

# RAPPORT DE STAGE

*ETUDE DE LA RELATION ENTRE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE  
DE L'HEMOLYMPHE ET LES RESERVES ENERGETIQUES CHEZ  
CRASSOSTREA GIGAS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE.*

**Claude BONDU**

Laboratoire Ecosystèmes Conchylicoles

IFREMER 17390 LA TREMBLADE

MAI 1989



## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier le corps enseignant de la faculté des sciences de Poitiers qui m'a permis de suivre ce stage dans le cadre de ma formation universitaire. Je remercie également M.Héral, responsable de laboratoire à l'IFREMER de la Tremblade pour m'avoir accueillie dans son établissement. Je ne saurais oublier la bonne humeur et le dynamisme de Jean-Marc Deslous-Paoli et de Serge Bougrier, leur compétence dans l'encadrement de ce stage, leur soutien moral et leur amitié. Je les en remercie très sincèrement. Je voudrais remercier plus particulièrement Serge Bougrier qui m'a aidée et soutenue lors de la réalisation de ce rapport.

Enfin, je tiens à remercier la totalité du personnel IFREMER pour sa bonne humeur, et S. Taillade pour son aide à la dactylographie.

## SOMMAIRE

### REMERCIEMENTS

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>4</b>
<i>Matériel biologique.....</i>	<i>4</i>
<i>Protocole expérimental.....</i>	<i>5</i>
<i>Analyses biochimiques.....</i>	<i>5</i>
<i>La chair.....</i>	<i>6</i>
<i>L'hémolymphe.....</i>	<i>6</i>
<i>Traitements statistiques.....</i>	<i>7</i>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>7</b>
<i>Les huîtres "frisées".....</i>	<i>7</i>
<i>Indice de condition.....</i>	<i>7</i>
<i>Evolution des éléments constitutifs de la chair.....</i>	<i>7</i>
<i>Biochimie de l'hémolymphe.....</i>	<i>11</i>
<i>Comparaison entre les huîtres "lisses" et "frisées".....</i>	<i>14</i>
<i>Indice de condition.....</i>	<i>14</i>
<i>Evolution des éléments constitutifs de la chair.....</i>	<i>14</i>
<i>Biochimie de l'hémolymphe.....</i>	<i>18</i>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>21</b>
<i>Les huîtres "frisées".....</i>	<i>21</i>
<i>Les huîtres "lisses".....</i>	<i>28</i>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>29</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>32</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>I à VI</b>

## INTRODUCTION

Contrairement aux USA où elles ne représentent que 4,6 % de la production marine totale (Chew et al., 1985) les productions de mollusques principalement bivalves, doivent être prises en considération. En France, 100 000 tonnes d'huîtres dont 98 % de *Crassostrea gigas* (Héral et al., 1986a) et 85 000 tonnes de moules (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*) (Dardignac, 1985) sont produites annuellement, soit 20 à 25 % des produits de la mer (Troadec et Bonnet, 1985) assurés par 5 000 exploitations.

Avec 3500 hectares de cultures et 300 exploitations, le bassin de Marennes-Oléron produit actuellement 35 % d'huîtres creuses et commercialise 50 % de la production nationale. Cependant, la baisse de performance de croissance et de qualité de *C. gigas* (huître creuse japonaise) cultivées dans ce bassin (Héral et al., 1986b) et les mortalités successives par épizooties qui ont frappé *Ostrea edulis* (huître plate) et *C. angulata* (huître creuse portugaise), impliquent de mieux comprendre les relations existantes entre le milieu et les mollusques d'élevage ou sauvages. Du fait de la sédentarité de ces organismes, la compréhension de ces relations nécessite d'une part, la connaissance des variations saisonnières de la qualité et de la quantité de nourriture disponible apportée par les courants (Héral., 1985) et d'autre part, la connaissance des besoins nutritifs liés à l'évolution de la physiologie des individus (Deslous Paoli., 1985).

La croissance de *C. gigas* est en relation avec le développement des efflorescences phytoplanctoniques, principalement au printemps (Deslous-Paoli, 1982 ; Berthomé et al., 1986). Durant cette période, l'huître doit assurer non seulement sa croissance, mais aussi l'accumulation des réserves nécessaires au développement des gamètes et à la vitellogenèse. Cette dernière précède la ponte qui se déroule au mois d'août.

Pendant l'automne, des efflorescences phytoplanctoniques de moindre importance (Héral et al., 1983) permettent l'accumulation des réserves énergétiques nécessaires à la survie en période hivernale. Lors de cette période d'amaigrissement qui débute au mois d'octobre et se termine au mois de mars, les mauvaises conditions trophiques nécessitent l'utilisation de 75 % du glycogène, 44 % des lipides et 36 % des protéines, pour assurer plus de 50 % du métabolisme basal (Deslous-Paoli et Héral, 1988).

On peut donc se demander quels sont les mécanismes qui régissent l'utilisation des réserves, en fonction des paramètres exogènes (nourriture, température, salinité...) et des paramètres endogènes (croissance, reproduction...).

La diminution des glucides et plus particulièrement du glycogène et l'augmentation synchrone des lipides, pendant la gamétogenèse (Deslous-Paoli et al., 1982) laisse supposer, comme l'ont écrit Masumoto et al. (1934) et Goddard et Martin (1966) qu'il y a conversion du glycogène en lipides pour la formation des gamètes. Gabbott (1976) démontre par ailleurs que cette transformation du glycogène en acides gras s'effectue par l'intermédiaire du cycle de Krebs chez *Mytilus edulis*, alors que Zaba (1981) en précise les mécanismes enzymatiques. De même, Comely (1974) sur *Pecten maximus* et Riley (1976) sur *C. gigas* suggèrent que le matériel nécessaire à la gamétogenèse n'est pas prélevé dans l'environnement, mais dans la réserve en glycogène du mollusque.

La dégradation des substances de réserve regroupe tout un ensemble de processus biochimiques complexes (schéma 1). En présence d'oxygène, le cycle de Krebs fait suite à la glycolyse dont il utilise le produit final : l'acide pyruvique. Cet ensemble de réactions aboutit à la libération de CO<sub>2</sub> (produit terminal de l'oxydation des glucides) et va permettre la mise en réserve d'énergie sous forme de liaisons phosphates (phosphorylations oxydatives couplées à la chaîne respiratoire qui utilise l'énergie libérée au cours des transferts d'électrons pour synthétiser des molécules d'ATP). Certaines des molécules formées au cours du cycle de Krebs vont servir de précurseurs à d'autres voies métaboliques conduisant

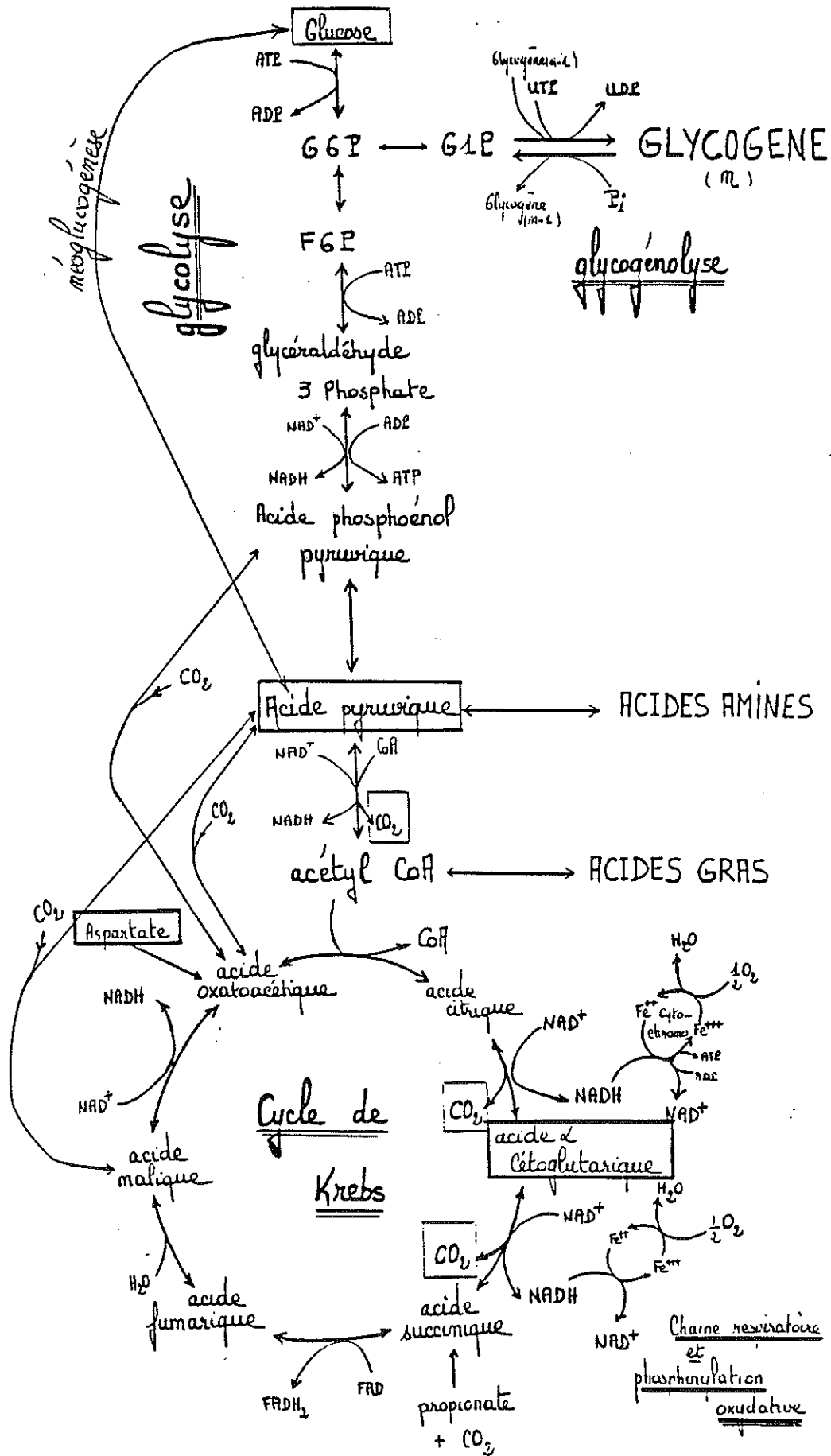


Schéma 1: Métabolisme général des substances de réserves (glycogène, acides aminés, acides gras).

notamment à la synthèse d'acides aminés ou d'acides gras (De Zwaan, 1983). Les huîtres semblent présenter un métabolisme essentiellement orienté vers les sucres, du fait de la concentration élevée en glycogène. Pourtant, pendant un jeûne prolongé, les lipides puis les protéines constituent, à long terme, les réserves énergétiques les plus importantes (Riley, 1976).

Afin de simplifier au maximum le cycle métabolique, les voies de synthèse anaérobiques n'ont pas été mentionnées sur le schéma, excepté l'aspartate qui peut être utilisé comme une réponse immédiate à la déplétion en oxygène (Collicutt et Hochachka, 1977 ; Zurburg et Ebberink, 1981 ; Zurburg et de Zwaan, 1981).

Suivant les conditions de l'environnement, le contrôle des nombreuses voies métaboliques complexes modifie l'état physiologique de l'huître. L'hémolymphe est le lieu de passage des éléments provenant soit de la chair, soit du milieu extérieur, orientés suivant la saison, vers la constitution d'un apport énergétique, la maturation des gamètes, ou bien, promis à l'excrétion. L'acclimatation des huîtres à cinq niveaux de températures caractéristiques des variations saisonnières, devrait permettre d'établir et de comprendre les relations entre la composition biochimique de l'hémolymphe et les réserves énergétiques de l'animal.

## **MATERIELS ET METHODES**

### ***Matériel biologique***

Imai et Sakaï (1961) définissent quatre races pour l'huître *C. gigas* native du Japon. Actuellement deux de ces races sont cultivées sur les côtes françaises. La première, de type "frisées" (Bougrier et al., 1986), importée en 1970-1972, est cultivée dans l'ensemble des bassins français. Cette race, au contact de polluant de type tributylétain (Alzieu et al., 1982),

présente des malformations de la coquille (phénomène du chambrage) caractérisées par un accroissement important de son épaisseur. La deuxième importée directement du Japon au début des années 1980, est caractérisée par une coquille de type "lisse" (Bougrier et al., 1986) et n'est pas sensible au phénomène du chambrage.

Les huîtres "frisées" ont été prélevées sur le banc de Dagnas (centre du bassin de Marennes-Oléron) alors que les "lisses" ont été récoltées dans la rivière de Crac'h (Baie de Quiberon, Bretagne).

### ***Protocole expérimental***

En modifiant la température d'un degré par jour, les huîtres sont acclimatées à 5, 10, 15, 20 et 25°C, températures caractéristiques des variations saisonnières. 38 huîtres "frisées" et 10 huîtres "lisses" sont placées dans chaque compartiment, et maintenues à température et salinité constantes pendant 10 jours.

Les animaux sont nourris avec un mélange d'algues (*Isochrysis galbana* (clone T. Iso) et *Chaetoceros calcitrans*) à raison de  $2 \cdot 10^8$  cellules/animal/jour en 2 fois (matin et soir).

Parallèlement à notre étude, des expériences de physiologie, filtration et respiration, ont été réalisées sur chaque huître, dans la journée précédant les analyses biochimiques.

### ***Analyses biochimiques***

A chaque température, les dosages de la chair et de l'hémolymphe sont effectués successivement sur chacune des 48 huîtres, par des méthodes spectrophotométriques (en annexes).



### La chair

Les dosages sont réalisés sur de la chair sèche finement broyée et homogénéisée au mortier. Environ 10 mg sont nécessaires pour les analyses des protéines, des glucides, et des lipides.

Les protéines (Lowry positive substances : LPS) extraites à la soude normale, sont déterminées par la méthode de Lowry et al. (1951). Après extraction à 4°C avec du TCA à 15%, les glucides totaux et le glycogène, précipité par de l'éthanol absolu, sont dosés par la méthode de Dubois et al. (1956). Les lipides, extraits et purifiés par la méthode de Bligh et Dyer (1959) sont estimés par la méthode de Marsh et Weinstein (1959). Les mesures sont exprimées respectivement en équivalent albumine de boeuf, glucose et tripalmitate.

Les résultats sont traités soit en pourcentage de chair sèche, soit suivant un indice, défini par le rapport de la quantité d'éléments dans l'animal sur la masse de coquille sèche. La valeur obtenue est rapportée à un animal standard de 50 g de masse de coquille. Celle-ci ne dépend pas de l'état physiologique de l'animal. Cet indice a été choisi en raison de l'hétérogénéité de taille des huîtres dans un même échantillon de température nécessaire aux expériences de filtration et de respiration réalisées auparavant.

### L'hémolymphe

De 1 à 2 ml d'hémolymphe sont prélevés sur chaque animal à l'aide d'une seringue dans la cavité péricardique. Les échantillons sont centrifugés (10 min à 1500 tr) pour séparer les hémocytes du plasma. 50 µl de celui-ci sont nécessaires pour les analyses des protéines, 100 µl pour la mesure des sucres totaux et du glycogène, et 200 µl pour la détermination des lipides, purifiés par la méthode de Bligh et Dyer (1959). Les dosages effectués sont les mêmes que ceux utilisés pour la biochimie de la chair. Les résultats sont exprimés en mg/ml.

## **Traitements statistiques**

Nous avons utilisé les analyses de variance à un et deux facteurs du logiciel Statgraphics.

## **RESULTATS**

### **Les huîtres "frisées"**

#### Indice de condition

L'indice de condition est défini par la masse de chair sèche rapportée à la masse de coquille sèche, qui ne dépend pas de l'état physiologique de l'animal. La figure 1 montre une diminution de cet indice liée à l'augmentation de la température : de  $35.10^{-3}$  à  $5^{\circ}\text{C}$  jusqu'à  $26.10^{-3}$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Cette évolution suggère un amaigrissement significatif ( $P=0,01$ ) de la chair des animaux probablement dû à une alimentation insuffisante.

#### Evolution des éléments constitutifs de la chair

Le taux de protéines (fig.2) reste constant quelque soit la température ( $I=0,52$ ).

Ainsi, celles-ci ne semblent pas intervenir dans le métabolisme général de l'animal. L'amaigrissement constaté d'après l'indice de condition est vraisemblablement dû à une utilisation préférencielle des sucres et des lipides, pour subvenir aux besoins énergétiques des animaux. L'indice de lipides (fig.3) et de glycogène (fig.4) décroît significativement avec la température ( $P<0,001$ ). Cette diminution tend à se stabiliser à partir de  $15^{\circ}\text{C}$  pour le glycogène (de 0,27 à 0,12) et  $20^{\circ}\text{C}$  pour les lipides (de 0,20 à 0,14). La figure 3 représentant le pourcentage des lipides de la chair laisse supposer qu'entre 15 et  $20^{\circ}\text{C}$ , il y a utilisation des réserves lipidiques pour le métabolisme général de l'animal. Cette dégradation est

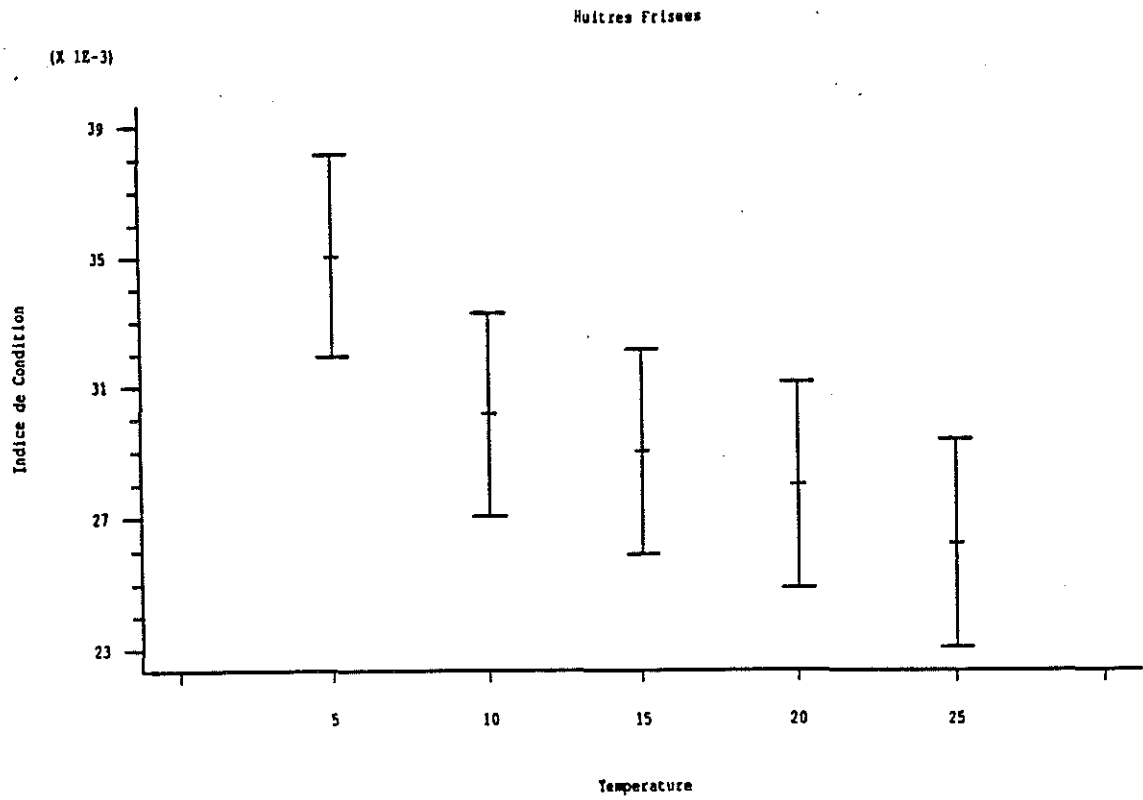


Figure 1: Evolution de l'indice de condition (Cf. texte) en fonction de la température (°C).

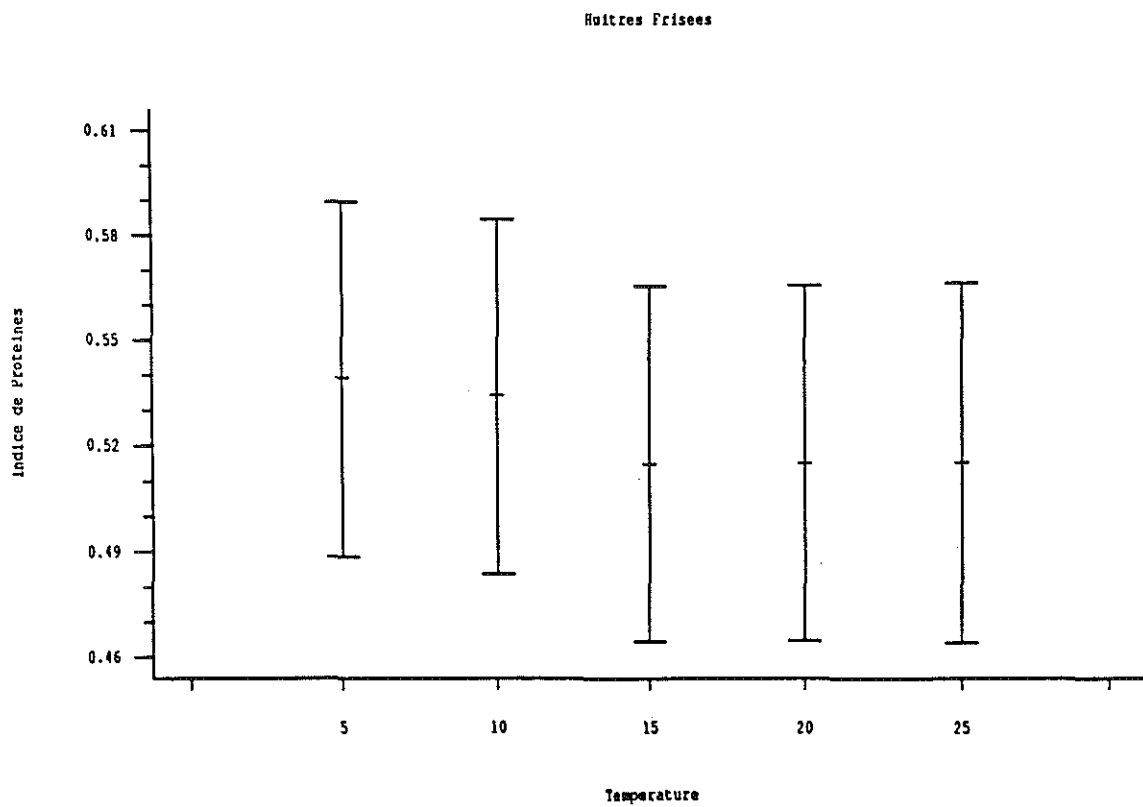


Figure 2: Evolution de l'indice de protéines (Cf. texte) en fonction de la température (°C).

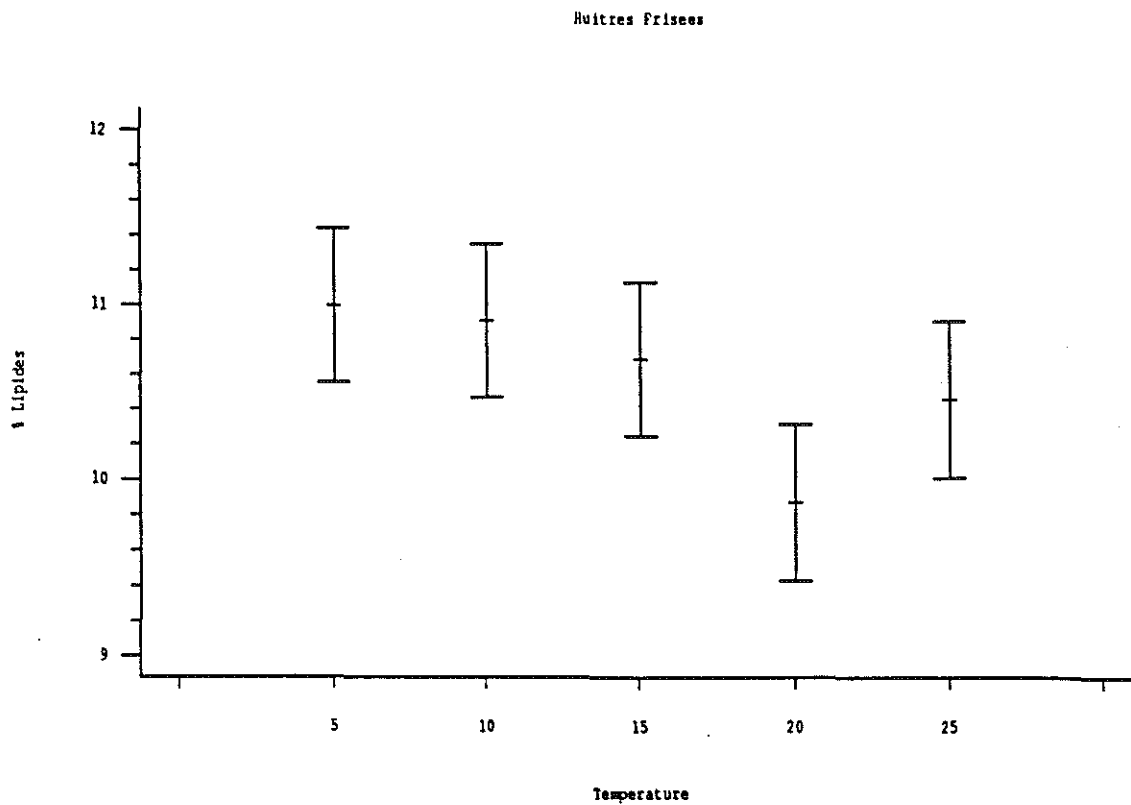
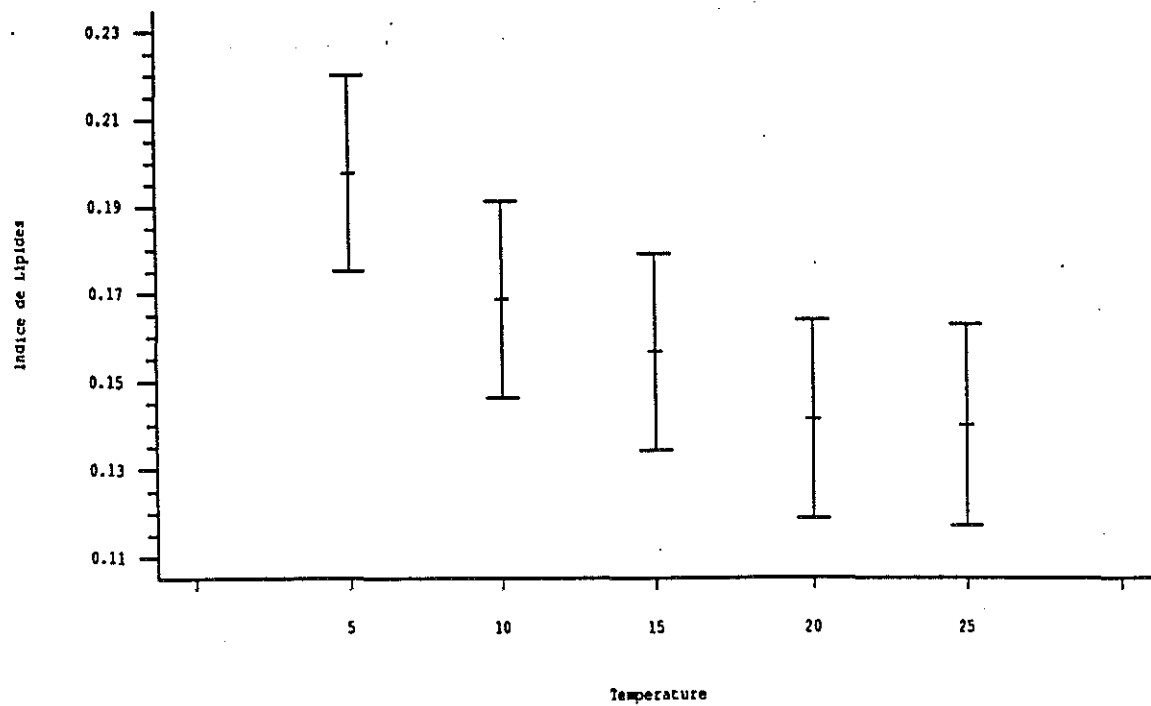


Figure 3: En haut, évolution de l'indice de lipides (Cf. texte) en fonction de la température (°C).  
En bas, évolution du pourcentage de lipides dans la chair en fonction de la température (°C).

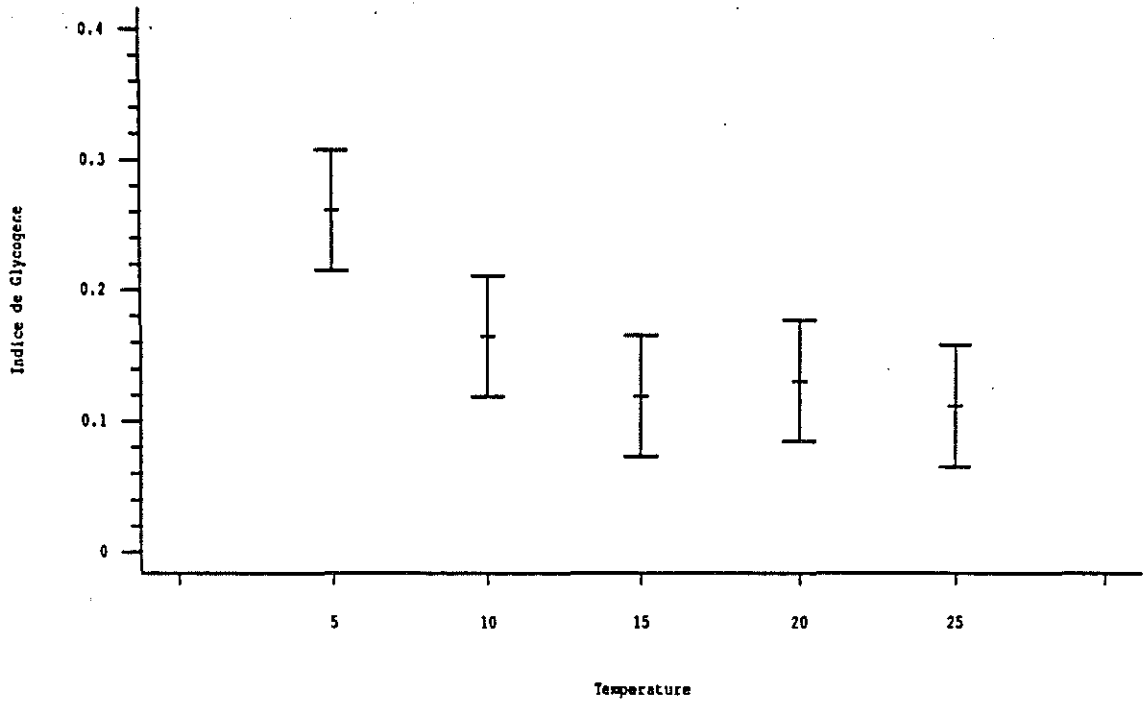


Figure 4: Evolution de l'indice de glycogène (Cf. texte) en fonction de la température (°C).

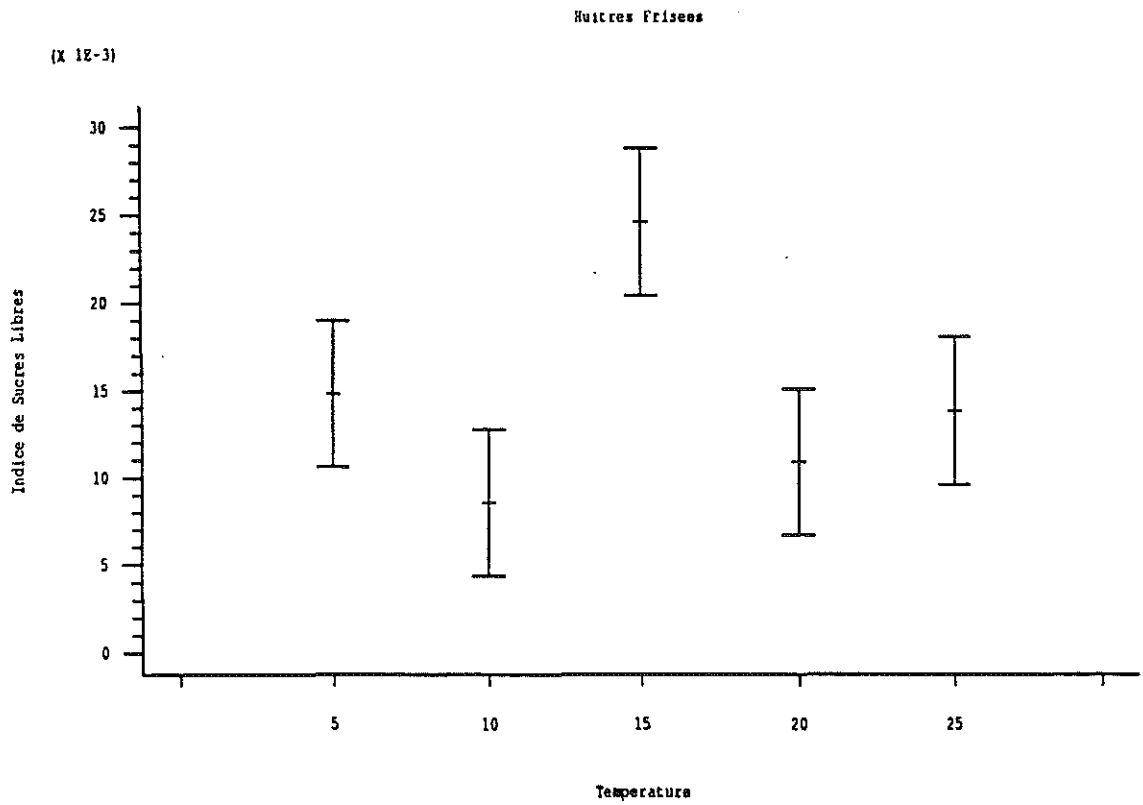


Figure 5: Evolution de l'indice de sucres libres (Cf. texte) en fonction de la température (°C).

synchrone à une accumulation du glycogène dans les gonades en maturation. Par la suite, à partir de 20°C, l'augmentation du pourcentage des lipides semble indiquer le début de la vitellogenèse.

Les sucres libres (sucres réducteurs tels que le glucose) ne forment pas une réserve énergétique pour l'animal : ils sont directement assimilables. L'indice de sucres libres (fig.5) est maximum à 15°C ( $I=25 \cdot 10^{-3}$ ). Pour les basses températures (5 et 10°C) et pour les températures élevées (20 et 25°C), la proportion des sucres libres reste relativement faible (de l'ordre de  $12 \cdot 10^{-3}$ ), suggérant ainsi l'utilisation des sucres par l'animal comme apport énergétique ou comme précurseur du glycogène et des lipides lors de la gamétogenèse à 20 et 25°C.

#### Biochimie de l'hémolymphe

La diminution de la concentration totale en lipides (fig.6) dans l'hémolymphe est liée à une augmentation de la température. Cette concentration décroît significativement ( $P=0,01$ ) de 0,54 mg/ml à 5°C jusqu'à 0,38 mg/ml à 25°C. Une stabilisation de la teneur en lipides à 0,47 mg/ml, entre 10 et 15°C dans l'hémolymphe, suggère une mobilisation intense des réserves lipidiques de la chair.

A partir de 15°C, la diminution du glycogène (fig.7) de 0,26 à 0,21 mg/ml et l'augmentation synchrone des sucres libres (fig.8) de  $9 \cdot 10^{-3}$  à  $27 \cdot 10^{-3}$  mg/ml laissent supposer que le métabolisme est essentiellement orienté vers la dégradation du glycogène en sucres réducteurs mobilisables lors de la gamétogenèse. De plus, dans les faibles températures, la décroissance, de 0,25 à 0,19 mg/ml pour le glycogène et de  $40 \cdot 10^{-3}$  à  $9 \cdot 10^{-3}$  mg/ml pour les sucres libres, tend à montrer l'utilisation de ces éléments comme apport énergétique pour la survie de l'animal.

La concentration en protéines dans l'hémolymphe (fig.9) varie irrégulièrement avec la température : le maximum avoisine 2,2 mg/ml à 15°C, et le minimum 1,7 mg/ml à 20°C. La

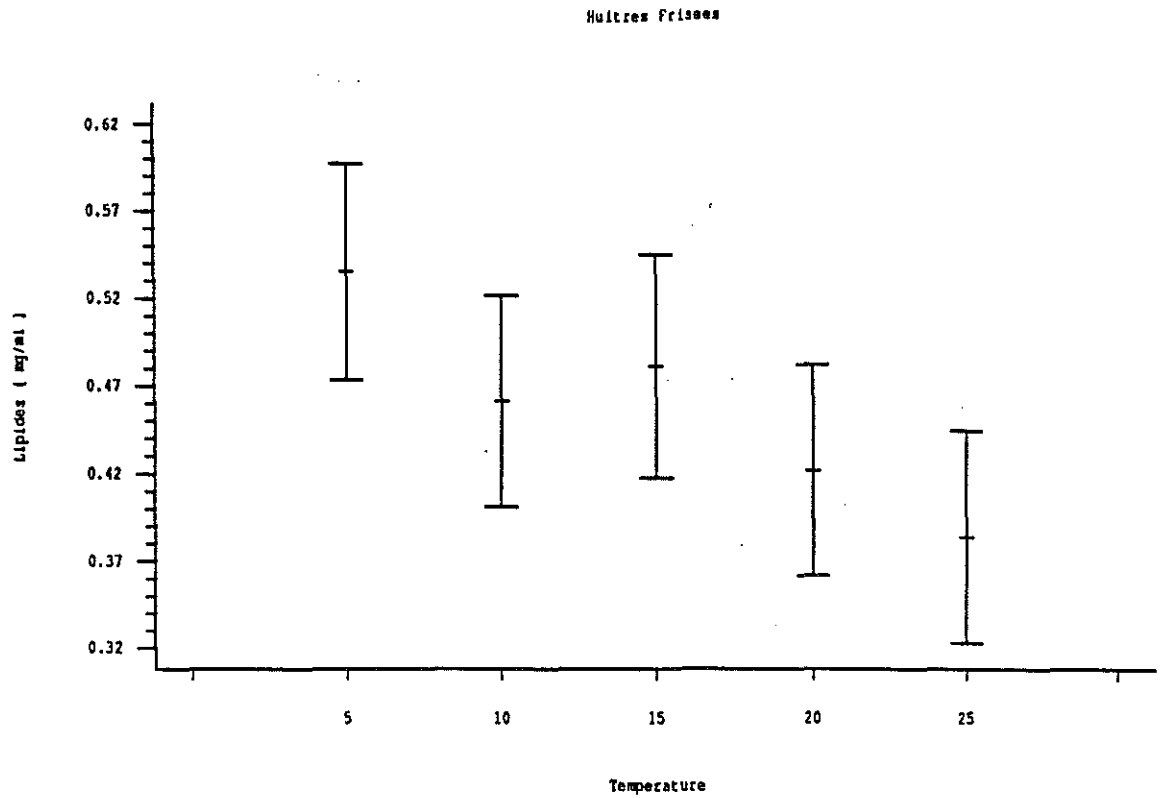


Figure 6: Evolution de la concentration en lipides de l'hémolymphe en fonction de la température (°C).

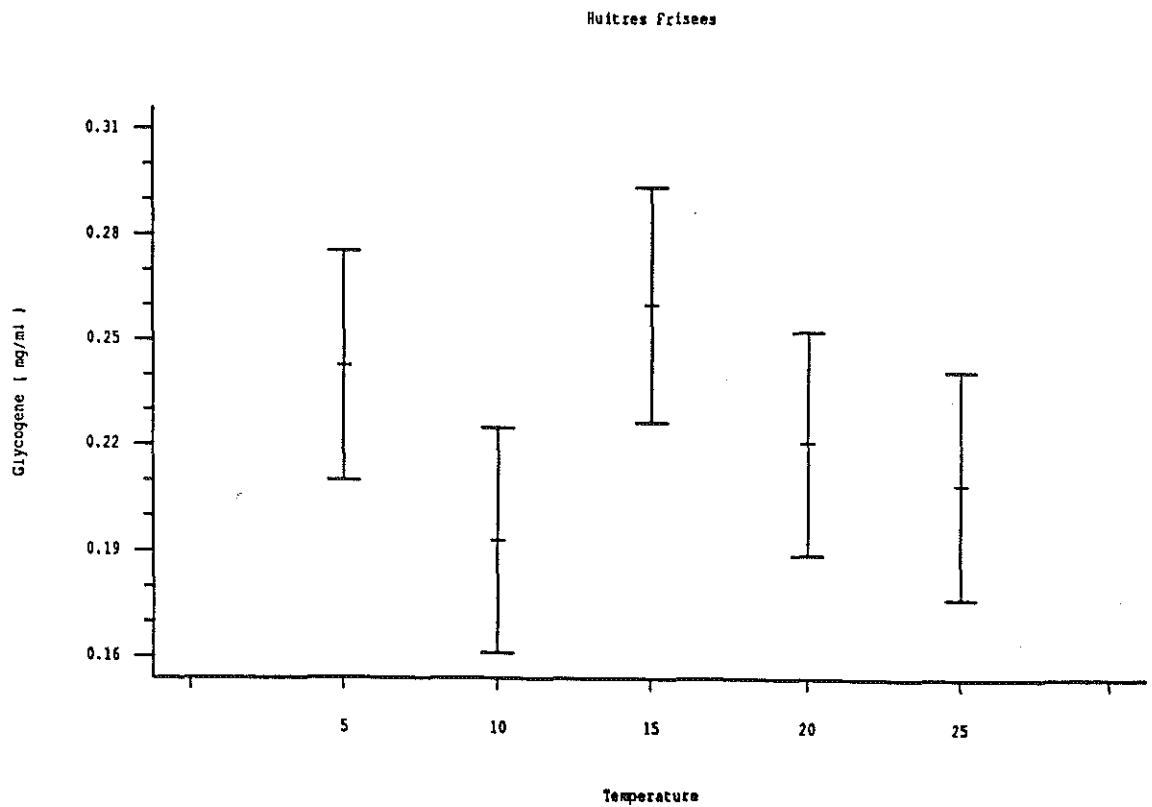


Figure 7: Evolution de la concentration en glycogène de l'hémolymphe en fonction de la température (°C).

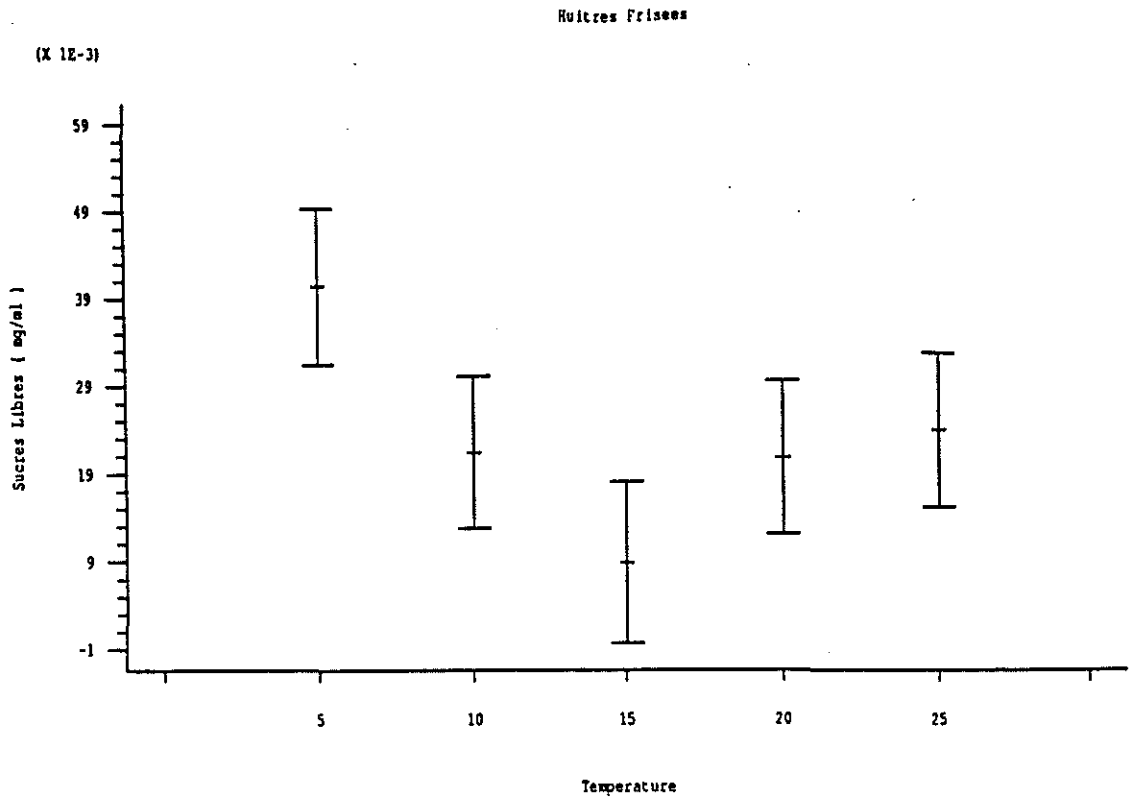


Figure 8: Evolution de la concentration en sucres libres de l'hémolymphe en fonction de la température (°C).

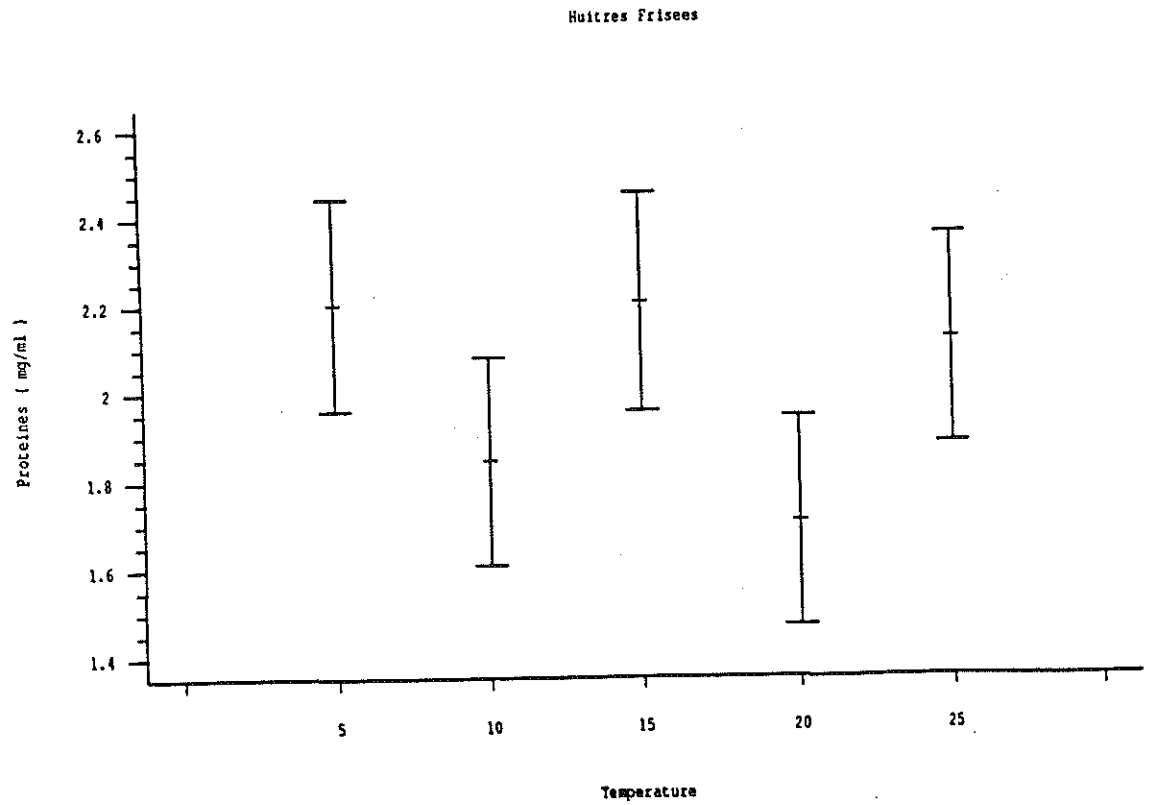


Figure 9: Evolution de la concentration en protéines de l'hémolymphe en fonction de la température (°C).



stabilité de la quantité de protéines dans la chair (fig.2) laisse supposer que les variations observées dans l'hémolymphe proviennent soit d'un apport en protéines du milieu extérieur, soit d'un remaniement interne des structures protéiques.

### ***Comparaison entre les huîtres "lisses" et "frisées"***

Les huîtres "frisées" correspondant à la gamme de taille des "lisses" seront uniquement prises en compte pour réaliser les comparaisons effectuées ci-dessous.

#### *Indice de condition*

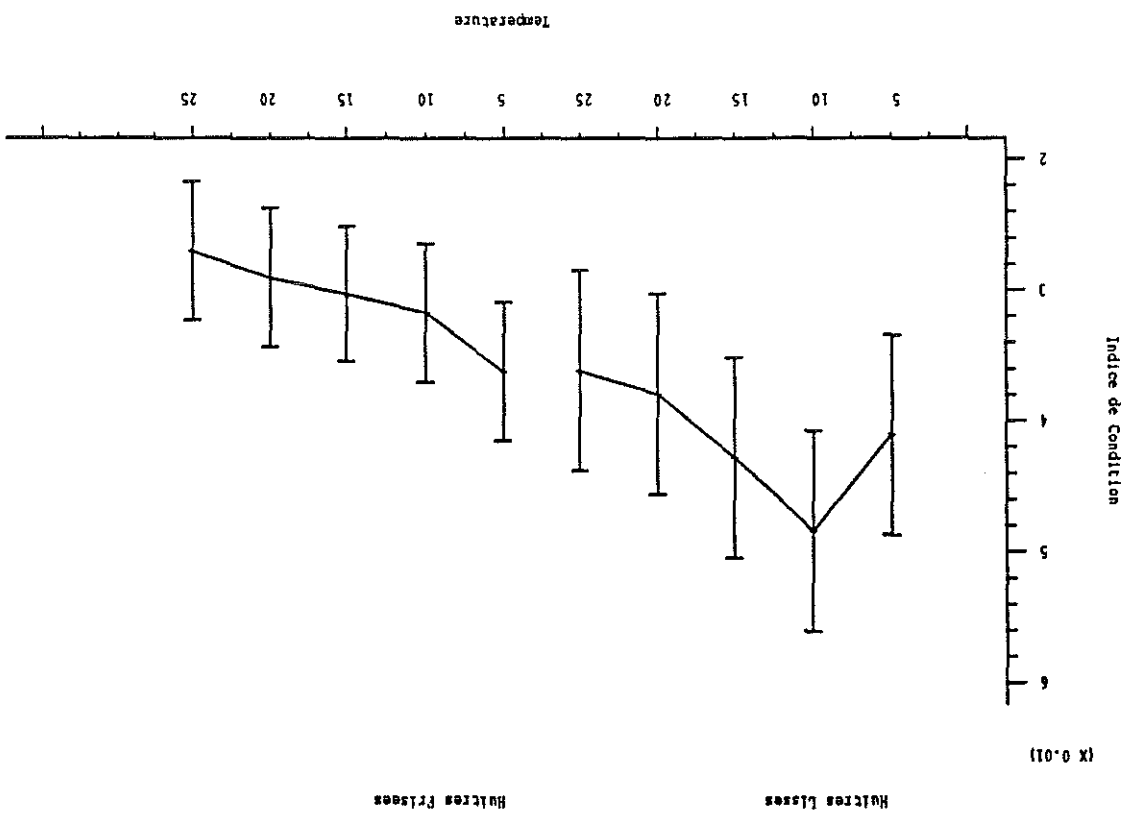
L'évolution du rapport de la masse sèche sur la masse de la coquille sèche des huîtres "lisses" (fig.10) montre une augmentation pour les températures allant de 5 à 10°C : l'indice varie de  $4 \cdot 10^{-2}$  à  $5 \cdot 10^{-2}$ , alors qu'il diminue de  $4 \cdot 10^{-2}$  à  $3 \cdot 10^{-2}$  pour les huîtres "frisées". Cette augmentation semble montrer une accumulation de réserves énergétiques aux faibles températures. Ensuite, à partir de 10°C, l'indice diminue régulièrement de  $5 \cdot 10^{-2}$  à  $3,6 \cdot 10^{-2}$  jusqu'aux températures élevées. Cette évolution devient semblable à celle observée chez les "frisées".

#### *Evolution des éléments constitutifs de la chair*

L'indice de protéines des huîtres "lisses" (fig.11) montre la même évolution que l'indice de condition (fig.10) en fonction de la température, avec un maximum à 10°C ( $I=0,75$  alors qu'il reste égal à 0,55 pour les huîtres "frisées" acclimatées à la même température).

Les réserves lipidiques de la chair (fig.12) sont plus élevées pour les huîtres "lisses" que pour les "frisées". Il en est de même pour les réserves en glycogène (fig.13), avec cependant une différence moins marquée. En effet, les huîtres "lisses", prélevées en Bretagne, subissent

Figure 10: Evolution de l'indice de condition en fonction de la température (°C) pour les lots "lisses" et "frisés".



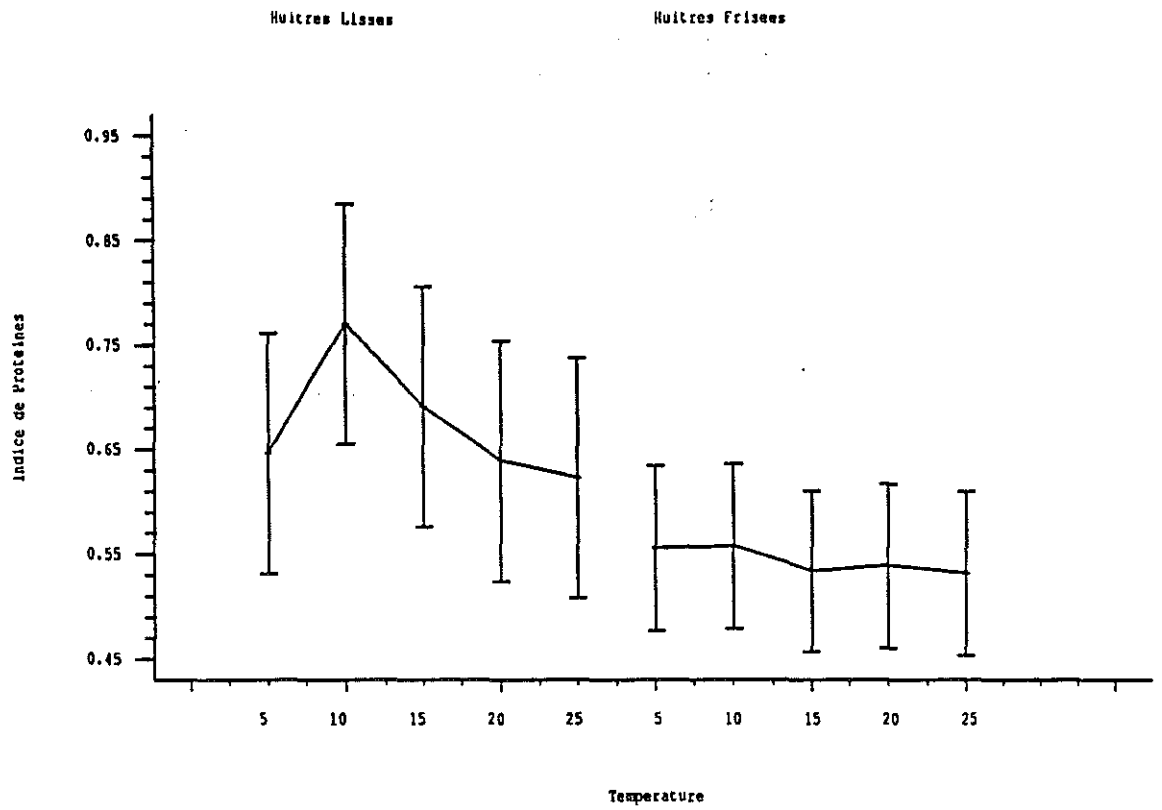


Figure 11: Evolution de l'indice de protéines en fonction de la température (°C) pour les lots "lisses" et "frisées".

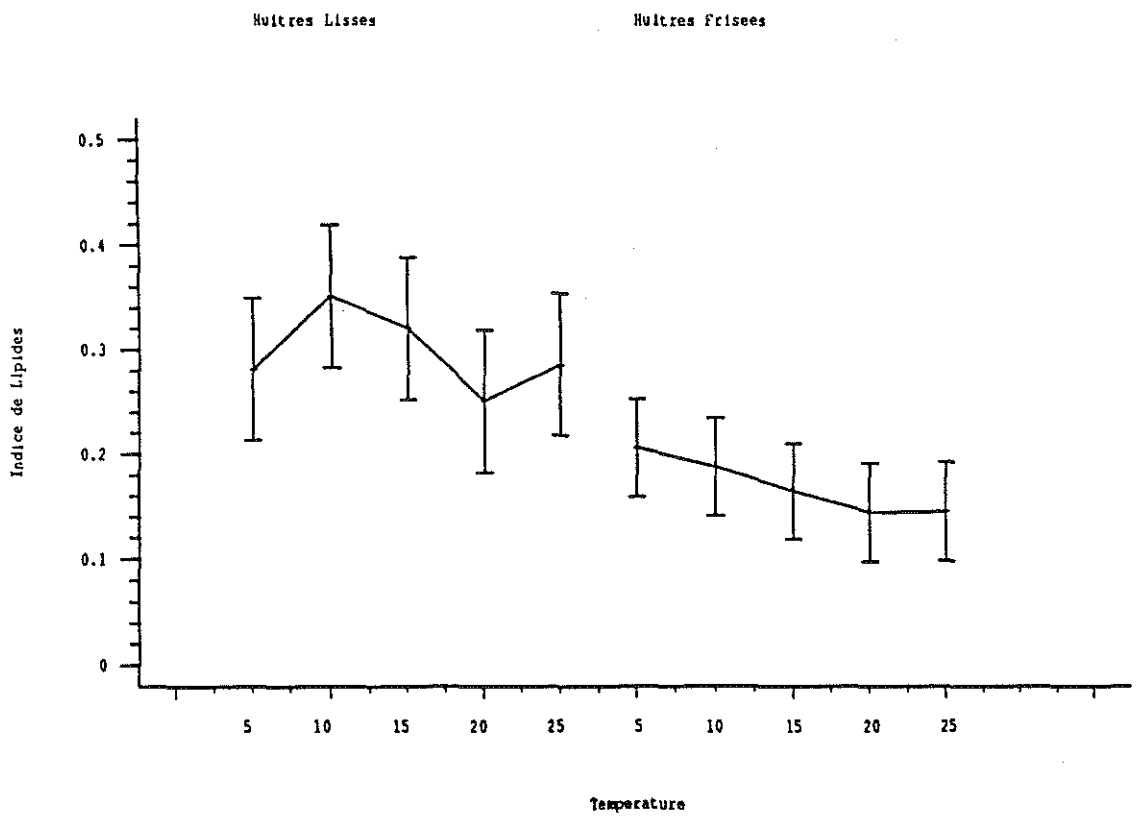


Figure 12: Evolution de l'indice de lipides en fonction de la température (°C) pour les lots "lisses" et "frisées".

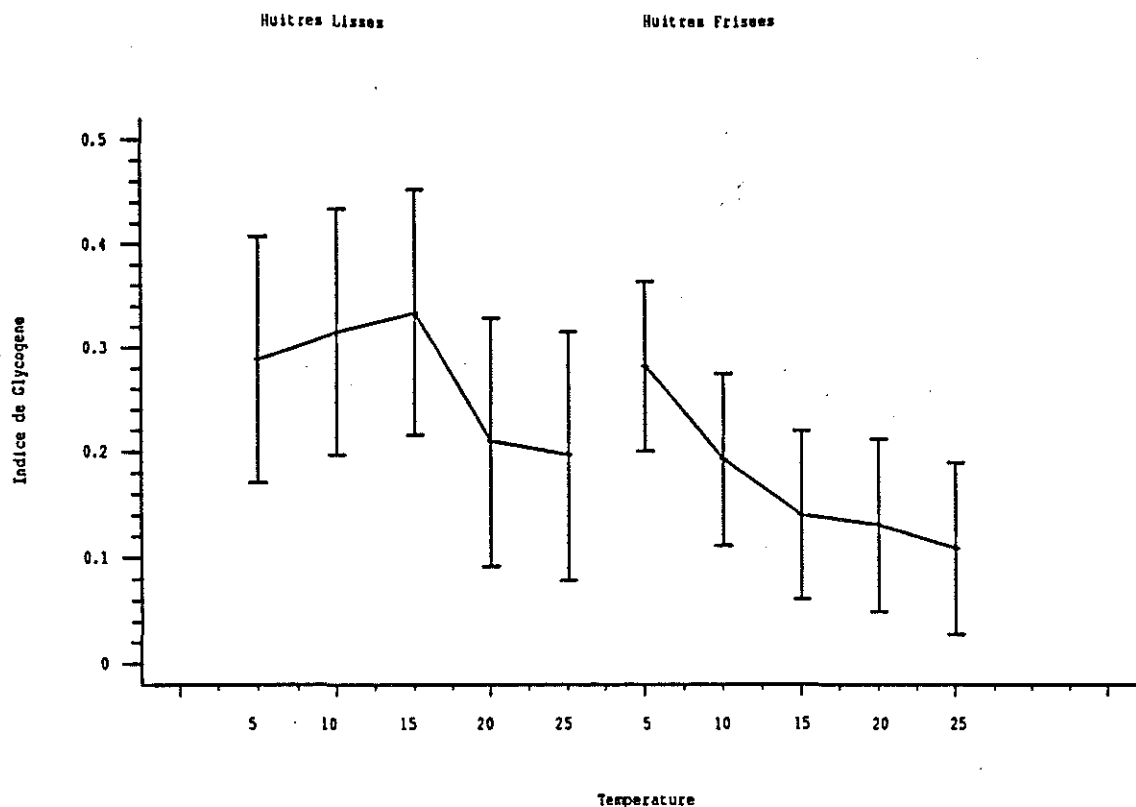


Figure 13: Evolution de l'indice de glycogène en fonction de la température (°C) pour les lots "lisses" et "frisées".

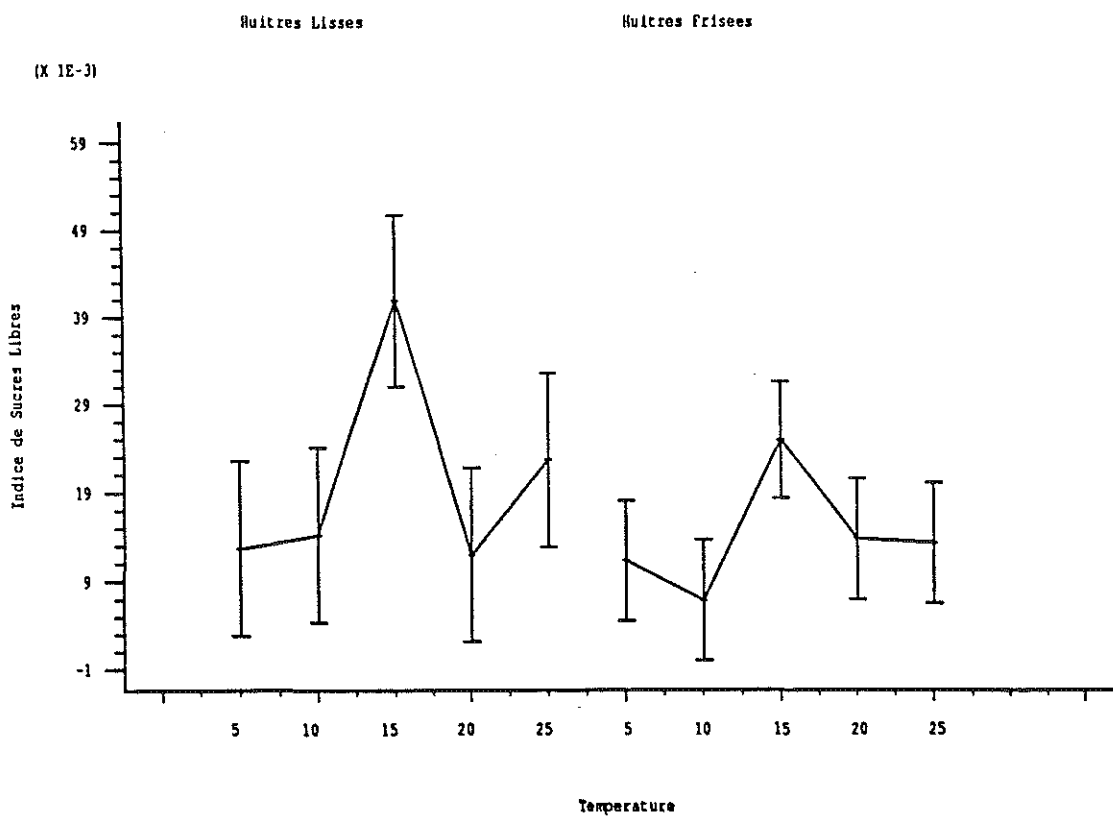


Figure 14: Evolution de l'indice des sucres libres en fonction de la température (°C) pour les lots "lisses" et "frisées".

en moyenne des températures insuffisantes en été pour pondre. De ce fait, les ovocytes gonflés de réserves lipidiques permettent à l'animal de passer l'hiver, en résorbant au fur et à mesure ses gamètes suivant les besoins énergétiques. Par conséquent, l'acclimatation des huîtres a permis d'observer une augmentation de l'indice de lipides (fig.12) entre 5 et 10°C (de 0,28 à 0,36), puis une diminution de 0,36 jusqu'à 0,24 à 20°C qui laisse supposer l'utilisation des réserves lipidiques. L'accroissement de l'indice, qui reprend ensuite jusqu'à 0,28 à 25°C semble montrer une nouvelle accumulation, liée à la vitellogenèse. L'indice de glycogène (fig.13) croît régulièrement jusqu'à 15°C. Puis, sa diminution brutale suggère des modifications importantes du métabolisme général de l'animal (l'indice passe de 0,32 à 15°C, à 0,21 à 20°C) contrairement à l'évolution régulière de cet indice avec la température pour les huîtres "frisées".

L'indice des sucres libres (fig.14) varie dans l'ensemble de la même façon pour les deux races d'huîtres *C. gigas*. Cependant, la proportion de sucres réducteurs, maximum à 15°C, est supérieure pour les "lisses" :  $41 \cdot 10^{-3}$  contre  $26 \cdot 10^{-3}$  pour les "frisées". De plus, la tendance à l'utilisation des sucres observée chez les "frisées" pour les faibles températures (5 et 10°C) et pour les températures élevées (20 et 25°C) est remplacée par une tendance à l'augmentation chez les huîtres "lisses".

#### Biochimie de l'hémolymphe

Le profil des concentrations en protéines (fig.15), lipides (fig.16) et glycogène (fig.17) semble globalement suivre une évolution analogue pour les deux races d'huîtres étudiées. On note cependant quelques changements:

- La concentration maximum des protéines atteint 2,8 mg/ml à 15°C, alors que celle-ci s'élève à 2,4 mg/ml pour les huîtres "frisées", atteignant un niveau identique à celui de 5°C.

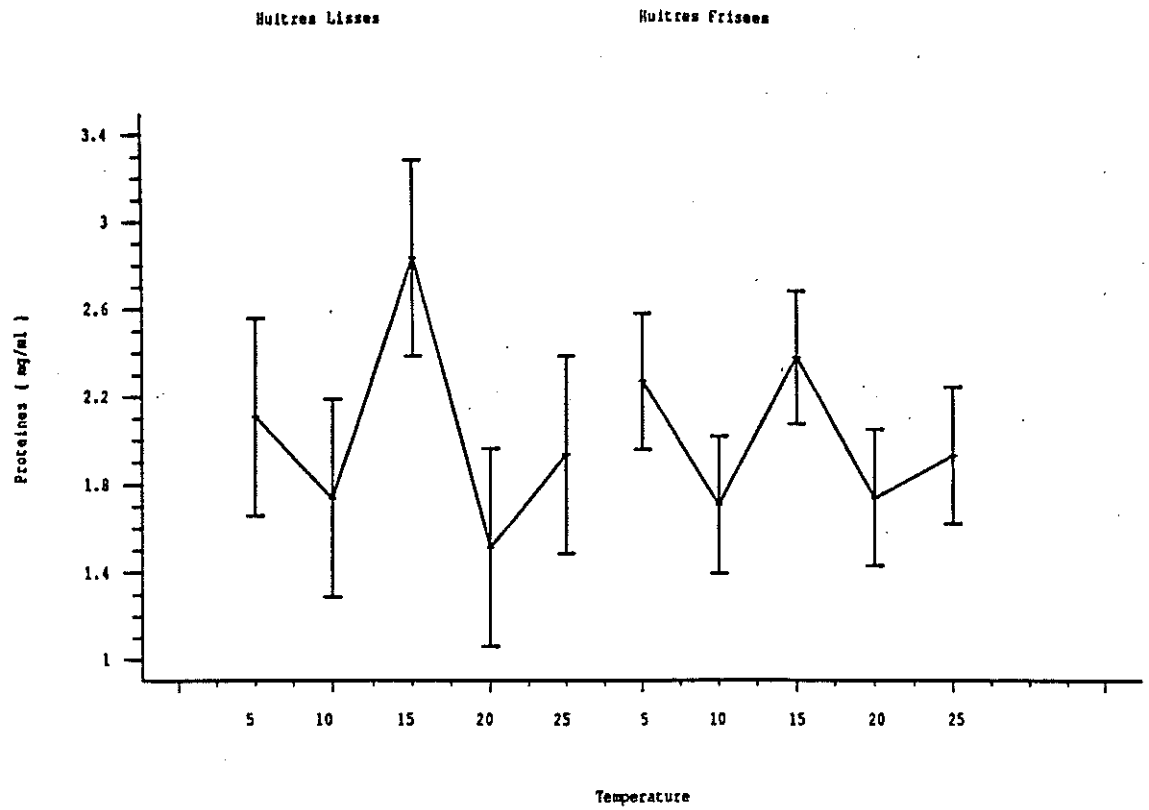


Figure 15: Evolution de la concentration en protéines de l'hémolymphe en fonction de la température (°C) pour les lots "lisses" et "frisées".

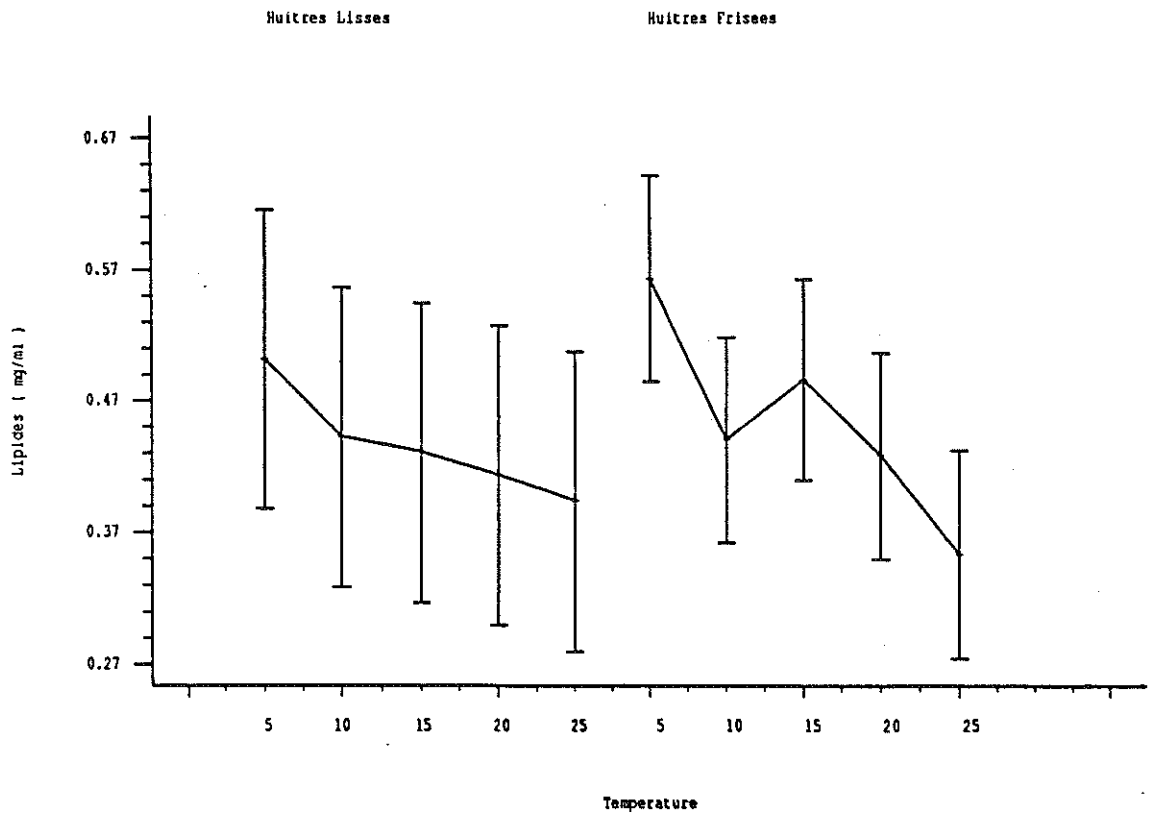


Figure 16: Evolution de la concentration en lipides de l'hémolymphe en fonction de la température (°C) pour les lots "lisses" et "frisées".

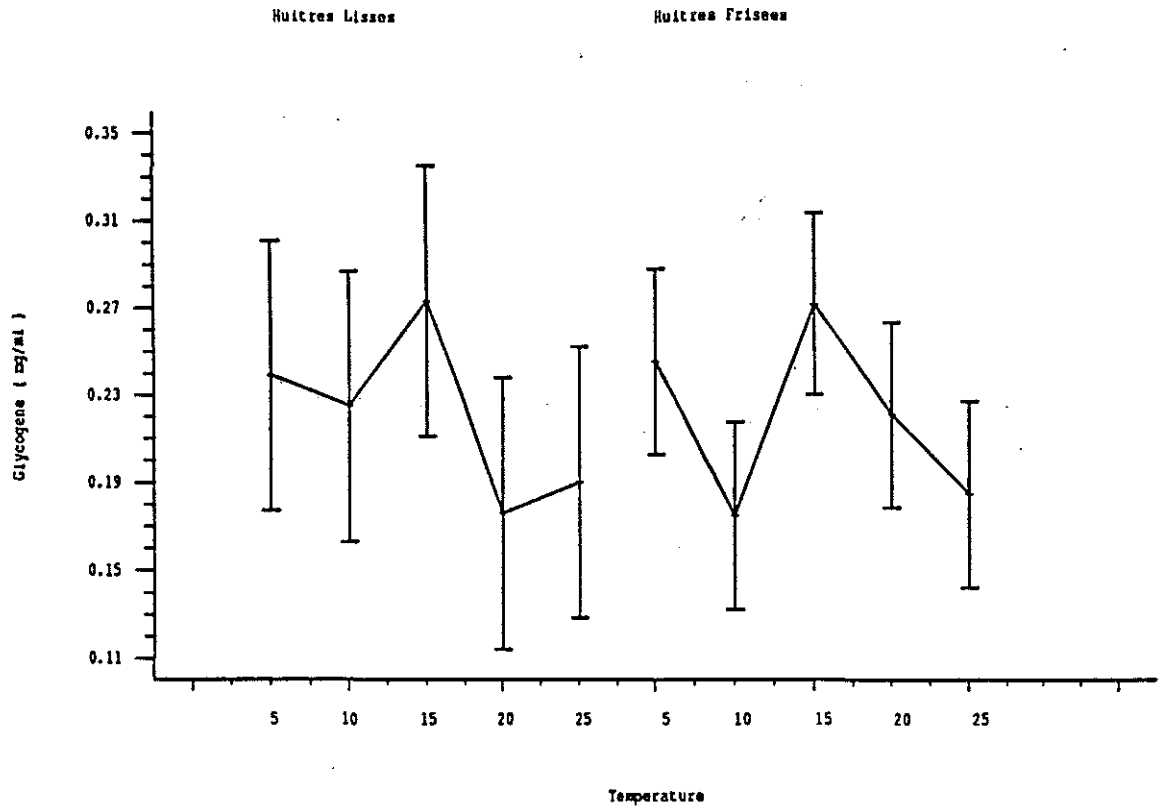


Figure 17: Evolution de la concentration en glycogène de l'hémolymphe en fonction de la température (°C) pour les lots "lisses" et "frisées".

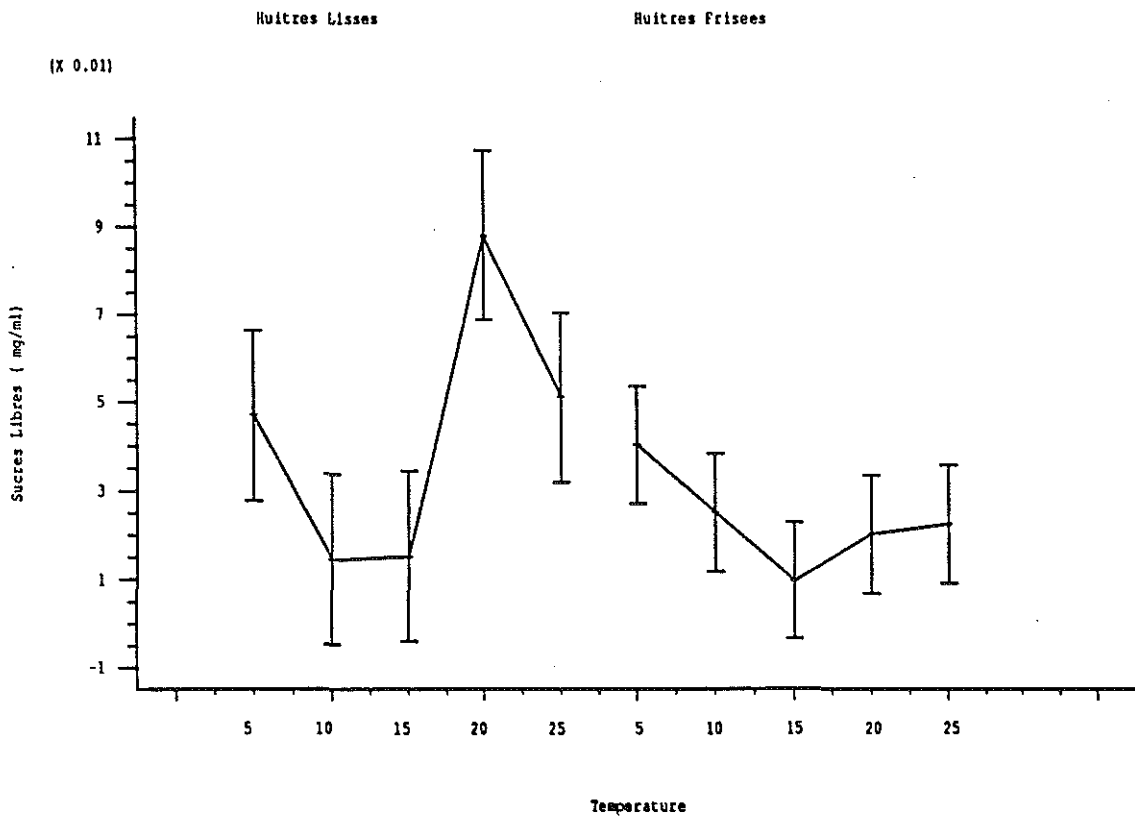


Figure 18: Evolution de la concentration en sucres libres de l'hémolymphe en fonction de la température (°C) pour les lots "lisses" et "frisées".

- Les concentrations des lipides sont dans l'ensemble plus faibles pour les huîtres "lisses". Cette différence semble plus marquée à 15 et 20°C.

- En comparant les valeurs des huîtres "lisses" à celles des "frisées", la concentration en glycogène est plus élevée à 10°C (0,23 mg/ml) et plus faible à 20°C (0,17 mg/ml). Par la suite, on note une augmentation sensible du taux de glycogène dans l'hémolymphe des huîtres "lisses" (entre 20 et 25°C) alors que sa diminution se poursuit chez les "frisées".

Les différences de concentration des sucres libres (fig.18) sont significatives entre les températures ( $P < 0,001$ ) de même qu'entre les lots "lisses" et "frisées" ( $P < 0,001$ ). La diminution constatée aux faibles températures chez les huîtres "lisses" se stabilise entre 10 et 15°C (à  $1,5 \cdot 10^{-2}$  mg/ml) ce qui n'est pas observé chez les "frisées". De plus, l'augmentation brutale de la concentration des sucres du plasma (celle-ci croît jusqu'à  $8,5 \cdot 10^{-2}$  mg/ml à 20°C) puis sa diminution jusqu'à 25°C (à  $5 \cdot 10^{-2}$  mg/ml) semble suivre l'évolution du glycogène (fig.17) de façon "opposée". Ceci laisse supposer la dégradation progressive du glycogène en métabolites de plus faible poids moléculaire entre 15 et 20°C, puis son assimilation par l'animal entre 20 et 25°C.

## **DISCUSSION**

### ***Les huîtres "frisées"***

L'évolution des constituants biochimiques de la chair et de l'hémolymphe chez *Crassostrea gigas* est liée à la disponibilité de la nourriture, la température, la croissance, la reproduction. L'acclimatation des huîtres à 5 niveaux de températures, choisies selon les variations climatiques saisonnières, devrait permettre d'établir les relations entre la composition biochimique de l'hémolymphe et les réserves énergétiques de l'animal.



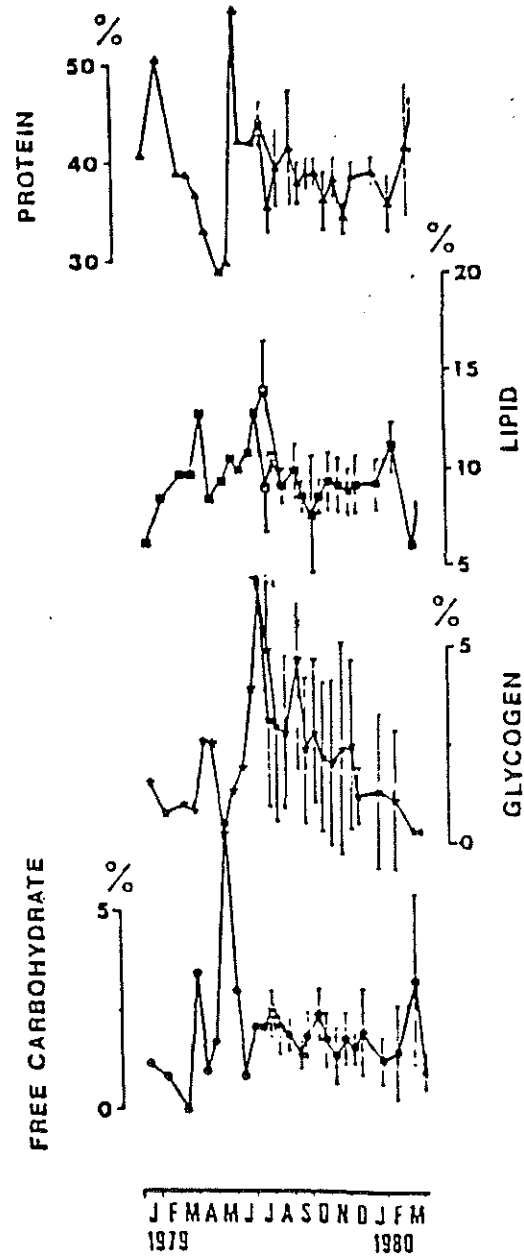


Figure 19: Variations saisonnières de la composition biochimique de la chair chez *C. gigas*, prélevées en 1978 dans le bassin de Marennes-Oléron. (D'après Deslous-Paoli et Héral, 1988)

Les huîtres "frisées" ont mal toléré l'appauvrissement de la nourriture dans le milieu expérimental. D'après Gerdes (1983), les besoins énergétiques s'accroissent avec la température parallèlement à une forte consommation en oxygène (Percy et Marcus, 1971 ; Bass., 1977). L'amaigrissement constaté serait dû à un déficit en énergie apporté par le milieu extérieur, ce qui laisse supposer l'utilisation accrue des réserves.

L'eau atteignant 6 à 7°C lors de la récolte des huîtres dans leur milieu d'élevage au mois de janvier, le compartiment 5°C pourrait être considéré comme référence de la composition biochimique initiale de la chair et de l'hémolymphe. A partir de cette indication, l'évolution des éléments constitutifs de la chair, ou en transit dans l'hémolymphe, pourra être suivie dans les bacs expérimentaux en fonction de la température, parallèlement à l'évolution observée dans le milieu naturel suivant les variations climatiques saisonnières (fig.19, Deslous-Paoli et Héral, 1988).

Dans le milieu naturel, pendant l'hiver, les mauvaises conditions trophiques entraînent une période d'amaigrissement de l'animal (Deslous-Paoli et Héral., 1988) et donc de catabolisme de ses réserves, reproduit expérimentalement dans les compartiments contenant de l'eau de mer à 5 et 10°C. La décroissance simultanée des sucres (glycogène et sucres libres) et des lipides dans la chair et dans l'hémolymphe, ainsi que les LPS dans l'hémolymphe, suggère que les produits de dégradation des réserves sont immédiatement utilisés pour la survie de l'animal.

Cependant, un jeûne expérimental de 7 jours n'entraîne pas d'effets sur les concentrations des sucres et des protéines de l'hémolymphe (Fisher et Newell., 1986). Similairement, Widdows et Bayne (1971) et Swift et Ahmed (1983) ont observé respectivement que la moule *Mytilus edulis* et l'huître américaine *C. virginica* maintiennent leur concentration en sucre dans l'hémolymphe pendant une période de 27 jours de jeûne, ce qui laisse supposer qu'un mécanisme de régulation est impliqué dans le contrôle des taux de métabolites dans l'hémolymphe (Thompson et al., 1978). Des activités enzymatiques

nécessaires à la régulation ont été mises en évidence chez quelques mollusques, par exemple, l'activité de l'hexokinase et de la glycogène phosphorylase chez *C. gigas* (Nakamuro et al., 1980). Des études sur la moule *Mytilus edulis* et sur la coquille saint-jacques *Placopecten magellanicus* ont montré des variations saisonnières de la concentration des éléments du plasma (Bayne., 1973 ; Thompson., 1977). La plupart de ces fluctuations sont corrélées aux différentes phases du cycle de reproduction : différenciation cellulaire et maturation des gamètes.

Alors que les faibles températures représentatives de la saison hivernale soulignent uniquement l'utilisation des réserves énergétiques, le réchauffement de l'eau lors de la période printanière entraîne des modifications importantes au niveau de la composition biochimique. Le compartiment expérimental dont la température est maintenue à 15°C a donné lieu à plusieurs observations:

- Poursuite de la dégradation du glycogène et des lipides dans la chair parallèlement à l'augmentation de la teneur en sucres libres.
- Augmentation de la concentration en glycogène, stabilisation des lipides, apport d'éléments protéiques, et diminution de la proportion de sucres libres dans l'hémolymphe.

Au printemps, la croissance de *C. gigas* est liée au développement des efflorescences phytoplanctoniques. La mobilisation des éléments dans le milieu est considérable par rapport aux autres saisons. Le métabolisme accru est orienté non seulement vers la croissance mais également vers l'accumulation de réserves et la préparation de la gamétogenèse. Des variations climatiques brutales à cette saison pourraient entraîner des perturbations physiologiques chez l'huître. Ceci conduirait à un état de déséquilibre énergétique qui agirait directement sur la gamétogenèse, et à plus longue échéance, entraînerait une mortalité importante (Deslous-Paoli et Héral., 1988). Expérimentalement, le catabolisme des réserves glucidiques et lipidiques se poursuit, suggérant ainsi une insuffisance

de nourriture apportée par le milieu extérieur. Par contre, les variations des concentrations des métabolites de l'hémolymphe, et principalement l'augmentation des substances protéiques, semblent dévoiler d'importantes modifications internes correspondant à la multiplication des cellules somatiques (croissance) et sexuelles (début de la gamétogenèse). Cette prolifération cellulaire demande une mobilisation énergétique intense ce qui semble expliquer la dégradation du glycogène et des lipides de la chair.

La détermination des protéines par la méthode de Lowry et al. (1951) s'appuie sur l'analyse des acides aminés tyrosines et tryptophanes en solution ou inclus dans des chaînes protéiques. Il ne dose pas les protéines de structure, ce qui semble expliquer la teneur constante observée dans la chair de l'animal en fonction de la température. La multiplication cellulaire laisse supposer un accroissement de la teneur en protéines de structure dans la chair, ce qui demande un apport protéique important, véhiculé par l'hémolymphe. Cet apport semble provenir du milieu extérieur, mais peut être également dû à un remaniement interne des structures protéiques de la chair.

En avril et mai, la phase printanière d'accumulation des réserves glycogénées est synchronisée avec la croissance et la gamétogenèse. Après un maximum en mai, les glucides chutent avec l'avancement de la maturation sexuelle et l'augmentation très forte de la teneur des lipides en juin et juillet. A cet instant, la croissance est pratiquement stoppée (Masumoto et al., 1934 ; Hatanaka, 1940 ; Jeng et al., 1979 ; Mann, 1979 ; Deslous-Paoli, 1982). Ce cycle d'évolution suggère la transformation du glycogène en lipides de réserve des gamètes (Gabbott, 1975-1976 ; Lubet et al., 1976) qui permettra par la suite de fournir de l'énergie lors des premiers stades du développement embryonnaire et larvaire. Cette évolution biochimique semble avoir été partiellement reproduite dans les bacs contenant de l'eau de mer à 15, 20 et 25°C. La diminution régulière des réserves en glycogène, observée précédemment dans les compartiments de faibles températures, se stabilise à partir de 15°C. Ceci laisse supposer un ralentissement de l'utilisation de ces réserves, et sans doute à plus longue échéance, l'accumulation du glycogène dans la chair de l'animal. En effet, la

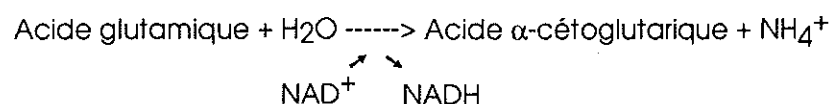
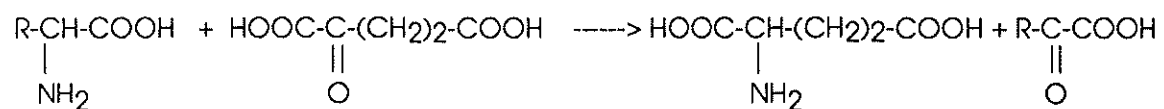
diminution de la teneur en sucres libres de la chair entre 15 et 20°C (qui semble montrer la transformation des sucres en glycogène) et la décroissance de la concentration en glycogène dans l'hémolymphe synchrones à l'augmentation de la concentration en sucres libres (qui laisse supposer le passage des sucres de faible poids moléculaire dans la chair) corroborent cette hypothèse. A 15 et 20°C, températures caractéristiques d'une demande énergétique maximale, les possibilités moindres du catabolisme glucidique entraînent la dégradation d'autres éléments, qui semblent intervenir pour répondre aux besoins métaboliques croissants. On peut noter que :

- La diminution des réserves lipidiques de la chair se poursuit (le pourcentage des lipides s'affaiblit considérablement à 20°C, fig. 3).

- La concentration des lipides dans l'hémolymphe décroît. Ceci semble montrer que leur utilisation est immédiate.

La diminution des éléments protéiques dans l'hémolymphe pourrait être le signe de la conversion des tyrosines et tryptophanes en acides  $\alpha$ -cétoglutariques, réintégrant ainsi le cycle de Krebs. En effet, cette transformation s'effectue par transamination : en dehors des processus cataboliques particuliers à chaque acide aminé, la production d'ammoniaque est liée à l'action de transaminases spécifiques. Ceci permet à l'azote aminé de parvenir jusqu'à l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique.

Acide aminé + acide  $\alpha$ -cétoglutarique  $\longrightarrow$  acide glutamique + R-CO-COOH



L'ammoniaque ainsi formée est excrétée. Ces voies de dégradation permettent aux acides aminés, qui n'ont pas été utilisés pour des synthèses protéiques, d'intégrer le cycle de Krebs pour fournir de l'énergie assimilable par l'animal.

Dans le milieu naturel, à partir du mois de juillet, la vitellogenèse semble dominer peu à peu l'accumulation des réserves glucidiques. Celles-ci semblent être utilisées pour l'élaboration des lipides de réserve des ovocytes (Goddard et Martin, 1966 ; Giese, 1969 ; Gabbott, 1975, 1983). Cette évolution peut être observée en comparant les bacs contenant de l'eau de mer à 20 et 25°C. La diminution régulière des lipides constatée aux températures précédentes, est amortie à partir de 20°C (le pourcentage des lipides augmente à cette température, fig.3). De plus, la teneur en glycogène de la chair se stabilise, suggérant l'arrêt de son accumulation ou sa conversion en lipides lors de la vitellogenèse (Masumoto et al., 1934 ; Goddard et Martin, 1966). En outre, l'évolution des concentrations dans l'hémolymphe (diminution des lipides et du glycogène, augmentation des sucres libres) tend à montrer le transfert de ces éléments vers les gamètes. Ce flux ne semble pas être compensé par un apport provenant du milieu expérimental. Cependant, Thompson (1977) a constaté lors de son étude sur la composition biochimique de la coquille saint-jacques *Placopecten magellanicus*, que les niveaux des différents constituants augmentent dans le plasma durant la période de croissance et de maturation de la gonade. Ceci suggère que la forte demande en éléments pendant la vitellogenèse est probablement responsable des concentrations importantes des métabolites dans le plasma. Cette hypothèse n'est pas observée pour les huîtres "frisées" acclimatées à 15, 20 et 25°C. La diminution des concentrations du glycogène et des lipides de l'hémolymphe laisse supposer une insuffisance de la nourriture disponible, et donc, un apport extérieur très faible pour compenser les besoins de l'organisme.

L'augmentation des LPS entre 20 et 25°C dans l'hémolymphe pourrait être liée à l'activation des cellules neurosécrétrices au début de la vitellogenèse (Lubet, 1983). En effet, ces cellules sécrètent des peptides qui agissent comme des hormones en diffusant dans

l'hémolymphe, ce qui modifie l'activité du métabolisme en l'orientant vers l'accumulation de réserves lipidiques lors de la vitellogenèse.

### ***Les huîtres "lisses"***

L'évolution de la composition biochimique des huîtres "lisses" pourrait être identique à celle des "frisées" : ses variations sont liées au cycle de reproduction. Cependant, lorsque les huîtres "lisses" ont été prélevées en Bretagne, la plupart était bloquée en fin de gamétogenèse. Ceci leur permet de passer l'hiver en résorbant les ovocytes, où les réserves lipidiques sont accumulées. De ce fait, l'acclimatation à différentes températures a permis d'observer la dégradation des lipides, nécessaire à la survie de l'animal, pour subvenir à ses besoins énergétiques.

Bien que l'évolution des concentrations des protéines, lipides et glycogène dans l'hémolymphe soit globalement semblable à celle des huîtres "frisées", les variations de ces éléments dans la chair et celles des sucres libres dans l'hémolymphe suggèrent des modifications du métabolisme entre les deux races d'huîtres suivant les températures. En effet, les bacs contenant de l'eau de mer à 5 et 10°C, températures hivernales, semblent montrer l'accumulation de protéines, de lipides et de glycogène dans la chair de l'animal, parallèlement à la diminution respective de chaque élément dans l'hémolymphe, contrairement aux observations des huîtres "frisées" dont les faibles températures se caractérisent essentiellement par l'utilisation des réserves.

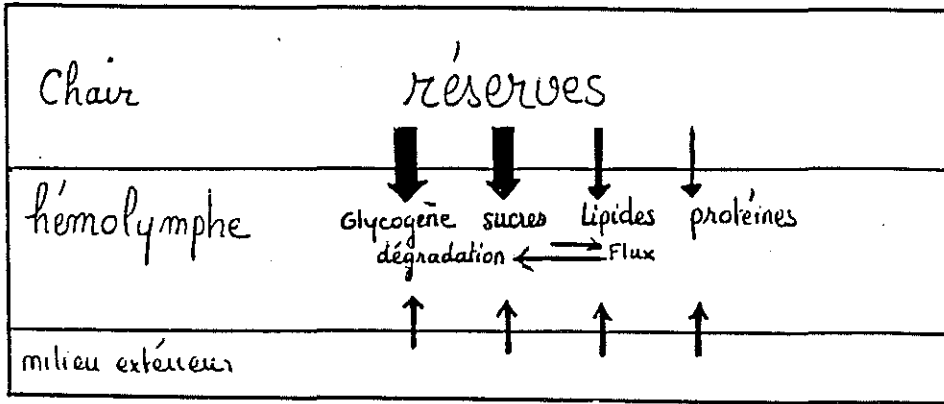
A partir de 15°C, La diminution brutale du glycogène de la chair et l'augmentation intense des sucres libres de l'hémolymphe suggèrent le passage d'un métabolisme essentiellement basé sur les réserves lipidiques, vers le catabolisme glucidique, afin de préparer la vitellogenèse qui détermine l'accumulation des lipides dans les ovocytes en maturation, observée dans les bacs expérimentaux contenant de l'eau de mer à 20 et 25°C.

## **CONCLUSION**

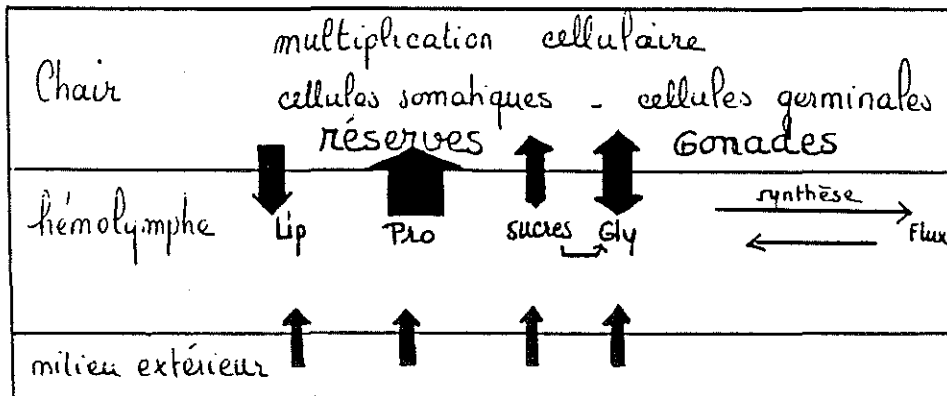
A partir de ses observations et interprétations, le comportement physiologique de l'huître *C. gigas*, intimement lié à l'évolution biochimique de la chair et de l'hémolymphe, pourrait être décrit en trois phases principales, partiellement reproduites dans le milieu expérimental :



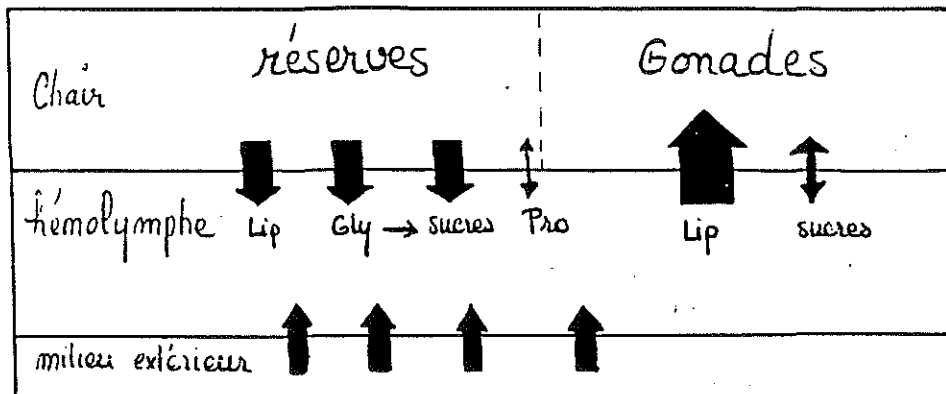
Hiver : catabolisme des réserves pour la survie de l'animal



Printemps : mobilisation énergétique intense, croissance et début de la gamétogénèse



été : demande énergétique maximale, gamétogénèse et vitellogénèse.



## **PERSPECTIVES**

L'évolution des éléments constitutifs de la chair et des métabolites circulant dans l'hémolymphe, analysés par des méthodes de dosages globaux, a permis d'interpréter de façon superficielle les variations biochimiques saisonnières.

Il est très difficile de comprendre les fluctuations des concentrations des éléments de l'hémolymphe sans connaître le sens et l'intensité des flux. Par la suite, il serait donc intéressant de réaliser le même protocole expérimental sur des animaux à jeûn (restreints au catabolisme de leurs réserves) pour faciliter les observations de l'évolution des constituants du plasma.

En outre, on peut se demander comment s'effectue le transfert des éléments entre la chair et l'hémolymphe. Il serait donc bon de rechercher si les métabolites de poids moléculaire important (glycogène, lipides) peuvent traverser directement les parois membranaires séparant les cellules de l'hémolymphe, ou s'ils doivent être dégradés en petites molécules pour se restructurer par la suite d'un côté ou de l'autre de la membrane.

## BIBLIOGRAPHIE

Alzieu C., Heral M., Thibaud Y., Dardignac M.J., Feuillet M., 1982 - Influence des peintures antisalissures à base d'organo-stannique sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 45(2) : 101-116

Bass E.L., 1977 - Influences of temperature and salinity on oxygen consumption of tissues in the American Oyster (*Crassostrea virginica*). Comp. Biochem. Physiol., 58 B : 125-130.

Bayne B.L., 1973 - Physiological changes in *Mytilus edulis* L. induced by temperature and nutritive stress. J. mar. biol. Ass. U.K., 53 : 39-58.

Berthomé J.P., Prou J., Bodoy A., 1986 - Performances de croissance de l'huître creuse *C. gigas* (Thunberg) dans le bassin d'élevage de Marennes-Oléron entre 1979 et 1982. Haliotis, 15 : 183-192.

Bligh E.G., Dyer W.F., 1959 - A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J. Biochem. Physiol., 37 : 911-917.

Bougrier S., Grizel H., Deltreil J.P., 1986 - Crossing influence on shape and structure of oyster shells. Aquaculture, 57(Abstract) : p. 365.

Chew K.K., Beattie J.M., Donaldson J.D., 1985 - Bivalve molluscs hatchery techniques, maturation and triggering of spawning. In Aquaculture Internat., Seminar Shellf. Cult. Manag. La Rochelle, march 1985, IFREMER-Paris ed.: 229-248.

Collicutt J.M., Hochachka P.W., 1977 - The anaerobic oyster heart : coupling of glucose and aspartate fermentation. J. comp. Physiol., 115 : 147-157.

Comely C.A., 1974 - Seasonal variations in the flesh weights and Biochemical content of the scallop *Pecten maximus* L. in the Clyde sea area. J. Cons. int. Explor. Mer., 35 (3) : 281-295.

Dardignac M.J., 1985 - La mytiliculture traditionnelle. In Aquaculture vol. 1, Technique et document, Ed. Lavoisier : 283-343.

Deslous-Paoli J.M., 1982 - Croissance et qualité de l'huître *C. gigas* (Thunberg) en élevage dans le bassin de Marennes-Oléron. Thétys, 10 (4) : 365-371.

Deslous-Paoli J.M., 1985 - Assessment of energetic requirements of reared molluscs and of their main competitors. In Aquaculture Internat. Seminar Shellf. Cult. Manag., La Rochelle, march 1985, IFREMER-Paris ed.: 319-346.

Deslous-Paoli J.M., Héral M., 1988 - Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. Aquat. Living Resour., 1: 239-249.

Deslous-Paoli J.M., Zanette Y., Héral M., Massé H., Garnier J., 1982 - Amélioration de la forme et de la qualité de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg dans les claires de Marennes-Oléron. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 45 (3) : 181-194. 1981 (1982).

De Zwaan A., 1983 - Carbohydrate catabolism in bivalves. In the Mollusca, Wilbur K.M. ed., Academic Press. Inc., vol: 1 : 137-175.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebecs P.A., Smith F., 1956 - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28 : 350-356.

Fisher W.S., Newell R.I.E., 1986 - Seasonal and environmental variation in protein and carbohydrate levels in the hemolymph from American Oysters *C. virginica*. Comp. Biochem. physiol., 85 (2) : 365-372.

Gabbott P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs : a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. Proc. 9th Europ. mar. biol. symp., Barnes H. Ed., Aberdeen Univ. Press. : 191-211.

Gabbott P.A., 1976 - Energy metabolism. In Marine mussels. Their ecology and physiology, Bayne B.L. Ed., Cambridge Univ. Press. : 293-355.

Gabbott P.A., 1983 - Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In the Mollusca, Wilbur K.M. ed., Academic Press. London, 2 : 165-217.

Gerdes D., 1983 - The pacific oyster *Crassostrea gigas*. Part II. Oxygen consumption of larvae and adults. Aquaculture, 31 : 221-231.

Giese A.C., 1969 - A new approach to the biochemical composition of the molluscs body. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 7 : 175-229.

Goddard C.K., Martin A.W., 1966 - Carbohydrate metabolism. In Physiology of Mollusca, Wilbur et Youge ed., Academic Press, New-York, London, 2 : 275-308.

Hatanaka M., 1940 - Chemical composition of the oyster, *Ostrea gigas* Th. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 9 (1) : 21-26.

Héral M., 1985. Evaluation of the carrying capacity of molluscan shellfish ecosystem. In Aquaculture. Internat. Seminar Shellf. Cult. Manag., La Rochelle, march 1985. IFREMER-Paris ed.: 297-318.

Héral M., Deslous-Paoli J.M., Prou J., 1986b - Dynamique des productions et des biomasses des huîtres creuses cultivées dans le bassin de Marennes-Oléron depuis un siècle. Note C.I.E.M. F. 41.

Héral M., Prou J., Deslous-Paoli J.M., 1986a - Influence des facteurs climatiques sur la production conchylicole du bassin de Marennes-Oléron. Haliotis, 15 : 193-207.

Héral M., Razet D., Deslous-Paoli J.M., Berthomé J.P., Garnier J., 1983 - Caractéristiques saisonnières de l'hydrologie du complexe estuarien de Marennes-Oléron (France). Rev. Trav. Pêches marit., 46 : 97-119.

Imai T., Sakai S., 1961 - Study of breeding of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Tohoku J. Agr. Res., 12(2) : 125-171

Jeng S.S., Hsu S.Y., Wang G.S., 1979 - Chemical composition of Taiwan's oysters and clams. Bull. Int. Zool. Acad. Sinica, 18 (1) : 2-10.

Lowry O.M., Roseborough N.I., Farrand A.L., Randall R.J., 1951 - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 263-275.

Lubet P.E., 1983 - Experimental studies on the action of temperature on the reproductive activity of the mussel (*Mytilus edulis* L., Mollusca, Lamellibranchia). J. Moll. Stud., Suppt. 12A : 100-105

Lubet P.E., Herlin P., Mathieu M., Collin F., 1976 - Tissu de réserves et cycle sexuel chez les lamelliibranches. Haliotis, 7 : 59-62

Mann R., 1979 - Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis on *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperature. J. mar. biol. Ass. U.K., 59 : 95-110.

Marsh J.B., Weinstein D.B., 1966 - Simple charring method for determination of lipid. J. Lip. Res., 7 : 574-576.

Masumoto B., Masumoto M., Hibino M., 1934 - Biochemical studies of Magaki (*Ostrea gigas* Thunberg) II. The seasonal variation in chemical composition of *Ostrea gigas* Thunberg. J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. 4A : 47-56.

Nakamuro K., Morimoto K., Inui M., Ishibashi S., 1980 - Basic biochemical studies on metabolism in the oyster. Properties of oyster hexotinas and its sensitivity to mercury compounds. Eisi Kagaku, 26 : 174-180.

Percy J.A., Marcus T.R., 1971 - Influence of environmental factors on respiration of excised tissues of American oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Can. J. Zool., 49 : 353-360.

Riley R.T., 1976. Changes in the total protein, lipid, carbohydrate, and extra-cellular body fluid free amino acids of Pacific oyster *Crassostrea gigas*, during starvation. Proc. nat. Shellfish. Ass., 65 : 84-90.

Swift M.L., Ahmed M., 1983 - A study of glucose, Lowry positive substances, and triacylglycerol levels in the hemolymph of *Crassostrea virginica* (Gmelin). J. Shellfish Res., 3 : 45-50.

Thompson R.J., 1977 - Blood chemistry, biochemical composition, and the annual reproductive cycle in the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, from southeast Newfoundland. J. Fish. Res. Board. Can., 34 : 2104-2116.

Thompson R.J., Bayne C.J., Moore M.N., Carefoot T.H., 1978 - Haemolymph volume, changes in the biochemical composition of the blood, and cytological responses of the digestive cells in *Mytilus californianus* Conrad, induces by nutritional thermal and exposure stress. J. comp. Physiol., 127 : 287-298.

Troadec J.P., Bonnet M., 1985 - The shellfish industry in France. In Aquaculture Internat. Seminar Shellf. Cult. Manag., La Rochelle, March 1985, IFREMER-Paris ed. : 59-82

Widdows J., Bayne B.L., 1971 - Temperature acclimation of *Mytilus edulis* with reference to its energy budget. J. mar. biol. Ass. U.K., 51 : 827-843.

Zaba B.M., 1981 - Glycogenolytic pathways in the mantle tissue of *Mytilus edulis* L.. Mar. Biol. Letters, 2 : 67-74.

Zuburg W., De Zwaan A., 1981 - The role of amino acids in anaerobiosis and osmoregulation in bivalves. J. Exp. Zool., 215 : 315-325.

Zuburg W., Ebbering R.H.M., 1981. The anaerobic energy demand of *Mytilus edulis*. Organ specific differences in ATP. Supplying processes and metabolic routes. Mol. Physiol., 1 : 153-164.

## **ANNEXES**

Dosages biochimiques sur la chair et l'hémolymphe

**Dosage colorimétrique des Protéines**  
**par la méthode de Lowry et al. (1951)**

Principe

La méthode de Lowry permet de doser les liaisons amides des protéines et les acides aminés: tyrosine et tryptophane.

Cette méthode (10 fois plus sensible que le Biuret) se caractérise par la formation d'un complexe cuivrique des protéines qui réduit le phosphomolybdate en milieu basique (apparition d'une coloration bleu violacée).

Extraction

- La chair est congelée puis lyophilisée
- Broyer jusqu'à l'obtention d'une poudre fine
- Peser environ 10 mg de chair sèche dans un tube cristal de 10 ml
- Ajouter 10 ml de NaOH 1N, boucher le tube
- Mettre 30 mn à 60°C, ou une nuit à température ambiante

Courbe étalon

- Faire une courbe étalon dans NaOH 1N avec de l'albumine de boeuf, de 0 à 500 µg/ml. En prendre 0,5 ml. Les résultats sont exprimés en mg équivalent albumine de boeuf.



### Solutions de dosages

- Solution A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2% dans NaOH 0,1N
- Solution B:  $\text{CuSO}_4$  à 0,5% dans  $\text{H}_2\text{O}$  distillée
- Solution C: Tartrate de sodium et potassium à 1% dans  $\text{H}_2\text{O}$  distillée
- Solution D: 100 ml de solution A + 2 ml de solution B + 2 ml de solution C
- Solution E: Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 2 fois (0,5N)

### Mode opératoire

- Mettre dans un tube cristal de 10 ml:
  - 0,5 ml de la dilution échantillon ou étalon
  - 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N pour ramener à pH neutre
  - 5 ml de la solution D
- Après 10 mn à température ambiante, ajouter 0,5 ml de la solution E et homogénéiser aussitôt
- Laisser 1 h 30 mn à température ambiante afin que la coloration atteigne son maximum
- S'il se produit un précipité blanc, le faire disparaître soit par addition de 1 ml de tricitrate de sodium (280 g/l) ou de EDTA à 0,05N (en tenir compte pour le calcul final) soit par centrifugation à 3000 tr/mn
- Mesurer la densité optique à 750 nm

Les protéines de l'hémolymphe sont dosées sur 50  $\mu\text{l}$  de plasma sans extraction à la soude.

**Dosage colorimétrique des Lipides**  
**par la méthode de Marsh et Weinstein (1959)**

Principe

La méthode de Marsh et Weinstein repose sur l'oxydation de la matière organique en milieu acide, et n'est pas spécifique des lipides, mais de l'ensemble du matériel liposoluble. L'obtention d'un extrait lipidique sans contaminants est donc essentielle à une bonne estimation des lipides. Bligh et Dyer (1959) ont développé une méthode d'extraction et de purification qui utilise un mélange ternaire monophasique (chloroforme/méthanol absolu/eau) suivi d'un mélange ternaire biphasique par addition d'eau.

Extraction et purification (Bligh et Dyer, 1959)

- La chair est congelée puis lyophilisée
- Broyer jusqu'à l'obtention d'une poudre fine
- Peser environ 10 mg de chair sèche dans un tube en verre de 10 ml
- Ajouter 1 ml de chloroforme et 2 ml de méthanol absolu
- Homogénéiser
- Centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn
- Soutirer le surnageant dans un tube en verre de 10 ml
- Répéter l'opération une seconde fois
- Séparer les 2 phases par adjonction de 4 ml d'H<sub>2</sub>O distillée
- Centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn
- Soutirer et jeter la phase supérieure (la mousse blanche à l'interface des 2 phases est due aux phospholipides)
- Evaporer le chloroforme à 40°C sous azote

### Courbe étalon

- Faire une courbe étalon dans du chloroforme avec du tripalmitate, de 0 à 1500  $\mu\text{g/ml}$ . Evaporer le chloroforme. Les résultats sont exprimés en mg équivalent albumine de boeuf.

### Solutions de dosage

- $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré
- $\text{H}_2\text{O}$  distillée

### Mode opératoire

- Ajouter sur le culot après séchage, 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré
- Développer la coloration 20 mn à  $200^\circ\text{C}$
- Refroidir rapidement dans un bain de glace
- Transvaser 2 ml de la solution obtenue dans un tube à hémolyse en verre
- Ajouter rapidement 3 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée
- Refroidir
- Homogénéiser
- Lire la densité optique à 360 nm

Les lipides de l'hémolymphe sont dosés sur 200  $\mu\text{l}$  de plasma directement par 2 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$ . *après extraction*

**Dosage colorimétrique des Sucres**  
**par la méthode de Dubois et al. (1956)**

Principe

Le dosage de Dubois s'appuie sur la formation de furfural ou d'hydroxyméthyl furfural en présence d'un acide minéral fort ( $H_2SO_4$ ). Ces composés réagissent avec le phénol pour donner un complexe coloré (apparition d'une coloration jaune orangée).

Extraction

- La chair est congelée puis lyophilisée
- Broyer jusqu'à l'obtention d'une poudre fine
- Peser environ 10 mg de chair sèche dans un tube à hémolyse en verre
- Délipider (méthode de Bligh et Dyer, Cf. dosage des lipides)
- Effectuer une extraction du culot de chair délipidée et séchée avec 3 ml d'acide trichloroacétique à 15% pendant 1 h à 4°C
- Homogénéiser, puis centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn
- Pipetter 0,5 ml du surnageant dans un tube en verre ou en polypropylène pour le dosage des sucres totaux
- Pipetter 0,5 ml du surnageant dans un tube en verre ou en polypropylène, ajouter 4 ml d'éthanol absolu pour précipiter le glycogène, centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn, jeter le surnageant, ajouter 0,5 ml d' $H_2O$  distillée bouillante

### Courbe étalon

- Faire une courbe étalon dans H<sub>2</sub>O distillée (ou TCA à 15%) avec du glucose, de 0 à 500 µg/ml. En prendre 0,5 ml. Les résultats sont exprimés en mg équivalent glucose.

### Solutions de dosage

- Phénol à 5%
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré

### Mode opératoire

- Sur les 0,5 ml de solution à doser, ajouter 1 ml de phénol
- Laisser reposer 40 mn à température ambiante
- Ajouter 5 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré
- Homogénéiser aussitôt
- Laisser reposer 10 mn à température ambiante
- Centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn s'il y a un précipité
- Lire la densité optique à 490 nm

La teneur en sucres libres (sucres réducteurs non glycogène) est la différence entre les sucres totaux et le glycogène.

Les sucres de l'hémolymphe sont dosés sur 100 µl de plasma sans extraction au TCA.