer l'activité et l'expression des enzymes intervenant dans le métabolisme du glycogène chez *Crassostrea gigas* (Bacca *et al.*, 2005 ; Bacca, 2007). La seconde, présentée dans ce manuscrit, a été effectuée au sein de l'UMR 100 IFREMER-UCBN et porte sur l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses.

**L'objectif de ces travaux de thèse est :**

- 1) de comprendre plus précisément les mécanismes cellulaires et moléculaires du transport du glucose, étape limitante de la mise en réserve, dans les cellules vésiculeuses,**
- 2) d'apporter des éléments de réponse sur l'impact des facteurs environnementaux sur le métabolisme énergétique et sur la reproduction de l'huître *Crassostrea gigas* et**
- 3) de déterminer l'importance de la composante génétique sur la stratégie de reproduction et de la gestion des réserves énergétiques.**

L'entrée du glucose dans la cellule constitue la première étape limitante du processus de mise en réserve. Dans un premier temps, il importe d'en connaître les mécanismes pour comprendre le métabolisme énergétique de la cellule vésiculeuse et pour étudier la régulation du cycle de mise en réserve et de mobilisation du glycogène.

### **III. MECANISMES DE TRANSPORT DU GLUCOSE A TRAVERS LES MEMBRANES CELLULAIRES**

Tous les organismes utilisent des systèmes de transport facilitant le passage des nutriments et d'autres solutés à travers les membranes cellulaires. La présence de la membrane plasmique limite fortement leur passage par simple diffusion. Au cours de l'évolution, différents systèmes de transport ont été mis en place pour favoriser l'approvisionnement des cellules en nutriments.

#### **1. Modes de transport à travers les membranes cellulaires**

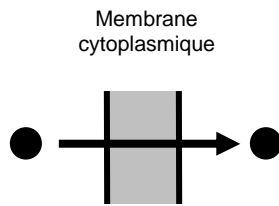
En se basant sur l'architecture des molécules et l'énergie nécessaire, cinq types de systèmes de transport ont été décrits (Rabus *et al.*, 1999). Ils assurent le transport des solutés selon deux voies : le transport par voie passive et le transport par voie active.



## 1.1. Voie passive : diffusion

### a. Mécanismes de diffusion simple

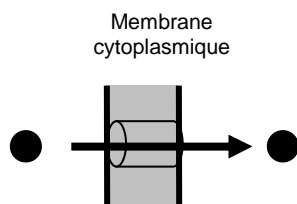
#### ✧ Diffusion simple à travers la membrane :



Ce mécanisme de diffusion concerne l'eau et les solutés polaires de petite taille, susceptibles de se dissoudre dans la bicouche lipidique pour la traverser. Plus la polarité est élevée plus la vitesse de passage sera rapide (Karp, 1998). A polarité équivalente, deux solutés posséderont des vitesses de pénétration variables en fonction de leur taille. Les molécules très petites (comme le  $\text{CO}_2$ , l' $\text{O}_2$  et  $\text{NO}$ ) diffusent rapidement tandis que les hexoses et les acides aminés traversent peu les membranes.

Cette diffusion s'effectue selon le gradient de concentration, les molécules diffusent toujours du compartiment le plus concentré vers le compartiment le moins concentré.

#### ✧ Diffusion simple par des canaux aqueux :



Les canaux sont formés de protéines membranaires intrinsèques entourant un pore aqueux permettant un passage sélectif de substances chargées vis-à-vis desquelles la membrane est imperméable ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ). Ces canaux sont bidirectionnels et les déplacements se font dans le sens du gradient électrochimique. La plupart de ces canaux peuvent adopter une conformation ouverte ou fermée. On distingue :

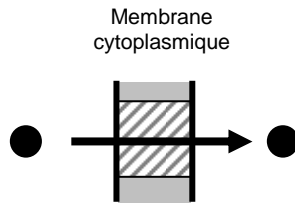
- Des canaux voltages-dépendants, dont la conformation dépend de la différence de la charge ionique entre les deux côtés de la membrane.
- Des canaux chimio-dépendants, dont la conformation dépend de l'association de la protéine canal à une molécule particulière.

Lorsque ces protéines se trouvent en conformation ouverte, elles peuvent s'unir simultanément à des solutés des deux côtés de la membrane.

La comparaison des séquences d'acides aminés des protéines composant ces canaux chez des organismes aussi divers que des bactéries, des plantes et des animaux vertébrés a permis de montrer que l'ensemble des canaux appartiennent à un petit nombre de superfamilles.



### b. Diffusion facilitée par une protéine transmembranaire



La diffusion facilitée est un processus de simple translocation de solutés à travers la membrane plasmique au moyen d'une protéine membranaire. Le fonctionnement du transporteur repose sur les changements de conformation et d'affinité de celui-ci pour le soluté. Ce mode de transport fonctionne sans être associé à une dépense énergétique, est saturable avec la concentration en substrat (Baldwin & Lienhard, 1981). Cette diffusion peut se faire dans les deux directions mais toujours selon le gradient de concentration (Karp, 1998). Les protéines impliquées dans la diffusion facilitée se distinguent des protéines canaux par le fait que la liaison au soluté ne peut avoir lieu que d'un côté à la fois (Rabus *et al.*, 1999). Ces protéines sont spécifiques des molécules qu'ils transportent et présentent une cinétique de saturation (**Figure 11**), contrairement à la diffusion simple.

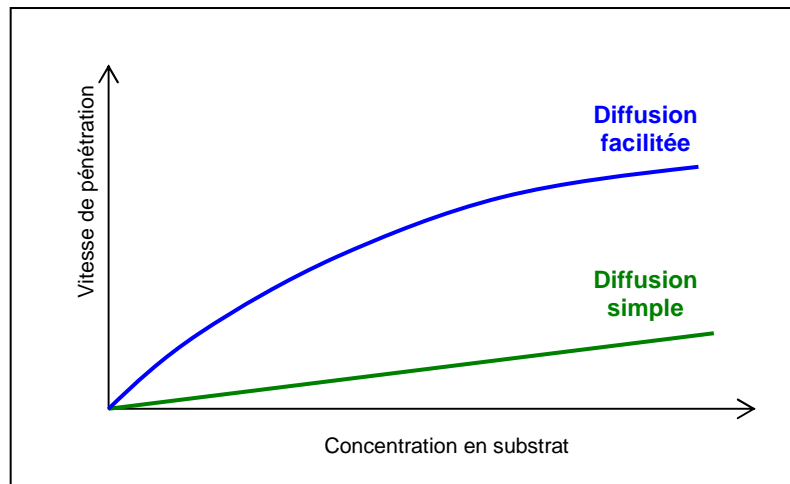


Figure 11. Comparaison des cinétiques d'entrée de la diffusion facilitée et de la diffusion simple.

### 1.2. Voie active : transport couplé à une dépense énergétique

Le déséquilibre des concentrations en ions de part et d'autre des membranes plasmiques ne peut être généré par les seuls mécanismes de diffusion simple ou facilitée : ils sont la conséquence d'un troisième mode de transport, le transport actif. Ce type de transport maintient les gradients de concentration nécessaires pour le fonctionnement cellulaire en permettant le déplacement des solutés contre leur gradient de concentration.

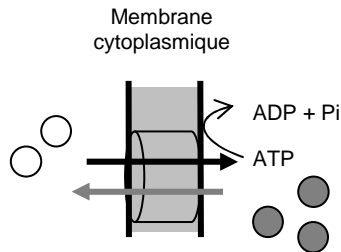
Le transport actif fait intervenir des protéines membranaires capables de se coupler sélectivement à un substrat donné et de le déplacer au travers de la membrane grâce à des changements de conformation. Ce déplacement endergonique (contre le gradient de concentration) est couplé à un mécanisme exergonique : libération d'énergie par hydrolyse d'ATP au niveau du transporteur lui-même ou d'un couplage à un gradient ionique. Si



l'hydrolyse a lieu au niveau du transporteur lui-même, il s'agit du transport actif primaire. Si elle est couplée à un gradient ionique, il s'agit d'un transport actif secondaire. Elle permet alors la translocation simultanée et consécutive d'un ion et du soluté.

#### a. Couplage du transport à l'hydrolyse de l'ATP

##### ✗ Les pompes de type P :



Le système producteur d'énergie est le plus souvent une pompe de type P  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ou pompe sodium-potassium qui associe la translocation des solutés à l'hydrolyse de l'ATP.

Pendant un cycle de transport d'une pompe de type P, l'hydrolyse de l'ATP aboutit à la phosphorylation de la protéine qui subit alors un changement de conformation. Le processus de transport repose sur ce changement de conformation du transporteur qui entraîne des changements d'affinité de celle-ci pour les ions qu'elle transporte (Karp, 1998). La liaison sur le transporteur de trois ions sodium provoque la phosphorylation de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase qui passe de la conformation  $E_1$  (forte affinité pour les ions sodium, faible affinité pour les ions potassium) à la conformation  $E_2$  (faible affinité pour les ions sodium, forte affinité pour les ions potassium) (**Figure 12**). Le site de fixation s'ouvre alors vers le milieu extérieur et les trois ions sodium sont libérés. La protéine lie ensuite deux ions potassium. Elle est alors déphosphorylée et reprend sa conformation  $E_1$ . Le site de liaison s'ouvre sur la face interne de la membrane et les ions potassium sont libérés.

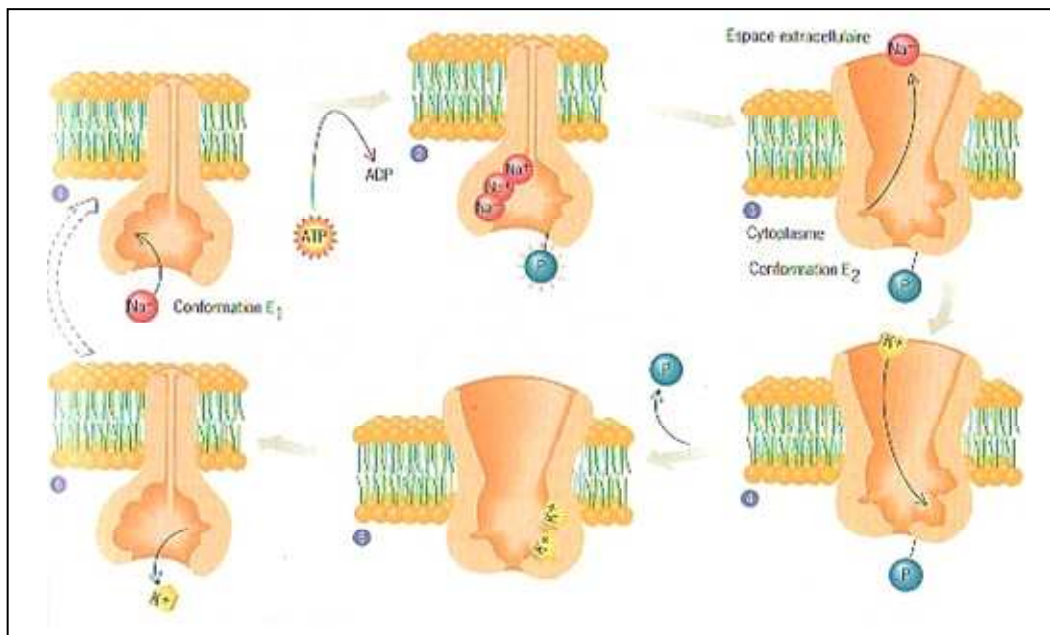


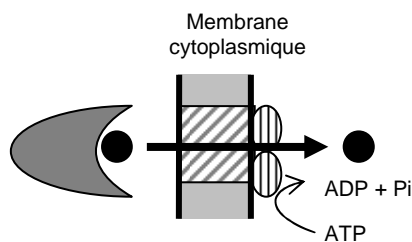
Figure 12. Cycle de transport de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase basé sur des changements de conformation du transporteur et des changements d'affinité vis-à-vis des ions sodium.  
D'après Karp, 1998.



D'autres systèmes de transport ionique fonctionnent sur le même principe dont la pompe à calcium, la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, et les pompes à protons chez les végétaux.

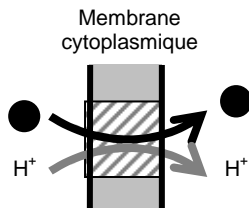
✂ Autres systèmes de transport ionique :

Un autre type de pompe décrit est appelé pompe de type V. Ce type de pompes ne fonctionne pas par un jeu de phosphorylation / déphosphorylation mais transporte les protons à travers les membranes par l'intermédiaires d'organites et de vacuoles.



Des transporteurs-cassettes de liaison de l'ATP (ABC) interviennent également dans le transport actif d'ions et de sucres. Ces transporteurs, après fixation du substrat sur une protéine de liaison, couplent la translocation de ce dernier à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP.

**b. Transport actif secondaire**



Le transport actif secondaire permet d'utiliser un gradient ionique, source d'énergie, pour transporter un soluté contre son gradient de concentration. Un tel mécanisme permet le cotransport de deux solutés en associant deux transporteurs distincts :

- Une pompe de type ATPase qui permet le maintien d'un gradient ionique ;
- Un cotransporteur qui permet la translocation d'un soluté contre son gradient de concentration en même temps que celle de l'ion selon le sien.

Il existe deux cas de cotransport. Dans le premier cas, les solutés sont cotransportés dans la même direction, il s'agit d'un symport ou dans le second cas, les solutés sont cotransportés dans des sens opposés, il s'agit alors d'un antiport.



### c. Autres modes de transports actifs

Ils ont tous été décrits chez les bactéries.

#### ✧ Transport par couplage translocation/phosphorylation :

Ce type de transport concerne le passage de sucres et repose sur le couplage de la translocation du sucre avec la phosphorylation de celui-ci par un système phosphoénolpyruvate/sucre phosphotransférase (Postma, 1992).

#### ✧ Transport par les transporteurs tripartite ATP-indépendants :

Ce mode de transport a été découvert en étudiant le transport du glutamate par *Rhodobacter sphaeroides* (Jacobs *et al.*, 1996). Dans ces travaux, les auteurs ont mis en évidence l'existence d'un système de transport actif secondaire nécessitant la présence d'une protéine de liaison du substrat, d'ions sodium et d'un gradient de protons. Depuis, d'autres transporteurs du même type ont été mis en évidence, pour la plupart chez les bactéries Gram-négatives (Rabus *et al.*, 1999).

## 2. Les différentes superfamilles de protéines impliquées dans le transport du glucose

Les différentes protéines constituant les systèmes de transport membranaire du glucose sont regroupées au sein de quatre grandes familles : la superfamille des MFS ou Major Facilitator Superfamily, la famille des SSSF ou Sodium Substrate Symport Family, la famille des protéines ABC ou ATP-Binding Cassette Proteins et enfin la famille des PTS ou Phosphoenol Transferase System qui n'a été identifiée que chez les bactéries.

Chacune de ces familles présente des caractéristiques particulières aussi bien en ce qui concerne la topologie, la structure et les modes de fonctionnement qu'en ce qui concerne les techniques permettant leur identification et leur caractérisation.

### 2.1. Mécanismes de diffusion facilitée : la superfamille des MFS (ou Major Facilitator Family)

#### a. La superfamille des MFS

Elle contient un grand nombre de transporteurs membranaires présentant une répartition ubiquiste chez les bactéries, les archéobactéries et les Eucaryotes.



Les membres de cette famille permettent entre autre le transport de sucres (Maiden *et al.*, 1987). Ces protéines se regroupent dans 17 familles distinctes (Pao *et al.*, 1998) et parmi elles, deux sont des transporteurs d'hexoses :

- La famille SP (Sugar Porter) regroupant des systèmes de diffusion facilitée et ainsi que des symports  $H^+$ /hexose ;
- La famille FGHS (Fucose/galactose/glucose/ $H^+$  symporter), caractéristique des Procaryotes, comportant des perméases galactose/glucose, glucose/mannose et le symporteur saccharide/proton. Le premier FGHS caractérisé est FucP chez *E.coli* (Pao *et al.*, 1998).

### b. Topologie des cotransporteurs de la famille MFS

Les molécules appartenant à la superfamille des MFS sont constituées de deux groupes de six hélices  $\alpha$  transmembranaires reliés par une longue boucle située entre les hélices 6 et 7. Cette boucle est localisée, comme les extrémités N- et C-terminales de la protéine, du côté cytoplasmique (**Figure 13**).

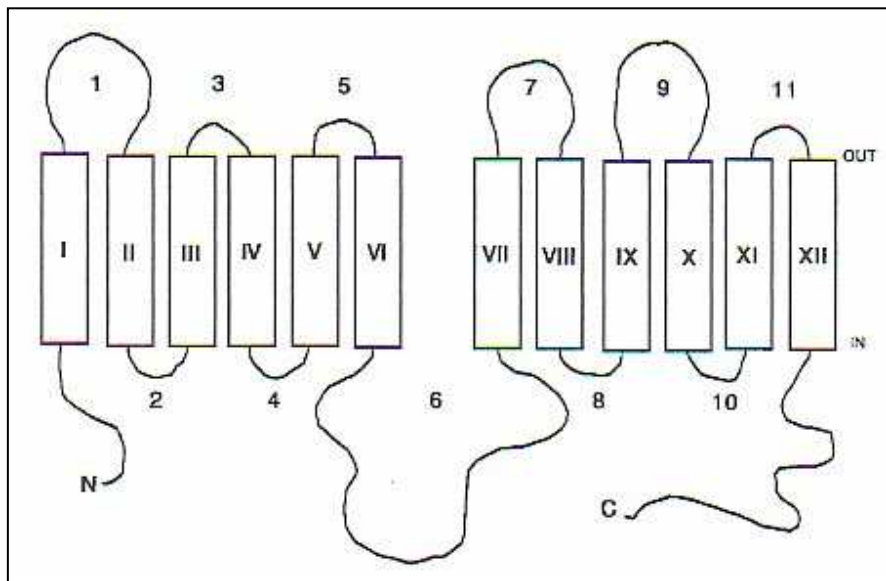


Figure 13. Topologie membranaire des membres de la superfamille des MFS (Major Facilitator Superfamily)

D'après Tanner & Caspari, 1996.

Les 12 domaines transmembranaires sont entourés par des rectangles. Les boucles 2, 4, 6, 8 et 10 sont cytoplasmiques tandis que les boucles 1, 3, 5, 7, 9 et 11 sont extracellulaires. Les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques.



### c. Mode de fonctionnement

Les membres de la superfamille MFS sont des transporteurs de petits solutés. Ils fonctionnent soit par un mécanisme de diffusion facilitée, soit par un mécanisme de transport actif secondaire (symports et antiports) impliquant des ions H<sup>+</sup> (Baldwin, 1993 ; Pao *et al.*, 1998). Les substrats transportés sont divers : hexoses, drogues, oligosaccharides, métabolites, organophosphates etc....

Deux mécanismes de transport des solutés ont été décrits dans la littérature (Tanner & Caspari, 1996) :

- Un mécanisme simple, où la fixation du soluté sur la protéine entraîne l'ouverture d'un canal, provoquant la translocation du soluté et sa libération de l'autre côté de la membrane.
- Un mécanisme de transport séquentiel et consécutif, où la fixation du soluté du côté extracellulaire conduit à un changement de conformation de la protéine et à la translocation du substrat sur l'autre face. Le soluté est libéré tandis que le transporteur fixe un second soluté, toujours extracellulaire. Un nouveau changement de conformation permet la libération de ce second substrat dans le cytoplasme (Jauch & Läuger, 1986).

### d. Comparaison de séquence et phylogénie

En 1998, Pao et ses collaborateurs ont établi une classification de ces protéines par des familles phylogénétiques, sur la base de comparaisons de séquences nucléotidiques et peptidiques (**Figure 14**).

Différents motifs consensus bien conservés se retrouvent dans toutes les perméases de la superfamille MFS. Des séquences répétées sont présentes dans les deux moitiés de la protéine. La comparaison de certaines régions des deux moitiés d'une protéine montre qu'il existe une grande similarité de séquence. Les protéines résultent selon les auteurs d'un événement de duplication interne d'un gène et cette duplication se serait produite avant la divergence des familles.



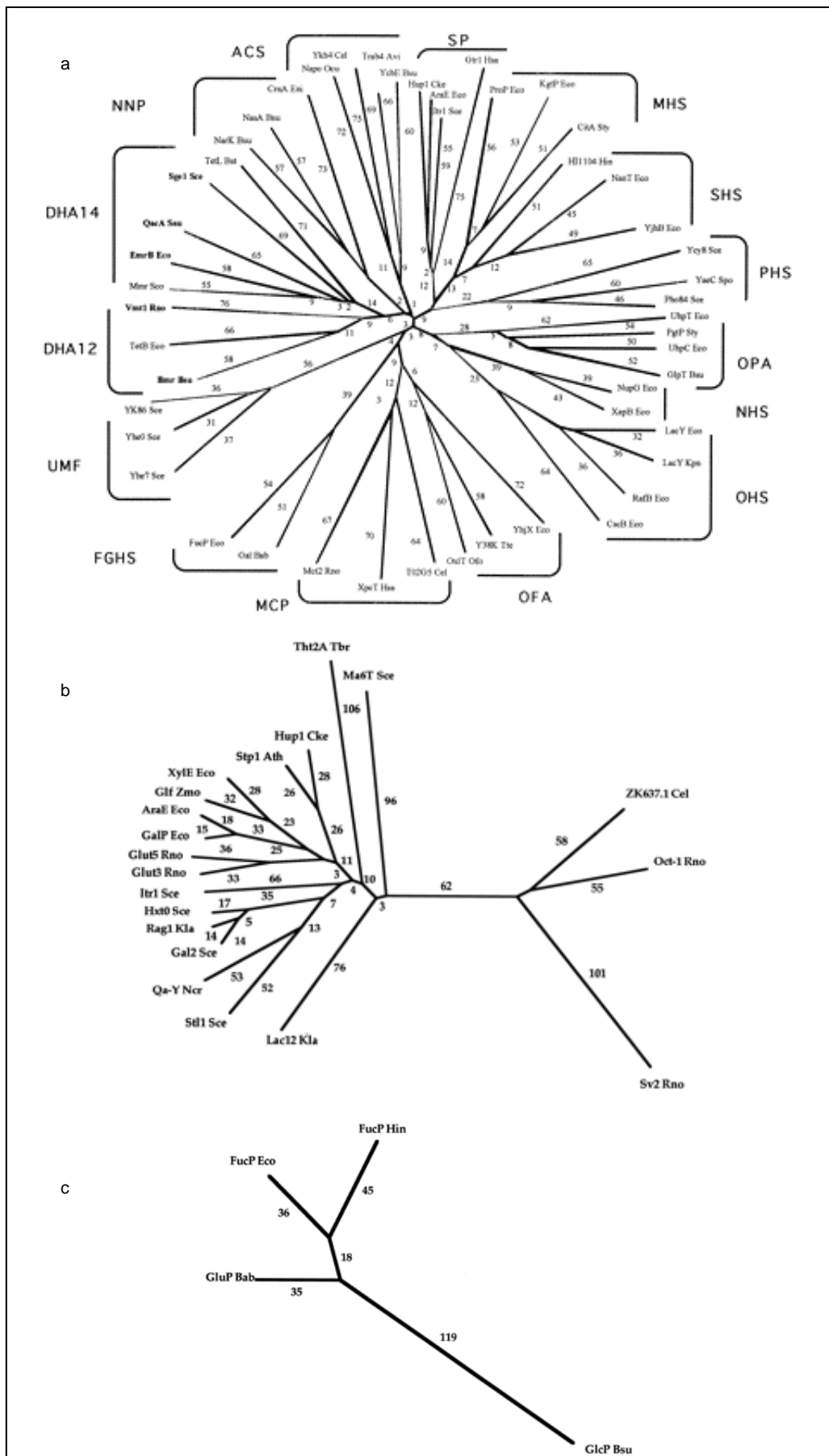


Figure 14. Phylogénie (a) des différentes familles des MFS (Major Facilitator Superfamily), (b) de la famille des SP (Sugar Porter) et (c) de la famille des FGHS (Fucose-Galactose Glucose :H<sup>+</sup> Symporter).

Le calcul des distances phylogénétiques est réalisé par le programme TREE. La longueur des branches reflète le degré de différences des séquences. Les valeurs numériques sont des unités arbitraires.

D'après Pao et al., 1998.



### e. Le transporteur facilité de glucose : GLuT

Le Glucose Transporter ou GLuT est un transporteur d'hexoses faisant partie de la famille des SP. Il a été particulièrement bien étudié chez les Vertébrés pour lesquels on dénombre à ce jour treize isoformes. Suite à l'isolement du premier ADNc de GLuT (GLuT1) dans le cerveau de rat et dans la lignée Hep G2 humaine (Silverman, 1991), il a été possible d'identifier onze autres membres (nommés GLuT2 à 12). La technique utilisée a été un criblage de banques d'ADNc de foie, de muscle et d'autres tissus à l'aide de cette sonde GLuT1. Ces différentes formes sont tissus et/ou cellules spécifiques et présentent chacune une affinité spécifique pour le glucose. L'activité de ces transporteurs est saturable, elle est stéréosélective et bidirectionnelle (Bell *et al.*, 1993). Les protéines GLuT1 à 4, 7, 8 et 12 sont des transporteurs de glucose tandis que les GLuT5, 9 et 11 sont des transporteurs de fructose, GLuT6 est quant à lui un pseudogène (**Tableau 2**).

Tableau 2. Famille des transporteurs facilités du glucose (GLuT).

GLuT	transport	Taille (aa)	affinité glucose (mM)	affinité fructose (mM)	localisation	fonction	Références
1	Glucose	492	5	0	érythrocytes, tissu fœtal, placenta, colon, cerveau	transport de glucose dans tissus fœtal, transport basal, barrière d'échange entre sang et tissu	Mueckler <i>et al.</i> , 1985 ; Gould <i>et al.</i> , 1991
2	Glucose	524	6 à 12	67	foie, cellules beta du pancréas, rein	haute capacité, faible affinité, transporteur basolatéral au niveau rénal, facilite l'entrée du glucose dans le sang	Fukumuto <i>et al.</i> , 1988 ; Gould <i>et al.</i> , 1991
3	Glucose	496	1 à 2	0	cerveau, rein, intestin	transporteur à haute affinité, transport primaire de glucose dans les neurones	Kayano <i>et al.</i> , 1988 ; Gould <i>et al.</i> , 1991 ;
4	Glucose	509	5	ND	adipocytes, cœur, muscle strié	régulation par insuline	Fukumuto <i>et al.</i> , 1989 ; James <i>et al.</i> , 1989
5	Fructose	501	0	6	intestin, cerveau, rein, spermatozoïdes	haute affinité au fructose	Kayano <i>et al.</i> , 1990 ; Davidson <i>et al.</i> , 1992
6		pseudogène			cerveau, rate, leucocytes		Doege <i>et al.</i> , 2000a ; Lisinski <i>et al.</i> , 2001
7	Glucose	528			foie, cellules beta du pancréas, rein	sortie du glucose du RE couplée avec la G6Pase, transport microsomale dans foie	Joost & Thorens, 2001



8	Glucose	477			Blastocystes, testicules, muscle squelettique, cœur, intestin, rate, prostate, cerveau	cellules germinales mâles pour synthèse d'ADN transport du glucose insulino-sensible au niveau des blastocystes	Carayannopoulos <i>et al.</i> , 2000 ; Doege <i>et al.</i> , 2000b ; Ibberson <i>et al.</i> , 2000 ; Lisinski <i>et al.</i> , 2001
9	fructose	46 kDa			rein, foie, placenta, leucocytes, poumon	Transporteur, mécanisme de régulation inconnu	Phay <i>et al.</i> , 2000
10					foie, pancréas, placenta, muscle squelettique et rein	Proposé comme gène de susceptibilité au diabète	Dawson <i>et al.</i> , 2001 ; Mc Vie-Wylie <i>et al.</i> , 2001
11	fructose				cœur, muscle squelettique	transporteur de fructose, faible affinité pour glucose, mécanisme de régulation inconnu	Doege <i>et al.</i> , 2001 ; Wu <i>et al.</i> , 2002 ; Sasaki <i>et al.</i> , 2001
12	glucose				cœur, prostate	Transporteur, mécanisme de régulation inconnu	Rogers <i>et al.</i> , 2002

Les isoformes les plus étudiées chez les Vertébrés sont les GLuT1 et GLuT4. Le GLuT1 ou « transporteur constitutionnel » se situe dans de nombreux tissus et pourrait être à l'origine de l'approvisionnement en glucose de cellules en repos. La protéine GLuT4 est localisée au niveau du tissu musculaire et adipeux. Chez les Vertébrés, le nombre de transporteurs de glucose GLuT4 dans la membrane plasmique des cellules adipeuses et musculaires est régulé par l'insuline (Martin *et al.*, 2000). Cette hormone permet, chez les Vertébrés, le maintien d'une concentration appropriée de sucre dans le sang par un effet hypoglycémiant. Elle peut intervenir soit sur l'entrée du glucose soit sur son métabolisme. La régulation par l'insuline de l'entrée du glucose dans les cellules est illustrée par la **Figure 15**. Les transporteurs sont stockés dans des compartiments intracellulaires. La liaison de l'insuline sur son récepteur déclenche une cascade d'événements dont une des conséquences est l'augmentation du taux d'exocytoses des vésicules contenant GLuT4 (Fletcher *et al.*, 2000), mais aussi de la fusion de ces vésicules avec la membrane (Foster & Klip, 2000) ainsi qu'une diminution de l'internalisation par endocytose (Bell *et al.*, 1993). Le GLuT1 est également localisé au niveau de la membrane plasmique avec un site de stockage intracellulaire, mais contrairement au GLuT4, il montre une faible redistribution vers la surface cellulaire en réponse à une stimulation par l'insuline (Pessin *et al.*, 1999).



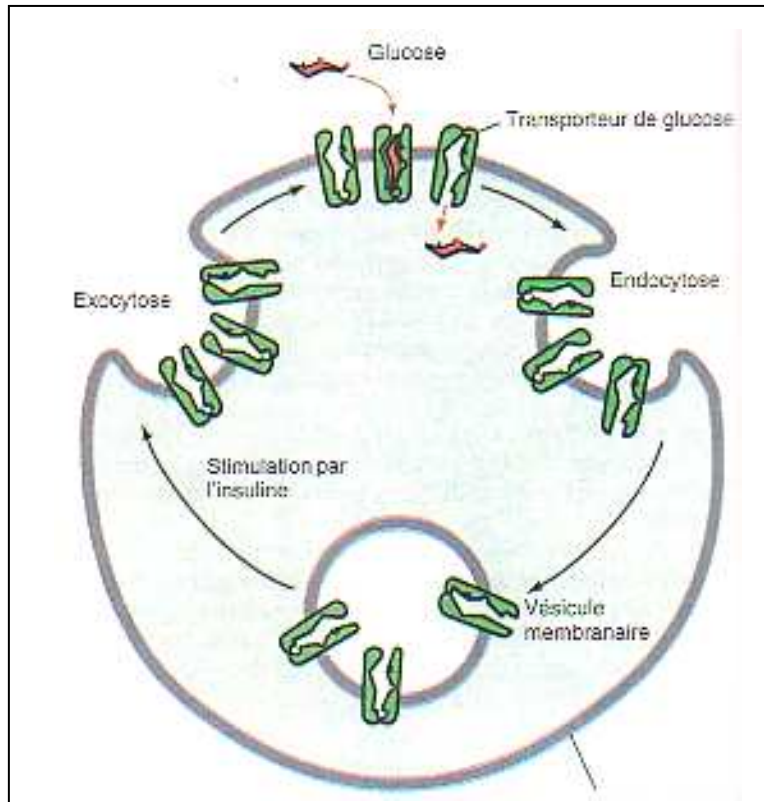


Figure 15. Régulation par l'insuline de l'entrée de glucose dans les cellules adipeuses et musculaires.

D'après Karp, 1998.

Les transporteurs sont stockés dans des vésicules intracellulaires. La stimulation par l'insuline provoque l'exocytose des vésicules contenant les transporteurs de glucose et la fusion de ces vésicules avec la membrane cellulaire. Ainsi les transporteurs de glucose se retrouvent au niveau de la membrane et permettent l'entrée du glucose dans la cellule.

#### ✘ Topologie membranaire :

Les protéines GLuTs (45 à 55 kDa) sont constituées d'environ 500 acides aminés fortement conservés (Joost et Thorens, 2001).

Le GLuT est une protéine formée de deux groupes de 6 hélices  $\alpha$  transmembranaires reliées par une boucle cytoplasmique de 65 acides aminés entre les hélices 6 et 7 (**Figure 16**). Les extrémités N- et C-terminaux sont du côté cytoplasmique. Le site de N-glycosylation se situe sur la petite boucle exofaciale entre les hélices 1 et 2.



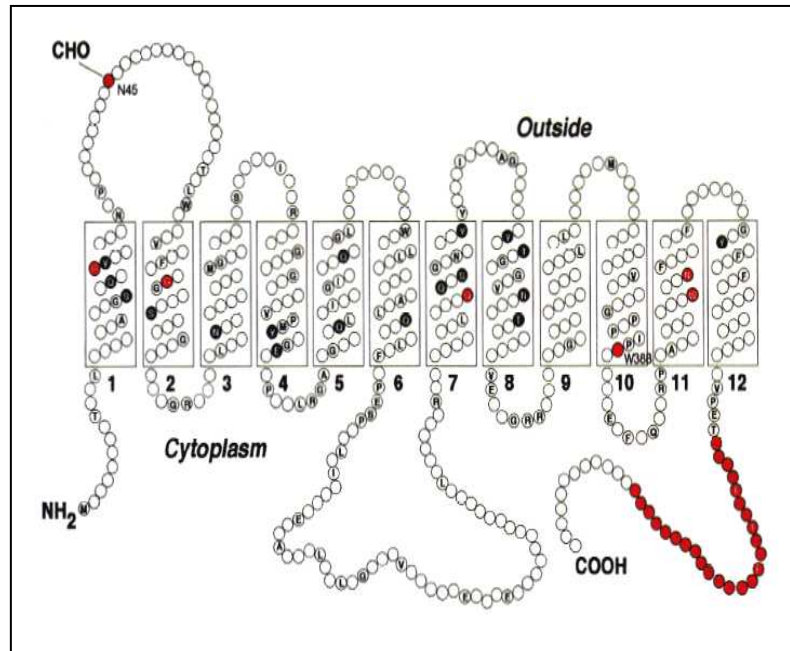


Figure 16. Topologie membranaire des transporteurs facilités de glucose chez les mammifères.

D'après Bell et al., 1993.

Les 12 domaines transmembranaires sont entourés par des rectangles. Le site potentiel de N-glycosylation au niveau de la boucle extracellulaire entre les hélices 1 et 2. Les résidus invariants sont notés par l'abréviation du nom de l'acide aminé. Les résidus polaires dans la bicouche lipidique sont représentés en noir et ceux dont la mutagenèse ou la délétion affecte la fonction du transporteur sont en rouge.

#### ✂ Sites de fixation, de translocation des solutés et fonctionnement :

Le motif QLS (Gln<sup>279</sup>, Leu<sup>280</sup>, Ser<sup>281</sup>), présent sur l'hélice 7 est très conservé dans la famille des GLuTs. Il forme en partie le site de fixation du substrat et joue un rôle dans la sélectivité du transporteur vis-à-vis du substrat (Seatter et al., 1998). Les résidus Tyr<sup>292/293</sup> et Trp<sup>412</sup> interfèrent dans le transport du soluté. Les résidus Tyr<sup>292/293</sup> délimitent le canal principal et le résidu Trp<sup>412</sup> se trouve à proximité de celui-ci (Zuniga et al., 2001).

Le mécanisme de transport du glucose par les protéines GLuTs est relativement simple (**Figure 17**). La fixation du glucose entraîne l'ouverture du canal principal. Ce changement de conformation facilite la translocation du soluté et sa libération de l'autre côté de la membrane (Silverman, 1991).



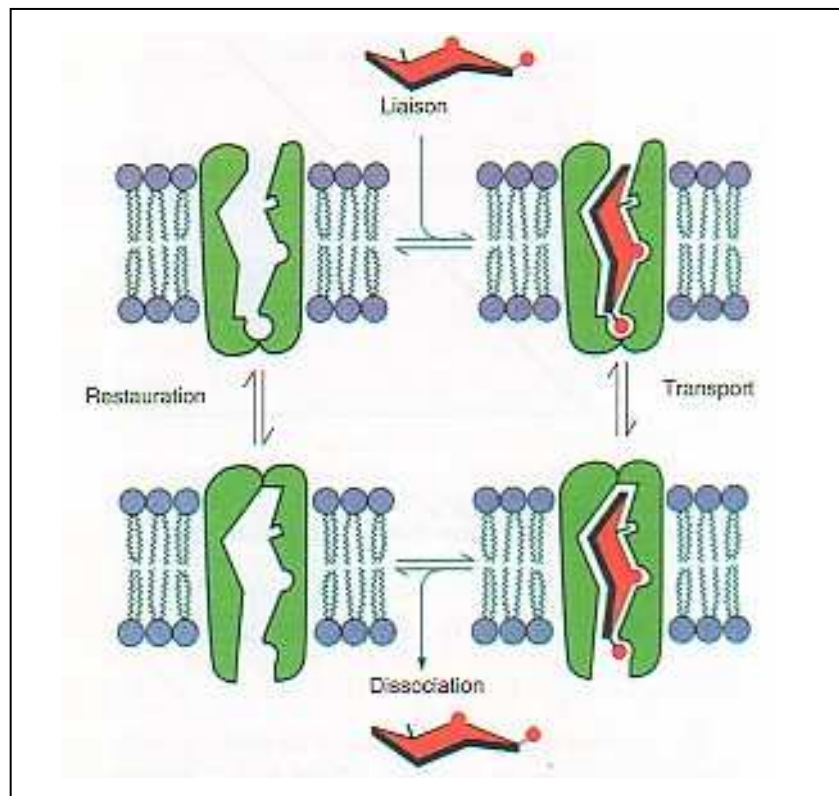


Figure 17. Mode de fonctionnement d'un transporteur de type GLuT.

D'après Karp, 1998.

La fixation du glucose d'un côté induit un changement conformationnel conduisant à la réorientation du site de fixation du substrat et donc à la libération du glucose de l'autre côté.

Les GLuTs peuvent être mis en évidence grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques tels que la cytochalasine B et la phlorétine (Czech *et al.*, 1973 ; Taverna & Langdon, 1973 ; Tanner & Caspari, 1996). La cytochalasine B se fixe sur les résidus 388 à 412, localisés aux extrémités endofaciales des deux canaux des protéines membranaires GLuTs (Zuniga *et al.*, 2001).

#### ✂ Comparaison de séquence et phylogénie :

Les alignements de séquences nucléiques entre les membres de la famille des GLuTs montrent une bonne conservation des séquences non seulement entre les différents GLuT au sein d'une même espèce mais aussi entre les GLuTs d'espèces variées même phylogénétiquement éloignées (les séquences sont disponibles chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le ver nématode *Caenorhabditis elegans* et la drosophile *Drosophila melanogaster*) (Joost & Thorens, 2001). Cette conservation s'observe au niveau des structures secondaires des protéines GLuTs, les Mammifères présentent une conservation variable selon les ordres de 39 à 68 % dont 182 acides aminées sont inchangés (26 %) (Bell *et al.*, 1993).

La réalisation d'un arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences des ADNc des GLuTs humains a permis de les diviser en 3 sous-classes issues de duplication



d'un gène ancestral (**Figure 18**). La classe I est formée des GLuTs 1 à 4, la classe II contenant le transporteur de fructose GLuT5, et les isotypes GLuT7, 9 et 11 et la classe III comprenant les GLuTs 6, 8, 10, 12 et HMIT, un transporteur de  $H^+$ -myo-inositol.

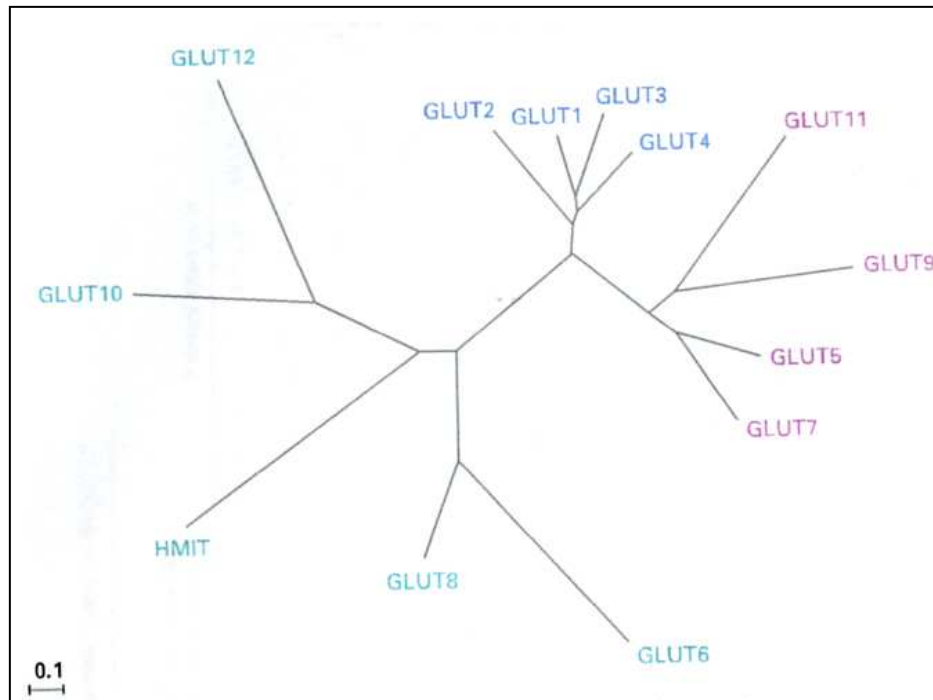


Figure 18. Dendrogramme de l'alignement multiple des membres de la famille des GLuTs. D'après Wood & Trayhurn, 2003.

L'alignement de séquence de trente membres de GLuTs humains est réalisé par le programme PHYLIP (Felsenstein, 1989). La longueur des branches reflète le degré de différences des séquences. Les trois classes des protéines GLuTs sont représentées par les couleurs suivantes : classe I en bleu, classe II en rouge et classe III en vert.

## 2.2. Mécanismes de transport actif primaire : la famille des ABC (ou ATP-Binding Cassette)

Le transport de soluté et l'hydrolyse de l'ATP sont assurés par un seul et même système protéique (Higgins, 1992). Ces transporteurs sont constitués 1) d'une protéine extracellulaire de liaison au substrat, 2) de deux domaines protéiques transmembranaires constituant le canal de translocation du soluté, 3) et de deux domaines de liaison aux nucléotides qui émergent dans le cytoplasme, l'hydrolyse de l'ATP fournissant l'énergie du système de transport (Albers *et al.*, 1999).

La protéine est formée de deux lobes entourant le site de fixation. En l'absence de soluté, les lobes sont en conformation ouverte, laissant libre accès au site de fixation. Lorsque le soluté est fixé, les lobes se referment et l'empêchent de retourner à sa forme libre. Le canal de translocation du soluté est formé de deux domaines localisés dans la



membrane lipidique. Ils possèdent chacun six segments transmembranaires. Ces protéines ont un site de fixation à l'ATP et présentent une activité ATPase. Elles fournissent ainsi l'énergie nécessaire aux changements de conformation des protéines de translocation.

Ce système de transport formerait la voie de transduction d'un signal qui partirait du périplasma avec la reconnaissance du substrat par une protéine de liaison et qui se terminerait par l'hydrolyse de l'ATP dans le cytoplasme (Boos & Schuman, 1998).

La **figure 19** permet de visualiser le fonctionnement d'un transporteur de maltose (Boos & Schuman, 1998). En absence de substrat, les deux sous-unités MalK sont associées à un activateur de transcription des gènes *mal*, MalT. En présence de maltose, le cycle débute par la fixation du soluté sur la protéine de liaison (MalE), cette fixation entraînant la propagation d'un signal de reconnaissance qui va provoquer le rattachement des deux sous-unités MalK au complexe de translocation (MalFG) ainsi que l'hydrolyse de l'ATP. La libération d'énergie permet l'ouverture du canal membranaire et la translocation du soluté de l'autre côté de la membrane.

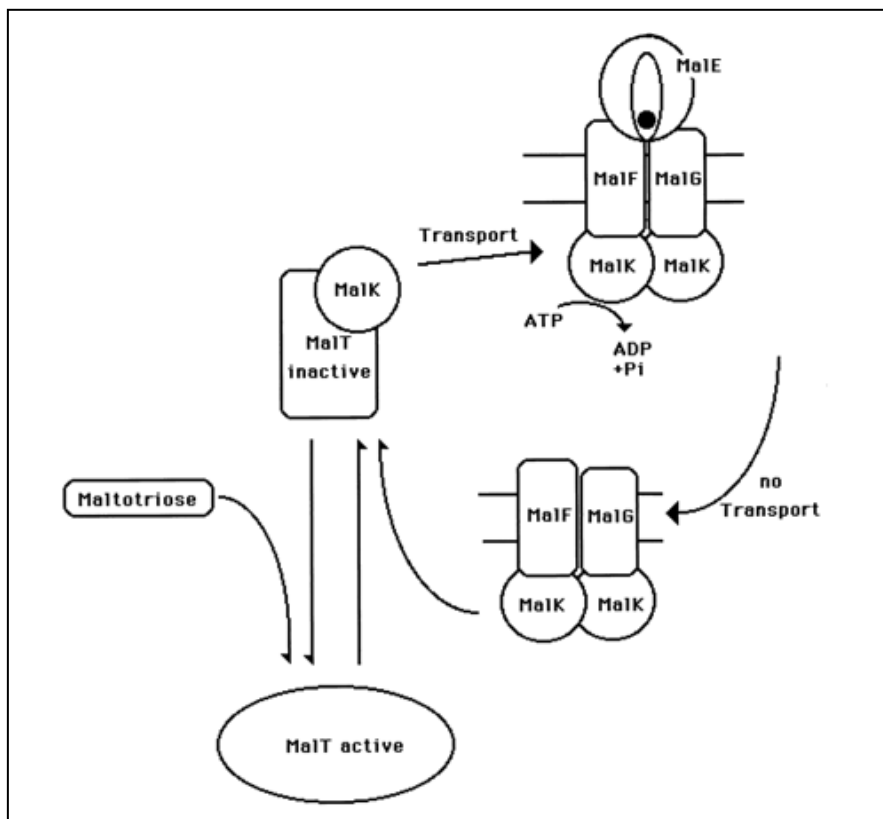


Figure 19. Mode de fonctionnement de la maltose perméase, une protéine de type ABC. D'après Boos & Shuman, 1998.

(MalK : sous-unité d'hydrolyse de l'ATP ; MalF et MalG : sous-unités de translocation du soluté ; MalE : Protéine de liaison au soluté ; MalT : protéine de régulation).



## **2.3. Mécanismes de transport actif secondaire : la famille des SSSF (ou Sodium Substrate Symport Family)**

### **a. La famille des SSSF**

Le symport sodium/substrat est un mécanisme très répandu de transport à travers la membrane des cellules procaryotes et eucaryotes (Jung, 2002). Par ce moyen, l'énergie associée au gradient de sodium (appelée SMF ou Sodium Motive Force) est utilisée pour conduire l'accumulation de soluté contre son gradient de concentration. Cette SMF est générée par des pompes à sodium primaires (comme les  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases, de la chaîne respiratoire) ou par des antiports  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Les différents membres de cette famille peuvent transporter des sucres mais également des acides aminés, des vitamines, des ions, du myo-inositol, du phénylacétate, de l'urée et de l'eau.

### **b. Topologie des transporteurs de la famille SSSF**

Les membres de la famille des SSSF sont formés de 400 à 700 acides aminés et sont constitués 11 à 15 hélices  $\alpha$  transmembranaires.

Le représentation de la structure secondaire de PutP, un cotransporteur de  $\text{Na}^+$ /proline d'*Escherichia coli*, montre que la protéine est formée de 13 domaines transmembranaires, dont l'extrémité N-terminale est située du côté périplasmique et l'extrémité C-terminale se trouvant du côté cytoplasmique (**Figure 20**). Les résidus intervenant dans la fixation du substrat et des ions  $\text{Na}^+$  sont localisés au niveau des boucles 2, 7 et 9.



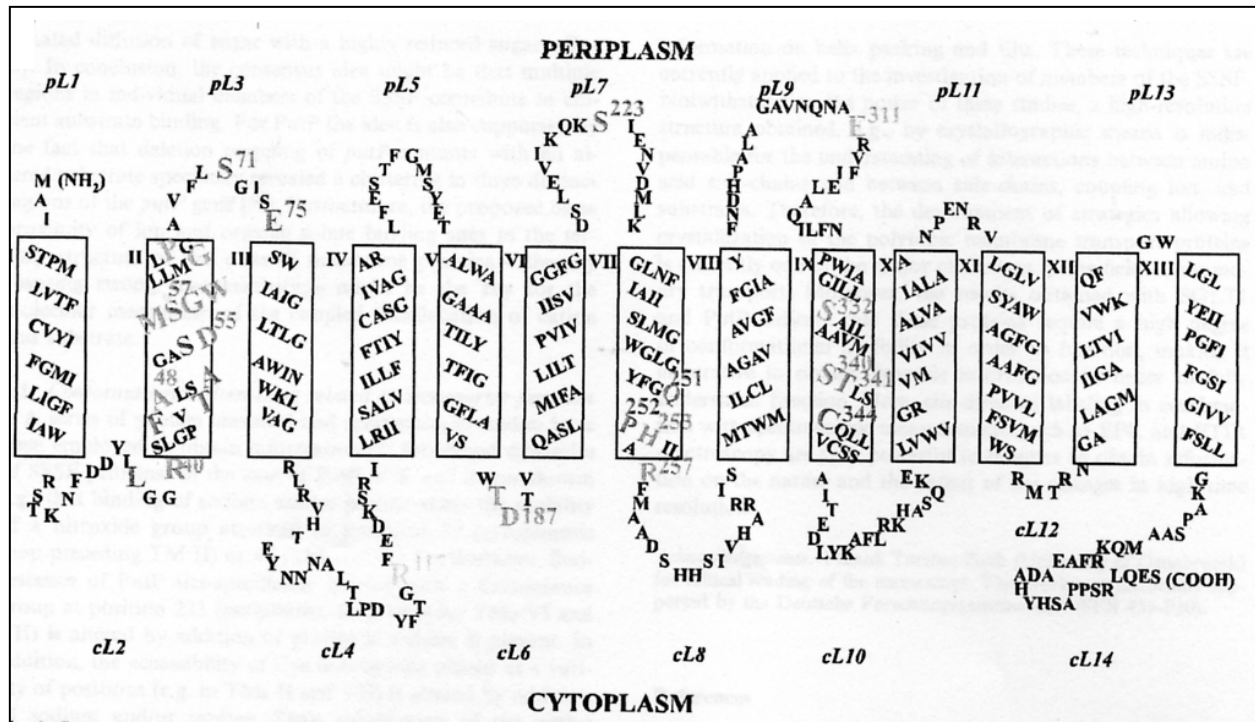


Figure 20. Représentation de la structure secondaire de PutP chez *Escherichia coli*.  
D'après Jung, 2002.

### c. Mode de fonctionnement

Le cycle du système de transport de sodium/substrat débute par la fixation du sodium au transporteur. La liaison du sodium sur le transporteur induit de ce fait un changement de conformation qui provoque à son tour l'augmentation de l'affinité du transporteur pour son substrat. La formation du complexe induit un autre changement structurel qui expose le sodium et le substrat de l'autre côté de la membrane. Le substrat et le sodium sont ensuite libérés, puis le transporteur libre se réoriente dans la membrane vers le périplasma permettant alors un nouveau cycle de transport.

### d. Comparaison de séquence et phylogénie

La famille des SSSF (Sodium Substrate System family) comprend plus de 100 transporteurs d'origines procaryotes ou eucaryotes (**Figure 21**), regroupés en famille selon leur niveau d'homologie (Jung, 2002).

Les membres de ces familles diffèrent selon le choix de l'ion de couplage ou le symport ou l'antiport associé.



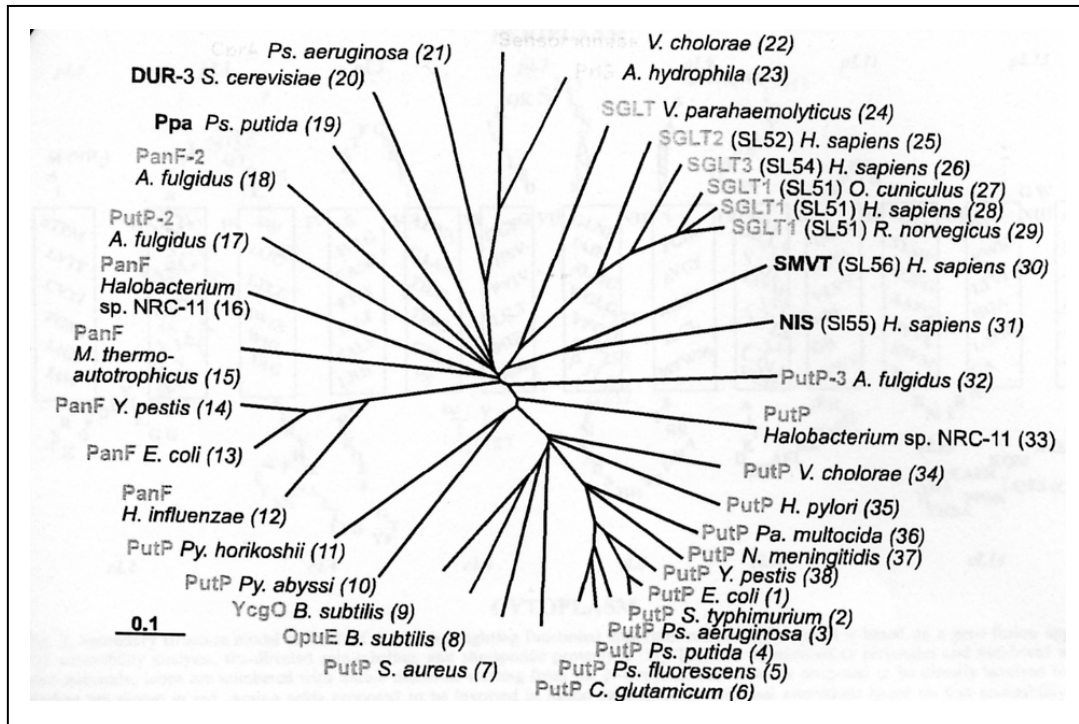


Figure 21. Phylogénie des membres de la famille des SSSF.

D'après Jung, 2002.

OpuE : Sodium/proline symporter ; PanF : Sodium/Pantothenate symporter ; PutP : Sodium/Proline transporter ; SGLT : Sodium/Glucose transporter ; YcgO : Sodium/proline symporter.

### e. Le cotransporteur Na<sup>+</sup>/glucose : SGLT

La famille des SGLTs (Na<sup>+</sup>/glucose transporter) est une famille des SSSF. La famille SGLT contient plus de 55 membres et possède des séquences identifiées chez les bactéries, la levure, les insectes, les nématodes et les mammifères. Toutes ces protéines montrent de grandes similarités de fonction et sont capables de transporter des solutés variables, des sucres ou des ions inorganiques. Le gradient de sodium est maintenu grâce à différentes pompes : Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, symport Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>...

#### ✂ Topologie membranaire :

La famille des Sodium-GLucose coTransporters ou SGLTs rassemble des transporteurs composés de 13 hélices  $\alpha$  transmembranaires avec l'extrémité C-terminale du côté cytoplasmique auxquelles peuvent s'ajouter un ou deux segments supplémentaires. Le premier membre de la famille des SGLTs, SGLT1, a été caractérisé au niveau rénal et dans l'intestin grêle (Turk & Wright, 1997) (**Figure 22**). Ces auteurs ont montré que les transporteurs mammaliens, mis à part les transporteurs d'iodide NIS, possédaient une quatorzième hélice transmembranaire. Il en va de même pour le transporteur bactérien du galactose, SGLTV. Les transporteurs HypE62 et DUR3 possèdent quant à eux 15 hélices transmembranaires. A l'exception du transporteur bactérien HypAeu d'*Alcaligenes eutrophis*,



toutes ces molécules ont l'extrémité N-terminale du côté extracellulaire. Le site de N-glycosylation se situe sur le résidu N 242.

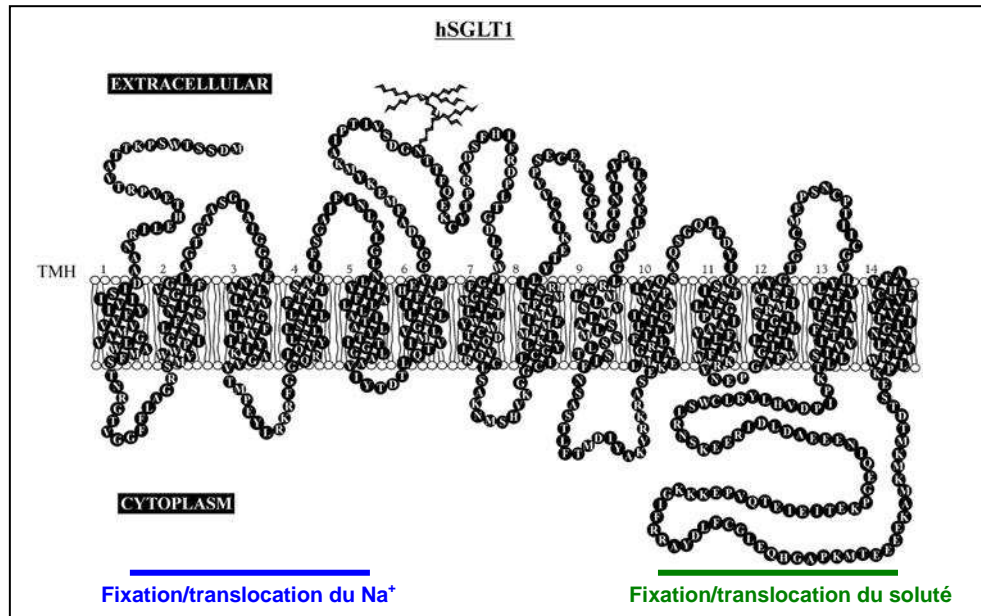


Figure 22. Topologie membranaire et sites de fixation et de translocation des solutés des protéines de transport de la famille des SGLTs. D'après Wright, 2001b.

Exemple du transporteur  $\text{Na}^+$ /glucose SGLT1 humain. Chaque acide aminé des 664 résidus est représenté par son code. Le modèle de structure secondaire montre 14 hélices transmembranaires avec les deux extrémités N- et C-terminales du côté extracellulaire.

#### ✂ Sites de translocation des solutés et fonctionnement :

Des études fonctionnelles portant sur des homologues de SGLT1 ainsi que sur SGLT2, SMIT (cotransporteur  $\text{Na}^+$ /Myoinositol) et NIS ont montré que les membres de cette famille partageaient de grandes similarités de fonction (Hirayama *et al.*, 1996 et 1997 ; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1995 ; Parent *et al.*, 1992a et b).

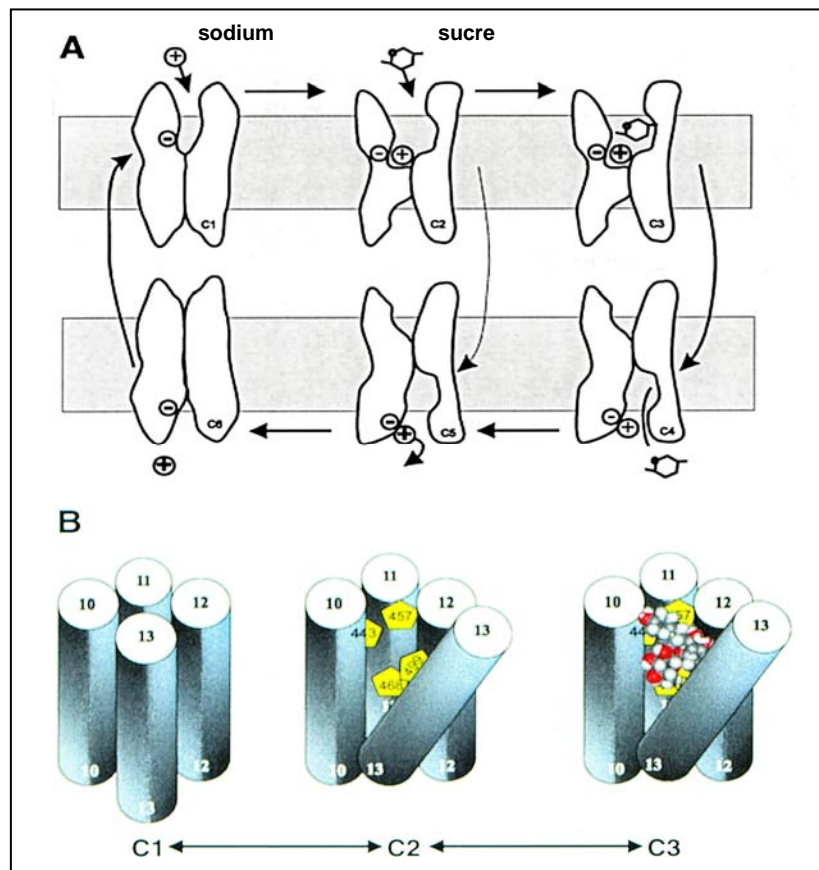
Le site de liaison et de translocation du  $\text{Na}^+$  se trouve à l'extrémité N-terminale entre les hélices transmembranaires 1 et 5 alors que les résidus 407 et 662 (Cys<sup>457/468/499</sup>) des hélices 10 à 13 déterminent l'affinité et la sélectivité du transporteur pour le sucre formant ainsi son site de fixation et de translocation. Le site de fixation de la phlorizine se situe au niveau de la boucle 13 (résidus 604-610).

En absence de substrat, tous ces transporteurs se comportent comme des canaux aqueux de faible conductance associés à une fuite de sodium. En présence de substrat, ces protéines se comportent comme des symports  $\text{Na}^+$ /soluté (Loo *et al.*, 1996). Les SGLTs permettent l'accumulation active du glucose dans une cellule par couplage du transport à un gradient ionique transmembranaire maintenu par une pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase de la



membrane basolatérale. Le mécanisme de translocation simultanée implique un ou plusieurs ions sodium selon le transporteur considéré (Loo *et al.*, 1996 et 1998).

Le mécanisme de transport du glucose a été décrit par Wright en 2001b (**Figure 23**). Lorsque le potentiel membranaire est négatif, la protéine membranaire divalente se trouve dans l'état C1. En présence de sodium extracellulaire, deux ions  $\text{Na}^+$  se lient et la protéine change de conformation en prenant l'état C2. En absence de sucre, la protéine facilite l'entrée du  $\text{Na}^+$ . Tandis qu'en présence de sucre du côté extracellulaire, deux ions  $\text{Na}^+$  et un sucre peuvent être transportés à travers la membrane ( $\text{C3} \rightarrow \text{C4} \rightarrow \text{C5}$ ). Le sucre et le  $\text{Na}^+$  sont finalement libérés du côté cytoplasmique de la membrane lorsque le transporteur se trouve en conformation C6. Le cycle s'achève lorsque la protéine reprend son état initial C1.



**Figure 23.** Mécanisme de fonctionnement du cotransporteur sodium/glucose SGLT1. D'après Wright, 2001b.

A: les 6 états conformationnels avec l'ordre de liaison des ligands. Au potentiel membranaire négatif, la protéine membranaire divalente est dans l'état C1, en présence de sodium extracellulaire, 2 ions  $\text{Na}^+$  se lient et forment l'état C2. En absence de sucre, la protéine facilite l'entrée du  $\text{Na}^+$ , mais en présence du sucre du côté extracellulaire, 2  $\text{Na}^+$  et un sucre sont transportés à travers la membrane. Le sucre et le  $\text{Na}^+$  sont libérés du côté cytoplasmique de la membrane et le transporteur complète le cycle  $\text{C6} \rightarrow \text{C1}$ .

B: bases structurales proposées du changement de conformation de SGLT1 dépendant du  $\text{Na}^+$ . Les hélices transmembranaires TMH 10-13 formeraient le site de translocation du sucre. Les cystéines 457, 468 et 499 ne sont pas accessibles par la méthaneithiosulfonate (MTS) à l'état C1, mais après la liaison du  $\text{Na}^+$ , cela devient possible, probablement par inclinaison de la TMH 13.



Outre le Na<sup>+</sup>, d'autres cations comme le H<sup>+</sup> et le Li<sup>+</sup> peuvent induire le cotransport des hexoses à travers SGLT1, 2 et 3. L'affinité de SGLT pour H<sup>+</sup> est 1000 fois plus élevée que pour Na<sup>+</sup> et Li<sup>+</sup> mais son affinité pour le sucre est supérieure avec le Na<sup>+</sup>.

L'activité de transport des sucres par des transporteurs de type SGLT peut être mis en évidence soit par le biais de différents inhibiteurs (phlorizine, ouabaine, amiloride) soit par l'utilisation d'un milieu de culture dépourvu de sodium et l'étude de l'effet de la concentration extracellulaire croissante de cet ion sur la cinétique d'entrée du glucose.

En ce qui concerne la régulation à court terme des SGLTs, des études *in vivo* sur l'intestin de souris démontrent que le cotransport Na<sup>+</sup>/glucose augmente 2 à 8 fois en quelques minutes lors de l'addition de forskolin qui augmente le taux d'AMP cyclique intracellulaire. Dans les ovocytes de lapin transfectés exprimant SGLT1, l'activation de la protéine kinase A (PKA) provoque l'augmentation du taux de cotransport Na<sup>+</sup>/glucose de 30 % alors qu'une diminution de 60 % est observée après activation de la PKC. Ce changement est accompagné d'une variation du nombre de cotransporteur dans la membrane plasmique et de la superficie de la membrane. La régulation du transport des SGLTs par les protéines kinases s'effectue par exo- et endocytose (Turk & Wright, 1997).

#### ✂ Comparaison de séquence et phylogénie :

Turk et Wright (1997) ont réalisé un arbre phylogénétique des membres de la famille SGLT en se basant sur des comparaisons des 21 séquences répertoriées chez les eucaryotes et les 16 séquences des procaryotes (**Figure 24**). Les homologues mammaliens sont regroupés sur une même branche à l'exception du transporteur d'iodide NIS qui est très divergeant. La longueur des séquences varie de 477 à 830 résidus, les formes eucaryotes sont généralement plus longues de 100 à 200 résidus par rapports à celles des procaryotes. Seuls 4 résidus sont parfaitement conservés. D'autre part, les domaines cytoplasmiques sont généralement plus courts et mieux conservés que les domaines externes. L'hélice 13 est très peu conservée. Les trois SGLTs (SGLT1, SGLT2 et SGLT3) présentent entre elles une forte conservation de séquence (664aa, 672aa et 659aa).



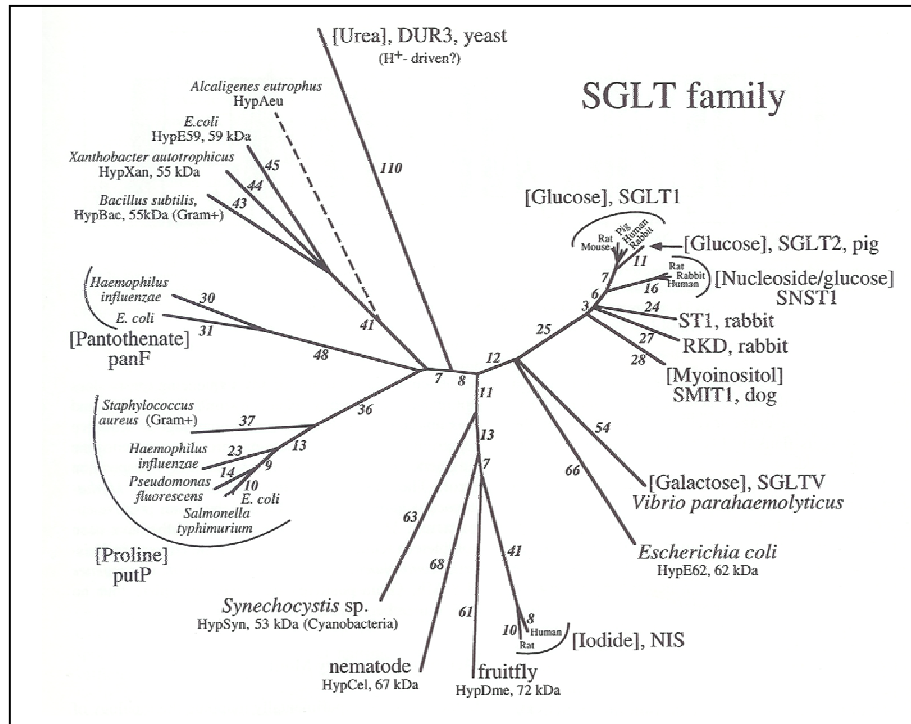


Figure 24. Arbre phylogénétique obtenu après alignement des séquences de 30 transporteurs homologues de la famille SGLT.

D'après Turk et Wright, 1997.

Le calcul des distances phylogénétiques est réalisé par le programme PHYLIP. La longueur des branches reflète le degré de différence des séquences.

## 2.4. Mécanismes de transport couplé à une phosphorylation : la famille des PTS

Ce système de transport a été découvert par Roseman et ses collaborateurs en 1964. Il catalyse la translocation concomitamment à la phosphorylation du substrat. Cela aboutit à l'accumulation dans la cellule d'esters phosphorylés et non de carbohydrates. Le groupement phosphoryl provient du phosphoénol pyruvate et est transféré au carbohydrate via une phosphorylation réversible par les protéines du système phosphotransférase ou PTS.

Le système PTS est constitué de deux types de protéines cytoplasmiques (Postma, 1992) :

- L'Enzyme I (EI) qui transporte les substrats phosphorylés vers la deuxième protéine HPr.
- Les Enzymes II (EII) et Facteurs III qui sont des protéines de reconnaissance et de translocation du soluté, sont spécifiques du soluté. L'Enzyme II et le Facteur III peuvent être sous la forme monomérique ou dimérique. Des complexes EII/FIII (Enzyme II/Facteur III) peuvent être constitués d'une à quatre protéines selon les cas. Ils sont formés de trois domaines : un domaine



hydrophobe transmembranaire qui permet la fixation et la translocation du soluté, et deux domaines hydrophiles possédant les sites de phosphorylation.

### 3. Mécanismes de transport du glucose dans le règne animal

#### 3.1. Transport du glucose chez les Vertébrés

##### a. Chez les Mammifères

Deux types de transporteurs du glucose ont été identifiés chez les mammifères :

- Des transporteurs de la super famille des MFS (famille SP) assurant une diffusion facilitée. Douze protéines GLuT ont été caractérisées (GLuT1 à GLuT12) (Joost & Thorens, 2001).

Ces protéines présentent une expression tissu et/ou cellules spécifique et peuvent transporter différents solutés (glucose et fructose) avec des affinités différentes (Bell *et al.*, 1993).

- Des cotransporteurs sodium/glucose de type SGLT d'affinité et de spécificité différente, couplés au fonctionnement de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. Trois SGLTs ont été identifiés (Wright, 2001a).

SGLT1 = transporteur de glucose et de galactose présentant une forte affinité (0,4mM pour le glucose).

SGLT2 = transporteur de glucose avec une affinité plus faible (2mM).

SGLT3 = rôle variable selon les espèces (affinité pour le glucose de 6mM).

##### b. Chez les Oiseaux

Deux types de transporteurs ont pu être mis en évidence chez les Oiseaux (Kimmich & Randles, 1975 et 1976 ; Amat *et al.*, 1996) :

- Des transports de type GLuT. Ces protéines membranaires ont pu être identifiées chez plusieurs espèces (White *et al.*, 1991 ; Wagstaff *et al.*, 1995 ; Garriga *et al.*, 1999). En 1999, Thomas-Delloye et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence trois transporteurs chez le canard musqué, *Cairina moschata*. L'un montrant une forte homologie avec GLuT1, l'autre avec GLuT5 et enfin un homologue de GLuT4 régulé par l'insuline.
- Un transporteur de type SGLT, mis évidence au niveau intestinal chez le poulet (Garriga *et al.*, 1999).



### c. Chez les Téléostéens

Deux systèmes de transport ont été mis en évidence (Reshkin & Ahearn, 1987a et 1987b ; Ahearn *et al.*, 1992) :

- Une protéine de diffusion facilitée inhibée par la phlorétine et la cytochalasine B (Tse & Young, 1990 ; Young *et al.*, 1994 ; Rodnick *et al.*, 1997 ; Soengas & Moon, 1998 ; Teerijoki *et al.*, 2000 et 2001), dont les caractéristiques sont différentes de celles du transport par les GLuTs (Wright *et al.*, 1998 ; Legate *et al.*, 2001)..
- Un cotransport Na<sup>+</sup>/glucose sensible à la phlorizine.

Des gènes codant pour des transporteurs de glucose de type GLuT exprimés principalement dans les muscles ont été mis en évidence chez la truite commune, *Salmo trutta* (Planas *et al.*, 2000, avec une forte homologie avec GLuT4), chez la truite arc-en-ciel, *Onchorhynchus mykiss* (Teerijoki *et al.*, 2000 ; Krasnov *et al.*, 2001, type GLuT1 et 2) et chez la carpe commune, *Cyprinus carpio* (Teerijoki *et al.*, 2001, type GLuT1 et 2).

### d. Chez les Amphibiens

En 1989, Weber et ses collaborateurs ont montré l'existence d'un transporteur de glucose de type SGLT dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. Les modalités fonctionnelles de ce transporteur sont cependant différentes de celles de ses homologues mammaliens. Comme le SGLT2 de Mammifère, il ne transporte pas le galactose mais la stoechiométrie du transport est identique à celle de SGLT1. Le SGLT de *Xenopus laevis* serait donc une chimère combinant les propriétés des transporteurs mammaliens SGLT1 et SGLT2.

Un autre transporteur a été cloné et caractérisé chez *Xenopus laevis* (Nagata *et al.*, 1999). Il possède une affinité plus forte pour le myo-inositol que pour le glucose et ne permet pas le transport d'ions sodium en l'absence de sucre. Les caractéristiques de ce transporteur le rapprochent plutôt des transporteurs de type SMIT (transporteurs de myo-inositol) que des SGLT. Toutefois, les paramètres cinétiques, de même que la distribution tissulaire et l'organisation génomique de cette protéine montrent une ressemblance avec SGLT1. Il pourrait s'agir d'une seconde chimère.

Récemment, une séquence d'une protéine homologue de GLuT1, appelée *xGLuT1*, a été identifiée chez le Xénope (Suzawa *et al.*, 2007). *Xenopus* GLuT1 est formée du motif d'acides aminés (R-X-G-R-R) que l'on retrouve chez tous les membres de la famille des transporteurs de diffusion facilitée de type GLuT, ce motif détermine la topologie



membranaire requise pour l'activité de transport de sucre chez GLuT1 mais son activité n'a pas encore été testée.

### **3.2. Transport du glucose chez les Invertébrés**

#### **a. Chez les Arthropodes**

Chez les insectes, un système de transport similaire à la diffusion facilitée des Mammifères a été mis en évidence (*Drosophila melanogaster*, Wang & Wang, 1993). Ce mode de transport montre une cinétique saturable et est inhibé par la cytochalasine B et la phlorétine mais pas par la phlorizine. En 1995, un gène présentant de fortes similitudes avec le gène humain GLuT3 a été mis en évidence (Martin *et al.*, 1995). Ces auteurs ont montré que sa présence n'était pas indispensable au bon développement des individus, il ne s'agit donc pas d'un transporteur important. En 1999, un gène appelé DmGluT1 a été cloné et caractérisé chez la drosophile (Escher & Rasmuson-Lestander, 1999). Il code pour une protéine de 480aa de type GLuT1 (61% d'homologie) possédant la structure des transporteurs des MFS. A partir de la séquence de DmGluT1, les auteurs ont pu localiser trois autres gènes susceptibles de coder des transporteurs de glucose.

Chez les Crustacés, des systèmes de transporteurs sodium dépendants ont également été identifiés au niveau de l'hépatopancréas (SGLT1L, Verri *et al.*, 2001). Ils présentent 52 à 53% d'identité avec SGLT1 humain (Nagata *et al.*, 1999). La diffusion vers le système sanguin fait intervenir un processus de diffusion facilitée (Ahearn & Maginniss, 1977 ; Ahearn *et al.*, 1985 ; Blaya *et al.*, 1998).

#### **b. Chez les Plathelminthes et les Némathelminthes**

Des protéines de diffusion facilitée, proches des systèmes facilités déjà connus, ont été caractérisées chez différentes espèces (*Schistosoma mansoni* : Skelly *et al.*, 1994 ; *Taenia solium* : Rodriguez Contreras *et al.*, 1998). De plus, un gène codant pour une protéine de type GLuT1, Ceglut1, a été identifié chez *Caenorhabditis elegans* sur la base d'homologies de séquences avec les GluTs d'autres espèces, en particulier avec la drosophile (Escher & Rasmuson-Lestander, 1999).

#### **c. Chez les Mollusques**

Chez les Mollusques Bivalves, des systèmes membranaires de transport du glucose ont été mis en évidence. Des mécanismes de diffusion facilitée et de cotransport sodium/glucose de type SGLT ont été décrits au niveau des épithéliums branchiaux et des



cellules de réserve chez *Mytilus edulis* (Zaba *et al.*, 1981 ; Zaba & Davies, 1984 ; Pajor *et al.*, 1989 ; Wright *et al.*, 1992 ; Louzao *et al.*, 1993). Chez cette espèce, Lenoir (1989) a étudié les mécanismes d'entrée d'un analogue du glucose non métabolisé par les cellules, le 3-ortho-méthyl-D-glucose dans une suspension de cellules vésiculeuses purifiées. Deux composantes de l'entrée du glucose ont été caractérisées, une composante de diffusion non saturable et une composante saturable avec la concentration en substrat qui est inhibée par la phlorétine, un inhibiteur non spécifique du transport facilité.

Chez *Crassostrea gigas*, en 1974, Bamford et Gingles ont mis en évidence un effet stimulateur de la concentration extracellulaire en sodium sur l'entrée du glucose au niveau des tissus branchiaux. De plus, la séquence d'un transporteur de type SGLT a été identifiée en 2004 chez l'huître creuse par Huvet et ses collaborateurs (UMR PE2M). L'existence de protéines de type GLuT dans les cellules vésiculeuses de *C. gigas* a été également fortement suggérée par une étude immunocytochimique réalisée sur des coupes congelées de palpes labiaux et des cellules vésiculeuses dissociées, à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-GluT4 de lapin (Sombe, 2001).



**OBJECTIFS :**

L'objectif de ce travail de thèse est de préciser les mécanismes moléculaires de l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses, cibles de mécanismes régulateurs. La capacité d'entrée est variable selon la période de l'année et fait appel à plusieurs types de transporteurs. Les constantes cinétiques de ces transporteurs ont été mesurées. La séquence de l'un d'eux, le SGLT, est d'ailleurs identifiée et permet le suivi quantitatif de son expression. Pour s'affranchir des difficultés liées aux changements permanents du statut métabolique des cellules vésiculeuses susceptibles de perturber l'étude de sa régulation, la technique de cryopréservation a été mise en oeuvre. Elle permet de disposer à n'importe quel moment de l'année d'une banque de cellules vésiculeuses dont les capacités métaboliques ont été étalonnées. La multiplicité des outils techniques développés pour appréhender le métabolisme glucidique a permis d'envisager des suivis saisonniers et de préciser les périodes de mise en réserve ou de mobilisation du glycogène et donc de cibler les phases clés d'inversion métabolique en lien direct avec les stades de développement de la gonade.

En ce qui concerne la partie appliquée de ce travail, l'effet des conditions d'alimentation sur la mise en réserve a pu être appréhendé *in vitro* sur les suspensions de cellules isolées ou *in vivo*, en réalisant des conditionnements contrôlés de lots d'huîtres à différentes périodes pertinentes du cycle de stockage du glycogène. La disponibilité de souches d'huîtres résistantes R et sensibles S aux mortalités estivales, sélectionnées génétiquement dans le cadre du programme MOREST, a offert l'opportunité de préciser des différences de comportement de ces souches en terme de reproduction, de mise en réserve de glycogène et de réponse aux paramètres trophiques.







## **MATERIEL ET METHODES**



---

<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>45</b>
<b>1. Animaux</b>	<b>47</b>
<b>2. Expérimentation <i>in vivo</i></b>	<b>48</b>
2.1. Suivi saisonnier sur estran	48
2.2. Conditionnement artificiel	50
<b>3. Mesures biométriques</b>	<b>51</b>
<b>4. Histologie</b>	<b>51</b>
4.1. Réalisation des coupes transversales d'huîtres	51
4.2. Fixation, inclusion et coupe	52
4.3. Coloration : Trichrome de Prenant Gabe (Gabe, 1968)	52
4.4. Analyse d'images	53
<b>5. Dosages biochimiques</b>	<b>54</b>
<b>6. Préparation de la suspension cellulaire</b>	<b>54</b>
<b>7. Tests biologiques <i>in vitro</i></b>	<b>55</b>
<b>8. Cryopréservation des cellules vésiculeuses</b>	<b>58</b>
<b>9. Expression quantitative des SGLT</b>	<b>59</b>
<b>10. Analyse des résultats</b>	<b>62</b>



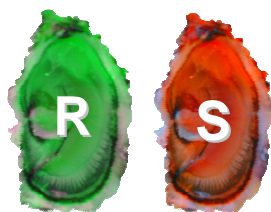
## 1. Animaux

✂ Les huîtres creuses, de calibre 3 (dont la masse totale est comprise entre 65 et 85 g), utilisées pour l'étude du métabolisme glucidique et de la cryopréservation de cellules de réserve de mollusque (chapitres 1 et 3), proviennent de l'entreprise ostréicole « La Tatihou GAEC » (Saint-Vaast-la-Hougue, 50) (famille LEFEVRE).

✂ Pour les suivis saisonniers du métabolisme énergétique et l'effet des conditions trophiques sur la gestion des réserves du glycogène, les huîtres proviennent de 3 lots distincts :



Un premier lot appelé T (représenté en bleu) correspondant à un lot témoin. Ces animaux sont issus de captages naturels et élevés à Meuvaines (14) sur la base conchyicole de M. POURTIER (Grandcamp Maisy, 50). Ces huîtres ont été placées sur les parcs ostréicoles en Baie des Veys (Géfosse) à partir du mois de février 2005.



Deux autres lots sélectionnés dans le cadre du programme MOREST (MORTalités ESTivales) ont été utilisés. Il s'agit respectivement des animaux R (résistants aux mortalités estivales, représentés en vert) et S (sensibles, représentés en rouge). Ces animaux sont issus de naissain d'écloserie et mis sur le site de la Baie des Veys (Géfosse) à l'âge de 18 mois en mars 2004.

Les huîtres R et S sont issues d'une sélection génétique, basée sur leur résistance aux mortalités estivales. Une première génération d'huîtres creuses (G1) a été réalisée en 2001 à partir d'un plan de croisement hiérarchisé par les mâles. Ces familles G1 ont été sélectionnées sur la base de leurs performances de survie en période estivale sur estran. Une seconde génération (G2) a ensuite été obtenue en 2002 par sélection divergente visant à améliorer ou diminuer la survie du naissain en période estivale. Des pools de familles sélectionnées sur la base de leur résistance ou de leur sensibilité ont alors été constitués.

Dès leur réception, les huîtres sont placées en chambre réfrigérée, et sont disséquées dans les 24 heures.



## 2. Expérimentation *in vivo*

### 2.1. Suivi saisonnier sur estran

Un suivi saisonnier a été mis en place pour les lots R, S et T aux différentes périodes clés du métabolisme énergétique ou de la gamétogenèse : en automne 2004, période de réinitiation de la gamétogenèse et de restructuration du tissu de réserve ; au printemps 2005, période de mobilisation des réserves au profit du développement des tubules gonadiques ; en été 2005, alors que les animaux sont à maturité sexuelle et que les réserves sont épuisées (Berthelin *et al.*, 2000b).

Les huîtres ont été placées sur le site de la Baie des Veys au niveau de la concession « MOREST » (**Figure 25**).



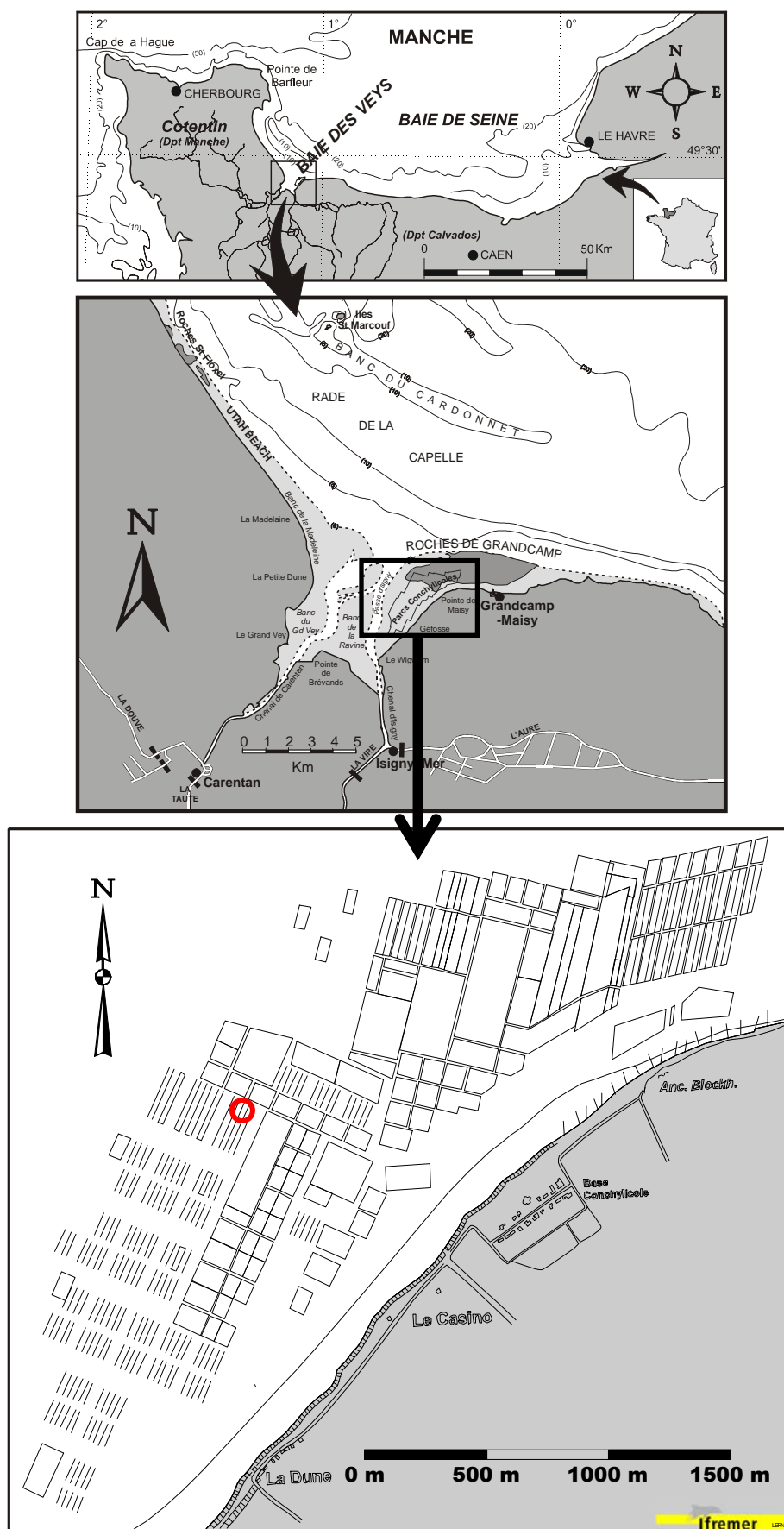


Figure 25. Localisation des huîtres de l'expérimentation sur la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy en Baie des Veys (50).



Les animaux ont été prélevés au début de chaque période de suivi ( $T_0$ ) puis après un mois ( $T_1$ ) en fin de l'expérimentation. Le suivi des paramètres de température, de phytoplancton et de survie des huîtres sur le site a été effectué par l'équipe du Laboratoire Environnement Ressources de Normandie (L.E.R.N) de l'IFREMER Port-en-Bessin (**Annexe III**).

## 2.2. Conditionnement artificiel

Le **Système Contrôlé d'Ambiance Marine** (structure d'élevage en milieu contrôlé, (**Figure 26**) du Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral (Blainville-sur-Mer, 50) permet de maintenir des animaux dans des conditions d'alimentation, de température et de salinité parfaitement contrôlées.

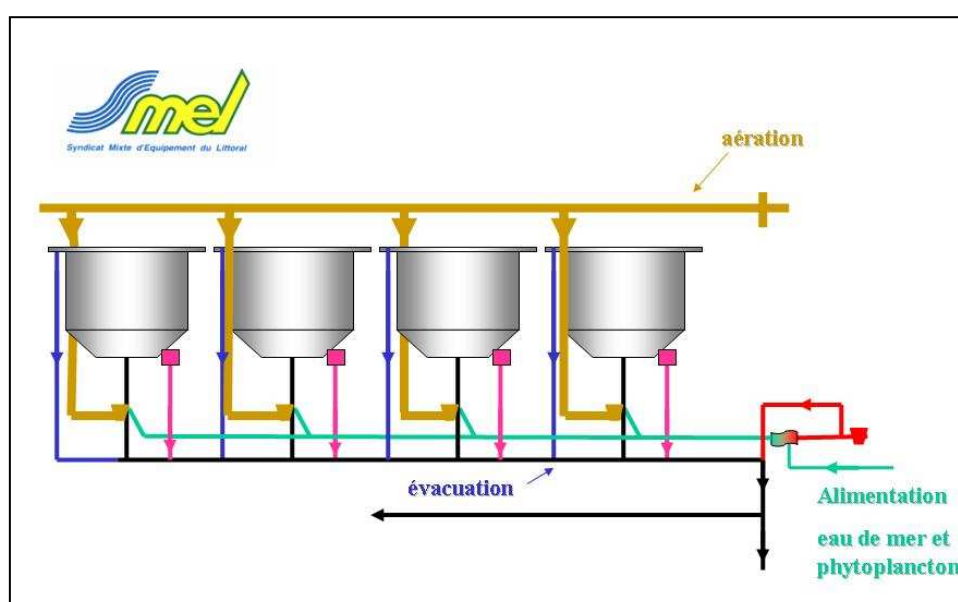


Figure 26. Système Contrôlé d'Ambiance Marine du Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral de Blainville-sur-Mer (50).

Les animaux ont été placés en conditions de forte (A+) ou de faible alimentation (A-) pendant une durée d'un mois aux trois périodes de suivi sur le terrain. La disponibilité en phytoplancton (*Skeletonema costatum*) dans les conditions de forte alimentation (A+) a été maintenue à un niveau hyper-eutrophe (environ 120 000 cellules/mL) pendant toute la durée des conditionnements. Les huîtres, placées dans des conditions de faible alimentation (A-), ont été installées dans des cuves dont l'eau de mer est continuellement filtrée afin d'en éliminer toutes particules nutritives (1  $\mu$ m de maille). La température et la salinité appliquées dans les bacs de conditionnement ont été ajustées à la température et à la salinité mesurée sur l'estran à la même période. Ces conditionnements ont été appliqués aux huîtres R et S du programme MOREST, ainsi qu'aux animaux témoins. Le déroulement de l'expérimentation pour chacun des trois lots est résumé dans la **Figure 27**.



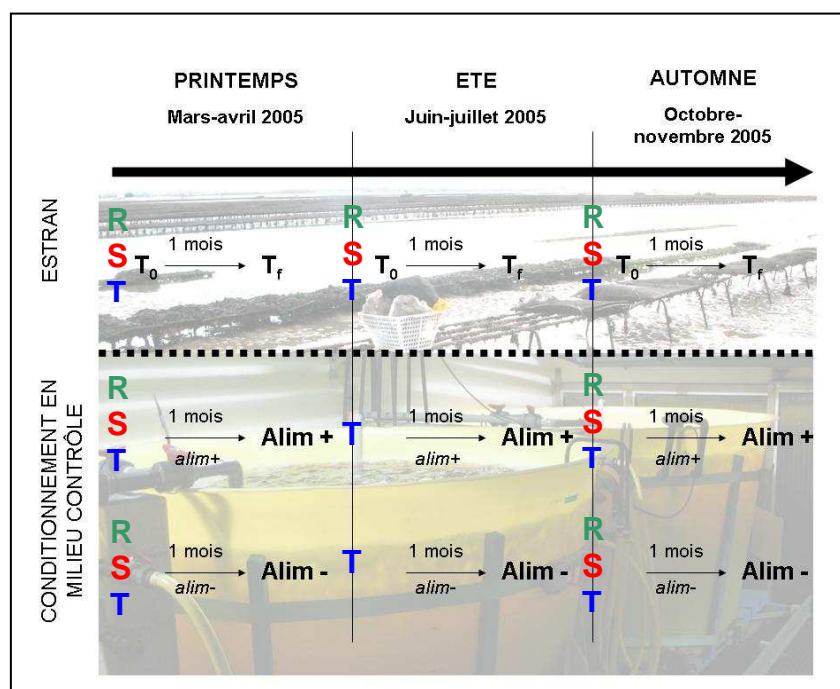


Figure 27. Déroulement de l'expérimentation lors des trois saisons suivies.

### 3. Mesures biométriques

Les mesures biométriques sont effectuées sur 10 animaux pour chaque lot.

Les coquilles sont débarrassées de leurs épibiontes par grattage puis elles sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse, pesées (poids total), puis ouvertes par la charnière. La chair est enlevée dans son intégralité de la coquille et égouttée pendant 15 minutes sur du papier absorbant disposé sur un plan incliné puis pesée (poids de chair). La coquille est séchée pendant 48h à l'étuve à 60°C, puis pesée (poids sec de la coquille). La masse viscérale est disséquée et pesée (poids de la masse viscérale). La dissection de la masse viscérale consiste à ôter les palpes, les branchies, le muscle et les parties libres du manteau afin de n'obtenir au final que l'aire digestive entourée de l'aire gonadique et du manteau.

### 4. Histologie

#### 4.1. Réalisation des coupes transversales d'huîtres

Pour le suivi histologique, une section transversale de 5mm d'épaisseur est réalisée dans la masse viscérale (10 animaux par lot), à la base des palpes labiaux (**Figure 28**).



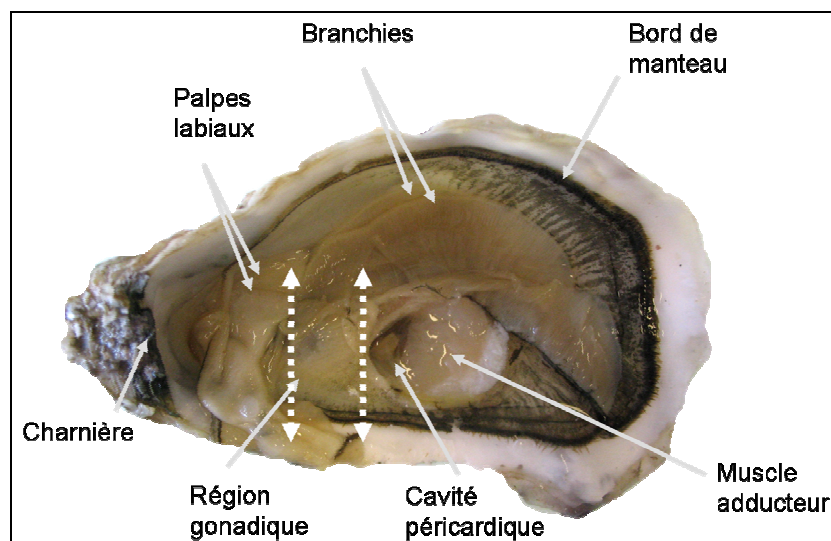


Figure 28. Anatomie de l'huître creuse (valve gauche creuse).  
Les doubles flèches indiquent le passage de la coupe transversale.

#### 4.2. Fixation, inclusion et coupe

La section de la masse viscérale prélevée est ensuite fixée dans du liquide de Davidson (**Annexe Ia**) pendant 48 heures à 4°C, puis déshydratée dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante (70°, 95° puis 100°) (48 heures chacun) avant d'être placée dans du butanol. La section est alors imprégnée puis incluse dans de la paraffine. Des coupes de 3µm sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome et déposées sur des lames de verre.

#### 4.3. Coloration : Trichrome de Prenant Gabe (Gabe, 1968)

La coloration des coupes histologiques est effectuée selon la technique du Trichrome de Prenant Gabe (Gabe, 1968) dont les solutions de coloration sont décrites en **Annexe Ib**.

Les lames sont dans un premier temps déparaffinées dans deux bains de Roti-histol® de 5 minutes chacun, suivis de deux bains de 5 minutes dans l'éthanol absolu afin d'éliminer le Roti-histol®. Dans un second temps, les lames sont progressivement réhydratées dans un bain d'éthanol à 95° de 5 minutes puis un bain à 70° de 10 minutes. Après un rinçage dans de l'eau distillée, les lames sont placées dans la solution d'hématoxyline de Groat pendant 1 minute afin de colorer les noyaux, rincées 2 fois dans l'eau distillée, puis incubées 8 minutes dans un bain d'éosine Y à 1 % et 1 minute d'un bain à l'acide phosphomolybdique à 1 %. Les coupes histologiques sont ensuite plongées dans du Vert lumière 0,2 % pendant 20 secondes.

Les préparations sont alors déshydratées dans deux bains successifs d'1 minute d'éthanol absolu, puis passées dans un bain de Roti-histol® de 5 minutes avant d'être montées d'une résine de type Depex® puis finalement séchées pendant 48 heures à 55°C.



Les coupes histologiques sont ensuite observées au microscope photonique afin de déterminer le stade de gamétogenèse et de développement du tissu de réserve, le sexe des huîtres lorsque cela est possible, et de noter d'éventuelles informations complémentaires comme la présence de gamètes résiduels, de macrophages ou d'hémocytes invasifs.

#### 4.4. Analyse d'images

L'acquisition d'images des coupes histologiques se fait à l'aide d'un scanner (Epson® 2000). L'analyse quantitative des lames scannées est réalisée en utilisant le logiciel Vision Assistant® d'après le protocole mis au point par K. Costil (Royer *et al.*, 2008).

L'analyse informatique se déroule en trois étapes (**Figure 29**) :

- ❖ L'établissement d'un masque sur l'image scannée pour isoler l'aire de référence,
- ❖ L'illumination sélective dans les zones non masquées,
- ❖ Le transfert sur Excel® des données, qui permet d'obtenir une valeur en pixels de la surface illuminée.

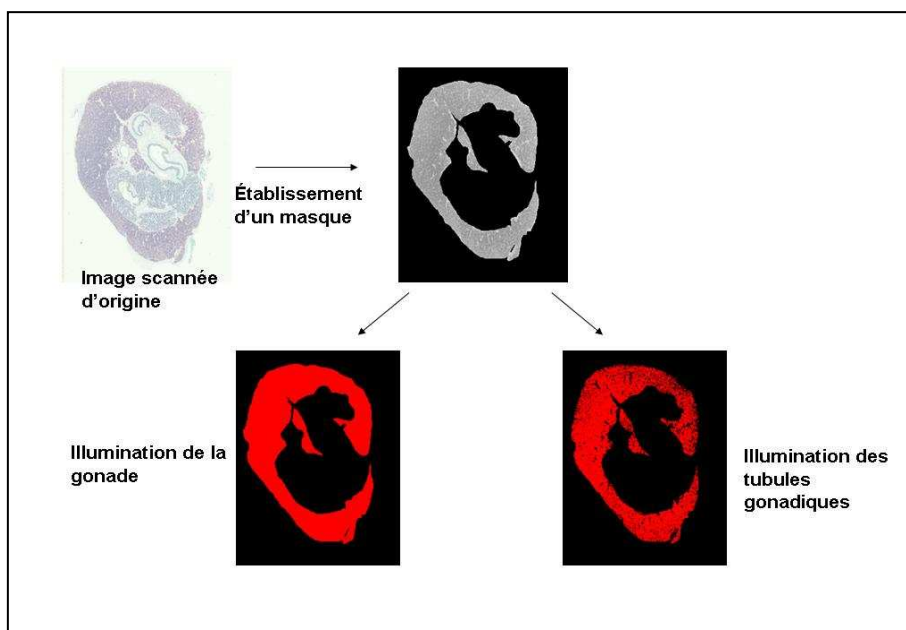


Figure 29. Analyse quantitative d'une coupe histologique (Vision Assistant®).

Ainsi, sur chaque coupe sont mesurés :

- La surface totale de la coupe (hors cavités) : SC
- La surface de l'aire gonadique : SG
- La surface des tubules gonadiques dans l'aire gonadique : ST



Ces mesures permettent ensuite de calculer :

- le pourcentage d'aire gonadique par rapport à la surface totale de la coupe (hors cavités) :  $\% AG = (SG/SC) \times 100$
- le pourcentage de tubules gonadique dans l'aire gonade-manteau :  $\% TG = (ST/SG) \times 100$
- le pourcentage de TR dans l'aire gonade-manteau par déduction du pourcentage précédant :  $\% TR = 100 - \% TG$

## 5. Dosages biochimiques

### ✂ Dosage des protéines

Le taux de protéines est estimé selon la méthode colorimétrique de Bradford (1976) en utilisant l'albumine sérique bovine comme référence (**Annexe Ic**) et basé sur la liaison des protéines avec le bleu de Coomassie.

### ✂ Dosage de la glycémie

Le glucose circulant dans l'hémolymphe est mesuré par la méthode de dosage colorimétrique du glucose décrite par Trinder (1969) à l'aide du kit de dosage Glucose assay kit (GO, Sigma®). Le protocole du dosage du glucose est présenté en **Annexe Id**.

## 6. Préparation de la suspension cellulaire

### ✂ Conditions de stérilité

Le matériel de dissection ainsi que la verrerie sont autoclavés ; les différents réactifs sont stérilisés par filtration sur filtre Millipore 0,2 µm sous hotte stérile.

### ✂ Dissection et dissociation

Les huîtres sont placées sur un lit de glace dès leur ouverture. Les deux paires de palpes labiaux sont prélevées et rincées dans de l'eau de mer stérile puis dans 10 mL de milieu de culture L-15 Medium Leibovitz (Sigma®, **Annexe Ie**) ; à 1100 mOsm/L (Lenoir, 1989).

Les palpes sont ensuite transférés dans 50 mL de milieu de culture L-15 additionné d'antibiotiques (**Annexe If**) et contenant une enzyme protéolytique, la collagénase (0,1 % p/v) : ils sont finement émincés à l'aide de ciseaux fins ; puis la dissociation enzymatique se poursuit dans le milieu sous agitation douce pendant deux fois 30 minutes. Ces étapes sont effectuées sur la glace.



### ✖ Isolement des cellules vésiculeuses

Après dissociation, les cellules sont filtrées sur toile à bluter (diamètre des mailles 100  $\mu\text{m}$ ) puis centrifugées (80 g, 30 min, 15°C). Le culot contenant les cellules isolées est repris dans 5 mL de milieu et la concentration de la suspension cellulaire est estimée par comptage à l'aide d'une cellule de numération de Thoma. La concentration cellulaire est finalement ajustée en fonction des expérimentations réalisées :  $50 \cdot 10^6$  cellules/mL pour les tests de cryoconservation et  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL pour les tests biologiques *in vitro*. A partir de cette étape, les cellules sont maintenues à 15°C.

## 7. Tests biologiques *in vitro*

### ✖ Estimation de la viabilité cellulaire

La survie cellulaire est appréciée par le test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) décrit par Mosmann (1983), adapté aux cellules d'organismes marins (Domart-Coulon *et al.*, 1994) et mis au point sur les cellules de réserve chez *Crassostrea gigas* par Berthelin et ses collaborateurs (2000a). Ce test est basé sur une réaction enzymatique de réduction d'un sel de Tétrazolium jaune en Formazan bleu par les enzymes mitochondriales cellulaires.

Les suspensions cellulaires sont incubées 24h en présence de MTT (Sigma®), puis les cristaux de formazan sont dissous après l'ajout d'HCl dilué à 0,04N dans l'Isopropanol (Annexe Ig).

Après centrifugation des échantillons et récupération du surnageant, la différence d'absorbance entre 570 et 630 nm, est mesurée au spectrophotomètre. Cette différence est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes mises en contact avec le MTT.

### ✖ Mesure *in vitro* du transport du glucose dans les cellules vésiculeuses

L'entrée du glucose dans des cellules à glycogène a déjà été étudiée chez la moule (*Mytilus edulis*) par Lenoir en 1989. Le protocole a été adapté aux cellules vésiculeuses de l'huître creuse.

Les cellules vésiculeuses dissociées sont incubées dans des tubes Eppendorf® de 1,5 mL. Chaque condition d'incubation fait l'objet de six réplicats.

Chaque microtube contient :

- ❖ 500  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire (concentration définie, la concentration standard est de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL)
- ❖ 50  $\mu\text{L}$  de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  D-glucose (0,5  $\mu\text{Ci}$ ) (MP-Biomedicals<sup>Inc.</sup>)



- ❖ 50  $\mu$ L de D-glucose (concentration définie, la concentration standard est de 0,5 mM)
- ❖ 50  $\mu$ L d'effecteur (concentration définie) ou milieu L-15

Les deux solutions de glucose sont préparées dans du milieu L-15. Les tubes sont incubés à 15°C. L'incubation est stoppée par addition de 300  $\mu$ L d'une solution de glucose à 20 mM, concentration saturante qui bloque l'entrée du [U- $^{14}$ C] D-glucose dans les cellules. Après centrifugation (80 g, 10 min, 15°C), le culot de cellules vésiculeuses est rincé trois fois par centrifugation dans 1 mL de milieu L-15 contenant 20 mM de glucose de manière à éliminer le glucose radioactif extracellulaire.

Le culot cellulaire obtenu à l'issue du dernier lavage est alors repris dans 200  $\mu$ L d'acide perchlorique 15 % qui provoque l'éclatement des cellules et la libération du contenu cellulaire dans le surnageant. La mesure de la radioactivité se fait sur la totalité du lysat cellulaire dans 4 mL de liquide de scintillation (Wallac®). Le comptage s'effectue à l'aide d'un compteur à scintillation avec un standard interne permettant une correction de quenching (Packard®) (**Figure 30**).

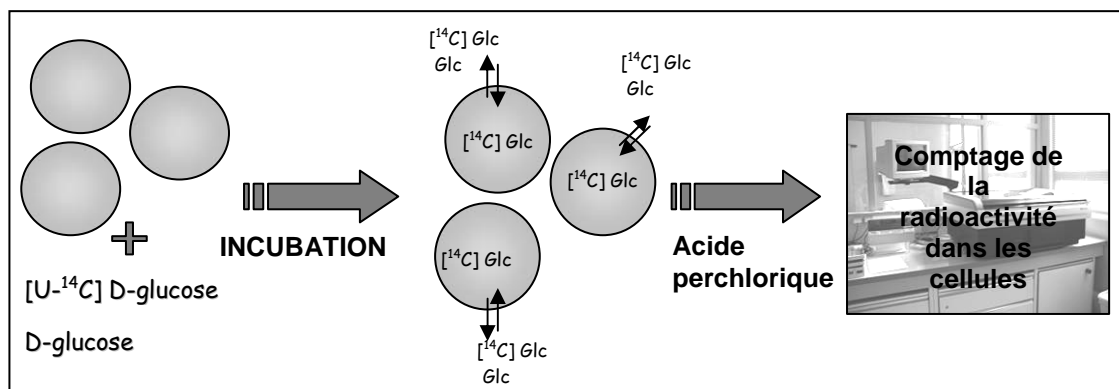


Figure 30. Etude *in vitro* de l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses.

Une série de tubes témoins ( $T_0$ ) préparée en bloquant l'incubation immédiatement après l'ajout du glucose radioactif permet d'évaluer le bruit de fond global de l'expérience. Cette quantité de radioactivité mesurée n'est pas due à une activité métabolique des cellules mais correspond aux molécules radioactives fixées à la membrane cellulaire entraînée avec elle lors de leur précipitation. Cette valeur  $T_0$  est retranchée à chaque valeur de comptage mesuré pour les lots cellulaires qui ont incubé en présence de glucose.

Un témoin sans cellule ( $T_{0C}$ ) permet d'évaluer la radioactivité résiduelle retenue par le matériel utilisé et les constituants chimiques de l'incubation ; un second témoin, sans radioactivité ( $T_{0R}$ ), indique le bruit de fond du compteur à scintillation ; enfin, un témoin de



radioactivité (TT), sans cellules et sans rinçage, permet de vérifier la quantité totale de radioactivité utilisée au départ.

**✖ Mesure *in vitro* de la capacité d'incorporation du glucose dans le glycogène dans les cellules vésiculeuses**

Les cellules vésiculeuses dissociées sont incubées dans des tubes à hémolyse stériles de 5 mL. Chaque condition d'incubation fait l'objet de six réplicats.

Chaque tube contient :

- ❖ 500 µL de suspension cellulaire (2,5 millions de cellules)
- ❖ 50 µL de [U-<sup>14</sup>C] D-glucose (0,5 µCi) (MP-Biomedicals <sup>Inc.</sup>)
- ❖ 50 µL de D-glucose (0,5 mM)

Les deux solutions de glucose sont préparées dans du milieu L-15. Les cellules sont incubées à 15°C pendant 20 heures.

Les cellules sont ensuite transférées dans des microtubes Eppendorf® de 1,5 mL, centrifugées (1000 g, 10 min, 15°C) pour les faire éclater et ainsi libérer le glycogène intracellulaire. 300 µL du surnageant de chaque tube sont transférés dans un tube à hémolyse contenant 5 mg de glycogène froid (100 µL), afin d'entraîner le glycogène néosynthétisé par les cellules. 4 mL d'éthanol absolu froid sont additionnés dans chaque tube de manière à précipiter le glycogène. Après 20 heures d'incubation à l'abri de la lumière et à 4°C, les tubes sont centrifugés (2500 g, 10 min, 4°C). Le culot est morcelé dans 3 mL d'éthanol glucosé au vortex puis centrifugé (2500 g, 10 min, 4°C). Ce rinçage est réalisé trois fois, le culot est finalement égoutté puis séché à température ambiante avant d'être solubilisé dans 500 µL d'eau bidistillée.

La mesure de la radioactivité s'effectue sur 200 µL de suspension diluée dans 4 mL de liquide de scintillation (Wallac®). La radioactivité émise par les échantillons est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation avec un standard interne permettant une correction de quenching (Packard®).

Une série de témoins ( $T_0$ ) est préparée en bloquant l'incubation immédiatement après l'ajout du glucose radioactif afin d'évaluer le bruit de fond global de l'expérience. D'autres contrôles sont réalisés en parallèle : un témoin sans cellule ( $T_{0C}$ ), un témoin, sans radioactivité ( $T_{0R}$ ), et un témoin de dose de radioactivité (TT).



## 8. Cryopréservation des cellules vésiculeuses

### ✕ Ajout des cryoprotecteurs

Quatre solutions cryoprotectrices ont été préparées en diluant les cryoprotecteurs dans l'Alsever (**Annexe Ih**) : DMSO (D), éthylène glycol (EG), glycérol (G) et un mélange nommé DGE composé de DMSO / glycérol / éthylène glycol (**Annexe li**).

Les cellules vésiculeuses dissociées selon le protocole décrit précédemment sont réparties dans des ampoules de congélation de 1,5 mL (cryotubes) à raison de 600 µL de suspension cellulaire à  $50.10^6/\text{mL}$  par tube. Les agents cryoprotecteurs sont progressivement ajoutés aux suspensions cellulaires en respectant les étapes répertoriées dans le **tableau 3** afin d'éviter aux cellules de subir un choc osmotique violent. Ces étapes sont réalisées à température ambiante pour faciliter une pénétration du cryoprotecteur dans les cellules (Poncet *et al.*, 2002).

Tableau 3. Augmentation de la concentration de la solution cryoprotectrice par doses successives.

		Volume (µL)	Temps d'incubation	Concentration du cryoprotectant
Suspension cellulaire		600		
Cryoprotecteur	Etape 1	60	10 min	<b>10 %</b>
	Etape 2	96	5 min	<b>20 %</b>
	Etape 3	150	5 min	<b>33 %</b>
	Etape 4	300	10 min	<b>50 %</b>
Volume final		1206		

### ✕ Décongélation et dilution progressive

Les cryotubes sont extraits de l'azote liquide. Une décongélation rapide s'effectue dans un bain-marie à 37°C, le contenu du cryotube est immédiatement transféré dans un tube de 15 mL stérile, et progressivement dilué avec de l'Alsever comme indiqué dans le **tableau 4**.

Les tubes subissent une centrifugation (80 g, 30 min, 15°C) et les cellules sont finalement reprises dans 6 mL de milieu L-15.



Tableau 4. Etapes de dilution progressive de la suspension cellulaire avec l'Alsever.

		Volume (µL)	Temps d'incubation	Concentration du cryoprotectant
Suspension cellulaire		1100		<b>50 %</b>
Alsever	Etape 1	220	3 min	<b>41 %</b>
	Etape 2	440	3 min	<b>31 %</b>
	Etape 3	1100	5 min	<b>19 %</b>
	Etape 4	7700	10 min	<b>5 %</b>
Volume final		10560		

## 9. Expression quantitative des SGLT

### ✗ Prélèvement des échantillons biologiques

Les palpes labiaux et l'aire gonade-manteau sont disséqués sur des animaux fraîchement ouverts, puis immédiatement plongés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux.

### ✗ Extraction et quantification des ARN totaux

Le matériel est préalablement traité au DEPC 0,02 % puis autoclavé afin d'éliminer le risque de contamination par des RNAses. La paillasse et la centrifugeuse sont soigneusement nettoyées avant chaque manipulation pour éviter toute contamination des échantillons.

L'extraction est réalisée sur des fragments de tissus congelés à -80°C puis finement broyés dans l'azote liquide (palpes labiaux et aire gonade-manteau, 100 mg par échantillon). Les ARN totaux sont extraits dans 1 mL de réactif Extract-All® (EUROBIO) (mélange de thiocyanate de guanidine et de phénol) et 0,2 mL de chloroforme. Après centrifugation à 10000 g pendant 15 minutes à 4°C, la phase aqueuse est prélevée et les acides ribonucléiques sont précipités par addition 0,5 mL d'isopropanol froid. Après centrifugation (10000 g, 10 min, 4°C), le culot est rincé à l'éthanol 75°, séché puis repris dans 200 µL d'eau traitée au DEPC 0,02 %.

La qualité des ARN totaux est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans un tampon TAE (40 mM Tris, 20 mM acide acétique, 2 mM EDTA, ajusté à pH 8,5) contenant 100 ng/mL de bromure d'éthidium. Les ARN totaux sont quantifiés par une mesure spectrophotométrique à 260 nm (une unité d'absorption optique ( $A_{260nm}$ ) correspond à une



concentration en ARN de 40 µg/mL). La pureté des ARN extraits est évaluée par le ratio des absorbances à 260 nm et 280 nm. Un rapport compris 1,8 et 2 atteste d'un degré de pureté optimal des ARN.

Les ARN totaux sont traités à la DNase I (Déoxyribonucléase I, Sigma®) qui digère l'ADN génomique contaminant : le mélange réactionnel (10 µL au total) contient 1 µL de DNase I (1U/µL), 1 µL de tampon de réaction 10x (10 mM Tris-HCl ; pH 7,5 ; 10 mM CaCl<sub>2</sub> et 10 mM MgCl<sub>2</sub>) et 1 µg d'ARN totaux. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, la digestion est stoppée par addition de 1 µL de solution Stop (50 mM EDTA), les tubes sont portés à 70°C pendant 10 minutes pour dénaturer les ARN, puis les ARN totaux sont immédiatement placés dans la glace.

### ✂ Transcription inverse

Les ADNc simple brin sont synthétisés à partir d'un microgramme d'ARN totaux préalablement dénaturés à 70°C pendant 5 minutes à partir des amorces Oligo-dT (500 ng). La rétrotranscription est effectuée en présence de 20 U RNasin (Promega®), de dNTP (5 mM de chaque) et 200 U de transcriptase inverse MuMLV-RT (Murine Moloney Leukemia Virus – Reverse Transcriptase ; Promega®) dans le tampon approprié pendant 1 heure à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par incubation à 70°C pendant 15 minutes.

### ✂ PCR quantitative en temps réel (real time qPCR)

#### ○ Principe :

Le principe de PCR quantitative est schématisé en **Annexe Ij**.

La technique de PCR quantitative en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un traceur fluorescent : l'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. La fluorescence émise lors de chaque cycle permet de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle d'amplification où la première augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice cible.

Pour la détection des amplicons, la sonde fluorescente utilisée est le SYBR Green I (SYBR Green Supermix Biorad®). Cette sonde se fixe à l'ADN double brin permettant alors de visualiser l'augmentation de la fluorescence lors de la phase d'élongation (Morrison *et al.*, 1998). L'émission de la fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un microspectrofluorimètre couplé au thermocycler qui permet de détecter l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000).

La normalisation des données est une étape importante et sensible de la quantification en PCR temps réel (Bustin, 2002). En effet, la fiabilité de chaque mesure peut être améliorée en introduisant un étalon interne constant. Ce gène "de ménage" doit



permettre de compenser les biais dus à une variabilité des étapes d'extraction, traitement DNase, transcription inverse et PCR (Pfaffl & Hageleit, 2001). La quantification d'un ARNm endogène ubiquitaire ( $\beta$ -actine, gène de référence : AF026063 ; Cadoret *et al.*, 1999) est donc réalisé en parallèle de l'amplification du gène cible (SGLT, gène cible : AAT44356 ; Huvet *et al.*, 2004).

Tableau 5. Séquence et numéro d'accension GenBank des amorces utilisées en PCR temps réel pour les tissus d'huître *Crassostrea gigas*.

	Gène	Numéro d'accension	Amorce sens	Amorce antisens
<b>Gène de référence</b>	$\beta$ -actine	AF026063	5'-GCCCTGGACTTCGAACAA-3'	5'-CGTTGCCAATGGTGATGA-3'
<b>Gène cible</b>	SGLT	AAT44356	5'-GAGGTGATGGCCTGGATG-3'	5'-CGGAAGGCTGTGTGTCCT-3'

L'expression du gène d'intérêt est mesurée selon une méthode de quantification relative (Pfaffl, 2001) qui consiste à exprimer le niveau d'ARNm d'un gène cible en relatif par rapport à un ARN contrôle. Le niveau d'ARN du gène référent est mesuré parallèlement à celui du gène cible pour chaque expérimentation. Le cycle seuil (Ct) est le nombre de cycles requis pour atteindre un signal d'émission de fluorescence significativement plus élevée que le bruit de fond (Gibson *et al.*, 1996).

Le calcul des quantités relatives (QR) entre le transcrit du gène cible et le transcrit du gène de référence basé sur la comparaison des cycles seuils (Pfaffl, 2001 ; Pfaffl *et al.*, 2002), est donné par la formule du  $\Delta Ct$  :

$$QR = 2^{(Ct \text{ gène référent} - Ct \text{ gène cible})}$$

○ Protocole :

La PCR quantitative en temps réel est effectuée dans des plaques de 96 puits à l'aide d'un appareillage Icyler (Biorad®).

Lors des réactions de qPCR, les ADNc sont déposés en triplicat pour le gène cible (SGLT : AAT44356 ; Huvet *et al.*, 2004) ainsi que le gène de référence ( $\beta$ -actine : AF026063 ; Cadoret *et al.*, 1999). Différents témoins sont effectués sur la même plaque : les échantillons traités à la DNase et non rétro-transcrits pour détecter une éventuelle contamination par l'ADN génomique, un témoin négatif (eau) pour chaque couple d'amorce pour vérifier une éventuelle contamination des réactifs ou la formation de dimères



d'amorces. L'efficacité entre les plaques de PCR est validée par la mesure du Ct d'un même échantillon d'ADNc contrôle déposé sur chaque plaque.

Chaque puits contient un volume total de 15  $\mu$ L, 5  $\mu$ L d'une dilution au 1/5<sup>ème</sup> d'ADNc rétrotranscrits à partir de 1  $\mu$ g d'ARN totaux traités à la DNase, 0,3 mM de chaque amorce (sens et antisens), 10 nM de fluorescéine (utilisé pour corriger la variabilité de fluorescence due aux erreurs de pipetage en attribuant un coefficient à chaque puits : well factor) et le mix de PCR Qiagen 1x (Quantitect SYBR Green PCR kit) contenant l'ADN polymérase, les dNTPs, un tampon et le SYBR Green I.

Les amorces retenues (**Tableau 5**) pour amplifier une partie des messagers du SGLT et d'actine ont été dessinés à partir des données de séquences (Huvet *et al.*, 2004) selon les recommandations générales fournies par Biorad® de façon à limiter la formation de dimères d'amorces pendant la réaction de polymérisation en chaîne (amplicon court 75 à 150 pb, 30 à 70 % d'oligonucléotides Guanine-Cytosine, température de fusion supérieure à 60°C, taille des amorces entre 18 et 20 pb) en évitant les zones de structures secondaires ainsi que les successions d'un même nucléotide (3 au plus).

Le protocole d'amplification comprend une phase d'activation de l'ADN polymérase à 95°C pendant 15 minutes, 45 cycles avec une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C puis les phases d'hybridation des amorces et d'élongation regroupées en une seule étape à 60°C pendant une minute. Enfin une étape de décrémentation de température par pas de 0,5°C toutes les 10 secondes (de 95°C à 55°C) permet l'établissement d'une courbe de fusion des produits obtenus après amplification afin de vérifier la spécificité des amplicons en la comparant avec la température de fusion expérimentale.

## 10. Analyse des résultats

### ✂ Traitement statistique des résultats

Les résultats sont exprimés par la moyenne des séries expérimentales  $\pm$  S.E.M pour un nombre d'échantillon = n. Pour la comparaison entre deux variables, la significativité statistique est déterminée par le test t de student, avec un seuil de confiance < 0,05 (\*), 0,01 (\*\*) ou 0,001 (\*\*\*).



**CHAPITRE I**  
**CARACTERISATION DU TRANSPORT DU**  
**GLUCOSE : IMPLICATION DE TRANSPORTEURS**  
**MEMBRANAIRES**



**CHAPITRE I. CARACTERISATION DU TRANSPORT DU GLUCOSE : IMPLICATION DE TRANSPORTEURS MEMBRANAIRES** **63**

---

<b>INTRODUCTION</b>	<b>65</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>71</b>
1. Glycémie dans l'hémolymphe	71
2. Préparation des suspensions de cellules vésiculeuses dissociées	71
3. Transport du glucose dans les cellules vésiculeuses : approche <i>in vitro</i>	73
3.1. Choix du traceur radioactif	73
3.2. Entrée du D-glucose en fonction de la concentration cellulaire	74
3.3. Cinétique d'entrée du glucose	74
3.4. Effet de la concentration du glucose sur l'entrée du glucose	76
3.5. Mise en évidence de différents systèmes de transport du glucose	79
4. Expression de SGLT	87
4.1. Séquence de SGLT	87
4.2. Mesure de l'expression de SGLT dans différents tissus et organe de l'huître	89
<b>PRINCIPAUX RESULTATS</b>	<b>91</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>92</b>



## I. CARACTERISATION DU TRANSPORT DU GLUCOSE : IMPLICATION DE TRANSPORTEURS MEMBRANAIRES

### INTRODUCTION

L'entrée du glucose à travers la membrane cellulaire représente un des plus importants systèmes de transport de nutriments dans les cellules puisque l'énergie fournie par le métabolisme du glucose joue un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie et donc, de la survie cellulaire. De nombreuses études ont cherché à déterminer les voies d'entrée de cette molécule, ainsi que celles d'autres sucres, dans les cellules.

Depuis l'identification du cotransport de  $\text{Na}^+$  et de glucose en 1965 par Crane, différentes techniques ont été utilisées dans le but d'étudier le mécanisme qui permet de coupler le transport de deux solutés de façon efficace. Le cotransporteur  $\text{Na}^+$ /glucose SGLT1 a d'abord été étudié dans des tissus intacts à partir des années 1960, puis les vésicules de membrane en bordure en brosse ont été intensivement utilisées dans les années 1970 et 1980. Cloné en 1987 par Hediger et ses collaborateurs, il est exprimé dans différents systèmes d'expression dont les ovocytes de *Xenopus laevis*. En général, les cotransports qui ont été étudiés présentent un certain nombre de caractéristiques communes reliées aux mécanismes et aux modèles cinétiques qui les représentent. Les cotransporteurs ont une stoechiométrie fixe, le transport s'effectue toujours dans le sens prévu par la somme des gradients électrochimiques de chaque espèce transportée, les affinités pour un substrat peuvent dépendre de la présence des autres substrats et être différentes de chaque côté de la membrane.

Le transporteur de glucose GluT1 est quant à lui la première isoforme des transporteurs facilités de glucose à être caractérisé dans les cellules de mammifères (Silverman, 1991). Grâce au criblage de banques d'ADNc de foie, de muscle et d'autres tissus chez l'Homme avec la sonde GluT1 d'autres membres de cette famille ont été désignés (Joost & Thorens, 2001). Les transporteurs GLuTs identifiés chez les vertébrés présentent des homologues chez des invertébrés comme *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* (Escher & Rasmuson-Lestander, 1999) possédant une bonne conservation de séquence même entre des espèces phylogénétiquement éloignées, ce qui semble indiquer une origine évolutive précoce et une importance fonctionnelle de ces transporteurs.



Le premier objectif de ce travail de thèse est d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires du transport du glucose dans les cellules vésiculeuses chez *Crassostrea gigas* afin de mieux comprendre la régulation du métabolisme de la cellule de réserve, unité de base de la mise en réserve énergétique et de mobilisation du glycogène chez l'huître creuse. Les caractéristiques anatomiques de l'huître (présence d'une coquille hermétique et d'un système lacunaire de circulation) rendent difficiles les injections et les expérimentations *in vivo*. La réalisation d'expérimentations *in vitro* sur des cellules isolées semblent donc une alternative chez cet animal.

L'une des techniques, couramment présentée dans la littérature pour caractériser les systèmes de transport du glucose, consiste à réaliser des cinétiques d'entrée de cette molécule ou de l'un de ses analogues non métabolisables dans des préparations d'organes, de tissus, de vésicules membranaires artificielles ou de suspensions cellulaires afin de déterminer si le glucose pénètre dans la cellule par un autre mécanisme que la diffusion simple (**Tableau 6**).

Tableau 6. Etudes des mécanismes de transport du glucose chez des organismes marins.

	Modèle	Glycémie (mM)	Tissu ou type cellulaire	Traceur radioactif	Incubation	Vmax	Km ou Kmapp	Inhibition	Références
Crustacés	<i>Carcinus maenas</i>	0,1-0,3	Branchies	[ <sup>3</sup> H] 3-O-Me-Glucose	2 min	0,47 μM/min x g de poids sec	5,5 mM	80 % avec phlorétine.	Welcomme & Devos, 1993 Lüschen <i>et al.</i> , 1993
	<i>Peneus japonicus</i>		Cellules du bord de manteau et de l'hépatopancréas	[ <sup>3</sup> H] D-Glucose	15 sec	5,4 ± 0,76 nmol/min x mg protéines	0,15 ± 0,04 mM	80 % avec phlorizine à 5 mM.	Verri <i>et al.</i> , 2001 review
	<i>Homarus americanus</i>	1,1-1,4	bord de manteau et hépatopancréas	[ <sup>3</sup> H] D-Glucose			0,62 mM	Phlorizine.	Verri <i>et al.</i> , 2001 review Ahearn <i>et al.</i> , 1985
			Cellules F isolées Elutriation E--R ou F--B Cellules R isolées Cellules B isolées Cellules E isolées	[ <sup>3</sup> H] D-Glucose	1 min 1 min 1 min 2 min 3 min	3,16 ± 0,93 nmol/min x mg protéines	2,36 ± 1,51 mM		Verri <i>et al.</i> , 2001 review Ahearn <i>et al.</i> , 1985
			ARNm injecté dans des ovocytes de Xénopes	[ <sup>3</sup> H] D-Glucose	30 min	4,62 ± 0,12 pmol/ovocyt e x 30 min	0,47 ± 0,04 mM	Elevée avec la phlorizine.	Mandal <i>et al.</i> , 2003



	<i>Macrobachium rosenbergii</i>		Intestin	[ <sup>3</sup> H] D-Glucose		0,15 nmol/min x mg protéines	0,17 mM	37 % avec D-Gal à 5 mM. 45 % avec 3-O-M-Glc à 5 mM. 68 % avec cyto B à 10 µM $K_i = 3,6$ µM.	Ahearn & Marginnis, 1977
Mollusques	<i>Mytilus edulis</i>	0,5-1,5	Branchies	[ <sup>14</sup> C] D-Glucose	1 min			Glc = αM-D-Glc > D-Gal. pas d'effet du 3-O-M-Glc, du fructose et du 2-Deoxy-D-Glc.	Pajor <i>et al.</i> , 1989 Livingstone & Clarke, 1983
			Bord de manteau et branchies	[ <sup>14</sup> C] D-Glucose	1 min	0,48 ± 0,084 nmol/min x mg protéines	3 ± 1 µM	Glc = αM-D-Glc > D-Gal. pas d'effet du 3-O-M-glc, du fructose et du 2-Deoxy-D-Glc.	
			Cellules à glycogène isolées	[ <sup>14</sup> C] 3-O-Me- D-Glucose 1mM	30-45 min et 2h	11,2 nmol/h x 10 <sup>6</sup> cellules	7,5 mM	Phlorétine à 0,3 mM	Lenoir, 1989
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>		Branchies	[ <sup>14</sup> C] D-Glucose	1 min	0,23 ± 0,03 nmol/min x mg protéines	9 ± 1 µM	Glc = αM-D-Glc > D-Gal. pas d'effet du 3-O-M-Glc, du fructose et du 2-Deoxy-D-glc. phlorizine $K_i = 153$ nM	Pajor <i>et al.</i> , 1989
			Cellules du manteau isolées	[ <sup>3</sup> H] D-Glucose	10 min	37,92 nmol/h x 10 <sup>6</sup> cellules	3,6 mM		Louzao <i>et al.</i> , 1993

La mesure de l'entrée en fonction de sa concentration extracellulaire permet de déterminer si le transport présente ou non une composante saturable, c'est-à-dire si les protéines interviennent ou non dans le transport (**Figure 31**).



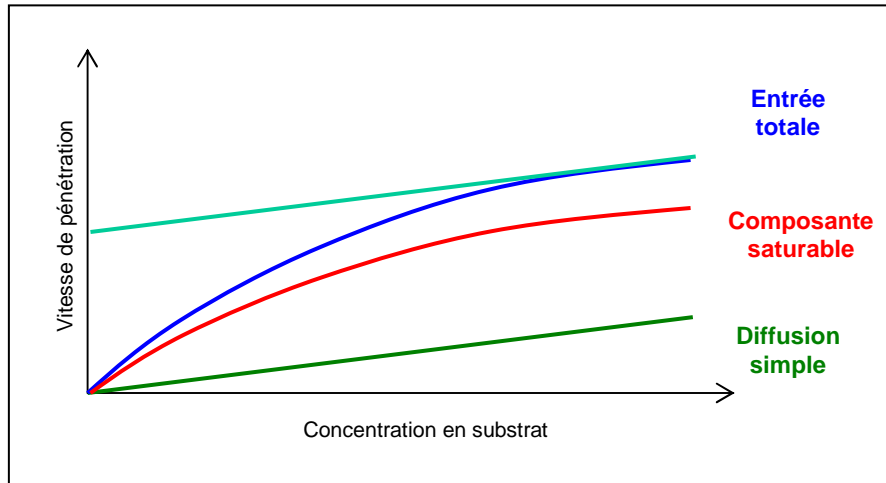
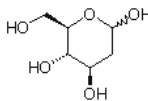
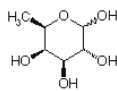
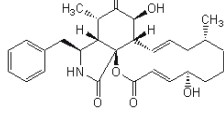
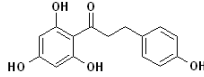
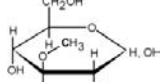
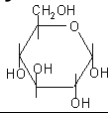
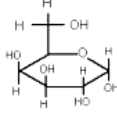
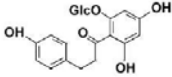
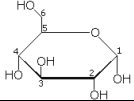
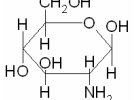


Figure 31. Caractérisation de la composante saturable.

Lorsque la cinétique de saturation a été mise en évidence, le type de transport impliqué (diffusion facilitée ou transport actif secondaire ou primaire) doit être déterminé. Cette caractérisation peut-être menée via des expériences d'entrée du glucose en présence d'inhibiteurs spécifiques ou d'analogues compétiteurs (**Tableau 7**), ou en faisant varier les concentrations extracellulaires en un ion donné ( $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$  par exemple) afin d'en changer le gradient transmembranaire. La cytochalasine B est un inhibiteur spécifique de transport facilité de type GLUT, son effet est réversible (Czech *et al.*, 1973) et il est compétitif sur la sortie du glucose. Le site de fixation de la cytochalasine B se situe au niveau des résidus 388 à 412 localisés aux extrémités endofaciales des 2 canaux de la protéine (Zuniga *et al.*, 2001). La phlorizine, un  $\beta$ -glucoside, inhibe de manière spécifique les cotransports  $\text{Na}^+$ /glucose de type SGLT (Colombo & Semenza, 1972). Elle est fréquemment utilisée depuis les années 1960 dans les expérimentations de cinétique enzymatique (Giraldez & Larralde, 1960 ; Diedrich, 1961) et sa constante d'inhibition est de l'ordre de 4-10  $\mu\text{M}$ . Par ailleurs, l'absence d'effet du voltage sur le taux de dissociation de la phlorizine sur le transporteur a amené Toggenburger et ses collaborateurs (Toggenburger *et al.*, 1978) à poser l'hypothèse que le complexe phlorizine- $\text{Na}^+$ -cotransporteur soit neutre. Novakova et ses coauteurs (2001) ont quant à eux formulé l'hypothèse que les résidus 604 à 610 formaient une partie du site de liaison de la phlorizine.



Tableau 7. Inhibiteurs et analogues permettant la caractérisation des modes de transports du D-glucose.

Type de transport	Inhibiteurs et autres traitements		
	Nom	Effet	Références
Diffusion facilitée	<b>2-Deoxy-D-Glucose</b> 	analogue du glucose transporté uniquement par les transporteurs facilités	Janicot & Lane, 1989 Thorens, 1993 Nagata & Ichikiwa, 1995
	<b>D-Fucose = 6-deoxy-D-Glucose</b> 	analogue non phosphorylable dérivé du 2-deoxy-D-Glucose	Eisenthal <i>et al.</i> , 1989
	<b>Cytochalasine B</b> 	inhibiteur spécifique de transport facilité de type GLUT, effet réversible, compétitif sur la sortie, site de fixation : résidus 388 à 412 localisés aux extrémités endofaciales des 2 canaux.	Kletzien & Perdue, 1973 Czech <i>et al.</i> , 1973 Krupka, 1985 King <i>et al.</i> , 1991 Pinkofsky <i>et al.</i> , 2000 Mannerström <i>et al.</i> , 2003
	<b>Phlorétine</b> 	inhibiteur compétitif de l'entrée du glucose, spécifique des cotransports sodium indépendants, se fixe sur les systèmes de diffusion facilitée de type GLUT, son effet est réversible	Czech <i>et al.</i> , 1973 Krupka, 1985
	<b>3-O-Methyl-D-Glucose</b> 	substrat pour transport facilité, non phosphorylé par l'hexokinase, non métabolisable, pas transporté par les SGLT2 et SGLT3	Janicot & Lane, 1989 Wright, 2001a
Cotransport Na <sup>+</sup> /glucose	<b>α-Methyl-D-Glucose</b> 	substrat pour les cotransports de glucose mais pas pour diffusion facilitée	Hediger <i>et al.</i> , 1987 Weber <i>et al.</i> , 1989 Nagata & Ichikawa, 1995
	<b>β-Methyl-D-Glucose</b>	substrat pour les cotransports de glucose mais pas pour diffusion facilitée, affinité faible	
	<b>D-galactose</b> 	substrat pour les symports H <sup>+</sup> /hexose (perméases des procaryotes) et SGLT 1	Pao <i>et al.</i> , 1998
	<b>Phlorizine</b> 	beta glucoside, inhibiteur spécifique des cotransports Na <sup>+</sup> dépendants	Czech <i>et al.</i> , 1973 Wright <i>et al.</i> , 1992 Louzao <i>et al.</i> , 1993 Nagata <i>et al.</i> , 1995 Ehrenkranz <i>et al.</i> , 2005, pour revue
Diffusion facilitée et Cotransport Na <sup>+</sup> /glucose	<b>D-glucose</b> 	compétiteur direct	
	<b>Glucosamine</b> 	dérivé de la chitine, interfère dans la voie de synthèse de l'insuline (compétiteur avec les glucokinases, provoque la diminution de l'insuline et l'augmentation du taux de glucose intracellulaire)	Agius & Stubbs, 2000



Cette étude sur la caractérisation du transport du glucose dans les cellules vésiculeuses chez l'huître *Crassostrea gigas* a pour objectif de répondre à différentes questions :

- Comment le glucose est-il transporté dans les cellules vésiculeuses par rapport aux systèmes déjà décrits dans la littérature ?

- Quels sont les paramètres de l'entrée du D-glucose dans les cellules de réserve ?

- Quelle est la vitesse d'entrée ? L'affinité des transporteurs pour le substrat ?

- Quels sont les facteurs pouvant faire varier la capacité d'entrée du glucose ?

- Quels sont les systèmes de transport présents sur la membrane plasmique ?



## RESULTATS

### 1. Glycémie dans l'hémolymphe

La glycémie a été dosée dans l'hémolymphe prélevée dans la région péricardique de l'huître *C. gigas* (**Tableau 8**), sur des pools de 3 animaux (n=4).

Tableau 8. Dosage de la glycémie dans l'hémolymphe de *Crassostrea gigas*

	Glycémie (mM $\pm$ écart-type)
<b>06/07/06</b>	0,164 $\pm$ 0,052
<b>09/10/06</b>	0,072 $\pm$ 0,038
<b>08/12/06</b>	0,034 $\pm$ 0,014
<b>30/03/07</b>	0,101 $\pm$ 0,054

Les valeurs de glycémie se situent dans une fourchette comprise entre 0,03 et 0,17 mM. La glycémie est plus élevée en été qu'en automne et en hiver. Les forts écart-types sont dus à d'importantes variations interindividuelles.

### 2. Préparation des suspensions de cellules vésiculeuses dissociées

Les cellules vésiculeuses sont préparées à partir de palpes labiaux.

L'estimation de la concentration cellulaire a été réalisée selon trois approches comparées sur une même suspension cellulaire :

- Comptage cellulaire sur cellule de Thoma.
- Test M.T.T. de survie cellulaire.
- Dosage Bradford de protéines.

Les résultats sont reportés en **Figure 32**.



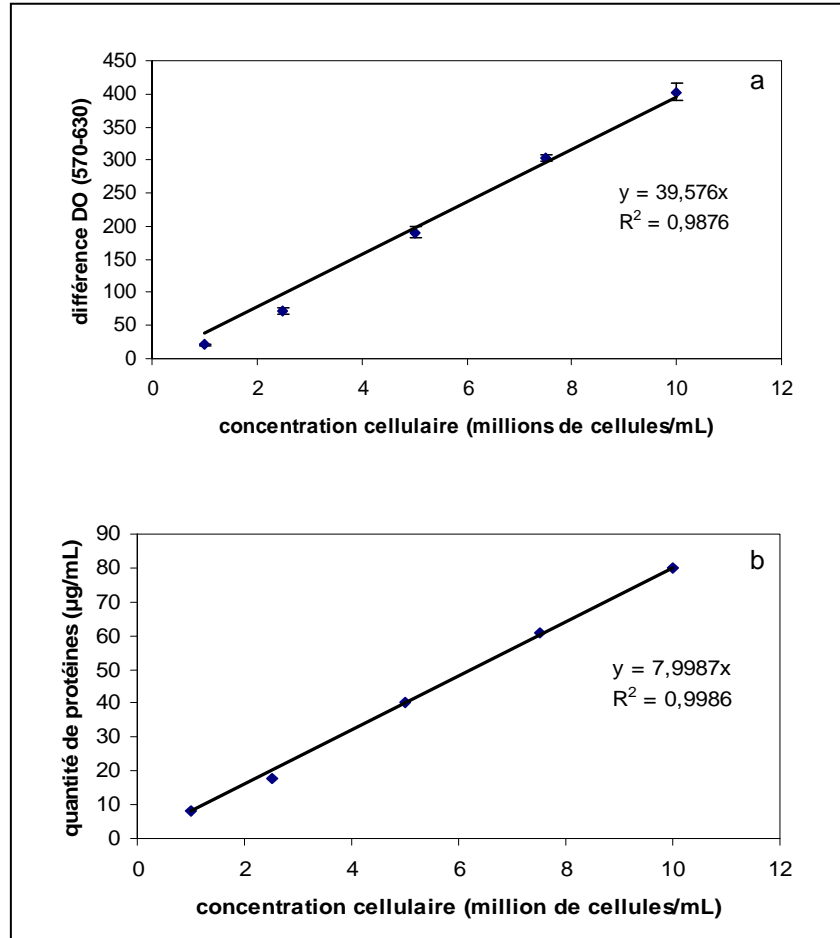


Figure 32. Estimation de la concentration cellulaire selon deux approches :  
 (a) Mesure de la différence d'absorbance (entre 630 et 570 nm) en fonction du nombre de cellules vésiculeuses (en millions par mL). Temps d'incubation avec le MTT de 24 heures.  
 (b) Dosage protéique en fonction du nombre de cellules vésiculeuses (en millions par mL).

La différence de densité optique mesurée par le test MTT (**Figure 32a**) et la quantité de protéines (**Figure 32b**) augmentent linéairement ( $R^2 > 0,98$ ) en fonction de la concentration cellulaire, ce qui permettra d'exprimer les résultats d'entrée soit en fonction de la quantité de protéine, soit en fonction du nombre de cellules vivante (MTT).

Les deux méthodes de quantification sont donc validées mais le test MTT sera préféré au dosage de protéines dans la mesure où il permet de quantifier les cellules ayant conservé une activité mitochondriale.



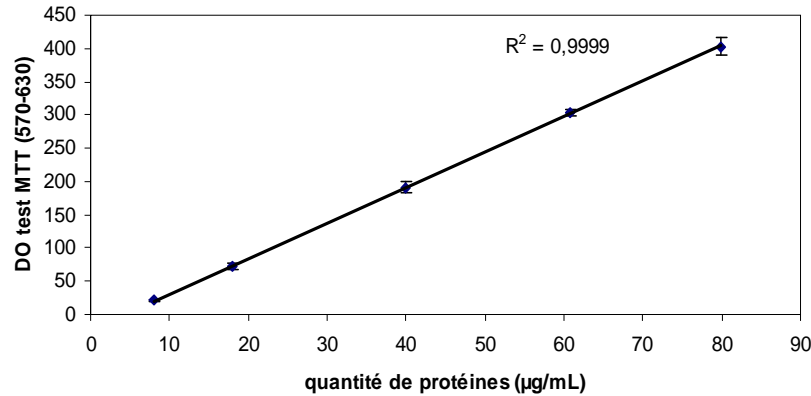


Figure 33. Corrélation entre le test MTT et la quantité protéique d'une préparation de cellules vésiculeuses dissociées.

### 3. Transport du glucose dans les cellules vésiculeuses : approche *in vitro*

#### 3.1. Choix du traceur radioactif

Deux radiotraceurs, utilisés couramment dans les études des voies métaboliques du glucose, ont été testés sur les cellules de palpes labiaux dissociées : le  $[U-^{14}C]$  D-glucose (conditionné dans 20 % d'éthanol) et le  $[U-^{14}C]$  3-O-méthyl-D-glucose (préparé dans 20 % d'éthanol) (**Figure 34**). Le transport du glucose est estimé en nmol/  $10^6$  cellules.

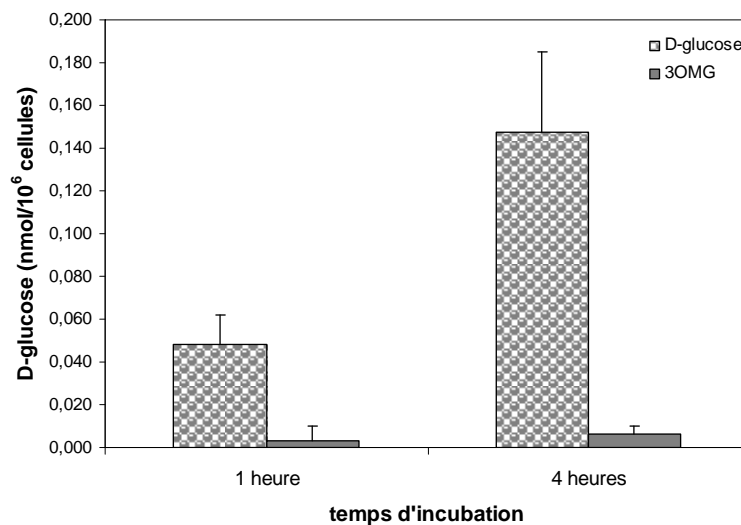


Figure 34. Entrée du  $[U-^{14}C]$  D-glucose et du  $[U-^{14}C]$  3-O-méthyl-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées.

Les résultats sont exprimés en nmoles de glucose entrées par  $10^6$  cellules  $\pm$  écart type (n=6). Le traceur  $[U-^{14}C]$  D-glucose a été dilué avec du D-glucose à 1 mM et le  $[U-^{14}C]$  3-O-méthyl-glucose avec du 3-O-méthyl-glucose à 1mM.  
15/07/04

Seul le D-glucose permet une mesure significative de l'entrée dans les conditions de l'expérimentation. Le  $[U-^{14}C]$  3-O-méthyl-D-glucose a été écarté des études de transport du glucose *in vitro* : son entrée est trop faible pour réaliser des études de cinétique.



### 3.2. Entrée du D-glucose en fonction de la concentration cellulaire

L'entrée du glucose a été suivie en fonction de la concentration cellulaire pour un temps d'incubation d'une heure à 0,5 mM de glucose extracellulaire (**Figure 35**).

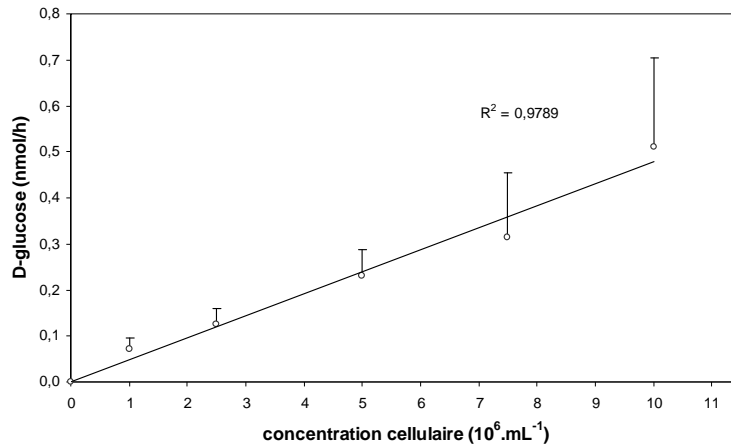


Figure 35. Transport du [U-<sup>14</sup>C] D-glucose en fonction de la concentration cellulaire (en millions de cellules par mL).

Les résultats sont exprimés en nmoles de glucose entrées par 10<sup>6</sup> cellules  $\pm$  écart type (n=6). Incubation d'1 heure en présence de 0,5 mM de D-glucose et de 0,5  $\mu$ Ci de [<sup>14</sup>C] D-glucose.

Les résultats obtenus montrent que l'entrée du D-glucose est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes présentes dans le milieu d'incubation. La concentration cellulaire retenue est de 5 millions de cellules.mL<sup>-1</sup>. En effet, cette concentration cellulaire permet d'obtenir une entrée significative par rapport au témoin de bruit de fond mais reste compatible avec la réalisation de séries expérimentales multiples et de 6 réplicats par points.

### 3.3. Cinétique d'entrée du glucose

#### ✂ Cinétique d'entrée du D-glucose dans les cellules de palpes labiaux :

La cinétique d'entrée du D-glucose a été réalisée en mesurant l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses en fonction du temps (**Figure 36**).



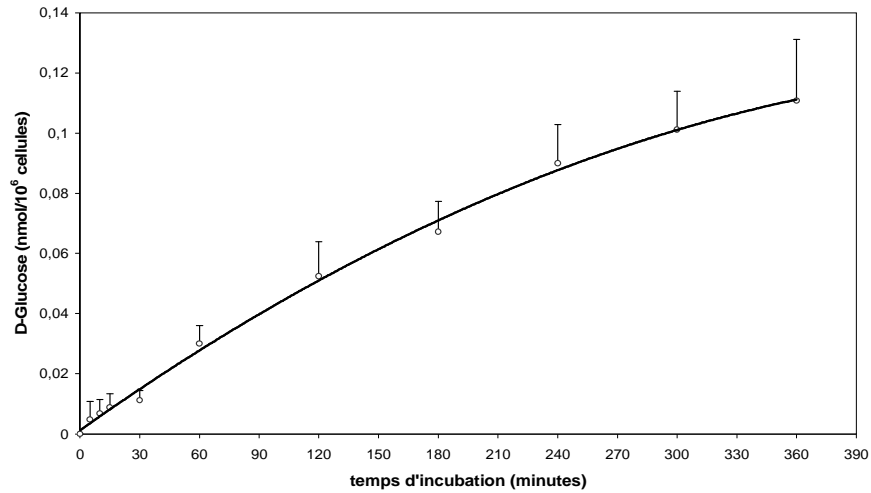


Figure 36. Cinétique d'entrée du  $[U-^{14}C]$  D-glucose (1 mM) dans les cellules de palpes labiaux dissociées.

Les résultats sont exprimés en nmoles de glucose entrées par  $10^6$  cellules  $\pm$  écart type (n=6).

06/02/04

La vitesse d'entrée est maximale au moins pendant la première heure de réaction correspondant à l'état stationnaire. Elle diminue ensuite très légèrement après, à partir de 3 heures d'incubation pour une concentration extracellulaire de D-glucose de 1 mM, sans toutefois avoir atteint de saturation nette à 6 heures.

#### ✂ Effet de la concentration extracellulaire de glucose sur la cinétique d'entrée du D-glucose :

L'effet de la concentration extracellulaire de D-glucose sur son entrée en fonction du temps a été testé pour trois concentrations (0,25 mM, 1 mM et 5 mM) (Figure 37).

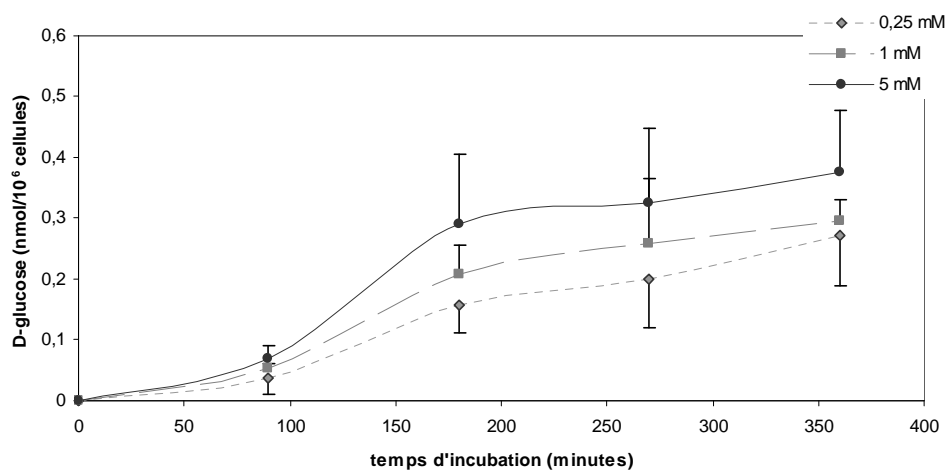


Figure 37. Cinétique d'entrée du  $[U-^{14}C]$  D-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées pour trois concentrations extracellulaires de glucose.

Les résultats sont exprimés en nmoles de glucose entrées par  $10^6$  cellules  $\pm$  écart type (n=6).

15/07/04



L'entrée du D-glucose dans les cellules apparaît comme un phénomène saturable pour les valeurs élevées de la concentration en substrat. La vitesse d'entrée augmente avec la concentration de glucose. A 5 mM, une saturation est atteinte après 3 heures d'incubation, autour de 0,3 nmol/10<sup>6</sup> cellules. Cette saturation apparaît plus tardivement pour les concentrations plus faibles.

#### ✂ Effet de la température sur la cinétique du transport du D-glucose :

L'effet de la température sur l'entrée du glucose en fonction du temps est représenté en **Figure 38**.

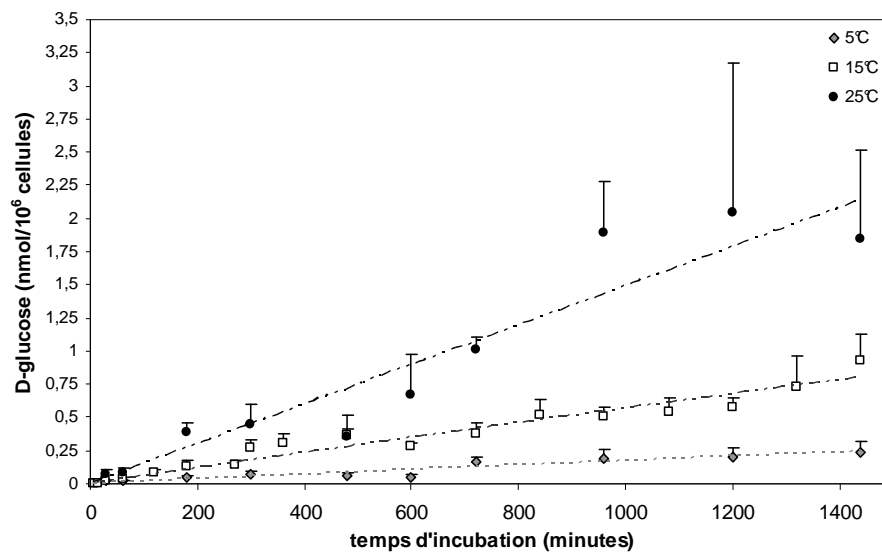


Figure 38. Cinétique d'entrée du [U-<sup>14</sup>C] D-glucose (0,5 mM) dans les cellules de palpes labiaux dissociées en fonction de la température.

Les résultats sont exprimés en nmoles de glucose entrées par 10<sup>6</sup> cellules  $\pm$  écart type (n=6).

04/10/06

A 25°C, l'entrée est plus élevée qu'aux plus faibles températures mais elle semble atteindre un plateau au bout de 15 minutes d'incubation. A 5°C, l'entrée du glucose est linéaire mais reste très faible même après 24 heures d'incubation.

A 15°C, l'entrée de glucose dans les cellules dissociées de palpes labiaux apparaît linéaire ( $R^2=0,9533$ ) et atteint un niveau suffisant pour réaliser les suivis de transport du glucose.

### 3.4. Effet de la concentration du glucose sur l'entrée du glucose

La capacité d'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses a été mesurée en faisant varier la concentration extracellulaire en D-glucose (**Figure 39**).



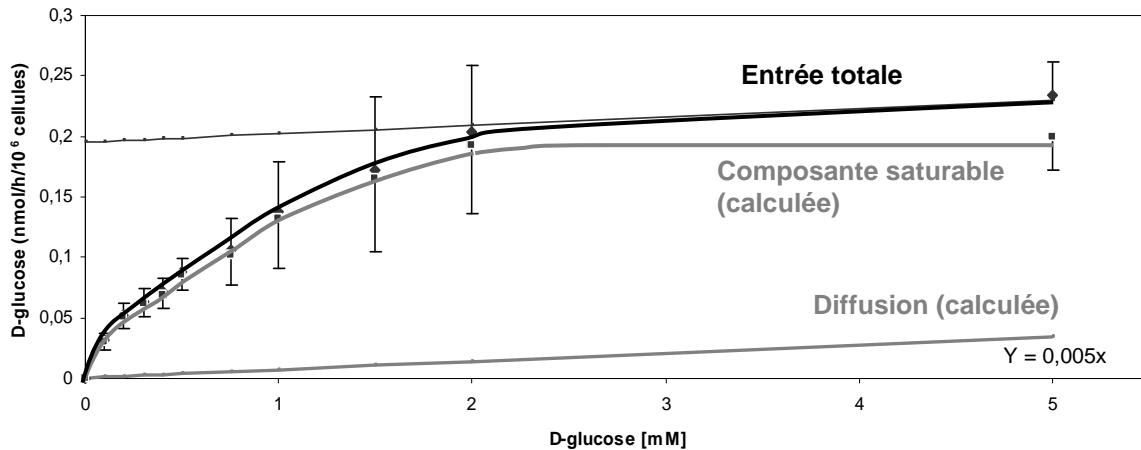


Figure 39. Effet de la concentration extracellulaire en D-glucose sur la vitesse d'entrée du  $[U-^{14}C]$  D-glucose dans les cellules vésiculeuses.

Deux composantes distinctes sont mises en évidence : une diffusion simple et une composante saturable dépendante de la concentration.

Les résultats sont exprimés en nmoles de D-glucose entrées en une heure par  $10^6$  cellules ( $n=6$ ).

26/04/06

Le transport du glucose dans les cellules vésiculeuses apparaît comme un phénomène saturable qui atteint une vitesse maximale pour des valeurs élevées en substrat (D-glucose) (Figure). Ce mécanisme peut être découpé en deux composantes :

- une composante de diffusion
- une composante saturable avec la concentration en substrat

La composante linéaire non saturable de diffusion, soustraite du transport total, permet de déduire la composante saturable. Les données ont été analysées selon trois transformations utilisées couramment dans les études cinétiques enzymatiques :

- a- La représentation de Lineweaver-Burk (**Figure 40**) donne  $1/V$  en fonction de  $1/S$
- b- La représentation de Woolf et Hanes (**Figure 41**) donne  $S/V$  en fonction de  $S$
- c- La représentation de Eadie et Hofstee (**Figure 42**) donne  $V$  en fonction de  $V/S$

L'expression graphique de ces trois représentations permet de déterminer les valeurs des constantes  $K_m$  et  $V_{max}$  exprimé soit en nmoles/h/ $10^6$  cellules, soit en nmoles/min x mg de protéines, comme on le trouve parfois dans la littérature.

a-  $K_m = 0,516$  mM

$V_{max} = 0,176$  nmoles/h/ $10^6$  cellules

$V_{max} = 23,47$  nmoles/min x mg de protéines

b-  $K_m = 0,994$  mM

$V_{max} = 0,252$  nmoles/h/ $10^6$  cellules

$V_{max} = 33,6$  nmoles/min x mg de protéines

c-  $K_m = 0,717$  mM

$V_{max} = 0,226$  nmoles/h/ $10^6$  cellules

$V_{max} = 30,13$  nmoles/min x mg de protéines



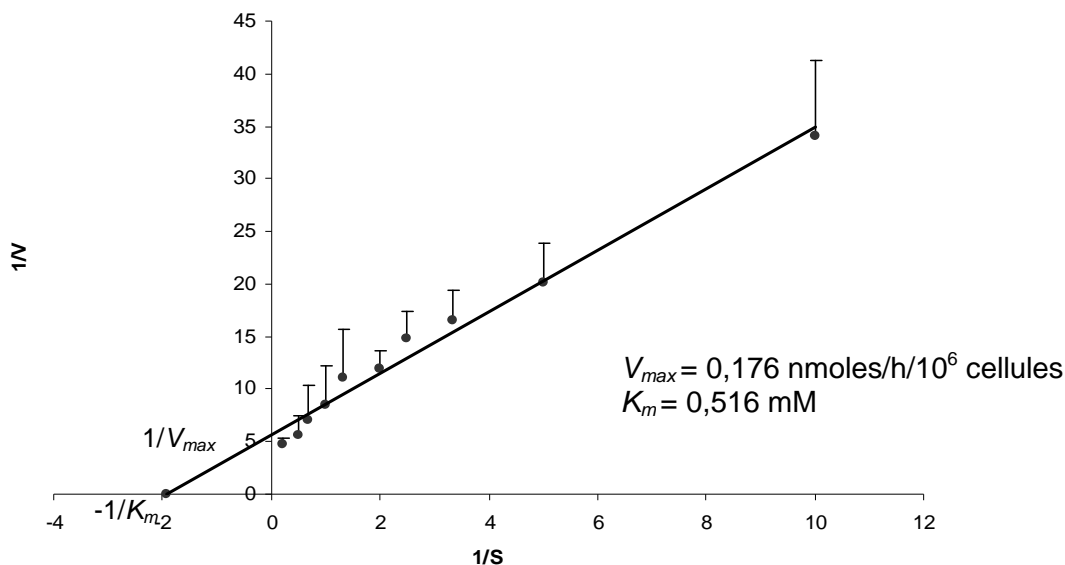


Figure 40. Détermination de  $V_{max}$  et de  $K_m$  de la composante saturable du transport du  $[U-^{14}C]$  D-glucose dans les cellules vésiculeuses selon la méthode de Lineweaver-Burk.

$V$  = vitesse d'entrée du D-glucose en nmoles/h/ $10^6$  cellules

$S$  = concentration extracellulaire en D-glucose exprimée en mmoles/litre.

26/04/06

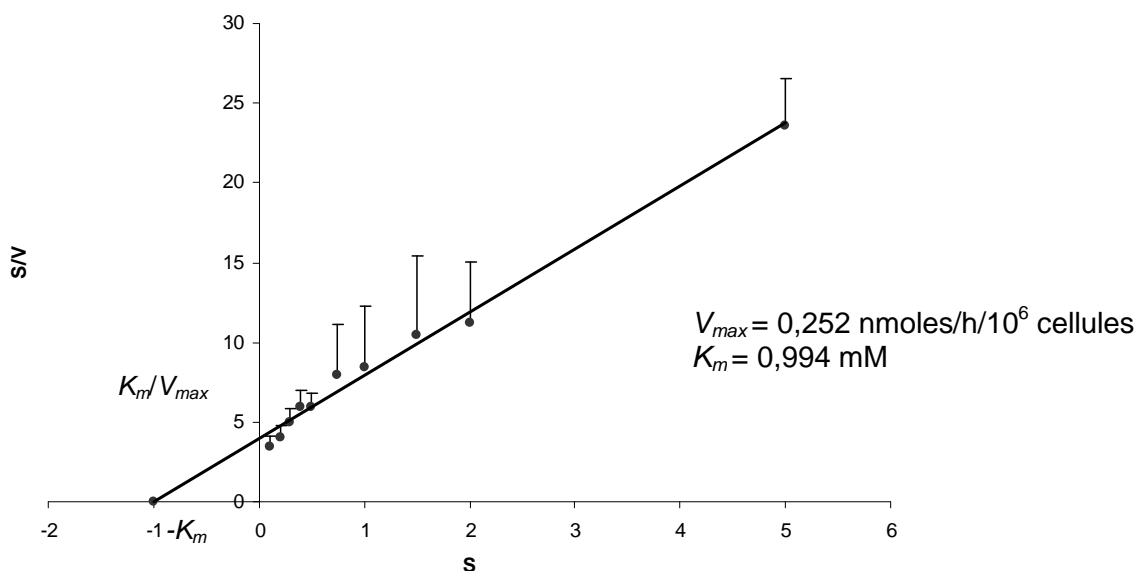


Figure 41. Détermination de  $V_{max}$  et de  $K_m$  de la composante saturable du transport du  $[U-^{14}C]$  D-glucose dans les cellules vésiculeuses selon la méthode de Woolf et Hanes.

$V$  = vitesse d'entrée du D-glucose en nmoles/h/ $10^6$  cellules

$S$  = concentration extracellulaire en D-glucose exprimée en mmoles/litre.

26/04/06



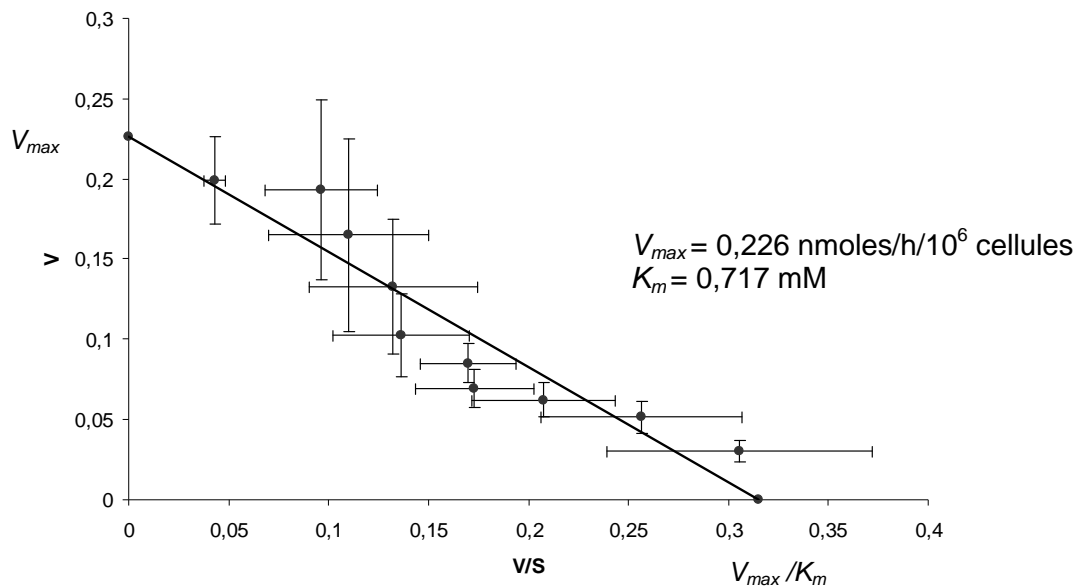


Figure 42. Détermination de  $V_{max}$  et de  $K_m$  de la composante saturable du transport du  $[U-^{14}C]$  D-glucose dans les cellules vésiculeuses selon la méthode de Eadie et Hofstee.

$V$  = vitesse d'entrée du D-glucose en nmoles/h/ $10^6$  cellules

$S$  = concentration extracellulaire en D-glucose exprimée en mmoles/litre.

26/04/06

### 3.5. Mise en évidence de différents systèmes de transport du glucose

Deux inhibiteurs spécifiques de l'entrée du glucose ont été choisis d'après leur effet décrit dans la littérature :

- ✗ La **cytochalasine B** inhibe les transports facilités de type GLuT, et son effet est réversible (Czech et al., 1973).
- ✗ La **phlorizine**, un  $\beta$ -glucoside, inhibe de manière spécifique les cotransports  $Na^+$ /glucose de type SGLT (Colombo & Semenza, 1972).

#### 3.5.1. Effet de la cytochalasine B

La capacité d'entrée du glucose dans des cellules vésiculeuses a été mesurée en présence de cytochalasine B à des concentrations variant entre 0 et 500  $\mu M$  après 3 heures d'incubation (**Figure 43**) à 15°C pour une concentration cellulaire de  $5 \cdot 10^6$  de cellules par mL.



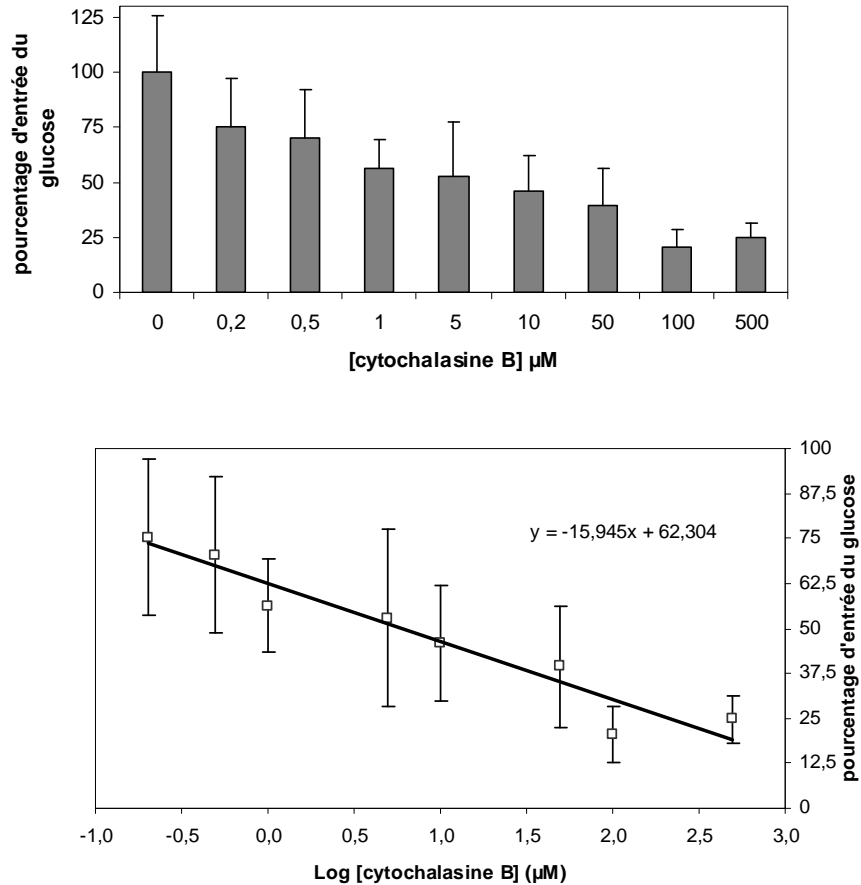


Figure 43. Effet de la cytochalasine B sur le transport du  $[U-^{14}C]$  D-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de D-glucose entré  $\pm$  écart type ( $n=6$ ).

La concentration de cytochalasine B varie entre 0 et 500  $\mu M$  (0, 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 et 500) alors que la concentration de D-glucose est maintenue à 0,5 mM.

Le temps d'incubation est de 3 heures.

$K_i = 2,16 \mu M$ .

10/05/04

L'entrée du D-Glucose est inhibée de façon dose dépendante par la cytochalasine B. Jusqu'à 10  $\mu M$ , l'inhibiteur n'occasionne pas de mortalité cellulaire et entraîne une diminution de l'entrée de  $54,25 \% \pm 16,19$ . Cette concentration a été retenue pour les expérimentations de suivies de l'effet de la cytochalasine B.

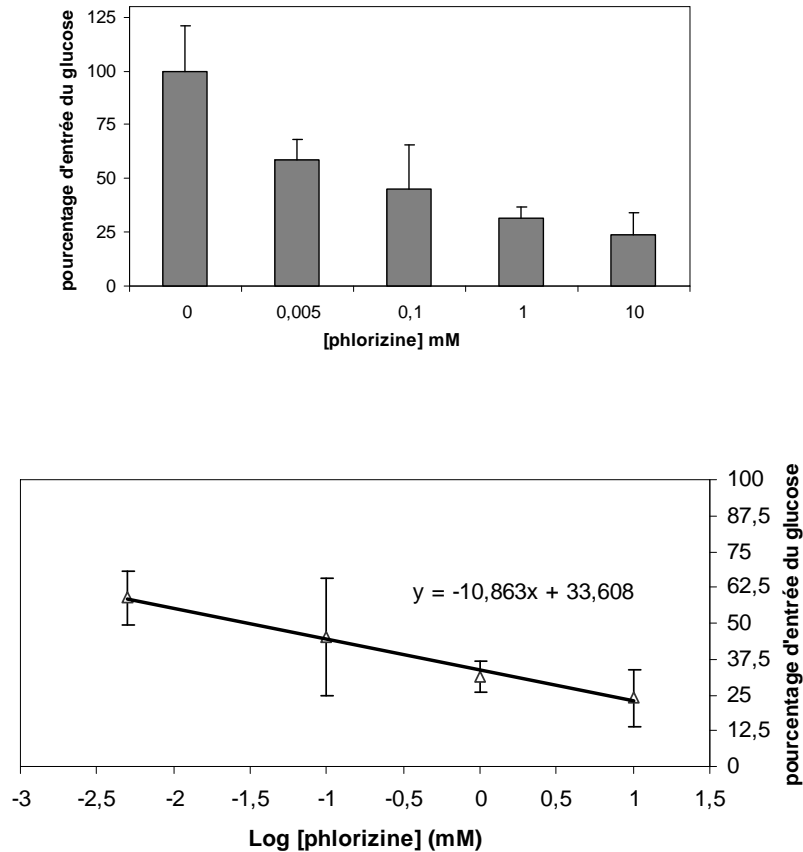
La constante de dissociation de l'inhibiteur  $K_i$  mesure l'efficacité de l'inhibition par la cytochalasine B lorsque la capacité d'entrée est diminuée de moitié et peut être calculée à partir de la transformation logarithmique de ces données :

$$K_{i \text{ cytochalasine B}} = 2,16 \mu M$$



### 3.5.2. Effet de la phlorizine

La capacité d'entrée du glucose dans des cellules vésiculeuses a été mesurée en présence de phlorizine à des concentrations variant entre 0 et 10 mM après 3 heures d'incubation (**Figure 44**) à 15°C pour une concentration cellulaire de  $5 \cdot 10^6$  de cellules par mL.



**Figure 44.** Effet de la phlorizine sur le transport du  $[U-^{14}C]$  D-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de D- glucose entré  $\pm$  écart type ( $n=6$ ).

La concentration de phlorizine varie entre 0 et 10 mM (0, 0,005, 0,1, 1 et 10) alors que la concentration de D- glucose est maintenue à 0,5 mM.

Le temps d'incubation est de 3 heures.

$K_i = 0,22$  mM.

08/04/04

A 1 mM, l'inhibition exercée par la phlorizine a atteint un plateau autour de  $68,57 \% \pm 5,37$ . A cette concentration, le suivi de la survie a montré que la phlorizine n'entraîne pas de mortalité significative. Cette concentration sera donc retenue pour les expérimentations ultérieures de suivi de l'entrée.

La transformation logarithmique de l'effet de différentes concentrations de la phlorizine sur la capacité d'entrée du glucose permet d'obtenir la constante d'inhibition  $K_i$ :

$$K_{i \text{ phlorizine}} = 0,22 \text{ mM}$$



### 3.5.3. Effet de la concentration extracellulaire de D-glucose en présence de la cytochalasine B et de la phlorizine sur l'entrée du glucose

L'effet de la concentration extracellulaire de D-glucose en présence de 10  $\mu$ M de cytochalasine B ou de 1 mM de phlorizine est présenté dans la **Figure 45**.

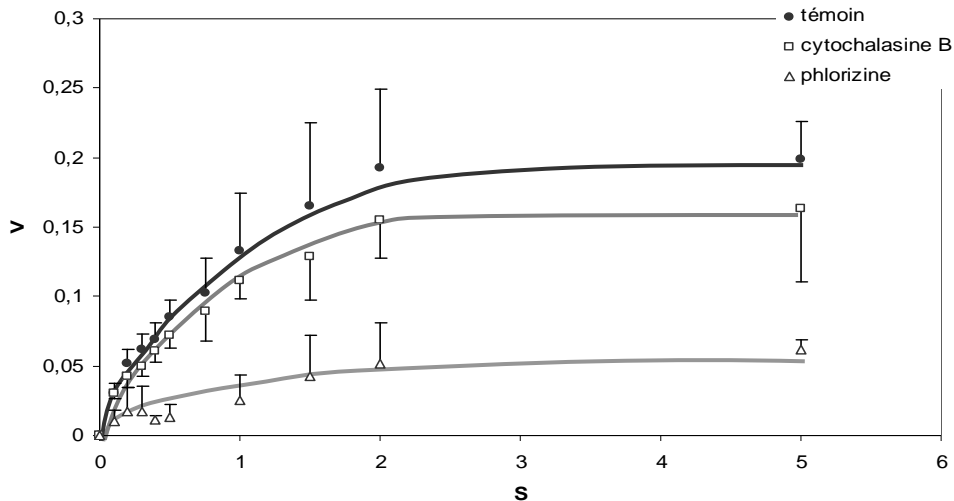


Figure 45. Effet de la cytochalasine B (10  $\mu$ M) et de la phlorizine (1 mM) sur la vitesse d'entrée du D-glucose dans les cellules dissociées de palpes labiaux (composante saturable) en fonction de la concentration du D-glucose extracellulaire.

V = vitesse d'entrée du D-glucose en nmol/h/10<sup>6</sup> cellules

S = concentration extracellulaire en D-glucose exprimée en mmol/litre.

Le temps d'incubation est d'une heure.

26/04/06

Les deux inhibiteurs réduisent l'entrée du glucose mais l'effet de la phlorizine est plus marqué dans les faibles concentrations de glucose.

Pour chaque inhibiteur, une transformation des résultats selon la méthode de Eadie Hofstee a été réalisée en représentant V en fonction de V/S.

L'intersection avec l'axe des ordonnées donne la valeur de la vitesse maximale  $V_{max}$  et l'intersection avec l'axe des abscisses permet de calculer la constante d'affinité apparente  $K_{mapp}$  à partir de la formule  $V_{max}/K_{mapp}$ .

Pour la cytochalasine B, bien que l'inhibition soit faible, la transformation a été réalisée et les résultats sont donnés en **Figure 46**.



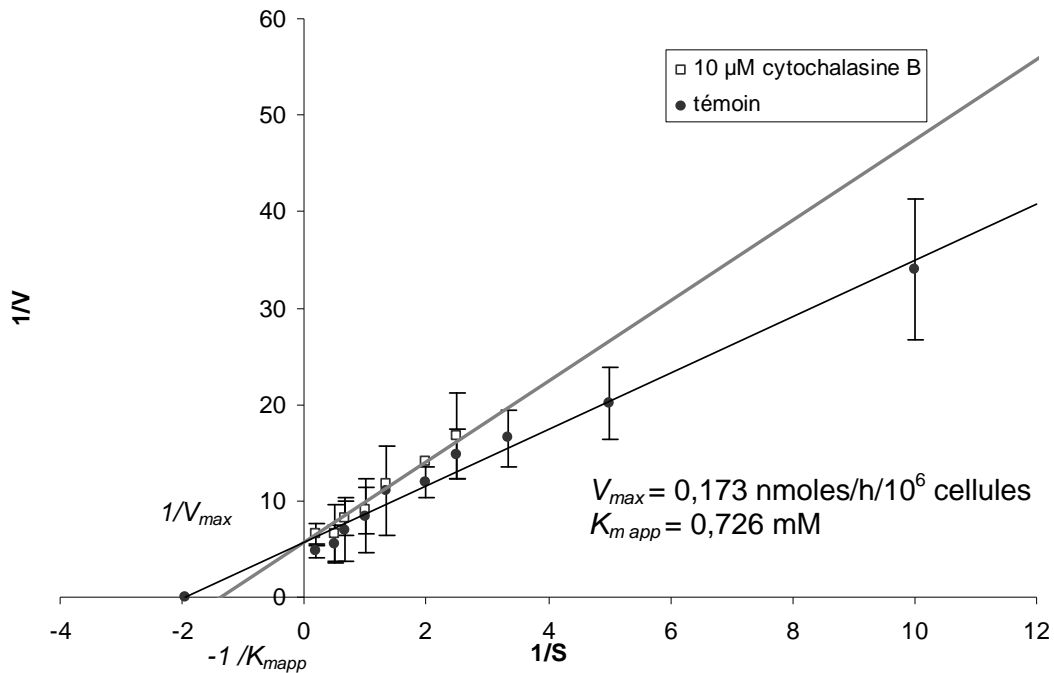


Figure 46. Effet de la cytochalasine B (10 µM) sur la vitesse de transport du [U-<sup>14</sup>C] D-Glucose (composante saturable) dans les cellules de palpes labiaux dissociées. Détermination de  $V_{max}$  et de  $K_{mapp}$  de la composante saturable du transport du [U-<sup>14</sup>C] D-glucose dans les cellules vésiculeuses selon la méthode de Lineweaver-Burk.

Le temps d'incubation est de 1 heure.

$V$  = vitesse d'entrée du D-glucose en nmoles/h/10<sup>6</sup> cellules

$S$  = concentration extracellulaire en D-glucose exprimée en mmoles/litre.

26/04/06

Les profils des deux droites (témoin et cytochalasine B, **Figure 46**) montrent qu'elles possèdent une  $V_{max}$  identique, mais des constantes  $K_m$  différentes. La cytochalasine B inhibe de manière compétitive le transport du glucose, c'est-à-dire que cet inhibiteur ne modifie pas la vitesse maximale de transport du glucose mais l'affinité des transporteurs de glucose à celui-ci.

Le calcul des constantes donne les valeurs suivantes :

$$K_{mapp} = 0,726 \text{ mM} \quad V_{max} = 0,173 \text{ nmoles/h/10}^6 \text{ cellules}$$

$$V_{max} = 23,06 \text{ nmoles/min} \times \text{mg de protéines}$$

Ces données permettent de calculer la constante d'inhibition de la cytochalasine B, donnée par la formule :

$$K_i = (K_m \times [I]) / (K_{mapp} - K_m)$$

avec  $K_{mapp} = 0,726 \text{ mM}$  et  $K_m = 0,516 \text{ mM}$

$$K_{i \text{ cytochalasine B}} = 24,57 \text{ µM}$$



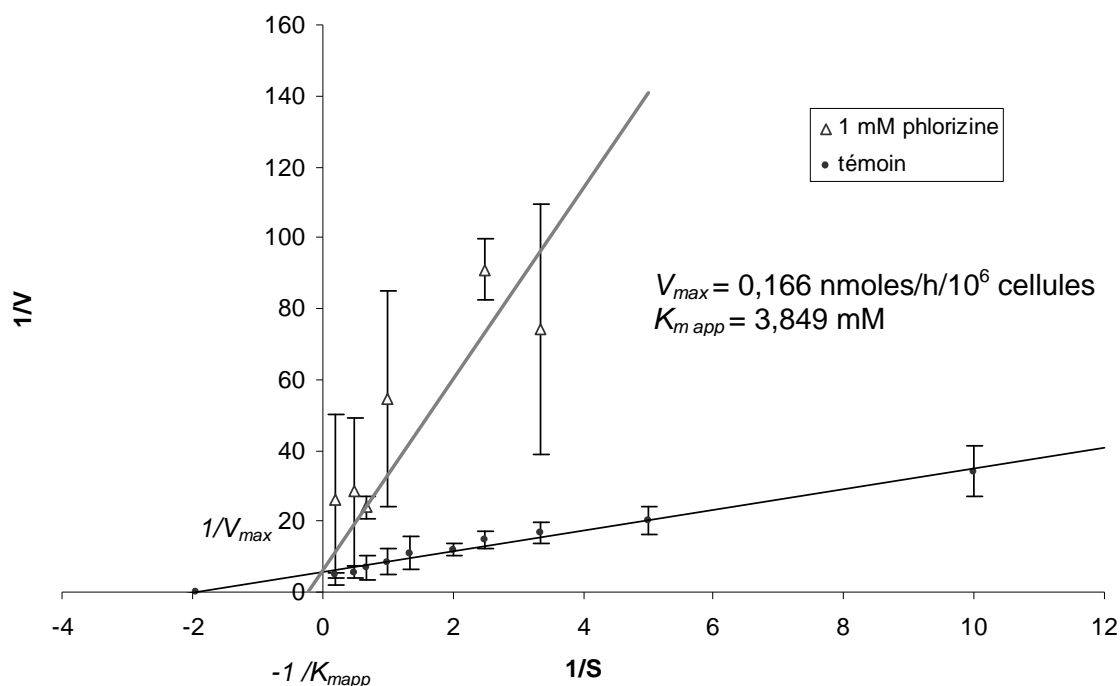


Figure 47. Effet de la phlorizine (1 mM) sur la vitesse de transport du [U-<sup>14</sup>C] D-glucose (composante saturable) dans les cellules de palpes labiaux dissociées. Détermination de  $V_{max}$  et de  $K_m$  de la composante saturable du transport du [U-<sup>14</sup>C] D-glucose dans les cellules vésiculeuses selon la méthode de Lineweaver-Burk.

Le temps d'incubation est de 1 heure.

$V$  = vitesse d'entrée du D-glucose en nmoles/h/ $10^6$  cellules

$S$  = concentration extracellulaire en D-glucose exprimée en mmoles/litre.

26/04/06

Les profils des deux droites en **Figure 47** (témoin et phlorizine) montrent qu'elles possèdent une  $V_{max}$  identique, mais des constantes d'affinité  $K_m$  différentes. La phlorizine se comporte comme un inhibiteur compétitif, c'est-à-dire qu'il n'influence pas la vitesse maximale d'entrée mais modifie la constante d'affinité apparente au substrat.

Le calcul des constantes donne les valeurs suivantes :

$$K_{mapp} = 3,849 \text{ mM} \quad V_{max} = 0,166 \text{ nmoles/h/}10^6 \text{ cellules}$$

$$V_{max} = 22,13 \text{ nmoles/min} \times \text{mg de protéines}$$

Ces données permettent de calculer la constante d'inhibition de la phlorizine, donnée par la formule :

$$K_i = (K_m \times [I]) / (K_{mapp} - K_m)$$

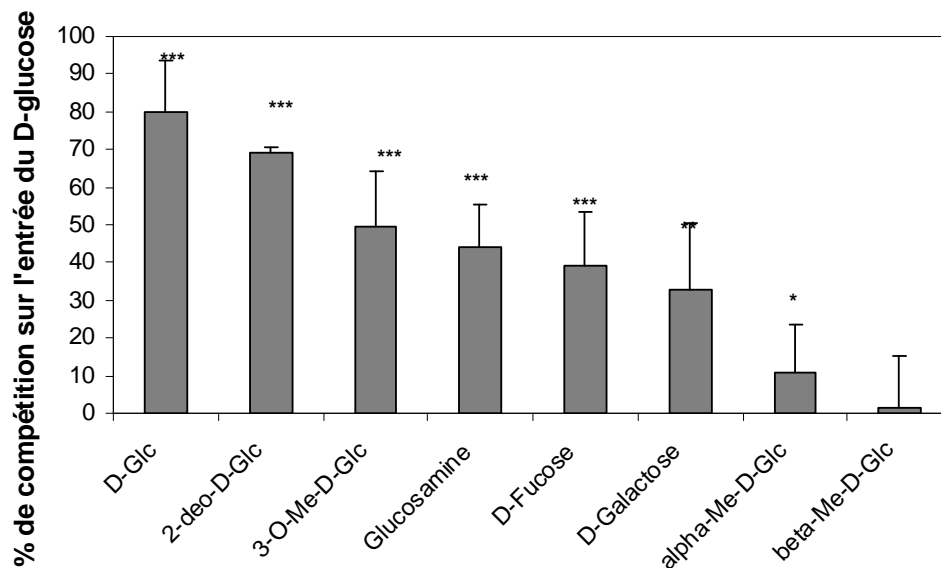
avec  $K_{mapp} = 3,849$  mM et  $K_m = 0,516$  mM

$$K_{i \text{ phlorizine}} = 0,154 \text{ mM}$$



### 3.5.4. Effet des analogues du glucose sur le transport du D-glucose

L'effet de plusieurs analogues du D-glucose a été testé sur l'entrée. Ces analogues ont été choisis en fonction de leur effet compétiteur sur les différents systèmes d'entrée (**Tableau 6**). Ces analogues sont utilisés à forte concentration (5 mM), l'entrée étant mesurée dans les conditions suivantes : [glucose] = 0,5 mM, incubation d'une heure à 15 °C. Les résultats sont exprimés en pourcentage de compétition sur l'entrée et sont reportés en **Figure 48**.



**Figure 48.** Effet de différents analogues du glucose sur le transport du  $[U-^{14}C]$  D-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de compétition sur le transport du D-glucose  $\pm$  écart type ( $n=6$ ). Compétition de 5 mM de chaque analogues sur 0,5 mM de D-glucose : D-glucose (D-Glc), ou 2-deoxy-D-glucose (2-deo-D-Glc), ou 3-O-méthyl-D-glucose (3-O-Me-D-Glc), ou glucosamine, ou D-fucose, ou D-galactose, ou alpha-méthyl-D-glucose (alpha-Me-D-Glc), ou beta-Me-D-glucose (beta-Me-D-Glc).

Le temps d'incubation est de 1 heure.

Test student ( $P<0,05^*$ ,  $P<0,01^{**}$  et  $P<0,001^{***}$ ), significativité calculée par rapport au témoin d'entrée en l'absence d'analogue.

06/04/06

Le 2-deoxy-D-Glucose, le D-fucose (dérivé de 2-deo-D-Glc) et le 3-O-méthyl-D-Glucose montrent un effet de compétition élevé.

La glucosamine provoque une diminution du transport du D-glucose de l'ordre de  $44,2\% \pm 11,2$ .

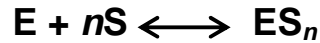
Le D-galactose, un substrat des cotransports de type SGLT1, bloque environ 33% du transport du glucose.

L' $\alpha$ -méthyl-D-glucose et le  $\beta$ -méthyl-D-glucose, tous deux des substrats pour les cotransports de glucose, n'entrent pas ou faiblement en compétition avec le transport du D-Glucose.



### 3.5.5. Effet de la concentration du sodium sur le transport du D-glucose

Les systèmes (enzymes ou transporteurs) ayant un fonctionnement coopératif (cas des SGLT : cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose) peuvent être caractérisés d'après le modèle de Hill (1910), basé sur l'équation suivante :



Soit une protéine E formée de  $n$  sous-unités qui peuvent chacune lier une molécule S, où S représente la concentration en sodium dans le cas des cotransports de type SGLT et  $n$  correspondant au coefficient de coopérativité.

La représentation de  $V$  en fonction de  $S$  est appelée courbe de Hill. Elle est sigmoïde et sa forme dépend du degré de coopérativité ( $n$ , appelé constante de Hill). La vitesse du système est donnée par l'équation de Hill :

$$V_0 = V_{\max} \times [\text{S}]^n / (K_h + [\text{S}]^n)$$

où  $n$  correspond au coefficient de Hill et  $K_h$  est la constante de dissociation indiquant la concentration de substrat à mi saturation.

Les valeurs de  $n$  et  $K_h$  peuvent être déterminées expérimentalement à partir de la représentation  $V$  en fonction de  $[\text{S}]$  (**Figure 49**).

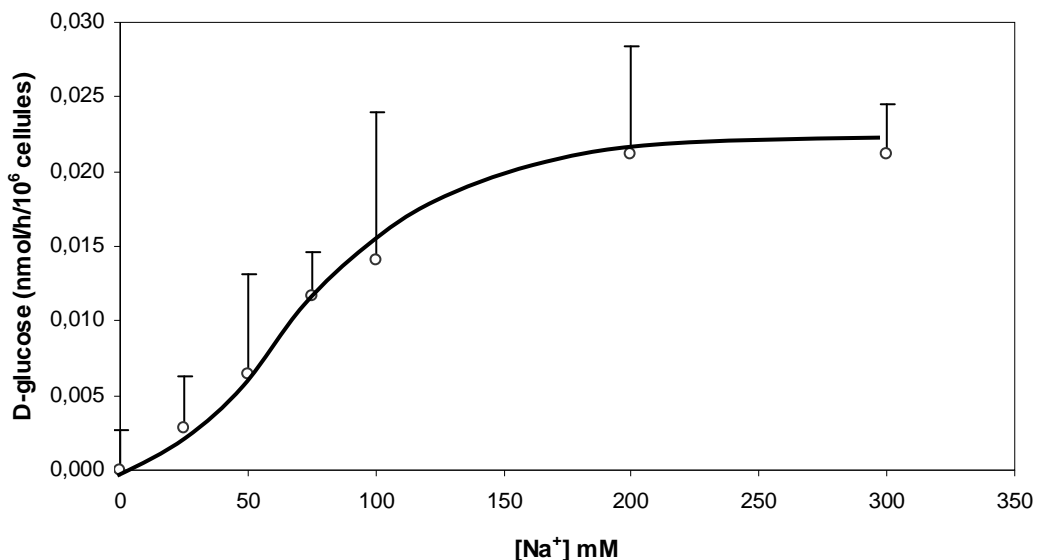


Figure 49. Effet de la concentration extracellulaire en  $\text{Na}^+$  sur le transport du  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$  D-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées.

Les résultats sont exprimés en nmoles de glucose entrées par heure et par  $10^6$  cellules  $\pm$  écart type ( $n=6$ ).

$J_{\max} = 0,0215 \text{ nmol/h/}10^6 \text{ cellules}$  et  $K_{\text{Na}} = 72,5 \text{ mM}$

25/10/06



La courbe sigmoïdale nous a permis d'estimer la  $K_{Na} = 72,5 \text{ mM}$  et  $V_{max} = 0,0215 \text{ nmol/h/10}^6 \text{ cellules}$ . Le coefficient de Hill a pu être calculé et équivaut à environ 3,74. Sa valeur est supérieure à 1, ce résultat indique que la réaction est bien de type coopératif. C'est-à-dire que le transport du sodium provoque l'augmentation de l'affinité des transporteurs de glucose pour celui-ci.

#### 4. Expression de SGLT

##### 4.1. Séquence SGLT

La topologie de la séquence protéique de SGLT de *Crassostrea gigas* (AAT44356) a tout d'abord été déterminée à partir des bases de données disponibles (**Figure 50**).

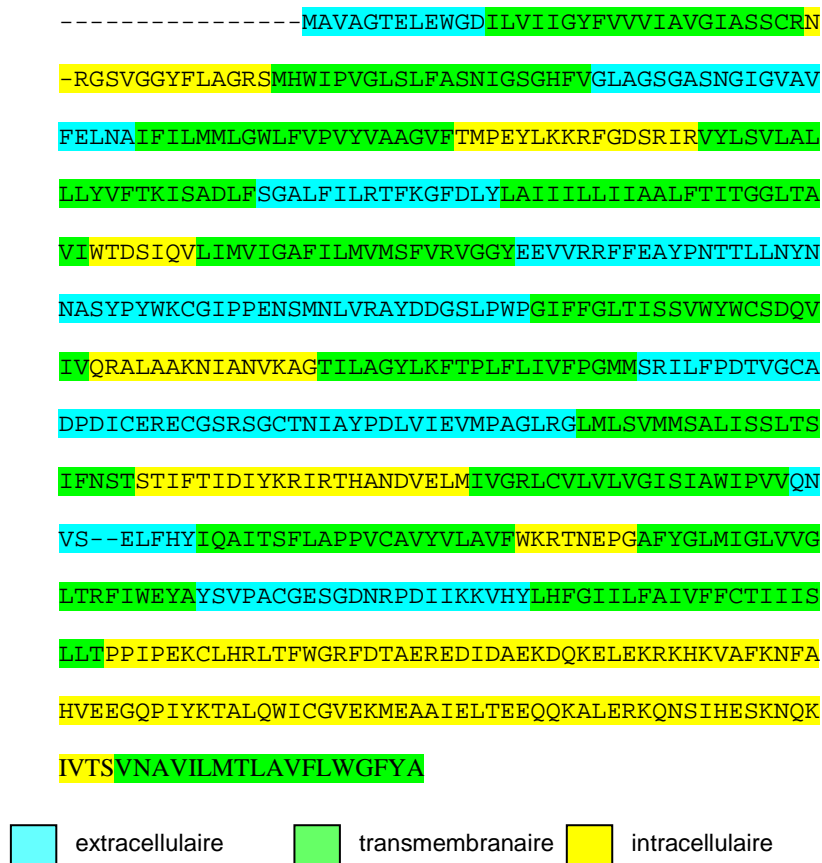


Figure 50. Topologie de la séquence protéique de SGLT de *Crassostrea gigas* (AAT44356).

La protéine SGLT de *Crassostrea gigas* est formée de 653 acides aminés et est constituée de 14 hélices transmembranaires. Son poids moléculaire est de 72 kDa, l'extrémité N-terminale est extracellulaire.



Le pourcentage d'identité de cette protéine avec les autres membres de la famille des SGLTs a été mesuré suite à la réalisation d'un BLAST à partir des banques de données moléculaires disponibles sous Swissprot (**Tableau 9**).

Tableau 9. Pourcentage d'identité entre la séquence protéique de SGLT de l'huître (AAT44356.1) avec les séquences disponibles dans les bases de donnée Swissprot (Expasy).

Séquence	Protéine	Modèle	% d'identité
P13866	SGLT 1	Homme	53%
P53791	SGLT 1	Mouton	53%
P11170	SGLT 1	Lapin	52%
P53790	SGLT 1	Rat	53%
P53792	SGLT 2	Rat	52%
Q92317	SGLT 2	Souris	51%
P31639	SGLT 2	Homme	51%
P26430	cotransport sodium/ nucléoside	Lapin	50%
Q8C3K6	SGLT 1	Souris	52%
P31636	SGLT 3	Cochon	50%
P26429	SGLT 1	Cochon	50%
Q9NY91	SGLT 3	Homme	48%
Q9ET37	SGLT 3	Souris	49%

La protéine SGLT de *Crassostrea gigas* présente une identité élevée avec les trois types de SGLT identifiés chez les mammifères. Le pourcentage d'identité le plus élevé est obtenu avec le SGLT1 humain (53 %). L'alignement multiple (CLUSTALW) de SGLT 1, 2, 3 et SGLT de *Crassostrea gigas* permet de localiser les zones les mieux conservées (**Annexe II**).

Un arbre phylogénétique basé sur l'alignement de 35 transporteurs de la famille SGLT a été réalisé en calculant les distances phylogénétiques par le programme Phylip (**Figure 51**). D'après les résultats, la protéine SGLT de *Crassostrea gigas* se révèle être proche des protéines de cotransport glucose sodium dépendant.



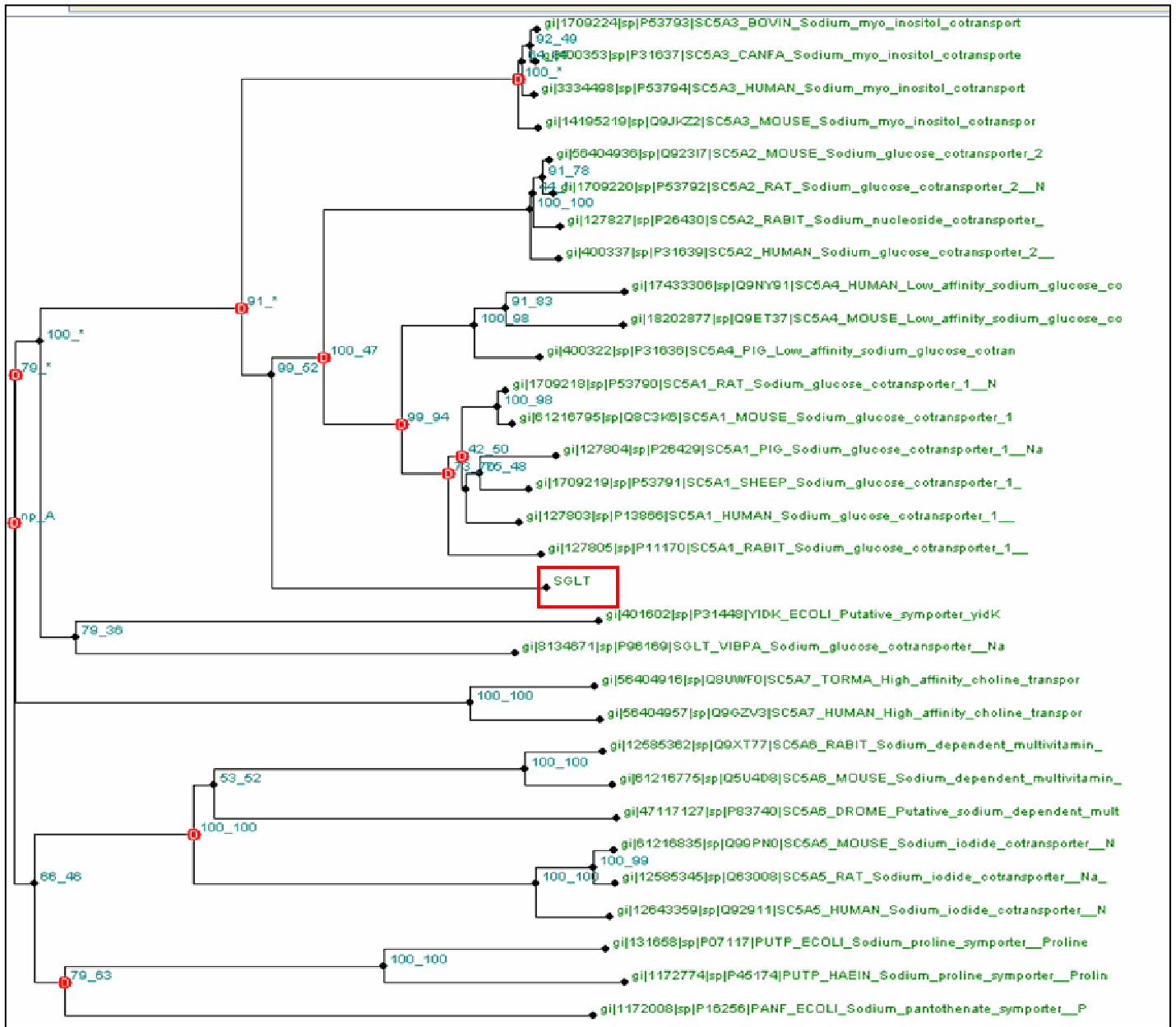


Figure 51. Position de la protéine de SGLT de *Crassostrea gigas* dans l'arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences de 30 transporteurs homologues de la famille SGLT. Le calcul des distances phylogénétiques est réalisé selon le modèle Phylip (Felsenstein, 1989). La longueur des branches reflète le degré de différences des séquences.

#### 4.2. Mesure de l'expression de SGLT dans différents tissus et organe de l'huître

L'expression quantitative des transporteurs de type SGLT par PCR en temps réel a été mesurée sur les ARNm des échantillons de différents tissus de l'huître (Figure 52).



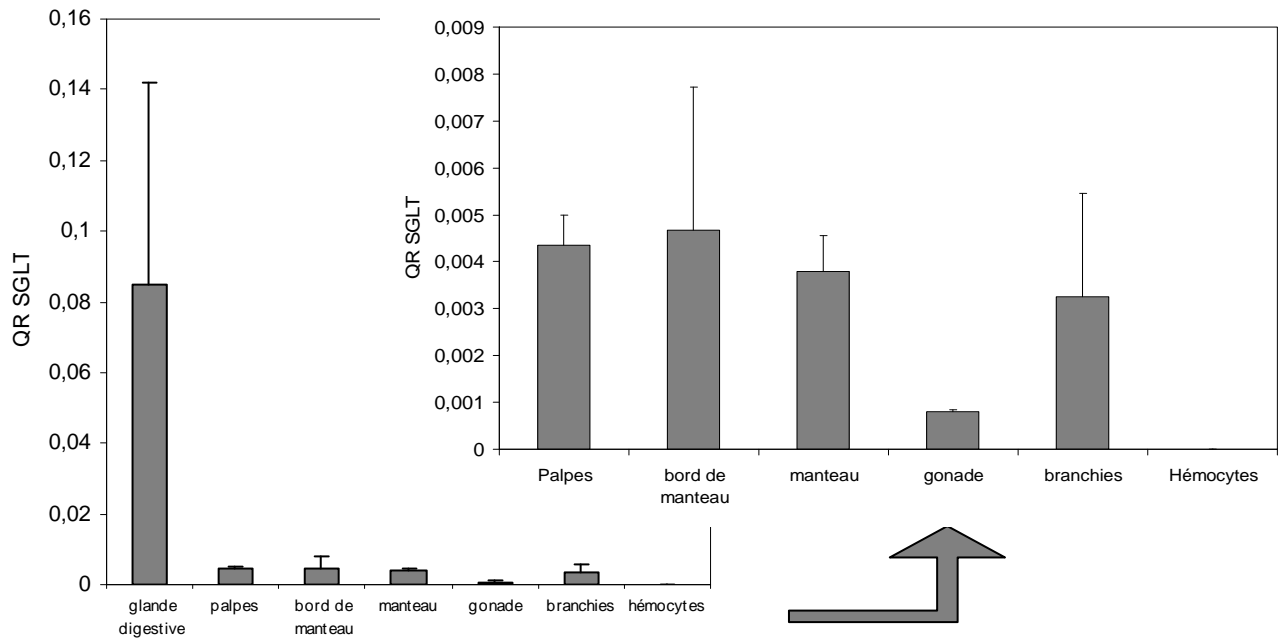


Figure 52. Expression quantitative des ARNm de SGLT mesurée par technique de PCR en temps réel dans différents tissus d'huître. Prélèvement des échantillons en avril 2006.

Les résultats montrent une expression dans les différents tissus extraits, avec des niveaux d'expression variables d'un tissu à l'autre. L'expression est maximale dans la glande digestive et plus faible dans les autres tissus. Il est à noter que tous ces tissus contiennent des cellules vésiculeuses. L'expression de SGLT est plus faible dans la gonade et non mesurable dans les hémocytes.



## PRINCIPAUX RESULTATS

- L'entrée du D-glucose est directement proportionnelle à la quantité de cellules dans les conditions des tests *in vitro*.
- L'entrée du D-glucose au cours du temps est lente, la vitesse d'entrée est maximale pendant la première heure puis diminue légèrement sans toutefois atteindre de saturation nette dans les conditions d'expérimentation.
- L'entrée du D-glucose dans les cellules apparaît comme un phénomène saturable pour les valeurs élevées de la concentration en substrat.
- La température module l'entrée du D-glucose : à faible température l'entrée est ralentie tandis qu'à une forte température le transport est accéléré.
- Le transport du glucose dans les cellules vésiculeuses est caractérisé par deux composantes : une composante de diffusion et une composante saturable avec la concentration en substrat. Les constantes michaéliennes de la composante saturable ont été déterminées :  $K_m = 0,717$  mM et  $V_{max} = 0,226$  nmoles/h/ $10^6$  cellules.
- La cytochalasine B inhibe légèrement l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses, suggérant l'existence de perméases de type GLuT. Cette inhibition est variable : en mai 2004 :  $K_{i\text{ cytochalasineB}} = 2,16$   $\mu$ M, et en avril 2006 :  $K_{i\text{ cytochalasineB}} = 24,57$   $\mu$ M.
- La phlorizine se comporte comme un inhibiteur compétitif et suggère la présence de cotransports de type SGLT dans les cellules vésiculeuses. (en avril 2004 :  $K_{i\text{ phlorizine}} = 0,22$  mM, et en avril 2006 :  $K_{i\text{ phlorizine}} = 0,15$  mM).
- L'effet de différents analogues du D-glucose sur son entrée confirme que le transport dans les cellules vésiculeuses fonctionne grâce à différents systèmes présents simultanément.
- L'effet de la concentration extracellulaire en sodium sur la vitesse d'entrée est conforme à la représentation sigmoïdale de Hill. La transformation de Hill donne  $K_{Na} = 72,5$  mM,  $V_{max} = 0,0215$  nmoles/h/ $10^6$  cellules et  $n = 3,74$ .
- La mesure de l'expression de SGLT par PCR en temps réel montre une variabilité selon les tissus. Les SGLTs sont majoritairement présentes dans la glande digestive, mais également dans les autres tissus contenant des cellules vésiculeuses.



## DISCUSSION

Le premier objectif défini dans le cadre de ce travail concerne l'étude de l'entrée du glucose dans la cellule vésiculeuse, étape limitante pour la suite du processus de mise en réserve du glycogène. Pour caractériser cette entrée dans les conditions physiologiques, il importait en premier lieu de connaître les paramètres du métabolisme cellulaire, et tout particulièrement la glycémie de l'huître.

### ✧ La glycémie

La glycémie est un paramètre complexe à déterminer. Les données bibliographiques sont encore imprécises dans ce domaine. La technique choisie dans cette étude et utilisée pour mesurer la concentration de glucose circulant chez l'huître est délicate car celle-ci nécessite de ponctionner de l'hémolymphe dans la région péricardique, zone fragile qui ne doit pas être mise en contact avec l'eau de mer contenue dans l'animal. Le volume d'hémolymphe prélevé par animal est relativement faible. De plus, les échantillons ne doivent en aucun cas être dilués à cause de la très faible teneur en glucose dans l'échantillon brut initial. Il est donc nécessaire de réaliser des pools de plusieurs animaux afin d'avoir suffisamment d'échantillon pour réaliser le dosage selon le protocole inspiré des travaux de Trinder, (1969), décrit en **Annexe Id**. Les résultats obtenus (**Tableau 8**) présentent de forts écart-types liés à l'importante variabilité interindividuelle mais également à cause de la technique de prélèvement peu précise.

Au sein d'un même phylum, des animaux occupant le même habitat et possédant le même mode de vie peuvent montrer une glycémie très différente. Par exemple chez les crustacés, la concentration en glucose circulant dosée avec le même protocole chez l'écrevisse américaine, *Orconectes limosus*, est de 0,03 mM tandis que chez l'écrevisse de Louisiane, *Procambarus clarkii*, la glycémie atteint 0,9 mM (**Tableau 10**).

Tableau 10. Valeur de la glycémie chez différents organismes marins référencés dans la littérature.

Modèle biologique	Glycémie (mM)	Référence
<i>Orconectes limosus</i>	0,03-0,19 mM	Keller & Orth, 1990
<i>Cancer borealis</i>	0,05-0,49 mM	Glowik <i>et al.</i> , 1997
<i>Carcinus maenas</i>	0,1-0,3 mM	Lüschen <i>et al.</i> , 1993
<i>Mytilus edulis</i>	0,5-1,5 mM	Livingstone & Clarke, 1983
<i>Penaeus monodon</i>	0,77-1,39 mM	Hall & Van Ham, 1998
<i>Cancer pagurus</i>	0,8 mM	Webster, 1996
<i>Procambarus clarkii</i>	0,9 +/-0,2 mM	Garcia <i>et al.</i> , 1993



La concentration de glucose circulant mesurée chez *Crassostrea gigas* est plus faible que celle dosée chez la moule *Mytilus edulis* (Livingstone & Clarke, 1983) mais cette différence est certainement liée à un métabolisme énergétique très différent entre ces deux espèces.

La glycémie mesurée dans l'hémolymphe de *C. gigas* montre des variations saisonnières. Celle-ci est plus élevée en période estivale (0,17 mM) puis elle décroît significativement en automne (0,07 mM, test t de student :  $p=0,034$ ) puis en hiver (0,034 mM, test t de student :  $p=0,042$ ). Un dosage réalisé en 2005 par Hamano et al. présente un profil identique mais les variations observées par les auteurs ne sont pas significativement différentes.

La variation saisonnière du taux de glucose circulant peut-être rapprochée du cycle reproducteur de l'huître creuse. Pendant l'été, l'huître est en période de reproduction, son métabolisme nécessite une source importante en énergie rapidement métabolisable pour répondre à son état physiologique. Tandis qu'en automne et en hiver, l'animal est en repos sexuel, les besoins énergétiques pour le métabolisme général sont plus faibles.

#### ✕ **L'estimation de la concentration cellulaire**

L'estimation de concentration cellulaire dans la suspension est un point essentiel pour comparer les expérimentations et vérifier leur reproductibilité.

Le comptage sur cellule de Thoma permet d'estimer rapidement la concentration cellulaire mais est plus ou moins précis selon la concentration au départ. De plus, il ne tient pas compte de la survie et de l'état physiologique des cellules. Il en est de même pour le dosage de protéine, simple à réaliser mais qui ne donne pas d'information sur la survie cellulaire. Le test MTT basé sur l'activité mitochondriale est quant à lui un test fonctionnel permettant de dénombrer les cellules vivantes. Il constitue de ce point de vue un outil intéressant bien que les données de survie ne soient disponibles qu'au bout de 24 heures de réaction. La colinéarité des trois méthodes permet néanmoins un ajustement constant entre les valeurs du test MTT et le nombre de cellules vivantes, ou bien la quantité de protéines.

D'un point de vue pratique, la répartition en plaque est donc basée sur un dénombrement réalisé à la cellule de Thoma à  $5 \cdot 10^6$  cellules par mL (soit  $2,5 \cdot 10^6$  cellules par puits) et les résultats d'entrée sont corrigés ultérieurement en fonction des résultats du MTT. Enfin, le dosage de protéines reste nécessaire car dans la littérature les valeurs des constantes d'entrée sont souvent exprimées en fonction de la quantité de protéines.

Mais le problème de l'hétérogénéité de la suspension cellulaire demeure. La technique de dissociation de la suspension cellulaire sur gradient de percoll a également été envisagée. Toutefois, cette technique présente un certain nombre d'inconvénients. D'une part, la technique est longue à réaliser, elle nécessite plusieurs passages par centrifugation



qui risque d'endommager l'intégrité cellulaire. D'autre part, le percoll est relativement toxique pour les cellules. Enfin, elle est justifiée dans le cas d'un tissu mixte comme par exemple l'aire gonadique formée à la fois de tubules gonadiques et du tissu de réserve. Mais le rendement de dissociation de ce tissu n'est pas constant, il est plus faible en fin de gamétogenèse. En période de maturation sexuelle, les suspensions de cellules vésiculeuses sont contaminées par des gamètes qui rendent alors difficile la purification de ces cellules (Heude-Berthelin, 2000). C'est pourquoi, il a semblé préférable de limiter les étapes de préparation de la suspension cellulaire en choisissant un tissu formé d'une population cellulaire relativement homogène comme les palpes labiaux.

Dans le but d'étudier les modes d'entrée du glucose chez *Crassostrea gigas*, il a été nécessaire de mettre au point un test biologique permettant l'étude de l'entrée brute du glucose dans les cellules vésiculeuses dissociées.

#### ✕ L'entrée du D-glucose dans les cellules vésiculeuses

En ce qui concerne le choix du traceur radioactif dans le cadre des études du métabolisme glucidique, l'emploi du [U-<sup>14</sup>C] glucose est préférable à celui du [<sup>3</sup>H] glucose du fait de la plus grande stabilité du squelette carboné. Le traceur radioactif retenu est le [U-<sup>14</sup>C] D-glucose car celui-ci permet une mesure significative de l'entrée dans les conditions d'expérimentation choisies. L'entrée du [U-<sup>14</sup>C] 3-O-méthyl-D-glucose atteint rapidement une saturation et son transport est trop faible pour effectuer des analyses cinétiques. De plus, il a été démontré que le 3-O-méthyl-D-glucose est un substrat des transports facilités et qu'il n'est pas transporté par les SGLT2 et SGLT3 (Janicot & Lane, 1989 ; Wright, 2001b). Cet hexose est donc à écarter des études sur le transport global du glucose.

Le mécanisme de transport du D-glucose dans les cellules vésiculeuses apparaît comme un phénomène lent si on le compare avec les systèmes de transports d'hexoses mis en évidence chez les cellules de Vertébrés. En effet, pour les érythrocytes de rat (Craick & Elliot, 1979) et les érythrocytes humains (Naftalin & Holmann, 1977), le temps nécessaire à l'équilibre de l'entrée du glucose varie respectivement entre une minute et quelques secondes. Les résultats obtenus sont toutefois comparables à ceux obtenus chez d'autres Invertébrés (Ahearn & Maginniss, 1977, Lenoir, 1989, **Tableau 6**). La relative lenteur de la saturation de cette entrée peut-être expliquée soit par une diminution de l'affinité des transporteurs pour le glucose soit par une faible activité de l'hexokinase, enzyme qui catalyse la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate.

Les variations du transport du glucose en fonction de la concentration de glucose extracellulaire sont certainement liées aux variations de l'activité des enzymes intervenant dans la cascade du métabolisme du glycogène. Chez la moule *Mytilus edulis*, l'activité de la



glycogène synthétase dans le manteau présente de larges variations saisonnières. L'activité de la forme I active (indépendante de la présence de glucose-6-phosphate) augmente d'un facteur 10 au mois de juin par rapport à la valeur mesurée en décembre ; cette élévation de l'activité coïncide avec la période de stockage du glycogène dans ce tissu (Gabbott & Whittle, 1986). L'augmentation des ressources nutritives et celle du taux de glucose circulant sont probablement impliquées dans cette activation. Les auteurs ont également constatés *in vitro* sur des explants de manteau de *Mytilus edulis* que le glucose active la conversion de la forme D inactive de la glycogène synthétase (dépendante de la présence du glucose-6-phosphate) en forme I active (Whittle & Gabbott, 1986). Cet effet activateur de la synthèse du glycogène par le glucose serait donc lié au cycle sexuel et à la concentration extracellulaire en glucose. Chez l'huître creuse, les travaux de Bacca en 2007 ont mis en évidence une augmentation de la quantité d'ARNm *Cg-HK* (ARNm de l'hexokinase de *Crassostrea gigas*) dans les palpes labiaux lorsque le niveau trophique augmente. L'activité enzymatique correspondante a été mesurée et a montré une augmentation rapide dès le 2ème jour de conditionnement trophique. De la même manière, la quantité d'ARNm *Cg-GYS* (ARNm de la glycogène synthétase de *Crassostrea gigas*) et l'activité de l'enzyme glycogène synthétase sont augmentées sous l'effet du niveau trophique. Une étude *in vitro* de l'effet du glucose sur la synthèse des ARNm *Cg-GYS* a été effectuée sur des cellules vésiculeuses de palpes labiaux dissociées et a permis de révéler un effet dose de la concentration en glucose extracellulaire sur la synthèse des ARNm ; toutefois cet effet ne s'est pas répercuté sur l'activité enzymatique. Selon cet auteur, les huîtres échantillonnées dans le cadre de son étude se situaient à la période limite entre la synthèse du glycogène et le démarrage de la gamétogenèse. Le basculement physiologique de l'huître vers la reproduction pourrait diminuer la capacité de transport du glucose et réduire l'effet du glucose sur les enzymes cytoplasmiques glycogène synthétase et glycogène phosphorylase.

L'entrée du glucose apparaît comme un phénomène saturable pour les valeurs élevées de la concentration en substrat. Ce plateau observé aux fortes concentrations de glucose extracellulaire est certainement dû à la saturation des transporteurs membranaires mais également à une activité saturée des enzymes (hexokinase et glycogène synthétase).

La température d'incubation des cellules (dans une gamme physiologique) module également l'entrée du glucose : à 15°C, l'entrée est significativement mesurable (contrairement à une incubation à 5°C) sans saturation en fonction du temps (comme c'est le cas à 25°C). Il est admis que la température joue à la fois sur la perméabilité des membranes en altérant leur fluidité mais également sur l'activité des enzymes du métabolisme du glycogène. Chez la dorade royale (*Sparus aurata*) les enzymes phosphorylantes du glucose sont sensibles à la température (Enes *et al.*, 2008). L'hexokinase et la glucokinase ont une activité accrue lorsque la température augmente.



L'effet de la concentration extracellulaire du glucose sur son entrée montre que le glucose est transporté par deux systèmes : une composante saturable lorsque la concentration en glucose extracellulaire augmente et une composante non saturable correspondant à la diffusion simple. La mise en évidence d'une cinétique de saturation de l'incorporation du D-glucose en fonction de sa concentration extracellulaire suggère donc l'intervention possible d'un ou de plusieurs facteurs limitants tels que le mécanisme du transport du glucose et l'activité des principales enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation du glycogène. De la même façon, chez *Mytilus edulis*, Lenoir (1989) a pu mettre en évidence l'existence de deux modes de transport du glucose dans la cellule vésiculeuse, une composante de diffusion non saturable et une composante saturable avec la concentration en substrat. Cette composante saturable est le premier indice de l'existence d'un transport facilité (Neame & Richards, 1972). La coexistence de ces deux composantes dans le transport d'hexoses est fréquente chez les Vertébrés (Czeck *et al.*, 1974 ; Wright, 2001b pour revue ; Scheepers *et al.*, 2004 pour revue) mais aussi chez les Invertébrés (Baker & Carruthers, 1981 ; Ahearn *et al.*, 1985 ; Wright *et al.*, 1992 ; Verri *et al.*, 2001 pour revue).

La valeur mesurée de constante d'affinité apparente ( $K_{mapp}$ ) correspond à l'affinité d'un système de transport dont les composantes sont multiples. Les paramètres de cinétique enzymatique mesurés sur les cellules vésiculeuses sont proches de ceux déjà obtenus chez d'autres Invertébrés marins (**Tableau 6**). Les valeurs des constantes michaéliennes,  $K_m = 0,717$  mM et  $V_{max} = 0,226$  nmoles/h/ $10^6$  cellules, sont relativement faibles par rapport à celles mesurées chez la moule *Mytilus edulis* ( $K_m = 7,5$  mM et  $V_{max} = 11,4$  nmoles/h/ $10^6$  cellules, Lenoir, 1989). Cela suggère que le système de transport du glucose présent sur la membrane des cellules vésiculeuses et l'activité des enzymes intervenant dans la métabolisation de ce sucre se caractérisent par une forte affinité pour le substrat mais sont moins efficaces. Chez *Mytilus edulis*, la  $K_m$  du transport du glucose est supérieure aux limites de la concentration en glucose circulant (0 à 1,5 mM), ce qui indique que le transport du glucose est loin de sa capacité maximale dans les conditions physiologiques, permettant ainsi une réponse à toute augmentation éventuelle de la concentration en glucose circulant résultant d'apports nutritionnels. Chez l'huître creuse, la  $K_m$  est très faible et peut mettre en évidence une capacité supérieure du système de transport du glucose dans les cellules de réserve, qui atteindrait sa capacité maximale de transport pour de faibles valeurs de glucose circulant. Ainsi, il paraît intéressant de suivre en parallèle la concentration en glucose circulant et la  $K_m$  du transport du glucose au cours d'un cycle annuel, pour comprendre comment une mise en réserve hivernale est possible alors que le milieu est pauvre en alimentation phytoplanctonique.



L'entrée saturable peut faire appel à deux systèmes d'entrée chez les Eucaryotes : des perméases de type GLuT (Glucose Transporter), qui transportent le glucose dans le sens du gradient de concentration, et des systèmes de cotransport de type SGLT (Sodium-Glucose coTransporter) dont le fonctionnement est couplé à des pompes  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  ATPase (Scheepers *et al.*, 2004). Ces mécanismes de transport ont été mis en évidence grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de l'entrée du D-glucose et d'analogues de cet hexose. Les fortes inhibitions exercées par la cytochalasine B (54% à 10  $\mu\text{M}$  sans toxicité) et la phlorizine (68% à 1 mM sans toxicité) confirment l'existence de plusieurs systèmes de transport. La cytochalasine B réduit significativement l'entrée, suggérant l'existence de perméases de type GLuT. L'effet de la phlorizine témoigne de la présence des co-transporteurs de type SGLTs dans les cellules vésiculeuses de l'huître. Chez de nombreux Invertébrés, on observe la présence simultanée du co-transport actif glucose-sodium et du transport passif facilité de glucose (de type GluT). La composante du transport facilité de glucose dans la cellule de réserve de *Crassostrea gigas* pourrait donc être la résultante de ces deux mécanismes de transport. Comme la littérature le décrit, la phlorizine est un inhibiteur compétitif de l'entrée du glucose à travers les transporteurs sodium-dépendant de type SGLT (Ehrenkranz *et al.*, 2005 pour revue). La constante d'inhibition  $K_i$  mesurée pour la phlorizine est d'environ 0,2 mM chez *C. gigas*. Cette valeur est relativement proche de celle estimée dans les branchies de la moule *Mytilus galloprovincialis* ( $K_i = 153$  nM, Pajor *et al.*, 1989). L'affinité de cet inhibiteur pour son ligand est relativement faible par rapport à celle mesurée dans les entérocytes de Vertébrés car la valeur estimée de  $K_i$  fluctue habituellement entre 5 et 10  $\mu\text{M}$  (Ehrenkranz *et al.*, 2005). Cela suggère que les systèmes de transporteurs de type SGLT chez les Mollusques sont structurellement différents de ceux connus chez les Vertébrés (la phlorizine ne peut alors pas se fixer aussi efficacement sur son ligand) et/ou que la présence d'autres transporteurs sur la membrane facilite le transport du glucose et donc réduit l'efficacité inhibitrice de la phlorizine pour l'entrée du glucose. La constante d'inhibition  $K_i$  mesurée pour la cytochalasine B présente des différences lors des deux études effectuées (en mai 2004 :  $K_{i \text{ cytochalasine B}} = 2,16$   $\mu\text{M}$ , et en avril 2006 :  $K_{i \text{ cytochalasine B}} = 24,57$   $\mu\text{M}$ ). Ce résultat indique l'existence d'une variation de l'affinité des transporteurs de type GLuT pour le glucose. La diminution de cette affinité peut être provoquée par la baisse du nombre de transporteurs présents sur la membrane cellulaire et suggère une régulation de l'entrée au cours de l'année en fonction de l'état physiologique des animaux.

La constante de Hill augmente avec le degré de coopérativité d'une réaction ce qui permet de caractériser une réaction de liaison d'un ligand. Si  $n = 1$ , l'équation de Hill est celle d'une hyperbole, la réaction de liaison du ligand est dite non coopérative. Si  $n < 1$ , la réaction est dite à coopérativité négative : la liaison du ligand diminue l'affinité de E pour les liaisons ultérieures du ligand. Inversement, comme c'est le cas de notre étude, une réaction où  $n > 1$



est à coopérativité positive : la liaison du ligand augmente l'affinité du transporteur pour les liaisons du ligand ultérieures (la coopérativité est infinie si  $n$  est égale au nombre de sites de liaison pour le ligand dans E). L'effet de la concentration extracellulaire en sodium sur le transport du glucose confirme que le transport du glucose est activé en présence d'ions sodium. La valeur estimée de la constante de Hill ( $K_{Na} = 72,5$  mM et  $n = 3,74$ ) démontre la présence d'un système de cotransport sodium-glucose dans les membranes des cellules vésiculeuses. Cette valeur est proche de celle déterminée chez d'autres Invertébrés marins. Chez *Homarus americanus*, le système de cotransport sodium dépendant a été décrit comme particulièrement efficace au niveau de l'hépatopancréas avec un  $K_{Na} = 27,89$  mM et un coefficient de Hill évalué à  $2,96 \pm 0,77$  (Verri *et al.*, 2001). Chez *Mytilus galloprovincialis*, à partir de cellules dissociées de manteau, le coefficient de Hill est proche de celui obtenu chez l'huître creuse et a été estimé à 3,8 (Louzao *et al.*, 1993).

L'entrée de glucose a également été mesurée en présence de divers analogues. Leur effet à forte concentration (5 mM) varie selon les molécules. L'effet compétiteur de ces analogues sur le transport du D-glucose montre la variabilité des systèmes de transport pouvant intervenir dans les cellules vésiculeuses : Le 2-deoxy-D-Glucose et le 3-O-Méthyl-D-Glucose, majoritairement compétiteurs du transport facilité, sont de bons compétiteurs de l'entrée. Le D-glucose et l' $\alpha$ -Méthyl-D-glucopyranoside provoquent également la diminution de la capacité d'entrée du D-glucose en saturant les protéines de type SGLTs. Les cellules vésiculeuses de cette préparation montrent alors des capacités de transport du glucose de type sodium dépendant mais aussi facilité de type GLuT. Le pattern obtenu chez l'huître creuse, D-Glc = 2-Deo-D-Glc = 3-O-Me-D-Glc = glucosamine = D-fucose > D-galactose >  $\alpha$ -Me-D-Glc, est très différent de celui observé dans les branchies de la moule *Mytilus californianus* et dans les vésicules isolées des branchies de *Mytilus edulis* (Pajor, 1989 ; Wright *et al.*, 1992). Chez ces bivalves, le 3-O-Méthyl-D-Glucose, le 2-deoxy-D-Glucose et le L-Glucose ne montrent pas d'effet compétiteur sur le transport du glucose tandis que le D-glucose et l' $\alpha$ -Méthyl-D-glucopyranoside ont un fort effet inhibiteur quant à lui, le D-galactose, présente un effet moindre. Le système de transport du glucose chez l'huître creuse semble donc plus complexe que celui de la moule qui possède un système de transport simplement sodium-dépendant. Une étude réalisée sur les membranes des vésicules de bordure en brosse de *Penaeus japonicas* a montré une forte compétition du transport avec un spectre plus large d'analogues (phlorizine >  $\beta$ -Méthyl-D-glucopyranoside =  $\alpha$ -Méthyl-D-glucopyranoside = D-Glucose > 3-O-Méthyl-D-Glucose = 2-deoxy-D-Glucose > D-galactose > glucosamine).

Ces éléments mettent en évidence que le système de transport saturable du glucose dans les cellules vésiculeuses de l'huître creuse, fait intervenir très certainement différents types de transporteurs : des transporteurs SGLTs mais également des transporteurs de type



GLuT. Une régulation du nombre et du fonctionnement de ces transporteurs GLuTs et SGLTs est essentielle pour le maintien d'un taux de glucose adapté dans les cellules orientées vers la mobilisation ou la mise en réserve du glycogène. Les mécanismes cellulaires qui modulent la captation du glucose sont complexes. Chez les vertébrés, avant d'être métabolisé, le glucose sanguin doit franchir plusieurs barrières cellulaires pour finalement atteindre le cytoplasme de la cellule. Il doit notamment être transporté du sang vers l'espace interstitiel et ensuite vers l'espace intracellulaire. Le mouvement du glucose des capillaires sanguins vers l'intérieur de la cellule est déterminé principalement par le flot sanguin via le recrutement des capillaires, le gradient de concentration du glucose mais aussi par le nombre et l'activité des transporteurs de glucose mobilisés à la surface cellulaire par l'insuline et la contraction musculaire.

La régulation peut porter sur l'entrée du glucose dans la cellule et/ou sur la cascade enzymatique du métabolisme du glycogène. Les transporteurs membranaires de glucose peuvent varier en nombre en fonction de la concentration de glucose libre. Il est désormais admis que sous l'effet de l'insuline, des vésicules contenant des transporteurs GLUTs s'internalisent dans la membrane cellulaire pour favoriser le transport du glucose (Martin *et al.*, 2000). De plus, il a également été démontré que le transport des SGLTs était régulé par les protéines kinases par exo- et endocytose (Turk & Wright, 1997). L'activité des enzymes du métabolisme du glycogène est également soumise à des régulations liées au taux de glucose. Chez les Vertébrés, le glucose provoque une augmentation de la synthèse du glycogène dans le foie en induisant l'inhibition de la glycogène phosphorylase et l'activation concomitante de la glycogène synthétase (Stalmans *et al.*, 1974). Chez les Invertébrés, les études portant sur l'effet du glucose et du Glucose-6-phosphate sur le métabolisme du glycogène sont peu nombreuses. Chez la moule *Mytilus edulis*, le glucose fut décrit comme le principal métabolite de régulation du métabolisme du glycogène (Mathieu & Lubet, 1993). Chez l'huître *Crassostrea virginica*, le glucose provoque l'augmentation de l'activité de la glycogène synthétase I dans les homogénats de muscle (Swift *et al.*, 1988). Chez *Crassostrea gigas*, l'incorporation du glucose dans le glycogène dans les cellules vésiculeuses est augmentée en présence de glucose à 1,5 mM (Berthelin *et al.*, 2000a).

Chez *Crassostrea gigas*, la séquence d'un transporteur de glucose de type SGLT a déjà été identifiée (Huvet *et al.*, 2004) et permet de mesurer son expression. La mise au point et la validation de la quantification absolue des ARNm par PCR en temps réel ont été effectuées par Amine Naimi en 2004 avec la collaboration de Arnaud Huvet. La quantification d'ARNm en PCR temps réel permet de se placer au niveau d'une des régulations les plus précoces : la régulation transcriptionnelle. La molécule fonctionnelle reste la protéine et la réponse protéique devra nécessairement être abordée. La mesure de l'expression des



ARNm cibles a été normalisée avec un autre ARNm, dont le niveau de transcription est supposé être stable. Le choix de l'actine, une protéine du cytosquelette, s'est imposé comme le plus pertinent car des mesures réalisées sur différents tissus et organes d'huîtres et à différentes périodes de l'année par Farcy (2006) ont révélé une très faible variation de son expression. Ainsi les résultats sont exprimés en relatif par rapport à l'ARNm de ce gène.

#### ✱ **La mesure d'expression de SGLT**

La mesure de l'expression quantitative des transporteurs de type SGLT par PCR en temps réel sur des ARNm de différents tissus d'huîtres montre une répartition relativement hétérogène de ce transporteur : cette expression est très élevée au niveau de la glande digestive ce qui suggère la présence probable d'un transport polarisé du glucose dans les cellules digestives comme celui des entérocytes chez les vertébrés. Pour les autres tissus testés, l'expression est beaucoup plus faible, mais toujours plus importante dans les tissus riches en cellules vésiculeuses comme les palpes, les branchies. L'expression mesurée dans la région gonadique est faible. Toutefois, il faut rappeler que cet organe est constitué de tissu de réserve mais également de tubules gonadiques pouvant évoluer pendant l'année (de 0 à 100 %). Le prélèvement des organes et tissus pour cette étude a été effectué en avril alors que la gonade est en gamétogenèse et le tissu de réserve se résorbe en faveur des tubules gonadiques. Pour mesurer l'expression de SGLT spécifiquement dans le tissu de réserve de la région gonadique, il est intéressant d'isoler les cellules vésiculeuses. Ceci pourra être réalisé par la technique de microdissection laser sur coupe de gonade à différentes périodes de l'année afin de suivre son expression au cours de l'évolution de la reproduction chez les huîtres.

**En conclusion, un modèle hypothétique du transport du glucose à travers la membrane des cellules vésiculeuses de l'huître *Crassostrea gigas* peut être représenté, faisant apparaître les différentes protéines intervenant dans le transport du glucose mais également les enzymes des voies métabolique de synthèse et de dégradation du glycogène étudiées par Bacca (2007) :**



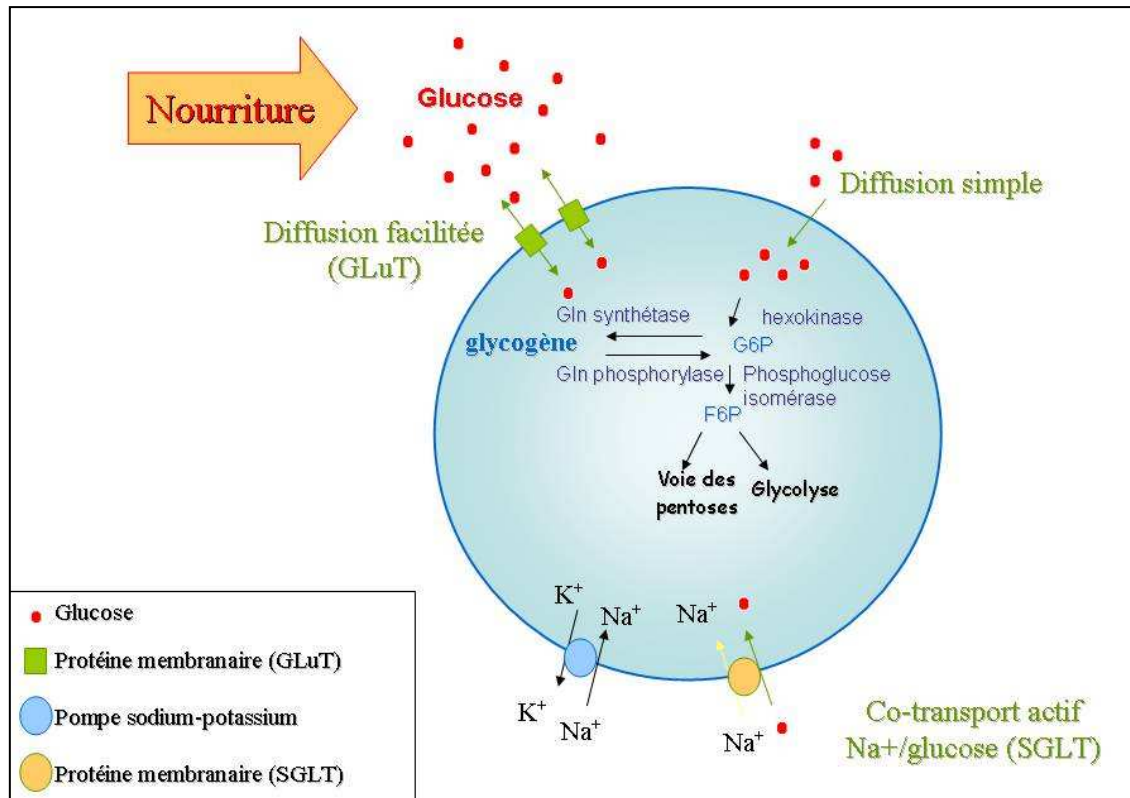


Figure 53. Représentation schématique des mécanismes de transport du glucose dans une cellule vésiculeuse.



**Perspectives :**

*En bilan de cette étude, quelques expérimentations mériteraient d'être amorcées afin de compléter nos connaissances sur le métabolisme du glycogène chez l'huître creuse et plus particulièrement sur le système de transport du glucose dans les cellules vésiculeuses :*

- *Tout d'abord, il serait intéressant de réaliser un suivi annuel de la glycémie afin de vérifier les variations saisonnières observées du glucose circulant dans l'hémolymphe. Il pourrait être également envisagé, dans le cadre d'une étude expérimentale de conditionnement d'animaux, d'étudier l'effet du niveau trophique sur la glycémie et cela à différentes périodes de l'année (lors des deux périodes d'inversion métabolique du glycogène : au printemps, lors de la mobilisation et en automne, lors de la mise en réserve).*
- *Ensuite, un suivi saisonnier des paramètres d'entrée et de la mesure des constantes Michaéliennes ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$ ) pourrait être mis en place aux différentes périodes de l'année : au printemps, lorsque les réserves en glycogène sont mobilisées en faveur de la gamétogenèse ; en été, lors de la période de reproduction, lorsque les réserves sont au plus bas et que les animaux atteignent leur maturité sexuelle et en automne, lorsque le métabolisme du glycogène bascule vers l'accumulation des réserves en glycogène (croissance somatique et régression des tubules gonadiques (Heude-Berthelin et al., 2001)).*
- *De plus, il est évident que la recherche d'une protéine apparentée aux GluTs, qui a débuté dans le cadre de cette thèse, doit se poursuivre car les résultats présentés dans ce manuscrit ont permis de rassembler de nombreux indices sur l'existence potentielle de ces protéines dans les cellules vésiculeuses.*

Ce chapitre a permis de caractériser les paramètres d'entrée du glucose et de mettre en évidence la présence de différents systèmes de transport dans les cellules vésiculeuses chez *Crassostrea gigas*. Les résultats ont montré l'existence d'une variation de la glycémie et de la capacité d'entrée du glucose, suggérant la présence d'un contrôle des mécanismes de transport. Dans l'optique d'approfondir la compréhension du métabolisme du glycogène, un suivi saisonnier a été mis en place en ciblant deux périodes clés où apparaissent des changements d'orientation de ce métabolisme (mobilisation/ mise en réserve) et en période estivale lorsque les animaux sont à maturité sexuelle.



**CHAPITRE II**  
**VARIATIONS SAISONNIERES DE LA**  
**GAMETOGENESE ET DU METABOLISME DU**  
**GLUCOSE ET EFFET DU NIVEAU TROPHIQUE**  
**SUR LA GESTION DES RESERVES**



**CHAPITRE II. VARIATIONS SAISONNIERES DE LA GAMETOGENESE ET DU METABOLISME DU  
GLUCOSE ET EFFET DU NIVEAU TROPHIQUE SUR LA GESTION DES RESERVES 103**

---

<b>INTRODUCTION</b>	<b>105</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>112</b>
<b>1. Suivi saisonnier du métabolisme énergétique et de la reproduction</b>	<b>112</b>
1.1. Suivi des paramètres environnementaux	112
1.2. Suivi biométrique des animaux	112
1.3. Suivi histologique de la gamétogenèse	113
1.4. Approche du métabolisme du glycogène	115
<b>2. Effet du niveau trophique sur le métabolisme énergétique et la reproduction</b>	<b>117</b>
2.1. Suivi des paramètres environnementaux	117
2.2. Suivi histologique de la gamétogenèse	117
2.3. Approche du métabolisme du glycogène	119
<b>PRINCIPAUX RESULTATS</b>	<b>121</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>122</b>



## II. VARIATIONS SAISONNIERES DE LA GAMETOGENESE ET DU METABOLISME DU GLUCOSE ET EFFET DU NIVEAU TROPHIQUE SUR LA GESTION DES RESERVES

### INTRODUCTION

Chez l'huître creuse, le caractère saisonnier de la mise en réserve du glycogène a déjà été démontré par différentes approches : dosages biochimiques (**Figure 54a**), analyse stéréologique (**Figure 54b**), suivi *in vitro* de l'incorporation du glucose dans le glycogène (**Figure 54c**) (Heude-Berthelin, 2000). Il est apparu qu'en période estivale, les réserves énergétiques sont au plus bas alors que la période hivernale permet une reconstitution des réserves en glycogène. Or, ce glycogène joue un rôle central comme support énergétique de la gamétogenèse (Berthelin *et al.*, 2000a) chez l'huître comme chez de nombreux autres mollusques bivalves (Gabbott, 1975 ; Bayne *et al.*, 1982 ; Gabbott & Whittle, 1986 ; Ruiz *et al.*, 1992 ; Mathieu & Lubet, 1993) et l'on peut donc supposer que la capacité des animaux à mettre en réserve ou à mobiliser le glycogène jouera un rôle primordial dans la réussite de la gamétogenèse. Dans un tel système, tout facteur, interne ou externe, susceptible d'agir sur le métabolisme du glycogène interfère indirectement dans le déroulement de la gamétogenèse (Maurer & Borel, 1986). L'objectif de ce chapitre sera donc de préciser chez *Crassostrea gigas* le lien entre le métabolisme du glycogène et la gamétogenèse à différentes périodes clés du cycle biologique, mais également d'évaluer l'impact de facteurs environnementaux susceptibles d'influer sur ce métabolisme saisonnier.

Chez la moule, le cycle du glycogène apparaît comme un phénomène opportuniste liée à l'apport phytoplanctonique dans la mesure où la mise en réserve se produit en été et en automne pendant la période de repos sexuel alors que la mobilisation du glycogène a lieu en période hivernale (Mathieu & Lubet, 1993 ; Blanco *et al.*, 2006). Chez cette espèce, les principaux facteurs de régulation de la mise en réserve semblent être le taux de glucose circulant (Mathieu & Lubet, 1993) et la charge énergétique adénylique (San Juan Serrano *et al.*, 1991). En 1986, Whittle et Gabbott ont mis en évidence sur des préparations de coupes de manteaux de moules que l'activité de la forme I de la glycogène synthétase (G6P indépendante) est augmentée en présence de glucose. Les mêmes auteurs, (Gabbott & Whittle, 1986), ont également suggéré un possible rôle inhibiteur du glycogène sur l'activité de la glycogène synthétase. Par ailleurs, San Juan Serrano *et al.*, (1998b), ont démontré l'implication du glucose et du glucose-6-phosphate comme régulateurs de l'activité de la glycogène phosphorylase forme b (non phosphorylée) du manteau de moule. Cette même enzyme est également régulée par la charge énergétique adénylique (AMP versus ATP)



(Ebberink & Salimans, 1982 ; San Juan Serrano *et al.*, 1995, 1998a ; Diaz Enrich & Ibarguren, 2003).

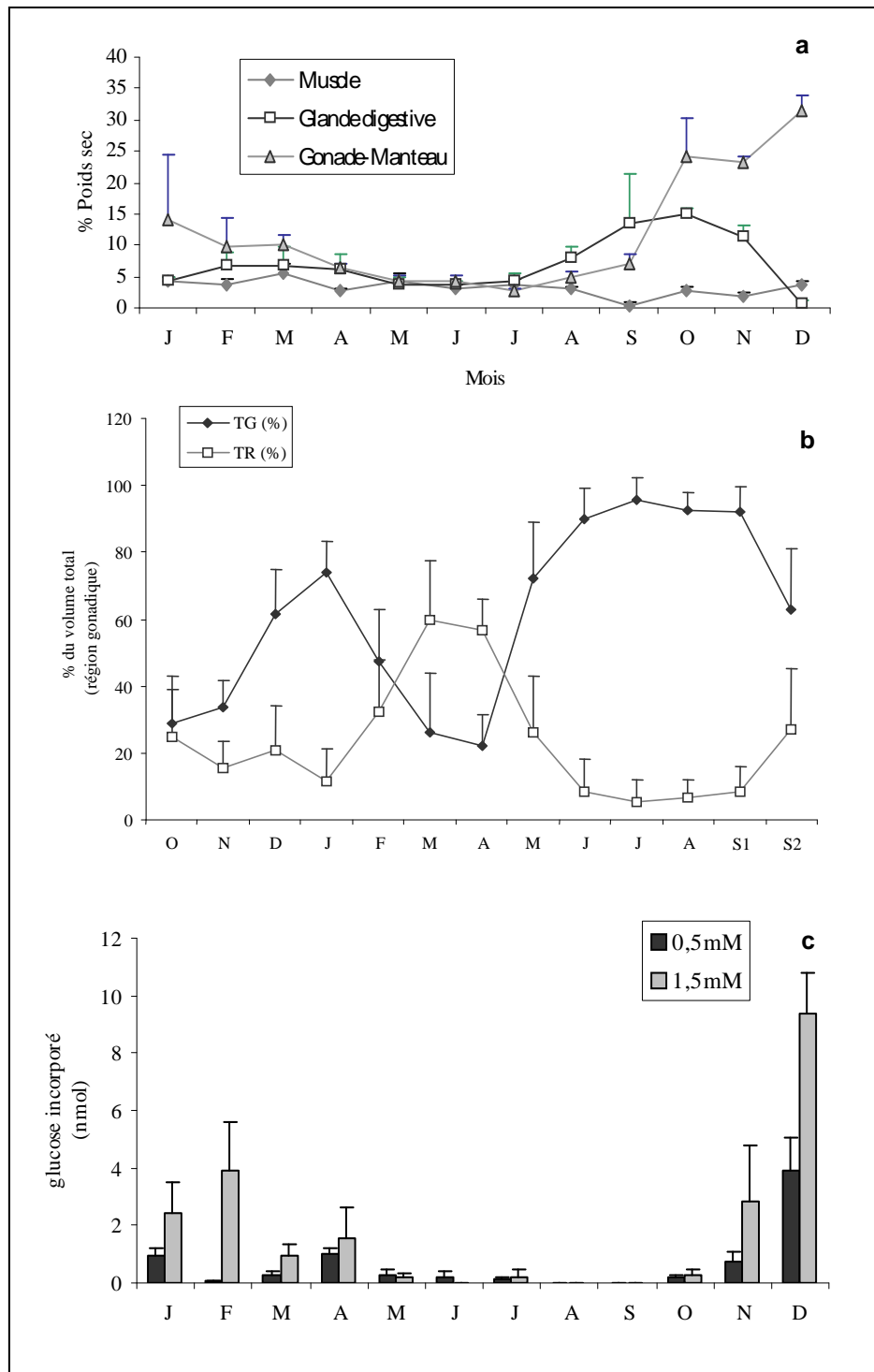


Figure 54. Caractère saisonnier de la mise en réserve chez l'huître creuse *C. gigas*.

a: Variations saisonnières du contenu en glycogène au niveau du muscle adducteur, de la glande digestive et de la région gonade-manteau. (% du poids sec) (Berthelin *et al.*, 2000b).

b: Analyse stéréologique : pourcentage de volume total occupé par le tissu de réserve (TR) et les tubules gonadiques (TG) (Heude Berthelin *et al.*, 2001).

c: Variations saisonnières de l'effet de la concentration en glucose extracellulaire sur l'incorporation du glucose dans le glycogène des cellules vésiculeuses isolées. Résultats exprimés en nanomole de glucose incorporé dans le glycogène. Concentration cellulaire :  $5 \cdot 10^6$  cellules / ml. Temps d'incubation : 7 heures (Berthelin *et al.*, 2000b).



Chez l'huître creuse, le fonctionnement du métabolisme énergétique est indéniablement plus complexe : paradoxalement, la mise en réserve a lieu en hiver, chez *Crassostrea gigas*, au moment où l'apport phytoplanctonique est faible et la mobilisation est associée à la période des efflorescences phytoplanctoniques printanières et estivales. L'orientation du métabolisme du glycogène ne reflète donc pas strictement l'augmentation des métabolites circulants due aux pics de phytoplancton (Berthelin *et al.*, 2000a), il est le résultat d'une régulation complexe intégrant à la fois le stade physiologique de l'animal, les paramètres environnementaux et des régulateurs internes.

L'effet des paramètres environnementaux a fait l'objet de plusieurs études, il en ressort que leur action peut porter sur la stratégie d'allocation des ressources mais également sur la gamétogenèse :

✂ De nombreux travaux ont montré l'influence de la **température** sur le métabolisme énergétique chez les bivalves. Il est admis que la température modifie la perméabilité membranaire et influence par ce fait la capacité de transport du glucose à travers la membrane cellulaire. Chez *Mytilus galloprovincialis*, l'activité enzymatique de la glycogène phosphorylase, intervenant dans la voie de dégradation du glycogène, est soumise aux variations de température (San Juan Serrano *et al.*, 1998c). Chez *Crassostrea gigas*, il existe peu d'informations sur l'effet de la température sur le métabolisme énergétique. Une étude réalisée sur le naissain de *C. gigas* a montré que le taux de sucres a tendance à diminuer lorsque la température augmente (Flores-Vergara *et al.*, 2004). En 1979, Mann avait déjà montré une réduction de la teneur en sucres aux températures élevées, l'auteur suggère que les sucres pourraient être mobilisés aux fortes températures afin de soutenir les dépenses énergétiques des animaux. La température agit également sur la gamétogenèse : c'est un facteur principal dans la régulation de la plupart des étapes de la gamétogenèse (réinitiation, maturation et ponte). Des suivis réalisés sur le milieu naturel ont montré la corrélation entre les faibles températures et la réinitiation de la gamétogenèse de *C. gigas* (Ruiz *et al.*, 1992 ; Steele & Mulcahy, 1999). La maturation gonadique de *Crassostrea gigas* est stimulée par des températures élevées de l'eau de mer (~ 20 °C) (Mann, 1979 ; Chávez-Villalba *et al.*, 2003).

✂ Concernant l'effet de l'**hypoxie** sur le métabolisme glucidique, David *et al.* (2005) ont montré que lors d'un stress hypoxique l'expression du gène de la glycogène phosphorylase est augmentée dans les branchies et le manteau ; ce



résultat suggère que le glycogène fournirait l'énergie nécessaire pour supporter cette situation de stress anoxique. Plus récemment, Le Moullac *et al.* (2007) ont confirmé l'effet de l'anoxie sur le métabolisme glucidique à travers le suivi de l'expression et de l'activité de la pyruvate kinase (PK) et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) au niveau du muscle. La baisse d'expression de la PK et l'augmentation de la PEPCK indiquent un switch du métabolisme aérobie au métabolisme anaérobie, mais ne peuvent être complètement dissociées d'un effet nutritionnel dans la mesure où les animaux placés en situation d'hypoxie réduisent leur alimentation par rapport aux témoins, ce qui illustre la complexité du contrôle de ces voies métaboliques.

✂ Le **facteur trophique** reste un facteur clé de la régulation des réserves en glycogène. Une approche *in vitro* a montré que le métabolisme du glycogène des cellules vésiculeuses chez *Crassostrea gigas* est lié à la concentration en glucose extracellulaire (Berthelin, 2000). L'élévation du taux de glucose stimule la capacité de mise en réserve de ces cellules en période de stockage du glycogène. En effet, l'activité des enzymes du métabolisme du glycogène est fonction du niveau trophique. Bacca (2007) a montré l'effet du niveau trophique sur l'activité des enzymes des voies de synthèse du métabolisme du glycogène. L'activité de l'hexokinase et de la glycogène synthétase est augmentée lorsque le milieu nutritionnel est riche. Le niveau trophique contrôle également le déroulement de la gamétogenèse. Le nombre et la qualité des gamètes produits dépendent du milieu trophique (Chávez-Villalba *et al.*, 2003). Dans les zones trophiques très riches, qualifiées eutrophe, Mori (1979) et Kang *et al.* (2000) ont montré que le développement gonadique de l'huître est accru. A contrario, une déficience en nourriture printanière semble retarder la maturation de la gonade et provoquer un risque de décalage de la ponte (Deslous-Paoli *et al.*, 1982). Une étude réalisée en 2004 par Enriquez-Diaz en conditions artificielles confirme que la concentration en phytoplancton interfère dans l'évolution de la gamétogenèse : en conditions de faible alimentation, les huîtres présentent une gonade réduite avec une émission totale des gamètes en été ; dans le cas d'une alimentation riche, les huîtres développent une gonade hypertrophiée mais la ponte est quant à elle partielle. La résorption des gamètes résiduels, susceptibles de retarder la réinitiation du cycle reproductif suivant serait également liée à l'abondance des ressources trophiques (Robinson, 1992 ; Chávez-Villalba, 2001).



En association avec les facteurs environnementaux, un contrôle de la gestion du glycogène en corrélation avec le cycle de reproduction par des régulateurs internes de type neuroendocriniens est également probable ; plusieurs familles de molécules, décrites chez les vertébrés et invertébrés, sont susceptibles d'intervenir dans ces régulations, même si à ce jour, peu de données sont répertoriées sur l'effet des molécules hétérologues ou homologues chez les mollusques bivalves, en partie en raison de l'absence de lignées cellulaires établies chez les bivalves.

- **La superfamille des insulines :** Connues pour leurs effets multiples et particulièrement bien conservés au cours de l'évolution (Claeys *et al.*, 2002 pour revue), les insulines-like ont été décelées par immunodétection au niveau de l'épithélium digestif chez *Ostrea edulis* (De Martinez *et al.*, 1973) et chez *Mytilus edulis* (Fritsch *et al.*, 1976) et dans les ganglions nerveux chez la moule (Kellner *et al.*, 2002). Chez *Mytilus edulis*, l'insuline a montré un effet hypoglycémiant (Madar *et al.*, 1979 ; Plisetskaya *et al.*, 1979). Chez l'huître creuse, l'insuline porcine stimule *in vitro* l'incorporation du glucose en glycogène dans les cellules vésiculeuses dissociées et montre un effet hypoglycémiant (Heude-Berthelin, 2000). En 2003, Gricourt et ses collaborateurs ont identifié un récepteur aux insulines-like chez *Crassostrea gigas* (CIR) et ont mis en évidence son expression au niveau des palpes labiaux, mais également dans les bords de manteau et la gonade. En 2005, Hamano *et al.* ont identifié un cDNA d'insuline-like chez l'huître *C. gigas* (nommé oIRP) à partir d'une banque de ganglions viscéraux. Le profil annuel d'expression semble corrélé à la période de mobilisation du glycogène, de forte croissance et de gamétogenèse active.
- **La famille du glucagon** dont la fonction hyperglycémiante est largement décrite chez les vertébrés est également présente et active chez les invertébrés (Thorpe & Duve, 1984 ; Maier *et al.*, 1990). Chez les mollusques bivalves, une étude immunologique a permis de localiser un immunomarquage vis-à-vis d'un anticorps anti-glucagon de vertébrés au niveau des ganglions nerveux chez la moule (Kellner *et al.*, 2002). Ce glucagon hétérologue exerce un effet hyperglycémiant chez *Crassostrea gigas* en provoquant une inhibition significative de l'incorporation du glucose en glycogène (Heude-Berthelin, 2000).
- **La voie leptine-neuropeptide Y** est également connue pour son rôle régulateur de la balance énergie-reproduction (Schneider, 2004). Des peptides apparentés au neuropeptide Y ont été identifiés chez les invertébrés dont le mollusque gastéropode *Lymnea stagnalis* (De Jong-Brink *et al.*, 2001 pour revue) où il interviendrait dans la régulation de la croissance et de la reproduction.



- **D'autres facteurs autologues :** L'effet d'extraits de ganglions de *Mytilus edulis* a été montré sur la mobilisation du glycogène (Herlin-Houtteville & Lubet, 1974, Mathieu, 1987) et sur l'incorporation du glucose dans le glycogène (Robbins *et al.*, 1990, 1991) mais les facteurs impliqués n'ont pas été identifiés.

Le métabolisme énergétique chez l'huître est donc le reflet de mécanismes de régulation sous l'influence des paramètres environnementaux et internes (**Figure 55**).

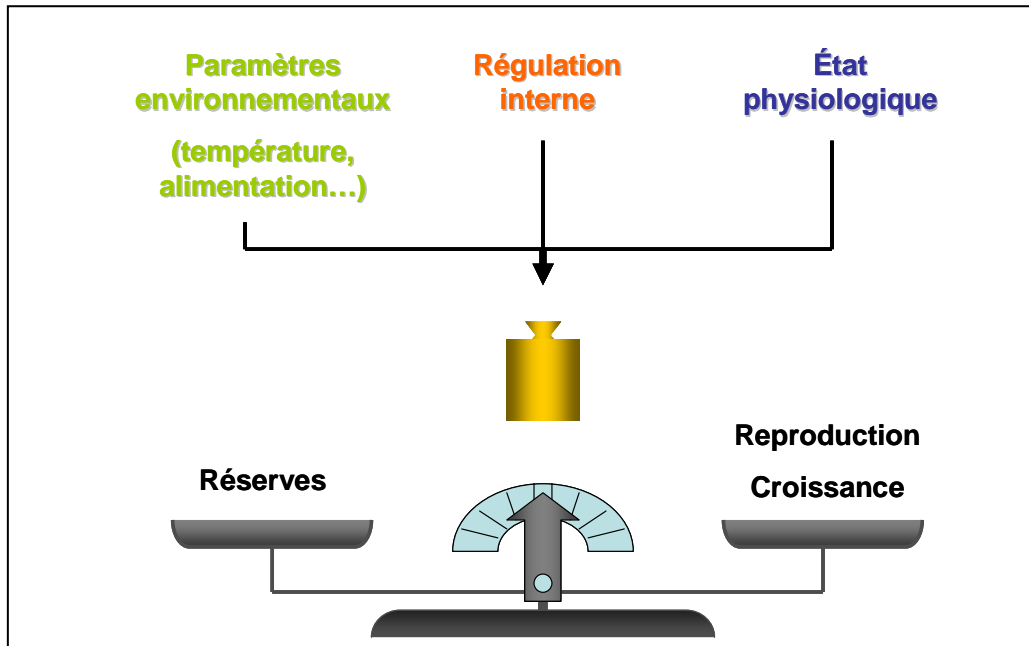


Figure 55. Equilibre du métabolisme énergétique chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* régit par des mécanismes de régulation externes et/ou internes.

Dans un premier temps, cette étude a eu pour objectif de suivre les variations saisonnières conjointes du métabolisme du glycogène et du développement gamétogénétique à différentes périodes clés pour préciser l'état de la balance réserve-gamétogénèse

- En automne (octobre-novembre), lors de la restructuration du tissu de réserve et du repos sexuel ;
- Au printemps (mars-avril) période de reprise de la gamétogénèse et de mobilisation du glycogène ;
- En été, alors que les huîtres ont atteint leur maturité sexuelle et que les réserves en glycogène sont au plus bas.

A ces mêmes périodes, la possibilité de placer les huîtres en mésocosme au sein de structures pilotes du **Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral (SMEL)** de Blainville-sur-mer (50), en conditions d'alimentation strictement contrôlées, a offert la possibilité d'évaluer



l'impact des conditions trophiques sur les réserves et sur la gamétogenèse en fonction de l'état physiologique des animaux, et ainsi d'apporter des éléments de réponse au problème complexe de la régulation de la balance réserve-reproduction chez l'huître.

Cette étude sur les variations saisonnières de la gamétogenèse et du métabolisme du glucose et l'effet des conditions trophiques sur la gestion des réserves chez l'huître *Crassostrea gigas* a pour objectif de répondre à différentes questions :

- Quel(s) type(s) de régulation peut (peuvent) expliquer les variations de l'orientation du métabolisme du glycogène pendant les périodes clés du cycle de reproduction chez l'huître ?
- Quels sont les phénomènes de régulation nutritionnelle du métabolisme du glycogène *in vivo* ?



## RESULTATS

### 1. Suivi saisonnier sur estran

#### 1.1. Suivi des paramètres environnementaux

Les paramètres environnementaux sur le site de la Baie des Veys ont été relevés pendant la période du suivi par l'équipe de l'IFREMER de port en Bessin (Michel Ropert). Les résultats (température, salinité et chlorophylle a) figurent en **ANNEXE III**.

#### 1.2. Suivi biométrique des animaux

Le poids total, le poids de la masse viscérale et le poids sec de la coquille ont été mesurés sur 10 animaux prélevés sur l'estran de la Baie des Veys lors du printemps, de l'été et de l'automne 2005 (**Figure 56**).

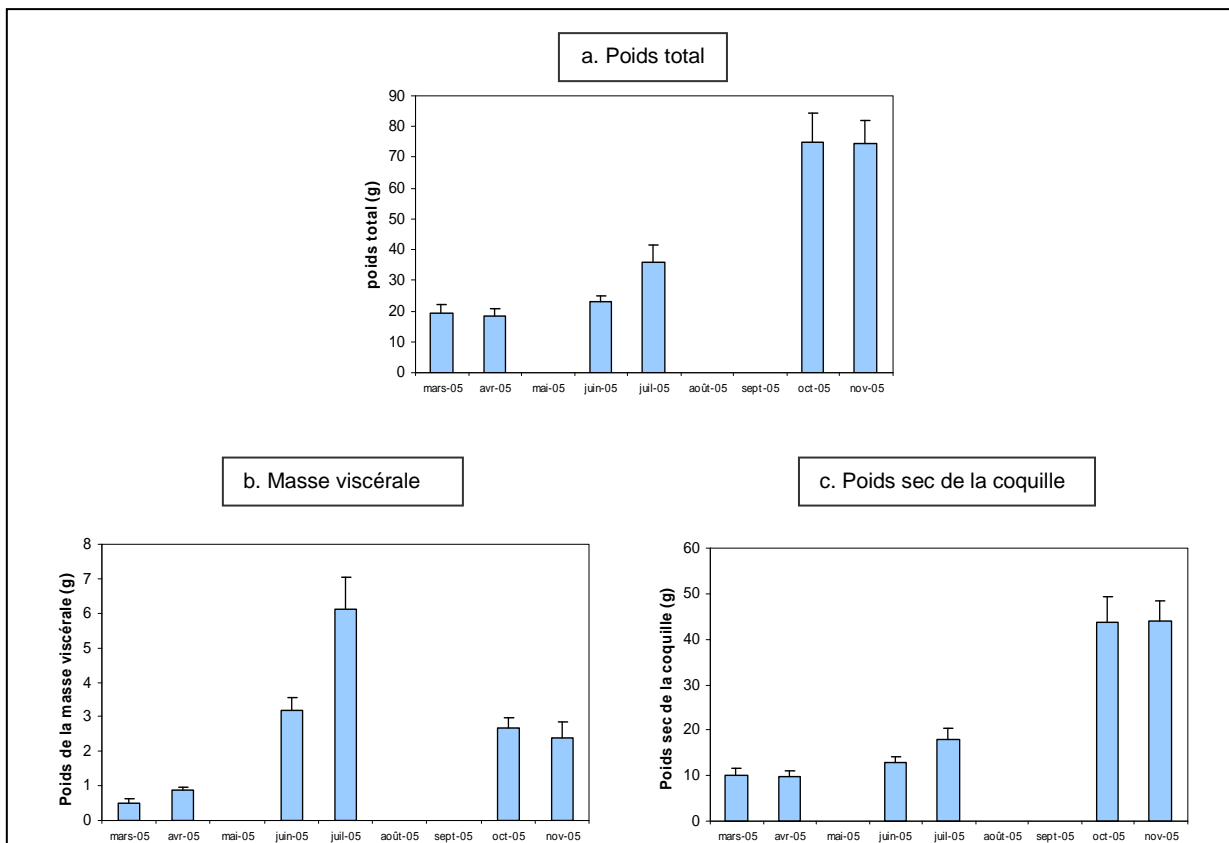


Figure 56. Suivi des mesures biométriques des animaux en Baie des Veys aux 3 périodes suivies. (n=10).

- a. Poids total moyen en g.
- b. Poids moyen de la masse viscérale en g.
- c. Poids sec moyen de la coquille en g.

Le suivi montre une augmentation du poids total entre juin et juillet (57 %) mais surtout entre juillet et octobre (plus de 100 %). L'évolution de la masse viscérale entre juin et



juillet permet d'associer l'augmentation du poids total à la maturation des animaux. En revanche, l'augmentation du poids total entre juillet et octobre est clairement associée à la pousse coquillère très nette sur le graphique **56c**, alors qu'à cette même période, le poids de la masse viscérale diminue considérablement, du fait de l'émission des gamètes.

### 1.3. Suivi histologique de la gamétogenèse

#### ▪ Approche qualitative :

Une analyse histologique qualitative individuelle réalisée sur un lot de 10 animaux a permis de caractériser les stades de gamétogenèse et du tissu en réserve au printemps, en été et en automne 2005. Les résultats sont reportés sur le **Tableau 11**.

*Tableau 11. Suivi des stades de gamétogenèse et du tissu de réserve.*

*(En gras, les stades majoritaires ; Gam. Résid. : Nombre d'individus dont les tubules gonadiques contiennent de nombreux gamètes résiduels ; herma. : Nombre d'individus hermaphrodites ; Situa. Part. : Situation particulière).*

	Stades de gamétogenèse				Gam. Résid.	Situa. Part.	Stades du tissu de réserve			
	0	I	II	III			A	B	C	D
<b>Mars 05</b>	<b>6</b>	4					4	<b>5</b>	1	
<b>Avril 05</b>	3	<b>5</b>	2					<b>5</b>	<b>5</b>	
<b>Juin 05</b>			3	<b>7</b>		2 herma.			2	<b>8</b>
<b>Juillet 05</b>				<b>10</b>						<b>10</b>
<b>Octobre 05</b>	<b>10</b>				1		3	<b>7</b>		
<b>Novembre 05</b>	7	2	1				3	<b>7</b>		

En mars 2005, la réinitiation de la gamétogenèse a lieu pour 4 animaux sur 10 et le tissu de réserve est restructuré ou en cours de restructuration. La gamétogenèse va évoluer progressivement tout au long du printemps et jusqu'en juillet où les animaux ont tous atteint la maturité sexuelle et sont prêts à émettre les produits génitaux. Deux animaux hermaphrodites ont été observés en 2005.

Le développement du tissu de réserve est inverse par rapport à celui des tubules gonadiques : à partir du mois d'avril, le tissu décroît dans l'aire gonadique (stade C) jusqu'au mois de juillet pour n'occuper qu'une partie restreinte dans la région gonadique (stade D), autour des lacunes hémocytaires.

En octobre 2005, tous les animaux sont en repos sexuel (stade 0), avec des tubules gonadiques régressés et un tissu de réserve soit en cours de restructuration, soit envahissant totalement les espaces libres de l'aire gonadique. En novembre 2005, pour certains animaux la gamétogenèse est déjà réinitiée (il y a même un animal en stade II).



Cette réinitiation de la gamétogenèse 2006 est plus précoce que celle de l'année précédente. Le tissu de réserve est en cours de restructuration ou totalement restructuré.

▪ **Approche quantitative :**

Une approche quantitative par analyse d'image a permis de déterminer le volume occupé par la gonade sur la coupe transversale et de mesurer le pourcentage du volume occupé respectivement par le tissu de réserve et les tubules gonadiques contenus dans la gonade. Les résultats sont reportés sur la **Figure 57**.

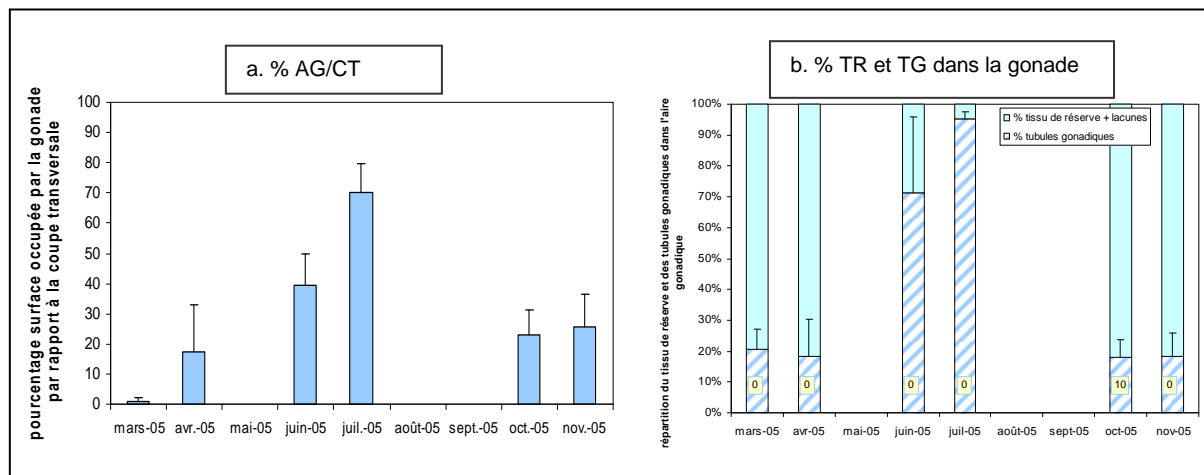


Figure 57. Approches histologiques qualitatives et quantitatives sur des animaux prélevés en Baie des Veys aux 3 périodes suivies. (n=10).

- Pourcentage du volume occupé par l'aire gonadique par rapport à la surface totale de la coupe transversale.
- Pourcentage du volume de tissu de réserve et de tubules gonadiques contenu dans la gonade. Les chiffres indiquent le pourcentage d'individus possédant des gamètes résiduels dans leurs tubules gonadiques.

(AG : Aire gonadique, CT : Coupe transversale, TR : Tissu de réserve et TG : Tubules gonadiques)

Le pourcentage de l'aire gonadique dans la masse viscérale varie au cours du suivi (**Figure 57a**). La surface de l'aire gonadique peut représenter 70 % de l'aire viscérale en juillet, lorsque les tubules gonadiques envahissent la gonade réduisant l'espace disponible pour le tissu de réserve, et seulement 2 % en mars 2005, lorsque la gamétogenèse est à peine réinitiée et que le tissu vésiculeux représente une part importante de l'aire gonadique.

La chute du pourcentage de surface gonadique entre juillet et octobre est associée à l'émission des produits génitaux mais ce pourcentage reste de l'ordre de 20 % du fait de la présence des gamètes résiduels qui ne seront complètement éliminés qu'en mars. La figure **57b** montre les parts respectivement occupées par les tubules et le tissu de réserve dans l'aire gonadique.

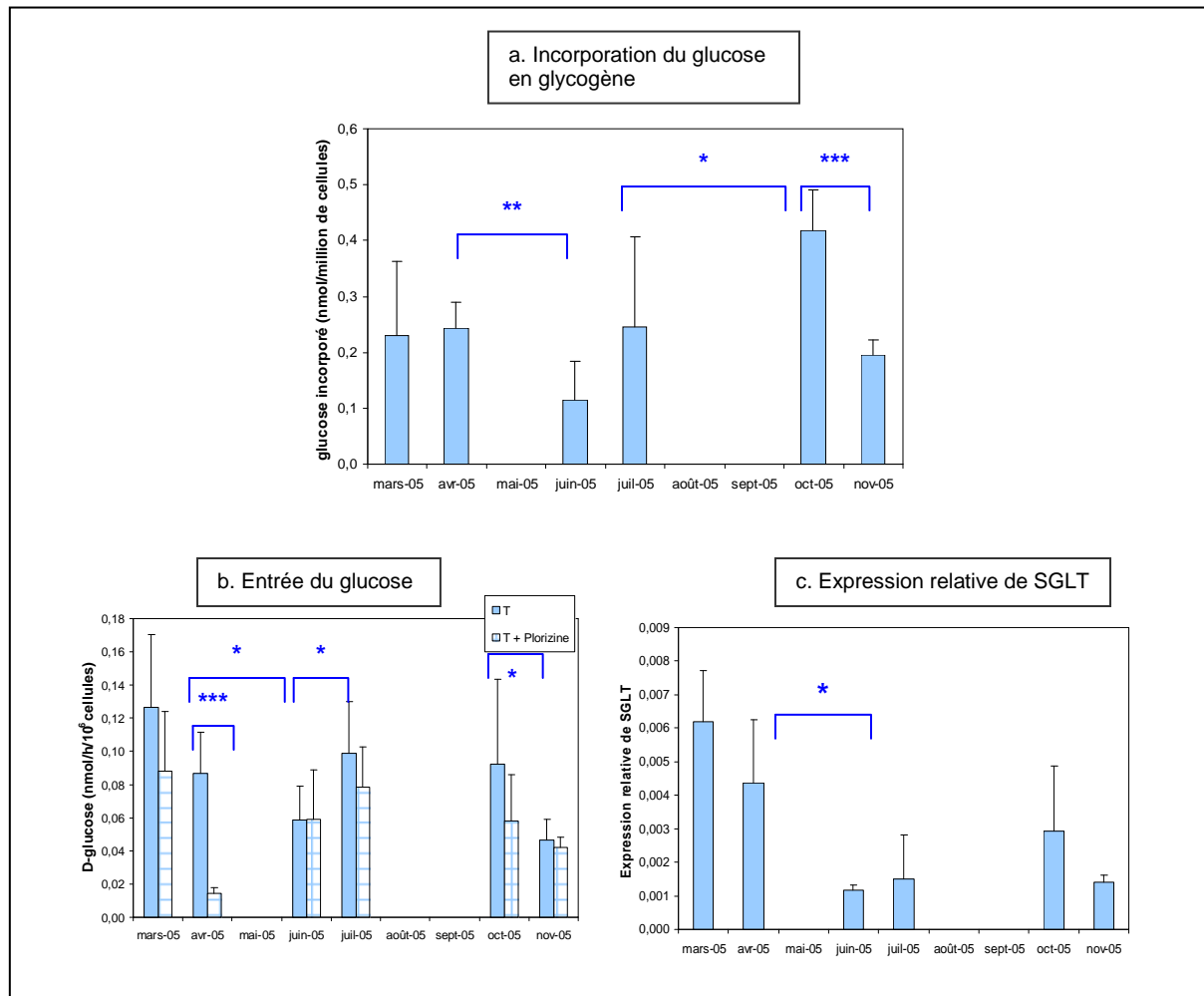


#### 1.4. Approche du métabolisme du glycogène

Un bilan du métabolisme du glycogène a été réalisé en mesurant :

- La capacité d'incorporation du glucose en glycogène,
- La capacité de l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses dissociées de palpes labiaux,
- L'expression relative du cotransporteur SGLT (PCR en temps réel) dans les palpes labiaux mais aussi dans la région gonade manteau.

Les résultats sont reportés sur la **Figure 58**.



**Figure 58.** Bilan des réserves en glycogène dans les palpes labiaux chez des animaux prélevés sur le site de la Baie des Veys aux trois périodes suivies.

- Evolution de la capacité d'incorporation du D-glucose en glycogène dans les cellules vésiculeuses dissociées de palpes labiaux (n=6).
- Effet de la phlorizine sur le transport du D-glucose dans les cellules vésiculeuses dissociées de palpes labiaux (n=6). T : entrée du glucose dans les cellules dissociées du lot témoin. T + phlorizine : entrée du glucose dans les cellules dissociées du lot témoin mises en présence de la phlorizine.
- Expression quantitative des ARNm de SGLT mesurée par technique de PCR en temps réel dans les palpes labiaux (n=3).

Test Student: \* P<0,05, \*\* P<0,01 et \*\*\* P<0,001.



La capacité d'incorporation est de l'ordre de 0,2 nmole par million de cellules avec une baisse en juin, période où le métabolisme du glycogène est orienté vers la mobilisation et un pic de plus forte capacité d'incorporation en octobre.

Le profil de la capacité d'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses de palpes est similaire à celui de l'incorporation. La phlorizine (inhibiteur des systèmes de transport sodium dépendant) montre un effet maximum au printemps (test de student,  $p < 0,001$ ) (**Figure 56b**). Ce résultat suggère que le transport du glucose fait appel au printemps à des transporteurs sodium dépendant de type SGLT. La quantification des ARNm de SGLT dans les palpes labiaux (**Figure 56c**) confirme ces données : le niveau d'expression de SGLT est élevé en mars-avril 2005 puis diminue en été et en automne.

L'expression relative de SGLT a également été mesurée dans la région gonade-manteau (**Figure 59**) : elle présente le même profil que dans les palpes, avec néanmoins un niveau d'expression beaucoup plus faible dans l'aire gonadique que dans les palpes (**Figures 58c et 59**). Cette différence est à rapprocher au fait que l'aire gonadique est un tissu mixte qui contient des cellules vésiculeuses mais également de nombreux autres types cellulaires (hémocytes, cellules germinales, fibres musculaires, cellules épithéliales etc.) et où une partie seulement des cellules expriment des SGLTs.

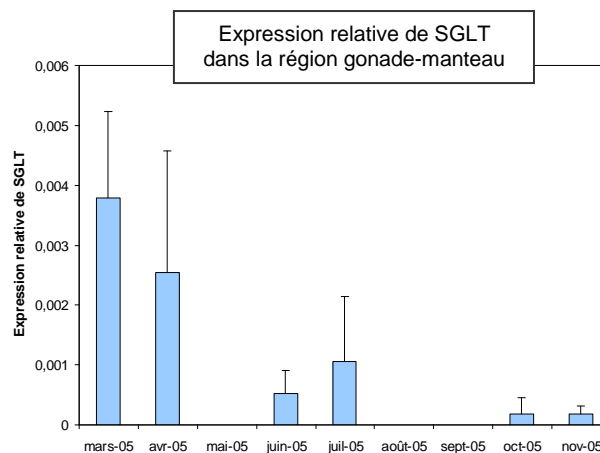


Figure 59. Expression quantitative des ARNm de SGLT mesurée par technique de PCR en temps réel dans la région gonade manteau. (n=3).



## 2. Effet du niveau trophique sur le métabolisme énergétique et la reproduction

### 2.1. Suivi des paramètres environnementaux

Les installations du Système Contrôlé d'Ambiance MARine du SMEL permet de maintenir des paramètres environnementaux strictement contrôlés. La température et la salinité ont été réglées de manière à se rapprocher des valeurs moyennes mesurées sur le site de la Baie des Veys aux mêmes saisons. Tandis que le niveau d'alimentation a été stabilisé de façon artificiel afin de soumettre les animaux à des conditions trophiques opposées : forte et faible alimentation (A+ et A-).

Les valeurs des paramètres de température, de salinité et de phytoplancton (*Skeletonema costatum*) sont rassemblées en **ANNEXE III**.

### 2.2. Suivi histologique de la gamétogenèse

#### ▪ Approche qualitative :

Tableau 12. Effet du niveau trophique sur l'évolution de la gamétogenèse et du tissu de réserve.  
(En gras, les stades majoritaires ; Gam. Résid. : Nombre d'individus dont les tubules gonadiques contiennent de nombreux gamètes résiduels ; herma. : Nombre d'individus hermaphrodites ; Situa. Part. : Situation particulière).

		Stades de gamétogenèse				Gam. Résid.	Situa. Part.	Stades du tissu de réserve			
		0	I	II	III A			A	B	C	D
avr-05	TA+	1	<b>9</b>					2	<b>8</b>		
	TA-	1	<b>9</b>					2	<b>8</b>		
juil-05	TA+			1	<b>9</b>		1 herma.				<b>10</b>
	TA-				<b>10</b>					1	<b>9</b>
nov-05	TA+		<b>10</b>			2			<b>10</b>		
	TA-	4	<b>6</b>			1		2	<b>8</b>		

En avril et en juillet 2005, nous n'observons pas de différences liées aux conditions d'alimentation : les animaux présentent les mêmes stades majoritaires de gamétogenèse et du tissu de réserve.

En novembre 2005 en revanche, les animaux placés à jeun montrent un retard par rapport aux animaux alimentés dans :

- La réinitiation de la gamétogenèse : 6 animaux sur 10 seulement ont réinitié une nouvelle gamétogenèse (10/10 pour les animaux alimentés).
- La restructuration du tissu de réserve : 2 animaux sur 10 n'ont pas encore un tissu de réserve restructuré.



▪ Approche quantitative :

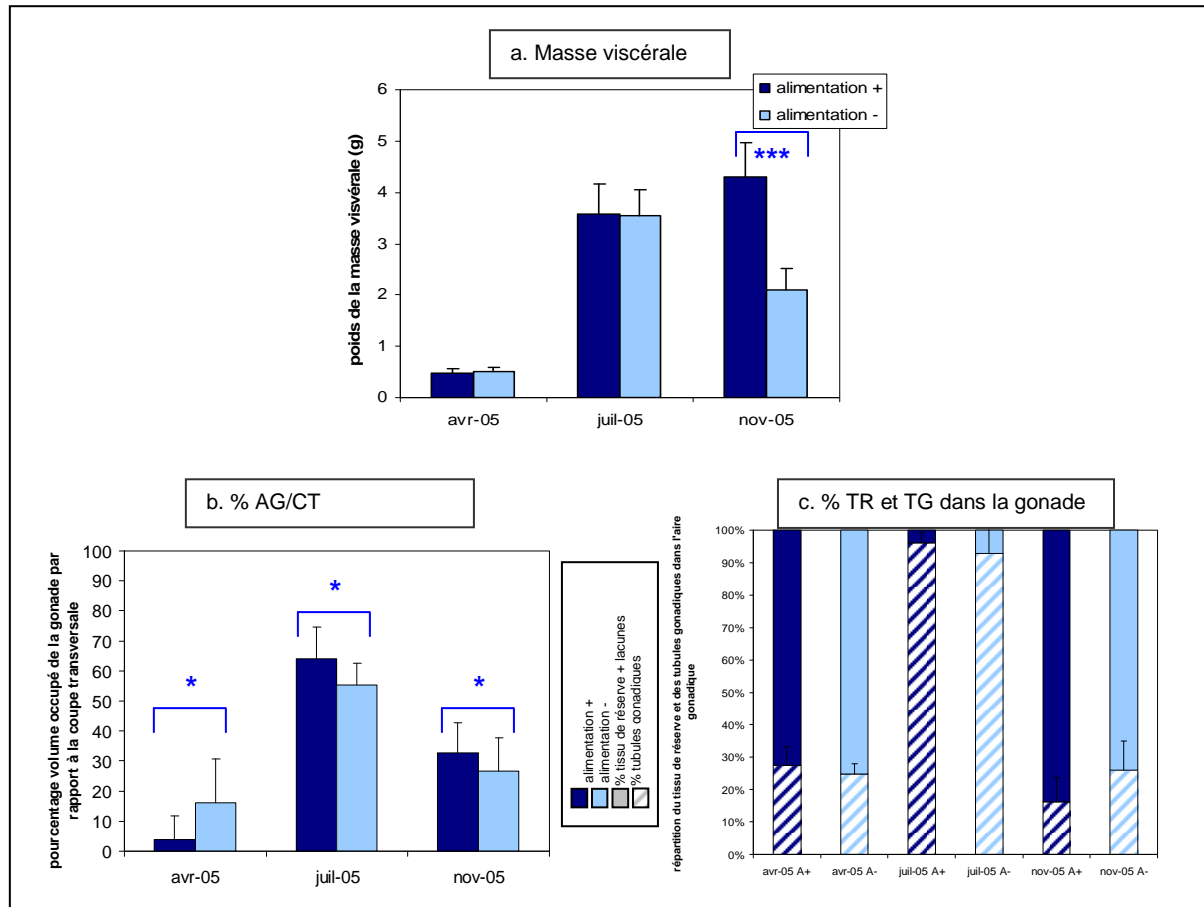


Figure 60. Effet des conditions trophiques sur la gamétogenèse. (n=10).

- a. Poids moyen de la masse viscérale en g.
  - b. Pourcentage du volume occupé par la gonade par rapport à la surface totale de la coupe transversale.
  - c. Pourcentage du volume de tissu de réserve et de tubules gonadiques contenu dans la gonade.
- (AG : aire gonadique, CT : Coupe transversale, TR : Tissue de réserve et TG : Tubules gonadiques).

Test Student: \*  $P < 0,05$  et \*\*\*  $P < 0,001$ .

En avril 2005, les conditions en alimentation présentent un effet sur le rapport aire gonadique sur surface totale (**Figure 60b**). Celui-ci reste faible et difficilement mesurable (petits animaux) mais semble proportionnellement plus important pour les animaux à jeun. Le poids total de la masse viscérale ainsi que la composition tissulaire de l'aire gonadique (tissu vésiculeux versus tubules gonadiques) sont cependant les mêmes pour les animaux à jeun et les animaux nourris (**Figure 60a** et **Figure 60c**).

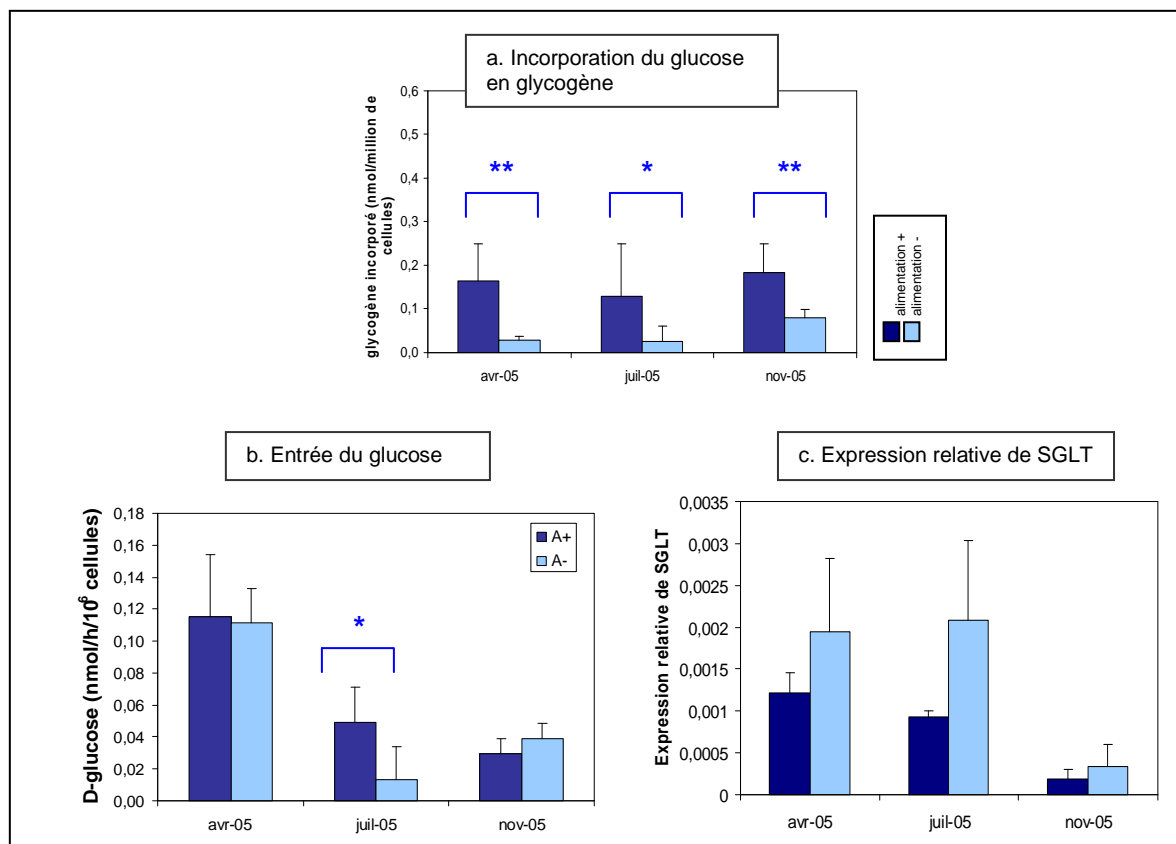
En juillet, les deux lots sont également peu différents, avec une gonade très développée (autour de 60% de la surface de la coupe) contenant presque exclusivement des tubules gonadiques (environ 5% de tissu vésiculeux). La surface occupée par la gonade par rapport à la coupe transversale chez les huîtres A- ( $55,26\% \pm 7,23\%$ ) est plus importante que chez les animaux au début du conditionnement ( $39,42\% \pm 10,44\%$ ).



En novembre, la mise à jeun provoque une diminution très significative du poids de la masse viscérale des animaux (presque 50% de la masse moyenne des A+) qui n'est associée qu'à une faible diminution de pourcentage d'aire gonadique. Le pourcentage de tubules gonadiques dans l'aire gonadique est légèrement augmenté au dépend du tissu de réserve. Il semble donc que la mise à jeun entraîne à cette période de l'année une réduction très significative du tissu de réserve dans l'aire gonadique mais également autour de la glande digestive.

### 2.3. Approche du métabolisme du glycogène

Les résultats sont représentés sur la **Figure 61**.



**Figure 61. Effet des conditions trophiques sur le métabolisme énergétique.**

- Evolution de la capacité d'incorporation du D-glucose en glycogène dans les cellules vésiculeuses dissociées de palpes labiaux (n=6).
- Evolution de la capacité d'entrée du D-glucose dans les cellules vésiculeuses dissociées de palpes labiaux (n=6).
- Expression quantitative des ARNm de SGLT mesurée par technique de PCR en temps réel dans la région gonade-manteau (n=3).

Test Student: \* P<0,05 et \*\* P<0,01.

Les conditionnements trophiques ont une incidence identique quelle que soit l'époque d'expérimentation sur la capacité d'incorporation (**Figure 61a**) : les animaux élevés dans un milieu trophique élevé ont une capacité d'incorporation du glucose en glycogène toujours



supérieure à celles des huîtres placées dans des conditions alimentaires faibles (test student, en avril A+/ A- :  $p < 0,01$  ; en juillet A+/ A- :  $p < 0,05$  ; en novembre A+/ A- :  $p < 0,01$ ). La capacité d'incorporation du glucose en glycogène des cellules vésiculeuses dépend donc du niveau trophique quels que soient la saison et l'état reproducteur de l'animal.

La capacité de transport du D-glucose dans les cellules vésiculeuses est également affectée par le niveau trophique mais cet effet n'est observé qu'en juillet 2005 : la capacité de transport est plus forte chez les A+ que chez les A- (**Figure 61b**).

Quelle que soit la période de l'année, il semble que le niveau d'expression de SGLT soit directement relié au niveau trophique (**Figure 61c**). En effet, l'expression relative du cotransporteur SGLT apparaît plus forte chez les animaux placés dans un milieu trophique pauvre que chez ceux élevés dans un milieu trophique riche.



## **PRINCIPAUX RESULTATS**

### **SUIVI SAISONNIER**

- Le déroulement de la gamétogenèse a pu être suivi aux différentes périodes clés de la gamétogenèse et du cycle de mise en réserve. Le tissu de réserve gonadique suit une évolution inverse à celle des tubules gonadiques.
- Le suivi saisonnier montre une variation de la capacité d'incorporation et de transport du glucose. Au printemps, le transport de glucose semble faire intervenir le système de cotransport sodium dépendant comme le montrent l'inhibition par la phlorizine et l'expression du cotransporteur SGLT, élevée à cette période de l'année.

### **EFFET TROPHIQUE**

- Les effets trophiques portent essentiellement :
  - Quelle que soit la saison, sur la mobilisation du glycogène grâce à une activation de l'incorporation du glucose en glycogène chez les animaux élevés dans des conditions trophiques élevées. Le niveau de l'expression du cotransporteur SGLT est également dépendant des conditions trophiques, la mise à jeun provoque l'augmentation de son expression.
  - En période automnale, sur la lyse des gamètes résiduels et la réinitiation de la gamétogenèse et la restructuration du tissu de réserve. Des conditions trophiques élevées induisent un développement gamétogénétique et du tissu de réserve plus important qu'en condition de jeûne.



## DISCUSSION

L'objectif de ce chapitre était de préciser, à différentes périodes clés du métabolisme saisonnier de l'huître, l'état de la balance réserve/gamétogenèse puis d'évaluer l'impact des conditions trophiques sur cette balance. Des suivis saisonniers ont déjà été réalisés sur *Crassostrea gigas* sur nos côtes : ils ont montré d'importantes fluctuations qualitatives et quantitatives tant au niveau du déroulement de la gamétogenèse que du point de vue du stockage des réserves. Ces variations sont souvent très marquées d'une région à l'autre, comme l'a souligné Heude-Berthelin et ses collaborateurs (2001) qui ont comparé le site de Marennes Oléron et le site de Saint-Vaast en 1997. Elles peuvent l'être également à l'échelle d'un même bassin ostréicole (variations microgéographiques), selon les paramètres hydrologiques du site comme cela a été décrit dans différents bassins de production (Soletchnik *et al.*, 1999 à Marennes Oléron ; Royer *et al.*, 2007 en Baie des Veys). Enfin, sur un même site, des variations inter-annuelles liées aux fluctuations environnementales sont également décrites et confirment la forte variabilité dans le déroulement des étapes du cycle reproducteur, en particulier autour de la période d'émission des gamètes (Costil *et al.*, 2005 ; Royer *et al.*, 2007).

Dans ce contexte, il était impératif, avant d'explorer l'effet de paramètres environnementaux sur la gestion des réserves allouées à la reproduction, de recadrer le cycle des réserves en glycogène et le cycle de gamétogenèse sur le site naturel d'élevage, par rapport aux données déjà établies. Les animaux témoins sont placés en Baie de Veys sur le site de Géfosse, site caractérisé par Royer *et al.*, 2007 comme étant le plus haut sur l'estran. Les conditions retrouvées sur le site sont de type estuarien avec d'importants apports d'eau douce et de sédiment. Le substrat est colmaté (vase et sable fin). Les huîtres placées à cet endroit ont montré les taux les plus élevés de mortalités estivales en 2000, 2001 et 2002 ainsi qu'une forte croissance et un important investissement dans la reproduction.

Le suivi saisonnier a mis en jeu différentes approches complémentaires : biométrique, histologique (qualitative et quantitative), métabolique et moléculaire.

### ✶ Conditions naturelles

- Gamétogenèse :

L'étude qualitative de la gamétogenèse montre que le déroulement général de la gamétogenèse chez les huîtres placées en Baie des Veys est similaire à celui présenté par Costil *et al.* en 2005 : la reprise de la gamétogenèse peut s'observer dès le mois de novembre, toutefois pour plus de la moitié des animaux, elle débute plus tardivement en



hiver (février-mars). Un suivi annuel de la gamétogenèse réalisé en 1997 avait déjà montré un tel retard de la reprise de la nouvelle gamétogenèse à Saint-Vaast-la-Hougue par rapport à des huîtres issues du bassin de Marennes-Oléron (Heude-Berthelin *et al.*, 2001) : ces premières mitoses goniales n'avaient été observées qu'en décembre chez les animaux de Saint-Vaast-la-Hougue tandis que la nouvelle gamétogenèse des animaux provenant de Marennes Oléron avait débuté depuis plus d'un mois. Cette réinitiation lente peut être la conséquence de la présence de gamètes résiduels en automne (observés en proportions variables chez certains animaux), résultat des pontes partielles bien décrites sur nos côtes normandes (St Vaast-la-Hougue / Baie des Veys) et liées à la température de l'eau (Mann, 1979 ; Heude-Berthelin *et al.*, 2001 ; Costil *et al.*, 2005). La maturité sexuelle (stade IIIA) est atteinte à la fin du mois de juin pour les animaux de ce suivi comme ceux observés en Baie des Veys en 2001 (Costil *et al.*, 2005). L'émission des gamètes est partielle et les gamètes résiduels persistent tardivement comme c'est le cas pour les huîtres suivies en 1997 à Saint-Vaast-la-Hougue (Heude-Berthelin *et al.*, 2001) et en 2001 en Baie des Veys (Costil *et al.*, 2005), parfois jusqu'en mars.

L'estimation du pourcentage du tissu gonadique semble être un très bon traceur du cycle reproducteur, puisqu'il décrit la continuité des stades de développement (Newell *et al.*, 1982). Les variations du pourcentage de l'aire gonadique dans la masse viscérale observées au cours de ce suivi se rapprochent de celles obtenues par Enriquez-Diaz (2004) et Royer *et al.*, 2008. Au printemps l'espace occupé par les tubules gonadiques dans l'aire gonadique est faible, la gamétogenèse est à peine réinitiée (stades 0-I). La surface de l'aire gonadique dans la masse viscérale croît par la suite et atteint un maximum en juillet au moment où les tubules gonadiques envahissent la gonade et que les animaux sont à maturité (stade IIIA). La chute du pourcentage de surface gonadique entre juillet et octobre est associée à l'émission des gamètes mais ce pourcentage ne dépasse pas 20 % du fait de la présence des gamètes résiduels dans les tubules gonadiques.

- **Gestion des réserves :**

Le développement du tissu de réserve de l'aire gonadique est similaire à ce qui a été décrit pour des huîtres de Marennes Oléron en 1997 (Berthelin *et al.*, 2000b) : les différents stades de développement du tissu de réserve (Stade A : restructuration du tissu conjonctif vésiculeux ; Stade B : développement maximal du tissu vésiculeux ; Stade C : régression du tissu conjonctif vésiculeux ; Stade D : en période de maturité sexuelle, le tissu de réserve est fortement résorbé, réduit autour des lacunes hémocytaires) sont étroitement corrélés au développement du tissu gonadique : le tissu de réserve gonadique est dense et largement dominant sur les tubules en automne et au printemps, pendant la période de repos sexuel et



de réinitiation de la gamétogenèse. A partir du mois de mars, il régresse au profit des tubules gonadiques qui, en juillet occupent la quasi-totalité de l'aire gonadique.

En automne, l'aire gonadique contient de nombreux hémocytes. Même si le rôle des hémocytes n'a pas été clairement élucidé, Heude-Berthelin (2000) a constaté que la restructuration du tissu de réserve est précédée d'une invasion dans la région gonadique par un très grand nombre de cellules circulantes. Selon l'auteur, ces cellules jouent certainement un rôle important lors de lyse des gamètes résiduels, étape nécessaire pour le développement du tissu de réserve. Mais il est possible que les cellules vésiculeuses qui apparaissent dans la région gonadique se différencient à partir de certaines de ces cellules circulantes. En effet, certaines cellules circulantes invasives possèdent des caractéristiques ultrastructurales proches de celles des cellules de réserve (nombreuses mitochondries, granules de glycogène cytoplasmique, réticulum endoplasmique abondant).

Parallèlement au suivi histologique du tissu de réserve, l'activité métabolique des cellules vésiculeuses a été appréhendée par des tests *in vitro* sur cellules isolées de palpes labiaux dont il a été démontré qu'elles ont un métabolisme identique à celui des cellules de l'aire gonadique (Berthelin *et al.*, 2000a).

La capacité d'incorporation du glucose dans le glycogène reste relativement élevée en Baie des Veys tout au long de l'année (par comparaison à d'autres sites décrits comme Marennes-Oléron ou Saint-Vaast-La-Hougue). Elle est cependant plus faible en juin, période où le métabolisme du glycogène est orienté vers la mobilisation, puis cette capacité d'incorporation augmente en octobre, lorsque le tissu vésiculeux se restructure et débute le stockage des réserves en glycogène, pour se stabiliser à environ  $0,2 \text{ nmol} \cdot 10^6 \text{ cellules}$ . En 2000, Heude-Berthelin a mesuré la capacité d'incorporation du glucose en glycogène dans des cellules vésiculeuses d'huîtres creuses originaires de Marennes Oléron et de Saint-Vaast-la-Hougue. Globalement, pour ces deux sites, les variations saisonnières de la capacité d'incorporer le glucose de ces cellules sont plus marquées que celles observées en Baie des Veys.

Les faibles variations annuelles d'activité métabolique en Baie des Veys pourraient être liées au fait que dans ce bassin le milieu trophique est relativement riche par rapport aux autres sites. De plus, les activités mesurées *in vitro* d'entrée et d'incorporation sont sans doute très différentes de l'activité réelle. En effet, les cellules vésiculeuses sont artificiellement placées dans des conditions de 0,5 mM de glucose extracellulaire. Or, en regard de la glycémie mesurée en automne et en hiver (évaluée à 0,03 mM en décembre, **Tableau 8**), la concentration extracellulaire du test *in vitro* (0,5 mM) est très nettement supérieure à celle de la glycémie réelle.



Bacca, au cours de sa thèse, a mesuré les variations annuelles de l'expression de la glycogène synthétase et de la glycogène phosphorylase (Bacca *et al.*, 2005) et leurs activités (Bacca, 2007) dans les palpes labiaux de *Crassostrea gigas*. La mesure quantitative de ces deux gènes indique d'importantes variations de leur expression : le nombre de transcrits de la glycogène synthétase atteint un maximum en octobre (en période de mise en réserve) tandis que les transcrits de la glycogène phosphorylase sont plus nombreux au mois de mai (en période de mobilisation). Les activités enzymatiques montrent que la glycogène phosphorylase joue un rôle important en mars-avril (GP totale, GP *a* et GP *b* ont une activité élevée), son activité diminue ensuite jusqu'en juin-juillet (forte demande énergétique et utilisation des réserves), puis augmente progressivement jusqu'en octobre pour rester constante jusqu'en février (croissance somatique). L'activité de la glycogène synthétase est quant à elle forte au printemps, faible en été et maximale en automne (pic d'activité en septembre lié à la phase de reconstitution du tissu de réserve gonadique et d'accumulation du glycogène). Les activités mesurées *in vivo* ne présentent pas d'opposition saisonnière bien marquée, ce qui suggère l'existence de plusieurs niveaux de régulation de la synthèse et de la dégradation du glycogène (Bacca, 2007).

L'implication des transporteurs SGLT a été démontrée par deux approches :

- L'utilisation de la phlorizine a permis de montrer une réduction significative de la capacité de transport du glucose en avril. Ce transport fait donc intervenir des co-transports sodium dépendants à cette époque de l'année.
- La quantité relative de transcrits SGLT (PCR en temps réel) est surtout élevée au printemps.

Ces deux résultats démontrent que ce transporteur joue un rôle prépondérant dans le transport du glucose au printemps.

Le niveau d'expression est plus faible dans la région gonade manteau par rapport à celui mesuré dans les palpes labiaux, cette variation doit être rapprochée de la composition mixte et variable de la région gonadique.

Le contrôle des variations saisonnières peut faire appel à des facteurs internes (métabolites, hormones) et/ou externes (température, photopériode, niveau trophique). Dans le but d'apporter des éléments de réponse au problème complexe de la régulation de la balance réserve-reproduction chez l'huître, nous avons réalisé un conditionnement d'animaux en milieu contrôlé afin d'évaluer l'impact des conditions trophiques sur les réserves et sur la gamétogenèse en fonction de l'état physiologique des animaux.



✂ **Effet du niveau trophique**

- **Gamétogenèse :**

Après un mois de jeûne, certains animaux A- se trouvent encore au stade 0 alors que les animaux A+ ont tous atteint le stade suivant. Il semble que le jeûne ralentisse la reprise de la nouvelle gamétogenèse et le développement du tissu de réserve ce qui induit chez les animaux A- une masse viscérale plus faible. L'effet du niveau trophique porte surtout en automne sur la lyse des gamètes résiduels qui conditionne à la fois la reprise de la gamétogenèse et la restructuration du tissu de réserve. Les plages de lyse occupent un espace qui ne favorise pas une restructuration optimale du tissu de réserve ce qui provoque sans doute le retard de la réinitiation gamétogénétique.

Le processus de dégénération des gamètes, est connu principalement sous les termes de résorption ou d'atrésie (Steele & Mulcahy, 1999). La résorption des gamètes est une phase nécessaire à la préparation de la gonade pour un nouveau cycle sexuel. D'après Enriquez-Diaz (2004), les huîtres auxquelles un régime alimentaire pauvre est fourni et qui ont totalement libéré leurs gamètes, présentent une courte période de résorption des gamètes tandis que celles nourries à partir d'un régime riche pondent partiellement et restent en période de résorption gamétique pendant plusieurs mois (automne-hiver).

Au printemps et en été, l'abondance de l'alimentation (concentration de phytoplancton) joue un rôle clef dans la stratégie reproductrice de *Crassostrea gigas*. Enriquez-Diaz (2004) a montré que si la température de l'eau régule la vitesse et donc la durée de la gamétogenèse, son intensité est influencée par la quantité de nourriture disponible. Ainsi, un niveau élevé de phytoplancton au printemps et en début d'été peut induire: un développement très élevé (hypertrophie) de la gonade, des modifications dans l'intensité de ponte (Soniati & Ray, 1985) et même une résorption automnale plus longue. Cette stratégie reproductrice dépendante de l'environnement mise en place par *C. gigas* est vraisemblablement un mécanisme d'adaptation lui permettant de réussir dans tous les d'habitats.

- **Gestion des réserves**

Pour comprendre comment les conditions trophiques influent sur le métabolisme du glycogène, la capacité d'incorporation du glucose en glycogène, la capacité d'entrée et l'expression des transporteurs SGLTs ont été suivies.

Les conditions trophiques peuvent avoir un impact à la fois sur le métabolisme des cellules vésiculeuses, mais peut-être également sur leur nombre :

En novembre, la masse viscérale est plus faible chez les A- sans qu'il y ait de variations de la composition, ni du volume relatif de l'aire gonadique. Les conditions de jeûne



à cette période de l'année semblent provoquer un amaigrissement général des animaux, les huîtres puisent dans leurs réserves, y compris viscérales. Néanmoins, la plupart des huîtres à la fin du jeûne ont reconstitué leur tissu conjonctif vésiculeux (stade B) comme la majorité des animaux placés sur estran.

Le niveau trophique montre un impact sur le métabolisme glucidique : les résultats mettent en évidence l'existence d'une régulation de la capacité d'incorporation du glucose en glycogène par le taux de glucose circulant. Aux trois saisons analysées, la capacité d'incorporation du glucose en glycogène dépend directement du niveau d'alimentation. Dans les expérimentations *in vitro*, les cellules vésiculeuses dissociées sont toujours placées dans des conditions de concentrations en glucose extracellulaire (0,5mM) identiques. Ainsi, si la capacité d'incorporation est différente, c'est que l'entrée et/ou le fonctionnement des enzymes des voies métaboliques du glycogène sont régulés par le glucose circulant. Les variations de la capacité d'incorporer le glucose sont le résultat d'une régulation intégrée et non d'un mécanisme passif lié à la quantité de glucose extracellulaire.

Cette régulation porte sur l'expression des SGLTs qui tend à être plus importante en condition de jeûne. En Juillet chez les A-, l'augmentation des SGLTs est associée à une baisse significative de la capacité d'entrée, ce qui suggère leur possible rôle dans la sortie du glucose à cette période. Au printemps, la différence d'expression de SGLT est moins importante et ne se traduit pas par une variation de l'entrée. En novembre, l'entrée et le niveau de transcrits SGLT sont relativement faibles. A cette période de l'année, les SGLTs ne semblent pas intervenir dans la phase de stockage de glucose en glycogène dans les cellules vésiculeuses. Ce transporteur sodium dépendant semble jouer un rôle plus important au printemps et en période estivale lorsque les huîtres développent leur gamétogenèse et mobilisent leurs réserves en glycogène.

La régulation de l'expression de SGLT par le taux de glucose circulant est un phénomène également décrit chez les vertébrés. Dyer *et al.*, 2003 ont mis en évidence dans les cellules épithéliales de l'intestin de mouton par immunodétection que l'activité et l'abondance des transporteurs SGLT1 sur la membrane des cellules intestinales étaient régulées par le D-glucose. De même, Ohta et ses collaborateurs (1990) ont démontré à partir de lignée cellulaire épithéliale rénale porcine (LLC-PK1) que de fortes concentrations en glucose régulent négativement l'expression des transporteurs SGLT1. Selon ces auteurs, le niveau d'expression du cotransporteur est maximal aux plus faibles concentrations de D-glucose tandis qu'aux fortes concentrations, voir hyperglycémiantes, le niveau de transcrits chute soudainement. Les travaux de Kellet, (2001, pour revue) ont également montré dans les cellules épithéliales intestinales qu'aux faibles concentrations de D-glucose, le transport cellulaire du D-glucose privilégie son entrée via le transporteur SGLT1 très affin pour ce



substrat tandis qu'aux fortes concentrations, le transporteurs GLUT2, moins affin mais plus efficace, assure le transport de l'hexose.

**Les résultats obtenus dans le cadre de ce conditionnement expérimental ont permis de mettre en évidence la présence d'importants phénomènes de régulation du transport du glucose et de la capacité d'incorporation du glucose dans le glycogène. Au printemps et en automne, lors des deux périodes d'inversion métabolique (stockage/ mobilisation du glycogène), les huîtres répondent différemment au conditionnement artificiel, il semble que des phénomènes de régulation particulièrement efficaces agissent en modulant l'activité des enzymes du métabolisme du glycogène mais également les systèmes de transport de glucose dans les cellules vésiculeuses.**

**Perspectives :**

*A la suite de ces travaux, mettant en évidence l'existence des mécanismes de régulation du métabolisme du glycogène, plusieurs perspectives de travail peuvent être envisagées :*

- *Si l'effet observé sur la gestion des réserves lors des conditionnements à jeun est direct, il pourra être confirmé par une approche in vitro consistant à pré-incuber les cellules vésiculeuses dissociées avec différentes concentrations de glucose extracellulaire puis à mesurer leur capacité de transport en présence d'inhibiteurs (cytochalasine B et Phlorizine). Il sera également intéressant lors de cette expérience de mesurer l'expression du transporteur SGLT.*
- *La technique d'électrophorèse bidimensionnelle pourrait être envisagée afin de contrôler l'effet du niveau trophique sur le protéome du tissu vésiculeux de l'huître creuse. Il faudrait effectuer des empreintes protéomiques à différentes périodes de l'année afin de suivre les variations saisonnières nettement mises en évidence dans le cadre de notre étude (printemps, été et automne).*

A la suite de ces travaux sur l'effet des paramètres environnementaux (alimentation) sur le métabolisme énergétique de l'huître creuse, nous avons recherché l'implication de la composante génétique dans le métabolisme glucidique et la reproduction.



**CHAPITRE III**  
**IMPLICATION DE LA COMPOSANTE**  
**GENETIQUE DANS LE METABOLISME**  
**GLUCIDIQUE ET LA REPRODUCTION**



**CHAPITRE III. IMPLICATION DE LA COMPOSANTE GENETIQUE DANS LE METABOLISME GLUCIDIQUE  
ET LA REPRODUCTION** **129**

---

<b>INTRODUCTION</b>	<b>131</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>135</b>
<b>1. Suivi de la gamétogenèse chez les huîtres R et S</b>	<b>135</b>
1.1. Approche qualitative	135
a. Suivi sur estran	135
b. Réponse au conditionnement trophique	136
1.2. Approche quantitative	137
a. Suivi sur estran	137
b. Réponse au conditionnement trophique	138
<b>2. Approche du métabolisme du glycogène chez les huîtres R et S</b>	<b>139</b>
a. Suivi sur estran	139
b. Réponse au conditionnement trophique	141
<b>PRINCIPAUX RESULTATS</b>	<b>143</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>144</b>



### III. IMPLICATION DE LA COMPOSANTE GENETIQUE DANS LE METABOLISME GLUCIDIQUE ET LA REPRODUCTION

#### INTRODUCTION

Depuis l'introduction en France dans les années 1970 de l'huître japonaise *Crassostrea gigas*, des épisodes de mortalité se sont régulièrement produits en période estivale (Maurer *et al.*, 1986, Renault *et al.*, 1994 ; Goulletquer, 1998 ; Soletchnik *et al.*, 1999). De tels phénomènes ont été également observés au Japon depuis la fin des années 60 (Mori, 1979) ainsi qu'aux Etats-Unis depuis les années 70 (Perdue *et al.*, 1981), dans des sites de forte productivité, de fort niveau trophique et où la température excède 20 °C en période estivale (Beattie *et al.*, 1980). En France, ces mortalités sont variables selon les années, elles affectent généralement 10 à 15 % des animaux mais peuvent atteindre localement 80 % du stock certaines années. Leurs répercussions économiques sont donc importantes pour la filière et elles peuvent même menacer la pérennité des entreprises.

Depuis les années 80, de nombreuses études ont été consacrées à ces mortalités épisodiques afin d'en dégager les principales caractéristiques : elles affectent les animaux adultes et juvéniles à des taux variables (Maurer *et al.*, 1986 ; Goulletquer, 1998), se produisent pendant la période de reproduction et sont associées à des températures élevées (Maurer *et al.*, 1986 ; Lipovsky & Chew, 1972 ; Clegg *et al.*, 1998, Maurer & Borel, 1986). Elles varient aussi selon les conditions d'élevage (Soletchnik *et al.*, 1999) : les pratiques culturales (élevage à plat ou sur table par exemple) de même que les caractéristiques du site d'élevage sont susceptibles de fragiliser les individus, les rendant plus ou moins sensibles aux mortalités. Certains auteurs ont associé aux mortalités estivales la présence d'agents pathogènes de type bactérien (Renault *et al.*, 1994 ; Lacoste *et al.*, 2001 ; Waechter *et al.*, 2002 ; Garnier *et al.*, 2007) ou viraux (Friedman *et al.*, 2005). Cependant, dans la mesure où aucun de ces pathogènes n'a pu être systématiquement relié à tous phénomènes de mortalité, il semble que leur présence soit plutôt la conséquence d'un affaiblissement général de l'organisme des animaux, les rendant plus vulnérables aux infections (Le Roux *et al.*, 2002).

C'est sur la base d'une hypothèse d'interactions complexes entre l'huître, son environnement et des pathogènes opportunistes, qu'a été initié un projet pluridisciplinaire d'étude des mortalités estivales rassemblant les efforts des 15 équipes de 2001 à 2005 sur une même problématique dans le cadre du défi MOREST (MORtalités ESTivales). Dans ce programme, les différents facteurs impliqués dans les interactions 'hôtes, environnement, pathogène' ont été systématiquement analysés dans le but de construire un modèle d'interaction permettant à terme de gérer et de prévoir les épisodes de crise (**Figure 62**).



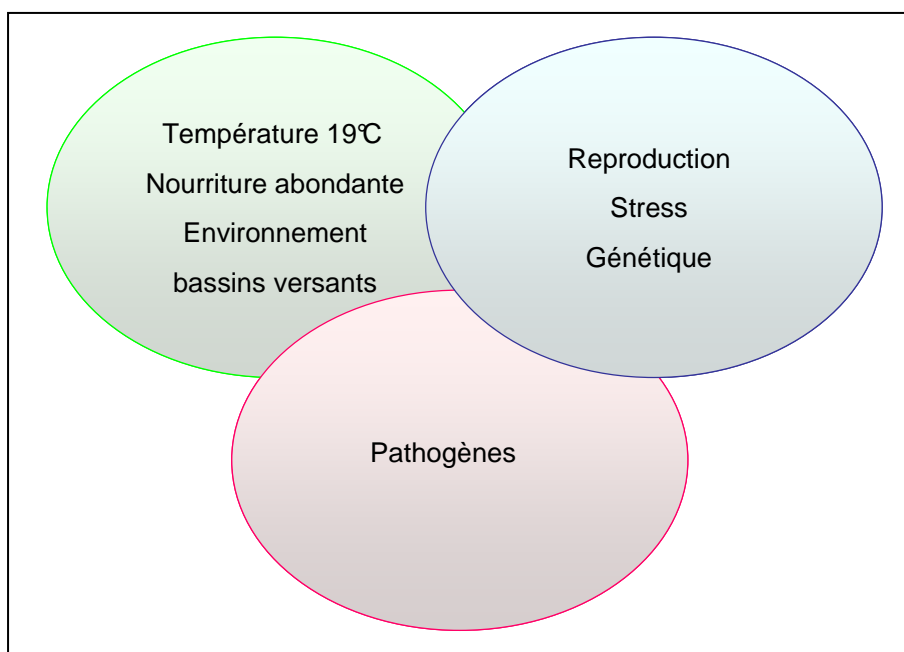


Figure 62. Interaction des sept facteurs de risques conduisant aux mortalités estivales. D'après Samain & Mc Combie, 2007.

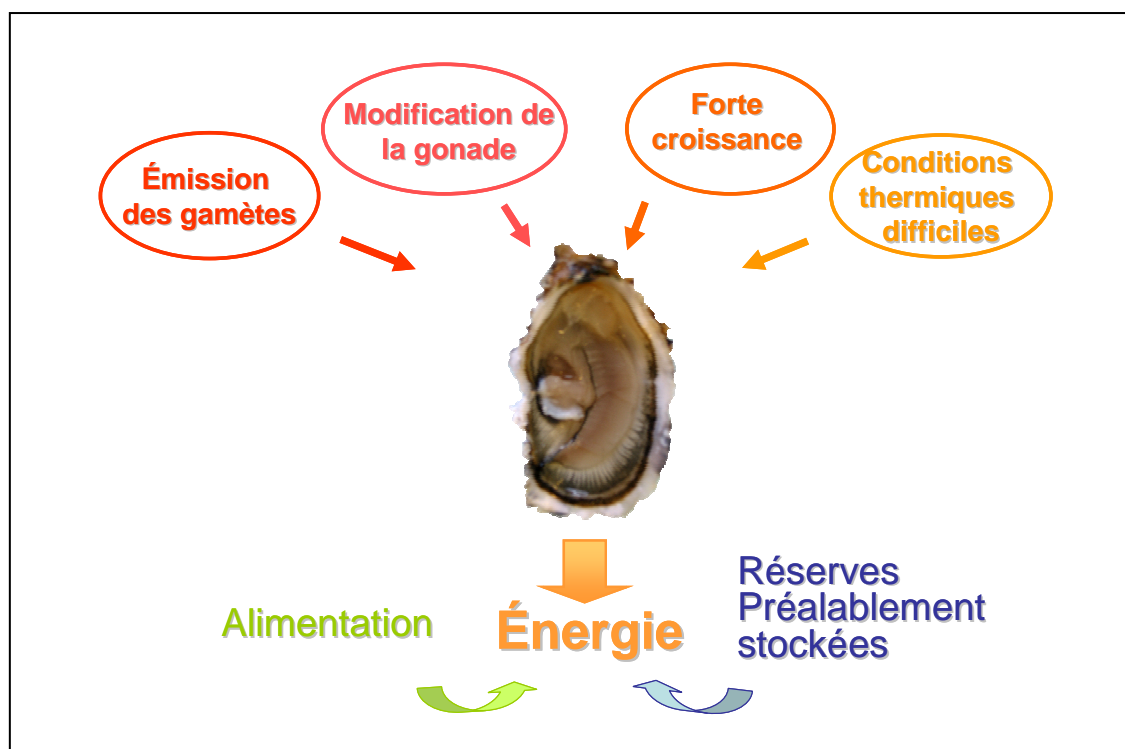


Figure 63. Hypothèse sur l'existence d'une inadéquation entre les réserves pré-établies et les dépenses énergétiques.



La **Figure 63** suggère qu'en période estivale, les dépenses énergétiques de l'huître sont multiples :

- ❖ La croissance est forte, les huîtres sont en période de maturation gamétogénétique, puis d'émission des gamètes. L'effort de reproduction est élevé puisqu'il se traduit par une perte de volume de l'ordre de 60 % du poids sec de chair au moment de la ponte (Downing & Allen, 1987).
- ❖ Les conditions environnementales sont difficiles. La température élevée favorise la prolifération des microorganismes, les stress de température sont de forte amplitude et fréquents, la température sur les parcs exondés peut dépasser 40 °C en été.

Les dépenses énergétiques associées à cette conjonction d'événements sont alors soutenues par l'alimentation mais également par la mobilisation des réserves préalablement stockées par l'animal au cours de l'hiver. Il apparaît donc clairement que l'efficacité de la mise en réserve hivernale est primordiale pour permettre aux animaux de franchir la période estivale critique (**Figure 63**). Une inadéquation entre les réserves pré-établies au cours de la période de stockage en période hivernale et les dépenses estivales pourrait être la cause de cette « crise énergétique » estivale. C'est cette hypothèse que nous avons privilégiée dans le cadre du programme MOREST, à travers une partie de ce travail de thèse.

Parmi les facteurs ayant un impact sur les mortalités estivales, l'implication d'une composante génétique a été clairement démontrée. En effet, en 1980, Beattie et ses collaborateurs avaient déjà mis en évidence aux Etats-Unis (Rocky Bay, Washington) une mortalité différentielle, variant de 10 à 80 % selon les familles sélectionnées. En France, en 2003, Dégremont a également démontré l'existence d'une composante génétique dans la sensibilité ou la résistance aux mortalités estivales. A travers une sélection divergente basée sur le caractère de survie, des familles monoparentales d'huîtres nommées R (Résistantes) ou S (Sensibles) ont été produites (Dégremont, 2003 ; Dégremont *et al.*, 2005, 2007). La forte héritabilité de ce caractère dont les facteurs déterminants apparaissent multiples, permet de suspecter qu'il puisse être sous contrôle d'un petit nombre de gènes (Dégremont *et al.*, 2007) et méritait d'être largement étudiée car elle ouvre une voie originale pour la sélection de souches résistantes aux mortalités.

Compte tenu du rôle clé des réserves dans la survie estivale, cette composante génétique pourrait être liée à des différences en terme de gestion de l'allocation des ressources énergétiques, et pourrait se traduire soit au niveau de l'activité métabolique elle-même (enzymes, transporteurs ...) soit au niveau des voies régulatrices. La disponibilité de souches d'huîtres résistantes R et sensibles S aux mortalités estivales peut nous permettre de mieux préciser leur mode de gestion des réserves en fonction des demandes associées à



la reproduction, à la croissance et aux stress environnementaux. Dans cette optique, deux études ont été réalisées en parallèle dans deux équipes de l'UMR. La première, assurée par H. Bacca (LPI de Plouzané, UMR PE2M), a consisté à étudier l'orientation du métabolisme du glycogène en mesurant l'expression et l'activité des enzymes intervenant dans la cascade de synthèse et de dégradation du glycogène. La seconde, présentée dans ce manuscrit, a eu pour objectif de suivre le développement gamétogénétique, et en parallèle d'évaluer la capacité de transport du glucose et de mise en réserve du glycogène pour les deux familles R et S. Ainsi, l'expérimentation a consisté d'une part à comparer le comportement des huîtres R et S placées dans les mêmes conditions naturelles (sur estran) tout au long d'un cycle annuel et d'autre part à discriminer leur capacité à répondre aux paramètres trophiques, en utilisant à nouveau les structures pilotes de conditionnements contrôlés d'alimentation du SMEL lors des deux périodes d'inversion métabolique (printemps et automne).

Cette étude sur l'effet de la composante génétique de gestion des réserves et la reproduction chez l'huître *Crassostrea gigas* a pour objectif d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

- Quelles sont les différences dans la stratégie de mise en réserve et de reproduction chez les huîtres R et S ?
- Quelles peuvent être les causes de mortalités estivales observées chez les huîtres S ?



## RESULTATS

### 1. Suivi de la gamétogenèse chez les huîtres R et S

#### 1.1. Approche qualitative

Une analyse histologique qualitative individuelle réalisée sur un lot de 10 animaux a permis de déterminer les stades de gamétogenèse et du tissu en réserve. Les résultats sur le suivi sur estran sont reportés sur le **tableau 13** et sur l'effet du conditionnement trophique sur le **tableau 14**.

#### a. Suivi sur estran

Tableau 13. Suivi des stades de gamétogenèse des huîtres R et S sur l'estran. (n=10).

(En gras, les stades majoritaires ; Gam. Résid. : Nombre d'individus dont les tubules gonadiques contiennent de nombreux gamètes résiduels ; herma. : Nombre d'individus hermaphrodites ; Situa. Part. : Situation particulière).

		Stades de gamétogenèse				Gam. Résid.	Situa. Part.	Stades du tissu de réserve			
		0	I	II	III			A	B	C	D
Mars. 05	R	7	3					3	7		
	S	7	3			2		8	2		
Avr. 05	R	5	4	1				2	8		
	S	5	3	2				2	6	2	
Juin. 05	R			6	4		1 herma.			6	4
	S			8	2		2 herma.			6	4
Juil. 05	R				10						10
	S				10						10
Oct. 05	R	10				3		8	2		
	S	10				5		7	3		
Nov. 05	R	10						4	6		
	S	9	1			3		5	5		

Sur l'estran, R et S ont eu en 2005 des comportements analogues en terme de déroulement de la gamétogenèse et de développement du tissu de réserve gonadique. La différence majeure entre les deux lots d'animaux se situe au niveau de la présence de gamètes résiduels. En automne, les tubules gonadiques des huîtres S en contiennent plus et ces gamètes résiduels perdurent jusqu'au printemps (mars 05). Parallèlement à la persistance des gamètes résiduels chez les huîtres S, le tissu de réserve accuse un retard de développement, surtout visible en mars 2005 où les S sont majoritairement en stade A alors que les R se trouvent en stade B.



## b. Réponse au conditionnement trophique

Tableau 14. Stades de gamétogenèse des huîtres R et S soumises à des conditions trophiques opposées au printemps et en automne 2005. (n=10).

(En gras, les stades majoritaires ; Gam. Résid. : Nombre d'individus dont les tubules gonadiques contiennent de nombreux gamètes résiduels).

		Stades de gamétogenèse				Gam. Résid.	Stades du tissu de réserve			
		0	I	II	III		A	B	C	D
Avr. 05 A+	R		6	4		1		7	3	
	S	1	7	2		1		8	2	
Avr. 05 A-	R		5	5				7	3	
	S		10			3		10		
Nov. 05 A+	R	3	7			4	3	7		
	S	2	5		3	4	2	6		2
Nov. 05 A-	R	2	8				2	8		
	S	8	1			3	4	5		

Bien que peu différentes sur estran, R et S semblent répondre de manière différentielle aux paramètres trophiques et tout particulièrement au jeûne, pour ce qui est de la réinitiation du cycle gamétogénétique et de la restructuration du tissu de réserve.

Au printemps, après un mois de jeûne, les S sont toutes en stade I avec un tissu de réserve très développé (stade B) alors que la moitié des R ont déjà atteint le stade II et mobilisent leur réserves (stade C). Ce retard peut être relié à la lyse moins avancée des gamètes résiduels.

En automne, la plupart des S sont en stade de repos sexuel alors que la gamétogenèse des R est plus avancée. Parallèlement à ces observations, les S présentent plus et plus longtemps des gamètes résiduels dans les tubules. La restructuration du tissu de réserve est retardée par rapport aux animaux R. Il est à noter également que certaines huîtres SA+ sont asynchrones par rapport au déroulement habituel de la gamétogenèse : elles présentent un stade III de gamétogenèse au mois de novembre (**Figure 64**).

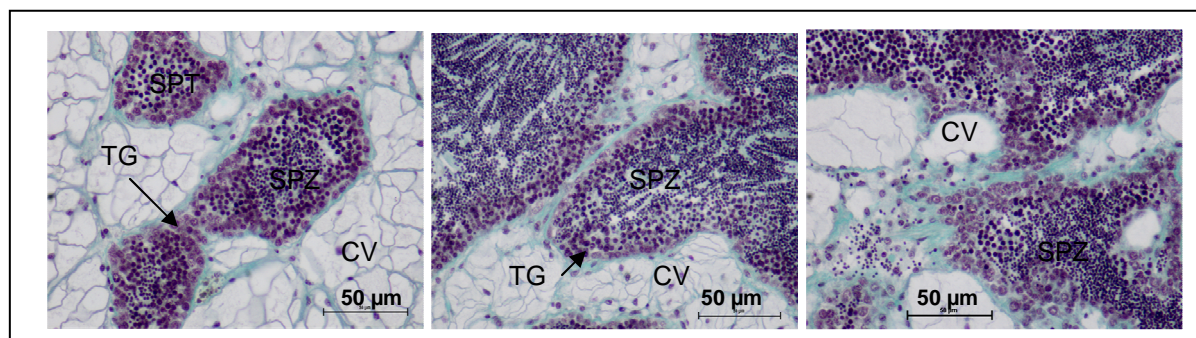


Figure 64. Gamétogenèse (stade III) chez des huîtres S soumises à des conditions trophiques élevées (A+) en novembre 2005. X400. (CV : cellule vésiculeuse, SPT : spermatide, SPZ : spermatozoïde et TG : tubule gonadique)



## 1.2. Approche quantitative

Une approche quantitative par analyse d'image a permis de déterminer le volume occupé par la gonade par rapport à la coupe transversale et de mesurer le pourcentage du volume occupé par le tissu de réserve et les tubules gonadiques contenus dans la gonade. Les résultats du suivi sur estran sont reportés sur la **Figure 65** et ceux du conditionnement trophique sur la **Figure 66**.

### a. Suivi sur estran

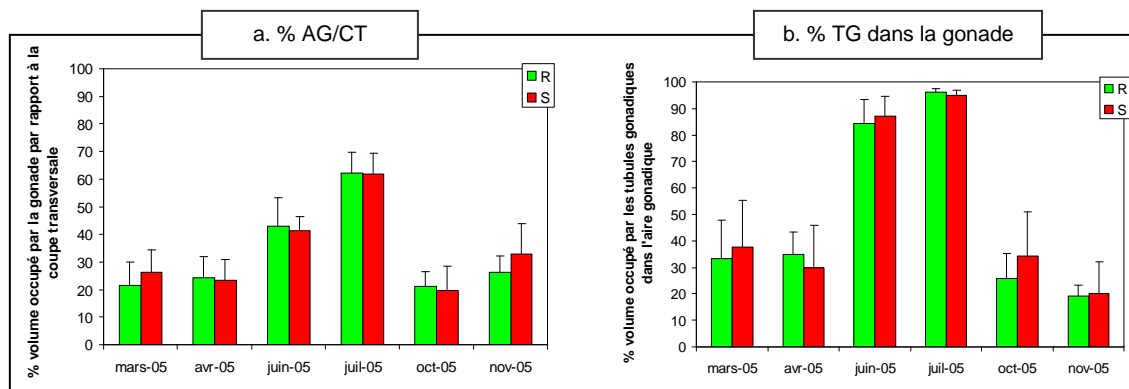


Figure 65. Approches histologiques quantitatives sur des animaux R et S placés sur l'estran. (n=10).

- Pourcentage du volume occupé par la gonade par rapport à la surface totale de la coupe transversale
  - Pourcentage du volume de tubules gonadiques contenu dans la gonade.
- (AG : Aire gonadique, CT : Coupe transversale et TG : Tubules gonadiques).

L'approche quantitative en 2005 ne fait pas apparaître de différence significative entre les lots R et S sur estran que ce soit d'un point de vue du pourcentage de surface occupée par l'aire gonadique par rapport à la coupe transversale ou du pourcentage du volume occupé par les tubules dans l'aire gonadique (**Figure 65**).



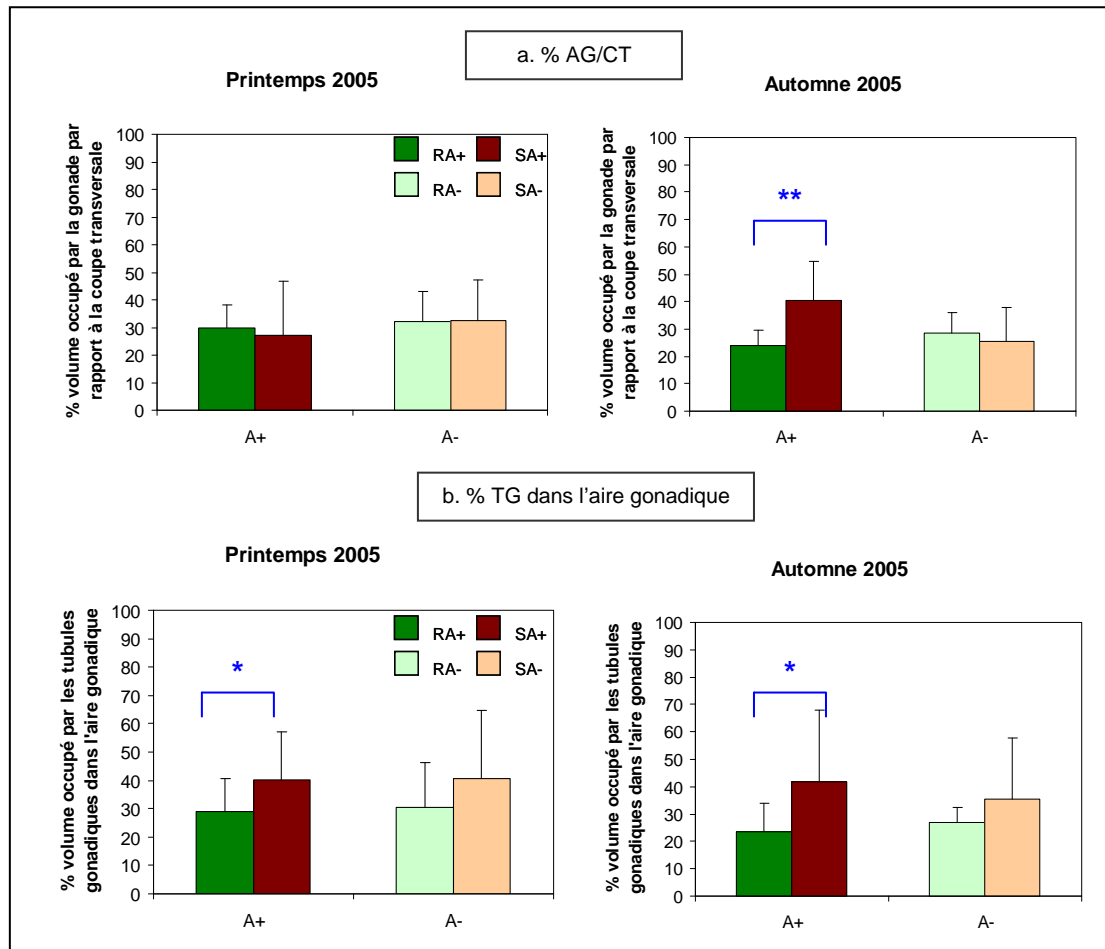
b. Réponse au conditionnement trophique

Figure 66. Approches histologiques qualitatives et quantitatives sur des animaux R et S soumis à deux niveaux trophiques opposés. (n=10).

a. Pourcentage du volume occupé par la gonade par rapport à la surface totale de la coupe transversale

b. Pourcentage du volume de tubules gonadiques contenu dans la gonade.

(AG : Aire gonadique, CT : Coupe transversale et TG : Tubules gonadiques).

Test Student: \* P<0,05 et \*\* P<0,01.

Au printemps, le retard de gamétogenèse observé après un mois de jeûne ne se traduit pas par une diminution du volume gonadique. La surface des tubules chez les S est même légèrement plus élevée que celle des R et ce quelques soient les conditions d'alimentation, ce qui peut-être lié à la présence de gamètes résiduels et/ou traduire un effort de reproduction plus important pour les S.

En automne, en condition alimentée, la différence de volume de la gonade entre R et S est liée aux animaux en stade III présentant une gonade particulièrement développée (**Figure 66**). En condition de jeûne, le retard de gamétogenèse entre les R et S ne se traduit pas par une baisse significative de volume de la gonade, la différence entre les stades 0 et I de gamétogenèse étant certainement plus qualitative que quantitative.



Enfin, le volume des tubules gonadiques dans l'aire gonadique est en général supérieur pour les animaux S, ce qui doit être mis en relation avec le fort taux de gamètes résiduels mais ceci n'exclut pas la possibilité d'un effort de reproduction supérieur pour les S.

## 2. Approche du métabolisme du glycogène

Le bilan des réserves en glycogène des huîtres R et S prend en compte la capacité d'incorporation du glucose en glycogène et d'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses dissociées de palpes labiaux ainsi que l'expression relative du cotransporteur SGLT mesurée par technique de PCR en temps réel dans les palpes labiaux (**Figures 67 et 68**).

### a. Suivi sur estran

Le bilan des réserves en glycogène montre peu de différence entre les deux lots d'huîtres R et S sur estran, excepté en octobre 2005 : les capacités d'incorporation et d'entrée du glucose sont inférieures chez les S par rapport aux R mais nous n'observons pas de différence au niveau de l'expression de SGLT, toujours faible en automne (comme pour les huîtres T, Chapitre II). L'expression relative du transporteur SGLT est en revanche élevée en mars 2005, en accord avec sa probable implication dans la mobilisation des réserves. En novembre, R et S retrouvent une capacité d'entrée et d'incorporation similaire, voire légèrement supérieure pour les S.



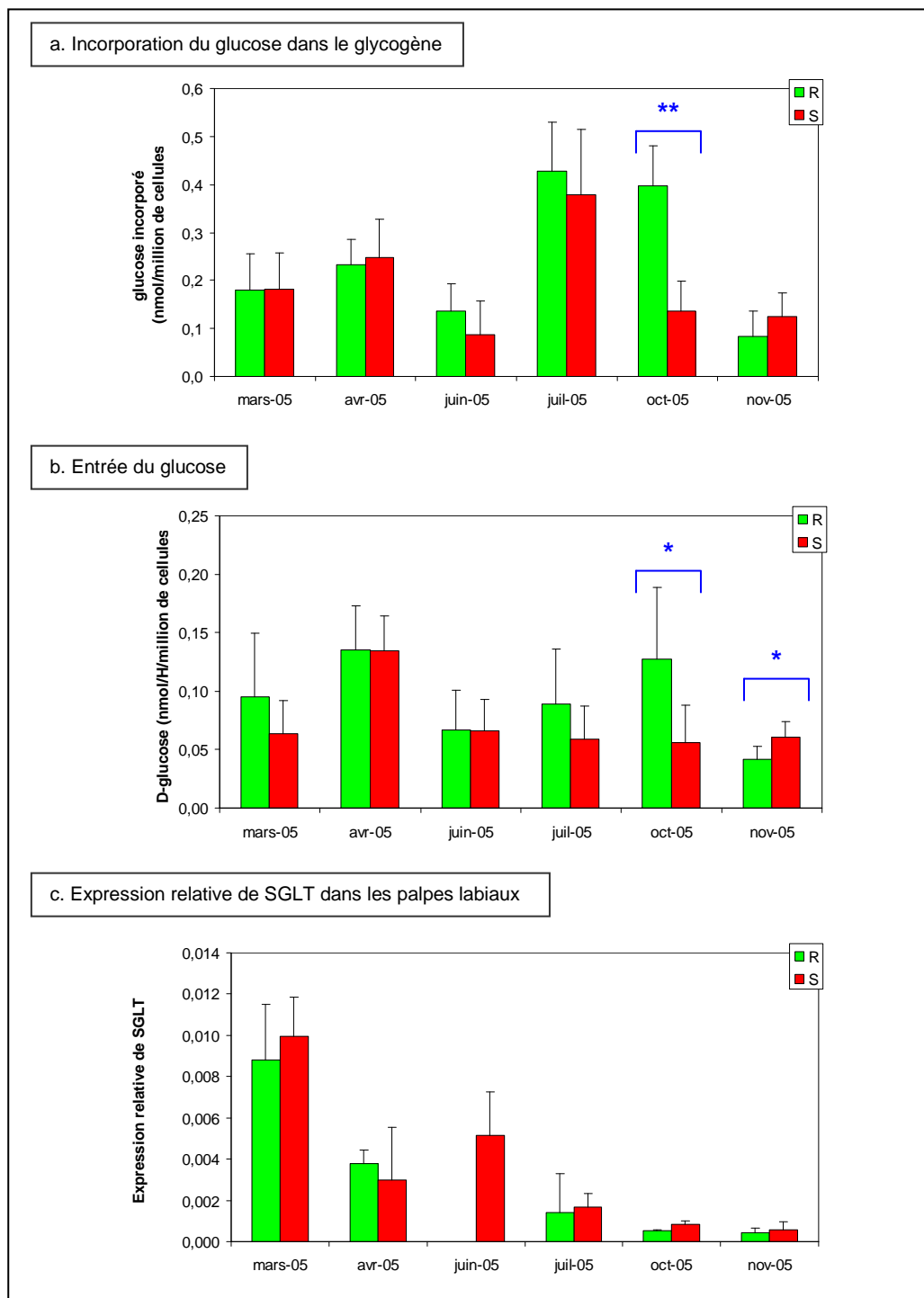


Figure 67. Statut des réserves en glycogène sur des animaux R et S placés sur l'estran.

- Evolution de la capacité d'incorporation du D-glucose en glycogène dans les cellules vésiculeuses dissociées de palpes labiaux (n=6).
- Evolution de la capacité d'entrée du D-glucose dans les cellules vésiculeuses dissociées de palpes labiaux (n=6).
- Expression quantitative des ARNm de SGLT mesurée par technique de PCR en temps réel dans les palpes labiaux (n=3). NB. pas d'échantillonnage pour les animaux R en juin 2005.

Test Student: \* P<0,05 et \*\* P<0,01.



**b. Réponse au conditionnement trophique**

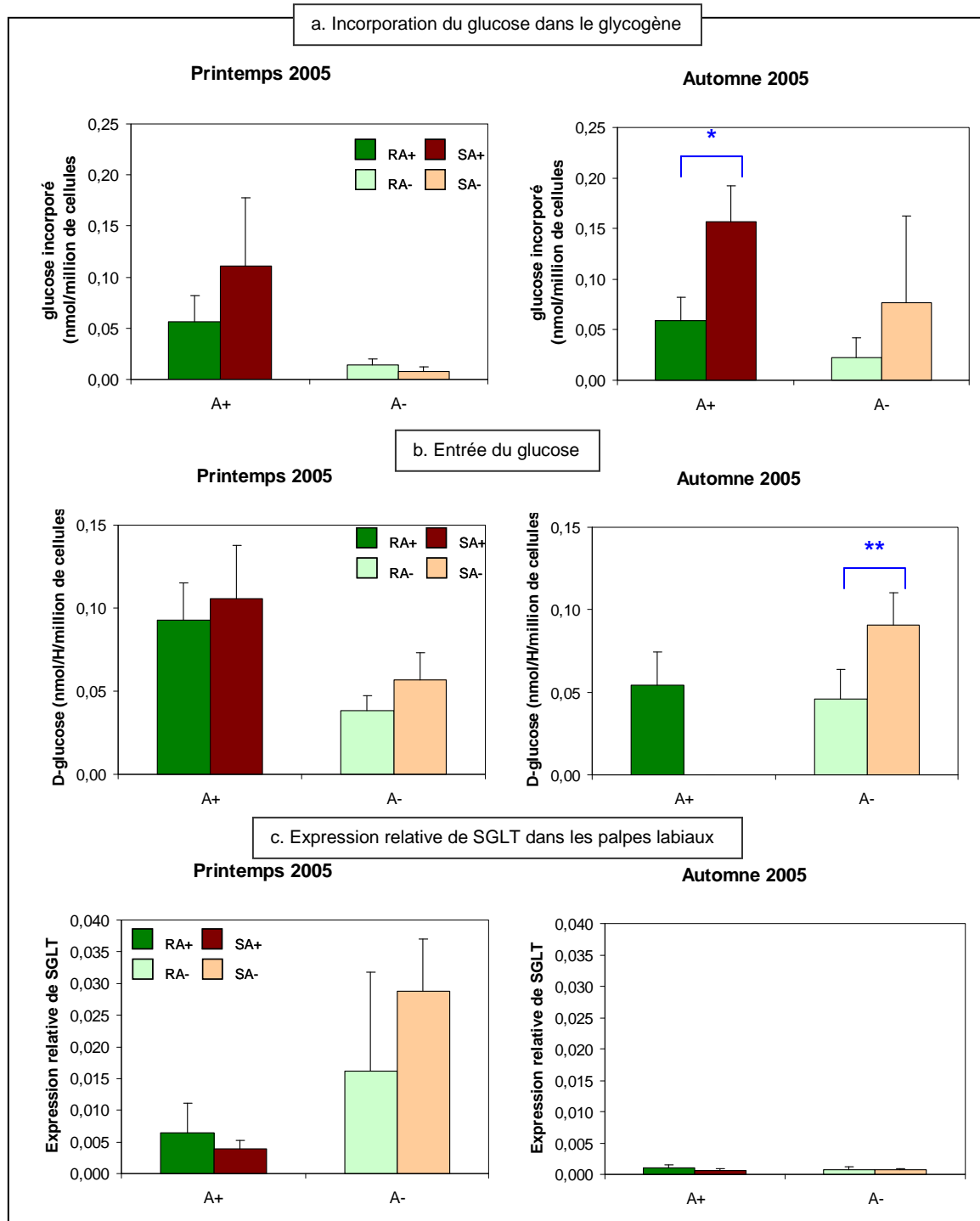


Figure 68. Statut des réserves en glycogène sur des animaux R et S soumis à deux niveaux trophiques opposés.

- Evolution de la capacité d'incorporation du D-glucose en glycogène dans les cellules vésiculeuses dissociées de palpes labiaux (n=6).
- Evolution de la capacité d'entrée du D-glucose dans les cellules vésiculeuses dissociées de palpes labiaux (n=6). NB. pas d'échantillonnage pour les animaux SA+ en automne 2005.
- Expression quantitative des ARNm de SGLT mesurée par technique de PCR en temps réel dans les palpes labiaux (n=3).

Test Student: \* P<0,05 et \*\* P<0,01.



Lorsque l'incorporation du glucose dans le glycogène est possible, les S ont une capacité d'incorporer supérieure aux R. Cette différence est plus nette en conditions trophiques élevées et est significative en novembre après le conditionnement automnal.

Au niveau de la capacité d'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses, les différences R/S n'apparaissent qu'en automne après un mois de jeûne : les S présentent une meilleure capacité d'entrée (NB. absence de point SA+ à cette date, faute de matériel biologique). Ces variations ne s'accompagnent pas d'une différence d'expression des transporteurs SGLTs. Le nombre de transcrits SGLTs est très faible en automne.



## PRINCIPAUX RESULTATS

### SUIVI SAISONNIER

- Le déroulement de la gamétogenèse est similaire pour les lots R et S lors du suivi sur l'estran. Néanmoins, les huîtres Sensibles possèdent plus de gamètes résiduels et les conservent plus longtemps que les Résistantes.
- La restructuration du tissu de réserve gonadique est plus lente chez les S au mois de mars (en lien avec les gamètes résiduels) mais ce retard est ensuite rattrapé en avril.
- Le bilan des réserves en glycogène montre peu de différence entre les deux familles génétiques R et S excepté en octobre. Enfin, il n'y a pas d'effet de la composante génétique sur l'expression du transporteur SGLT.

### EFFET TROPHIQUE

Les effets trophiques mettent en évidence certaines différences entre les R et S :

- Les conditions trophiques révèlent un décalage entre les R et S en terme de déroulement de leur gamétogenèse particulièrement marqué au printemps après un mois de mise à jeun.
- Les S semblent plus sensibles aux conditions d'alimentation que les R en automne 2005, l'aire gonadique des huîtres S est proportionnellement plus volumineuse que celle des R, ce qui peut-être mis en relation avec le décalage des S noté dans l'approche descriptive (3 animaux en stade III). Le pourcentage du volume occupé par les tubules dans l'aire gonadique est toujours supérieur pour les animaux S, cette différence étant significative en condition d'alimentation A+. Cette observation est à mettre en relation avec la présence de plages de lyse et de gamètes résiduels dans les tubules gonadiques mais n'exclut pas la possibilité que l'effort de reproduction soit supérieur pour les S.
- Quelque soient les niveaux d'alimentation, les huîtres S possèdent une meilleure capacité d'entrée et d'incorporation surtout en automne, en période de mise en réserve du glycogène. Enfin, le conditionnement trophique ne montre pas d'effet de la composante génétique sur l'expression du transporteur SGLT.



## DISCUSSION

Dans le cadre du programme MOREST, deux familles d'huîtres ont été sélectionnées sur la base de leur résistance différentielle aux mortalités estivales. En 2005, Dégremont et ses collaborateurs ont mis en évidence que 45 % de la variance observée dans la mortalité sur estran était expliquée par l'origine génétique des huîtres. Un des objectifs du programme MOREST a consisté à analyser les bases physiologiques de ces différences entre R et S en les soumettant à des conditions différentes. Ainsi, des lots R et S ont été suivis dans trois sites atelier du programme : le bassin de Marennes Oléron en Charente Maritime, la rivière d'Auray dans le Morbihan et la Baie des Veys dans la Manche ou en conditions artificielles (Samain & Mc Combie, 2007). La comparaison entre les deux familles a montré des différences majeures dans la stratégie de reproduction. Dans notre étude, ces lots ont été suivis en Baie des Veys sur le banc de Géfosse et en conditions contrôlées d'alimentation parallèlement à des lots témoins non sélectionnés. Une attention particulière a été portée à leur reproduction et à leur gestion des réserves en glycogène.

- **Stratégie reproductive**

Le suivi sur l'estran des huîtres R et S a permis de mettre en évidence les différences entre les animaux R et S en terme de stratégie reproductive. Si l'émission des gamètes en été est partielle pour les deux familles, il est clairement apparu que les huîtres S conservent plus et surtout plus longtemps des gamètes résiduels. Ces gamètes résiduels qui remplissent parfois les tubules jusqu'en mars (huîtres S) peuvent ralentir la réinitiation d'une nouvelle gamétogenèse, mais semblent surtout freiner la restructuration du tissu de réserve en automne. Cela se traduit au printemps (mars 2005) par une majorité de S (8/10) en stade A (avec un tissu de réserve en cours de restructuration) alors que les R (7/10) ont un tissu de réserve ayant atteint un développement total (stade B). La persistance des gamètes résiduels et des plages de lyse chez les huîtres S (parfois jusqu'en mars) pourrait provoquer un décalage dans la reprise de la nouvelle gamétogenèse et retarder également le développement du tissu vésiculeux gonadique qui, à terme, pourrait être insuffisant pour subvenir aux dépenses énergétiques liées à la reproduction. Cette différence physiologique pourrait donc être impliquée dans la survie différentielle observée entre les deux groupes et constitue un élément de réponse possible au problème des mortalités estivales.

Nos résultats de suivis de gamétogenèse en Baie des Veys sont dans leur ensemble conformes à ce qui a été observé en rivière d'Auray et en Baie des Veys dans des études antérieures sur les deux lots R et S (Samain & Mc Combie, 2007) : en 2002 à Auray, la température de l'eau ayant atteint 20°C, les R ont émis la totalité de leur gamètes au cours du mois d'août alors que les S ont présenté une ponte partielle et une résorption lente des



gamètes résiduels en automne. L'année suivante sur le même site, la température estivale ayant atteint 22°C, R et S ont pondu de façon synchrone. En 2003 et 2004, sur le site de la Baie des Veys, l'analyse histologique et le dosage lipidique avaient indiqué un investissement plus important des huîtres S dans la gamétogenèse (au printemps) mais aucune différence n'avait été observée pendant la période de ponte et post-ponte (automne). Dans le cadre de notre étude, la température relevée en Baie des Veys n'a pas dépassé 17,5°C en période estivale. Cette faible montée en température en 2005 pourrait expliquer que les R ont aussi subi des émissions partielles cette année, mais moindres que les S.

Prises dans leur ensemble, les données collectées sur les différents sites depuis 2003 tendent donc à montrer que les huîtres S présentent :

- un effort de reproduction supérieur par rapport aux R,
- une tendance aux pontes partielles plus marquée que pour les R.

Ces caractéristiques restent cependant fortement dépendantes des conditions du milieu, en particulier de la température (émission des gamètes) et des conditions trophiques (déroulement de la gamétogenèse). L'impact des conditions trophiques sur la gamétogenèse a déjà fait l'objet de plusieurs études : la nourriture disponible en fin d'hiver et début de printemps semble jouer un rôle important dans le stockage des réserves permettant la synthèse des gamètes (Maurer & Borel, 1986). Dans les zones eutrophes, le développement gonadique de l'huître semble amplifié jusqu'à une hypertrophie de la gonade pouvant conduire à des désordres physiologiques (Mori, 1979 ; Kang *et al.*, 2000). En contre partie, une déficience dans la nourriture printanière peut retarder la maturation des gonades et provoquer un décalage de la ponte (Deslous-Paoli *et al.*, 1982). Afin de comparer l'effet des conditions trophiques sur les deux souches R et S, et tout particulièrement sur leur gamétogenèse, un conditionnement trophique a été réalisé aux deux périodes clés du suivi.

- un mois de jeûne entraîne en automne un fort retard des S par rapport aux R en terme de stade de gamétogenèse avec un tissu de réserve très peu développé. Les S possèdent toujours plus de gamètes résiduels que les R même si le jeûne semble activer leur lyse. S'il n'est pas étonnant que le jeûne retarde la maturation des gonades au printemps (Deslous-paoli *et al.*, 1982), les S semblent plus sensibles à cet effet trophique que les R.

- les fortes conditions trophiques font ressortir des différences entre R et S essentiellement en automne : pour les S, le volume de la gonade est supérieur ainsi que le pourcentage de tubules gonadiques dans l'aire gonadique, ce qui doit être mis en relation avec le fort taux de gamètes résiduels. En outre, trois huîtres S (sur 10) étaient en stade III à l'issue du conditionnement A+, stade habituellement obtenu en début d'été. Ceci peut être relié soit à un retard très conséquent de ces animaux soit à une stimulation de la gamétogenèse liée au conditionnement artificiel. En effet, la technique de conditionnement



de géniteurs consiste à placer des animaux dans des conditions trophiques riches et à élever graduellement la température pour accélérer le développement de la gonade jusqu'au stade de maturité sexuelle (Lannan *et al.*, 1980). Le conditionnement de géniteurs de *Crassostrea gigas* en laboratoire peut être accompli presque toute l'année à l'exception de l'automne (Robert & Gérard, 1999). A cette période de l'année, qualifiée à ce titre de « réfractaire », les huîtres se trouvent en période de repos sexuel et ne sont pas réceptives aux conditionnements environnementaux. Cependant, une étude réalisée par Chávez-Villalba (2001) a démontré que la production d'ovocytes et de larves viables est possible pendant la période de ralentissement du cycle sexuel si les huîtres sont exposées à une accélération de la variation de la température de manière à créer des conditions hivernales en octobre suivies de conditions estivales. Ces résultats illustrent donc le fait que les huîtres S répondent différemment et apparaissent plus sensibles aux conditionnements artificiels en automne que les R.

De nombreux auteurs ont montré que la fonction de reproduction est extrêmement coûteuse en énergie (Berthelin *et al.*, 2000b, Soletchnik *et al.*, 1997). Cette énergie provient de l'alimentation mais également des réserves de glycogène pré-établies par l'animal qui diminuent progressivement au cours du processus gamétogénétique. Les S semblent investir plus d'énergie dans la reproduction que les R, ce qui pourrait entraîner un déséquilibre énergétique que des variations de température (stress thermiques), l'émission des gamètes ou d'autres facteurs environnementaux ou pathogènes peuvent encore accroître (Li *et al.*, 2007; Samain *et al.*, 2007). Le statut énergétique des animaux doit donc également être pris en compte dans les phénomènes de mortalités.

- **Gestion des réserves**

L'analyse histologique des R et S en Baie des Veys montre clairement un retard des S du point de vue de la restructuration du tissu de réserve au printemps. Ce retard est indissociable de la présence des gamètes résiduels ou des plages de lyse dans l'aire gonadique; il est accentué par des conditions de jeûne. Nous nous sommes demandés si, parallèlement à ce retard de lyse, les R et S différaient au niveau de leur capacité de mise en réserve ou de mobilisation du glycogène.

Pour aborder cet aspect, nous avons suivi sur estran puis dans les conditions trophiques contrôlées (i) l'incorporation du glucose en glycogène, (ii) l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses de palpes et (iii) l'expression du transporteur SGLT.



Sur estran, R et S présentent des profils similaires sauf en octobre 2005 où les S accusent une plus faible capacité d'entrée et d'incorporation du glucose. Les données sur la capacité d'incorporation peuvent être mises en parallèle avec celles portant sur les enzymes clés du métabolisme du glycogène dosées par Bacca en 2007 : l'expression des enzymes glycogène synthase (GS) et glycogène phosphorylase (GP) a été mesurée par PCR en temps réel et l'activité de ces enzymes a également été dosée. D'après cet auteur (Bacca, 2007), il existe de petites différences en terme de quantité d'ARNm mais il n'y a aucune différence d'activité GS ou GP entre les huîtres R et S, quelle que soit la saison analysée. Il n'y aurait donc pas de différence majeure de fonctionnement au niveau des enzymes de synthèse et de dégradation du glycogène. La faible capacité d'incorporation pourrait être simplement le reflet d'une plus faible capacité d'entrée du glucose chez les S. Cette différence ne met pas en jeu les SGLTs dont le niveau d'expression ne varie pas (faiblement exprimé en automne pour les S comme pour les R), mais concernerait plutôt les systèmes de transport facilité de type GLuT dont l'existence a été étudiée en chapitre I. Ces transporteurs peuvent être la cible de régulations endocrines modulant leur disponibilité au niveau de la membrane plasmique, l'effet de l'insuline sur la translocation des GluT 4 ayant été largement décrit chez les vertébrés (Martin *et al.*, 2000).

**En bilan de cette étude comparant les animaux R et S sur l'estran ou en conditions d'alimentation contrôlées, il apparaît que la différence de stratégie de reproduction est certainement un point clé du mécanisme de la résistance, comme cela a déjà été signalé par Samain *et al.*, en 2007. L'émission des gamètes, d'après tous les résultats collectés sur des différents sites, semble largement soumise au facteur température et les S y seraient particulièrement sensibles. Nos données en conditionnement artificiel montrent également que les S sont plus sensibles aux conditions trophiques que les R, cette sensibilité portant sur la lyse des gamètes résiduels, la réinitiation de la gamétogenèse mais également sur le métabolisme du glycogène en automne.**



**Perspectives :**

La (les) différence(s) génétique(s) entre R et S porte(nt) donc à la fois sur (i) la reproduction, (ii) la gestion des réserves et (iii) la susceptibilité aux stress (thermiques, pathogènes etc.) et seraient sous contrôle d'un petit nombre de gènes (Dégremont et al., 2007).

Pour comprendre les bases de cette divergence génétique, il serait sans doute intéressant de prendre en compte non seulement les acteurs de ces différentes fonctions mais surtout les voies régulatrices. Là encore, les molécules de la famille des insuline pourraient être de bons candidats puisqu'elles interviennent chez les vertébrés comme chez les invertébrés dans la régulation de la reproduction, de la croissance, du métabolisme du glycogène, de réponse aux stress...(Clayes et al., 2002 pour revue) et qu'elles peuvent également intégrer des effets environnementaux. Des séquences de récepteur et de ligand sont dorénavant disponibles (Gricourt et al., 2003, Hamano et al., 2005) et les effecteurs des cascades de signalisation sont en cours de caractérisation. Il en est de même pour la voie Leptine-Neuropeptide Y, également impliquée dans la gestion de la prise alimentaire et de la mise en réserve ainsi que dans le contrôle de la reproduction et de la croissance (Peng et al., 1990; Schneider, 2004). Les acteurs de cette voie ont également été décrits chez les invertébrés (De Jong-Brink et al., 2001 pour revue) et récemment, des séquences EST apparentées au neuropeptide Y et à son récepteur ont été identifiées dans les banques normalisées "d'hémocytes et tous stades".

Le suivi de l'expression de tous ces gènes potentiellement impliqués dans la balance énergétique associée à la reproduction pourra être envisagé par une approche de type microarray et par PCR en temps réel afin de préciser leur implication dans la saisonnalité du métabolisme, les réponses aux variations du milieu (température, alimentation...), les différences entre souches (R et S par exemple).



**CHAPITRE IV**  
**CRYOPRESERVATION, OUTIL POUR LA**  
**CONSERVATION A LONG TERME DE CELLULES**  
**VESICULEUSES**



**CHAPITRE IV. CRYOPRESERVATION, OUTIL POUR LA CONSERVATION A LONG TERME DE CELLULES VESICULEUSES** **149**

---

<b>INTRODUCTION</b>	<b>151</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>154</b>
1. Phases d'abaissement de température	154
2. Toxicité et efficacité des agents cryoprotecteurs	154
3. Effet de la vitesse de descente en température	156
4. Effet de la température de transfert des échantillons dans l'azote liquide	158
5. Conditions finales de cryopréservation	158
6. Activité métabolique des cellules cryopréservées	159
7. Constitution d'une banque de cellules vésiculeuses	161
<b>PRINCIPAUX RESULTATS</b>	<b>162</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>163</b>



## IV. CRYOPRESERVATION, OUTIL POUR LA CONSERVATION A LONG TERME DE CELLULES VESICULEUSES

### INTRODUCTION

Les données précédemment acquises ont montré la saisonnalité du métabolisme du glucose dans les cellules vésiculeuses d'huître. Le cycle saisonnier de stockage et de mobilisation des réserves n'est pas corrélé chez cette espèce avec l'abondance d'aliments dans le milieu. Cette observation suggère que le métabolisme énergétique est certainement soumis à un mécanisme de régulation stricte permettant d'ajuster la gestion des réserves aux besoins énergétiques (croissance reproduction, survie). La nature de cette régulation reste à préciser. La recherche de régulateurs potentiels a déjà fait l'objet d'étude (Heude-Berthelin, 2000) mais se heurte toujours à des limites méthodologiques : il n'est pas aisé de comparer des effets d'extraits ganglionnaires ou de molécules hétérologues sur des suspensions cellulaires fraîches réalisées à différentes périodes de l'année et pouvant présenter des orientations métaboliques variables. De ce point de vue, il est apparu que la technique de cryopréservation pouvait s'avérer particulièrement intéressante : elle permet de disposer de lots de cellules métaboliquement caractérisées (orientées vers la mise en réserve ou vers la mobilisation selon la période de congélation) sur lesquels il est possible de tester de façon reproductible n'importe quel extrait ou facteur à n'importe quel moment. Cette technique permet également d'atténuer les variations individuelles ou interannuelles très marquées chez ces animaux.

C'est dans cette optique que la technique de cryopréservation a été envisagée sur des suspensions de cellules vésiculeuses d'huître *Crassostrea gigas*.

La technique de cryopréservation a été largement utilisée depuis de nombreuses années pour la conservation à long terme de cellules, de tissus et d'embryons de mammifères (Mazur, 1984 ; Guignot, 2005). Chez les Mollusques bivalves cette technique a également été éprouvée, essentiellement pour la congélation des spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* (Bougrier & Rabenomanana, 1986 ; Kurokura *et al.*, 1990 ; Mc Fadzen, 1995 ; Usuki *et al.*, 1997 ; Ieropoli *et al.*, 2004 ; Dong *et al.*, 2005a et 2005b), de *C. virginica* (Paniagua-Chavez *et al.*, 1998 et 2006), de *C. tulipa* (Yankson & Moyse, 1991) et de *C. rhizophorae* (Nascimento *et al.*, 2005) et de *Pinctada margaritifera* (Acosta-Salmon *et al.*, 2007).

La cryopréservation des ovocytes est expérimentée avec succès depuis 2005 (Tervit *et al.*, 2005) : la survie et le développement embryonnaire après fécondation des ovocytes congelés sont suffisants pour permettre l'utilisation de cette technique dans des programmes de sélection par combinaison parentale. Des protocoles de cryopréservation de larves ont



été établis chez différentes espèces : Mc Fadzen *et al.*, 1995 ; Chao *et al.*, 1994 et 1997, Gwo, 1995 ; Naidenko, 1997 ; Lin *et al.*, 1999 mais avec des taux de survie relativement faibles.

En ce qui concerne les cellules somatiques différenciées de Mollusques les données sont beaucoup plus fragmentaires : des essais fructueux de cryopréservation ont été réalisés sur des cellules cardiaques de *Crassostrea virginica* (Cheng *et al.*, 2001), de *Pecten maximus* (Le Marrec-Croq *et al.*, 1998) et des cellules dissociées de manteau de *Haliotis tuberculata* (Poncet *et al.*, 2002).

L'impact de la congélation sur ces différents types cellulaires est évalué soit par des tests de survie soit par des tests fonctionnels.

Le test de perméation du bleu trypan, le dosage de protéines (Bradford) ou de l'ADN (Test de Burton) sont rapides et simples à mettre en œuvre. L'utilisation récente de traceurs fluorescents (SYBR 14 et l'iodure de propidium) utilisés pour vérifier l'intégrité de la membranes cellulaires (Paniagua-Chavez *et al.*, 2006) ne donne pas d'information sur la « récupération » des capacités physiologiques des cellules décongelées. L'activité mitochondriale peut également être suivie, indépendamment du type cellulaire par le test enzymatique de réduction du MTT (Seidler & Wohlrab, 1973) ou très récemment par l'utilisation du traceur fluorescent Rhodamine 123 (R123) qui permet de mesurer le potentiel membranaire mitochondrial (Paniagua-Chavez *et al.*, 2006). Des tests de fonctionnalité plus spécifiques du type cellulaire ont également été développés, en particulier pour les gamètes et les embryons : la mobilité des spermatozoïdes et leur pouvoir fécondant sont très souvent pris en considération, de même que le développement d'ovocytes après avoir réalisé une fécondation, ou le développement des embryons après décongélation. Pour les cellules somatiques, la disponibilité de tests biologiques d'activité fonctionnelle s'est limitée à la capacité de synthèse de protéines, d'ARN ou d'ADN. La disponibilité de deux tests spécifiquement adaptés aux cellules vésiculeuses dissociées, le suivi de l'entrée du glucose et le suivi de l'incorporation du glucose en glycogène est une occasion indiscutable d'évaluer l'impact de la congélation sur ce type cellulaire.

Quel que soit le type cellulaire congelé, le protocole de cryopréservation fait toujours appel à l'utilisation d'agents cryoprotecteurs. Ils protègent des dommages que peuvent causer les stress osmotiques en présence de glace extracellulaire lors du refroidissement (entre -5 et -15°C) et empêchent la formation de cristaux de glace intracellulaire à plus basse température. Ils agissent en abaissant le point de congélation (Jain & Paulson, 2006). Néanmoins aux concentrations utilisées, ils peuvent avoir également des effets toxiques impliquant un placement immédiat à froid après leur ajout et une dilution très rapide dans un milieu après décongélation.



Plusieurs agents cryoprotecteurs (pénétrants ou non pénétrants) sont répertoriés dans la littérature : chez *Mizuchopecten yessoensis* et chez *Mytilus trossulus*, le DiMéthylSulfOxide (DMSO 5-10 %) a été retenu en tant que meilleur cryoprotecteur suite à l'analyse comparée de la survie après congélation de cultures primaires de cellules provenant de différentes origines de tissus (Odintsova & Tsal, 1995 ; Odintsova *et al.*, 2001). Ce même cryoprotecteur a permis de conserver 93 % de la fertilité des spermatozoïdes de *C. gigas*, 78,3 % et 71,4 % de fertilité pour *Saccostrea cucullata* et *C. tulipa* respectivement (Yankson & Moyse, 1991). L'éthylène glycol, le glycérol et le DMSO ont également été utilisés pour la cryopréservation de larves nauplii de *Balanus amphitrite* en testant différentes concentrations, en variant le temps d'incubation et la température de transition. Le taux de survie est le plus important en présence de l'éthylène glycol (Anil *et al.*, 1997). Il apparaît donc en se référant à la littérature que le choix du cryoprotecteur dépend largement du type de tissu ou de cellules cryopréservées. L'utilisation simultanée de plusieurs cryoprotecteurs a également été testée (Poncet & Lebel, 2003), avec une efficacité accrue sur les hémocytes d'ormeaux *Haliotis tuberculata*.

La vitesse de congélation est également un des facteurs qui détermine la survie cellulaire : il faut d'une part qu'elle soit assez lente pour permettre une déshydratation suffisamment poussée et ainsi éviter la formation de cristaux de glace intracellulaires, et d'autre part assez rapide pour limiter l'effet toxique des cryoprotecteurs avant la congélation (Mazur, 1984). A un protocole de congélation brutale interrompue par des paliers (Odintsova & Tsal, 1995), est préféré maintenant une diminution progressive de la température. Cette méthode est souvent préconisée lors de la congélation de cellules ou de tissus de Bivalves (Le Marrec-Croq *et al.*, 1998 ; Horita *et al.*, 1999 ; Lin *et al.*, 1999). De plus, des tests réalisés sur les hémocytes d'ormeaux ont révélé l'importance de la vitesse de refroidissement : une meilleure survie est obtenue avec un refroidissement plus lent (-1°C/min) en présence de glycérol (Poncet *et al.*, 2002) alors qu'une vitesse plus rapide (-6 à -8°C/min) appliquée à différents types de cellules somatiques ne permet pas d'obtenir des taux de survie élevés (Odintsova *et al.*, 2001).

Ainsi, dans ce chapitre les différents paramètres susceptibles d'influer sur la réussite de la cryopréservation ont été pris en compte pour valider un protocole adapté aux cellules vésiculeuses : différents traitements cryoprotecteurs, différentes vitesses d'abaissement en température et des températures de transfert des échantillons dans l'azote liquide ont été comparés. L'efficacité de ces traitements a été validée par le test de réduction MTT, puis, pour les concentrations finalement retenues, l'activité fonctionnelle des cellules vésiculeuses a été suivie en mesurant l'entrée et l'incorporation du glucose dans les réserves cellulaires.



## RESULTATS

### 1. Phases d'abaissement de température

La congélation des suspensions cellulaires se réalise dans un congélateur programmé qui contrôle la vitesse d'abaissement de température.

Cette diminution de température se déroule en plusieurs étapes (**Figure 69**).

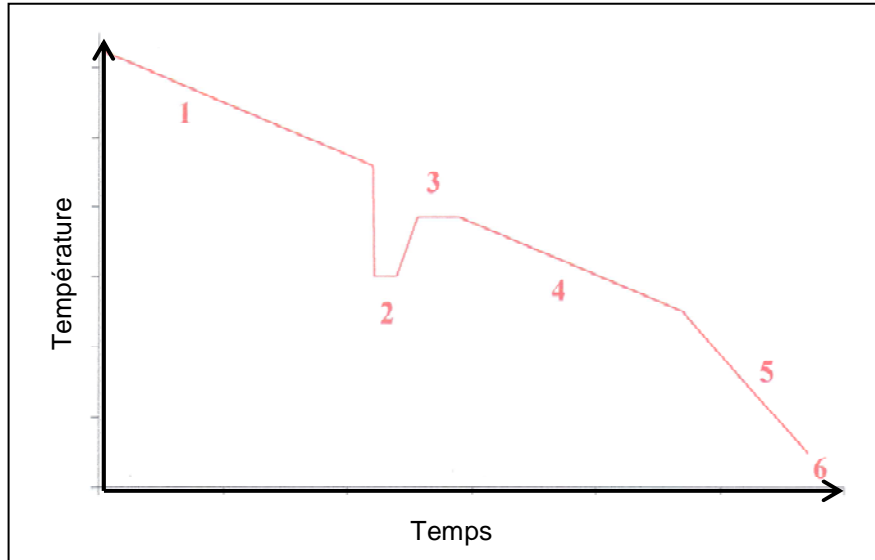


Figure 69. Phases d'abaissement de température en fonction du temps

- (1) Phase de refroidissement contrôlé
- (2) « Seeding » : diminution brusque de la température
- (3) Période de récupération du refroidissement contrôlé
- (4) Phase de refroidissement avec une vitesse identique que l'initiale jusqu'à -40 ou -50 °C
- (5) Phase de refroidissement accéléré jusqu'à -70 °C
- (6) Transfert des échantillons dans l'azote liquide et conservation

La première étape est une phase de refroidissement contrôlée depuis la température ambiante jusqu'au voisinage du point de congélation du milieu (1). Cette phase est suivie par une procédure de « seeding » (2) qui correspond à une descente brusque de la température. Ensuite, la phase de récupération de la descente contrôlée de la température (3) précède une reprise de la vitesse initiale de refroidissement jusqu'à -40 ou -50°C (4), coïncidant à la phase de température auxquelles les cellules sont les plus vulnérables (Chao & Liao, 2001). La phase de refroidissement est enfin accélérée jusqu'à -90°C (5) avant le transfert des échantillons dans l'azote liquide (6).

### 2. Toxicité et efficacité des agents cryoprotecteurs

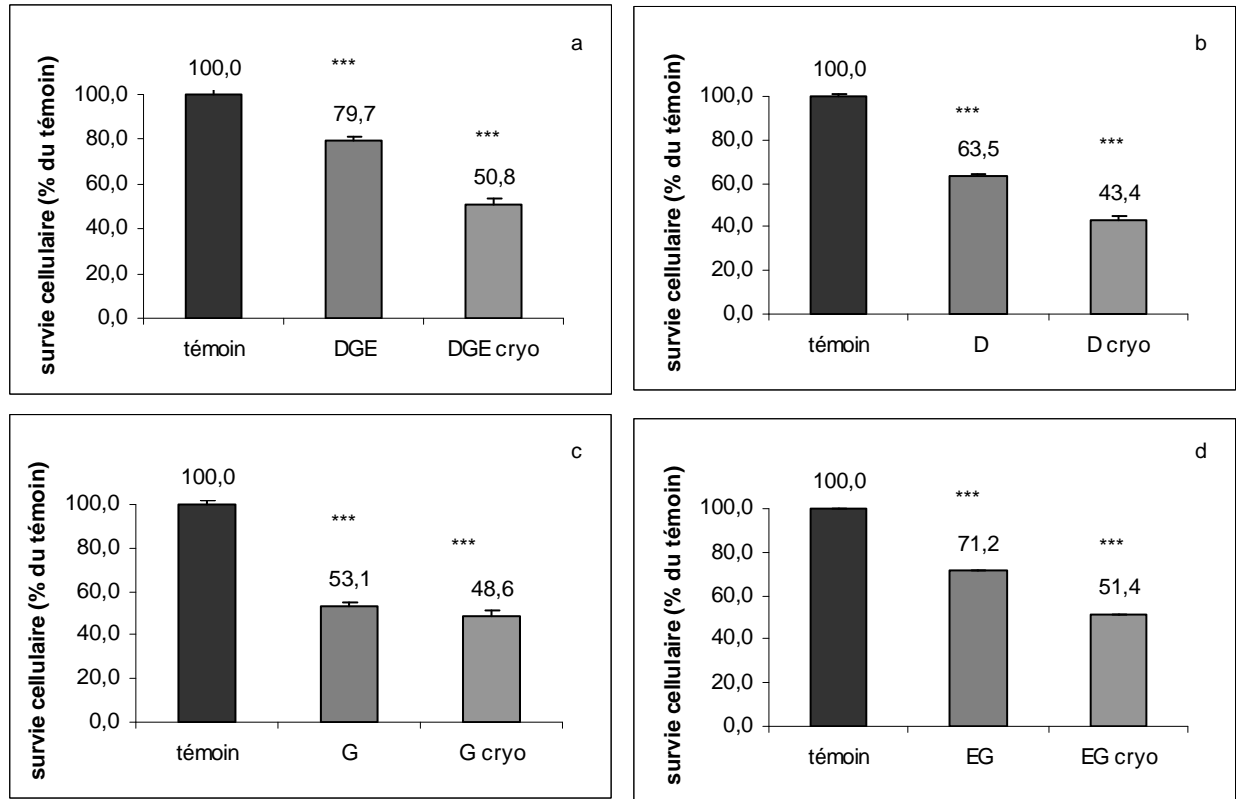
Pour les quatre traitements cryoprotecteurs choisis, la survie des cellules de la suspension a été déterminée par le test de réduction MTT dans trois conditions :

- cellules non traitées et non congelées



- cellules traitées au cryoprotecteur et non congelées
- cellules traitées au cryoprotecteur et congelées.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la survie du témoin non traité (100%) et sont reportés en **Figure 70**.



**Figure 70. Evaluation de la survie avant et après congélation en présence de 4 solutions cryoprotectrices.**

La survie est exprimée par rapport à un témoin non congelé et non traité aux cryoprotecteurs. Test student, significativité par rapport au témoin : \*\*\* P<0.001 (n= 3).

Témoin : échantillon non traité et non congelé

DGE: DMSO, Glycérol, Ethylène glycol, D: DMSO, G: Glycérol, EG: Ethylène glycol (avant congélation)

Cryo: échantillons ayant subi la cryopréservation avec une vitesse de descente de température de - 3°C/min jusqu'à -50°C puis transfert des échantillons dans l'azote liquide.

La survie sans congélation est le reflet de la toxicité du traitement cryoprotecteur. Cette toxicité peut-être donnée par la formule :

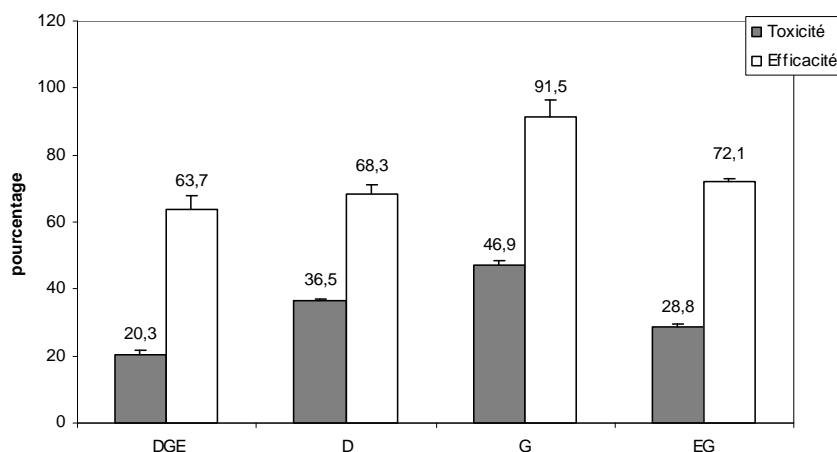
$$T = [(survie\ sans\ traitement - survie\ avec\ traitement\ sans\ congélation) / survie\ sans\ traitement] \times 100$$

La survie après congélation permet d'évaluer l'efficacité des traitements cryoprotecteurs. Cette efficacité sera donnée par la formule :

$$E = [(survie\ avec\ traitement\ sans\ congélation - survie\ avec\ traitement\ et\ congélation) / survie\ avec\ traitement\ sans\ congélation] \times 100$$

Les valeurs de T et E ont été calculées pour chaque traitement et sont détaillées en **Figure 71**.





**Figure 71.** Mesure de la toxicité et de l'efficacité des agents cryoprotecteurs sur la suspension de cellules vésiculeuses dissociées.

La toxicité est exprimée en pourcentage de cellules mortes avant la congélation et l'efficacité est exprimée en pourcentage de récupération cellulaire après congélation.

DGE: DMSO, Glycérol, Ethylène glycol, D: DMSO, G: Glycérol, EG: Ethylène glycol

La vitesse d'abaissement de température de -3°C/min jusqu'à -50°C puis transfert des échantillons dans l'azote liquide.

Il apparaît ainsi que la toxicité la plus importante correspond au traitement au glycérol qui réduit la survie à 46,9 %. Le mélange de cryoprotecteurs est le traitement le moins toxique pour les cellules vésiculeuses, entraînant 20,3 % de perte cellulaire seulement. Les deux autres traitements donnent des survies intermédiaires. Toutefois, si le glycérol est le plus toxique, c'est également lui qui présente la meilleure efficacité cryoprotectrice (91,5%), alors que le mélange DGE est le moins efficace, avec seulement 63,7 % d'efficacité.

En final, comme le montre la **Figure 71**, les différents traitements sont équivalents en terme de survie cellulaire après congélation (autour de 50 %).

Le mélange DGE et le glycérol présentant des spécificités très différentes en terme de toxicité et d'efficacité, ils ont été retenus pour l'optimisation du protocole de cryopréservation.

### 3. Effet de la vitesse de descente en température

Trois vitesses de descente en température ont été testées (-1 °C/min, -3 °C/min et -5 °C/min) jusqu'à -50°C avant le transfert dans l'azote liquide et avec les deux solutions cryoprotectrices choisies (**Figure 72**). Les résultats sont exprimés en terme de survie cellulaire rapportée au témoin « cellules non congelées et non traitées » puis rediluées dans l'Alsever comme les cellules décongelées.



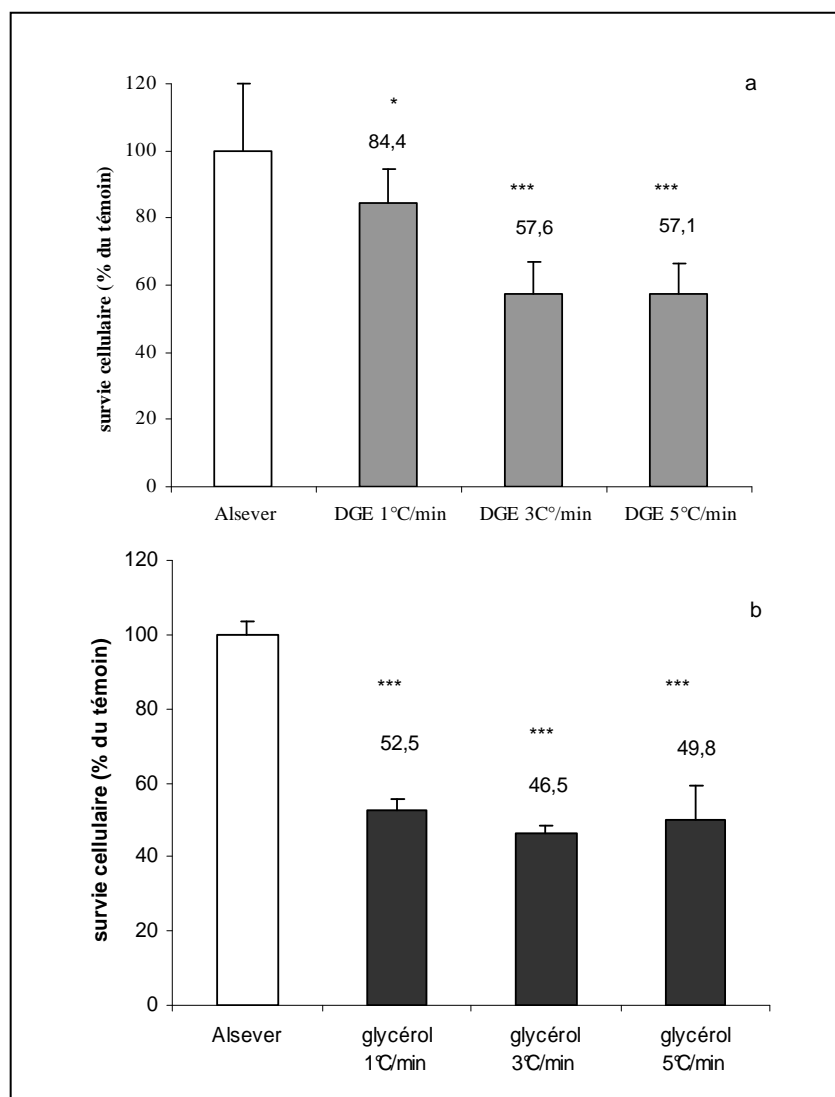


Figure 72. Effet de la vitesse de descente en température sur la survie des cellules vésiculeuses (-1; -3; -5°C/min) pour deux traitements cryoprotecteurs (a) DGE ou (b) Glycérol.

Les échantillons sont transférés dans l'azote liquide à -50°C. Test student significativité par rapport au témoin Alsever : \* P<0.05, \*\*\* P<0.001 (n= 5).

Pour le traitement avec le mélange DGE, la meilleure survie cellulaire a été obtenue avec un refroidissement lent (-1 °C/min) (84,4 ± 1,4 %). Cette survie diminue significativement (autour de 57 %) pour des vitesses de descente de température plus élevées.

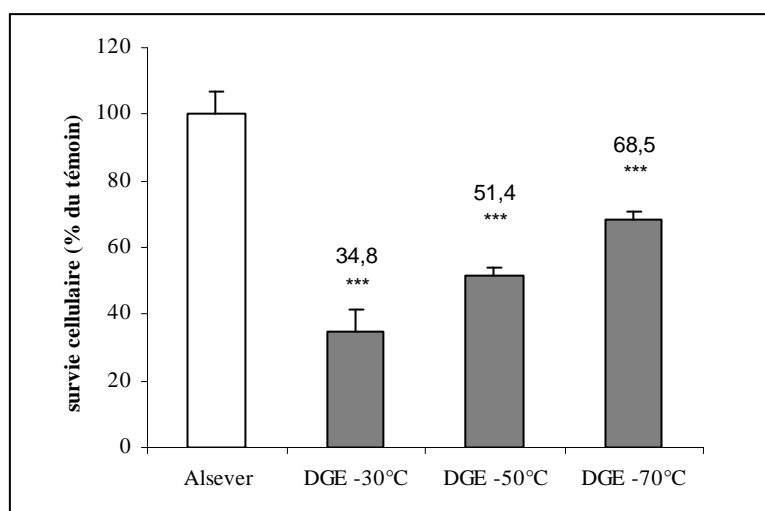
Avec le traitement au glycérol, après décongélation quelle que soit la vitesse de descente en température, la survie cellulaire n'excède jamais 52,5 %.

Le mélange DGE à 1°C/min apparaît donc comme le meilleur traitement et est retenu pour les expérimentations suivantes.



#### 4. Effet de la température de transfert des échantillons dans l'azote liquide

Trois températures de transfert des échantillons dans l'azote liquide ont été testées sur des cellules vésiculeuses traitées avec le mélange cryoprotecteur DGE et congelées avec une vitesse d'abaissement de température de  $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . La récupération cellulaire estimée par le test MTT après décongélation des échantillons cellulaires est comparée à un témoin de cellules non congelées, non traitées et rediluées dans l'Alsever comme les cellules décongelées (**Figure 73**).



**Figure 73.** Effet de la température de transfert des échantillons dans l'azote liquide sur la survie des cellules vésiculeuses après décongélation.

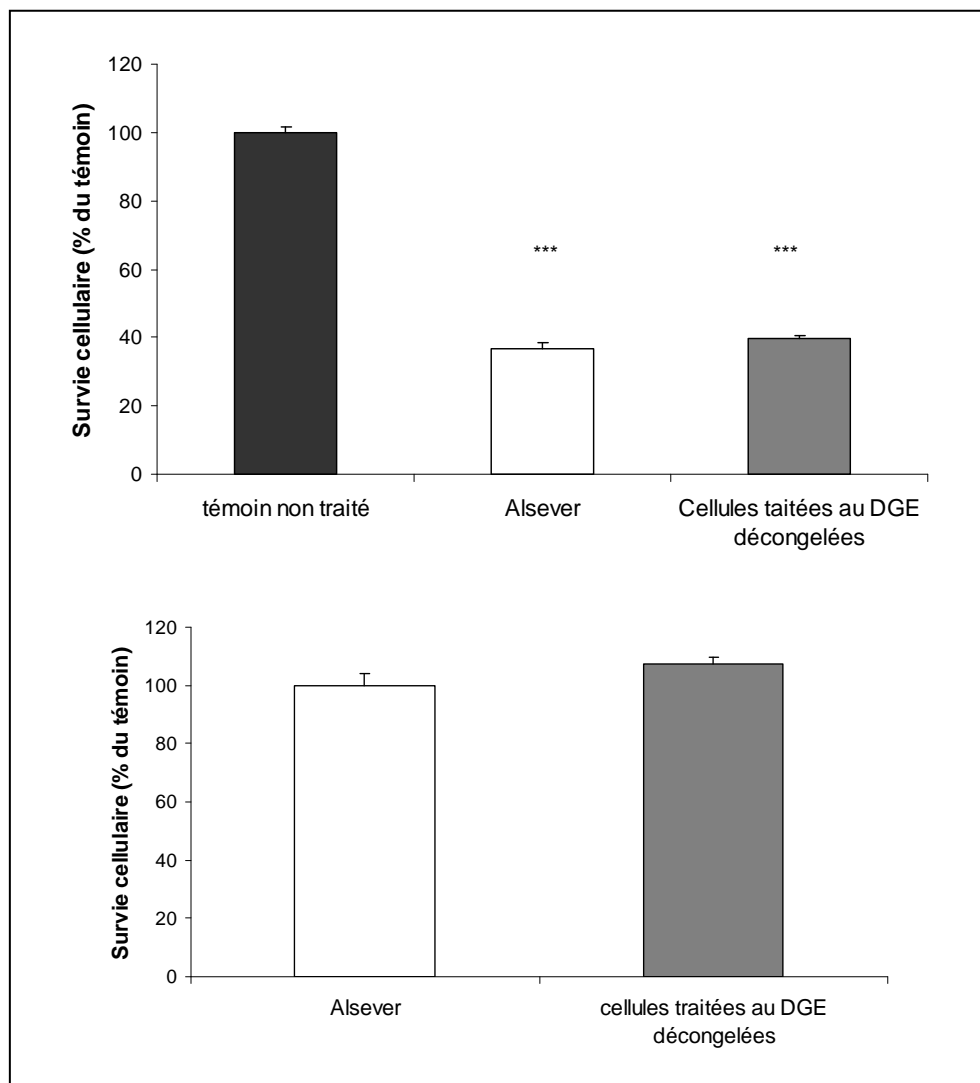
Trois températures sont comparées ( $-30^{\circ}\text{C}$ ,  $-50^{\circ}\text{C}$  et  $-70^{\circ}\text{C}$ ). Les cellules sont traitées avec le mélange DGE et cryopréservées avec une vitesse d'abaissement de température de  $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . test student, significativité par rapport au témoin Alsever : \*\*\*  $P < 0.001$  ( $n = 5$ ).

Le meilleur résultat en terme de survie cellulaire est obtenu pour un transfert des échantillons à  $-70^{\circ}\text{C}$  (survie cellulaire :  $68,5 \pm 2,2\%$ ). La récupération cellulaire est plus faible à  $-50^{\circ}\text{C}$  ( $51,4 \pm 2,9\%$ ) et elle l'est encore moins à  $-30^{\circ}\text{C}$  ( $34,8 \pm 6,5\%$ ). Par la suite, la température de transfert des échantillons dans l'azote utilisée pour la conservation à long terme de cellules vésiculeuses sera donc de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 5. Conditions finales de cryopréservation

Les conditions de cryopréservation retenues sont les suivantes : un traitement de la suspension cellulaire avec un mélange cryoprotecteur contenant du DMSO, du glycérol et de l'Éthylène glycol. Les cellules subissent ensuite un abaissement de température de  $-1^{\circ}\text{C}$  par minute jusqu'à atteindre une température de transfert des échantillons dans l'azote liquide de  $-70^{\circ}\text{C}$ . La récupération cellulaire après décongélation de la suspension ayant subi les conditions énumérées ci-dessus est reportée en **Figure 74**. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport au témoin.





**Figure 74. Récupération cellulaire après décongélation.**

Les cellules sont traitées avec le mélange DGE et cryopréservées avec une vitesse d'abaissement de température de  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  puis sont transférées dans l'azote liquide à partir de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Test student, significativité par rapport au témoin Alsever : \*\*\*  $P < 0.001$  ( $n = 5$ ).

Dans les conditions choisies de cryopréservation, le taux de survie obtenu après cryopréservation est significativement le même que celui du témoin non traité, non cryopréservé et repris dans l'Alsever. Toutefois, il est à noter que ce témoin dénote d'une forte perte cellulaire (près de 60%) par rapport à la suspension cellulaire d'origine, liée à la dilution et centrifugation inévitables des cellules.

## 6. Activité métabolique des cellules vésiculeuses cryopréservées

L'incidence de la cryopréservation sur l'activité métabolique des cellules vésiculeuses a pu être évaluée grâce aux tests biologiques *in vitro* de l'entrée du D-glucose dans les cellules vésiculeuses et de l'incorporation du glucose dans le glycogène. Les capacités d'entrée et d'incorporation ont été évaluées sur les suspensions de cellules vésiculeuses



dissociées non traitées ou après traitement avec le mélange DGE, congélation et remises en suspension après décongélation dans du milieu de culture L15.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de capacité métabolique par rapport au témoin n'ayant subi aucun traitement.

L'entrée et l'incorporation brutes ne prennent pas en compte la perte cellulaire liée à la cryopréservation. L'entrée et l'incorporation nettes sont ramenées au pourcentage de cellules vivantes déterminées par le test MTT, ils sont de l'ordre de 40 % comme le montre l'expérience précédente. Les résultats sont présentés sur la **Figure 75**.

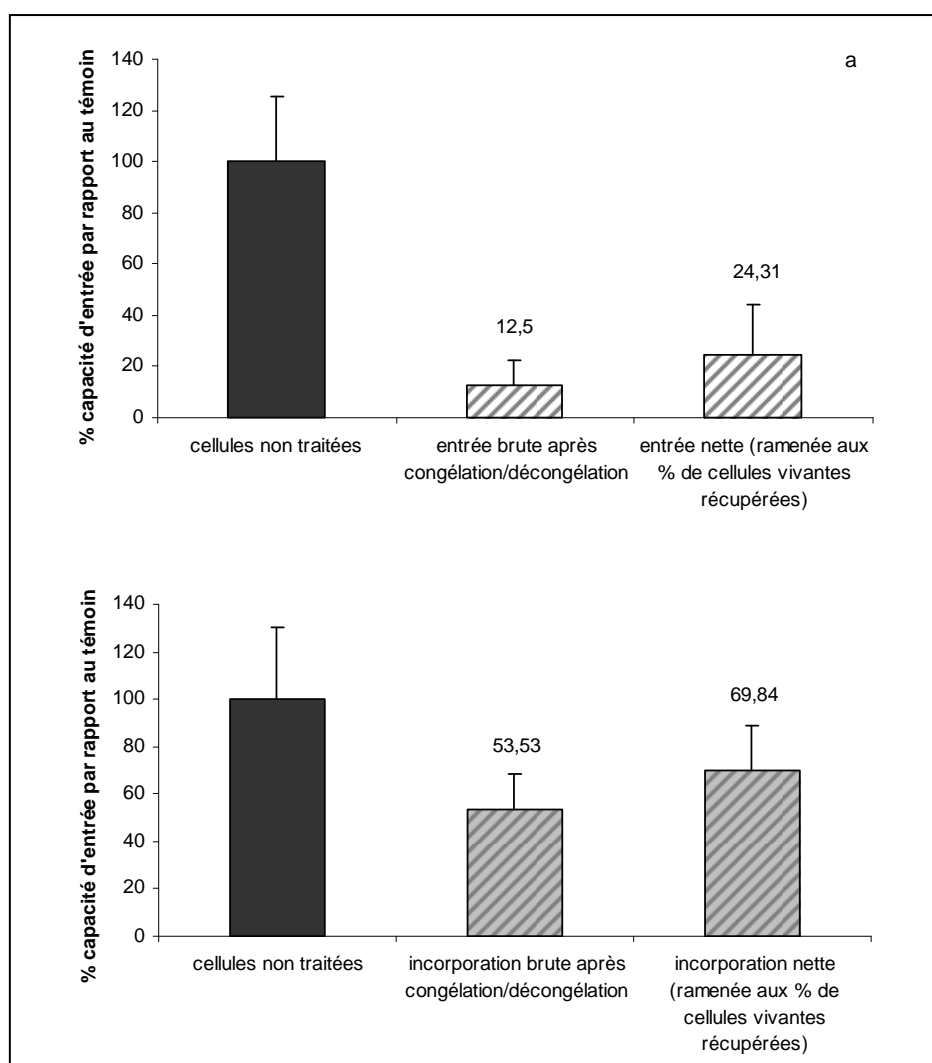


Figure 75. Activité métabolique de cellules cryopréservées ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , traitement au DGE, transfert dans l'azote liquide à  $-70^{\circ}\text{C}$ ) a été estimée par la mesure de la capacité d'entrée du glucose (a) et d'incorporation du glucose en glycogène (b) dans les cellules vésiculeuses.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport aux témoins non traités.

Les résultats d'entrée et d'incorporation nettes montrent une différence de l'activité métabolique des cellules vésiculeuses par rapport au témoin : elle est très marquée pour

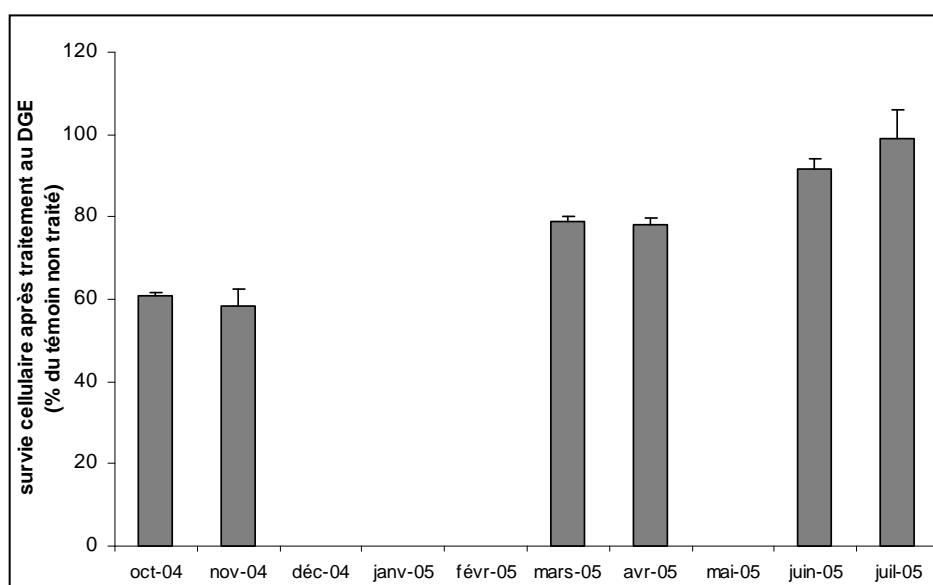


l'entrée du glucose dans les cellules (seulement 25 % de l'activité initiale). L'incorporation est en revanche moins affectée (70% de l'activité initiale).

## 7. Constitution d'une banque de cellules vésiculeuses

Une banque de cellules vésiculeuses a été constituée selon les conditions de cryopréservation choisies. Trois périodes ont été retenues en fonction de l'orientation de l'activité métabolique des cellules vésiculeuses : en automne, période de stockage du glycogène, au printemps, mobilisation des réserves en glycogène et en été, période critique de sensibilité des huîtres.

La survie cellulaire après traitement au mélange DGE a été mesurée dans les suspensions cellulaires réalisées lors de ces trois périodes de l'année et est reportée en **Figure 76**. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport au témoin non traité.



*Figure 76. Variation de la toxicité du mélange cryoprotecteur DGE au cours des saisons.*

Les cellules sont traitées avec le mélange DGE mais ne sont pas cryopréservées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie cellulaire par rapport au témoin non traité.

La survie cellulaire varie entre 60 et 90% selon les périodes de l'année.



## PRINCIPAUX RESULTATS

- Le choix de l'agent cryoprotecteur est un compromis entre efficacité cryoprotectrice et toxicité. Le mélange de cryoprotecteurs (DGE) s'est révélé le plus approprié.
- Le mélange DGE associé à un abaissement de température à 1°C/min jusqu'à -70°C puis un transfert dans l'azote liquide apparaît comme le traitement cryoprotecteur le plus adapté. (avec un taux de survie de  $68,5 \pm 2,2$  % par rapport au témoin Alsever).
- Les résultats d'entrée et d'incorporation nettes montrent une différence de l'activité métabolique des cellules vésiculeuses par rapport au témoin : elle est très marquée pour l'entrée du glucose dans les cellules (seulement 25 % de l'activité initiale). L'incorporation est en revanche moins affectée (70% de l'activité initiale).



## DISCUSSION

La technique de cryopréservation a été envisagée pour répondre aux problèmes de variations du métabolisme des cellules vésiculeuses qu'il s'agisse de variations individuelles (marquées chez ces invertébrés), de variations saisonnières liées au stade de gamétogenèse (orientation métabolique différente) ou de variations inter-annuelles (décalage du cycle de reproduction d'une année à l'autre). La constitution d'une banque de cellules cryopréservées était un moyen d'échapper à ces variations et de disposer de lots de cellules dont le métabolisme aurait été caractérisé préalablement (orienté soit vers une mise en réserve énergétique, soit vers une mobilisation). L'objectif de ce travail était donc d'étudier la faisabilité de cette approche en sachant qu'il existait peu de données bibliographiques sur la cryopréservation chez les bivalves et encore moins sur la cryopréservation de cellules somatiques (**Tableau 15**).

L'utilisation d'un cryoprotecteur est nécessaire pour congeler ces cellules à une concentration de l'ordre de 10%. Comme cela apparaît dans le **Tableau 15**, les agents cryoprotecteurs les plus couramment utilisés chez *Crassostrea gigas* sont le glycérol, l'Éthylène glycol, le DMSO (Nascimento *et al.*, 2005) ; nous les avons donc testés sur les cellules vésiculeuses. La combinaison de plusieurs cryoprotecteurs est également efficace et réduit l'effet de toxicité individuelle (Acosta-Salmon *et al.*, 2007). C'est pourquoi nous avons également utilisé le mélange (DGE) supposé moins toxique (Chao & Liao, 2001). La toxicité des agents cryoprotecteurs variant d'un type cellulaire à l'autre, il est impératif de tester la tolérance des cellules vésiculeuses vis-à-vis de ces différents traitements. Le test MTT a été choisi pour suivre la survie cellulaire avant et après congélation. Ainsi, il est apparu que les expérimentations de mise au point de la technique de cryopréservation sur les cellules vésiculeuses de l'huître ont permis d'améliorer le rendement de récupération de la suspension cellulaire après la décongélation des échantillons. De plus, plusieurs paramètres de cryopréservation ont été ajustés : le choix de la solution cryoprotectrice, la vitesse de descente de température et la température de transfert des échantillons dans l'azote liquide.



Tableau 15. Cryopréservation de divers types cellulaires chez différentes espèces de Mollusques : agent cryoprotecteur employé, test de viabilité ou d'activité cellulaire utilisé dans la bibliographie.

Espèce	Type cellulaire	Agent cryoprotecteur employé	Test de viabilité ou d'activité cellulaire	Référence
<i>Crassostrea gigas</i>	Spermatozoïdes	Me <sub>2</sub> SO	Fertilité	Ieropoli <i>et al.</i> , 2004 ; Usuki <i>et al.</i> , 1999 ; Van der Horst <i>et al.</i> , 1985
			Eosine-nigrosine	Kurokura <i>et al.</i> , 1990
		Me <sub>2</sub> SO, Tréhalose	Fertilité	Adams <i>et al.</i> , 2004 ; Mc Fadzen, 1995
		Ethylène glycol		Lennan, 1971
		Propylène glycol		Bougrier & Rabenomanana, 1986
		Glycérol, DMSO	Comètes	Gwo <i>et al.</i> , 2003
		DMSO, Ethylène glycol, Propylène glycol, glycérol	Développement embryonnaire (→larve D)	Ieropoli <i>et al.</i> , 2004
	Spermatozoïdes 2n	DMSO, Méthanol, Propylène glycol	Mobilité et fertilité	Paniagua-Chavez <i>et al.</i> , 2006
		Me <sub>2</sub> SO, Propylène glycol	Mobilité, fertilité	Dong <i>et al.</i> , 2005b
	Spermatozoïdes 4n	DMSO	Mobilité, fertilité	Dong <i>et al.</i> , 2005a
	Ovocytes	Me <sub>2</sub> SO	Fertilité	Chen <i>et al.</i> , 1989
		Glycérol		Naidenko, 1997
	Embryons	Ethylène glycol, DMSO, Propylène glycol, Méthanol	Fertilité et développement	Tervit <i>et al.</i> , 2005
		Propylène glycol, Glycérol	Viabilité	Gwo <i>et al.</i> , 2003
		Ethylène glycol, Me <sub>2</sub> SO	Développement embryonnaire	Chao <i>et al.</i> , 1994
		Me <sub>2</sub> SO, Ethylène glycol		Lin <i>et al.</i> , 1993
		Me <sub>2</sub> SO		Chao <i>et al.</i> , 1997
		Propanediol, Méthanol		Renard & Cochard, 1989
		Sucrose		Naidenko, 1997 ; Renard, 1991
	Larves	Me <sub>2</sub> SO	Développement viabilité	Naidenko, 1997 Usuki <i>et al.</i> , 1999
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Spermatozoïdes	DMSO, Propanediol, Méthanol	Fertilité	Nascimento <i>et al.</i> , 2005
	Larves trochophores	DMSO, Propanediol, Méthanol	Développement	Nascimento <i>et al.</i> , 2005
<i>Crassostrea tulipa</i>	Spermatozoïdes	Me <sub>2</sub> SO	viabilité	Choi & Chang, 2003



<i>Crassostrea virginica</i>	Spermatozoïdes	Propylène glycol Me <sub>2</sub> SO	Fertilité	Paniagua-Chavez & Tiersch, 2001 ; Zell <i>et al.</i> , 1979 ; Hughes, 1973
		Propylène glycol	Traceurs fluorescents (SYBR 14, Rodhamine, Iodure de Propidium)	Paniagua-Chavez <i>et al.</i> , 2006
	Larves	Propylène glycol	Survie et croissance	Paniagua-Chavez <i>et al.</i> , 1998
	Cellules du coeur	Me <sub>2</sub> SO, Glycérol, Propylène glycol	MTT	Cheng <i>et al.</i> , 2001
<i>Haliotis diversicolor</i>	Spermatozoïdes	Me <sub>2</sub> SO, Glucose	Fertilité	Tsai & Chao, 1994
		Me <sub>2</sub> SO		Gwo <i>et al.</i> , 2002
<i>Haliotis tuberculata</i>	Cellules du manteau	Me <sub>2</sub> SO, Glycérol, Ethylène glycol	MTT, Bradford, Burton test, activité phosphatase-alcaline, incorporation de [ <sup>3</sup> H]-Leucine	Poncet <i>et al.</i> , 2002
	hémocytes	Me <sub>2</sub> SO, Glycérol, Ethylène glycol		Poncet & Lebel, 2003
<i>Meretrix lusoria</i>	Embryons	Me <sub>2</sub> SO	Développement	Chao <i>et al.</i> , 1997
<i>Pecten maximus</i>	Embryons	Ethylène glycol Propanediol, Méthanol Me <sub>2</sub> SO, Glycérol, sucrose	Viabilité	Renard & Cochard, 1989
	Cellules du coeur	Me <sub>2</sub> SO	Bleu Trypan, Bradford, incorporation de [ <sup>3</sup> H]-Thymidine, incorporation de [ <sup>14</sup> C]-Leucine	Le Marrec-Croq <i>et al.</i> , 1998
<i>Pinctada fucata</i>	Larves	Me <sub>2</sub> SO	viabilité	Choi & Chang, 2003
<i>Pinctada margaritifera</i>	Spermatozoïdes	Tréhalose+DMSO Glucose+DMSO+Propylène glycol	Mobilité	Acosta-Salmon <i>et al.</i> , 2007
<i>Mizuchopecten yessoensis</i>	Culture primaire Cellules embryonnaires Cellules de la glande digestive	Me <sub>2</sub> SO, Glycérol Tréhalose	Bleu Trypan Incorporation de [ <sup>3</sup> H]-uridine	Odintsova et Tsal, 1995 Odintsova <i>et al.</i> , 2001
<i>Mytilus edulis</i>	Embryons	Me <sub>2</sub> SO	Viabilité	Toledo <i>et al.</i> , 1989
<i>Mytilus trossulus</i>	Culture primaire Manteau, branchies, muscles	Me <sub>2</sub> SO	Incorporation de [ <sup>3</sup> H]-uridine	Odintsova & Tsal, 1995 Odintsova <i>et al.</i> , 2001
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Embryons	Ethylène glycol Propanediol, Méthanol Me <sub>2</sub> SO, Glycérol, sucrose	Viabilité	Renard & Cochard, 1989

Le glycérol présente la meilleure efficacité cryoprotectrice, mais se révèle être le cryoprotecteur le plus toxique pour les cellules avant congélation : cette toxicité avait déjà été démontrée chez des embryons de *Crassostrea gigas* à différents stades de développement (Gwo, 1995), elle entraîne une survie finale moindre par rapport aux autres cryoprotectants. Le mélange DGE comme prévu, s'est avéré le moins toxique.



En ce qui concerne les paramètres de congélation, là encore, le protocole doit être adapté au type cellulaire : la vitesse de refroidissement doit permettre un compromis entre une hydratation suffisante des cellules, pour prévenir la formation de glace intracellulaire et pour limiter les variations de pH, et les effets toxiques des solutés. Les résultats obtenus pour trois vitesses de refroidissement (-5, -3 et -1 °C/min) ont clairement montré qu'en présence de DGE, la survie des cellules vésiculeuses est nettement améliorée aux faibles vitesses de refroidissement (84,4 % de survie à -1 °C/min par rapport au témoin Alsever). Ces données sont conformes avec l'observation que les cellules de volume important requièrent une descente en température plus lente. Néanmoins, ces vitesses sont du même ordre que celles utilisées pour les cellules cardiaques de *Pecten maximus* (Le Marrec-Croq *et al.*, 1998), les hémocytes d'ormeaux *Haliotis tuberculata* (Poncet *et al.*, 2002), les ovocytes ou les spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* (Dong *et al.*, 2005b ; Tervit *et al.*, 2005).

La température de transfert des échantillons dans l'azote liquide est également importante pour garantir le succès de la cryopréservation (Cheng *et al.*, 2001). Elle est liée à l'état de déshydratation des cellules. Dans notre cas, 3 températures ont été comparées : -70°C, -50°C et -30°C. Une survie améliorée a été obtenue pour -70°C. Ce résultat est également en accord avec ce qui a été utilisé pour la cryopréservation d'autres types de cellules somatiques chez *Crassostrea gigas* ou *Pecten maximus* (Le Marrec-Croq *et al.*, 1998 ; Cheng *et al.*, 2001) ou de spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* (Ieropoli *et al.*, 2004 ; Dong *et al.*, 2005b).

Malgré l'optimisation de ces paramètres de cryopréservation, le taux de récupération de cellules vivantes après congélation excède rarement 40 % du témoin non traité aux cryoprotectants et non congelé. Ce taux relativement faible en rapport à la littérature peut s'expliquer par plusieurs facteurs :

- Les cellules vésiculeuses sont de grosses cellules fragiles qui ne peuvent être centrifugées qu'à faible vitesse. Le traitement de décongélation les soumet à des dilutions et à une centrifugation qui entraînent des pertes cellulaires importantes. Ces pertes sont évaluées par le témoin Alsever (qui subit les mêmes dilutions et centrifugations, mais pas d'addition d'agent cryoprotecteur ni de congélation), elles sont de l'ordre de 35 %.
- La survie cellulaire est mesurée par le test MTT, test d'activité fonctionnelle basé sur l'activité mitochondriale, ce test est beaucoup plus précis que le test de perméation du bleu Trypan par exemple qui est utilisé dans de nombreuses références.



Poncet et Lebel (2003) ont également observé de fortes variations de survie selon le test utilisé sur les hémocytes d'ormeaux : le test de MTT donne généralement une survie inférieure à celles obtenues soit par le dosage protéique, soit par le contenu en ADN. Très récemment, des tests basés sur l'utilisation de traceurs fluorescents marqueurs de l'intégrité membranaire (SYBR 14 et Iodure de Propidium) ou du potentiel membranaire mitochondriale (Rhodamine 123) ont été développés et peuvent constituer une alternative intéressante au MTT (Paniagua-Chavez *et al.*, 2006) qui est un test relativement long.

- La survie varie d'une expérimentation à l'autre. Un lot de cellules décongelées en deux expérimentations distinctes peut donner des taux de survie différents, très probablement liés à de légères variations des conditions expérimentales de décongélation. Cette observation montre la sensibilité des cellules à toute variation de température et donc la nécessité de calibrer parfaitement les protocoles expérimentaux pour obtenir la meilleure reproductibilité possible.
- La survie varie dans l'année, très certainement en lien avec l'état physiologique des cellules vésiculeuses, contenant plus ou moins de glycogène et présentant une sensibilité variable aux traitements de congélation.

L'incidence de la cryopréservation sur le métabolisme des cellules vésiculeuses a pu être testée à travers les deux tests d'activités biologiques *in vitro* mis au point sur ce type cellulaire. Les résultats montrent que l'entrée du glucose dans la cellule est plus sensible que son incorporation dans le glycogène. Cette perte d'activité, retrouvée à différente période de l'année de façon plus ou moins marquée peut indiquer que la cryopréservation affecte l'organisation de la membrane cellulaire et perturbe le fonctionnement des transporteurs. Il doit être noté que l'entrée est mesurée dans les 3 heures qui suivent immédiatement la décongélation. Une observation ultrastructurale comparative des cellules avant et après cryopréservation en se focalisant particulièrement sur l'intégrité de la membrane permettrait de vérifier cette hypothèse. Une phase de récupération préalable permettrait peut-être de rétablir un fonctionnement normal et devra être expérimentée. De même, l'addition de tréhalose qui stabilise la membrane cellulaire en réduisant la formation de cristaux de glace lors de la cryopréservation pourra être envisagée. Cet agent cryoprotecteur a montré un effet positif sur la mobilité des spermatozoïdes chez *Pinctada margaritifera* (Acosta-Salmon *et al.*, 2007).

L'incorporation du glucose dans le glycogène est moins affectée par la congélation, mais là encore, il faut noter que le temps d'incubation de 24 heures facilite peut-être une



récupération cellulaire qui n'a pas été observé concernant l'étude de l'entrée du glucose dans les cellules.

Ces résultats dans leur ensemble confirment la possibilité de congeler ce type de cellules somatiques, les cellules vésiculeuses. Néanmoins, une attention particulière doit encore être apportée à la phase de décongélation qui peut générer des variations par lots ainsi qu'à la mesure des activités métaboliques (surtout l'entrée du glucose).

A l'issue de l'adaptation de la technique de cryoconservation sur les cellules vésiculeuses, une banque de cellules cryopréservées a été réalisée à différentes périodes de l'année 2004/2005 à partir de différentes familles d'huîtres (Résistantes, Sensibles, et Témoins).

#### **Perspectives :**

*Le procédé de cryopréservation des cellules vésiculeuses a été envisagé dans le but de constituer une banque de cellules facilitant la réalisation à l'avenir d'études sur la physiologie de ces cellules. Cette technique a pu être adaptée aux cellules vésiculeuses mais il reste toutefois quelques tests à effectuer afin d'améliorer la reprise d'activité cellulaire après la décongélation des cellules. Par exemple, un temps de repos après la décongélation et avant les tests biologiques devrait permettre de contrôler si la reprise d'activité métabolique requiert un temps précis.*

*La banque de cellules vésiculeuses pourrait faciliter la mise en oeuvre d'études des phénomènes de régulation du transport du glucose ou de l'activité de enzymes du métabolisme du glycogène :*

*Il serait par exemple intéressant d'étudier l'effet de la concentration extracellulaire du glucose sur la capacité d'incorporation du glucose en glycogène et sur la capacité d'entrée du glucose, en utilisant les deux inhibiteurs retenus de la composante saturable (cytochalasine B et phlorizine), dans les cellules vésiculeuses cryopréservées aux différentes périodes de l'année.*



## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**







## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de l'étude des mécanismes physiologiques associés à la mise en réserve et à la mobilisation du glycogène chez l'huître *Crassostrea gigas*, le premier axe de recherche a consisté à caractériser les mécanismes d'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses. Les travaux décrits dans ce manuscrit ont permis de déterminer les paramètres de transport de glucose d'une suspension de cellules vésiculeuses de palpes labiaux. Les expérimentations *in vitro* ont mis en évidence la présence d'une composante saturable en fonction de la concentration de glucose, dont la  $K_m$  a été estimée à 0,717 mM et la  $V_{max}$  à 0,226 nmoles/h/10<sup>6</sup> cellules. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et d'analogues du glucose a révélé l'existence sur la membrane cellulaire de transporteurs de glucose de type actifs et facilités :

- Les **transporteurs SGLTs**, dont un type a été identifié chez *Crassostrea gigas*, semblent jouer un rôle important au printemps au moment où les huîtres achèvent la mise en réserve du glycogène et entreprennent la lyse de du tissu de réserve afin de pourvoir aux besoins énergétiques que requiert la gamétogenèse. Les différents résultats ont montré qu'au printemps, il existe une concordance entre la présence et l'activité des transporteurs grâce à la mesure de l'expression du gène par PCR en temps réel et à l'utilisation de la phlorizine qui a montré un fort effet inhibiteur sur la capacité de transport sodium dépendant en avril.

Deux hypothèses sont envisageables afin d'expliquer la présence des transporteurs SGLT au niveau de la membrane des cellules vésiculeuses au printemps : ils pourraient intervenir pour faciliter la sortie du glucose des cellules vésiculeuses lors de la mobilisation des réserves en glycogène ou au contraire permettre l'entrée du glucose afin qu'il soit stocké dans les cellules sous forme de glycogène en fin de phase de réserve.

Les conditionnements trophiques ont permis de mettre en évidence une implication directe de la quantité en aliment sur l'orientation du métabolisme glucidique. La régulation du transport de glucose, portant sur le transporteur SGLT, serait donc capable d'intégrer les paramètres du milieu : en condition trophique élevée, la métabolisation du glucose en glycogène est forte mais l'expression du transporteur SGLT est inhibée. En condition trophique réduite, le phénomène inverse est constaté, le nombre de transcrits SGLT augmente tandis que la glycogénèse diminue, ce qui porte à penser que les transporteurs SGLTs interviendraient lors de la mobilisation du glycogène.



▪ Les **transporteurs GLuTs** identifiés chez les Vertébrés présentent des homologues chez des Invertébrés comme *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* (Escher & Rasmuson-Lestander, 1999 ; Joost & Thorens, 2001). Cette conservation de séquence entre espèces phylogénétiquement éloignées témoigne d'une origine évolutive précoce et d'une importance fonctionnelle de ces transporteurs.

L'existence de transporteurs de type GLuT est vraisemblable chez *Crassostrea gigas* dans la mesure où la cytochalasine B a montré un effet inhibiteur compétitif sur l'entrée du glucose, même si cet effet est relativement faible et semble fortement varier dans le temps. La technique de Western blot pourrait être envisagée afin de confirmer l'existence d'une protéine de type GLuT dans les cellules vésiculeuses chez *Crassostrea gigas*. Cette approche s'est révélée fructueuse chez les oiseaux car elle a permis de détecter des protéines homologues aux GLuT1 et GLuT4 des mammifères chez le canard musqué (Thomas-Delloye *et al.*, 1999).

Une étude immunocytochimique, réalisée sur des coupes congelées de palpes labiaux et des cellules vésiculeuses dissociées, en utilisant comme outils de reconnaissance des anticorps anti-GLuT4 de lapin, a permis une immunodétection de transporteurs de glucose (Sombe, 2001). Le signal de l'immunomarquage a pu être intensifié en présence d'insuline porcine et a été localisé au niveau de la membrane cellulaire.

Une étude par RT-PCR a déjà été entreprise mais n'avait pas encore permis d'obtenir de résultats concluants (Naimi, 2004). Malgré des réactions d'amplifications générant des fragments de la taille attendue, l'analyse des séquences a mis en évidence la non-spécificité des amplifications. Les conditions d'amplification sont difficiles à déterminer : les oligonucléotides déduits de l'alignement de séquences présentent un degré de dégénérescence variable selon la nature des acides aminés présents dans les régions conservées. De ce fait les températures de fusion ( $T_m$ ) d'un couple d'amorces sont très différentes ce qui rend difficile la détermination de la température d'hybridation optimale à la matrice.

Une séquence apparentée à un transporteur de glucose figurant dans les banques EST (« Expressed Sequence Tag ») chez *C. gigas* reste encore à analyser.

La régulation de la quantité et du fonctionnement des transporteurs de glucose (GLuTs et SGLTs) est essentielle pour le maintien d'un taux de glucose adapté dans les



cellules orientées vers la mobilisation ou la mise en réserve du glycogène. Une variation de ces paramètres a pu être mise en évidence à partir du suivi saisonnier mais également par les expérimentations de conditionnement trophique. La nature de cette régulation peut porter sur différents niveaux : (i) transcriptionnel (démontrée par la variation de l'expression de SGLT lors des 3 saisons étudiées), (ii) traductionnel et/ou (iii) sur la disponibilité des transporteurs sur la membrane cellulaire (mise en évidence par la variation de la capacité d'entrée observée au cours du suivi). Afin, d'étudier l'effet de cette régulation, Il serait donc intéressant de mettre en oeuvre des études complémentaires dont l'objectif serait de mettre en évidence les phénomènes de régulations, par des facteurs exogènes et endogènes, des systèmes de transport dans les cellules de réserves. Une expérimentation *in vitro* pourrait être réalisée en testant l'effet de la concentration du glucose extracellulaire sur l'expression du transporteur SGLT et sur la capacité d'entrée de l'hexose dans les cellules vésiculeuses en utilisant la phlorizine comme inhibiteur des transporteurs sodium dépendant. Dans l'optique de comprendre comment l'orientation de la mise en réserve du glucose par la synthèse de glycogène se met en place au niveau des cellules vésiculeuses, l'entrée du glucose pourrait être mesurée en présence de cytochalasine B qui inhibe les systèmes de transport facilité de type GLuT, ceci sous deux conditions opposées : avec ou sans insuline afin de mesurer la variation de la capacité de transport des protéines GLuTs susceptibles d'être présentes dans les cellules vésiculeuses. La technique d'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) est une approche à envisager car elle permettrait d'obtenir un maximum d'informations sur le phénotype du tissu de réserve. Une application possible de cette technique consisterait à comparer le profil protéique du tissu vésiculeux des palpes labiaux d'animaux en conditions naturelles avec le profil protéique de ce même tissu chez des animaux ayant subi un conditionnement trophique (comparaison de l'effet de la mise à jeun et d'un conditionnement trophique riche). La technique de protéomique permet de mettre en exergue les différences phénotypiques entre deux protéomes à un moment précis, elle permet de révéler la présence ponctuelle d'une protéine ou de détecter son inactivité en fonction des conditions testées.

L'existence d'une régulation interne est essentielle pour expliquer les changements d'orientations métaboliques chez l'huître creuse mais elle n'a pas été abordée au cours de notre étude. Cependant, nous avons mis en évidence l'impact des paramètres environnementaux, le niveau en alimentation et l'effet saisonnier sur le métabolisme énergétique et sur le déroulement de la gamétogenèse. Le suivi saisonnier de la gamétogenèse chez les huîtres placées sur l'estran de la Baie des Veys a montré un retard de la reprise de la nouvelle gamétogenèse et un retard de la lyse des gamètes résiduels. Ce phénomène est régulièrement observé sur les côtes de la Manche. La gestion des réserves



en glycogène chez *Crassostrea gigas* est en lien direct avec la gamétogenèse. L'effort de reproduction nécessite un apport énergétique important qui est vraisemblablement assuré en partie par les réserves contenues dans le tissu de réserve de la région gonade-manteau, celui-ci se résorbant presque entièrement au cours de la maturation de la gonade.

Le procédé de cryopréservation des cellules vésiculeuses a été envisagé dans le cadre de cette thèse dans le but de constituer une banque de cellules qui pourrait faciliter la réalisation à l'avenir d'études sur la physiologie de ces cellules somatiques. Les résultats dans leur ensemble confirment la possibilité de congeler ce type cellulaire. A l'issue de l'adaptation de la technique de cryoconservation sur les cellules vésiculeuses, une banque de cellules cryopréservées a été réalisée à différentes périodes de l'année 2004/2005 à partir de différentes familles d'huîtres (R, S, et T). Toutefois, une attention particulière doit encore être apportée à la phase de décongélation qui peut générer des variations par lots ainsi qu'à la mesure des activités métaboliques. Il reste encore quelques tests à agencer afin d'améliorer la reprise d'activité cellulaire après la décongélation des cellules. Par exemple, un temps de repos pourrait être envisagé après la décongélation des cellules et avant les tests biologiques afin d'augmenter la reprise d'activité métabolique.

Parmi les familles de molécules susceptibles d'expliquer les phénomènes de régulation observés chez l'huître creuse, l'insuline est celle sur laquelle il existe le plus d'éléments à ce jour. Afin d'étudier les phénomènes de régulations intervenant lors des deux périodes clés d'inversion métabolique (mise en réserve et mobilisation du glycogène), la mesure de l'expression du récepteur CIR et de son ligand oIRP peuvent être suivies. Hamano *et al.*, 2005 ont montré que l'expression du peptide apparenté à l'insuline est corrélée au cycle de reproduction chez *C. gigas*. Les auteurs ont constaté que l'expression du gène était maximale au printemps ce qui suggère que oIRP interviendrait dans les processus de mobilisation des réserves en glycogène. A ce jour, il existe de nombreuses données bibliographiques sur l'implication des molécules du système insuline/IGF. L'insuline et l'IGF1 induisent une grande diversité de réponses qui peuvent être réparties en deux catégories : les effets métaboliques (transport du glucose et synthèse de glycogène, lipogenèse et lipolyse, et synthèse de protéines) et les effets sur la croissance (prolifération et différenciation cellulaire). La transduction du signal de ces ligands, relayé par des récepteurs tyrosine kinase, emprunte de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Plusieurs voies de signalisation associées au récepteur ont été mises en évidence, dont les deux principales sont : (i) la voie phosphoinositol-3-kinase (PI-3-kinase), impliquée dans la régulation des métabolismes des glucides, des lipides et des protéines et (ii) la voie MAP kinase (« Mitogen-activated-protein kinase »), qui régule de nombreuses protéines



cellulaires, telles que les facteurs de croissance, les facteurs de transcription ou des protéines du cytosquelette, conduisant ainsi à l'expression de différents gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire.

La spécificité de réponse cellulaire pour un ligand donné résulterait de la conjonction de plusieurs éléments dont : le profil d'expression des différents types de récepteurs à la surface des cellules cibles, la concentration physiologique des ligands, l'affinité relative du récepteur pour les différents ligands, ou la nature des molécules impliquées dans la transduction du signal et en particulier des molécules situées en fin de cascade de signalisation (les facteurs de transcription). Il serait intéressant de caractériser l'existence éventuelle des effecteurs intervenant dans les voies de transduction du signal des molécules de type insuline/IGF (i) dans les cellules vésiculeuses, afin d'en déterminer leur action au niveau du processus de mise en réserve/mobilisation du glycogène, leurs effets sur le cycle des cellules de réserve (prolifération et/ou migration, différenciation, régression, apoptose), mais également (ii) dans les cellules germinales, dans le but de connaître leur implication au niveau de la réinitiation des mitoses gonadiques et de la vitellogenèse.

Pour cela, il serait intéressant de rechercher dans les 29000 EST de *Crassostrea gigas* enregistrées dans Genbank les séquences de molécules pouvant être impliquées dans la régulation de l'activité de l'insuline. Puis, afin d'obtenir des éléments de réponse quant à l'expression et aux rôles de ces molécules, plusieurs stratégies pourront être envisagées. La séparation des deux populations cellulaires par la technique de microdissection laser puis l'extraction des ARNm correspondants permettrait de quantifier précisément l'expression des transcrits codant ces molécules lors des différents processus évoqués. Cependant, dans un premier temps, un suivi qualitatif de l'expression de ces effecteurs pourrait être réalisé par l'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* déjà développée par Hamano et ses collaborateurs (2005) afin de localiser l'ARNm de l'oIRP au niveau des ganglions viscéraux.

Les résultats de ces travaux de thèse fournissent des réponses à plusieurs interrogations concernant différents aspects de la reproduction de *C. gigas*. Un paramètre environnemental semble contrôler l'évolution de la gamétogenèse en vitesse et en intensité, il s'agit du niveau trophique. De plus, d'un point de vue des causalités intrinsèques, un déterminisme génétique fort semble aussi contrôler cette fonction physiologique, ceci a été démontré par l'analyse de différences phénotypiques des souches d'huîtres Résistantes et Sensibles. Les huîtres R et S, issues d'une sélection divergente sur le caractère de survie, répondent différemment aux mortalités estivales. La forte héritabilité de ce caractère traduit chez ces animaux l'existence d'un nombre limité de gènes d'intérêts. Des différences de stratégies de reproduction ont été observées entre les deux lots d'huîtres. Elles indiquent



que les S présenteraient un effort de reproduction supérieur à celui des R. Notre objectif a été de rechercher s'il existe une différence entre ces deux familles en terme de fonctionnement du métabolisme de glycogène. Le suivi dans les conditions naturelles de la Baie des Veys aux trois périodes du cycle de reproduction n'a pas permis de mettre en évidence de différences en terme de régulation du métabolisme du glycogène entre les lots d'huîtres R et S mais l'année de ce suivi n'a pas connu de phénomènes de mortalités permettant de discriminer les deux populations. Le conditionnement trophique a permis de montrer que les R et S réagissent différemment au niveau d'alimentation. De fortes conditions trophiques, comme celles mesurées sur le site de la Baie des Veys, réduisent les différences d'effort de reproduction observées généralement entre les huîtres R et S (Samain *et al.*, 2007). Toutefois, le conditionnement trophique a permis de révéler des différences de stratégie reproductrice entre les huîtres R et S mais également d'allocation de l'énergie. Les S semblent investir plus d'énergie dans la reproduction que les R, ce qui pourrait entraîner un déséquilibre énergétique que des variations de température (stress thermiques), l'émission des gamètes ou d'autres facteurs environnementaux ou pathogènes peuvent encore accroître. La nature de ces différences reste encore à déterminer. L'approche protéomique présenterait ici de nombreux avantages car elle permettrait de mettre en évidence les différences phénotypiques entre les deux familles. La stratégie énergétique des huîtres R et S pourrait être analysée et comparée plus en détail grâce à cette technique en prélevant les palpes labiaux et en effectuant un suivi des empreintes protéomiques au cours du processus de reproduction des animaux. Les animaux R et S doivent être placés dans des conditions similaires afin de comparer les variations phénotypiques entre ces deux familles génétiques, en particulier en période estivale afin de discriminer les réponses aux phénomènes de mortalités estivales des R et S. La disponibilité de nombreuses séquences dans les banques EST chez *C. gigas* pourrait permettre la mise en place d'une étude du transcriptome des animaux. La fabrication de puces à ADN pourrait permettre de réaliser un criblage différentiel des huîtres R et S.

Les travaux réalisés dans le cadre du programme MOREST ont permis de déterminer les facteurs de risque favorisant l'apparition des mortalités estivales. Celles-ci surviennent pendant la période de maturation, surtout chez les huîtres à gonade hypertrophiée. Elles interviennent sous certaines conditions : des conditions trophiques riches induisent chez les huîtres un effort de reproduction plus important, qui ne constitue un risque qu'à une température excédant 19 °C et sous la condition de l'existence d'un stress (fortes densités d'élevage, pathogène, pollution) (Samain & Mc Combie, 2007).



Il existe deux phases dans la gamétogenèse qui peuvent être considérées comme des facteurs à risque et qui peuvent compromettre la survie des animaux :

- La phase de maturation lors de la gamétogenèse, quand l'huître consacre une majeure partie de son énergie au développement des gamètes (cas des animaux Sensibles). L'animal dispose alors de moins d'énergie dédiée à sa défense.

- La phase d'émission des gamètes coûteuse en énergie, ainsi que l'état régressé des tissus conjonctifs, peuvent fournir un terrain favorable au développement de pathogènes. De plus, la période de résorption automnale plus ou moins longue est potentiellement une étape physiologique à risque.

Les résultats décrits dans ce manuscrit ont révélé que les huîtres R et S diffèrent d'un point de vue :

- **de la lyse des gamètes résiduels** ; Il est donc dorénavant nécessaire d'orienter de nouvelles études sur les mécanismes de lyse des gamètes résiduels (phagocytose, apoptose, déterminer leur contrôle),
- **de la réinitiation de la gamétogenèse** ; Des travaux ont été initiés afin de caractériser et de décrire les processus déclenchant la reprise de la gamétogenèse et le déroulement de celle-ci (Franco *et al.*, 2008 ; Fleury, *et al.*, 2008),
- **de la gestion des réserves** ; Les mécanismes permettant l'alternance des phases de croissance somatique (synthèse du glycogène) et de fabrication des gamètes (mobilisation du glycogène) restent encore à déterminer. Il existe probablement chez l'huître creuse un contrôle endocrinien du métabolisme du glycogène similaire à celui décrit chez *L. stagnalis*. La mise en réserve du glycogène, les fonctions reproductives et la prise alimentaire sont régulées chez ce mollusque par le Neuropeptide Y et un facteur produit par les cellules à glycogène (De Jong-Brink *et al.*, 2001).







## **BIBLIOGRAPHIE**







## A

**Adams, S.L., Smith, J.F., Roberts, R.D., Janke, A.R., Kaspar, H.F., Tervit, H.R., Pugh, P.A., Webb, S.C. & King, N.G.** (2004) Cryopreservation of sperm of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): development of the practical method for commercial spat production. *Aquaculture*. 242: 271-282.

**Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B. & de Rosa, R.** (2000) The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 97: 4453-4456.

**Acosta-Salmón, H., Jerry, D. J., Southgate, P.C.** (2007) Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) spermatozoa. *Cryobiology*. 54: 13-18.

**Agius, L. & Stubbs, M.** (2000) Investigation of the mechanism by which glucose analogues cause translocation of glucokinase in hepatocytes: evidence for two glucose binding sites. *Biochemical Journal*. 346 (2): 413-421.

**Ahearn, G.A., Behnke, R.D., Zonno, V. & Storelli, C.** (1992) Kinetic heterogeneity of Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransport in teleost gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology*. 263: R1018-R1023.

**Ahearn, G.A., Grover, M.L. & Dunn, R.E.** (1985) Glucose transport by lobster hepatopancreatic brush-border membrane vesicles. *American Journal of Physiology*. 248: R133-R141.

**Ahearn, G.A. & Maginiss, L.A.** (1977) Kinetics of glucose transport by the perfused mid-gut of the freshprawn *Macrobrachium rosenbergii*. *The Journal of Physiology*. 271: 319-326.

**Albers, S., Elferink, M.G.L., Charlebois, R.L., Sensen, C.W., Driessen, A.J.M. & Konings, N.** (1999) Glucose transport in the extremely thermophilic *Sulfolobus solfataricus* involves a high-affinity membrane-integrated binding protein. *Journal of Bacteriology*. 181 (14): 4285-4291.

**Amat, C., Planas, J. M. & Moretó, M.** (1996) Kinetics of hexose uptake by the small and large intestine of the chicken. *American Journal of Physiology*. 271: R1085-R1089.

**Anil, A.C., Tulaskar, A.S., Khandeparkar, D.C. & Wagh, A.B.** (1997) Cryopreservation of *Balanus amphitrite* nauplii. *Cryobiology*. 34: 131-140.

## B

**Bacca, H.** (2007) Etudes des voies métaboliques des sucres chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. *Thèse de Biologie, Vie-Agro-Santé. Université de Rennes 1*. 220 p.

**Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A. & Moal, J.** (2005) Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 145B: 635-646.



- Baker, P.F. & Carruthers, A.** (1981) 3-O-methylglucose transport in internally dialysed giant axons of *Loligo*. *The Journal of Physiology*. 316: 503-525.
- Baldwin, S.A.** (1993) Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1154: 17-49.
- Baldwin, S.A. & Lienhard, G.E.** (1981) Glucose transport across plasma membranes : facilitated diffusion systems. *Trends in Biochemical Sciences*. 6: 208-211.
- Bamford, D.R. & Gingles, R.** (1974) Absorption of sugar in the gill of the japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 49A: 637-646.
- Barber, B.J. & Blake, N.J.** (1981) Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 52: 121-134.
- Bargeton, M.** (1942) Les variations saisonnières du tissu conjonctif vésiculeux de l'huître. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique*. 76: 175-191.
- Bayne, B.L., Bubel, B., Gabbott, P.A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M. & Moore, M.N.** (1982) Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* (L.). *Marine Biology Letters*. 3: 89-105.
- Beattie, J.H., Chew, K.K. & Hershberger, W.K.** (1980) Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*. 70: 184-189.
- Bell, G.I., Burant, C.F., Takeda, J. & Gould, G.W.** (1993) Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *The Journal of Biological Chemistry*. 268 (26): 19161-19164.
- Berthelin, C., Kellner, K. & Mathieu, M.** (2000a) Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Marine Biotechnology*. 2: 136-145.
- Berthelin, C., Kellner, K. & Mathieu, M.** (2000b) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 125B: 359-369.
- Blanco, S.L., Suarez, M.P. & San Juan, F.** (2006) Seasonal change of nucleotides in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mantle tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 143B: 384-390.
- Blaya, J.A., Vazquez, C.M., Muriana, F.J., Ruiz-Gutierrez, V. & Bolufer, J.** (1998) Alpha-MeGlc and D-glucose transport by hepatopancreatic brush border membrane vesicles from prawn. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 54: 1-7.
- Boos, W. & Shuman, H.** (1998) Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism and regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 204-229.
- Bougrier, S. & Rabenomanana, L.D.** (1986) Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 58: 277-280.



**Bradford, M.M.** (1976) A rapid colorimetric and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

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

**Bustin, S.A.** (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 29: 23-39.

## C

**Cadoret, J.P., Debon, R., Cornudella, L., Lardans, V., Morvan, A., Roch, P. & Boulo, V.** (1999) Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters*. 46: 81-85.

**Carayannopoulos, M.O., Chi, M.M., Cui, Y., Pingsterhaus, J.M., McKnight, R.A., Mueckler, M., Devaskar, S.U. & Moley, K.H.** (2000) GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 97: 7313-7318.

**Chao, N.H., Chiang, C.P., Hsu, H.W., Tsai, C.T. & Lin, T.T.** (1994) Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquatic Living Resources*. 7: 99-104.

**Chao, N.H. & Liao, I.C.** (2001) Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*. 197: 161-189.

**Chao, N.H., Lin, T.T., Chen, Y.J., Hsu, H.W. & Liao, I.C.** (1997) Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture*. 155: 31-44.

**Chávez-Villalba, J.** (2001) Conditionnement expérimental de l'huître *Crassostrea gigas*. Thèse d'Océanologie Biologique, Université de Bretagne Occidentale. 162 p.

**Chávez-Villalba, J.E., Cochard, J-C., Le Pennec, M., Barret, J., Enriquez-Diaz, M., & Caceres-Martinez, C.** (2003) Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *The Journal of Shellfish Research*. 22(3): 721-731.

**Chávez-Villalba, J., Mingnant, C., Cochard, J. C. & Le Pennec, M.** (2001) Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber Benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Halotiss*. 30:1-12.

**Chen, C.P., Hsu, H.W., Lei, S.F. & Chang, C.H.** (1989) Preliminary study on the cryopreservation of Pacific oyster oocytes. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*. 16: 197-201.

**Cheng, T.C., La Peyre, J.F., Buchanan, J.T., Tiersch, T.R. & Cooper, R.K.** (2001) Cryopreservation of heart cells from eastern oyster. *In vitro cellular & Developmental Biology - Animal*. 37: 237-244.

**Choi, Y.H. & Chang, Y.J.** (2003) Influence of cooling rate, developmental stage, and the addition of sugar on the cryopreservation of larvae of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology*. 45: 190-193.



**Clayes, I., Simonet, G., Poels, J., Van Loy, T., Vercammen, L., De Loof, A. & Van den Broeck, J.** (2002) Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. *Peptides*. 23: 807-816.

**Clegg, J.S., Uhlinger, K.R. & Jackson, S.A.** (1998) Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 7 (1): 21-30.

**Colombo, V.E. & Semenza, G.** (1972) An example of mutual competition between transport inhibitors of different kinetic type: the inhibition of intestinal transport of glucalogues by phloretin and phlorizin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 288: 145-152.

**Comps, M. & Duthoit, J.L.** (1976) Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (Lmk). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*. 283: D1595-D1596.

**Costil, K., Royer, J., Ropert, M., Soletchnik, P. & Mathieu, M.** (2005) Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Helgoland Marine Research*. 59: 286-300.

**Crane, R.K.** (1965) Na<sup>+</sup> -dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Federation Proceedings*. 24: 1000-1006.

**Craik, J.D. & Elliott, R.F.** (1979) Kinetics of 3-O-methyl-D-glucose transport in isolated rat hepatocytes. *The Biochemical Journal*. 182: 503-508.

**Czech, M.P., Lawrence, J.C. & Lynn, W.S.** (1974) Hexose transport in isolated brown fat cells: a model system for investigation insulin action on membrane transport. *The Journal of Biological Chemistry*. 249 (17): 5421-5427.

**Czech, M.P., Lynn, D.G. & Lynn, W.S.** (1973) Cytochalasin B-sensitive 2-deoxy-D-glucose transport in adipose cell ghosts. *The Journal of Biological Chemistry*. 248 (10): 3636-3641.

## D

**Davidson, N.O., Hausman, A.M., Ifkovits, C.A., Buse, J.B., Gould, G.W., Burant, C.F. & Bell, G.I.** (1992) Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *American Journal of Physiology*. 262: C795-C800.

**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: 5635-5652.

**Dawson, P.A., Mychaleckyj, J.C., Fossey, S.C., Mihic, S.J., Craddock, A.L. & Bowden, D.W.** (2001) Sequence and functional analysis of GLUT10 : a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region chromosome 20q12-13.1. *Molecular Genetics and Metabolism*. 74: 186-199.

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



- 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, Université de Caen. 322 p.
- Dégremont, L., Bédier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A. & Moal, J.** (2005) Relative importance of family, site and field placement timing on survival, growth and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. 249: 213-229.
- Dégremont, L., Ernande, B., Bédier, E., & Boudry, P.** (2007) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture*. 262: 41-43.
- De Jong-Brink, M., Ter Maat, A. & Tensen, C.P.** (2001) NPY in invertebrates: molecular answers to altered functions during evolution. *Peptides*. 22 (3): 309-315.
- Deslous-Paoli, J.M., Héral, M. Berthome, J.P., Razet, D. & Garnier, J.** (1982) Reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* Thunberg dans le bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981: aspects biochimiques et énergétiques. *Revue des Travaux de l'Institut scientifique des Pêches Maritimes*. 45 (4): 319-327.
- Diaz Enrich, M.J. & Ibarguren, I.** (2003) Implication of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate, guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate, adenosine 5'-mono-, di-, and triphosphate and fructose-2, 6-bisphosphate in the regulation of the glycolytic pathway in relation to the gametogenetic cycle in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 47: 618-620
- Diedrich, D.F.** (1961) Comparison of effects of phlorizin and phloretin 2'-galactoside on the renal tubular reabsorption of glucose in dog. *Biochimica et Biophysica Acta*. 47: 618-620.
- Doege, H., Bocianski, A., Joost, HG. & Schurmann, A.** (2000a) Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *The Biochemical Journal*. 350: 771-776.
- Doege, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, HG. & Schurmann, A.** (2001) Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *The Biochemical Journal*. 359: 443-449.
- Doege, H., Schurmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A. & Joost, H.G.** (2000b) GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 16275-16280.
- Domart-Coulon, I., Doumenc, D., Auzoux-Bordenave S. & Le Fichant, Y.** (1994) Identification of media supplements that improve the viability of primary cell cultures of *Crassostrea gigas* oysters. *Cytotechnology*. 16: 109-120.
- Dong, Q., Eudeline, B., Huang, C., Allen, S.K. & Tiersch, T.R.** (2005a) Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Cryobiology*. 50: 1-16.
- Dong, Q., Huang, C., Eudeline, B. & Tiersch, T.R.** (2005b) Systematic factor optimization for cryopreservation of shipped sperm samples of diploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas*. *Cryobiology*. 51: 176-197.



**Downing, S.L. & Allen, S.K.** (1987) Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*. 61: 1-15.

**Dyer, J., Vayro, S., King, T.P. & Shirazi-Beechey, S.P.** (2003) Glucose sensing in the intestinal epithelium. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 270: 3377-3388.

## E

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

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

**Ehrenkranz, J.R.L., Lewis, N.G., Kahn, C.R. & Roth, J.** (2005) Phlorizin: a review. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 21: 31-38.

**Escher, S.A. & Rasmuson-Lestander, A.** (1999) The *Drosophila* glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic comparisons, analysis of functional sites and secondary structures. *Hereditas*. 130: 95-103.

**Eisenthal, R., Game S. & Holman, G.D.** (1989) Specificity and kinetics of hexose transport in *Trypanosoma brucei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 985 (1): 81-89.

**Enes, P., Panserat, S. & Oliva-Teles, A.** (2008) Hepatic glucokinase and glucose-6-phosphatase responses to dietary glucose and starch in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles reared at two temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149A (1): 80-86.

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

**Epp, J., Bricelli, V.M. & Malouf, R.E.** (1988) Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 121: 113-136.

## F

**Fabioux, C.** (2004) Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas*: Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. Thèse d'Océanologie biologique, Université de Brest. 199 p.

**Farcy, E.** (2006) étude de l'impact des radionucléides rejetés par les installations nucléaires du nord cotentin sur l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Analyse de l'expression de marqueurs moléculaires de stress. Thèse de Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions, Université de Caen. 219 p.

**Felsenstein, J.** (1989) PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistic*. 5: 164-166.



**Fletcher, L.M., Welsh, G.I., Oatey, P.B. & Tavaré, J.M.** (2000) Role for the microtubule cytoskeleton in GluT4 vesicle trafficking and in the regulation of insulin-stimulated glucose uptake. *The Biochemical Journal*. 352: 267-276.

**Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P. & Huvet, A.** (2008) Characterization of a gonad-specific transforming growth factor- $\beta$  superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*. 410: 187-196.

**Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel, B., Cerón-Ortiz, A.N. & Arredondo-Vega, B.** (2004) Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat. *Aquaculture Research*. 35 (12): 1131-1140.

**Foster, L.J. & Klip, A.** (2000) Mechanism and regulation of GluT4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *American Journal of Physiology*. 279: C877-C890.

**Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdaire, P. & Mathieu, M.** (2008) Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and Cell*. 40 (4): 251-260.

**Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargrove, J.S., Barber, Elston, R.A., Burrenson, E.M. & Reece, K.S.** (2005) Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63: 33-41.

**Fritsch, H.A.R., Van Noorden, S. & Pearse, A.G.E.** (1976) Cytochemical and immunofluorescence investigations on insulin-like producing cells in the intestine of *Mytilus edulis* L. (bivalvia). *Cellular Tissue Research*. 165: 365-369.

**Fukumuto, H., Kayano, T., Buse, J.B., Edwards, Y., Pilch, P.F., Bell, G.I. & Seino, S.** (1989) Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 264: 7776-7779.

**Fukumuto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., Eddy, R.L., Fukushima, Y., Byers, M.G., Shows, T.B. & Bell, G.I.** (1988) Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 85: 5434-5438.

## G

**Gabbott, P.A.** (1975) Storage cycle in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. *Proceedings of 9<sup>th</sup> European Marine Biology Symposium*, H. Barnes ed., Aberdeen University Press.

**Gabbott, P.A. & Whittle, M.A.** (1986) Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L. –II. Seasonal changes in glycogen content and glycogen synthetase activity in the mantle tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 83B: 197-207.

**Gabe, M.** (1968) Techniques histologiques. *Masson et C<sup>ie</sup>, Paris-VI, ed.*

**Galstoff, P.S.** (1964) The american oyster, *Crassostrea virginica* (G.). *Fishery Bulletin. U.S.* 64: 1-480.



- Garcia, E., Benitez, A. & Onetti, C.G.** (1993) Responsiveness to D-glucose in the neurosecretory cells of crustaceans. *Journal of Neurophysiology*. 70: 758-764.
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M. & Nicolas, J.L.** (2007) Evidence for the involvement of pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology*. 53 (2): 187-196.
- Garriga, C., Rovira, N., Moreto, M. & Planas, J.M.** (1999) Expression of Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter in brush-border membrane of the chicken intestine. *American Journal of Physiology*. 276: R627-R631.
- Gibson, U.E., Heid, C.A. & Williams, P.M.** (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*. 6: 995-1001.
- Giraldez, A. & Larralde, J.** (1960) Phlorizin inhibition in the absorption of monosaccharides by the cat intestine. *Revista Espanola de Fisiologia*. 16: 79-89.
- Glowik, R.M., Golowasch, J., Keller, R. & Marder, E.** (1997) D-glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of blood glucose level. *The Journal of Experimental Biology*. 200: 1421-1431.
- Gould, G.W., Thomas, H.M., Jess, T.J. & Bell, G.I.** (1991) Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: Kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry*. 30: 5139-5145.
- Gouletquer, P.** (1998) Shellfish culture in France: present status and new approaches to optimise production. *Proceedings of the twenty ninth annual shellfish conference*. 69-80.
- Gricourt, L., Bonnet, G., Boujard, D., Mathieu, M. & Kellner, K.** (2003) Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrlGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *General and Comparative Endocrinology*. 134: 44-56.
- Grizel, H., Comps, M., Cousserans, F., Bonami, J.R. & Vago, C.** (1974) Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *Comptes Rendus de l'Académie des Science de Paris*. 279: D783-D784.
- Guignot, F.** (2005) Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. INRA, Productions Animales. 18 (1): 27-35.
- Gwo, J.C.** (1995) Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Theriogenology*. 43: 1163-1174.
- Gwo, J.C., Chen, C.W. & Cheng, H.Y.** (2002) Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor* supertaxa). *Theriogenology*. 58: 1563-1578.
- Gwo, J.C., Wu, C.Y., Chang, W.S. & Cheng, H.Y.** (2003) Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. *Cryo-Letters*. 24: 171-180.



## H

- Hall, M.R. & Van Ham, E.H.** (1998) Diurnal variation and effects of feeding on blood glucose in the giant tiger prawn, *Peneaus monodon*. *Physiological Zoology*. 71: 574-583.
- 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. *Journal of Endocrinology*. 187: 55-67.
- Hanquet-Dufour, A.C., Kellner, K., Heude, C., Naimi, A., Mathieu, M. & Poncet, J.M.** (2006) Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells: Viability and metabolic activity. *Cryobiology*. 53: 28-36.
- Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S. & Wright, E.M.** (1987) Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. *Nature*. 330: 379-381.
- Héral, M., Prou, J. & Deslous-Paoli, J.M.** (1986) Influence des facteurs climatiques sur la production conchylicole du bassin de Marennes-Oléron. *Haliotis*. 15: 193-207.
- Herlin-Houtteville, P. & Lubet, P.** (1974) Analyse expérimentale, en culture organotypique, de l'action des ganglions-pleuraux et viscéraux sur le manteau de la moule mâle. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*. 278: 2469-2472.
- Heude-Berthelin, C.** (2000) Etude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. *Thèse de Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions, Université de Caen*. 156 p.
- Heude-Berthelin, C., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M. & Kellner, K.** (2001) Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* of two different growing areas (Normandy and Atlantic shore, France). *Invertebrate Reproduction and Development*. 40 (1): 79-86.
- Higgins, C.F.** (1992) ABC transporters : from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*. 8: 67-113.
- Hirayama, B.A., Loo, D.D.F. & Wright, E.M.** (1997) Cation effects on protein conformation and transport in the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 2110-2115.
- Hirayama, B.A., Lostao, M.P., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D.F., Turk, E. & Wright, E.M.** (1996) Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters (SGLT-1). *American Journal of Physiology*. 270: G919-G926.
- Horita, C., Mega, H. & Kurokura, H.** (1999) Grafting of cryopreserved mantle tissues onto cultured pearl oyster. *Cryo-Letters*. 20: 311-314.
- Houtteville, P.** (1974) Contribution à l'étude cytologique et expérimentale du cycle annuel du tissu de réserve du manteau de *Mytilus edulis* (L.). *Thèse de Doctorat, Université de Caen*. 98 p.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F. & Cunningham, C.** (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*. 343: 211-220.



**Hughes, J.B.** (1973) An examination of eggs challenged with cryopreserved spermatozoa of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Cryobiology*. 10: 342-344.

## I

**Ibberson, M., Uldry, M. & Thorens, B.** (2000) GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 4607-4612.

**Ieropoli, S., Masullo, P., Do Espirito Santo, M. & Sansone, G.** (2004) Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilisation viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Cryobiology*. 49: 250-257.

## J

**Jacobs, M.H.J., Van der Heide, T., Driessen, A.J. & Konings, W.N.** (1996) Glutamate transport in *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by a novel binding protein-dependent secondary transport system. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 93: 12786-12790.

**Jain, J.K. & Paulson, R.J.** (2006) Oocyte cryopreservation. *Fertility and Sterility*. 86: 1037-1046.

**James, D.E. & Piper, R.C.** (1993) Targeting of mammalian glucose transporters. *Journal of Cell Science*. 104: 607-612.

**James, D.E., Strube, M. & Mueckler, M.** (1989) Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature*. 338: 83-87.

**Janicot, M. & Lane, M.D.** (1989) Activation of glucose uptake by insulin and insulin-like growth factor I in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 86 (8): 2642-2646.

**Jauch, P. & Läuger, P.** (1986) Electrogenic properties of the sodium-alanine cotransporter in pancreatic acinar cells. II. Comparison with transport models. *The Journal of Membrane Biology*. 94: 117-127.

**Joost, H.J. & Thorens, B.** (2001) The extended GLUT-family of Sugar/polyol transport facilitators - Nomenclature, sequence characteristics and potential function of its novel members. *Molecular Membrane Biology*. 18: 247-256.

**Jung, H.** (2002) The sodium/substrate symporter family: structural and functional features. *Federation of European Biochemical Societies*. 529: 73-77.

## K

**Kang, Ch-K., Park, M.S., Lee, P. Y., Choi, W-J. & Lee, W-Ch.** (2000) Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. *Journal of Shellfish Research*. 19 (2): 771-778.



**Karp, G.** (1998) Biologie cellulaire et moléculaire - Concepts et expériences. De Boeck Université, Paris, Bruxelles.

**Karyano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., Gould, G.W., Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Shows, T.B. Seino, S. & Bell, G.I.** (1990) Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *Journal of Biological Chemistry*. 265: 13276-13282.

**Karyano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B. & Bell, G.I.** (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 15245-15248.

**Keller, R. & Orth, H.P.** (1990) Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. In: Eppler, A., Scanes, C.G., Stetson, M.H. (Eds.). *Progress in Comparative Endocrinology*. Wiley-Liss, New-York. 265-271.

**Kellet, G.L.** (2001) The facilitated component of intestinal glucose absorption. *The Journal of Physiology*. 531(3): 585-595.

**Kellner, K., Heude-Berthelin, C. & Mathieu, M.** (2002) Immunocytochemical demonstration of glucagon-like peptides in *Mytilus edulis* cerebral ganglia and *In vitro* effect of vertebrate glucagon on glycogen metabolism. *Tissue and Cell*. 34 (2): 109-116.

**Kimmich, G.A. & Randles, J.** (1975) A  $\text{Na}^+$ -independent, phloretin-sensitive monosaccharide transport system in isolated intestinal epithelial cells. *The Journal of Membrane Biology*. 23: 57-76.

**Kimmich, G.A. & Randles, J.** (1976) 2-Deoxyglucose transport by intestinal epithelial cells isolated from the chick. *The Journal of Membrane Biology*. 27: 363-379.

**King, A.P., Ku Tai, P.K. & Carter-Su, C.** (1991) Cytochalasin B interferes with conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter induced by internal and external sugar binding. *Biochemistry*. 30: 11546-11553.

**Kletzien, R.F. & Perdue, J.F.** (1973) The inhibition of sugar transport in chick embryo fibroblasts by cytochalasin B: Evidence for a membrane-specific effect. *The Journal of Biological Chemistry*. 248 (2): 711-719.

**Krasnov, A., Teerijoki, H. & Molsa, H.** (2001) Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1520: 174-178.

**Krupka, R.M.** (1985) Asymmetrical binding of phloretin to the glucose transport system of human erythrocytes. *The Journal of Membrane Biology*. 83 (1-2): 71-80.

**Kurokura, H., Namba, K. & Ishikawa, T.** (1990) Lesions of spermatozoa by cryopreservation in oyster *Crassostrea gigas*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 56: 1803-1806.



## L

- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F. & Cordevant, C.** (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms*. 46 : 139-145.
- Lannan, J.E., Robinson, A. & Breese, W.P.** (1980) Broodstock management of *Crassostrea gigas* II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture*. 21: 337-345.
- Legate, N.J., Bonen, A. & Moon, T.W.** (2001) Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), the American eel (*Anguilla rostrata*) and the black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *General and Comparative Endocrinology*. 122: 48-59.
- Le Marrec-Croq, F., Fristayre, K., Chesné, C., Guillozou, A. & Dorange, G.** (1998) Cryopreservation of *Pecten maximus* heart cells. *Cryobiology*. 37: 200-206.
- 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: 371-382.
- Lennan, J.E.** (1971) Experimental self-fertilization of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, utilizing cryopreserved sperm. *Genetics*. 68: 599-601.
- Lenoir, F.** (1989) Mise au point de techniques de dissociation, de purification et de culture cellulaires chez la moule *Mytilus edulis* L. Application à l'étude des régulations du métabolisme du glucose et du glycogène dans les cellules à glycogène (= cellules vésiculeuses). *Thèse de Sciences, Université de Caen*. 167 p.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L., Gouy, M. & Berthe, F.C.J.** (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*. 15: 251-258.
- Li, Y., Qin, J.G., Abbott, C.A., Li, X. & Benkendorff, K.** (2007) Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 293 (6): R2353-2362.
- Lin, T.T., Chao, N.H. & Tung, H.T.** (1999) Factors affecting survival of cryopreserved oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Cryobiology*. 39: 192-196.
- Lin, T.T., Tung, H.T. & Chao, N.H.** (1993) Cryopreservation of oyster embryos with conventional freezing procedure and vitrification. *Cryobiology*. 30: 614-615.
- Lipovsky, P. & Chew, K.K.** (1972) Mortality of the Pacific oysters *Crassostrea gigas*: the influence of temperature and enriched seawater on oyster survival. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*. 62: 72-82.



**Livingstone, D.R. & Clarke, K.R.** (1983) Seasonal changes in hexokinase from the mantle tissue of the common mussel *Mytilus edulis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 74B (4): 691-702.

**Lisinski, I., Schurmann, A., Joost, H.G., Cushman, S.W. & Al-Hasani, H.** (2001) Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochemical Journal*. 358: 517-522.

**Loo, D.D.F., Hirayama, B.A., Gallardo, E.M., Lam, J.T., Turk, E. & Wright, E.M.** (1998) Conformational changes couple  $\text{Na}^+$  and glucose transport. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 95: 7789-7794.

**Loo, D.D.F., Zeuthen, T., Chandy, G. & Wright, E.M.** (1996) Cotransport of water by the  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 93: 13367-13370.

**Louzao, M.C., Vieytes, M.R. & Botana, L.M.** (1993) D-glucose transporter on mussel mantle cell membranes: effect of sodium and phlorizin. *The Journal of Experimental Biology*. 267: 572-577.

**Lubet, P.** (1959) Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. *Revue des Travaux de l'Institut Scientifique des Pêches Maritimes*. 23 (3): 387-548.

**Lubet, P.** (1980) Influence des facteurs externes sur la reproduction des lamellibranches. *Oceanis*. 6: 469-489.

**Lüschen, W., Willig, A. & Jaros, P.P.** (1993) The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105C (2): 291-296.

## M

**Madar, I., Sildan, N., Pora, E.A. & Hernandez, L.** (1979) In vitro effect of insulin on the glucose uptake by isolated mantle pieces of *Mytilus galloprovincialis* (L.). *Revue Roumaine de Biologie – Série de Biologie Animale*. 24 (1): 41-43.

**Maiden, M.C.J., Davis, E.O., Baldwin, S.A., Moore, D.C.M. & Henderson, P.J.F.** (1987) Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature*. 325: 641-643.

**Maier, V., Fuchs, J., Pfeiffer, E.F. & Bounias, M.** (1990) Glucagon as a non species specific regulator of the glycaemia in honeybee (*Apis mellifica*). *Diabetes & Metabolism*. 16: 428-434.

**Mandal, A., Verri, T., Mandal, P.K., Storelli, C. & Ahearn, G.A.** (2003) Expression of  $\text{Na}^+$ /D-glucose cotransport in *Xenopus laevis* oocytes by injection of poly(A)<sup>+</sup> RNA isolated from lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 135A (3): 467-475.

**Mann, R.** (1979) Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal of the Marine biological Association of the United Kingdom*. 59: 95-100.



- Mannerström, M., Tähti, H., Tiihonen, K. & Salama, A.** (2003) D-Glucose uptake in fish hepatocytes: mediated by transporter in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), but only by diffusion in prespawning lamprey (*Lampetra fluviatilis*) and in RTH-149 cell line. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 136A (3): 779-790.
- Martin, C.H., Mayeda, C.A., Davis, C.L., Ericsson, C.L., Knafels, J.D., Mathog, D.R., Celniker, S.E., Lewis, E.B. & Palazzolo, M.J.** (1995) Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 92: 8398-8402.
- Martin, S. Millar, C.A., Lyttle, C.T., Meerloo, T., Marsh, B., Gould, G.W. & James, D.E.** (2000) Effects of insulin on intracellular GluT4 vesicles in adipocytes : evidence for a secretory mode of regulation. *Journal of Cell Science*. 113: 3427-3438.
- Mathieu, M.** (1987) Etude expérimentale des contrôles exercés par les ganglions nerveux sur la gamétogenèse et les processus métaboliques associés à la moule *Mytilus edulis* (L.) (Mollusque lamellibranche). *Thèse de doctorat d'état, Université de Caen*.
- Mathieu, M. & Lubet, P.** (1993) Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves - a brief review. *Invertebrates reproduction and development*. 23 (2-3): 123-129.
- 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. & His, E.** (1986) Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis*. 15: 309-317.
- Mazur, J.P.** (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*. 247: C125-C142.
- Medhioub, M.N. & Lubet, P.** (1988) Recherches cytologiques sur l'environnement cellulaire (tissu de réserve) des gonades de la palourde *Ruditapes philippinarum* (Mollusque Bivalve). *Annales des Sciences Naturelles - Zoologie*. 9: 87-102.
- Mc Fadzen, I.R.** (1995) Cryopreservation of the sperm of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Methods in Molecular Biology*. 38: 145-149.
- Mc Vie-Wylie, A.J., Lamson, D.R. & Chen, Y.T.** (2001) Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics*. 72: 113-117.
- Mori, K.** (1979) Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*. 53: 361-369.
- Morrison, T.M., Weis, J.J. & Wittwer, C.T.** (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 24: 952-962.
- Mosmann, T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E. & Lodish, H.F.** (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 229: 941-945.



## N

**Naftalin, R.J. & Holman, G.O.** (1977) Transport of sugar in human red cells. In: *Ellory, J.C. & Lew, V.L., eds. Membrane transport in red cells.* 257-300.

**Naidenko, T.** (1997) Cryopreservation of *Crassostrea gigas* oocytes, embryos and larvae using antioxydant echinochrome A and antifreeze protein AFP1. *Cryo-Letters*. 18: 375-382.

**Naimi, A.** (2004) Caractérisation des transporteurs de glucose et mesure de leur expression par PCR en temps réel chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Rapport de DEA, Université de Caen*. 30 p.

**Nagata, K., Hori, N., Sato, K., Ohta, K., Tanaka, H. & Hiji, Y.** (1999) Cloning and functional expression of an SGLT1-like protein from the *Xenopus laevis* intestine. *The American Journal of Physiology*. 276: G1251-G1259.

**Nagata, K. & Ichikawa, O.** (1995) Two endogenous methyl-alpha-D-glucopyranoside uptake activities in *Xenopus* oocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B Biochemistry and Molecular Biology*. 112 (1): 115-22.

**Nascimento, I.A., Leite, M.B. N.L., Sampaio de Araujo, M.M., Sansone, G., Pereira, S.A. & Do Espirito Santo, M.** (2005) Selection of cryoprotectants based on their toxic effects on oyster gametes and embryos. *Cryobiology*. 51: 113-117.

**Neame, K.D. & Richards, T.G.** (1972) Elementary kinetics of membrane carrier transport. *New York, John Wiley & Sons*. 56-79.

**Newell, R.I.E., Hilbish, T.J., Koehn, R.K. & Newell, J.C.** (1982) Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L (Bivalvia-Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. *The Biological Bulletin*. 162: 299-310.

**Novakova, R., D. Homerova, R.K. Kinne, E. Kinne-Saffran, & Lin, J.T.** (2001) Identification of a region critically involved in the interaction of phlorizin with the rabbit sodium-D-glucose cotransporter SGLT1. *The Journal of Membrane Biology*. 184: 55-60.

## O

**Odintsova, N.A., Kiselev, K., Sanina, N. & Kostetsky, E.** (2001) Cryopreservation of primary cell cultures of marine invertebrates. *Cryo-Letters*. 22: 299-310.

**Odintsova, N.A. & Tsal, L.** (1995) Cryopreservation of primary cell cultures of bivalvia. *Cryo-Letters*. 16: 13-20.

**Ohta, T., Isselbacher, K.J. & Rhoads, D.B.** (1990) Regulation of glucose transporters in LLC-PK<sub>1</sub> cells: Effects of D-glucose and monosaccharides. *Molecular and Cellular Biology*. 10 (12): 6491-6499.

## P

**Pajor, A.M., Moon, D.A. & Wright, S.H.** (1989) Sodium D-glucose cotransport in the gill of the marine mussels: studies with intact tissue and brush-border membrane vesicles. *The Journal of Membrane Biology*. 107: 77-88.



- Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D.F. & Wright, E.M.** (1995) Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 27099-27105.
- Paniagua-Chavez, C.G., Buchanan, J.T. & Tiersch, T.R.** (1998) Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm. *Journal Shellfish Resources*. 17: 231-237.
- Paniagua-Chavez, C.G., Jenkins, J., Segovia, M. & Tiersch, T.R.** (2006) Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes. *Cryobiology*. 53: 128-138.
- Paniagua-Chavez, C.G. & Tiersch, T.R.** (2001) Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the Eastern oyster. *Cryobiology*. 43: 211-223.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., Saier & M.H. Jr.** (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 1-34.
- Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F. & Wright, E.M.** (1992a) Electrogenic properties of the cloned Na<sup>+</sup>/ glucose cotransporter : I. Voltage-clamp studies. *The Journal of Membrane Biology*. 125: 49-62.
- Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F. & Wright, E.M.** (1992b) Electrogenic properties of the cloned Na<sup>+</sup>/ glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *The Journal of Membrane Biology*. 125: 63-79.
- Peng, C., Huang, Y.P., Peter, R.E.** (1990) Neuropeptide Y stimulates Growth Hormone and Gonadotropin release from the goldfish pituitary in vitro. *Neuroendocrinology*. 52: 28-34.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H. & Chew, K.K.** (1981) Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Washington State. *Journal of Shellfish Research*. 1 (1): 9-16.
- Pessin, J.F., Thurmond, D.C., Elmendorf, J.S., Coker, K.J. & Shuichi, O.** (1999) Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (5): 2593-2596.
- Pfaffl, M.W.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29: E45.
- Pfaffl, M.W. & Hageleit, M.** (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*. 23: 275-282.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L.** (2002) Relative expression software tool (REST<sup>®</sup>) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 30 (9): 1-10.
- Phay, J.E., Hussain, H.B. & Moley, J.F.** (2000) Strategy for identification of novel glucose transporter family members by using internet-based genomic databases. *Surgery*. 128: 946-951.
- Pinkofsky, H.B., Dwyer, D.S. & Bradley, R.J.** (2000) The inhibition of GluT1 glucose transport and cytochalasin B binding by tricyclic antidepressants. *Life Sciences*. 66 (3): 271-278.



**Pipe, R.K.** (1987) Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*. 96: 519-528.

**Planas, J.V., Encarnación, C. & Gutiérrez, J.** (2000) Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. *FEBS Letters*. 481: 266-270.

**Plisetskaya, E.M., Slotitskaya, L.P. & Leibson, L.G.** (1979) Participation of insulin in metabolic regulation in marine bivalve molluscs. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 15 (3): 243-248.

**Poncet, J.M. & Lebel, J.M.** (2003) Influence of cryoprotectant agent and cooling rate on frozen and thawed hemocytes from the mollusc *Haliotis tuberculata*. *Cryobiology*. 47: 184-189.

**Poncet, J.M., Serpentine, A., Boucaud-Camou, E. & Lebel, J.M.** (2002) Cryopreservation of mantle dissociated cells from *Haliotis tuberculata* (Gasteropoda) and postthaw primary cell cultures. *Cryobiology*. 44: 38-45.

**Postma, P.W.** (1992) Phosphoenolpyruvate : carbohydrate phosphotransferase system. *Encyclopedia of Microbiology*. Lederberg, J. (ed.), Academic press. Vol. 3 (M-R): 339-149.

## R

**Rabus, R., Jack, D.L., Kelly, D.J. & Saier, M.H. Jr.** (1999) TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. *Microbiology*. 145: 3431-3445.

**Renault, T., le Deuff, R.M., Cochenne, N. & Maffart, P.** (1994) Herpes viruses associated with mortalities among Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France – Comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 145 (10): 735-742.

**Renard, P.** (1991) Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects. *Aquaculture*. 92: 43-57.

**Renard, P. & Cochard, J.C.** (1989) Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam *Ruditapes philippinarum* Reeve and King scallop *Pecten maximus* (L) embryos: influence of the biochemical and osmotic effects. *Cryo-Letters* 10: 169-180.

**Reshkin, S.J. & Ahearn, G.A.** (1987a) Intestinal glucose transport and salinity adaptation in a euryhaline teleost. *The American Journal of Physiology*. 252: R567-R578.

**Reshkin, S.J. & Ahearn, G.A.** (1987b) Basolateral glucose transport by intestine of teleost, *Oreochromis mossambicus*. *The American Journal of Physiology*. 252: R579-R586.

**Robbins, I., Lenoir, F. & Mathieu, M.** (1990) A putative neuroendocrine factor that stimulates glycogen mobilization in isolated glycogen cells from the marine mussel *Mytilus edulis*. *General and Comparative Endocrinology*. 79: 123-129.

**Robbins, I., Lenoir, F. & Mathieu, M.** (1991) Neuroendocrine factor affecting the glycogen metabolism of purified *Mytilus edulis* glycogen cell: partial characterization of the putative glycogen mobilization hormone—demonstration of a factor that stimulates glycogen synthesis. *General and Comparative Endocrinology*. 82: 45-52.



**Robert, R. & Gérard, A.** (1999) Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources*. 12 (2): 121-130.

**Robinson, A.** (1992) Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture*. 106: 89-97.

**Rodnick, K.J., Bailey, J.R., West, J.L., Rideout, A. & Driedzic, W.R.** (1997) Acute regulation of glucose uptake in cardiac muscle of the American eel *Anguilla rostrata*. *The Journal of Experimental Biology*. 200: 2871-2880.

**Rodriguez-Contreras, D., Skelly, P.J., Landa, A., Shoemaker, C.B. & Laclette, J.P.** (1998) Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. *Parasitology*. 117: 579-88.

**Rogers, S., Macheda, M/L, Docherty, S.E., Carty, M.D., Henderson, M.A., Soeller, W.C., Gibbs, E.M., James, D.E. & Best, J.D.** (2002) Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *The American Journal of Physiology*. 282: E733-E738.

**Royer, J., Ropert, M. & Costil, K.** (2007) Spatio-temporal changes in mortality, growth and condition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Normandy (France). *Journal of Shellfish Research*. 26 (4): 973-984.

**Royer, J., Segueineau, C., Park, K., Pouvreau, S., Choi, K. S. & Costil, K.** (2008) Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture*. 277: 313-320.

**Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G., Abad, M. & Sanchez, J.L.** (1992) Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Marine Biology*. 112: 67-74.

## S

**Samain, J.F., Dégrement, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T. & Boudry, P.** (2007) Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*. 268 (1-4): 227-243.

**Samain, J.F. & Mc Combie, H.** (2007) Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Ed. Ifremer/ Quae. 332 p.

**San Juan Serrano, F., Fernandez, M., Sanchez, J.L. & Garcia, L.O.** (1991) Purification and molecular properties of glycogen phosphorylase b from mantle tissue of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 98B: 33-39.

**San Juan Serrano, F., Fernandez, M., Sanchez, J.L. & Garcia, L.O.** (1995) Molecular mechanism of the control of glycogenolysis by calcium ions and cycle AMP in the mantle of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 110B: 577-582.



**San Juan Serrano, F., Sanchez, J.L. & Garcia, L.O.** (1998a) ATP and energy charge regulate glycogen phosphorylase from *Mytilus galloprovincialis* mantle. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 120: 438-491.

**San Juan Serrano, F., Suarez Alonso, P., Blanco Lopez, S.C. & Garcia Martin, L.O.** (1998b) Regulation of *Mytilus galloprovincialis* glycogen phosphorylase by glucose and glucose-6-phosphate. *Journal of shellfish Research*. 17 (1): 159-163.

**San Juan Serrano, F., Suarez Alonso, P., Lombrana Tascon, M. & Garcia Martin, L.O.** (1998c) Effect of temperature on glycogen phosphorylase activity of *Mytilus galloprovincialis* mantle tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 4: 267-272.

**Sasaki, T., Minoshima, S., Shiohama, A., Shintani, A., Shimizu, A., Asakawa, S., Kawasaki, K. & Shimizu, N.** (2001) Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 289: 1218-1224.

**Seatter, M.J., de la Rue, S.A., Porter, L.M. & Gould, G.W.** (1998) QLS motif in transmembrane helix VII of the glucose transporter family interacts with the C-1 position of D-glucose and is involved in substrate selection at the exofacial binding site. *Biochemistry*. 37: 1322-1326.

**Seidler, E. & Wohlrab, F.** (1973) Suitability of monotetrazolium salt MTT derivatives for histochemical dehydrogenase demonstration. *Acta Histochemica*. 46 (2): 202-8.

**Scheepers, A., Joost, H.G. & Schürmann, A.** (2004) The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *Journal of parenteral and enteral nutrition*. 28: 364-371.

**Schneider, J.E.** (2004) Energy balance and reproduction. *Physiology & Behavior*. 81: 289-317.

**Silverman, M.** (1991) Structure and function of hexose transporters. *Annual Review of Biochemistry*. 60: 757-794.

**Skelly, P.J., Kim, J.W., Cunningham, J. & Shoemaker, C.B.** (1994) Cloning, characterization, and functional expression of cDNAs encoding glucose transporter proteins from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 4247-4253.

**Soengas, J.L. & Moon, T.W.** (1998) Transport and metabolism of glucose in isolated enterocytes of the black bullhead *Ictalurus melas*: effects of diet and hormones. *The Journal of Experimental Biology*. 201: 3263-3273.

**Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P. & Gouletquer, P.** (1999) Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron: étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquatic Living Resources*. 12 (2): 131-143.

**Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N. & Gouletquer, P.** (1997) Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquatic Living Resources*. 10: 177-185.



**Sombe, N.** (2001) Mise en évidence de transporteurs de glucose de type GluT4 au niveau des cellules de réserve de l'huître creuse *Crassostrea gigas* par des méthodes immunologiques. *Rapport de maîtrise de Biologie cellulaire et Physiologie, Université de Caen*. 20 p.

**Soniat, T. M. & Ray, S. M.** (1985) Relationships between possible available food and the composition, condition and reproductive state of oysters from Galveston Bay, Texas. *Contributions in Marine Science*. 28: 109-121.

**Stalmans, W., De Wulf, H., Hue, H. & Hers, H.G.** (1974) The sequential inactivation of glycogen phosphorylase and activation of glycogen synthetase in liver after the administration of glucose to mice and rats. The mechanism of the hepatic threshold to glucose. *European Journal of Biochemistry*. 41: 127-134.

**Steele, S. & Mulcahy M.F.** (1999) Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal of the Marine biological Association of the United Kingdom*. 79: 673-686.

**Suzawa, K., Yukita, A., Hayata, T., Goto, T., Danno, H., Michiue, T., Cho, K.W. & Asashima, M.** (2007) *Xenopus* glucose transporter 1 (xGLUT1) is required for gastrulation movement in *Xenopus laevis*. *The International Journal of Developmental Biology*. 51(3):183-90.

**Swift, M.L., Thomas, T.P. & Humphrey, C.L.** (1988) characteristics of glycogen synthase activity in the oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 90B: 361-365.

## T

**Tanner, W. & Caspari, T.** (1996) Membrane transport carriers. *Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47: 595-626.

**Taverna, R.D. & Langdon, R.G.** (1973) Reversible association of cytochalasin B with the human erythrocyte membrane: inhibition of glucose transport and the stoichiometry of cytochalasin binding. *Biochimica et Biophysica Acta*. 323: 207-219.

**Teerijoki, H., Krasnov, A., Gorodilov, Y., Krishna, S. & Mölsä, H.** (2001) Rainbow trout glucose transporter (OnmyGLUT1): functional assessment in *Xenopus laevis* oocytes and expression in fish embryos. *The Journal of Experimental Biology*. 204: 2667-2673.

**Teerijoki, H., Krasnov, A., Piktänen, T.I. & Mölsä, H.** (2000) Cloning and characterization of teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) glucose transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1493: 290-294.

**Tervit, H.R., Adams, S.L., Roberts, R.D., McGowen, L.T., Pugh, P.A., Smith, J.F. & Janke, P.A.** (2005) Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Cryobiology*. 51: 142-151.

**Tessmar-Raible, K. & Arendt, D.** (2003) Emerging systems: between vertebrates and arthropods, the Lophotrochozoa. *Current Opinion in Genetics and Development*. 13: 331-340.

**Thomas-Delloye, V., Marmonier, F., Duchamps, C., Pichon-Georges, B., Lachuer, J., Barré, H. & Crouzoulon, G.** (1999) Biochemical and functional evidences for a GluT4



homologous protein in avian skeletal muscle. *American Journal of Physiology*. 277: R1733-R1740.

**Thorens, B.** (1993) Facilitated glucose transporters in epithelial cells. *Annual Review of Physiology*. 55: 591-608.

**Thorpe, A. & Duve, H.** (1984) Insulin- and glucagon-like peptides in insects and molluscs. *Molecular physiology*. 5: 235-260.

**Toggenburger, G., M. Kessler, A. Rothstein, G. Semenza, & Tannenbaum, C.** (1978) Similarity in effects of Na<sup>+</sup> gradients and membrane potentials on D-glucose transport by, and phlorizin binding to, vesicles derived from brush borders of rattit intestinal mucosal cells. *The Journal of Membrane Biology*. 40: 269-290.

**Toledo, J.D., Kurokura, H. & Kasahara, S.** (1989) Preliminary studies on the cryopreservation of Blue mussel embryos. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 65: 1661.

**Trinder, P.** (1969) Determination of glucose in Blood using Glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*. 6: 24-29.

**Tsai, H.P. & Chao, N.H.** (1994) Cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor*) sperm-technique and its significance. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*. 21: 347-360.

**Tse, C. & Young, J.** (1990) Glucose transport in fish erythrocytes: variable cytochalasin-B-sensitive hexose transport activity in the common eel (*Anguilla japonica*) and transport deficiency in the paddyfield eel (*Monopterus albus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *The Journal of Experimental Biology*. 148: 367-383.

**Turk, E. & Wright, E.M.** (1997) Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *The Journal of Membrane Biology*. 159: 1-20.

## U

**Usuki, H., Hamaguchi, M. & Ishioka, H.** (1997) Long-term cryopreservation of pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. *Bulletin of Nansei National Fisheries Research Institute*. 30: 115-123.

**Usuki, H., Hamaguchi, M. & Ishioka, H.** (1999) Cryopreservation of Pacific oyster sperm and larvae. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture*. S1: 3-6.

## V

**Van der Horst, G., Dott, H.M., Samuels, J.S. & Genade, A.** (1985) Short- and long-term storage of viable oyster sperm. *South African Journal of Science*. 81: 404-405.

**Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, P.K., Ingrosso, L., Zonno, V., Vilella, S. Ahearn, G.A. & Storelli, C.** (2001) D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 130A: 585-606.



## W

- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.L., Marissal, E. & Berthe, F.** (2002) Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Comptes Rendus Biologies*. 325: 231-238.
- Wagstaff, P., Kang, H.Y., Mylott, D., Robbins, P.J. & White, M.K.** (1995) Characterization of the avian GLUT1 glucose transporter: differential regulation of GLUT1 and GLUT3 in chicken embryo fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*. 6: 1575-1589.
- Wang, M. & Wang, C.** (1993) Characterization of glucose transport system in *Drosophila* Kc cells. *FEBS Letters*. 317: 241-244.
- Weber, W.M., Schwarz, W. & Passow, H.** (1989) Endogenous D-glucose transport in oocytes of *Xenopus laevis*. *The Journal of Membrane Biology*. 111: 93-102.
- Webster, S.** (1996) Measurements of crustacean hyperglycemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emmersion stress. *The Journal of Experimental Biology*. 199: 1579-1585.
- Welcomme, L. & Devos, P.** (1993) Immunological identification and biochemical characterization of a glucose transporter in the posterior gills of the crab *Carcinus maenas* L. *The Journal of Experimental Biology*. 268: 218-223.
- White, M.K., Rall, T.B. & Weber, M.J.** (1991) Differential regulation of glucose transporter isoforms by the src oncogene in chicken embryo fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. 11: 4448-54.
- Whittle, M.A. & Gabbott, P.A.** (1986) Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L. III: Regulation by glucose in a mantle tissue slice preparation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 83B: 209-214.
- Wood, I.S. & Trayhurn, P.** (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*. 89: 3-9.
- Wright, E.M.** (2001a) Molecular aspects of intestinal brush-border Na<sup>+</sup>/glucose transport. *Current Topics in Membranes*. 50: 499-516.
- Wright, E.M.** (2001b) Renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransports. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 280: F10-F18.
- Wright, J.R., O'Hali, W., Yang, H., Han, X. & Bonen, A.** (1998) GluT4 deficiency and absolute peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. *General and Comparative Endocrinology*. 111: 20-27.
- Wright, S.H., Pajor, A.M., Moon, D.A. & Wunz, T.M.** (1992) High-affinity phlorizin binding in *Mytilus* gill. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1103: 212-218.
- Wu, X., Li, W., Sharma, V., Godzik, A. & Freeze, H.H.** (2002) Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Molecular Genetics and Metabolism*. 76: 37-45.



## Y

**Yankson, K. & Moyse, J.** (1991) Cryopreservation of the spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and tree other oysters. *Aquaculture*. 97: 259-267.

**Young, J., Yao, S., Tse, C., Davies, A. & Baldwin, S.** (1994) Functional and molecular characteristics of a primitive vertebrate glucose transporter : Studies of glucose transport by erythrocytes from the Pacific hagfish (*Eptatretus stouti*). *The Journal of Experimental Biology*. 186: 23-41.

## Z

**Zaba, B.N. & Davies, J.I.** (1984) Glycogen metabolism and glucose utilisation in the mantle tissue of *Mytilus edulis*. *Molecular Physiology*. 5: 261-283.

**Zaba, B.N., Gabbott, P.A. & Davies, J.I.** (1981) Seasonal changes in the utilisation of <sup>14</sup>C- and <sup>3</sup>H-labelled glucose in the mantle tissue slice preparation of *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 70B: 689-695.

**Zandee, D.I., Kluytmans, J.H., Zuburg, W. & Pieters, H.** (1980) Seasonal variation in Biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Netherlands Journal of Sea Research*. 14: 1-29.

**Zell, S.R., Bamford, M.H. & Hidu, H.** (1979) Cryopreservation of spermatozoa of American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Cryobiology*. 16: 448-460.

**Zuniga, F.A., Shi, G., Haller, J.F., Rubashkin, A., Flynn, D.R., Iserovich, P. & Fischbarg J.** (2001) A three dimensional model of the human facilitative glucose transporter GluT1. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 44970-44975.







## **ANNEXES**







## ANNEXE I

### ✂ Préparation histologique

#### a) Davidson :

400 mL de glycérol  
800 mL de formol (37%)  
1200 mL d'éthanol (96%)  
1200 mL d'eau de mer filtrée  
Ajouter 1/10° d'acide acétique.

#### b) Colorants pour la méthode Trichrome de Prenant Gabe :

##### ○ Hématoxyline de Groat :

**Solution A :** 50 mL d'eau déminéralisée  
0,8 mL d'acide sulfurique concentré  
1 g d'alun de fer et d'ammonium

**Solution B :** 50 mL d'éthanol 95°  
0,5 g d'hématoxyline pur

**Mélanger A et B**, 30 minutes d'incubation puis filtrer.

##### ○ Eosine Y 1% :

1 g d'éosine Y  
Ajuster à 100 mL d'eau déminéralisée.

##### ○ Acide phosphomolybdique 1% :

1 g d'acide phosphomolybdique  
Ajuster à 100 mL d'eau déminéralisée.

##### ○ Vert lumière 0,2% :

200 µg de vert lumière  
Ajuster à 100 mL d'eau déminéralisée.  
Addition de quelques gouttes d'acide acétique.

### ✂ Dosages biochimiques

#### c) Dosage des protéines (Bradford, 1976) :

Gamme étalon : Solution mère de serum albumine bovine (SM) à 1 mg/mL.



Tube	Volume de la solution de BSA	Volume d'EBD	Concentration finale de BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	50 $\mu\text{L}$ de la SM	4,950 mL	10
2	2,4 mL du tube 1	600 $\mu\text{L}$	8
3	1,2 mL du tube 2	1,2 mL	5
4	1,2 mL du tube 3	1,2 mL	2,5
5	1,2 mL du tube 4	1,2 mL	1,25
6	0	2 mL	0

**Echantillon :**

Peser 10 mg de tissu lyophilisé, les reprendre dans 5 mL de NaOH 1M.

Vortexer, puis chauffer 5 min à 100°C.

Centrifuger 10 min à 2000 g.

ou

Verser 1 mL de solution cellulaire ( $5 \cdot 10^6$  cellules/ mL) dans 1 mL de NaOH 1M.

Vortexer, puis centrifuger 5 min à 2000 g.

Reprendre 50  $\mu\text{L}$  du surnageant dans 4,950 mL d'EBD.

Vortexer, puis réaliser le dosage avec 1 mL de la gamme.

**Protocole de dosage :**

Ajouter 1 mL de réactif de Bradford (SIGMA ®) à 1 mL de la solution à doser (échantillon ou gamme).

Mélanger doucement, laisser 5 min à température ambiante puis lire au spectrophotomètre à 595 nm.

**d) Dosage du glucose (Trinder, 1969) :**

**Gamme étalon** : Solution de glucose (SM) à 1 mg/mL.

Tube	Volume de la solution de glucose	Volume d'EBD	Concentration finale de glucose ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	64 $\mu\text{L}$ de la SM	736 $\mu\text{L}$	80
2	300 mL du tube 1	400 $\mu\text{L}$	60
3	200 $\mu\text{L}$ du tube 2	200 $\mu\text{L}$	40
4	200 $\mu\text{L}$ du tube 3	200 $\mu\text{L}$	20
5	200 $\mu\text{L}$ du tube 4	200 $\mu\text{L}$	10
6	200 $\mu\text{L}$ du tube 5	200 $\mu\text{L}$	5
7	200 $\mu\text{L}$ du tube 6	800 $\mu\text{L}$	1
8	0	400 $\mu\text{L}$	0



**Echantillon :**

Réaliser des pools de 3 animaux : ponctionner 100 µL d'hémolymphe dans la région péricardique pour chaque animal,

Mélanger en inversant le tube plusieurs fois, puis centrifuger 10 min à 200 g.

Reprendre 100 µL du surnageant dans 100 µL d'eau bidistillée.

**Protocole de dosage :**

Ajouter 400 µL du réactif (o-Dianisidine dihydrochloride à 0,008% et 500 unités de Glucose oxydase et 100 unités de peroxydase, SIGMA ®) au 200 µL de la solution à doser (échantillon ou gamme).

Vortexer, mettre ensuite au bain marie à 37°C pendant 30 min.

Verser 400 µL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 12N.

Vortexer puis lire au spectrophotomètre à 540 nm.

**✂ Préparation de la suspension cellulaire****e) Milieu L-15 :**

L-15 Medium (Leibovitz) 1,5 % (p/v)

NaCl 342 mM

KCl 50 mM

Hepes 18 mM

Ajuster le pH à 7,4 puis filtrer sous hotte à l'aide d'un filtre Millipore 0,2 µm stérile.

**f) Antibiotiques :**

Streptomycine 6,8 mM

Pénicilline 16,8 mM

Filtrer des aliquots de 1 mL

Verser 500 µL de cette solution dans 50 mL de milieu L-15.

**g) Test de réduction du MTT :**

Ajouter 50 µL de MTT 12 mM dans 500 µL de suspension cellulaire.

Mettre à Incuber à 15 °C pendant 24 heures.

Laisser précipiter la suspension après l'addition de 550 µL d'Isopropanol HCl 0,04 N.

Mettre à incuber sous agitation vigoureuse pendant 30 minutes.

Centrifuger (1000 g, 5min, 15 °C).

Récupérer le surnageant.

Mesurer l'absorbance à 570 et 630 nm.

**✂ Cryopréservation des cellules vésiculeuses****h) Alsever :**

Citrate de Na 27,2 mM

EDTA 9 mM



NaCl 440 mM

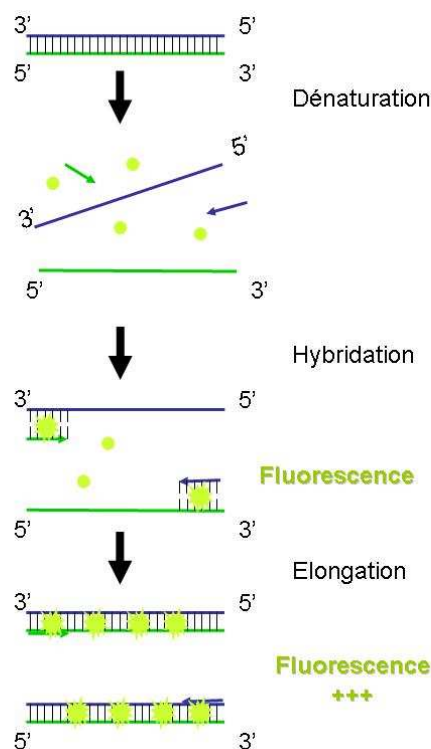
Ajuster le pH à 7,4 puis filtrer sous hotte à l'aide d'un filtre Millipore 0,2 µm stérile.

#### i) Solutions cryoprotectrices :

Dénomination	Cryoprotecteur	Dilution dans l'Alsever
<b>D</b>	DMSO	10 %
<b>EG</b>	Ethylène glycol	10 %
<b>G</b>	Glycérol	10 %
<b>DGE</b>	DMSO	4 %
	Glycérol	4 %
	Ethylène glycol	4 %

#### ✂ PCR quantitative en temps réel (real time qPCR)

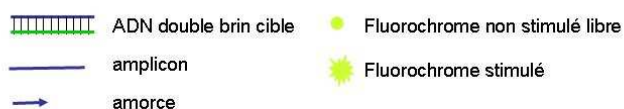
##### j) Principe :



Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorochrome non stimulé et libre.

Après le couplage des amorces, le fluorochrome se lie à l'ADN double brin. Sa liaison à l'ADN se traduit par l'apparition de fluorescence.

Pendant la phase d'élongation, le nombre de molécules de fluorochrome liées à l'ADN double brin augmente provoquant une augmentation de la fluorescence. La fluorescence émise est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle.





## ANNEXE II

### Alignement de séquences protéiques des SGLT1, SGLT2 et SGLT3 humains avec le SGLT de *Crassostrea gigas*.

L'alignement a été réalisé dans le programme Clustalw.

```

SC5A1_HUMA      MDSSTWSPKTTAVTRPVETHELIRNAADISIIIVYFVVVMAVGLWAMFST
SC5A4_HU        MASTVSPSTIAETPEPPPLSDHIRNAADISIVIVYFLVVMVAVGLWAMLKT
SC5A2_HUMA      ---MEEHTEAGSAPEMGAQKALIDNPADILVIAAYFLLVIGVGLWSMCR
AAT44356.1|_sod -----MAVAGTELEWGDILVIIGYFVVVIAVGIASSCRN
                                : .** :*  ***:::.*: :  .

SC5A1_HUMA      NRGTVGGFFLAGRSMVWWPIGASLFASNIGSGHFVGLAGTGAASGIAIGG
SC5A4_HU        NRGTVGGFFLAGRDMAWWPMGASLFASNIGSNHYVGLAGTGAASGVATVT
SC5A2_HUMA      NRGTVGGYFLAGRSMVWWPVGASLFASNIGSGHFVGLAGTGAASGLAVAG
AAT44356.1|_sod -RGSVGGYFLAGRSMHWIPVGLSLFASNIGSGHFVGLAGSGASNGIGVAV
                                ***:::***:***.* * *: * *****.*:*****:***.:.

SC5A1_HUMA      FEWNALVLVVVLGWLFPVIYIKAGVVTMPPEYLKRFRGGQRIQVYLSLLSL
SC5A4_HU        FEWTSSVMLLILGWIFVPIYIKSGVMTMPPEYLKKRFGGERLQVYLSILSL
SC5A2_HUMA      FEWNALFVLLLGLWLFAPVYLTAGVITMPQYLKRFRGGRRIRLYSVLSL
AAT44356.1|_sod FELNAIFILMMLGWLFPVYVAAGVFTMPPEYLKKRFGDSRIRVYLSVLAL
                                ** .: .:::***:***: ***.***:***:***. ***:***:***

SC5A1_HUMA      LLYIFTKISADIFSGAIFINLALG-LNLYLAIFLLLAITALYTITGGLAA
SC5A4_HU        FICVLLISADIFAGAIFIKLALG-LDLYLAIFILLAMTAVYTTTGGGLAS
SC5A2_HUMA      FLYIFTKISVDMFSGAVFIQQALG-WNIYASVIALLGITMIYTVTGGGLAA
AAT44356.1|_sod LLYVFTKISADLFSGALFILRTFKGFDLYLAIILLIIAALFTITGGLTA
                                :: :.  **.*:***:*** ::  :*: ::  ** :: :*: *****

SC5A1_HUMA      VIYTDTLQTVIMLVGSLILTGFAFHEVGGYDAFMEKYMKAIPTIVSDGN-
SC5A4_HU        VIYTDTLQTIIMLIGSFILMGFAFNEVGGYESFTEKYVNATPSVVEGDN-
SC5A2_HUMA      LMYTDTVQTFVILGGACILMGYAFHEVGGYSGLFDKYLGAATSLTVSEDP
AAT44356.1|_sod VIWTDISIQVLIMVIGAFILMVMSFVRVGGYEEVVRFFEAYPNTLLNYN
                                :*:***:*.::: *:*  :* .****. .  :. * ..

SC5A1_HUMA      --TTFQEKCYTPRADSFIHFRDPLTGDLPWPGFIFGMSILTLWYWCTDQV
SC5A4_HU        --LTISASCYTPRADSFIHFRDAVTGDIPWPGIIFGMPITALWYWCTNQV
SC5A2_HUMA      AVGNISSFCYRPRPDSYHLLRHPVTGDLPWPALLGLTIVSGYWWCSDQV
AAT44356.1|_sod NASYPYWKCGIPPENSMNLVRAYDDGSLPWPGGIFFLTISVWYWWCSDQV
                                *  *  :* :.*  *.***:***:*. : *****

SC5A1_HUMA      IVQRCLSAKNMSHVKGGCILCGYLKLMFIMVMPGMISRILYTEKIAACV
SC5A4_HU        IVQRCLCGKDMSHVKAACIMCAYLKLLPMFLMMPGMISRILYTDMAVACV
SC5A2_HUMA      IVQRCLAGKSLTHIKAGCILCGYLKLTMPFLMMPGMISRILYPDEVACV
AAT44356.1|_sod IVQRALAAKNIANVKAGTILAGYLFKFTPLFLVFPGMMSRILFPDTPVGA
                                ****.*..*.:***. *..***: ***:***:***:***:.. :.*.

SC5A1_HUMA      VPSECEKYCGTKVGCTNIAYPPTLVVELMPNGLRGLMLSVMLASLMSSLTS
SC5A4_HU        VPSECVKHCQVDVGCTNYAYPTMVLELMPQGLRGLMLSVMLASLMSSLTS
SC5A2_HUMA      VPEVCRRVCGETEVGCSNIAYPRLVVKLMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLAS
AAT44356.1|_sod DDPICERECGRSGCTNIAYPDLVIEVMPAGLRGLMLSVMMSSALISSLTS
                                *. * : *  ***:*** :*:*** *****:***:***:***

SC5A1_HUMA      IFNSASTLFTMDIYAKVRKRASEKELMIAGRFLFILVLIGISIAWVPIVQS
SC5A4_HU        IFNSASTLFTIDLYTKMRQASEKELLIAGRIFVLLLTVVSIVVWVPLVQV
SC5A2_HUMA      IFNSSSTLFTMDIYTRLRPRAGDRELLLVGRLWVVFIVVSVAWLPVVQA
AAT44356.1|_sod IFNSTSTIFTIDIYKRIRTHANDVELMIVGRCLVVLVVGISIAWIPVVQN
                                *****:***:*** :*: *.: ***:***: :.: :*:.*:***

SC5A1_HUMA      AQSGQLFDYIQSITSYLGPPIAAVFLLAIFWKRVNEPGAFAWGLILGLLIG
SC5A4_HU        SQNGQLIHYTESISSYLGPPIAAVFVLAIFCKRVNEQGAFAWGLMVGLAMG
SC5A2_HUMA      AQGGQLFDYIQAVSSYLAPPVSAVFVLAIFVPRVNEQGAFAWGLIGGLLMG
AAT44356.1|_sod --VSELFHYIAITSFLAPPVCAVYVLAIFWKRTNEPGAFAWGLMIGLVVG
                                .:*. * :*:***.***: ***:***: *.* ***:***: ** :*
```



```

SC5A1_HUMA      ISRMITEFAYGTGSCMEPS-NCPTIICGVHYLYFAIILFAISFITIVVIS
SC5A4_HU        LIRMITEFAYGTGSCCLAPS-NCPKIICGVHYLYFSIVLFFGSMLVTLGIS
SC5A2_HUMA      LARLIPEFSFGSGSCVQPS-ACPAFLCGVHYLYFAIVLFFCSGLLTLTVS
AAT44356.1|_sod LTRFIWEYAYSVPACGESGDNRPDIKKVHYLHFGIILFAIVFFCTIIIS
                : *:* *:.. :* .. * : : *****:*.**** : : :*

SC5A1_HUMA      LLTKPIPDVHLYRLCWSLRNSKEERIDLDAEEENIQEGPKETIEIETQVP
SC5A4_HU        LLTKPIPDVHLYRLCWVLNSTERIDIDAEEKSQEE---TDDGVEEDYP
SC5A2_HUMA      LCTAPIPRKHLHRLVFSLRHSKEEREDLDADEQQGSSLPVQNGCPESAME
AAT44356.1|_sod LLTPPIPEKCLHRLTFWGRFDTAEREDIDAEDQKELEKRKHKVAFKNFA
                * * * * * *:*** : * .. ** *:::::.. .

SC5A1_HUMA      EKKK-----GIFRRAYDLFCGLEQHGA---PKMTEEEEEKAMKMTDTSE
SC5A4_HU        EKSR-----GCLKKAYDLFCGLQKG-----PKLTKEEEELSKKLTDTSE
SC5A2_HUMA      MNEPQAPAPSLFRQCLLWFCGMSRGGVGSPPLTQEEAAAAARRLEDISE
AAT44356.1|_sod HVEE--GQPIYKTALQWICGVEKMEAA--IELTEEQQKALERKQNSIHE
                : . :*:..: :*: : * : . *

SC5A1_HUMA      KPLWRTVLNVNGIILVTVAVFCHAYFA
SC5A4_HU        RPSWRTIVNINAILLLLAVVVFIHGYYA
SC5A2_HUMA      DPSWARVVNLNALLMMAVAVFLWGFYA
AAT44356.1|_sod SKNQKIVTSVNAVILMTLAVFLWGFYA
                : .:*.:::::..** .::*

```



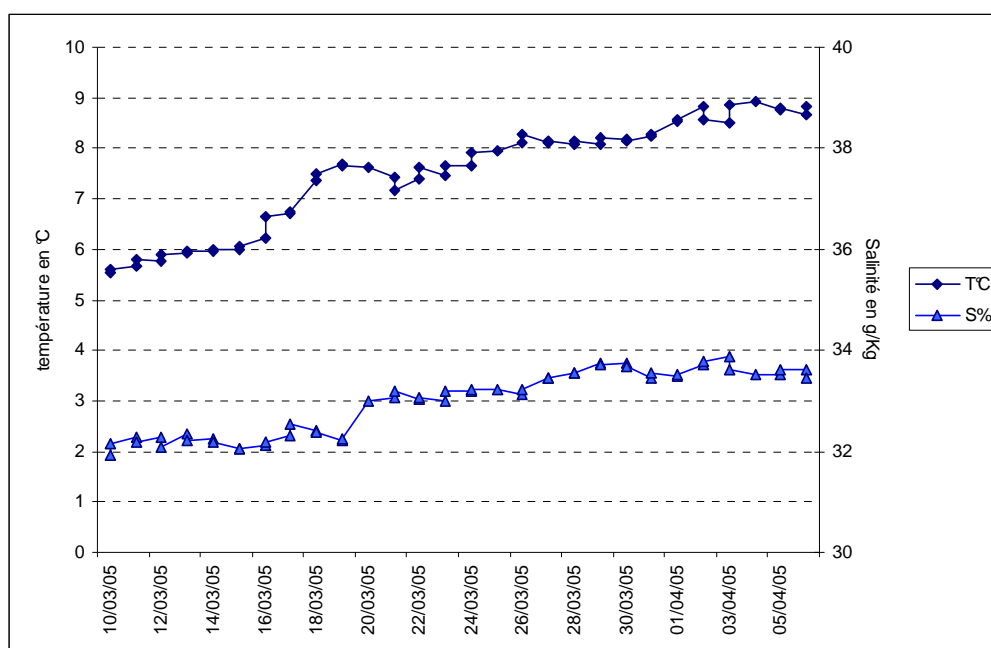
## ANNEXE III

### DONNEES DE TEMPERATURE ET SALINITE

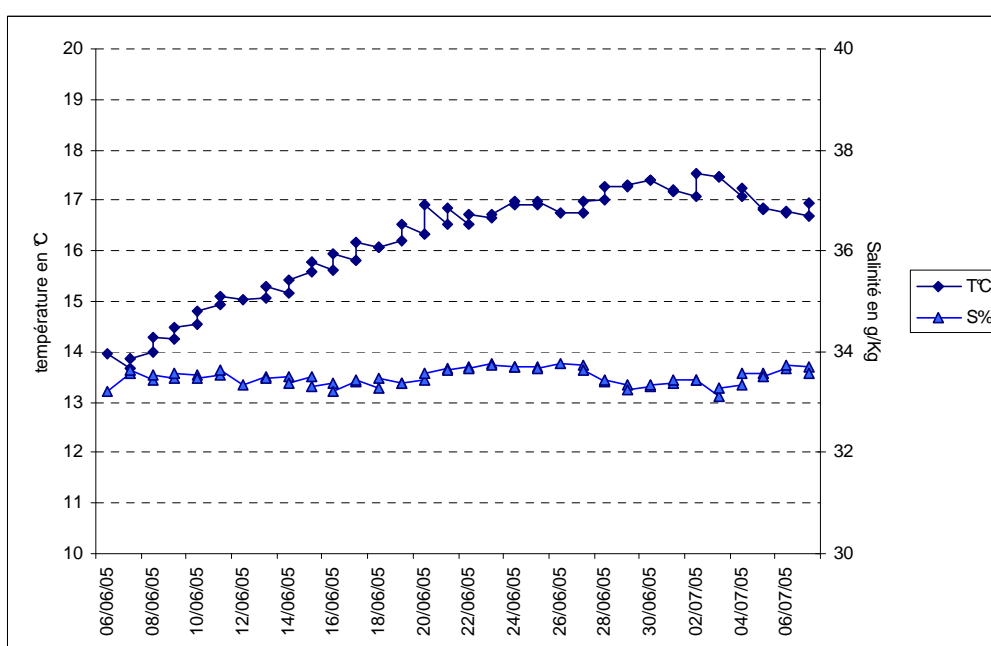
#### Baie des Veys

Les données de température et de salinité ont été enregistrées au moyen de sondes multiparamètres de type TPSO2 Micrel®.

#### ❖ Printemps : Mars-avril 2005

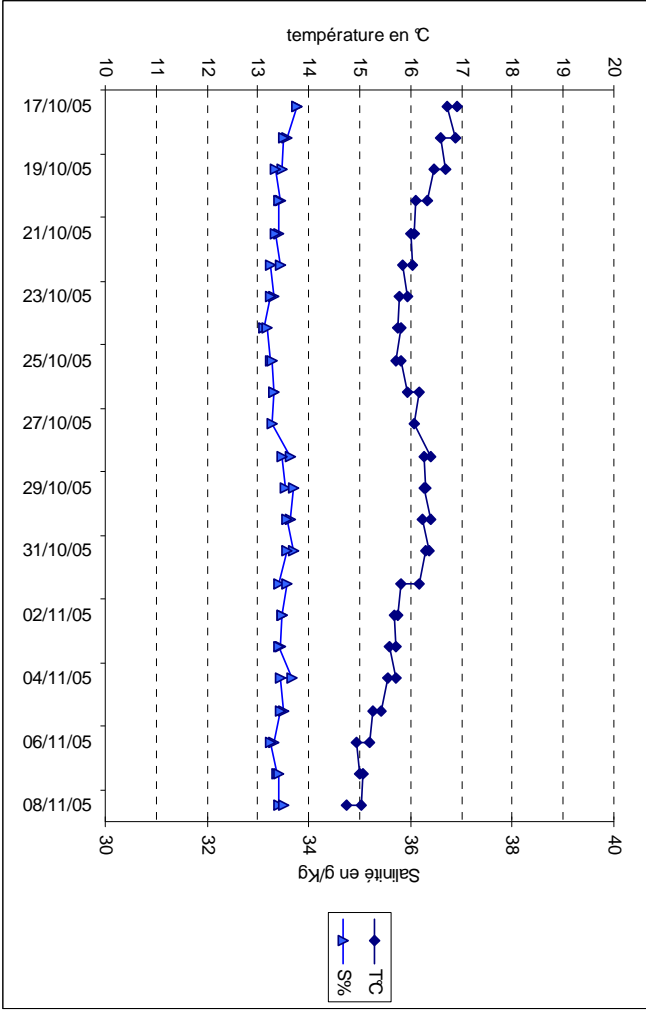


#### ❖ Été : Juin-Juillet 2005



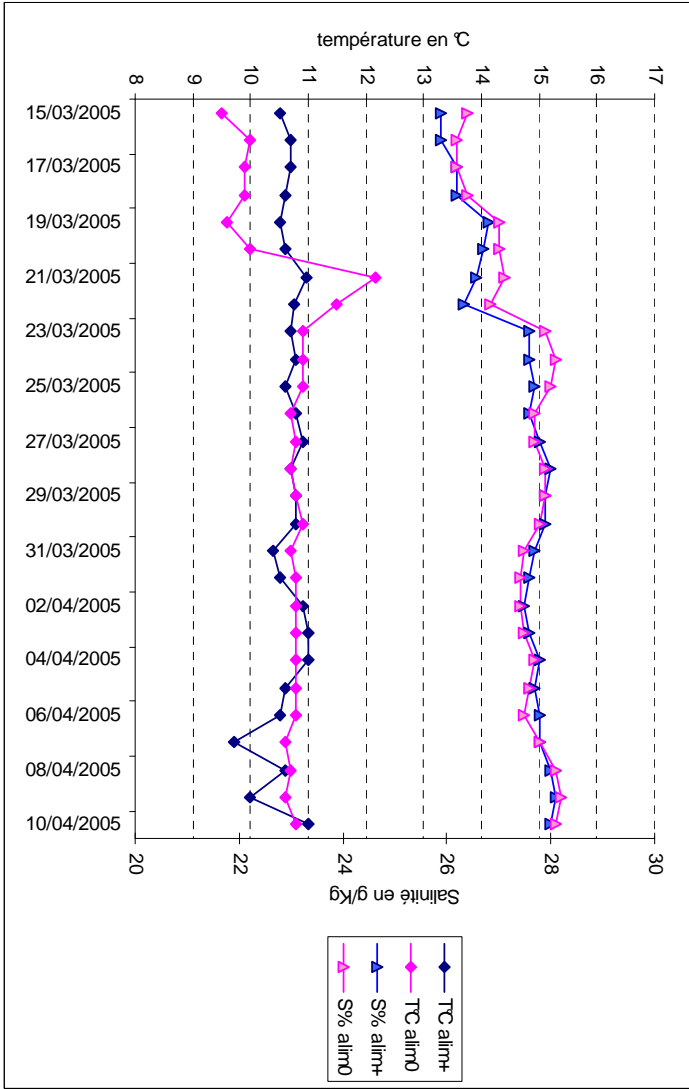


❖ *Automne : Octobre-Novembre 2005*



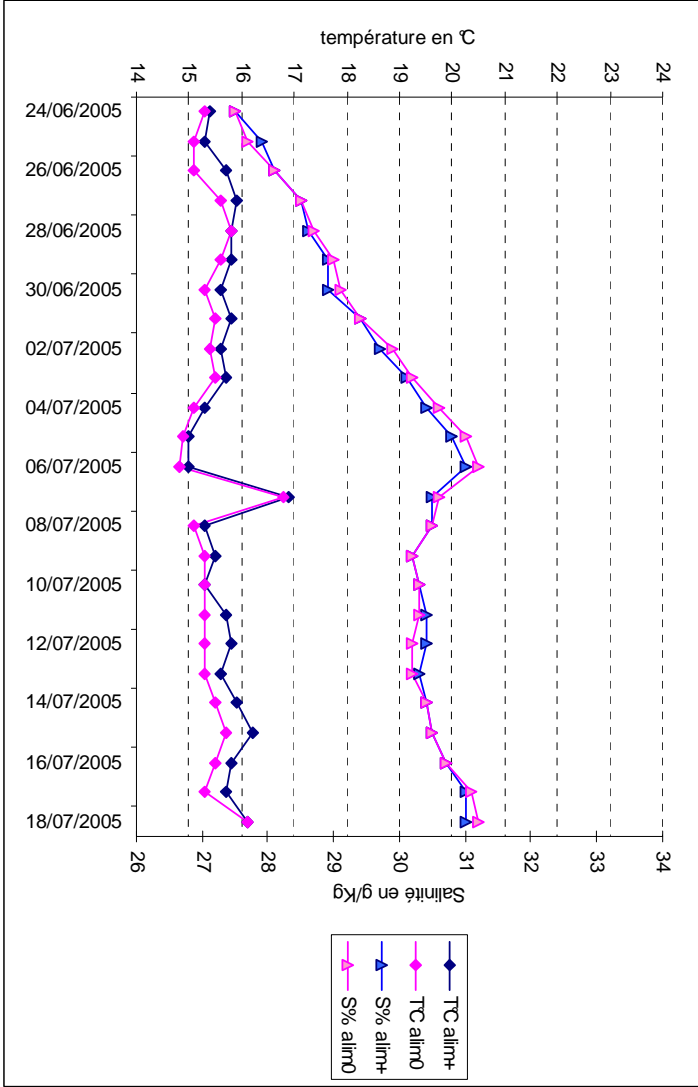
**SYCAMAR**

❖ *Printemps : Mars-avril 2005*

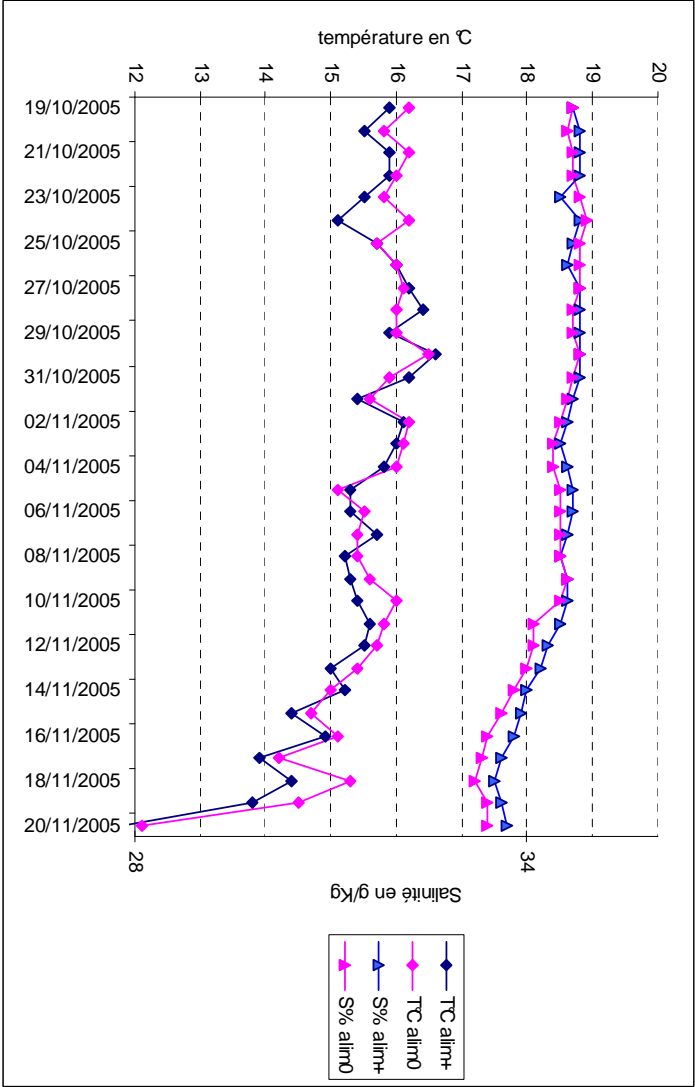




❖ *Eté : Juin-Juillet 2005*



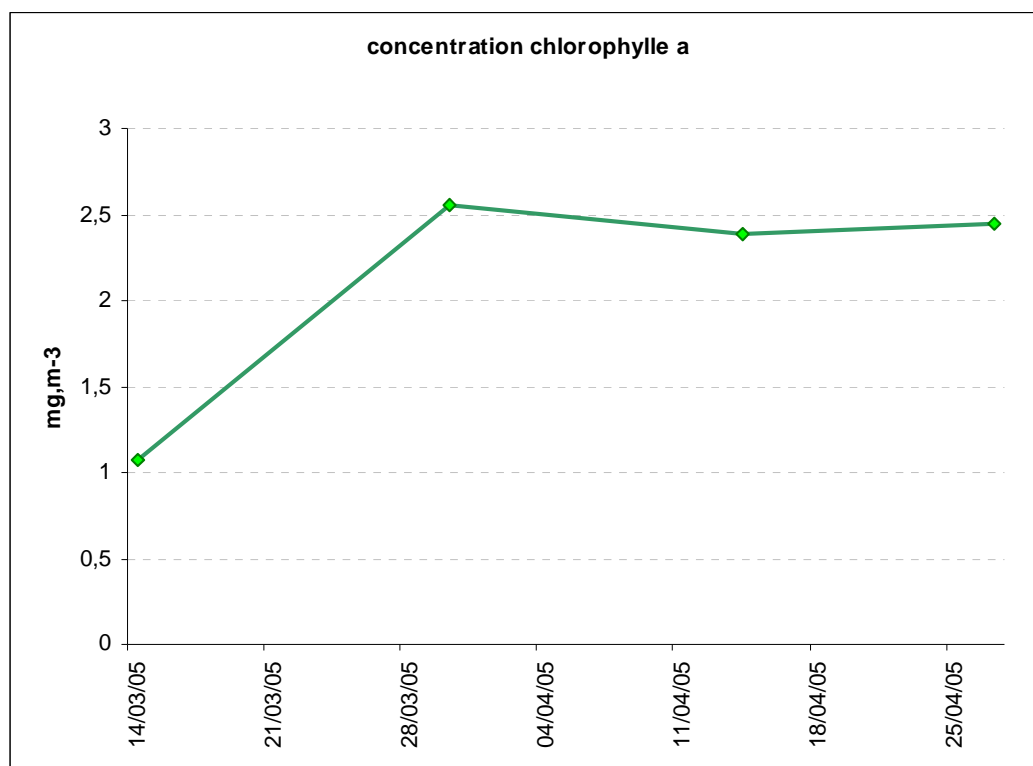
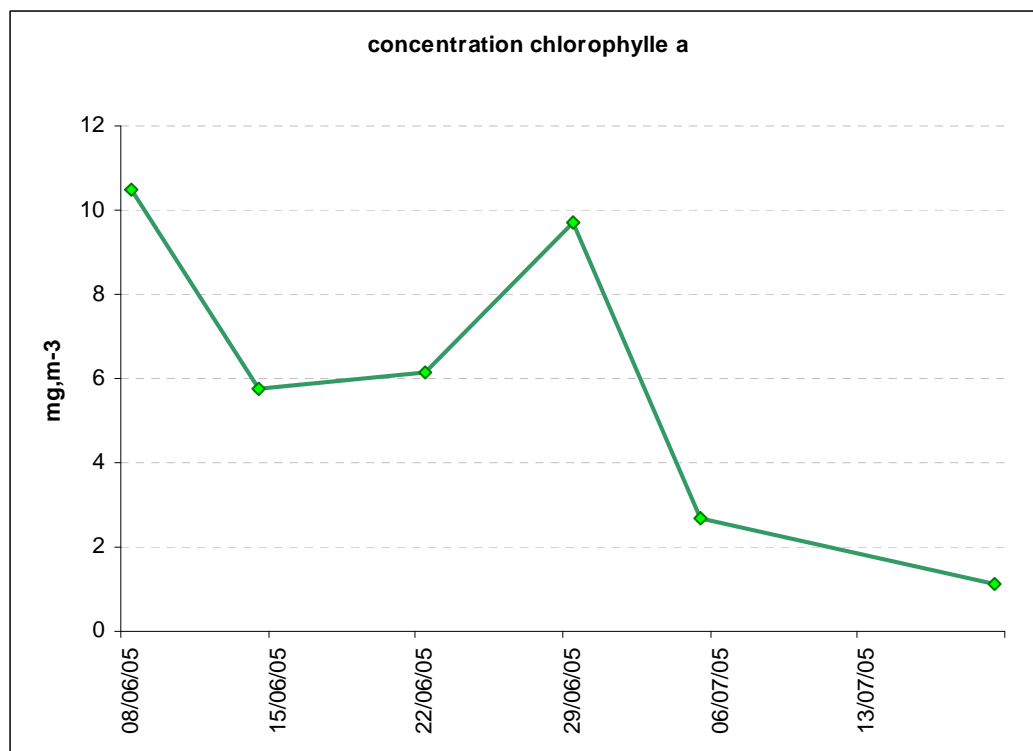
❖ *Automne : Octobre-Novembre 2005*



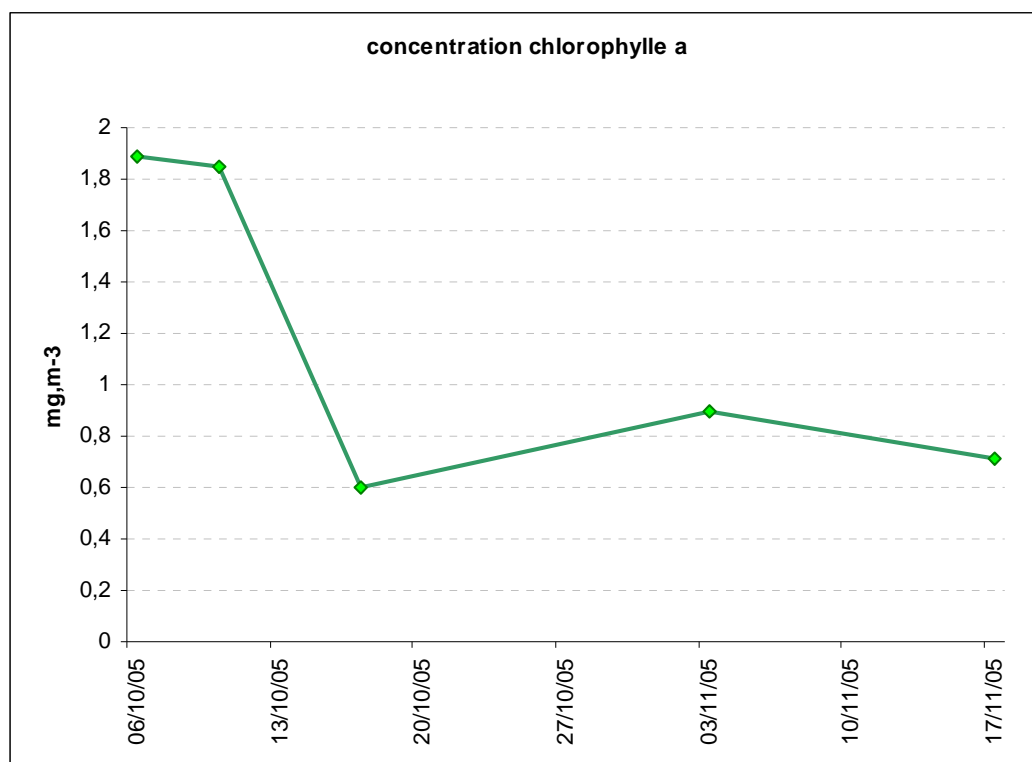
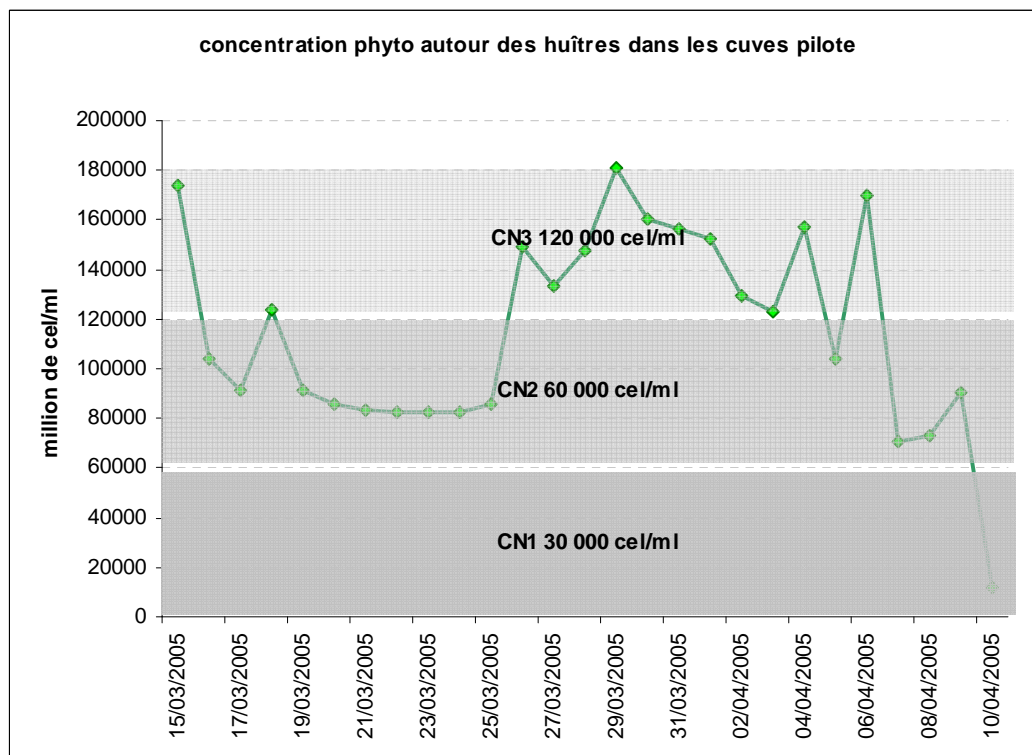


## DONNEES DE PHYTOPLANCTON

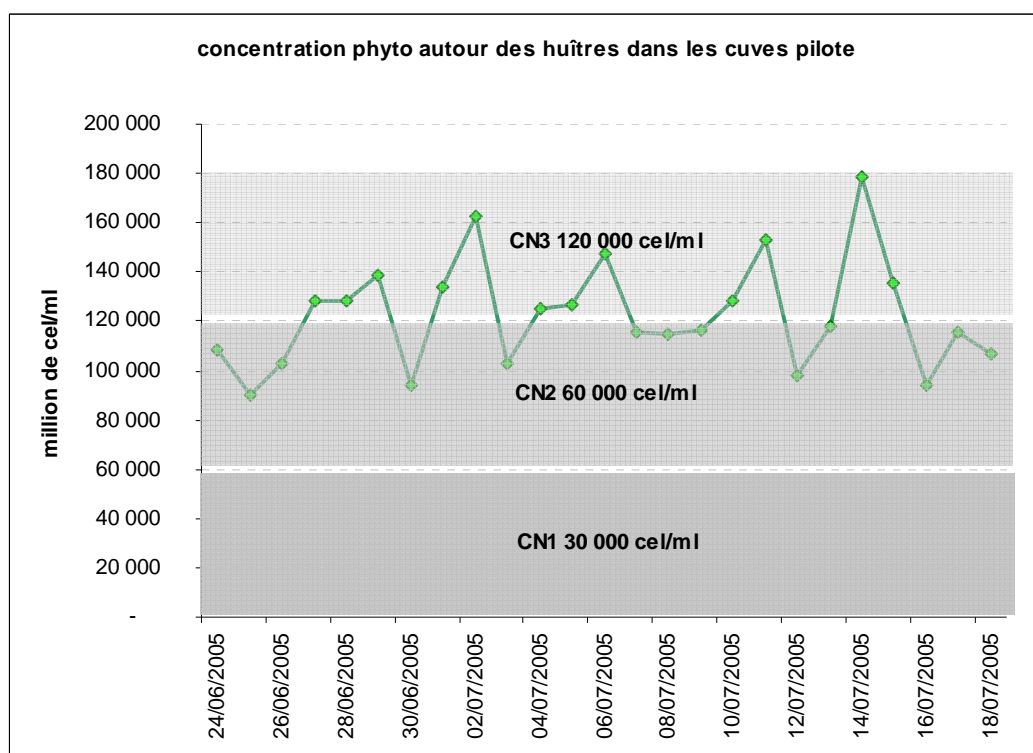
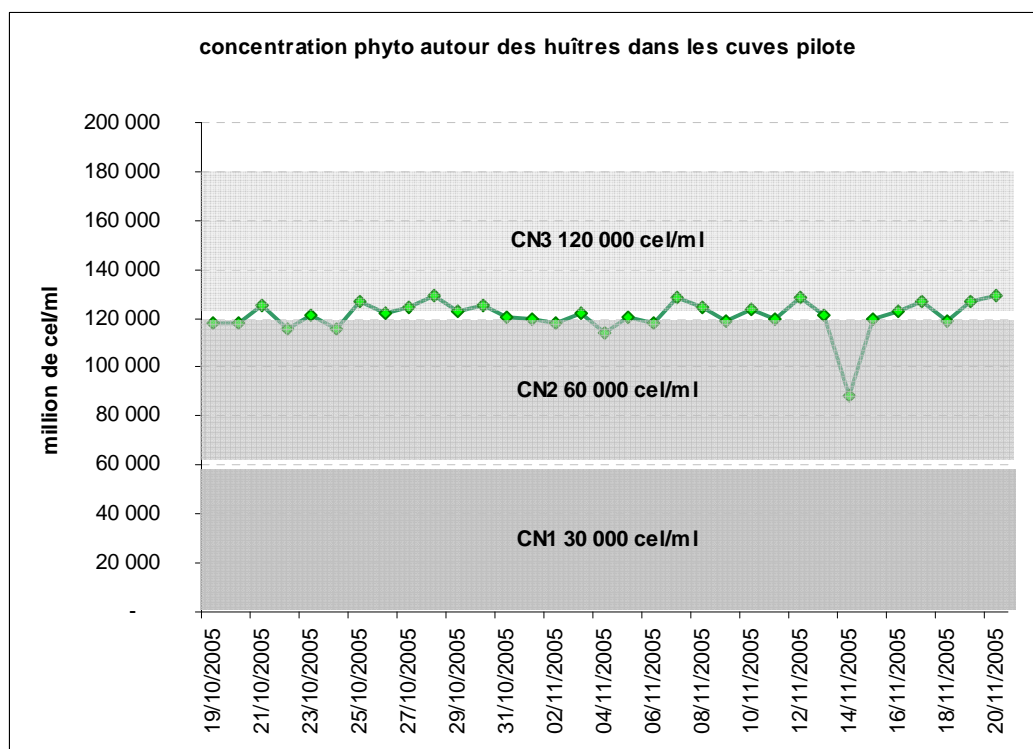
## Baie des Veys

❖ *Printemps : Mars-avril 2005*❖ *Été : Juin-Juillet 2005*



❖ **Automne : Octobre-Novembre 2005****SYCAMAR**❖ **Printemps : Mars-avril 2005**



❖ **Été : Juin-Juillet 2005**❖ **Automne : Octobre-Novembre 2005**



## DONNEES DE MORTALITES

## Baie des Veys

Mortalités moyennes enregistrées en Baie des Veys sur 6 points (SUMO) :

	27/09/2004	12/10/2004	25/10/2004	23/05/2005	07/07/2005	05/08/2005	18/08/2005	05/09/2005	19/09/2005	03/10/2005	17/10/2005	14/11/2005
Mortalité journalière (%/j)	0,00%	0,05%	0,03%	0,00%	0,01%	0,03%	0,02%	0,09%	0,02%	0,07%	0,07%	0,03%
IC95 % MJ	0	0,07%	0,06%	0,00%	0,01%	0,04%	0,04%	0,06%	0,04%	0,04%	0,04%	0,02%
Mortalité cumulée	0,00	0,78	1,13	1,90	2,16	2,93	3,19	4,80	5,12	6,00	6,95	7,81

Lot issu de captage naturel de 24 mois mis à l'eau début 2004, était déjà présent au début du suivi. La mortalité a été mesurée à partir du début de l'expérimentation jusqu'à la fin du suivi 14/11/2005.



## ANNEXE IV

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Cryobiology xxx (2006) xxx–xxx

CRYOBIOLOGY

[www.elsevier.com/locate/jcryo](http://www.elsevier.com/locate/jcryo)

## Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells: Viability and metabolic activity<sup>☆</sup>

A.C. Hanquet-Dufour<sup>a</sup>, K. Kellner<sup>a,\*</sup>, C. Heude<sup>a</sup>, A. Naimi<sup>a</sup>, M. Mathieu<sup>a</sup>,  
J.M. Poncet<sup>b</sup>

<sup>a</sup> UMR PE2M, Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR 100 Ifremer (Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins), Université de Caen, Esplanade de la Paix, F 14032 Caen Cedex, France

<sup>b</sup> Plateau de Cryobiologie, ISBIO, Université de Caen, Esplanade de la Paix, F 14032 Caen Cedex, France

Received 27 July 2005; accepted 29 March 2006

### Abstract

Cryopreservation is widely used for long-term conservation of various tissues, embryos or gametes. However, few studies have described cryopreservation of invertebrate primary cell cultures and more particularly of marine invertebrate somatic cells. This technique would however be of great interest to facilitate the study of various metabolic processes which vary seasonally. The aim of the present study was to develop a protocol for cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells. Different parameters were adjusted to improve recovery of cells after freezing. The most efficient cryoprotectant agent was a mix of Me<sub>2</sub>SO, glycerol, and ethylene glycol (4% each). The optimal cooling rate was  $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$  down to  $-70^{\circ}\text{C}$  before transfer into liquid nitrogen. In these conditions the percentage of viable cells reached 70% of the control. The glucose metabolism of thawed cells was evaluated using radioactive glucose as a tracer. Immediately after thawing, glucose uptake involving membrane transporters was greatly reduced (24% of control) whereas glucose incorporation into glycogen was less affected (68% of control).

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** *Crassostrea gigas*; Oyster; Mollusc; Cryopreservation; Vesicular cells; Glycogen metabolism

Growth and reproductive activity of the oyster *Crassostrea gigas* are mainly supported by glycogen reserves stored in vesicular cells, constituting the storage tissue. This storage tissue is located in the labial palps, the mantle, the gonadal area, at the base of the

gills, and around the digestive gland [3]. Vesicular cells have been the focus of many studies because of their involvement in energetic support of gametogenesis [2,16,20,29,43]. Suspensions of isolated vesicular cells were used for investigation of metabolic activity by in vitro bioassays ( $[^{14}\text{C}]$ glucose uptake and its incorporation into glycogen) [4]. This in vitro approach demonstrated a clear seasonality in glucose metabolism in oysters, inversely correlated with the reproductive cycle, with glycogen storage in autumn and mobilisation of reserves in spring to support

<sup>☆</sup> A.C. Hanquet-Dufour was supported by a grant from the Conseil Régional du Calvados and SMEL (Conseil Général de la Manche).

\* Corresponding author. Fax: +33 2 31 56 53 46.

E-mail address: [kristell.kellner@unicaen.fr](mailto:kristell.kellner@unicaen.fr) (K. Kellner).



gonadal development. In vivo experiments in which labelled glucose was injected into whole animals confirmed the seasonal variations of glycogen metabolism [21]. The seasonal cycle of accumulation and mobilisation of storage products is not strictly correlated with availability of food. It is probably heavily influenced by endocrine regulation in response to the high energy demand associated with reproduction and growth in summer. Identification of the factors involved in this regulation as well as characterisation of the regulatory mechanisms are among our main research objectives. However, this requires testing and comparison of the biological effects of extracts or of potentially active substances from living vesicular cells with metabolic activity oriented both towards the build up of reserves (autumn/winter) and towards mobilisation of reserves (spring/summer). Until present, these effects were by necessity tested on freshly isolated cells at 6 month intervals, but it is obviously problematic to compare the results of totally independent experiments, particularly in animals which exhibit high levels of variation both between individuals and inter-annually. For this reason we envisaged cryopreservation of reference batches of metabolically characterised vesicular cells in liquid nitrogen as a complementary approach which would allow simultaneous testing of regulatory factors in strictly identical experimental conditions. In this manner, analytical biases associated with, for example, variable receptivity of target cells, can be reduced. The feasibility of cryopreservation of these vesicular cells was the object of the present study.

Cryopreservation was developed mainly for long-term storage of vertebrate cells, tissues, and embryos. Few studies have reported successful cryopreservation of molluscan cells. Of these, most involve germinal cells or embryos (Table 1); spermatozoa were successfully cryopreserved in *Crassostrea tulipa*, *Crassostrea virginica*, *C. gigas*, and cryopreservation has been tested on oocytes of *C. gigas*. Embryos and larvae from various species including *C. virginica* and *C. gigas* have also been the subject of attempts at cryopreservation, but several authors have underlined the difficulty of maintaining structure and activity of embryos after thawing [41,6,7,33,27]. Concerning differentiated somatic cells, *C. virginica* and *Pecten maximus* cardiac cells were successfully cryopreserved as were dissociated mantle cells and haemocytes from the gastropod *Helix tuberculata*. For these molluscan cell types, several cryoprotectant agents (CPAs) were used separately or in combination (ethylene-glycol (EG), dimethylsulfoxide (Me<sub>2</sub>SO), and/or glycerol

(G)). The respective efficiency of CPAs seems to be cell type- and/or species-dependent. The freezing protocol also strongly influenced final cell recovery. The cooling rate is one of these critical parameters: slow cooling of cells can reduce the risk of intracellular ice formation. Around the critical subzero temperature, cells are exposed to increased concentrations of solutes that may become toxic and therefore this critical temperature zone should be passed as quickly as possible. However, within the same temperature range, cells require a sufficient time to reduce water content to prevent ice formation. The combination of these two factors will determine the optimal cooling rate in different cryoprotectant agents [30]. Before transfer into LN, cell water content must be low enough to inhibit intracellular ice formation (IIF). Subsequently, the solute and/or the CPA concentration must be sufficiently high to facilitate vitrification on rapid cooling. Therefore, cells must be progressively cooled avoiding ice formation in supercooled internal solutions during transfer to LN. The importance of determining a suitable temperature at which living samples can be transferred into LN without major damages has been demonstrated in a study of cryopreservation of ragworm larvae [36].

Cell recovery from deep freezing is estimated using different tests like the Trypan blue permeation test, the MTT reduction assay, evaluation of protein content (Bradford) or DNA content (Burton test). Recovery of physiological capacities is crucial in cryopreservation processes and the use of in vitro tests allowing measurement of specific metabolic activity is of great importance in this respect. Functional tests based on metabolic activities have occasionally been applied for somatic cells. These tests involved measurement of radioactive precursor incorporation: [<sup>3</sup>H]leucine, [<sup>3</sup>H]thymidine or [<sup>3</sup>H]uridine to evaluate protein, DNA or RNA synthesis, respectively [26,35,39,40].

The present study aimed to define a protocol convenient for freezing oyster vesicular cells with high post-thaw viability levels as estimated by the MTT reduction test. Moreover, we investigated the performance of specific functional properties of these cells by in vitro measurement of glucose uptake and glycogen synthesis.

## Materials and methods

### Animals

Three-year-old Pacific oysters (*C. gigas*) were obtained from a commercial oyster farm in



Table 1

Cryopreservation and molluscan species: cell type, nature of cryoprotectant agent (CPA), and test of viability or cell activity

Species	Cell type	CPA	Test of viability or cell activity	Ref.
<i>Crassostrea tulipa</i>	Spermatozoa	Me <sub>2</sub> SO	Fertility	[50]
<i>Crassostrea virginica</i>	Larvae	Propylene glycol	Survival, growth	[37]
	Spermatozoa	Propylene glycol, Me <sub>2</sub> SO	Fertility	[38,51,22]
	Heart cells	Me <sub>2</sub> SO, glycerol, propylene glycol	MTT	[10]
<i>Crassostrea gigas</i>	Spermatozoa	Me <sub>2</sub> SO	Fertility	[23,48,49]
			Eosine-nigrosine	[24]
		Me <sub>2</sub> SO, trehalose	Fertility	[1,31]
		Ethylene glycol		[25]
		Propylene glycol		[5]
	Spermatozoa 2n	Glycerol	Comet assay	[17]
		Me <sub>2</sub> SO	Fertility	[14]
	Oocytes	Me <sub>2</sub> SO	Fertility	[9]
		Glycerol		[33]
	Embryos	Propylene glycol, glycerol	Viability	[19]
		Ethylene glycol, Me <sub>2</sub> SO	Embryonic development	[6]
		Me <sub>2</sub> SO, ethylene glycol		[28]
		Me <sub>2</sub> SO		[7]
		Propanediol, methanol		[42]
		Sucrose		[33,41]
	Larvae	Me <sub>2</sub> SO	Development	[33]
			Viability	[47,48]
<i>Pinctada fucata</i>	Larvae	Me <sub>2</sub> SO	Viability	[11]
<i>Pecten maximus</i>	Heart cells	Me <sub>2</sub> SO	Trypan blue, Bradford, [ <sup>3</sup> H]Thymidine incorporation, [ <sup>14</sup> C]Leucine incorporation	[26]
	Embryos	Ethylene glycol, propanediol, methanol, Me <sub>2</sub> SO, glycerol, sucrose	Viability	[42]
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Embryos	Ethylene glycol, propanediol, methanol, Me <sub>2</sub> SO, glycerol, sucrose	Viability	[42]
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Primary culture	Me <sub>2</sub> SO, glycerol,	Trypan blue	[34]
	Embryo cells, digestive gland cells	Trehalose	[ <sup>3</sup> H]Uridine incorporation	[35]
<i>Mytilus trossulus</i>	Primary culture	Me <sub>2</sub> SO	[ <sup>3</sup> H]Uridine incorporation	[34]
	Mantle, gills, muscles			[35]
<i>Mytilus edulis</i>	Embryos	Me <sub>2</sub> SO	Viability	[45]
<i>Meretrix lusoria</i>	Embryos	Me <sub>2</sub> SO	Development	[7]
<i>Haliotis tuberculata</i>	Mantle cells	Me <sub>2</sub> SO, glycerol	MTT, Bradford, Burton test	[39]
	Haemocytes	Ethylene glycol	Alkaline phosphatase activity, [ <sup>3</sup> H]Leucine incorporation	[40]
<i>Haliotis diversicolor</i>	Spermatozoa	Me <sub>2</sub> SO, glucose	Fertility	[46]
		Me <sub>2</sub> SO		[18]

Saint-Vaast-la-Hougue (Normandy, France). Oysters were always used within 24 h of reception.

#### Preparation of vesicular cell suspensions

Oysters (36 animals) maintained in ice during dissection were opened and thoroughly rinsed with sterile seawater. The labial palps containing vesicular cells were dissected, rinsed three times in sterile seawater

and then once in Leibovitz culture medium [Leibovitz L15 (1.5%; NaCl 340 mM, KCl 50 mM, Hepes 20 mM, pH 7.4, 1100 mOsm, filtered on a Millipore 0.22 µm filter) supplemented with antibiotics (streptomycin 70 µM, penicillin 170 µM). The dissociation was performed as previously described by Berthelin et al. [3]. Briefly, tissues were minced with scissors and cells were dissociated by mechanical stirring associated with enzymatic treatment (collagenase 0.1% wt/



vol). Cells were then filtered through a 100 µm nylon mesh and rinsed in Leibovitz medium containing antibiotics. They were then pelleted by centrifugation (80g, 30 min, 15 °C) before re-suspending in fresh culture medium at the chosen cell concentration.

#### Freezing of cells

Cell suspensions ( $50 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>) were pipetted into 1.8 ml cryotubes (0.6 ml per tube). An equal volume of cryoprotectant solution was added at room temperature using the following stepwise additions to reach for each cryoprotectant agent the specific 1× final concentrations detailed in Table 2: 0.20×, 10 min; 0.40×, 5 min; 0.65×, 5 min; and 1×, 10 min. Cryoprotectant solutions were prepared by diluting CPA in modified Alsever's solution (MAS: sodium citrate 27 mM, EDTA 12 mM, sodium chloride concentration was adjusted so as to prevent cells from being exposed to an osmolarity exceeding 2.2 Osm kg<sup>-1</sup>) according to Table 2. Samples were then submitted to freezing procedures using a controlled-rate cooler (IMV-CryoBio-System, L'Aigle, France). The freezing protocols included three phases: a stepwise first step cooling from ambient temperature to the melting temperature of each considered cryoprotectant solution, a seeding procedure, and a second stepwise cooling down to the final holding temperature before transferring into LN.

A series of controls was set up to measure the toxicity of each CPA and the effect of cryoprotectant treatment on frozen cell viability. Three different cooling rates were applied to the cells: -1, -3, and -5 °C min<sup>-1</sup> (classically used for mollusc somatic cells [26,40]). Samples were transferred to liquid nitrogen at various final temperatures: -30, -50 or -70 °C.

#### Thawing of cells

After storage periods ranging from 2 days to 7 days, samples were extracted from LN and thawed by immersing in a 37 °C water bath until the last ice crystal disappeared (approximately 90 s). Cryoprotectant agents were then diluted in MAS using the following

stepwise decreasing concentration (initial 1× concentration for each CPA was reported in Table 2): 0.8×, 3 min; 0.6×, 3 min; 0.4×, 5 min; and 0.1×, 10 min. Cells were then centrifuged (80g, 30 min at 15 °C), the supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in sterile Leibovitz medium containing antibiotics.

#### MTT reduction assay

A test based on the mitochondrial enzymatic reaction with (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT (Sigma) as a substrate and adapted to molluscan cells [32,12] was used to evaluate cell viability. Five hundred microlitres of cells suspension ( $5 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>) were incubated in a 24-well plate with 1/10 (vol:vol) MTT solution (1, 2 mM in culture medium) for 24 h at 15 °C. An equal volume of isopropanol containing 0.04 N HCl was then added to each well and after 30 min agitation, absorbance was measured at a wavelength of 570 nm, with a reference at 630 nm. Each value is the mean of three replicates and results were analysed using a Student's test.

#### [U-<sup>14</sup>C]Glucose uptake into vesicular cells

Five hundred microlitres of cell suspension was incubated in 24-well culture plates with 50 µl [U-<sup>14</sup>C]glucose (0.5 µCi) (MP-Biomedicals) and 50 µl of unlabelled D-glucose (0.5 mM in final concentration). After 3 h incubation at 15 °C, [<sup>14</sup>C]glucose uptake was stopped by addition of 300 µl of 20 mM glucose. Cells were centrifuged (80g, 10 min at 15 °C), rinsed three times in Leibovitz medium containing glucose (20 mM), then dispersed in 200 µl perchloric acid (15% vol:vol in distilled water). The radioactivity was measured using a scintillation counter (Packard®) with internal quenching correction.

Controls were stopped immediately after labelled glucose addition and negative controls without cells or without tracer were also performed. Each value is the mean of six replicates and results were analysed using a Student's test.

#### [U-<sup>14</sup>C]Glucose incorporation into glycogen of vesicular cells

This protocol was previously described by Berthelin et al. [3] for the same cell type. Briefly, 500 µl of cell suspensions were incubated in 5 ml sterile tubes with 50 µl of [U-<sup>14</sup>C]glucose (0.5 µCi) (MP-Biomedicals) and 50 µl of unlabelled D-glucose (at a final

Table 2  
Composition of the different cryoprotectant solutions

Designation	Cryoprotectant agent	Dilution in MAS (%)
D	Me <sub>2</sub> SO	10
G	Glycerol	10
E	Ethylene glycol	10
DGE	Me <sub>2</sub> SO	4
	Glycerol	4
	Ethylene glycol	4



concentration of 0.5 mM). After 20 h incubation at 15 °C, cells were centrifuged (10,000g, 10 min). Three hundred microlitres of the glycogen-containing supernatant was precipitated with ethanol (with 10 mg of unlabelled glycogen as a carrier) and the glycogen was recovered by centrifugation (2500g for 10 min). After three washes in absolute ethanol containing D-glucose (0.1 M), the pellet was air dried and re-suspended in 500 µl distilled water before counting using a scintillation counter (Packard®).

Standards were stopped immediately after radioactive glucose addition and negative controls without cells or without tracer were also performed. Each value is the mean of six replicates and results were analysed using a Student's test.

## Results

### Toxicity of CPA treatments

Cell viability (MTT reduction assay) was measured in unfrozen dissociated cells previously treated with each cryoprotectant solution to evaluate their putative harmful effects. Results were expressed in % viability relative to untreated cells. As shown in Fig. 1, MTT values varied according to the CPA. The maximal cell loss was observed with glycerol (MTT activity decreased by  $46.9 \pm 1.6\%$ ). The toxic effect of Me<sub>2</sub>SO (D) and ethylene glycol (E) treatments was less important ( $36.5 \pm 0.4\%$  and  $28.8 \pm 0.5\%$ , respectively) whereas Me<sub>2</sub>SO–glycerol–ethylene glycol (DGE) appeared significantly less harmful ( $20.3 \pm 1.2\%$ ) ( $P < 0.05$ ).

### Thawed cell recovering

Cell recovery after thawing was estimated by the ratio of cells surviving after freezing and thawing

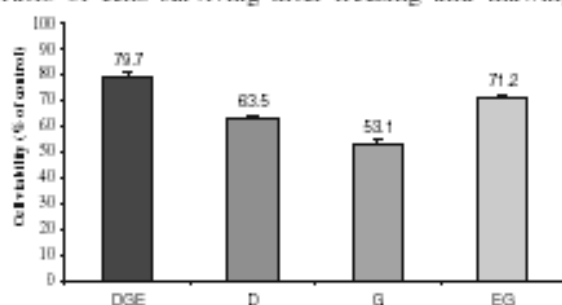


Fig. 1. Toxicity of CPA treatments estimated by the MTT reduction assay in treated unfrozen cells versus untreated control (expressed in percentage of control). Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three replicates.

(MTT test) in comparison with CPA-treated cell viability before freezing. Fig. 2 illustrates the respective ability of the four CPA treatments to prevent cells from cooling injury: glycerol 10% was the most efficient CPA in this respect ( $91.5 \pm 5.2\%$ ) whereas the other cryoprotectant solutions were slightly less efficient (recovery rate ranging from  $63.7 \pm 4.0\%$  for DGE to  $72 \pm 0.64\%$  with EG).

### Effects of cooling rate

Three different cooling rates, low ( $-1^\circ\text{Cmin}^{-1}$ ), intermediate ( $-3^\circ\text{Cmin}^{-1}$ ), and high ( $-5^\circ\text{Cmin}^{-1}$ ) were applied during the freezing procedure using DGE (the least toxic cryoprotectant solution) and glycerol (the most efficient cryoprotectant) down to a temperature of transfer into liquid nitrogen fixed at  $-50^\circ\text{C}$ . Results are shown in Fig. 3 with unfrozen cells re-suspended in MAS as the control. For DGE treatment, the low cooling rate ( $-1^\circ\text{Cmin}^{-1}$ ) induced a significant improvement in cell recovery reaching  $84.4 \pm 10.4\%$ . The recovery of cells subjected to the other cooling rates was significantly lower ( $57.6 \pm 9.5\%$  and  $57.1 \pm 9.1\%$ , respectively, for  $-3^\circ\text{Cmin}^{-1}$  and for  $-5^\circ\text{Cmin}^{-1}$ ). With glycerol treatment, whatever the cooling rate, the percentage of cell survival never exceeded 53%.

### Effects of the final cooling temperature before plunging into LN

Vesicular cells treated with DGE were cooled ( $-3^\circ\text{Cmin}^{-1}$ ) down to three distinct temperatures before transferring into LN. The effect on cell recovery of each transfer temperature is presented in Fig. 4 with unfrozen cells treated with MAS as the

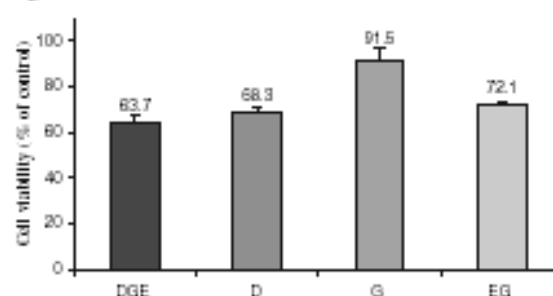


Fig. 2. Cell recovery after thawing. For each CPA treatment, cells were cooled at  $3^\circ\text{Cmin}^{-1}$  down to  $-50^\circ\text{C}$  before transfer into LN. The efficiency was estimated by the MTT reduction assay after freezing and thawing (expressed in percentage of CPA treated unfrozen cells). Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three replicates.



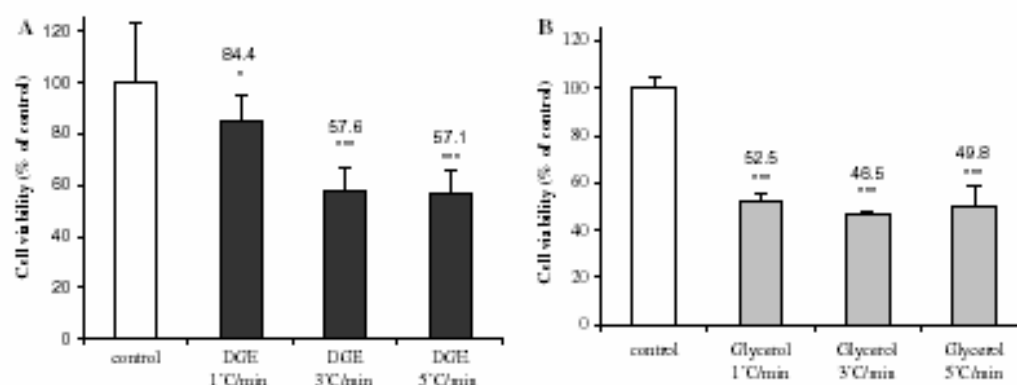


Fig. 3. Effect of the cooling rate ( $-1$ ;  $-3$ ;  $-5$  °C min $^{-1}$ ) using (A) DGE or (B) glycerol as CPA. Cell viability was estimated with the MTT reduction assay and expressed as % of unfrozen MAS treated cells. Samples were cooled down to  $-50$  °C before transfer into LN. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of five replicates. Significant differences from the control cell are indicated: +  $P < 0.05$ ; ++  $P < 0.01$ ; +++  $P < 0.001$  (Student's test).

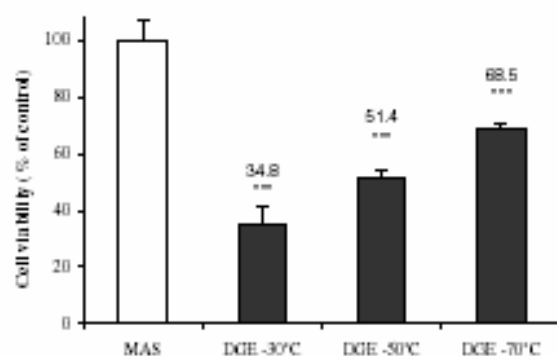


Fig. 4. Effect of final cooling temperature before transfer into LN with DGE as CPA. Three temperatures were compared ( $-30$ ,  $-50$ , and  $-70$  °C) at the intermediate cooling rate  $-3$  °C min $^{-1}$  and survival was estimated according to the MTT reduction assay. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of five replicates. Significant differences from MAS treated cells are indicated: +  $P < 0.05$ ; ++  $P < 0.01$ ; +++  $P < 0.001$  (Student's test).

control. The lowest transfer temperature ( $-70$  °C) led to the greatest recovery ( $68.5 \pm 2.2\%$ ) whereas cell viability decreased at  $-50$  °C ( $51.4 \pm 2.9\%$ ) and even more so at  $-30$  °C ( $34.8 \pm 6.5\%$ ).

#### Metabolic activity of cryopreserved vesicular cells

Glucose uptake and glucose incorporation into glycogen were compared before and after freezing of vesicular cells in the optimal conditions presented above (DGE treatment, cooling rate of  $-1$  °C min $^{-1}$  down to  $-70$  °C). Results are expressed in percentage of metabolic activity relative to unfrozen untreated cells (Fig. 5). The capacity of glucose

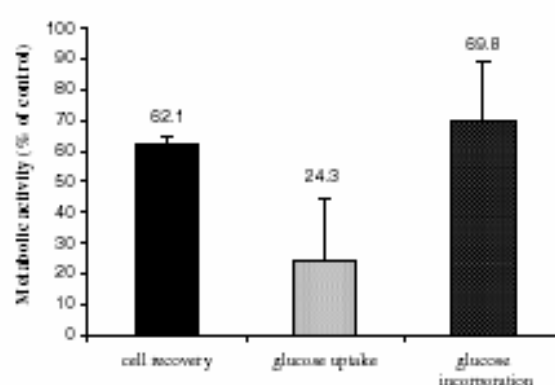


Fig. 5. Metabolic activity of thawed cells ( $-1$  °C min $^{-1}$ , DGE treatment, and transfer into LN at  $-70$  °C) estimated by glucose uptake into vesicular cells, and glucose incorporation into glycogen. Results are expressed in % of untreated cells.

uptake was significantly reduced after thawing ( $24.3 \pm 19.7\%$  of the initial activity for surviving cells) whereas incorporation seemed to be less affected ( $69.8 \pm 29.2\%$ ). Cell viability versus the MAS control ( $62.1 \pm 2.3\%$ ) confirmed the expected value.

#### Discussion

To understand the glycogen metabolism of the oyster *C. gigas* in relation with seasonal reproductive activity, we have developed a vesicular cell enrichment procedure based on moderate enzymatic dissociation of labial palps. Such cell suspensions have permitted in vitro measurement of [ $^{14}$ C]glucose uptake (Hanquet-Dufour et al., in preparation) and



incorporation into glycogen [4]. Nevertheless, the difficulty in undertaking studies of seasonal variations of glycogen storage and metabolism led us to envisage the banking of homogenous pools of vesicular cells in LN.

Little information is available about cryopreservation of marine invertebrate somatic cells, however it is widely accepted that the addition of cryoprotectant agents is essential to protect cells from freezing injury. The concentrations of CPAs required in cryopreservation procedures may cause severe toxic effects to cells. For molluscan somatic cells, different CPAs have been tested. Among these agents, glycerol,  $\text{Me}_2\text{SO}$ , and ethylene glycol were the most commonly used and the most efficient CPA concentration was close to 10% [10,26,34,39,40]. We therefore tested the ability of these CPAs to protect vesicular cells from cryoinjury. Combinations of two or more CPAs are assumed to be less toxic than a single-CPA solution because the concentration of any one component is then decreased [8]. Moreover, it is known that the toxic activity of  $\text{Me}_2\text{SO}$  can be decreased by acetamide [15]. Indeed, in embryos of *C. gigas*, biochemical toxicity of  $\text{Me}_2\text{SO}$  has been mitigated by dimethylacetamide [6]. To define a cryoprotectant solution as harmless as possible, a combination of three CPAs (4% vol:vol of each in final concentration) was tested.

Since toxicity of CPAs is known to vary with cell type, a necessary preliminary step to define a successful cryopreservation protocol was to determine the tolerance to the selected cryoprotectant treatments. Using the metabolic MTT test to estimate cell viability, we first compared the effect of cryoprotectant agents on dissociated cells without freezing. Cell viability varied from 53% with G to 80% with DGE. Toxicity was significantly different between cryoprotectant treatments and glycerol was the most harmful, as was previously observed with *C. gigas* spermatozoa [23]. As expected, DGE was found to be the least toxic treatment for vesicular cells. Chao et al. [6] reported a significant reduction in toxicity to oyster embryos by the addition of glucose. Carbohydrates such as sucrose and especially trehalose have also been shown to protect cell membranes during cooling [44]. These disaccharides were successfully used for the cryopreservation of spermatozoa of the Pacific oyster [48,1]. However, addition of glucidic substances would interfere with glycogen metabolism and therefore this method was not used in this study.

In the second step of our study, the cryoprotective efficiency of each treatment (the ratio of survival rates after freeze-thawing and in unfrozen controls, both after CPA treatment) was compared. The results revealed that glycerol was significantly more effective than the three other treatments. However, when compared to untreated control cells, the survival rate dramatically decreased to  $48.6 \pm 2.8\%$  and was in fact lower than DGE treatment ( $50.8 \pm 19.0\%$ ) which was significantly less toxic. The relatively low survival rates are not surprising given that cell viability was estimated with a metabolic test based on mitochondrial activity. Poncet and Lebel [40] observed strong variations in *H. tuberculata* haemocyte viability according to the estimation method and showed that the survival percentages obtained with the MTT test (ranging from 30 to 75%) were generally lower than those obtained by protein or DNA content tests.

The optimal cooling rate should be a compromise between sufficient cell dehydration to prevent IIF and limited solute effects and pH variations. Optimizing cooling rate is essential to obtain the best cell survival. With DGE as the cryoprotectant treatment, the survival of vesicular cells is strongly influenced by the cooling rate. The slowest rate ( $-1^\circ\text{Cmin}^{-1}$ ) led to a final recovery rate reaching  $84.4 \pm 10.2\%$  compared to the unfrozen control, significantly higher than when cooled at  $-3^\circ\text{Cmin}^{-1}$  or  $-5^\circ\text{Cmin}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ). These data are in agreement with the assumption that slow cooling is required for cells having a low surface/volume ratio [13]. Such a cooling rate has also been applied to heart cells of *P. maximus* [26] and to haemocytes of *H. tuberculata* [40].

The lower the temperature before transferring into LN, the more dehydrated the cell should be. Therefore, this parameter may greatly influence the cryopreservation success, as shown by Cheng et al. [10] on heart cells of the oyster *C. virginica*. In our case, the optimal temperature of transfer in liquid nitrogen was the lowest ( $-70^\circ\text{C}$ ). This is in accordance with the transfer temperature used for the cryopreservation of other molluscan somatic cells, such as heart cells of *P. maximus* [26] or of *C. gigas* [10].

The optimal conditions for cryopreservation of vesicular cells were found to be: cryoprotective treatment consisting of a combination of  $\text{Me}_2\text{SO}$  (4%), glycerol (4%), and ethylene glycol (4%), a cooling rate of  $-1^\circ\text{Cmin}^{-1}$  down to  $-70^\circ\text{C}$  before transferring into LN. In these conditions,



the survival rate estimated by the MTT reduction test was about 70% (taking into account cell mortality and loss of cells during thawing and CPA-diluting procedures). However, cell viability varied slightly through the year (from 60 to 75%) probably due to the physiological state of vesicular cells which appeared to be more sensitive when they were larger and fully loaded with glycogen reserves.

The metabolic activity of the cryopreserved vesicular cells was also investigated by measuring cellular uptake of glucose and glucose incorporation into glycogen. Glucose uptake into surviving cells was drastically affected (only 24.3% of initial activity) by the freeze-thawing. This loss of activity suggests that cryopreservation affected the organisation of the cell membrane and disturbed the functioning of glucose transporters just after thawing. It would be interesting to verify if this disorganisation is definitive (glucose uptake was measured over 3 h just after thawing) or if glucose uptake could recover after a period in standard culture conditions. The addition of trehalose (which may stabilize cell membranes) to the cryoprotective solution may also be considered. The fact that glucose incorporation into glycogen (measured over a 24 h period) of thawed cells was less affected (68% of the initial activity) may confirm the hypothesis of temporary damage of transporters. Glycogen synthesis involves intracellular enzymes that may not be disturbed to the same extent as membrane components.

Our results confirm the possibility of successfully cryopreserving *C. gigas* somatic cells. However, this technique may not be suitable for investigating seasonal variations in glycogen metabolism given the reduction of glucose uptake after thawing.

## Acknowledgments

The authors would like to thank I. Probert for his expert linguistic guidance. A.C. Hanquet-Dufour was supported by a grant from the Conseil Régional du Calvados and SMEL (Conseil Général de la Manche).

## References

- [1] S.L. Adams, J.F. Smith, R.D. Roberts, A.R. Janke, H.P. Kasper, H.R. Tervit, P.A. Pugh, S.C. Webb, N.G. King, Cryopreservation of sperm of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): development of the practical method for commercial spat production, *Aquaculture* 242 (2004) 271–282.
- [2] B.L. Bayne, B. Bubel, P.A. Gabbott, D.R. Livingstone, D.M. Lowe, M.N. Moore, Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* (L.), *Mar. Biol. Lett.* 3 (1982) 89–105.
- [3] C. Berthelin, K. Kellner, M. Mathieu, Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells, *Mar. Biotechnol.* 2 (2000) 136–145.
- [4] C. Berthelin, K. Kellner, M. Mathieu, Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France), *Comp. Biochem. Physiol.* 125B (2000) 359–369.
- [5] S. Bougrier, L.D. Rabenold, Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, *Aquaculture* 58 (1986) 277–280.
- [6] N.H. Chao, C.P. Chiang, H.W. Hsu, C.T. Tsai, T.T. Lin, Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants, *Aquat. Living Resour.* 7 (1994) 99–104.
- [7] N.H. Chao, T.T. Lin, Y.J. Chen, H.W. Hsu, I.C. Liao, Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam, *Aquaculture* 155 (1997) 31–44.
- [8] N.H. Chao, I.C. Liao, Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos, *Aquaculture* 197 (2001) 161–189.
- [9] C.P. Chen, H.W. Hsu, S.F. Lei, C.H. Chang, Preliminary study on the cryopreservation of Pacific oyster oocytes, *J. Fish. Soc. Taiwan* 16 (1989) 197–201.
- [10] T.C. Cheng, J.F. La Peyre, J.T. Buchanan, T.R. Tiersch, R.K. Cooper, Cryopreservation of heart cells from the eastern oyster, *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 37 (2001) 237–244.
- [11] Y.H. Choi, Y.J. Chang, Influence of cooling rate, developmental stage, and the addition of sugar on the cryopreservation of larvae of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*, *Cryobiology* 45 (2003) 190–193.
- [12] I. Coulon, Mise au point d'un système contrôle de culture de cœur d'huître *Crassostrea gigas*. Application au test de la toxicité des produits chimiques en milieu aquatique. Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon (1993).
- [13] R.S. Denniston, S. Michelet, R.A. Godke, Principles of cryopreservation, in: T.R. Tiersch, P.M. Mazik (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2000, pp. 59–74.
- [14] Q. Dong, B. Eudeline, C. Huang, S.K. Allen, T.R. Tiersch, Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, *Cryobiology* 50 (2005) 1–16.
- [15] G.M. Fahy, The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology, *Cryobiology* 23 (1986) 1–13.
- [16] P.A. Gabbott, M.A. Whittle, Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L. II. Seasonal changes in glycogen content and glycogen synthetase activity in the mantle tissue, *Comp. Biochem. Physiol.* 83B (1985) 197–207.
- [17] J.C. Gwo, C.Y. Wu, W.S. Chang, H.Y. Cheng, Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay, *Cryo Letters* 24 (2003) 171–180.
- [18] J.C. Gwo, C.W. Chen, H.Y. Cheng, Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*), *Theriogenology* 58 (2002) 1563–1578.
- [19] J.C. Gwo, Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos, *Theriogenology* 43 (1995) 1163–1174.
- [20] C. Heude-Berthelin, J. Laisney, J. Espinosa, O. Martin, G. Hernandez, M. Mathieu, K. Kellner, Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing



- areas (Normandy and the Atlantic coast, France), Inver. Rep. Dev. 40 (2001) 79–86.
- [21] C. Heude-Berthelin, B. Fievet, G. Leclerc, P. Germain, K. Kellner, M. Mathieu, In vivo and in vitro approaches to the analysis of glycogen metabolism in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, J. Shellfish Res. 22 (2003) 715–721.
  - [22] J.B. Hughes, An examination of eggs challenged with cryopreserved spermatozoa of the American oyster, *Crassostrea virginica*, Cryobiology 10 (1973) 342–344.
  - [23] S. Ieropoli, P. Masullo, M. Do Espírito Santo, G. Sansone, Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilisation viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), Cryobiology 49 (2004) 250–257.
  - [24] H. Kurokura, K. Namba, T. Ishikawa, Lesions of spermatozoa by cryopreservation in oyster *Crassostrea gigas*, Nippon Suisan Gakkaishi 56 (1990) 1803–1806.
  - [25] J.E. Lennan, Experimental self-fertilization of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, utilizing cryopreserved sperm, Genetics 68 (1971) 599–601.
  - [26] P. Le Marrec-Croq, K. Fristayre, C. Chesne, A. Guillozeu, G. Dorange, Cryopreservation of *Pecten maximus* heart cells, Cryobiology 37 (1998) 200–206.
  - [27] T.T. Lin, N.H. Chao, H.T. Tung, Factors affecting survival of cryopreserved oyster (*Crassostrea gigas*) embryos, Cryobiology 39 (1999) 192–196.
  - [28] T.T. Lin, H.T. Tung, N.H. Chao, Cryopreservation of oyster embryos with conventional freezing procedure and vitrification, Cryobiology 30 (1993) 614–615.
  - [29] M. Mathieu, P. Lubet, Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves—a brief review, IRD 23 (2–3) (1993) 123–129.
  - [30] P. Mazur, Freezing of living cells: mechanisms and implications, Am. J. Physiol. 247C (1984) 125–142.
  - [31] I.R.B. McFadden, Cryopreservation of the sperm of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Methods Mol. Biol. 38 (1995) 145–149.
  - [32] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55–63.
  - [33] T. Naidenko, Cryopreservation of *Crassostrea gigas* oocytes, embryos and larvae using antioxidant echinochrome A and antifreeze protein APPI, Cryo Letters 18 (1997) 375–382.
  - [34] N.A. Odintsova, L. Tsai, Cryopreservation of primary cell cultures of Bivalvia, Cryo Letters 16 (1995) 13–20.
  - [35] N.A. Odintsova, K. Kisilev, N. Sanina, E. Kostetsky, Cryopreservation of primary cell cultures of marine invertebrates, Cryo Letters 22 (2001) 299–310.
  - [36] P.J.W. Olive, W.B. Wang, Cryopreservation of *Nereis virens* (Polychaeta, Annelida) larvae: the mechanism of cryopreservation of differentiated metazoan, Cryobiology 34 (1997) 284–294.
  - [37] C.G. Paniagua-Chavez, J.T. Buchanan, T.R. Tiersch, Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm, J. Shellfish Res. 17 (1998) 231–237.
  - [38] C.G. Paniagua-Chavez, T.R. Tiersch, Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the Eastern oyster, Cryobiology 43 (2001) 211–223.
  - [39] J.M. Poncet, A. Serpentine, E. Boucaud-Camou, J.M. Lebel, Cryopreservation of mantle dissociated cells from *Halotis tuberculata* (Gastropoda) and postthaw primary cell cultures, Cryobiology 44 (2002) 38–45.
  - [40] J.M. Poncet, J.M. Lebel, Influence of cryoprotectant agent and cooling rate on frozen and thawed hemocytes from the mollusk *Halotis tuberculata*, Cryobiology 47 (2003) 184–189.
  - [41] P. Renard, Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects, Aquaculture 92 (1991) 43–57.
  - [42] P. Renard, J.C. Cochard, Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam *Ruditapes philippinarum* Reeve and King scallop *Pecten maximus* (L.) embryos: influence of the biochemical and osmotic effects, Cryo Letters 10 (1989) 169–180.
  - [43] C. Ruiz, D. Martínez, G. Mosquera, M. Abad, J.L. Sanchez, Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibra (Galicia, Spain), Mar. Biol. 112 (1992) 67–74.
  - [44] A.S. Rudolph, J.H. Crowe, Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and praline, Cryobiology 22 (1985) 367–377.
  - [45] J.D. Toledo, H. Kurokura, S. Kasahara, Preliminary studies on the cryopreservation of blue mussel embryos, Nippon Suisan Gakkaishi 65 (1989) 1661.
  - [46] H.P. Tsai, N.H. Chao, Cryopreservation of small abalone (*Halotis diversicolor*) sperm—technique and its significance, J. Fish. Soc. Taiwan 21 (1994) 347–360.
  - [47] H. Usuki, M. Hamaguchi, H. Ishioka, Effects of developmental stage, seawater concentration and rearing temperature on cryopreservation of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae, Fish. Sci. 68 (2002) 757–762.
  - [48] H. Usuki, M. Hamaguchi, H. Ishioka, Cryopreservation of Pacific oyster sperm and larvae, Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. 81 (1999) 3–6.
  - [49] G. Van der Horst, H.M. Dott, J.S. Samuels, A. Genade, Short- and long-term storage of viable oyster sperm, S. Afr. J. Sci. 81 (1985) 404–405.
  - [50] K. Yankson, J. Moyse, Cryopreservation of the spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and tree other oysters, Aquaculture 97 (1991) 259–267.
  - [51] S.R. Zell, M.H. Bamford, H. Hidu, Cryopreservation of spermatozoa of American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin, Cryobiology 16 (1979) 448–460.



## INDEX DES FIGURES

Figure 1. Phylogénie des métazoaires basée sur l'analyse de l'ARNr 18S.	5
Figure 2. Anatomie de l'huître creuse (valve gauche creuse).	6
Figure 3. Cycle de développement de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> .	7
Figure 4. Coupe transversale dans la région gonade-manteau-glande digestive.	8
Figure 5. Gamétogenèse mâle et femelle chez <i>Crassostrea gigas</i> .	10
Figure 6. Tubules gonadiques contenant des gamètes résiduels chez <i>Crassostrea gigas</i> .	11
Figure 7. Cas d'hermaphrodisme chez <i>Crassostrea gigas</i> .	11
Figure 8. Tissu de réserve des palpes labiaux constitué presque exclusivement de cellules vésiculeuses chez <i>Crassostrea gigas</i> . X100.	13
Figure 9. Ultrastructure des cellules vésiculeuses isolées chez <i>Crassostrea gigas</i> .	14
Figure 10. Evolution qualitative du tissu de réserve dans la région gonadique au cours du cycle sexuel chez <i>Crassostrea gigas</i> .	15
Figure 11. Comparaison des cinétiques d'entrée de la diffusion facilitée et de la diffusion simple.	18
Figure 12. Cycle de transport de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.	19
Figure 13. Topologie membranaire des membres de la superfamille des MFS.	22
Figure 14. Phylogénie des différentes familles des MFS, des SP et des FGHS.	24
Figure 15. Régulation par l'insuline de l'entrée de glucose dans les cellules.	27
Figure 16. Topologie membranaire des transporteurs facilités de glucose chez les mammifères.	28
Figure 17. Mode de fonctionnement d'un transporteur de type GLuT.	29
Figure 18. Dendrogramme de l'alignement multiple des membres de la famille des GLuTs.	30
Figure 19. Mode de fonctionnement de la maltose perméase, une protéine de type ABC.	31
Figure 20. Représentation de la structure secondaire de PutP chez <i>Escherichia coli</i> .	33
Figure 21. Phylogénie des membres de la famille des SSSF.	34
Figure 22. Topologie membranaire, sites de fixation et de translocation des solutés des SGLTs.	35
Figure 23. Mécanisme de fonctionnement du cotransporteur sodium/glucose SGLT1.	36
Figure 24. Arbre phylogénétique des transporteurs de la famille SGLT.	38
Figure 25. Localisation des huîtres de l'expérimentation sur la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy en Baie des Veys (50).	49
Figure 26. Système Contrôlé d'Ambiance Marine.	50
Figure 27. Déroulement de l'expérimentation lors des trois saisons suivies.	51
Figure 28. Anatomie de l'huître creuse (valve gauche creuse). Les doubles flèches indiquent le passage de la coupe transversale.	52
Figure 29. Analyse quantitative d'une coupe histologique (Vision®).	53
Figure 30. Etude in vitro de l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses.	56
Figure 31. Caractérisation de la composante saturable.	68
Figure 32. Estimation de la concentration cellulaire selon deux approches.	72
Figure 33. Corrélation entre le test MTT et la quantité protéique d'une préparation de cellules vésiculeuses dissociées.	73
Figure 34. Entrée du $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ D-glucose et du $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ 3-O-méthyl-glucose dans les cellules	73



de palpes labiaux dissociées.

Figure 35. Transport du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose en fonction de la concentration cellulaire (en millions de cellules par mL).	74
Figure 36. Cinétique d'entrée du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose (1 mM) dans les cellules de palpes labiaux dissociées.	75
Figure 37. Cinétique d'entrée du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées pour trois concentrations extracellulaires de glucose.	75
Figure 38. Cinétique d'entrée du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose (0,5 mM) dans les cellules de palpes labiaux dissociées en fonction de la température.	76
Figure 39. Effet de la concentration extracellulaire en D-glucose sur la vitesse d'entrée du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose dans les cellules vésiculeuses.	77
Figure 40. Détermination de $V_{max}$ et de $K_m$ de la composante saturable du transport du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose dans les cellules vésiculeuses selon la méthode de Lineweaver-Burk.	78
Figure 41. Détermination de $V_{max}$ et de $K_m$ de la composante saturable du transport du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose dans les cellules vésiculeuses selon la méthode de Woolf et Hanes.	78
Figure 42. Détermination de $V_{max}$ et de $K_m$ de la composante saturable du transport du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose dans les cellules vésiculeuses selon la méthode de Eadie et Hofstee.	79
Figure 43. Effet de la cytochalasine B sur le transport du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées.	80
Figure 44. Effet de la phlorizine sur le transport du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées.	81
Figure 45. Effet de la cytochalasine B (10 $\mu$ M) et de la phlorizine (1 mM) sur la vitesse d'entrée du D-glucose dans les cellules dissociées de palpes labiaux (composante saturable) en fonction de la concentration du D-glucose extracellulaire.	82
Figure 46. Effet de la cytochalasine B (10 $\mu$ M) sur la vitesse de transport du [U- <sup>14</sup> C] D-Glucose (composante saturable) dans les cellules de palpes labiaux dissociées.	83
Figure 47. Effet de la phlorizine (1 mM) sur la vitesse de transport du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose (composante saturable) dans les cellules de palpes labiaux dissociées.	84
Figure 48. Effet de différents analogues du glucose sur le transport du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées.	85
Figure 49. Effet de la concentration extracellulaire en Na <sup>+</sup> sur le transport du [U- <sup>14</sup> C] D-glucose dans les cellules de palpes labiaux dissociées.	86
Figure 50. Topologie de la séquence protéique de SGLT de <i>Crassostrea gigas</i> (AAT44356).	87
Figure 51. Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences de 35 transporteurs homologues de la famille SGLT.	89
Figure 52. Expression quantitative des ARNm de SGLT mesurée par technique de PCR en temps réel dans différents tissus d'huître.	90
Figure 53. Représentation schématique des mécanismes de transport du glucose dans une cellule vésiculeuse.	101
Figure 54. Caractère saisonnier de la mise en réserve chez l'huître creuse <i>C. gigas</i> .	106



Figure 55. Equilibre du métabolisme énergétique chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> régit par des mécanismes de régulation externes et/ou internes.	110
Figure 56. Suivi des mesures biométriques des animaux en Baie des Veys aux 3 périodes suivies. (n=10).	112
Figure 57. Approches histologiques qualitatives et quantitatives sur des animaux prélevés en Baie des Veys aux 3 périodes suivies. (n=10).	114
Figure 58. Bilan des réserves en glycogène dans les palpes labiaux chez des animaux prélevés sur le site de la Baie des Veys aux trois périodes suivies.	115
Figure 59. Expression quantitative des ARNm de SGLT mesurée par technique de PCR en temps réel dans la région gonade manteau. (n=3).	116
Figure 60. Effet des conditions trophiques sur la gamétogenèse. (n=10).	118
Figure 61. Effet des conditions trophiques sur le métabolisme énergétique.	119
Figure 62. Interaction des sept facteurs de risques conduisant aux mortalités estivales.	132
Figure 63. Hypothèse sur l'existence d'une inadéquation entre les réserves pré-établies et les dépenses énergétiques.	132
Figure 64. Gamétogenèse (stade III) chez des huîtres S soumises à des conditions trophiques élevées (A+) en novembre 2005. X400.	136
Figure 65. Approches histologiques quantitatives sur des animaux R et S placés sur l'estran.	137
Figure 66. Approches histologiques qualitatives et quantitatives sur des animaux R et S soumis à deux niveaux trophiques opposés.	138
Figure 67. Statut des réserves en glycogène sur des animaux R et S placés sur l'estran.	140
Figure 68. Statut des réserves en glycogène sur des animaux R et S soumis à deux niveaux trophiques opposés.	141
Figure 69. Phases d'abaissement de température en fonction du temps.	154
Figure 70. Evaluation de la survie avant et après congélation en présence de 4 solutions cryoprotectrices.	154
Figure 71. Mesure de la toxicité et de l'efficacité des agents cryoprotecteurs sur la suspension de cellules vésiculeuses dissociées.	156
Figure 72. Effet de la vitesse de descente en température sur la survie des cellules vésiculeuses (-1; -3; -5°C/min) pour deux traitements cryoprotecteurs (a) DGE ou (b) Glycérol.	157
Figure 73. Effet de la température de transfert des échantillons dans l'azote liquide sur la survie des cellules vésiculeuses après décongélation.	158
Figure 74. Récupération cellulaire après décongélation.	159
Figure 75. Activité métabolique de cellules cryopréservées (-1°C/min, traitement au DGE, transfert dans l'azote liquide à -70°C) a été estimée par la mesure de la capacité d'entrée du glucose (a) et d'incorporation du glucose en glycogène (b) dans les cellules vésiculeuses.	160
Figure 76. Variation de la toxicité du mélange cryoprotecteur DGE au cours des saisons.	161



## INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Types cellulaires de réserve chez les mollusques répertoriés dans la littérature.	12
Tableau 2. Famille des transporteurs facilités du glucose (GLuT).	25
Tableau 3. Augmentation de la concentration de la solution cryoprotectrice.	58
Tableau 4. Etapes de dilution progressive de la suspension cellulaire avec l'Alsever.	59
Tableau 5. Séquence et numéro d'accèsion GenBank des amorces utilisées en PCR temps réel pour les tissus d'huître.	61
Tableau 6. Etudes des mécanismes de transport du glucose chez des organismes marins.	66
Tableau 7. Inhibiteurs et analogues permettant la caractérisation des modes de transports du D-glucose.	69
Tableau 8. Dosage de la glycémie dans l'hémolymphe de <i>Crassostrea gigas</i> .	71
Tableau 9. Pourcentage d'identité entre la séquence protéique de SGLT de l'huître (AAT44356.1) avec les séquences disponibles dans les bases de donnée Swissprot (Expasy).	88
Tableau 10. Valeur de la glycémie chez différents organismes marins référencés dans la littérature.	92
Tableau 11. Suivi des stades de gamétogenèse et du tissu de réserve.	113
Tableau 12. Effet du niveau trophique sur l'évolution de la gamétogenèse et du tissu de réserve.	117
Tableau 13. Suivi des stades de gamétogenèse des huîtres R et S sur l'estran. (n=10).	135
Tableau 14. Stades de gamétogenèse des huîtres R et S soumises à des conditions trophiques opposées au printemps et en automne 2005. (n=10).	136
Tableau 15. Cryopréservation de divers types cellulaires chez différentes espèces de Mollusques : agent cryoprotecteur employé, test de viabilité ou d'activité cellulaire utilisé dans la bibliographie.	164







---

**TITRE :** Approches cellulaires et moléculaires de la gestion des réserves chez l'huître, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Suivi saisonnier du métabolisme énergétique et effet du niveau trophique sur la mise en réserve.

---

### Résumé

Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, l'énergie nécessaire au métabolisme général et à la gamétogenèse est fournie principalement par le glycogène stocké dans les cellules vésiculeuses. Le premier niveau de contrôle du métabolisme du glycogène est l'entrée du glucose dans les cellules. Le suivi de la capacité d'entrée du  $[U-^{14}C]$  D-glucose a mis en évidence l'existence d'une composante saturable dont les constantes cinétiques sont  $K_m = 0,71$  mM et  $V_{max} = 0,22$  nmoles/h/ $10^6$  cellules. L'utilisation d'inhibiteurs a révélé la présence de transporteurs de type GLuT et SGLT. Un suivi saisonnier a montré une variation de la capacité de transport et d'incorporation du glucose, ainsi qu'une expression des SGLTs plus forte en période de mobilisation du glycogène et de maturation des gamètes. Un conditionnement en milieu contrôlé a permis de mettre en évidence l'existence d'une régulation de l'incorporation du glucose ainsi que de l'expression des SGLTs en fonction du niveau trophique. A jeun, la capacité de stockage du glycogène est faible alors que l'expression de SGLT est forte. Un suivi comparatif de deux lignées d'huîtres sélectionnées par leur résistance (R) ou leur sensibilité (S) aux mortalités estivales a été entrepris. Les deux souches présentent peu de variations sur l'estran, mais en conditions contrôlées des différences ont été constatées dans le déroulement de la gamétogenèse et leur stratégie énergétique, indiquant une origine génétique à la différence R/S. Enfin, la cryopréservation a été envisagée afin de disposer d'une banque de cellules vésiculeuses. L'adaptation du protocole a permis d'obtenir un taux de survie de  $68,5 \pm 2,2$  %.

---

**TITLE:** Cellular and molecular approaches to the management of reserves in the oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Monitoring seasonal energy metabolism and effect of trophic level on reserves storage.

---

### Abstract

In the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, the energy necessary for general metabolism and gametogenesis is mainly provided by the glycogen stored in the vesicular cells. The first level of glycogen metabolism control is the entrance of glucose into cells. The monitoring of the uptake capacity of  $[U-^{14}C]$  D-glucose revealed the existence of a saturable component with kinetic constants:  $K_m = 0.71$  mM ;  $V_{max} = 0.22$  nmol/h/ $10^6$  cells. The use of inhibitors has revealed the presence of carriers belonged to GLuT and SGLT types. A follow-up showed a seasonal variation of the uptake capacity and incorporation of glucose into glycogen, and a high expression of SGLT during mobilization of glycogen and gametes maturation. A bioassay in a controlled rearing system has shown the existence of a regulation of glucose incorporation and the expression of SGLT depending on the trophic level. In fasting situation, the storage capacity of glycogen is low while the expression of SGLT is high. A follow-up comparison of two strains of oysters selected from their resistance (R) or sensitivity (S) to summer mortality has been undertaken. Both strains show little variations in ntural environment, but under controlled conditions differences are observed in the sequence of the gametogenesis and their energy strategy, indicating a genetic origin to the difference R/S. Finally, cryopreservation has been envisaged to constitute a bank of cells. The adaptation of the protocol able to reach a survival rate of  $68.5 \pm 2.2$  %.

---

Mots clés : *Crassostrea gigas*, Glucides métabolisme, Glucose, Reproduction, Cryoconservation.

---

DISCIPLINE : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions