THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Mention : Biologie Marine
École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Myrina BOULAIS

Préparée à Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

Métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse (*Crassostrea gigas*)

Thèse soutenue le 11 décembre 2014
devant le jury composé de :

Mme Catherine LABBE
Chargé de Recherche (HDR), INRA / Rapporteur
M. Gary WIKFORS
Directeur de Recherche, NOAA / Rapporteur
M. Jean-Charles MASSABUAU
Directeur de Recherche, CNRS / Examinateur
M. Edouard KRAFFE
Maître de conférence, UBO / Examinateur
M. Pierre BOUDRY
Cadre de Recherche (HDR), Ifremer / Directeur de thèse
M. Philippe SOUDANT
Directeur de Recherche, CNRS / Directeur scientifique
M. Marc SUQUET
Cadre de Recherche, Ifremer / Directeur Scientifique

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Ecole doctorale des Sciences de la Mer

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Mention : Biologie Marine

Présentée et soutenue publiquement par
Myrina BOULAIS
Le 11 décembre 2014

Métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse (*Crassostrea gigas*)

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer)

JURY :

Mme Catherine LABBE	Chargé de Recherche (HDR), INRA	Rapporteur
M. Gary WIKFORS	Directeur de Recherche, NOAA	Rapporteur
M. Jean-Charles MASSABUAU	Directeur de Recherche, CNRS	Examinateur
M. Edouard KRAFFE	Maître de conférence, UBO	Examinateur
M. Pierre BOUDRY	Cadre de Recherche (HDR), Ifremer	Directeur de thèse
M. Philippe SOUDANT	Directeur de Recherche, CNRS	Directeur scientifique
M. Marc SUQUET	Cadre de Recherche, Ifremer	Directeur scientifique

Avant-propos

Cette thèse s'est déroulée au sein de l'UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), dans ses implantations du Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR) et du département de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins de l'Ifremer de Brest (PFOM/LPI). Un des objectifs du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés est de développer les recherches sur les principales fonctions physiologiques des invertébrés marins, telles que la reproduction, la croissance et la survie. Le laboratoire dispose d'une écloserie expérimentale, située à Argenton (Finistère), dont l'objectif est l'amélioration des techniques d'élevage (culture des algues et des larves en continu) et de la qualité des juvéniles produits. Cette thèse s'intègre dans le cadre du programme européen Reproseed (FP7-KBBE-2009-3), coordonné par Jean-Louis Nicolas et ayant pour objectif l'amélioration des techniques d'écloserie de quatre espèces de bivalves marins, l'huître creuse, la coquille S^t Jacques *Pecten maximus*, la moule *Mytilusedulis* et la palourde européenne *Ruditapesdecussatus*. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont bénéficié du soutien financier de l'Ifremer (Institut Français de Recherches pour l'Exploitation de la Mer) et de la Région Bretagne.

Remerciements

Je remercie la région Bretagne et l'Ifremer pour avoir financé mes trois années de thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de cette thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Catherine Labbé et Gary Wikfors pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi qu'à Jean-Charles Massabuau et Edouard Kraffe pour leur participation au jury.

Un grand merci aux membres de mon comité de thèse pour leurs disponibilités et leurs précieux conseils. Merci donc à Charlotte Corporeau, Nelly Le Goïc, Kristell Kellner, Caroline Fabioux, Christian Fauvel et Edouard Kraffe.

Je suis reconnaissante à Marianne Alunno-Bruscia et à Pierre Boudry, responsables respectifs du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés et de l'Unité de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins de l'Ifremer, qui m'ont intégrée dans leur équipe de recherche et m'ont donné les moyens matériels et financiers de réaliser ce travail. Je souhaite également remercier Olivier Ragueneau, directeur du Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, pour m'avoir accueillie au moment de la rédaction de ma thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Pierre Boudry, ainsi que mes deux co-encadrants, Marc Suquet et Philippe Soudant. Merci pour votre confiance, vos nombreux conseils, votre disponibilité et votre gentillesse. Grâce à vous, j'ai beaucoup appris sur le plan professionnel et personnel au cours de ces trois années. Ce fût un réel plaisir de travailler avec vous.

J'exprime mes sincères remerciements à toute l'équipe du Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR) pour leur aide, leur passion et leur bonne humeur. Je tiens à remercier tout particulièrement l'équipe du site expérimental d'Argenton pour la gestion de la partie expérimentale de ma thèse.

Je suis reconnaissante à Gaëlle Simon, de la plateforme RMN de l'Université de Bretagne Occidentale pour sa participation à mon projet et ses précieux conseils.

Au cours de ma thèse, j'ai été formée à de nouvelles techniques à l'Institut de Recherche en Pisciculture et en Hydrobiologie de l'Université de Bohême du Sud en République-Tchèque. Merci à Jacky Cosson, Boris Dzyuba et Otomar Linhart pour leur accueil et leurs nombreux conseils.

Enfin, un merci tout particulier à mes amis et à ma famille pour leur soutien à la réalisation de ma thèse.

Sommaire

Liste des abréviations……...7

Liste des figures et tableau…….9

Introduction……...11

1. Le métabolisme énergétique cellulaire 11

1.1- La molécule d'ATP 11

1.2- Les réactions centrales du catabolisme cellulaire 11

1.2.1- Le métabolisme du glucose 12

1.2.1.1- La glycolyse anaérobie : du glucose au pyruvate 12

1.2.1.2- La glycolyse aérobie : du pyruvate à l'acétyl-CoA 13

1.2.2- L'oxydation des acides gras : des lipides à l'acétyl-CoA 13

1.2.3- Le catabolisme des acides aminés : des protéines à l'oxaloacétate 14

2. Le métabolisme énergétique mitochondrial 15

2.1- La mitochondrie : structure 15

2.2- La mitochondrie : fonctions 16

2.2.1- Le cycle de Krebs 16

2.2.2- La phosphorylation oxydative 17

2.2.2.1- Les éléments du système de phosphorylation oxydative 17

2.2.2.2- L'oxydoréduction ou le transfert d'électrons 18

2.2.2.3- La phosphorylation oxydative 19

2.3- Le bilan en ATP des substrats énergétiques 20

3. Les phosphagènes 22

3.1- Fonctions des phosphagènes 22

3.2- Répartition des phosphagènes dans le règne animal 24

4. Le métabolisme énergétique du spermatozoïde 26

4.1- Le spermatozoïde 26

4.2- Structure et fonctionnement du flagelle 26

4.3- Métabolisme du spermatozoïde 28

4.3.1- Métabolisme des espèces à fécondation interne 28

4.3.2- Métabolisme des espèces à fécondation externe 30

5. Modèle biologique, l'huître creuse Crassostrea gigas 33

5.1- Systématique, répartition et habitat 33

5.2- Origine de l'ostréiculture de l'huître creuse 34

5.3- Anatomie 34

5.4- Reproduction 36

5.4.1- La gonade 36

5.4.2- Déroulement de la gamétogenèse 37

5.4.3- La fécondation et le développement embryonnaire 42

5.5- Caractéristiques biologiques des gamètes de l'huître creuse 44

5.5.1- L'ovocyte 44

5.5.2- Le spermatozoïde 44

6. Problématique de l'étude 47

Chapitre 1 : Evolution des caractéristiques cellulaires et biochimiques au cours de la phase de mouvement du spermatozoïde d'huître creuse 49

Chapitre 2 : Rôle de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative dans la production d'ATP du spermatozoïde d'huître creuse 63

Chapitre 3 : Analyse des métabolites par RMN au cours de la phase de mouvement du spermatozoïde d'huître creuse 81

Chapitre 4 : Implication du métabolisme énergétique dans le succès à la fécondation du spermatozoïde d'huître creuse 99

Discussion générale et perspectives…….115

Conclusion……...120

Bibliographie……...123

Annexes……...135

Liste des abréviations

^{31}P-RMN : ^{31}P-Résonance Magnétique Nucléaire

α-CA : α-cétoacide

AA : acides aminés

Acétyl-CoA : acétyl-coenzyme A

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AG : acides gras

AK : arginine kinase

AMP : adénosine monophosphate

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ATP : adénosine triphosphate

BCECF: 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein

BSA : sérum albumine bovine

CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone

CEA : charge énergétique adénylique

CK : créatine kinase

C I : complexe I

C II : complexe II

C III : complexe III

C IV : complexe IV

Cu : cuivre

DMSO : diméthyl sulfoxyde

E°' : potentiel rédox

FAD : flavine adénine dinucléotide

FADH2 : forme réduite du FAD

FCCP : carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone

Fer ferreux : Fe^{2+}

Fer ferrique : Fe^{3+}

FMN : flavine mononucléotide

GSCs : cellules germinales souches

H-89 : 5-isoquinoline-sulfonamide

IBMX : 3-Isobutyl-1-methylxanthine

NAD : nicotinamide adenine dinucleotide

NAD^+ : forme oxydée du NAD

$NADH,H^+$: forme réduite du NAD

OXPHOS : phosphorylation oxydative

PA : phosphoarginine

PCr : phosphocréatine

PKA : protéine kinase A

PME : phosphomonoesters

PDE : phosphodiesters

PMM : potentiel membranaire mitochondrial

Pi : phosphate inorganique

RMN : résonance magnétique nucléaire

TG : triglycérides

Liste des figures et tableau

Figure 1 : Les réactions de la glycolyse. D'après Hecketsweiler et Hecketsweiler (2012) 12

Figure 2 : La β-oxydation. D'après Hecketsweiler et Hecketsweiler (2012) 13

Figure 3 : Structure d'une mitochondrie vue en coupe.
D'après http://animalcellbiology.wordpress.com/ 15

Figure 4 : Les réactions du cycle de Krebs. D'après Hecketsweiler et Hecketsweiler (2012) 17

Figure 5 : Représentation schématique de la chaîne de transfert des électrons, incluant la représentation du trajet des électrons (flèches bleues) et du pompage de protons (H^+, flèches vertes) à travers la membrane interne, et le retour de ceux-ci dans la matrice. La différence de potentiel membranaire mitochondrial (PMM) de part et d'autre de la membrane interne est symbolisée par le triangle bleu 18

Figure 6 : Schéma de la navette phosphocréatine. D'après Rivière (2011) 23

Figure 7 : Coupe schématique d'un axonème. D'après site Cytosquelette 27

Figure 8 : Détail du fonctionnement du moteur « dynéine ». L'étape énergétique du moteur se situe entre b et c, où a lieu l'hydrolyse de l'ATP qui permet l'extension du bras de dynéine. D'après Cosson (1992) 27

Figure 9 : L'huître creuse *Crassostrea gigas* fermée (A) et ouverte, valve droite enlevée (B) 33

Figure 10 : Anatomie générale de l'huître creuse *Crassostrea virginica* dans sa valve gauche. Les axes d'orientation de l'animal sont indiqués en caractères gras. D'après Galtsoff (1964) et Fabioux (2004) 35

Figure 11 : L'huître creuse *Crassostrea gigas*, valve droite enlevée, à maturité 36

Figure 12 : Développement des cellules germinales de l'huître creuse Crassostrea gigas au stade adulte. Les zones oranges représentent la localisation des cellules germinales souches (GSCs) et les cellules germinales formant la gonade. Les flèches bleues indiquent la prolifération des GSCs. D'après Fabioux, 2004 37

Figure 13 : Organisation des tubules gonadiques mâles et femelles de l'huître creuse *Crassostrea gigas* pendant la gamétogenèse. Représentation schématique de la coupe transversale d'un tubule. GSC : cellule germinale souche.
D'après Fabioux (2004) 38

Figure 14 : Les différentes étapes de l'ovogenèse des mollusques. D'après Fabioux (2004) 39

Figure 15 : Les différentes étapes de la spermatogenèse des mollusques. D'après Fabioux (2004). 39

Figure 16 : Cycle de développement de l'huître creuse. D'après Fabioux (2004) 43

Figure 17 : Photographies en microscopie électronique à balayage (A, B) et à transmission (C) du spermatozoïde d'huître creuse *Crassostrea gigas*. A : Tête du spermatozoïde, B : Quatre mitochondries exposées après démembranation, C : coupe longitudinale du spermatozoïde avant activation dans l'eau de mer (a : acrosome, ab : invagination nucléaire antérieur, ar : bâtonnet axial, n : noyau, m :mitochondrie. D'après Dong *et al.* (2005b) et Suquet *et al.* (2010) 44

Figure 18 : Représentation schématique des mécanismes biochimiques possibles soutenant le mouvement des spermatozoïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas*…….115

Figure 19 : Représentation schématique de la variabilité individuelle de la capacité de fécondation des spermatozoïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas*……..118

Figure 20 : Lipides neutres et polaires du spermatozoïde d'huître creuse mesurés entre 5h et 12h post activation dans l'eau de mer. TG : triglycérides, ST : stérols libres, ALC : alcools, PE : phosphatidylethanolamine, PI : phosphatidylinositol, CL: cardiolipide, PS: phosphatidylsérine, PC : phosphatidylcholine, CAEP : céramide aminoéthylphosphonate……136

Tableau 1 : Distribution des phosphagènes dans le règne animal. PC : phosphocréatine, PA : phosphoarginine, PG : phosphoglycocyamine, PT : phosphotaurocyamine, PHT : phosphohypotaurocyamine, PL : phospholombricine, PO : phosphoophéline, PTh : phosphothalassemine. Adapté de Ellington (2001) 24

Introduction

1. Le métabolisme énergétique cellulaire

Le métabolisme énergétique regroupe l'ensemble des réactions qui s'accompagnent, au sein de la cellule, de la production d'énergie chimique. Cette énergie sera utilisée par la cellule afin d'assurer ses réactions métaboliques de synthèse et de dégradation ainsi que ses nombreux processus physiologiques. Le métabolisme énergétique est un couplage entre anabolisme et catabolisme. L'anabolisme correspond aux réactions de synthèse : des éléments simples (acides gras, glucose ...) sont utilisés pour former des molécules plus complexes (protéines, glycogène ...) en consommant de l'énergie libre utilisable par la cellule, l'adénosine-5'-triphosphate (ATP). Le catabolisme correspond aux réactions de dégradation de macromolécules en éléments simples et permet de libérer de l'ATP.

1.1- La molécule d'ATP

La molécule d'ATP a été découverte en 1929 par Karl Lohmann. L'énergie libérée par la rupture de la liaison phosphate, fait de cette molécule la principale source d'énergie des processus cellulaires et représente la « monnaie énergétique » de la cellule chez tous les organismes vivants connus. Elle a un « turn-over » considérable et sous contrôle des besoins énergétiques, elle est constamment disponible et régénérée (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012).

1.2- Les réactions centrales du catabolisme cellulaire

Le métabolisme d'une cellule comprend de très nombreuses réactions biochimiques permettant de libérer de l'ATP. Une faible part de l'ATP, environ 10 %, est produit dans le cytosol de la cellule à partir de substrats riches en énergie, en particulier au cours de la glycolyse. Lorsque la cellule est maintenue en conditions aérobies, les métabolites que ces voies génèrent (acétylcoA, pyruvate …) et les équivalents réduits ($NADH,H^+$ et $FADH_2$) peuvent être utilisés par la mitochondrie pour fournir une quantité d'ATP nettement supérieure.

1.2.1- Le métabolisme du glucose

1.2.1.1- La glycolyse anaérobie : du glucose au pyruvate

Les glucides ou hydrates de carbone, ont un rôle énergétique majeur. Ils représentent 50 à 55 % de l'apport énergétique d'une cellule et peuvent être stockés sous forme de glycogène. Parmi les trois hexoses (fructose, galactose, glucose), le glucose est l'hexose-clé du métabolisme glucidique. Il est le substrat principal de la glycolyse et le seul substrat à pouvoir produire de petites quantités d'ATP en anaérobiose. Il est donc indispensable aux cellules anaérobies, comme les globules rouges. Le fructose et le galactose doivent être transformés pour intégrer la voie de la glycolyse (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012).

La glycolyse, également appelée voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, est une voie métabolique universelle qui a pour but de transférer et de libérer une partie de l'énergie du glucose. La glycolyse ne nécessite pas l'utilisation de l'oxygène et représente donc la phase anaérobie du métabolisme du glucose. Elle consiste en une série de dix réactions enzymatiques, se déroulant dans le cytosol de la cellule, permettant d'oxyder progressivement une molécule de glucose pour former deux molécules de pyruvate et libérer une faible quantité d'ATP (deux molécules), deux protons et deux $NADH,H^+$ (Figure 1).

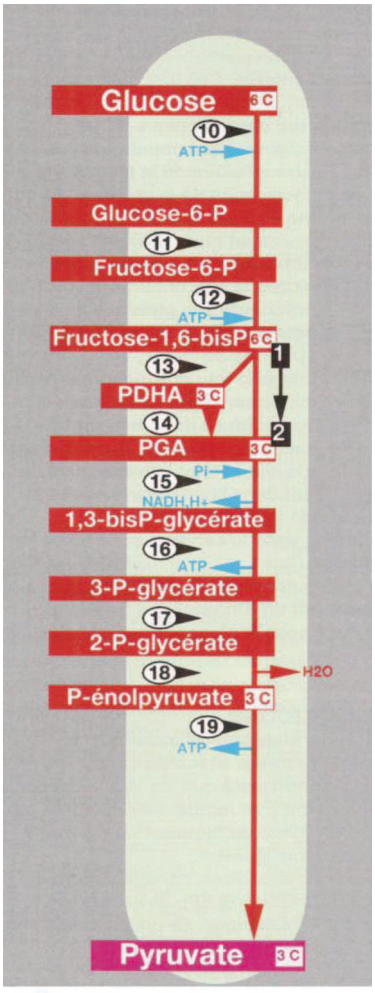


Figure 1 : Les réactions de la glycolyse. D'après Hecketsweiler et Hecketsweiler (2012).

1.2.1.2- La glycolyse aérobie : du pyruvate à l'acétyl-CoA

Le métabolisme du glucose se poursuit par l'oxydation du pyruvate dans la mitochondrie où il pénètre facilement à l'aide d'un transporteur membranaire spécifique. Le pyruvate est oxydé et décarboxylé irréversiblement en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), substrat du cycle de Krebs. Les coenzymes réduits pourront être oxydés par la chaîne respiratoire. En anaérobiose, le pyruvate est réduit en lactate par le $NADH,H^+$ dans le cytosol (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012).

1.2.2- L'oxydation des acides gras : des lipides à l'acétyl-CoA

Chez les vertébrés, les lipides fournissent environ 40% de l'énergie. Les lipides alimentaires contiennent environ 95 % de triglycérides (TG) et 5 % de lipides divers (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012). L'hydrolyse des triglycérides par les lipases conduit à la libération d'un glycérol et de trois acides gras (AG). Les AG libérés sont activés sur un CoA cytosolique en acyl-CoA dans le cytosol, qui servent de substrat à la β-oxydation, dans la mitochondrie. La β-oxydation est la voie la plus énergétique pour la plupart des cellules et se compose d'un cycle de quatre réactions qui raccourcit l'acyl-CoA de deux carbones et libère un acétyl-CoA (Figure 2). Ce cycle se répète n fois, libérant à chaque fois un acétyl-CoA et un acyl-CoA raccourci de deux carbones, qui subira autant de cycles qu'il y a de paires de carbones restantes. Chaque cycle d'oxydation libère une grande quantité d'énergie potentielle : 1 acétyl-CoA + 1 $FADH_2$ + 1$NADH,H^+$. Les acétyl-CoA seront oxydés par le cycle de Krebs et les coenzymes réduits par la chaîne respiratoire (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012).

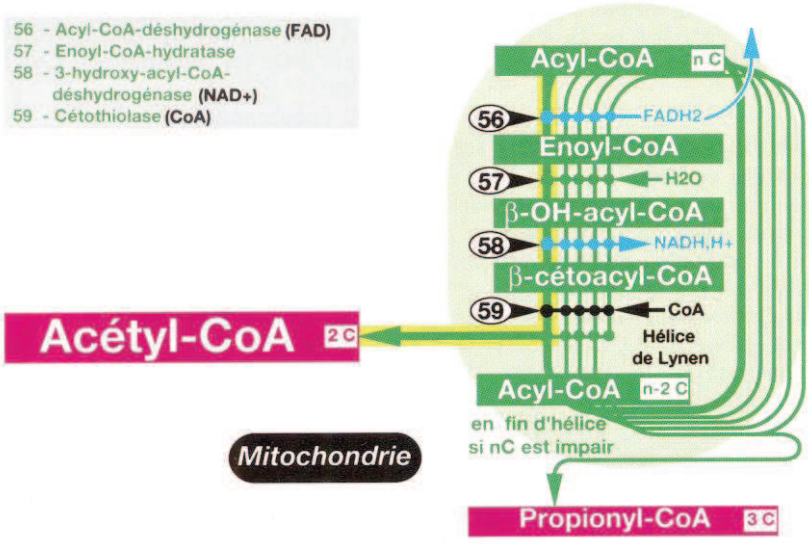


Figure 2 : La β-oxydation. D'après Hecketsweiler et Hecketsweiler (2012).

1.2.3- Le catabolisme des acides aminés : des protéines à l'oxaloacétate

A l'inverse des glucides et des AG qui peuvent être stockés sous forme de glycogène ou de TG, les protéines de l'organisme sont simultanément synthétisées et détruites. La dégradation des protéines intracellulaires est une voie métabolique majeure, car les acides aminés (AA) libérés seront utilisés dans de nombreuses synthèses, comme celle de nouvelles protéines. Les AA libérés représentent également des substrats oxydables par les mitochondries pour la production d'énergie (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012). La dégradation des AA apporte 10% des besoins énergétiques de l'organisme.

Le catabolisme des AA débute par l'élimination de leur fonction aminée $-NH_2$. Elle est catalysée par des transaminases ou aminotransférases qui transfèrent la fonction NH_2 sur l'α-cétoglutarate qui se transforme en glutamate. Cette élimination transforme l'AA en α-CA (α-cétoacide) correspondant, *e.g.* AA+ α-cétoglutarate $\Rightarrow$ α-CA + glutamate. Ces réactions de transfert aboutissent à la formation de grandes quantités de glutamate qui est transporté dans la mitochondrie par un transporteur spécifique, où il est transaminé sur l'oxaloacétate, conduisant à la formation d'aspartate. L'aspartate est ensuite métabolisé en oxaloacétate, substrat oxydé par le cycle de Krebs (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012).

2. Le métabolisme énergétique mitochondrial

Les dégradations primaires mentionnées auparavant permettent la production d'une quantité restreinte d'ATP en conditions anaérobies. Cependant, lorsque la cellule est en conditions aérobies, les métabolites que ces voies génèrent (acétylcoA, pyruvate …) et les équivalents réduits ($NADH,H^+$ et $FADH_2$) peuvent être utilisés par la mitochondrie pour fournir une quantité d'ATP nettement supérieure : 19 fois plus d'ATP par molécule de glucose.

2.1- La mitochondrie : structure

Les mitochondries sont présentes dans toutes les cellules des organismes eucaryotes et occupent 10 à 20 % du volume cellulaire. Leur taille est de l'ordre du micromètre et la plupart des cellules humaines contiennent entre 500 et 2000 mitochondries, mais ce nombre varie en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques. Une mitochondrie est formée de deux compartiments, délimités par une membrane interne et divisant la mitochondrie en quatre sous-parties (Figure 3) :

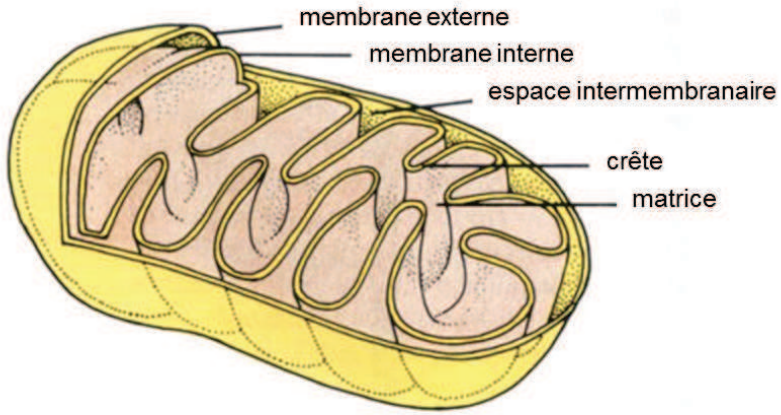


Figure 3 : Structure d'une mitochondrie vue en coupe. D'après site animal cell biology.

La matrice est le compartiment interne de la mitochondrie. Elle est le siège de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs ou l'oxydation des acides gras et contient donc toutes les enzymes nécessaires à ces deux voies. Elle renferme également l'acide désoxyribonucléique (ADN) mitochondrial, des mitoribosomes et des acides ribonucléiques (ARN) de transfert. La membrane interne diffère des autres membranes biologiques de par sa composition. Elle contient environ 80 % de protéines et seulement 20 % de phospholipides. La plupart de ces protéines sont des composants des complexes de la chaîne respiratoire ou de

l'ATP-synthase, impliqués dans la production d'ATP (Becker *et al.*, 2009). La membrane interne possède de nombreux replis qui forment les crêtes mitochondriales, augmentant considérablement sa surface d'échange. C'est au niveau de ces crêtes que sont préférentiellement enchâssés les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP-synthase. L'espace intermembranaire a une composition très proche de celle du cytosol. Il contient une forte concentration en protons qui lui confère une charge positive. La membrane externe est une bicouche lipidique composée d'environ 50 % de protéines et 50% de lipides.

2.2- La mitochondrie : fonctions

Les mitochondries sont les véritables « centrales énergétiques » de la cellule. Dans une cellule eucaryote aérobie, environ 90 % de l'énergie nécessaire est fournie par la mitochondrie (Rolfe et Brown, 1997). Les divers métabolites (acétylcoA, pyruvate …) et les coenzymes réduits ($NADH,H^+$ et $FADH_2$) issus des dégradations primaires peuvent être utilisés par les mitochondries pour fournir de l'ATP. Dans la mitochondrie, la dégradation de l'acétyl-CoA s'y poursuit. Cette molécule joue un rôle crucial dans le métabolisme car c'est le produit commun de la dégradation des nutriments et le principal substrat du cycle de Krebs.

2.2.1- Le cycle de Krebs

Dans les cellules aérobies, le cycle de Krebs est une plateforme commune de catabolisme des substrats énergétiques, qui a lieu dans la matrice mitochondriale. Le cycle de Krebs est un ensemble coordonné de huit réactions qui permet d'extraire l'énergie de l'acétyl-CoA en l'oxydant en deux CO_2 (Figure 4). A chaque fin de cycle, un acétyl-CoA se condense avec l'oxaloacétate pour former du citrate. Le citrate est le premier d'une série de trois acides tricarboxyliques : pour cette raison, le cycle de Krebs est également appelé « cycle de l'acide citrique » ou « cycle tricarboxylique ». D'autres substrats peuvent entrer dans le cycle en aval de l'acétyl-CoA, tel l'α-cétoglutarate, le succinyl-CoA et le fumarate. Une molécule d'acétyl-CoA, dégradée en un tour de cycle, produit une molécule d'ATP, 3 $NADH,H^+$ et $1FADH_2$, principaux substrats de la chaîne respiratoire (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012).

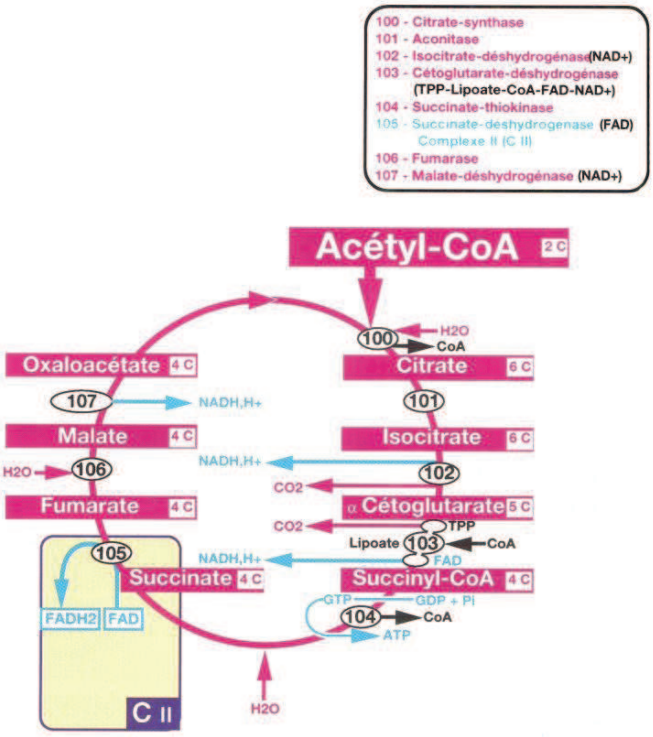


Figure 4 : Les réactions du cycle de Krebs. D'après Hecketsweiler et Hecketsweiler (2012).

2.2.2- La phosphorylation oxydative

Le système de phosphorylation oxydative comporte deux sous-ensembles, la chaîne respiratoire mitochondriale ou chaîne d'oxydoréduction et l'ATP-synthase.

2.2.2.1- Les éléments du système de phosphorylation oxydative

La chaîne respiratoire est un ensemble de quatre protéines enzymatiques, les complexes I (C I), II (C II), III (CIII), IV (CIV), enchâssées dans la membrane interne de la mitochondrie, et de deux éléments mobiles, l'ubiquinone ou coenzyme Q et le cytochrome c (Figure 5). Les complexes transmembranaires protéiques participent au transport des électrons. Le complexe V ou ATP-synthase est un complexe multiprotéique très élaboré, composé de deux parties, la partie F0 située dans la membrane interne et la partie F1, la tête enzymatique, qui fait saillie dans la matrice mitochondriale. Elle est formée de cinq protéines, α, β, γ, δ, ε (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012). Les éléments mobiles assurent la continuité de la chaîne. L'ubiquinone est un lipide composé d'une benzoquinone et d'une chaîne isoprénoïde hydrophobe assurant sa mobilité au sein de la phase lipidique membranaire, entre CI et CII. Le cytochrome c est une petite protéine hydrosoluble, mobile sur la surface externe de la membrane interne, entre CIII et CIV.

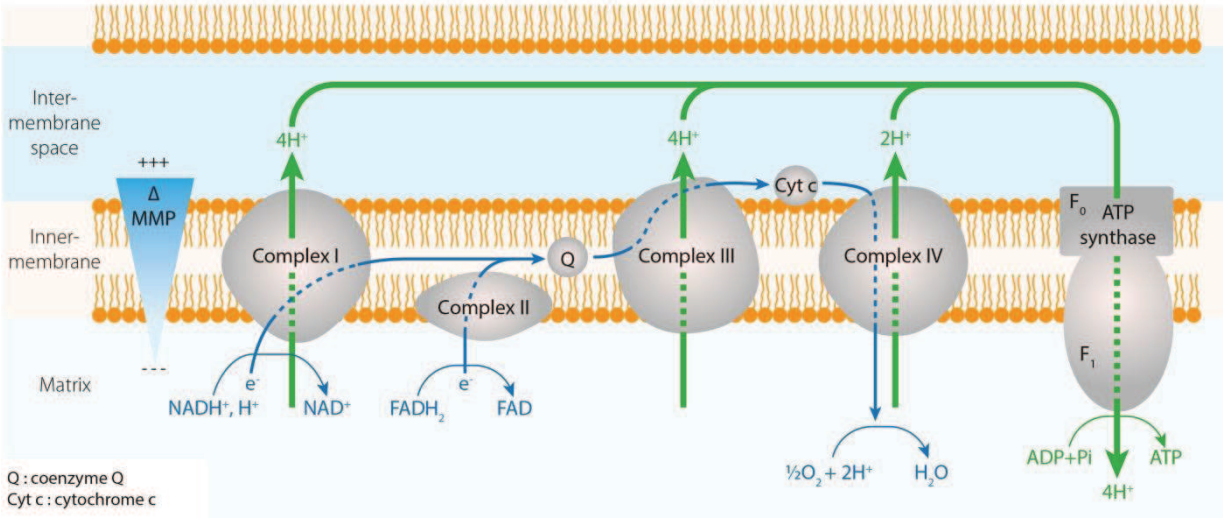


Figure 5 : Représentation schématique de la chaîne de transfert des électrons, incluant la représentation du trajet des électrons (flèches bleues) et du pompage de protons (H^+, flèches vertes) à travers la membrane interne, et le retour de ceux-ci dans la matrice. La différence de potentiel membranaire mitochondrial (PMM) de part et d'autre de la membrane interne est symbolisée par le triangle bleu.

2.2.2.2- L'oxydoréduction ou le transfert d'électrons

La chaîne respiratoire a pour fonction de procéder à l'oxydation contrôlée et progressive des équivalents réducteurs des coenzymes réduits $NADH,H^+$ et $FADH_2$, par transfert de leurs électrons sur un accepteur final, l'oxygène (Figure 5). Les électrons sont transférés de manière fragmentée, un par un, sur l'hème de chaque complexe. Ce transfert du complexe I au complexe IV intervient dans un ordre qui est déterminé par le potentiel rédox (E°') de chacun des complexes de la chaîne de respiration. Il va donc s'établir le long de la chaîne respiratoire un gradient de potentiels d'oxydoréduction et les électrons vont transiter de molécules à faible potentiel (tels que le NAD^+) vers des molécules à fort potentiel (tel que l'oxygène). Le transport des électrons d'un couple rédox au suivant, libère de l'énergie qui est ainsi progressive car fragmentée. Quand elle est suffisamment importante, l'énergie libérée au cours d'une dénivellation engendre un flux de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire (H^+ provient de l'eau cellulaire). Dans le cas contraire, l'énergie est transformée en chaleur contribuant à la thermogenèse. L'énergie générée par le transfert des électrons sur la chaîne d'oxydoréduction permet aux complexes I, III et IV de fonctionner comme des pompes à protons. A partir d'un $NADH,H^+$, le transfert des électrons par la chaîne d'oxydo-réduction provoque trois flux de protons sortant de la matrice et deux flux à partir d'un $FADH_2$, créant de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne, un gradient électrochimique de protons.

Ce gradient comporte une différence de potentiel de membrane mitochondrial (PMM) et une différence de pH (1,4 à 1,5 unités de pH). Par rapport à l'espace intermembranaire et au cytosol, le pH de la matrice mitochondriale est plus élevé et sa charge électrique plus négative (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012).

2.2.2.3- La phosphorylation oxydative

Le processus de phosphorylation oxydative repose sur la théorie chimio-osmotique de Peter Mitchell en 1961 et largement validé depuis, qui formule que l'ATP-synthase peut phosphoryler un ATP à partir d'un ADP (adénosine diphosphate) et d'un Pi (phosphate inorganique) grâce au gradient électrochimique de protons. Les protons éjectés dans l'espace intermembranaire, lors du transfert d'électrons sur la chaîne d'oxydoréduction, tendent à entrer à nouveau dans la matrice sous la pression du gradient électrochimique de protons (Figure 5). Compte-tenu de l'imperméabilité de la membrane interne, ils ne peuvent y pénétrer qu'en empruntant le canal du complexe V ou ATP-synthase. Le gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne, ou force proto-motrice, fait tourner la partie F0 de l'ATP-synthase. Sa rotation entraîne un cycle de transconformations des protéines de la partie F1 de l'ATP-synthase. Les protéines β de la partie F1, activées tour à tour, fixent l'ADP et le Pi, assurent la réaction de synthèse de l'ATP et permettent sa libération dans la matrice mitochondriale (Schon *et al.*, 2001). La partie F1 peut fonctionner à l'envers, déphosphorylant l'ATP en ADP et Pi, à condition que la partie F0 soit supprimée, d'où son ancien nom d'ATPase (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012).

L'oxydation d'un $NADH,H^+$ par la chaîne de respiration mitochondriale génère un flux de dix protons (quatre pour CI, quatre pour CII et deux pour CIV) et l'oxydation d'un $FADH_2$ génère six protons. La formation d'un ATP nécessite un flux de quatre protons. Un $NADH,H^+$ produit donc 2,5 ATP et un $FADH_2$ produit 1,5 ATP. Or traditionnellement on admet que trois ATP sont produits lors de l'oxydation d'un $NADH,H^+$ et deux ATP sont produits lors de l'oxydation d'un $FADH_2$ (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012). L'ATP produit dans la mitochondrie gagne le cytosol grâce à un transporteur mitochondrial qui l'échange contre l'ADP, l'ATP/ADP translocase.

2.3- Le bilan en ATP des substrats énergétiques

L'analyse des réactions cataboliques successives permet de calculer le bilan énergétique du glucose en molécules d'ATP synthétisées. L'oxydation aérobie d'une molécule de glucose produit :

- par la glycolyse, deux molécules d'ATP
- par l'oxydation de deux $NADH,H^+$ issus de la glycolyse, six molécules d'ATP
- par l'oxydation de deux pyruvates en deux molécules d'acétyl-CoA, six molécules d'ATP
- par l'oxydation de deux molécules d'acétyl-CoA par le cycle de Krebs, 24 molécules d'ATP

Ainsi, grâce à la phosphorylation oxydative, une cellule aérobie produit 38 ATP, soit 19 fois plus d'ATP par molécule de glucose qu'une cellule anaérobie produisant uniquement deux molécules d'ATP par la glycolyse (Hecketsweiler et Hecketsweiler, 2012).

3. Les phosphagènes

Les phosphagènes sont des dérivés guanidiliques, découverts dans le muscle en 1927 par Eggleton et dénommés phosphagènes car leur hydrolyse libère une molécule d'acide phosphorique.

3.1- Fonctions des phosphagènes

Les phosphagènes sont des réservoirs de « phosphate à haute énergie » typiquement utilisés par les cellules dont la demande en énergie est fluctuante et importante, tels que les muscles, les neurones ou les spermatozoïdes. De grandes quantités de phosphagènes peuvent être accumulées dans les cellules ou tissus (Eggleton et Eggleton, 1928) et leur concentration est plus élevée que celle des nucléotides adényliques (Beis et Newsholme, 1975). Les guanido-phosphagènes kinases (phosphotransférases) associées aux phosphagènes (système phosphagène/kinase) permettent de réguler les niveaux d'ATP intracellulaires, en stockant et libérant de l'énergie en fonction des besoins cellulaires (Kammermeier, 1987)(Kammermeier, 1993). Ces enzymes catalysent le transfert réversible du groupement γ-phosphate de l'ATP vers l'accepteur guanidilique générant de l'ADP et le phosphagène correspondant selon la réaction suivante :

$MgATP^{2-}$ + composé guanidilique ⇆ $MgADP^{-}$ + phosphagène

Les phosphagènes et leurs kinases sont également impliqués dans le transport d'énergie au sein de la cellule, formant un réseau de distribution d'énergie entre les sites de production d'ATP (mitochondrie et glycolyse) et les sites de consommation (ATPases) (Bessman et Geiger, 1981; Bessman et Carpenter, 1985). Le transport d'énergie par les phosphagènes a été étudié dans le système phosphocréatine/créatine kinase (Figure 6) : la créatine kinase mitochondriale, localisée dans l'espace intermembranaire, catalyse le transfert du groupement γ-phosphate de l'ATP vers la créatine. La phosphocréatine ainsi formée, plus petite que l'ATP, quitte alors la mitochondrie par diffusion. Ainsi la phosphocréatine véhicule "la liaison riche en énergie" jusqu'aux sites utilisateurs où la régénération de l'ATP est alors rendue possible par les kinases créatines cytoplasmiques. La créatine alors libérée peut rediffuser jusqu'à la mitochondrie, bouclant ainsi le circuit.

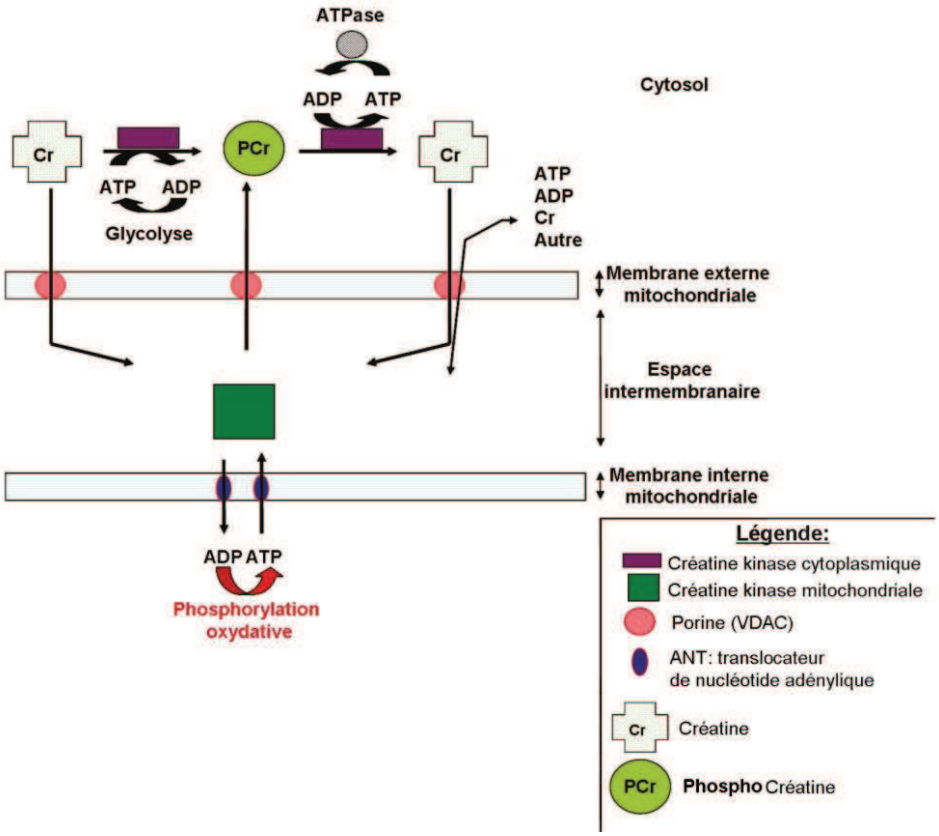


Figure 6 : Schéma de la navette phosphocréatine. D'après Rivière (2011).

Une autre fonction du système phosphagène/kinase est le maintien du rapport ATP/ADP élevé au niveau des sites consommateurs d'énergie (Mainwood et Rakusan, 1982; Jacobus, 1985; Kammermeier, 1993). Inversement, un rapport ATP/ADP faible est maintenu par les enzymes au niveau des sites de synthèse d'ATP, stimulant ainsi sa production. Le système phosphagène/kinase est souvent trouvé dans les cellules polarisées (*i.e.*, les sites de synthèse d'ATP sont localisés à une grande distance de diffusion des sites de consommation), chez lesquelles la diffusion seule de l'ATP ne permet pas le maintien d'un ratio ATP/ADP constant au niveau des ATP-ases et donc leur fonctionnement optimal (Jacobus, 1985; Kammermeier, 1987).

3.2- Répartition des phosphagènes dans le règne animal

Neufs phosphagènes sont actuellement connus : phosphocréatine, phosphoarginine, phosphoglycocyamine, phosphotaurocyamine, phosphohypotaurocyamine, phospholombricine, phosphoophéline et phosphothalassemine (Ellington, 2001).

La phosphocréatine et la phosphoarginine sont très largement distribuées au sein des métazoaires (Tableau 1). Les autres phosphagènes, limités au groupe des lophotrochozoaires (Robin, 1964 ; 1974), ont été découverts plus tardivement et semblent être issus d'un « phosphocreatine like-ancestor ». Certains groupes comme les mollusques contiennent uniquement un type de phosphagène, alors que d'autres groupes comme les échinodermes, possèdent différents phosphagènes. La phosphocréatine est le seul phosphagène présent chez les vertébrés.

Phylum	Subphylum	Phosphagène
Annelida		PA, PT, PHT, PG, PL, PC, PO
Arthropoda		PA
Brachiopoda		PA, PC
Chordata	Tunicata	PA, PC
	Cephalochordata	PA, PC
	Vertebrata	PC
Cnidaria		PA
Echinodermata		PA, PC
Echiura		PL, PC, PTh
Hemichordata		PA, PC
Mollusca		PA
Nematoda		PA
Phoronida		PC
Platyhelminthes		PA
Porifera		PA, PC
Sipuncula		PA, PHT, PC

Tableau 1 : Distribution des phosphagènes dans le règne animal. PC : phosphocréatine, PA : phosphoarginine, PG : phosphoglycocyamine, PT : phosphotaurocyamine, PHT : phosphohypotaurocyamine, PL : phospholombricine, PO : phosphoophéline, PTh : phosphothalassemine. Adapté de Ellington (2001).

Chez les polychètes, échinodermes, tuniciers, sipunculidés, peu importe le phosphagène présent dans les cellules somatiques ou les ovocytes, l'unique phosphagène présent dans les spermatozoïdes est la phosphocréatine (Van Thoai et Robin, 1969; Robin, 1964; 1974; Ellington et Kinsey, 1998 ; Kamp *et al.*, 1995). Avec l'unique exception des spermatozoïdes de deux espèces de polychètes (*Sabella pavonia, Spirographis spallanzani*) (Robin *et al.*, 1975) qui

utilisent la phosphoarginine. L'avantage de l'utilisation de la phosphocréatine chez les spermatozoïdes reste inconnu.

4. Le métabolisme énergétique du spermatozoïde

4.1- Le spermatozoïde

Les spermatozoïdes sont des cellules hautement spécialisées, dont le rôle est de transférer le patrimoine génétique mâle à l'ovocyte lors de la fécondation (Lambert et Battaglia, 1993). Les gamètes mâles sont généralement stockés dans les organes reproducteurs, à l'état immobile et sans capacité de fécondation. Chez de nombreuses espèces animales, l'acquisition de la mobilité (*i.e.*, mouvement généré par les battements du flagelle) ainsi que la mise en place de la réaction acrosomique sont des étapes primordiales pour que le gamète mâle acquiert une capacité de fécondation. L'acquisition de la mobilité passe par un processus appelé capacitation et consiste en une série de réactions biochimiques, au cours desquelles le spermatozoïde subit une maturation spécifique (Tesarik et Testart, 1989). Au terme de ce processus, le gamète mâle devient hyperactif, selon le milieu dans lequel il est incubé et capable d'une ultime modification, la réaction acrosomique (Buffone *et al.*, 2012). Cette dernière étape permettra, par une série de processus enzymatiques, de phénomènes ioniques et de changements structuraux, la fusion du gamète mâle avec le gamète femelle (Buffone *et al.*, 2012).

4.2- Structure et fonctionnement du flagelle

Les flagelles sont des éléments de 10 à 100 µm de long et de 0,3 à 1 µm de diamètre, selon les espèces. Leur structure a été décrite en microscope électronique. Le flagelle est entouré de la membrane plasmique et contient l'axonème. Il est formé de 9 doubles microtubes ou doublets (A et B) d'approximativement 40 nm de diamètre, constituant un cylindre dont le centre est occupé par deux microtubules centraux d'environ 20 nm de diamètres (Figure 7) (Cosson, 1992). Les microtubules sont continus tout au long d'un même flagelle et sont composés de tubulines qui représentent 70 % de la masse totale des protéines de l'axonème. La jonction entre doublets est réalisée par des bras externes et internes. Les doublets sont aussi reliés entre eux par des ponts de nexine et aux microtubules centraux par des rayons (« radial spokes »). La taille des bras externes et internes est approximativement de 50 nm et ces derniers représentent 10 à 15 % de la masse totale des protéines de l'axonème et contiennent les dynéines. Ces dernières sont des protéines enzymatiques (dynéines-ATPases), moteurs des battements du flagelle (Holzbaur et Vallee, 1994; Mitchell, 1994;Vallee, 1993)(Cosson *et al.*, 2001).

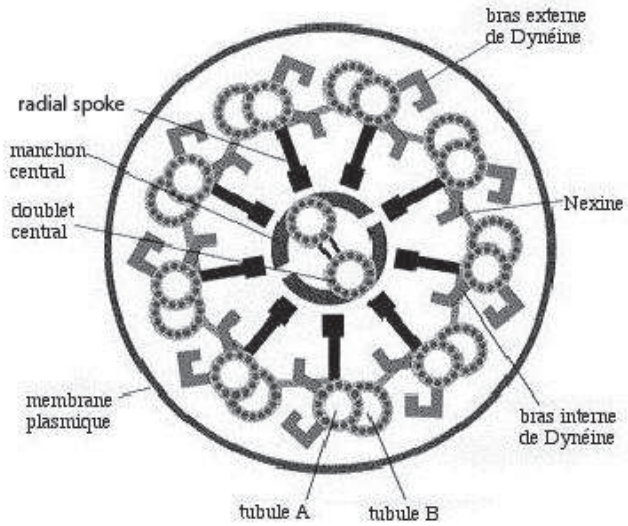


Figure 7 : Coupe schématique d'un axonème. D'après site Cytosquelette.

Le battement sinusoïdal du flagelle est réalisé par courbures locales et chaque courbure est due au glissement relatif entre deux doublets adjacents, les uns sur les autres. Ce processus est également appelé « *sliding* » (Summers et Gibbons, 1971) et illustré par la figure 8. La génération du glissement est réalisée par l'accrochage-décrochage de la dynéine sur le doublet lui faisant face. Le changement de conformation de la dynéine, permet l'hydrolyse de l'ATP, dont l'énergie chimique est récupérée pour être restituée en énergie mécanique. Plusieurs dynéines adjacentes, réparties toutes les 24 nm le long de l'axonème, participent au glissement des doublets adjacents et leur fonctionnement procède par « vagues » locales qui se propagent le long du flagelle (Cosson, 1992 ; Cosson *et al.*, 2001).

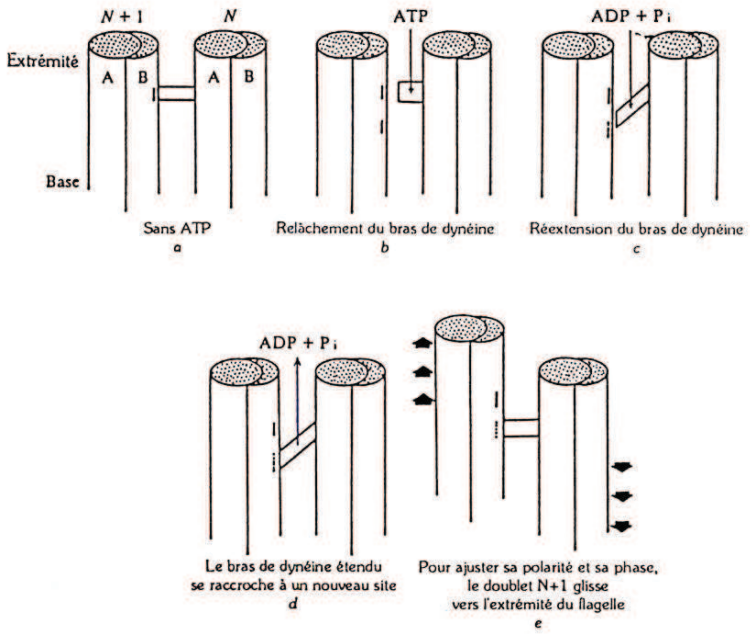


Figure 8 : Détail du fonctionnement du moteur « dynéine ». L'étape énergétique du moteur se situe entre b et c, où a lieu l'hydrolyse de l'ATP qui permet l'extension du bras de dynéine. D'après Cosson (1992).

Les spermatozoïdes de certaines espèces de Crustacés et de Nématodes sont dépourvus de flagelle locomoteur. Ce sont donc des processus particuliers qui aboutissent à la mise en contact du gamète mâle avec le gamète femelle. Pour les Crustacés et les Nématodes, la fécondation, interne, explique en partie l'absence de flagelle (Jouin, 1978).

4.3- Métabolisme du spermatozoïde

Le métabolisme énergétique est un des paramètres clés de l'activité fonctionnelle des spermatozoïdes. Le mécanisme de glissement des microtubules, responsable de la mobilité des spermatozoïdes, est consommateur d'ATP et des quantités suffisantes d'énergie doivent être fournies à tous les sites dynéines le long de l'axonème. Afin de répondre à leur demande en énergie, les spermatozoïdes ont la capacité de mobiliser différentes voies métaboliques, selon les disponibilités en oxygène, la composition et disponibilité des substrats et le mode de fécondation de l'espèce.

4.3.1- Métabolisme des espèces à fécondation interne

Le mode de fécondation interne caractérise généralement les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les insectes et existe chez les chondrichtyens, les mollusques céphalopodes et gastéropodes. Ce mode de fécondation permet aux spermatozoïdes de trouver dans le tractus génital femelle, les substrats exogènes nécessaires à leur survie et à leur mobilité.

Depuis les premières études bioénergétiques menées sur le spermatozoïde dans les années 1940, l'essentiel des travaux a été réalisé sur les espèces mammifères (pour revue : Storey, 2008). Concernant la mobilité du spermatozoïde chez l'humain, plusieurs auteurs concluent au rôle principal ou exclusif de la glycolyse dans la production d'énergie (Williams et Ford, 2001 ; Amaral *et al.*, 2011 ; Hereng *et al.*, 2011). Cette hypothèse a initialement été discutée en terme de « compartimentalisation », suggérant que l'ATP produit dans la pièce intermédiaire, comprenant les mitochondries, pourrait difficilement diffuser jusqu'à la partie distale du flagelle (Turner, 2003 ; Ford, 2006). L'hypothèse est appuyée par de fortes concentrations de glucose et pyruvate observées dans les voies génitales femelles. Cependant, la question du métabolisme nécessaire au mouvement du spermatozoïde chez l'homme est sujet à un intense débat (Ford, 2006 ; Ramalho-Santos *et al.*, 2009). En effet, la consommation en oxygène des mitochondries du spermatozoïde est corrélée à leur mobilité (Stendardi *et al.*, 2011 ; Ferramosca *et al.*, 2012) et plusieurs inhibiteurs de la chaîne respiratoire ont un impact négatif sur le mouvement du

spermatozoïde (Ruiz-Pesini *et al.*, 2000). De plus, il a été proposé que le rôle des mitochondries dans la fonctionnalité du spermatozoïde pourrait être lié à d'autres aspects physiologiques, comme la production contrôlée de ROS nécessaire à la mobilité du spermatozoïde, la capacitation, la réaction acrosomale et la capacité de fécondation. Malgré une littérature riche sur le sujet, à l'heure actuelle, une conclusion sur le métabolisme énergétique et le rôle des mitochondries du spermatozoïde humain ne peut être émise avec certitude. Le concept général et raisonnable qui émerge de la plupart des études est que le spermatozoïde de l'homme présente une grande polyvalence dans son métabolisme, utilisant différents mécanismes pour produire de l'énergie en fonction des substrats disponibles dans les voies génitales femelles (Ruiz-Pesini *et al.*, 2007 ; Storey, 2008).

Chez d'autres mammifères, le métabolisme énergétique du spermatozoïde a été clairement défini. Chez les bovins, la mobilité peut être soutenue par la glycolyse ou la phosphorylation oxydative seule ou par la combinaison des deux (Krzyzosiak *et al.*, 1999). A l'inverse, le spermatozoïde de souris est dépendant de la glycolyse (Miki *et al.*, 2004 ; Odet *et al.*, 2008 ; Danshina *et al.*, 2010).

Chez les oiseaux, le métabolisme énergétique des spermatozoïdes varie fortement en fonction de l'espèce étudiée. La majorité des travaux concerne les espèces d'élevage et d'intérêt économique. Le nombre de mitochondries du gamète mâle varie en fonction des espèces, une trentaine chez le coq, près de 150 chez la caille japonaise. Les mitochondries peuvent être présentes dans la partie distale du flagelle (Blesbois, 2011). Le métabolisme énergétique des spermatozoïdes de dindon est strictement aérobie alors que les gamètes de coq présentent un métabolisme aérobie et anaérobie. La synthèse d'ATP du spermatozoïde de dinde est dépendante de la phosphorylation oxydative alors que le sperme de poulet a la capacité de stimuler la glycolyse en conditions anaérobies (Wishart, 1984).

Peu de travaux concernant le métabolisme des spermatozoïdes de poissons à fécondation interne ont été menés. Selon les espèces, différentes stratégies ont été développées : le spermatozoïde peut utiliser des substrats endogènes comme exogènes, présents dans le liquide séminal et/ou dans les sécrétions du tractus génital de la femelle. Chez les poissons ovovivipares, la glycolyse ainsi que la fermentation seraient impliquées pour produire de l'énergie nécessaire au mouvement du spermatozoïde (Billard and Cosson, 1990). La capacité des gamètes mâles à hydrolyser à la fois leurs propres réserves endogènes (glycogène) et les substrats exogènes (glucose, fructose) (Billard, 1969 ; Gardiner, 1978 ; Billard et Cosson, 1990) autorise une durée de mouvement plus longue, plusieurs heures chez la perche (*Cymatogaster aggregata*),

comparée aux espèces de poissons à fécondation externe chez lesquelles la phase de mouvement est plus courte (de 1 à 20 minutes : Cosson *et al.*, 2008).

Peu d'études ont été menées sur le métabolisme nécessaire au mouvement du spermatozoïde chez les mollusques à fécondation interne, tel les céphalopodes et les gastéropodes. Le spermatozoïde de calamar (*Loligo pealii*) peut utiliser la glycolyse pour synthétiser de l'énergie car il métabolise le glucose et le fructose en acide lactique (Austin *et al.*, 1964).

4.3.2- Métabolisme des espèces à fécondation externe

La fécondation externe est présente dans une grande proportion des espèces vivant en milieu aquatique et rencontrée principalement chez les batraciens, les ostéichtyens et chez de nombreux invertébrés. Les spermatozoïdes sont généralement émis en milieu aqueux, ce qui impose aux gamètes mâles de parcourir des distances plus longues que chez les espèces à fécondation interne et dans un milieu qui n'est pas toujours favorable à leur survie. Le métabolisme soutenant la mobilité du gamète mâle repose essentiellement sur les réserves endogènes.

Chez les spermatozoïdes de poissons, la durée de la phase de nage est généralement courte, de 30 secondes à quelques minutes (Stoss, 1983). Il existe cependant quelques exceptions, comme le spermatozoïde de l'anguille (*Anguilla anguilla*) et de congre (*Conger conger*) qui restent mobiles durant plus de 20 minutes (Gibbons *et al.*, 1985 ; Cosson *et al.*, 2008). Chez les poissons, les spermatozoïdes sont émis à proximité des ovocytes et des comportements reproducteurs sont décrits, rapprochant les deux sexes durant la fraie (Hutchings *et al.*, 1999), comme chez la morue (*Gadus morhua*).

Chez les poissons d'eau douce comme la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et la carpe commune (*Cyprinus carpio*), la durée de la phase de nage est faible : 20 à 30 secondes chez la truite arc-en-ciel (Christen *et al.*, 1987), 45 secondes à 1,50 minutes chez la carpe (Redondo-Müller *et al.*, 1991). Chez ces espèces, la diminution de la fréquence de battement flagellaire et la durée limitée de la phase de nage sont liées à la réduction des réserves en ATP du spermatozoïde (Christen *et al.*, 1987 ; Robitaille *et al.*, 1987 ; Perchec *et al.*, 1995), en raison d'une phosphorylation oxydative inefficace pour compenser l'hydrolyse de l'ATP par les dynein-ATPases durant le mouvement. En conséquence, les réserves en ATP stockées avant émission des spermatozoïdes constituent la principale source d'énergie soutenant la mobilité (Christen *et al.*, 1987 ; Perchec *et al.*, 1995). De plus, l'arrêt du battement flagellaire du

spermatozoïde de truite arc-en-ciel et de carpe pourrait également être dû à la diminution de la concentration en phosphocréatine (Robitaille *et al.*, 1987 ; Kamp *et al.*, 1996).

La plupart des travaux menés sur les spermatozoïdes de poissons marins ont été réalisés sur le turbot (*Psetta maxima*) et le bar (*Dicentrarchus labrax*), deux espèces d'intérêt aquacole (Dreanno *et al.*, 1998). La durée de nage des spermatozoïdes de ces espèces est également courte, allant de 40-50 secondes chez le bar à 3-5 minutes chez le turbot et accompagnée de la diminution du contenu en ATP du gamète mâle. Le spermatozoïde de bar semble être limité par la capacité de phosphorylation oxydative de ses mitochondries : le contenu en ATP intracellulaire chute à 25% de sa valeur initiale, 10 secondes post activation dans l'eau de mer (Dreanno *et al.*, 1999a). Chez le turbot, l'hydrolyse de l'ATP durant la phase de nage du spermatozoïde est partiellement compensée par l'activité mitochondriale : 54% de la quantité initiale d'ATP sont toujours mesurés, 10 secondes post activation (Dreanno *et al.*, 1999b). Cependant, un processus de rigidification du flagelle, observé initialement dans sa partie distale, cause la diminution des caractéristiques de battement du flagelle puis l'arrêt du mouvement. Ce processus pourrait être causé par la diminution puis disparition au cours de la phase de nage, de la phosphocréatine, induisant une mauvaise distribution de l'énergie le long du flagelle (Dreanno *et al.*, 1999b).

Comparés aux espèces de poissons étudiées, les spermatozoïdes des invertébrés marins ont la particularité d'être mobiles durant une plus longue période de temps. Cette stratégie de reproduction pourrait être liée aux faibles capacités de déplacement des reproducteurs. Les gamètes sont émis dans le milieu extérieur et le spermatozoïde doit potentiellement parcourir une longue distance pour atteindre le gamète femelle.

La majorité des travaux concernant le métabolisme énergétique des spermatozoïdes des invertébrés marins a été réalisée chez différentes espèces d'oursin. Chez *Arbacia lixula* et *Paracentroctus lividus*, le contenu en ATP diminue rapidement : 54% à 80% de perte de la concentration initiale d'ATP est mesurée cinq minutes post-activation (Mita *et al.*, 1994). Les spermatozoïdes d'oursin n'utilisent pas la glycolyse et leur métabolisme repose uniquement sur la β-oxidation des phospholipides endogènes, dans une unique mitochondrie localisée dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde (Mohri, 1957 ; Mita et Nakamura, 1993) Selon l'ordre à laquelle l'espèce appartient, le substrat catabolisé par le spermatozoïde d'oursin est différent : les spermatozoïdes d'oursin appartenant à l'ordre des Echinoida (*Hemicentrotus pulcherrimus, Anthocidaris crassispina*, *Paracentrotus lividus*) catabolisent la phosphatidylcholine, alors que ceux de l'ordre des Arbacioida (*Arbacia lixula*), des Clypeasteroida (*Clypeaster japonicus*) et des Diadematoida (*Diadema setosum*) utilisent les triglycerides (pour revue voir Mita et

Nakamura, 1998). Le transport de l'ATP entre la mitochondrie et la partie distale du flagelle est réalisé par le biais de la phosphocréatine (Tombes *et al.*, 1987). Cependant, il semblerait que la quantité d'ATP hydrolysée par les dynéines-ATPases soit supérieure à celle produite par la phosphorylation oxydative, la quantité d'ATP devenant ainsi limitante dans la portion distale flagelle et induisant l'arrêt du battement flagellaire (Tombes *et al.*, 1987).

Les caractéristiques métaboliques des spermatozoïdes de bivalves marins ont fait l'objet de peu d'études. Chez l'huître perlière (*Pinctada margaritifera*) et la coquille St-Jacques (*Pecten maximus*) les durées de la phase de nage du spermatozoïde sont respectivement de six à 20 minutes selon le milieu d'activation et d'une dizaine d'heures (Demoy-Schneider *et al.*, 2012 ; Suquet *et al.*, 2013). Chez ces deux espèces, l'arrêt du mouvement du spermatozoïde pourrait être lié à l'épuisement de l'ATP intracellulaire mais le métabolisme nécessaire à la synthèse d'énergie du spermatozoïde est encore inconnu. L'arrêt du mouvement commençant par la rigidification de la partie distale du flagelle chez l'huître perlière, il pourrait être dû à un manque de molécules de transport d'ATP comme les phosphagènes (Demoy-Schneider *et al.*, 2013). A notre connaissance, aucun phosphagène n'a été isolé dans le spermatozoïde de bivalves marins, mais de la phosphoarginine a été identifiée dans certaines tissus de l'huître américaine (*Crassostrea virginica*) et de la palourde européenne (*Ruditapes decussatus*) (Tikunov *et al.*, 2010 ; Hanana *et al.*, 2012).

5. Modèle biologique, l'huître creuse *Crassostrea gigas*

5.1- Systématique, répartition et habitat

Les huîtres creuses sont des mollusques bivalves, de l'ordre des Eulamellibranches, de la super-famille des Ostréidés, de la famille des Crassostréidés et du genre *Crassostrea*. Le genre *Crassostrea* regroupe une 20^{aine} d'espèces, comme l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Figure 9), l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) et l'huître creuse américaine *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791).

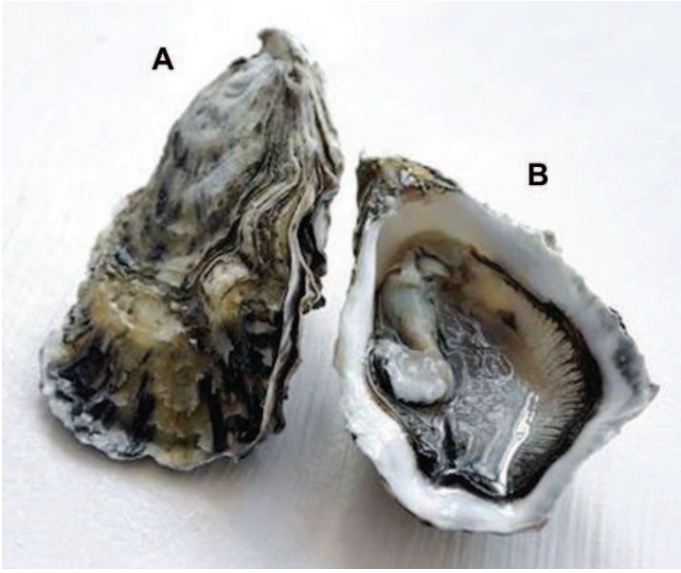


Figure 9 : L'huître creuse *Crassostrea gigas* fermée (A) et ouverte, valve droite enlevée (B).

L'huître creuse est originaire du Pacifique Nord. Plusieurs vagues d'importations volontaires ou accidentelles ont disséminé l'espèce dans de nombreuses régions du globe, en Europe (Grizel et Héral, 1991), au Canada, sur la côte ouest des Etats-Unis, en Afrique du Sud, en Tasmanie (Thomson, 1952 ; 1958), en Nouvelle-Zélande et en Russie (Orlenko, 1994). En France, elle est présente sur tout le littoral, du Golfe Normand-Breton à la Méditerranée. Elle s'est adaptée dans ces régions, notamment grâce à sa forte croissance et à sa grande tolérance aux variations de température (eurytherme), de salinité (euryhaline) et de quantité de nourriture (Coleman, 1986 ; Smith *et al.*, 1986 ; Grizel, 1996 ; Fabioux, 2004). L'huître creuse est actuellement considérée comme une espèce invasive, colonisant les substrats meubles ou durs dans les zones intertidales, infralittorales et estuariennes (site NIMPIS 2002).

5.2- Origine de l'ostréiculture de l'huître creuse

L'élevage des huîtres remonte à la fin du XIX^{ème} siècle. Elle se développe sur la côte Atlantique et en Bretagne entre 1860 et 1870 (Lubet et Mathieu, 1999). Cette activité concernait la seule espèce endémique des côtes françaises, l'huître plate, *Ostrea edulis*. Cette espèce a été exploitée jusqu'au déclin constaté des stocks, entre 1960 et 1970, lié à la pêche intensive et à des épisodes de mortalités provoqués par des parasites (Grizel, 1974 ; Fabioux, 2004). L'huître creuse portugaise, *Crassostrea angulata*, devint l'espèce dominante sur les côtes françaises, entre 1968 et 1971, avant d'être à son tour décimée par un Iridovirus provoquant la « maladie des branchies » (Comps, 1978). Pour pallier aux mortalités massives de l'huître portugaise, l'huître creuse a été introduite en France, entre 1971 et 1973, en provenance du Japon et de Colombie Britannique (Canada) (Grizel et Héral, 1991 ; Fabioux, 2004). L'huître creuse est devenue l'espèce majoritairement cultivée dans les bassins ostréicoles français, plaçant la France au rang de 1er producteur européen, avec 83 000 tonnes d'huîtres creuses produites en 2012 (Site cnc france). Cette production repose, selon les années, pour 70 à 80 % sur le captage naturel de naissains dans les bassins ostréicoles de Marennes Oléron (Geay et Bouquet, 2009), d'Arcachon (Maurer *et al.*, 2009), de la Baie de Bourgneuf et de la Rade de Brest (Pouvreau *et al.*, 2008) et pour 20 à 30 % sur la production de naissains d'écloserie. La part des écloseries dans la production de naissains est en augmentation.

5.3- Anatomie

Les huîtres sont des animaux à corps mou, renfermé dans une coquille à deux valves asymétriques, articulées autour d'une charnière et maintenues par un muscle adducteur (Figure 10). La valve inférieure (gauche) est creuse tandis que la valve supérieure (droite) est plane (Kennedy *et al.*, 1996 ; Fabioux , 2004).

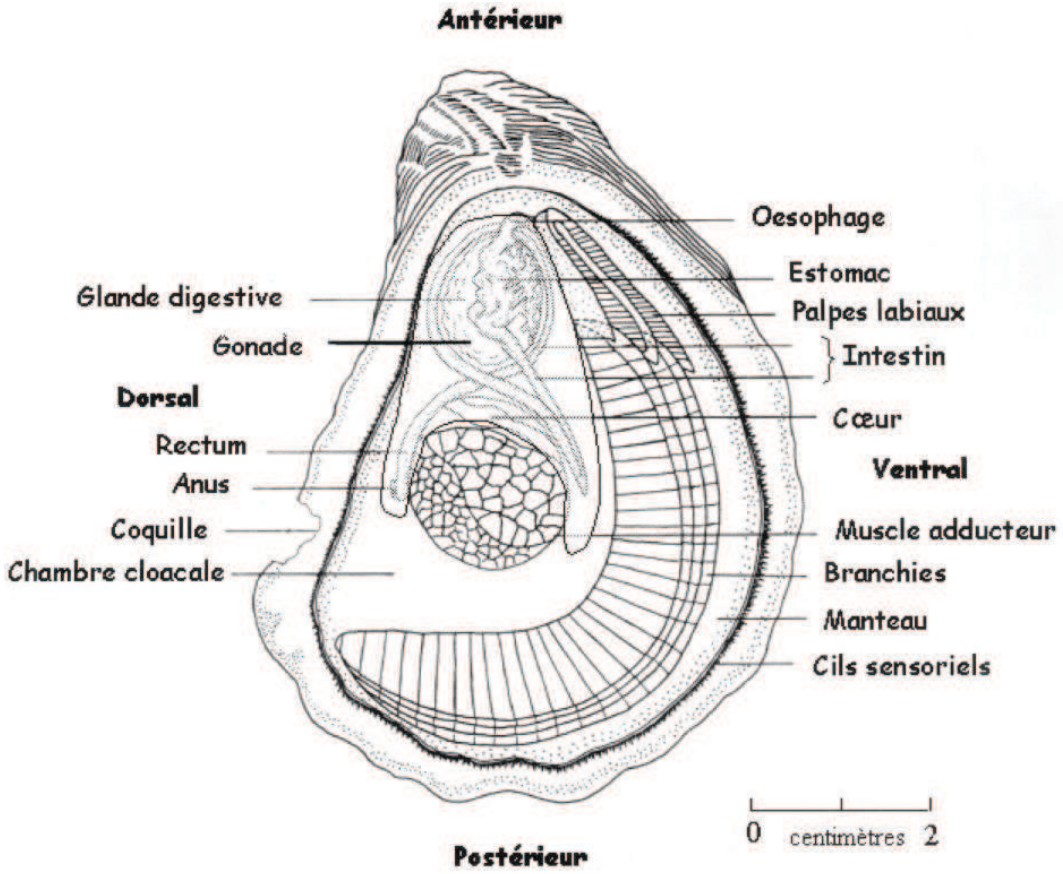


Figure 10 : Anatomie générale de l'huître creuse *Crassostrea virginica* dans sa valve gauche. Les axes d'orientation de l'animal sont indiqués en caractères gras. D'après Galtsoff (1964) et Fabioux (2004).

Les parties molles du corps sont enveloppées dans un manteau dont les deux lobes sont soudés et qui délimite la cavité palléale (Kennedy *et al.*, 1996). Les branchies lamellaires, suspendues dans la cavité palléale, assurent la double fonction de respiration et de nutrition. Les filaments branchiaux ciliés créent un courant d'eau permanent, qui assure aux branchies un apport continu en oxygène et en particules alimentaires. Les branchies sont recouvertes d'un mucus qui permet à l'animal de retenir les particules alimentaires et de les transporter jusqu'aux palpes labiaux qui eux-mêmes les dirigent vers la bouche (Kennedy *et al.*, 1996). Le système digestif est composé de la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, la glande digestive, le rectum et l'anus. L'estomac forme un long cæcum et contient une évagination tubulaire, le stylet cristallin, remplie d'une gelée à forte teneur en enzymes digestives. L'estomac est entouré par une glande digestive volumineuse. Le système d'excrétion est constitué d'un rein formé d'une glande tubulaire. Le système circulatoire des huîtres est semi-ouvert : le fluide circulant, l'hémolymphe, n'est pas confiné aux vaisseaux et au coeur et peut s'insinuer librement au sein de tous les tissus. Le cœur est simple, composé d'un ventricule et de deux oreillettes et est enfermé dans une cavité péricardique située en avant du muscle adducteur. Le système nerveux est réduit à quelques ganglions difficilement observables (Fabioux, 2004).

5.4- Reproduction

Les huîtres creuses possèdent un mode de reproduction primitif: une fécondation externe et sont hermaphrodites protandre de type alternatif (Amemiya, 1929 ; Gérard *et al.*, 1995). Cette espèce est donc généralement mâle lors de sa première saison de reproduction (Guo *et al.*, 1998 ; Lango-Reynoso *et al.*, 1999), observée au cours de sa première année de vie. Le changement de sexe a principalement lieu entre deux saisons de reproduction (Amemiya, 1929 ; Buroker, 1983). Une faible proportion d'individus morphologiquement hermaphrodites (0,4 à 4%), pour lesquels des cellules germinales des deux sexes sont présentes simultanément dans la gonade, peut être trouvée dans les populations (Amemiya, 1929 ; Katkansky et Sparks, 1966).

Les mécanismes endogènes contrôlant les changements de sexe et les facteurs exogènes pouvant les déclencher (température, nutrition...) sont encore mal connus chez les huîtres et il est difficile de dire si les principaux facteurs sont d'ordre génétique, biologique ou environnementaux (Guo *et al.*, 1998 ; Fabioux, 2004).

5.4.1- La gonade

La gonade de l'huître apparaît comme une masse blanchâtre, constituée de tubules gonadiques ramifiés, invaginés dans le tissu conjonctif (Figure 11). Les tubules gonadiques, s'anastomosent à leur extrémité pour former le gonoducte qui débouche dans la cavité palléale (Devauchelle *et al.*, 1998 ; Fabioux, 2004). La gonade se développe autour de la glande digestive et occupe une grande partie de la cavité palléale à maturité (Figure 11). Pendant la période de repos sexuel, la gonade devient indiscernable alors que le développement du tissu conjonctif est maximal à ce stade (Fabioux, 2004).

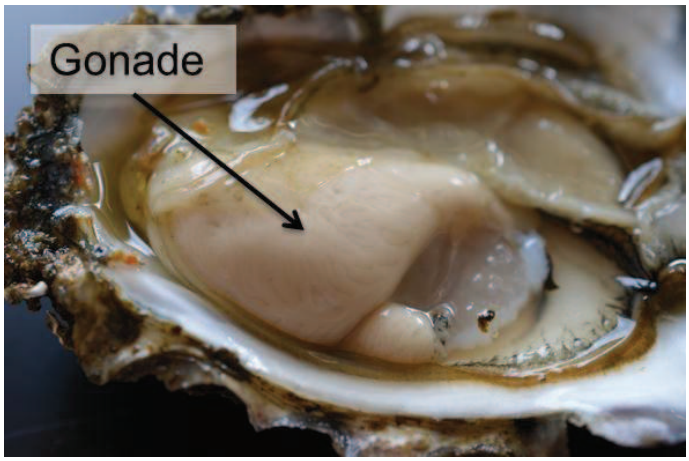


Figure 11 : L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, valve droite enlevée, à maturité.

5.4.2- Déroulement de la gamétogenèse

Le cycle de reproduction de l'huître creuse comporte plusieurs stades (Steele et Mulcahy, 1999) et sur les côtes françaises, il suit un rythme saisonnier (Fabioux *et al.*, 2005). En effet, la gonade se développe annuellement et régresse après l'émission des gamètes.

Durant l'automne et au début de l'hiver, pendant la période dite de « repos sexuel » (stade 0) (Lango-Reynoso *et al.*, 2000), la gonade est indiscernable alors que le développement du tissu conjonctif est maximal à ce stade (Lubet, 1991 ; Fabioux, 2004) (Figure 12). Le tissu conjonctif est formé de cellules vésiculeuses qui stockent le glycogène, principale forme de réserve chez l'huître (Berthelin *et al.*, 2000). La gonade n'est représentée que par quelques cellules germinales souches (GSCs), disséminées au sein de l'épithélium dans le tissu conjonctif (Fabioux, 2004). A la fin de l'hiver, les GSCs, décrites comme des cellules capables d'auto-renouvellement (Lin, 1997), se multiplient activement et donnent naissance aux tubules gonadiques (Goulletquer, 1997 ; Lango-Reynoso, 1999, Fabioux *et al.*, 2004). Pendant la phase de prolifération (stade 1), les GSCs se différencient ensuite en gonies qui se divisent intensément par mitose (Fabioux *et al.*, 2004). Ce sont des cellules de petite taille (~6 µm de diamètre), composées d'un gros noyau et d'une fine couche de cytoplasme granuleux (Kennedy *et al.*, 1996 ; Lango-Reynoso *et al.*, 2000).

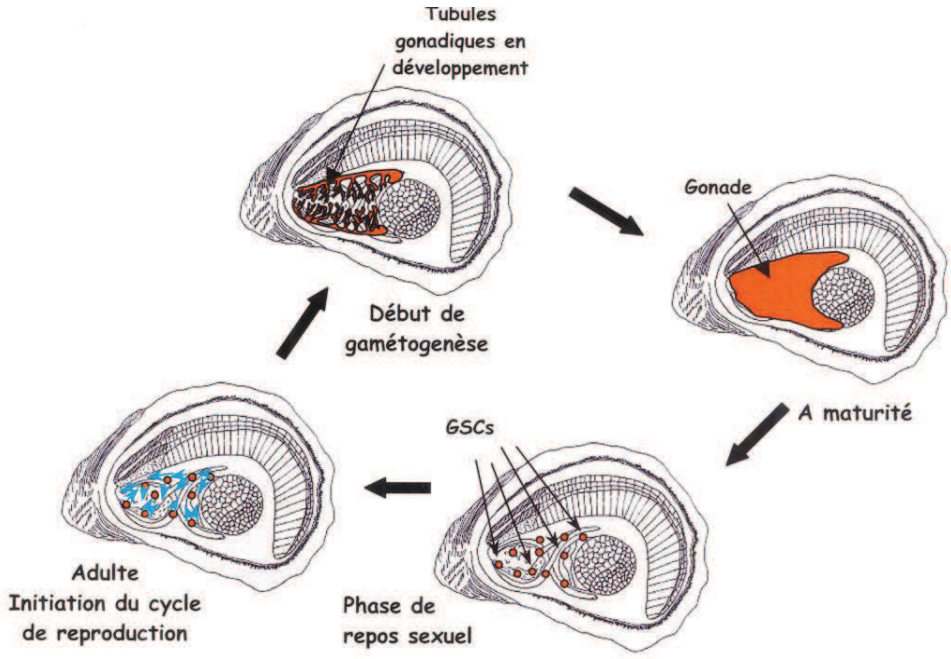


Figure 12 : Développement des cellules germinales de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, au stade adulte. Les zones oranges représentent la localisation des cellules germinales souches (GSCs) et les cellules germinales formant la gonade. Les flèches bleues indiquent la prolifération des GSCs. D'après Fabioux, 2004.

Au printemps, les gonies se différencient ensuite en cytes primaires (ovocytes ou spermatocytes) (Figure 13). Le développement des ovocytes et spermatocytes est soutenu par les réserves, essentiellement constituées de glycogène, contenues dans les cellules vésiculeuses du tissu conjonctif environnant qui régresse en conséquence (Berthelin *et al.*, 2000 ; Matsumoto *et al.*, 2003 ; Fabioux, 2004). La gamétogenèse est un processus qui s'effectue de façon centripète dans les tubules gonadiques, depuis l'épithélium germinal jusqu'à la lumière centrale. Les cytes primaires sont donc situés derrière la couche de gonies par rapport à l'épithélium gonadique (Lango-Reynoso, 1999, Fabioux, 2004).

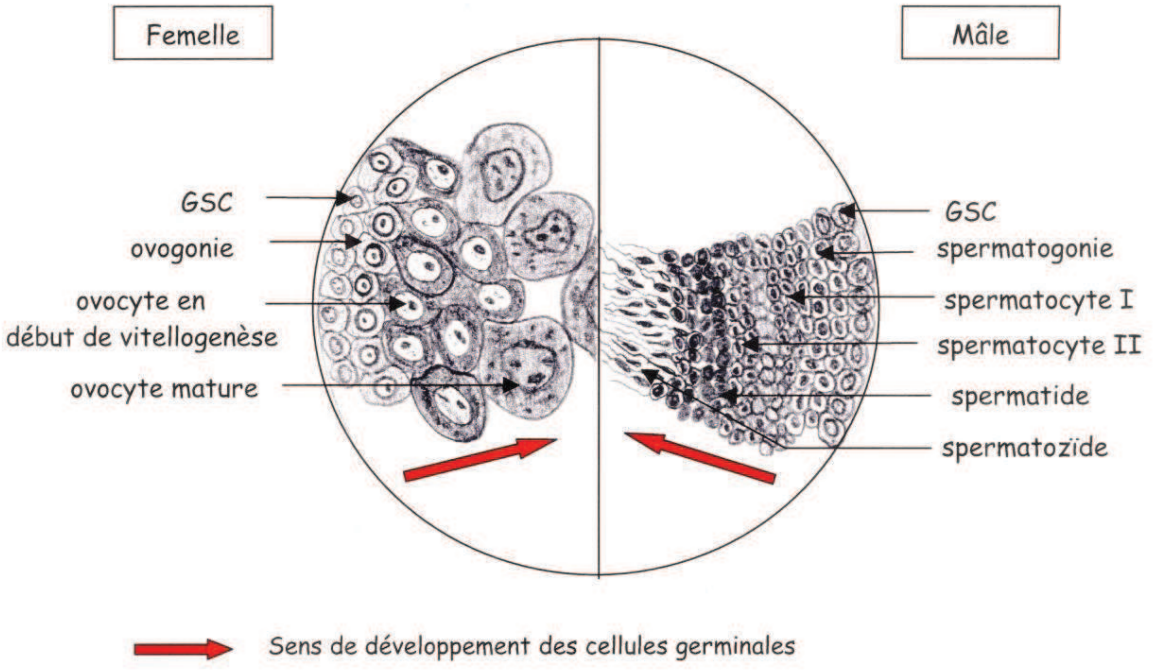


Figure 13 : Organisation des tubules gonadiques mâles et femelles de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, pendant la gamétogenèse. Représentation schématique de la coupe transversale d'un tubule. GSC : cellule germinale souche. D'après Fabioux (2004).

- Les ovogonies se différencient ensuite en ovocytes primaires ou ovocytes I et subissent la première division méiotique (Gilbert, 1996 ; Fabioux, 2004) (Figure 14). Une fois la réplication de l'ADN effectuée et les chromosomes homologues appariés, les ovocytes I sont bloquées en prophase. La vitellogenèse correspond à la phase de maturation des ovocytes I au cours de laquelle des protéines, des ARN messagers (ARNm) et des lipides sont accumulés afin de permettre le développement de l'embryon après fécondation (Kennedy *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2000).

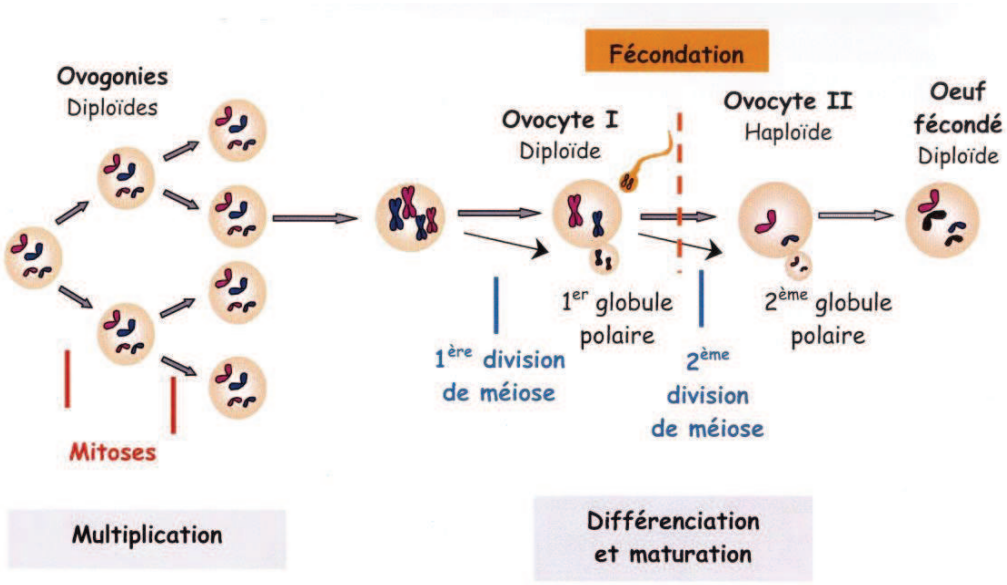


Figure 14 : Les différentes étapes de l'ovogenèse des mollusques. D'après Fabioux (2004).

- Les spermatogonies se différencient en spermatocytes primaires ou spermatocytes I et entrent en prophase I de méiose (Figure 15) (Fabioux, 2004). L'ADN se réplique pour aboutir au dédoublement des chromosomes en deux chromatides. Les chromosomes homologues s'apparient sur toute la longueur. Les spermatocytes I sont des cellules tétraploïdes. La division se poursuit pour donner des spermatocytes secondaires ou II (diploïdes). Les spermatocytes II subissent la seconde division de méiose pour donner quatre spermatides possédant chacune un nombre haploïde de chromosomes. Les spermatides subissent alors des transformations morphologiques (compaction du noyau…) au cours desquelles ils se différencient en spermatozoïdes matures (Alberts *et al.*, 1986 ; Gilbert, 1996 ; Hess, 1999 ; Fabioux, 2004).

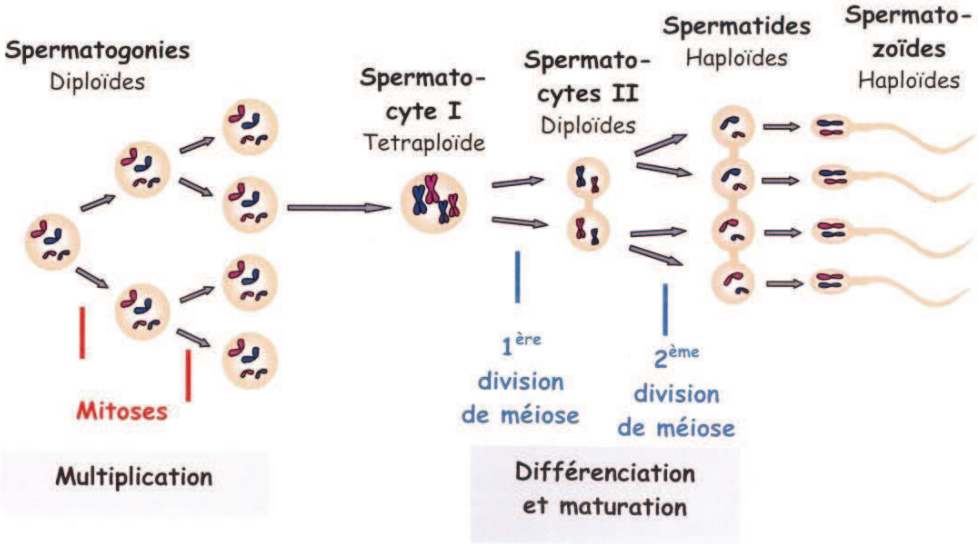


Figure 15 : Les différentes étapes de la spermatogenèse des mollusques. D'après Fabioux (2004).

Les gamètes arrivent à maturité à la fin du printemps ou au début de l'été. La maturité (stade 3) est caractérisée par la présence de gamètes (ovocytes ou spermatozoïdes matures) envahissant les tubules gonadiques (Fabioux, 2004) (Figures 11 et 12). L'émission des gamètes a lieu généralement pendant la période estivale. Elle peut être totale ou partielle (Galtsoff, 1930 ; Goulletquer, 1997 ; Lango-Reynoso *et al.*, 1999 ; Chavez-Villalba *et al.*, 2001) (stades 4 et 5). L'émission des gamètes est totale sur les côtes françaises où la température de l'eau est élevée (Charentes, Méditerranée) alors qu'elle n'est souvent que partielle, voir absente, dans le nord de la France où la température de l'eau est plus basse (Normandie ou Bretagne nord) (Goulletquer, 1997 ; Fabioux, 2004). L'émission intervient souvent en réponse à un signal extérieur (changement de température, bloom phytoplanctonique ou présence dans l'eau de gamètes d'individus de la même espèce). L'huître creuse présente une fécondité très élevée, entre 20 et 100 millions d'ovocytes émis à chaque ponte (Marteil, 1976) et environ 30.10^9 spermatozoïdes par gramme de gonade chez le mâle (Dong *et al.*, 2005a). L'émission dans l'eau de mer, déclenche la reprise de la méiose pour les ovocytes I (Figure 14). Les chromosomes se condensent à nouveau, l'enveloppe nucléaire disparaît et les chromosomes répliqués sont répartis entre deux noyaux-fils, dont chacun contient la moitié du nombre initial de chromosomes (Fabioux, 2004). Le cytoplasme se divise alors de façon asymétrique pour produire un ovocyte contenant tous les éléments nécessaires au développement et un globule polaire de petite taille. La seconde division de méiose se produit en général lors de la fécondation. Les deux chromatides sœurs de chaque chromosome se séparent et le cytoplasme de l'ovocyte se divise de nouveau de façon inégale pour donner l'ovocyte mature et un second globule polaire qui possèdent tous deux un nombre haploïde de chromosomes. Les deux globules polaires dégénèrent tandis que l'ovocyte est prêt pour la fécondation (Lessman, 1998; Picton et Gosden, 1999, Fabioux, 2004).

Après la ponte, les gamètes résiduels de la gonade (non émis) sont lysés (stades 6 et 7). L'énergie issue de la résorption des gamètes pourrait être réinvestie dans le métabolisme de base de l'huître creuse (Beninger et Le Pennec, 1991 ; Steele et Mulcahy, 1999). Les réserves énergétiques de l'huître sont reconstituées à l'automne avant la ré-initiation d'un nouveau cycle de reproduction (Berthelin *et al.*, 2000).

Chaque étape de la gamétogenèse est coordonnée par des facteurs exogènes et des facteurs endogènes (Mann, 1979 ; Ruiz *et al.*, 1992). La température et la photopériode sont des

paramètres clés pour la maturation des gamètes. La gamétogenèse apparaît aussi sous la dépendance directe des efflorescences phytoplanctoniques hivernales et printanières qui conditionnent l'accumulation de réserves (Enriquez, 2004). Cependant, l'entrée en méiose des gonies serait un processus inéluctable quelles que soient les conditions environnementales, pourvu que les réserves énergétiques ou que la quantité de nourriture disponible soient suffisantes pour fournir l'énergie nécessaire à la gamétogenèse (Fabioux, 2004). L'émission a lieu en période estivale, dès lors que la température dépasse 19°C (Paniagua-Chavez et Acosta-Ruiz, 1995; Fabioux *et al.*, 2005).

5.4.3- La fécondation et le développement embryonnaire

La fécondation se produit dans la colonne d'eau après émission des gamètes. Les embryons et les larves sont planctoniques jusqu'à leur fixation.

Après fécondation, le développement de l'œuf passe progressivement par les stades morula, blastula, gastrula (environ 7 h après fécondation à 20°C) (Verdonk et Van de biggelaar, 1983 ; Malakhov et Medvedeva, 1985). Les embryons atteignent ensuite le stade trochophore (Figure 16). A ce stade, les larves présentent une forme de toupie et sont capables de se mouvoir à l'aide de cils. Le stade larve D est observé 24 à 48 heures après la fécondation. Les larves D possèdent un velum et une coquille qui leur confèrent une forme de d majuscule. Jusqu'à ce stade, les larves se développent en utilisant l'énergie de leurs réserves, principalement accumulées lors de la maturation des ovocytes. La larve devient ensuite véligère (Prieur, 1971). Elle reste planctonique pendant deux à quatre semaines puis se fixe. Après fixation, le velum se résorbe. Au cours de la métamorphose, la plupart des tissus et des organes larvaires se réorganisent pour donner la forme juvénile: mise en place du tractus digestif permettant à la larve de se nourrir, apparition progressive d'un pied et disparition du velum (Prieur, 1971 ; Waller, 1981 ; Burke, 1983 ;). A une température moyenne de 20°C, il faut entre 15 et 24 jours pour obtenir un développement larvaire complet, *i.e.* de la fécondation à la fixation (Fabious, 2004). La fixation se produit sur des substrats meubles ou durs des zones intertidales, infra-littorales ou estuariennes.

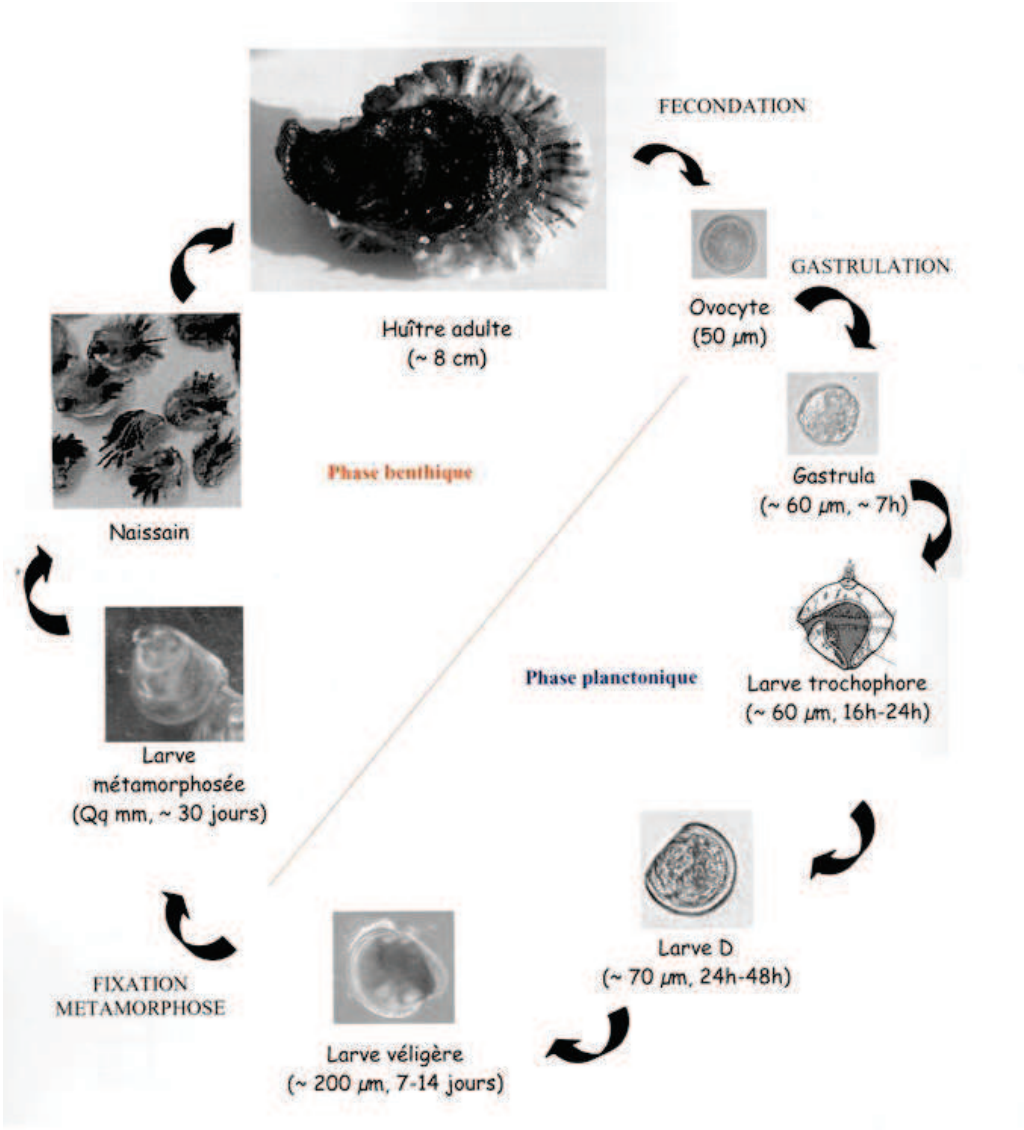


Figure 16 : Cycle de développement de l'huître creuse. D'après Fabioux (2004).

5.5- Caractéristiques biologiques des gamètes de l'huître creuse

5.5.1- L'ovocyte

Le gamète femelle de l'huître creuse est de forme arrondie. Quelques caractéristiques de l'ovocyte ont été décrites en laboratoire (moyenne ± erreur type) : son diamètre est de 65.7 ± 2.5 µm à maturité (Le Goïc *et al.*, 2014). Un ovocyte contient en moyenne 0.24 ± 0.01 pmol d'ATP, 14.85 ± 0.66 ng de protéines, 8.70 ± 0.75 ng de lipides, essentiellement composés de lipides neutres (5.27 ± 0.21 ng) et de triglycérides (4.49 ± 0.18 ng) (Boulais *et al.*, soumis à Aquaculture). La consommation moyenne d'oxygène est de 0.0007 pmol.10^{-3} ovocyte par minute (Ramirez *et al.*, 1999).

5.5.2- Le spermatozoïde

La morphologie du gamète mâle de l'huître creuse a été décrite par Faure (1996), Dong *et al.* (2005) et Suquet *et al.* (2010) (Figure 17). Le gamète mâle de l'huître creuse répond sur le plan structural à la définition de spermatozoïde de type primitif (noyau et pièce intermédiaire de taille réduite) décrit par Franzen (1956), ou aquaspermatozoïde (Koike, 1985). Il est donc formé de deux parties principales: la tête, comprenant la partie intermédiaire, et le flagelle. A maturité, la tête du spermatozoïde mesure en moyenne 3 µm de long, 2 µm de large et le flagelle mesure environ 33 µm (Faure, 1996 ; Demoy-Schneider *et al.*, 2013). La tête possède un acrosome, un noyau et 4 mitochondries localisées à la base du noyau. L'acrosome facilite la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte lors de la fécondation.

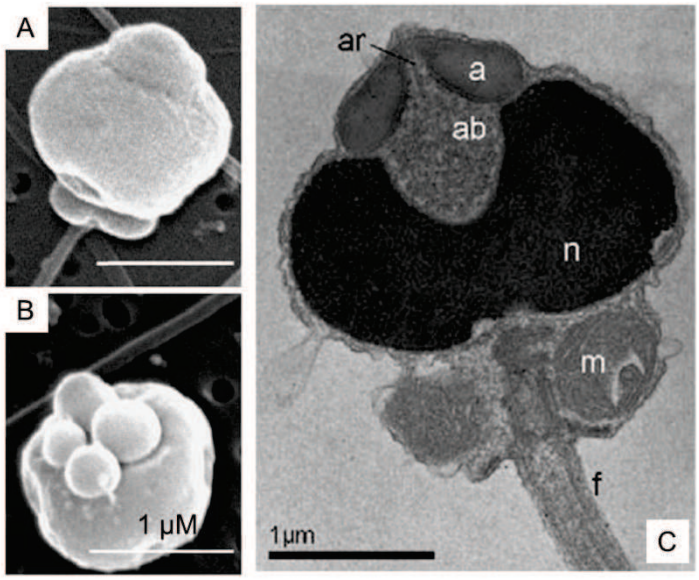


Figure 17 : Photographies en microscopie électronique à balayage (A, B) et à transmission (C) du spermatozoïde d'huître creuse *Crassostrea gigas*. A : Tête du spermatozoïde, B : Quatre mitochondries exposées après démembranation, C : coupe longitudinale du spermatozoïde avant activation dans l'eau de mer (a : acrosome, ab : invagination nucléaire antérieur, ar : bâtonnet axial , n :noyau,m :mitochondrie. D'après Dong *et al.* (2005b) et Suquet *et al.* (2010).

Les spermatozoïdes mâles sont stockés dans les organes reproducteurs à l'état immobile et sans pouvoir fécondant. Le pH acide de la gonade (moyenne ± écart-type: pH 5.82 ± 0.48) est un facteur de la répression de la mobilité. Les spermatozoïdes acquièrent graduellement la capacité à devenir mobiles au contact de l'eau de mer (pH voisin de 8.0) (Demoy-Schneider *et al.*, 2013). Ces auteurs ont suggéré que l'augmentation du pH externe provoque une augmentation du pH interne permettant l'activité des dynein-ATPases, comme démontré chez l'oursin (Christen *et al.*, 1983). Dans l'eau de mer, le déplacement des spermatozoïdes de l'huître creuse s'effectue par une succession de mouvements hétérogènes non plans (3D), qui peuvent de plus s'arrêter transitoirement (Faure, 1996). Comparée aux autres espèces marines à fécondation externe (paragraphe 4.3.2), la période de nage du spermatozoïde d'huître creuse est longue, de 20 à 24 heures (Suquet *et al.*, 2010), pour une distance totale parcourue proche du mètre. La vitesse moyenne de déplacement des spermatozoïdes est de 55-75 $\mu m.sec^{-1}$, avec une fréquence de battement flagellaire de 42 Hz (Demoy-Schneider *et al.*, 2013). Le contenu intracellulaire en ATP du spermatozoïde d'huître est d'environ 44,7 ± 2,0 $nmol.10^{-9}$ spermatozoïdes (Suquet *et al.*, 2010). Une forte capacité de maintien du contenu en ATP du spermatozoïde d'huître a été observée: il diminue seulement de 6% de sa valeur initiale à la fin de sa phase de nage, 24h post activation. Des changements morphologiques du spermatozoïde sont observés à la fin de la phase de nage (Suquet *et al.*, 2010).

6. Problématique de l'étude

La période de nage du spermatozoïde d'huître creuse, de 20 à 24 heures (Suquet *et al.*, 2010), est la plus longue observée chez les invertébrés marins à fécondation externe étudiés jusqu'à aujourd'hui. Chez l'oursin, la durée maximale de mouvement des spermatozoïdes est de douze heures (Ohtake *et al.*, 1996). La période de nage des spermatozoïdes est proche de 10 heures chez la coquille Saint-Jacques (Suquet *et al.*, 2013) et de six à 20 minutes selon le milieu d'activation chez l'huître perlière (Demoy-Schneider *et al.*, 2012). Cette durée est fortement liée à la diminution du contenu intracellulaire en ATP. Le spermatozoïde de l'huître creuse se distingue de ces espèces par la durée de phase de nage et le maintien d'un contenu intracellulaire en ATP élevé jusqu'à la fin du mouvement (Suquet *et al.*, 2010). Cependant, le métabolisme énergétique du spermatozoïde n'a jamais été étudié chez cette espèce.

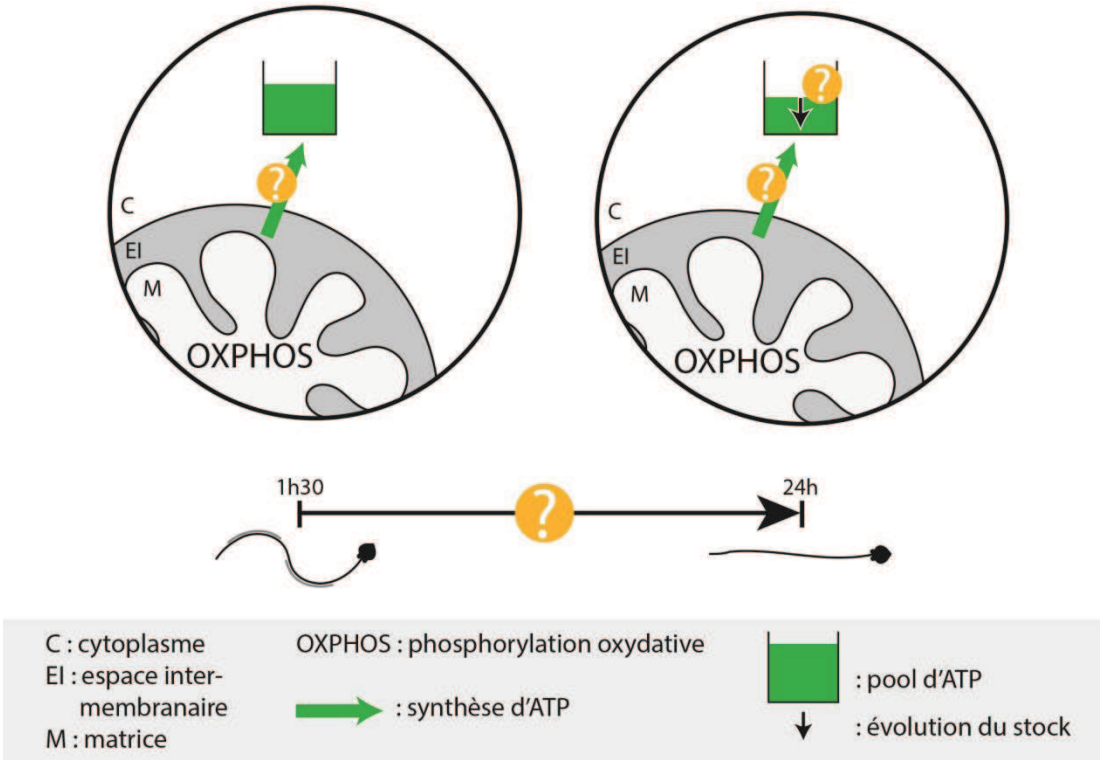
Cette thèse présente une étude du métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, avec pour principaux objectifs, (1) de confirmer les caractéristiques du spermatozoïde de cette espèce: durée de nage et contenu intracellulaire en ATP, (2) d'identifier les voies de synthèse d'ATP et leurs substrats et (3) de déterminer l'implication du métabolisme énergétique dans le succès à la fécondation du spermatozoïde d'huître creuse.

Chapitre 1

Evolution des caractéristiques cellulaires et biochimiques au cours de la phase de mouvement du spermatozoïde d'huître creuse

---

Les objectifs de ce premier travail sont (1) de confirmer les caractéristiques de la durée de nage du spermatozoïde d'huître creuse et de son contenu intracellulaire en ATP et (2) d'explorer le rôle potentiel de la phosphorylation oxydative dans la synthèse d'ATP du spermatozoïde d'huître creuse. La question scientifique est schématisée dans la figure suivante :



Ce travail est présenté sous forme d'un article.

Changes of cellular, biochemical and movement parameters during the motility phase of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, spermatozoa

Myrina Boulais[1*], Philippe Soudant[2], Nelly Le Goïc[2], Claudie Quéré[3], Pierre Boudry[3], Marc Suquet[1]

[1]*Ifremer, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Site Expérimental d'Argenton, Argenton, France ;*
[2]*IUEM, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France ;*
[3]*Ifremer, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Centre de Bretagne, Plouzané, France ;*

** Corresponding author e-mail: myrina.boulais@gmail.com*

Abstract

Pacific oyster spermatozoa are characterized by a remarkably long movement duration (>24h), sustained by a high capacity to maintain intracellular ATP level. As a result, their ATP metabolism is of special interest but remained to be investigated. The role of oxidative phosphorylation (OXPHOS) in fueling ATP for the motility phase of Pacific oyster spermatozoa was studied by measuring intracellular ATP content and mitochondrial membrane potential (MMP) in relation to motion features (*i.e.*, percentage of motile spermatozoa and velocity). Our results showed that the percentage of motile spermatozoa decreased during a 24h movement period and that the velocity decreased slightly but not significantly during the first 20h of movement. MMP increased steadily during the first 9h of the movement phase and was maintained at the same level afterwards. Conversely, spermatozoon ATP content decreased steadily during the first 9h post activation, down to 75% of the value assessed 1.5h post activation, and was maintained to this level during the following hours of the movement phase. These results suggest that Pacific oyster spermatozoa highly hydrolyze intracellular ATP content during the early part of the movement phase stimulating ATP synthesis through OXPHOS. Constant and high ATP level until the end of the motility phase appeared to be related to OXPHOS. However, we conclude that ATP content is not the main factor limiting the movement of Pacific oyster spermatozoa.

Keywords: ATP production / Mitochondrial membrane potential / Sperm motility / Movement phase / Crassostrea gigas

Introduction

Motility is a characteristic function of the male gamete, which allows spermatozoa to actively reach and penetrate the oocyte. Since flagellar movement occurs partly through reaction catalyzed by dynein-ATPase (Cosson, 1996), adenosine triphosphate (ATP) is needed to fuel spermatozoon movement phase. In the case of external fertilization, spermatozoa rely entirely on intracellular ATP storage and/or endogenous substrates to fuel ATP to dynein-ATPases located in the flagellum. In most marine species, intracellular ATP content controls the duration of spermatozoon movement phase. In European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Psetta maxima*) spermatozoon movement duration is very short, 40-50 seconds and 3-5 minutes, respectively (Dreanno, 1998). This duration is strongly related to the decrease of intracellular ATP content. After a 10 second movement in seawater, ATP content of turbot and sea bass spermatozoa drops to 54% and 25% of its initial value, respectively (Dreanno et al., 1999a and b) and the end of movement is partly due to the low concentration of intracellular ATP (Dreanno et al., 1999b). Spermatozoa of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, exhausted almost 70% of their initial ATP content after 10 minutes of movement (Mita and Yasumasu, 1984). Such high ATP consumption was also reported in the sea urchin, *Anthocidaris crassispina,* where 73% of the initial level of ATP was hydrolyzed after 5 minutes of movement (Mita et al., 1984). Changes in ATP content during the movement phase of bivalve spermatozoa have been little documented. In the king scallop, *Pecten maximus*, the percentage of motile spermatozoa, velocity and ATP content decreased steadily and concomitantly during a 10h movement phase (Suquet et al., 2013). In the black-lip-pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, spermatozoa are motile from 6 to 20 minutes according to the composition of the activating media (Demoy-Schneider et al., 2012) but changes of ATP content during the movement phase of spermatozoa remain undocumented in this species. In the Pacific oyster, spermatozoa are characterized by a long movement duration (>24 hours) which is the longest among marine bivalves studied up to now (Suquet et al., 2010). Cessation of flagellar beat is not related to intracellular ATP exhaustion as its concentration was still high at the end of spermatozoon movement phase (94% of the initial content; Suquet et al., 2010). Thus, Pacific oyster spermatozoon metabolism might differ from previously studied marine species. However, energy metabolism fueling ATP of spermatozoa remained to be documented in Pacific oyster.

The two main metabolic pathways producing energy in the form of ATP are the oxidative phosphorylation (OXPHOS) and the glycolysis. OXPHOS is the most efficient mean of generating ATP as it produces nineteen times more ATP than glycolysis. OXPHOS takes place in the mitochondrion and requires the coordinated operation of two main components, the respiratory chain and the ATP-synthase, both located in the inner mitochondrial membrane (Piomboni et al., 2012). The mitochondrial respiratory chain is involved in the transport of reducing equivalents from some electron donors to the molecule of O_2 with the final formation of H_2O (Piomboni et al., 2012). The respiratory chain uses the free energy released during this process for the generation of an electrochemical gradient of protons across the inner mitochondrial membrane (Piomboni et al., 2012). ATP-synthase uses this proton gradient for the synthesis of ATP. A mean to provide information on OXPHOS functionality is the assay of the mitochondrial membrane potential (MMP) (Stendardi et al., 2011), as it results from the electrochemical gradient of protons across the inner mitochondrial membrane used by the ATP-synthase for the synthesis of ATP. Recent developments in flow cytometry methods have enabled accurate and rapid analysis of MMP in spermatozoa (Marchetti et al., 2002; Marchetti et al., 2004; Gallon et al., 2006; Le Goic et al., 2013) using specific dye such as JC-1. This latter can selectively enter into mitochondria and reversibly change color from green to orange as membrane potential increases (Marchetti et al., 2004).

In this context, the purpose of the present study was to explore the role of OXPHOS in fueling ATP for the motility phase of Pacific oyster spermatozoa. Spermatozoon ATP content and MMP were determined in relation to motion features (percentage of motile spermatozoa and velocity).

Materials and methods

Collection of sperm

Three year old mature oysters were collected in June from farmed stock in the Bay of Brest (Finistère, France). Sperm was collected by stripping male individuals (n=6; mean weight±SEM: 72.5±2.3g): gonads were dissected out and placed individually in a Petri dish. The gonads were incised and 5 mL of sea water at 19°C filtered at 1 µm (FSW) were added to collect gametes. The sperm suspensions were filtered at 60 µm to remove the large chunks of gonad material. After dilution to 1/1000 in FSW, concentration of spermatozoa were determined by flow cytometer (duplicates) and was adjusted to 4.10^8 spermatozoa.mL^{-1} in 8 mL by further dilution in FSW, in a 20 mL plastic bowl. In order to avoid bacterial proliferation during the swimming period, chloramphenicol was added at a final concentration of 25 µg.mL^{-1} (stock

solution: 5 mg chloramphenicol/2 ml distilled water). Spermatozoon suspensions were incubated at room temperature (19°C) and changes in cellular, biochemical and movement features of spermatozoa according to post activation times were studied by sampling at 1.5h, 5h, 9h, 13h, 20h and 24h post activation in seawater.

Motility features of spermatozoa

To measure movement features of spermatozoa 25 µL of the spermatozoon suspension were diluted in 475 µL of FSW containing 1g.L^{-1} of bovine serum albumin (BSA). Then, 7µl of diluted suspension were transferred to Thomas cell and spermatozoon movement characteristics were observed under a microscope (dark field, Olympus BX51, X20 magnification), connected to a video camera (Qicam Fast 1394). The percentage of motile spermatozoa and velocity (VAP: Velocity of the Average Path) were assessed using a CASA plug-in developed for the Image J software (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007) and adapted to Pacific oyster spermatozoa. Calibration settings are the following ones: frame rate: 25 frames sec^{-1}, minimum number of spermatozoa observed for each sample: 30, minimum VAP for motile (µm.sec^{-1}): 10, minimum track length: 15 frames.

Flow cytometry analyses

Analyses of spermatozoon viability and mitochondrial membrane potential (MMP) were performed using an EasyCyte Plus cytometer (Guava Millipore) equipped with standard optics and a 488 nm argon laser. Fluorescence is given in arbitrary units. Analyses were carried out on 200 µL sample after dilution of spermatozoon suspension in FSW (concentration: 10^6 spermatozoa.mL^{-1} for viability; 10^7 spermatozoa.mL^{-1} for MMP). Viability and MMP were assessed according to Le Goic et al. (2013). Briefly, viability was measured using a 10 minutes dual staining with SYBR-14 (final concentration: 1µM) and propidium iodide (PI; final concentration: 10 µg.mL^{-1}). SYBR-14 only penetrates cells with intact membranes, and PI penetrates cells with damage membranes. Results were expressed as percentages of live, dying and dead spermatozoa. MMP was measured using the potential-dependent J-aggregate-forming delocalized lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-l,l',3,3'-tetra-ethylbenzimidazol carbocyanine iodide (JC-1), after a 10 minute incubation (final concentration 5 µM). JC-1 selectively enters into mitochondria and reversibly change color from green to orange as MMP increases. After 10 minutes incubation, sample was diluted ten times in FSW to reach probe equilibrium. MMP was thus estimated by orange/green fluorescence ratio.

Intracellular ATP content

To measure intracellular ATP content, 5.10^6 spermatozoa in 500 µL of FSW were transferred in a 2 mL cryotube (Nunc™), and stored in liquid nitrogen until analysis. Intracellular ATP content was measured in triplicates by bioluminescence (kit ATPlite, Perkin Elmer) using a plate reader (EnSpire™ 2300 Multilabel Reader, PerkinElmer). To avoid ATP hydrolysis during sample defrost, 250 µl of lysis solution containing anti-ATPases were added into cryotube which was then placed on a rotator tube holder (SB3, Stuart™). Then, sample was homogenized during 3-4 secondes by sonication (Vibra-cell ™ 72405, Bioblock Scientific) and 150 µL of sample were transferred to a microplate. A volume of 50 µL of substrate solution (Luciferine-Luciferase) was added. Microplate was shaked for 5 minutes (MS2 Mini shaker, Ika) at 100 rpm and then placed in the dark for 10 minutes until luminescence assessment.

Statistical analysis

Data are presented as means ± SEM. Data expressed as percentages were arcsine square root transformed and the means were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Fisher a posteriori test. A value of $P<0.05$ was considered as significant. Statistical analyses were performed using Statistica 6 software.

Results

Motility features of spermatozoa

One hour and half post activation, 70 ± 8% of spermatozoa were motile with a mean velocity of 48.0 ± 4.0 $\mu m.sec^{-1}$ (Fig.1). The percentage of motile spermatozoa significantly decreased at 13h, 20h and 24h post activation to reach 40 ± 8%, 15 ± 4% and 8 ± 5%, respectively. Spermatozoon velocity decreased slightly but not significantly during the first 20h of movement. At 24h post activation, it decreased more drastically, reaching 18.9 ± 8.0 $\mu m.sec^{-1}$ at this time.

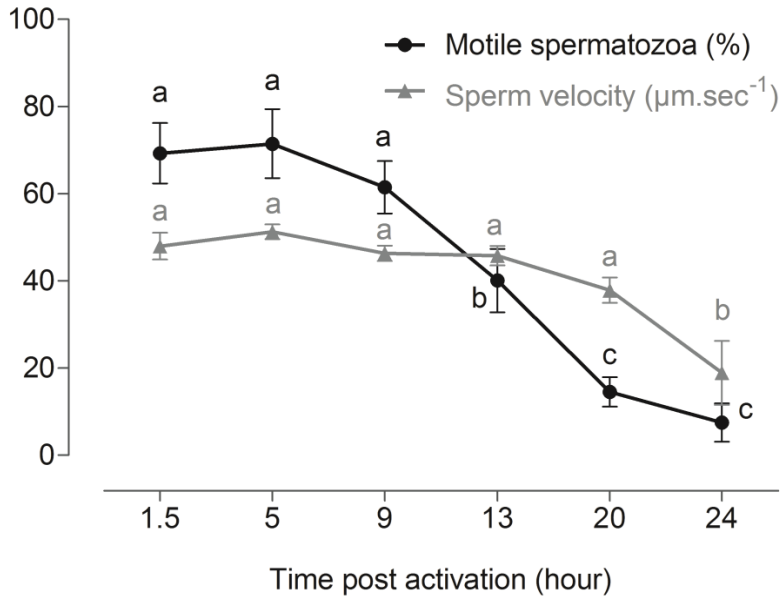


Fig.1. Changes in percentage of motile spermatozoa and in velocity, assessed on motile spermatozoa, according to time post activation (mean±SEM, n=6 males individuals). Different letters refer to significantly different results vs. time.

Flow cytometric analyses

The percentage of dead spermatozoa significantly increased fivefold between 9h and 13h post incubation, up to 5.3 ± 0.8% and did not change afterwards (Fig.2A).

Mitochondrial membrane potential (MMP) increased steadily during the first 9h of the swimming phase, up to 5.7 ± 0.4 (yellow/green fluorescence ratio) and was maintained at the same level afterwards: 6.2 ± 0.5, 6.1 ± 0.5 and 5.3 ± 0.5 at 13h, 20h and 24h, respectively (Fig.2B). Maintenance of spermatozoon MMP between 9h and 24h post activation is not due to differentiation of two spermatozoon sub populations, *e.g.*, one characterized by a high MMP and one by a low MMP (Fig.3).

Intracellular ATP content

Spermatozoon ATP content was 185.6 ± 15.7 nmol.10^{-9} one hour and half post activation. Then it decreased steadily down to 140.1 ± 7.8 nmol.10^{-9} spermatozoa at 9h post activation and was maintained to this level during the following hours of the movement phase (Fig.2C).

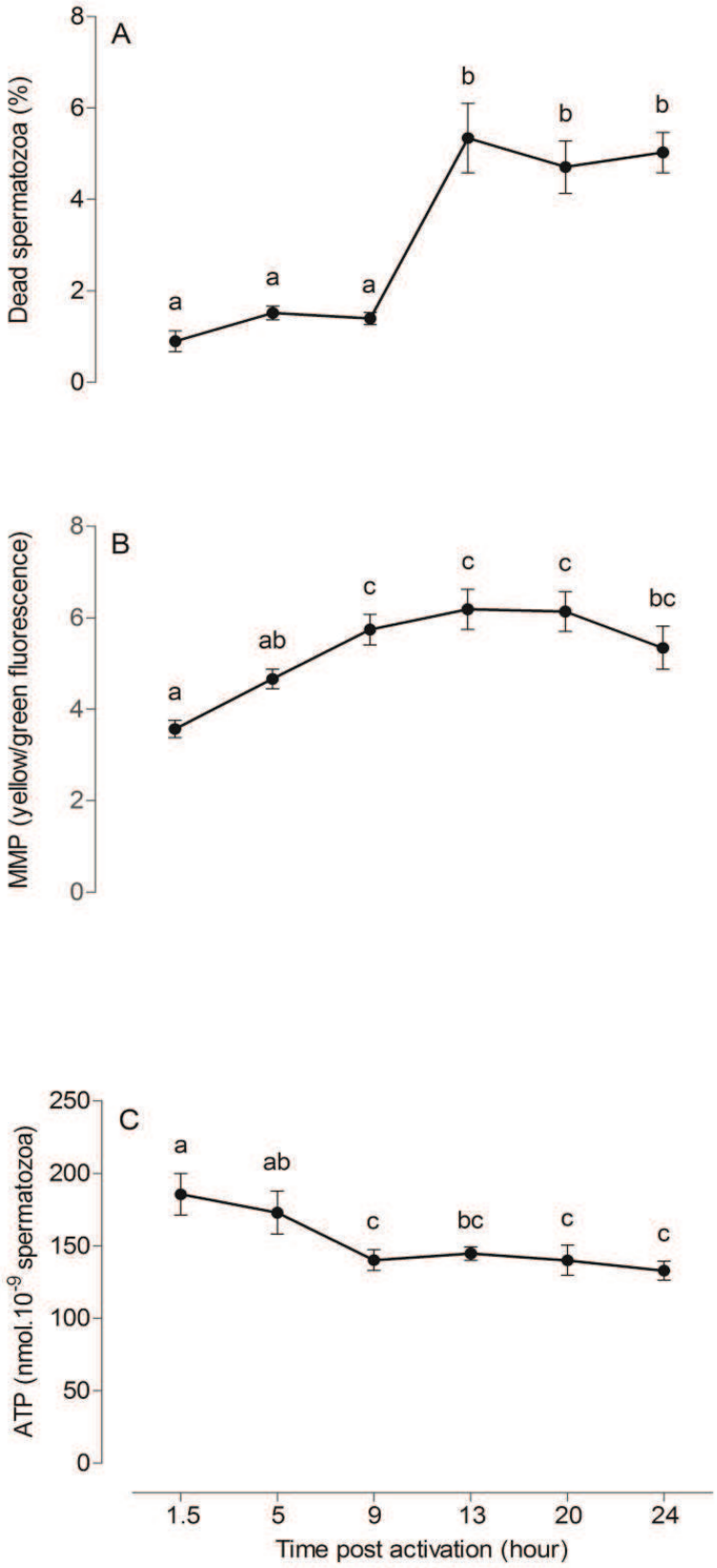


Fig.2. Changes in percentage of dead spermatozoa (A), spermatozoon mitochondrial membrane potential (MMP) (B) and intracellular ATP content (C), according to time post activation (mean±SEM, n=6 males individuals). Different letters refer to significantly different results vs. time.

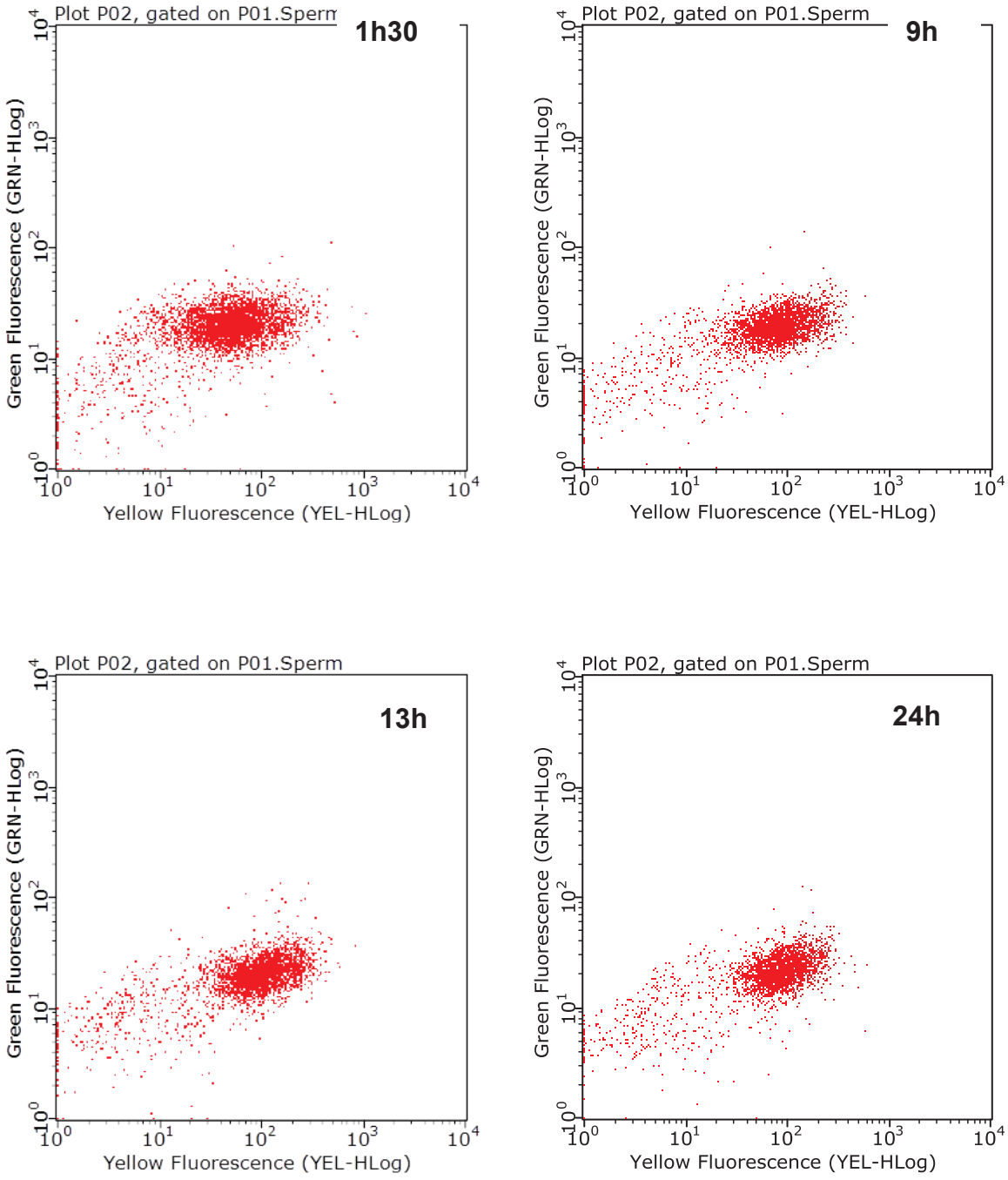


Fig.3. Mitochondrial membrane potential (MMP) assay using JC-1 dye. Yellow vs green fluorescence cytogram of spermatozoon population of one representative male at different time (hour) post activation in sea water.

Discussion

Changes in intracellular ATP content, mitochondrial membrane potential (MMP) and movement features were explored during the movement phase of Pacific oyster spermatozoa. Spermatozoon movement phase lasted up to 24 hours as measured by the percentage of motile cells, as previously reported in Pacific oyster by Suquet et al. (2010). The end of spermatozoon movement does not seem to be directly related to the percentage of dead spermatozoa, measured by dual staining with SYBR-14 and propidium ionide, which never reached values higher than 5% at 24h post activation. In our study, 1h30 post activation Pacific oyster spermatozoon velocity was 48.0 ± 3.4 $\mu m.sec^{-1}$. Higher values of spermatozoa velocity were measured and reported in other bivalve species: Australian oyster, Saccostrea *commercialis* (164 ± 33 $\mu m.sec^{-1}$), black-lip-pearl oyster (221 ± 12 $\mu m.sec^{-1}$), Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (99 ± 7 $\mu m.sec^{-1}$) (Denehy, 1975; Demoy-Schneider et al., 2012; Basti et al., 2013), but also in the king scallop (162 ± 15 $\mu m.sec^{-1}$), mussels *Perna canaliculus* (86 ± 4 $\mu m.sec^{-1}$) and *Mytilus sp.* (104 ± 2 $\mu m.sec^{-1}$) (Jha et al., 2008; Smith et al., 2012; Suquet et al., 2013). Both the low spermatozoon velocity and the long movement duration suggest a specific strategy developed by Pacific oyster spermatozoa resulting in a potential long total distance covered by spermatozoa during their movement phase (about 3-4 meters). Such strategy may reflect the adaptation of Pacific oyster to the sessile life, improving oocyte fertilization success (Suquet et al., 2012). Furthermore, this movement strategy may be one of the biological traits contributing to the invasiveness of Pacific oyster in the wild (Troost, 2010).

Spermatozoon ATP content decreased during the first 9h of the movement phase, down to 75% of the value measured at 1.5h post activation. Afterwards, no further changes in ATP content were observed. These results suggest that ATP hydrolysis is higher than ATP synthesis during the first 9h of movement. Later on (9h to 24h), ATP consumption is highly reduced or compensated by higher ATP production. These results let us propose that a low intracellular ATP content cannot explain the end of the movement of Pacific oyster spermatozoa. A similar pattern was previously observed in Pacific oyster spermatozoa (Suquet et al., 2010): ATP content decreased in the first 6h post activation and then was maintained constant until the end of spermatozoon movement, 18 hours later. Conversely, the exhaustion of intracellular ATP content was observed at the end of the movement phase in king scallop (Suquet et al., 2013) and in black-lip-pearl oyster (Demoy-Schneider et al., 2012). The maintenance of intracellular ATP content during the second phase of movement, *i.e.*, from 9h to 24h post activation, was not affected by the slow decrease of the percentage of motile spermatozoa, confirming a weak relationship between these two parameters. We suggest that the intracellular ATP content of non-

motile spermatozoa is kept constant in the cell after the end of movement. In the present study, spermatozoon mitochondrial membrane potential (MMP), measured by JC-1 assay, increased during the first 9h of the movement phase. Then, MMP observed in spermatozoa did not change from 13h post activation to the end of the movement phase, suggesting that the proton gradient was maintained in non-motile spermatozoa after the end of movement. Spermatozoon ATP content and MMP assays both suggest that the steady decrease of ATP content assessed during the first 9h of movement, has simultaneously stimulated ATP synthesis through OXPHOS, as the proton gradient is used by ATP-synthase for the phosphorylation of Adenosine Di-Phosphate (ADP) to ATP. We speculate that stimulation of ATP synthesis through OXPHOS may compensate for ATP hydrolysis in motile spermatozoa between 9h and 24h post activation.

In our study, spermatozoon velocity remained relatively stable during the movement phase. Spermatozoon swimming speed is generated by the propagation of constant amplitude bending waves along the flagellum, conducted by dynein-ATPase, localized along the axoneme. The propagation of bending waves requires continuous ATP supply (Gibbons, 1981; Tombes et al., 1987; Cosson et al., 1997). The constant velocity, whereas some spermatozoa stop swimming, suggests that the end of flagellar beat did not occurred steadily during the 24h movement period, but rather is a rapid process, as no progressive decrease of velocity was observed. It is assumed that the end of spermatozoon flagellar beat is not explained by a low intracellular ATP content of spermatozoa and different other hypotheses are proposed. First, it may be due to plasma membrane alterations, which may have negatively affected progressive bending waves along the flagellum and/or induced membrane solute permeability, leading to potential intracellular osmotic or pH changes. Plasma membrane alterations of Pacific oyster spermatozoa at the end of the movement phase were previously reported (Suquet et al., 2010). Intracellular pH has been suggested to regulate spermatozoon movement in Pacific oyster because gonad pH of this species (mean±SD: pH 5.82±0.48) is more acidic than sea water (pH 8.0) and the percentage of motile spermatozoa is reduced when pH of sea water is shifted back to acidic values (pH 5.0) (Faure, 1996; Demoy-Schneider et al., 2013). Second, the end of flagellar beat may be due to a disruption of ATP transport from the mitochondria to the flagellum. This hypothesis would suggest the involvement of phosphagens. Phosphagens are high energy component and are known to serve as shuttle of energy in polarized cells such as spermatozoa, from the sites of ATP production to the ATPases (Ellington, 2001). In sea urchin spermatozoa, inhibition of ATP transport via phosphagen shuttles results in the decrease of ATP in the distal part of the flagellum, leading to motility impairment (Tombes et al., 1987). Thus, we suggest that the exhaustion of phosphagens or impairment of corresponding phosphagen kinase activity might have induced a rapid cessation of flagellar beat.

To conclude, we suggested that Pacific oyster spermatozoa hydrolyze intracellular ATP content during the early part of the movement phase, *i.e.*, the first 9h, stimulating ATP synthesis through OXPHOS. Then OXPHOS seems to be involved in sustaining constant and high ATP level until the end of the motility phase. Despite the maintenance of a high ATP level, it does not prevent the end of spermatozoon motility. It is assumed that ATP content is not the main factor limiting the movement of Pacific oyster spermatozoa. Alternative hypothesis of spermatozoon movement cessation can be proposed, such as membrane alterations, the exhaustion of phosphagens or the impairment of corresponding phosphagen kinase activity. Further studies are needed to validate these hypotheses and to explore mechanisms involved in controlling spermatozoon movement in this species. Blocking mitochondrial ATP production with specific inhibitors of OXPHOS combined with intracellular ATP content assays could validate the role of OXPHOS in sustaining spermatozoon ATP content. Monitoring endogenous metabolites to establish an overview of the metabolic status of spermatozoa during the movement phase would also help to identify metabolites involved in the end of movement and potential phosphagens in Pacific oyster spermatozoa.

Acknowledgements

The authors want to thank the technical team of Ifremer's facilities in Argenton. This work was partly supported by the European project ReproSeed (FP7-KBBE-2009-3), coordinated by Dr. J.-L. Nicolas. M. Boulais was funded by Ifremer and by a doctoral grant from Région Bretagne.

References

Basti, L., Nagai, K., Tanaka, Y., Segawa, S., 2013. Sensitivity of gametes, fertilization, and embryo development of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii,* to the harmful dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*. Mar. Biol. 160, 211–219. doi:10.1007/s00227-012-2079-2

Cosson, J., 1996. A moving image of flagella: News and views on the mechanisms involved in axonemal beating. Cell Biol. Int. 20, 83–94. doi:10.1006/cbir.1996.0012

Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dreanno, C., Linhart, O., Suquet, M., 1997. Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. Pol. Arch. Hydrobiol. 44, 103–113.

Demoy-Schneider, M., Levêque, A., Schmitt, N., Pennec, M.L., Cosson, J., 2012. Motility activation and metabolism characteristics of spermatozoa of the black-lip-pearl oyster *Pinctada margaritifera* var: cumingii (Jameson, 1901). Theriogenology 77, 53–64. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.07.014

Demoy-Schneider, M., Schmitt, N., Suquet, M., Labbé, C., Boulais, M., Prokopchuk, G., Cosson, J., 2013. Biological characteristics of sperm in two oyster species: the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. In "Spermatozoa: Biology, Motility

and Function and Chromosomal abnormalities", Chapter 2, Nova Science Publishers Inc., Brenda T. Erickson Editor, ISBN: 978-1-63, p. 15-74.

Denehy, M., 1975. Propulsion of nonrotating ram and oyster spermatozoa. Biol. Reprod. 13, 17–29. doi:10.1095/biolreprod13.1.17

Dreanno, C., 1998. Régulation de la mobilité des spermatozoïdes de turbot (*Psetta maxima*) et de bar (*Dicentrarchus labrax*) : Etude du métabolisme énergétique, du contrôle ionique, de la morphologie et du pouvoir fécondant. Thesis, Univ. Rennes, France.

Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M., Cibert, C., Fauvel, C., Dorange, G., Billard, R., 1999a. Effects of osmolality, morphology perturbations and intracellular nucleotide content during the movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 116, 113–125.

Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M., Seguin, F., Dorange, G., Billard, R., 1999b. Nucleotide content, oxydative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period. Mol. Reprod. Dev. 53, 230–243. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<230::AID-MRD12>3.0.CO;2-H

Ellington, W., 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. Annu. Rev. Physiol. 63, 289–325. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.289

Faure, C., 1996. Paramètres physiologiques de l'émission et de l'activation des gamètes mâles de deux mollusques bivalves: la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg). Thesis. University of Paris 7, France.

Gallon, F., Marchetti, C., Jouy, N., Marchetti, P., 2006. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. Fertil. Steril. 86, 1526–1530. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.055

Gibbons, I., 1981. Cilia and flagella of eukaryotes. J. Cell Biol. 91, S107–S124. doi:10.1083/jcb.91.3.107s

Jha, M., Cote, J., Hoeh, W.R., Blier, P.U., Stewart, D.T., 2008. Sperm motility in *Mytilus edulis* in relation to mitochondrial DNA polymorphisms: Implications for the evolution of doubly uniparental inheritance in bivalves. Evolution 62, 99–106. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00262.x

Le Goic, N., Hegaret, H., Fabioux, C., Miner, P., Suquet, M., Lambert, C., Soudant, P., 2013. Impact of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on Pacific oyster reproductive output: application of flow cytometry assays on spermatozoa. Aquat. Living Resour. 26, 221–228. doi:10.1051/alr/2013047

Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., Marchetti, P., 2002. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. Hum. Reprod. 17, 1257–1265. doi:10.1093/humrep/17.5.1257

Marchetti, C., Jouy, N., Leroy-Martin, B., Defossez, A., Formstecher, P., Marchetti, P., 2004. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. Hum. Reprod. 19, 2267–2276. doi:10.1093/humrep/deh416

Mita, M., Yasumasu, I., 1984. The role of external potassium ion in activation of sea urchin spermatozoa. Dev. Growth Differ. 26, 489–495.

Mita, M., Hino, A., Yasumasu, I., 1984. Effect of temperature on interaction between eggs and spermatozoa of sea urchin. Biol. Bull. 166, 68–77. doi:10.2307/1541431

Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., Zara, V., 2012. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. Int. J. Androl. 35, 109–124. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x

Smith, J.F., Adams, S.L., McDonald, R.M., Gale, S.L., McGowan, L.T., Tervit, H.R., 2012. Cryopreservation of Greenshell (TM) Mussel (*Perna canaliculus*) sperm. II. Effect of cryopreservation on fertility, motility, viability and chromatin integrity. Aquaculture 364, 322–328. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.08.039

Stendardi, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Palumberi, D., Serafini, F., Ferramosca, A., Zara, V., 2011. Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. Int. J. Androl. 34, 247–255. doi:10.1111/j.1365-2605.2010.01078.x

Suquet, M., Labbe, C., Brizard, R., Donval, A., Le Coz, J.R., Quere, C., Haffray, P., 2010. Changes in motility, ATP content, morphology and fertilisation capacity during the movement phase of tetraploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. Theriogenology 74, 111–117. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.01.021

Suquet, M., Quere, C., Mingant, C., Lebrun, L., Ratiskol, D., Miner, P., Cosson, J., 2013. Effect of sampling location, release technique and time after activation on the movement characteristics of scallop (*Pecten maximus*) sperm. Aquat. Living Resour. 26, 215–220. doi:10.1051/alr/2013048

Tombes, R., Brokaw, C., Shapiro, B., 1987. Creatine kinase-dependent energy transport in sea urchin spermatozoa-Flagellar wave attenuation and theorical analysis of high energy phosphate diffusion. Biophys. J. 52, 75–86.

Troost, K., 2010. Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. J. Sea Res. 64, 145–165. doi:10.1016/j.seares.2010.02.004

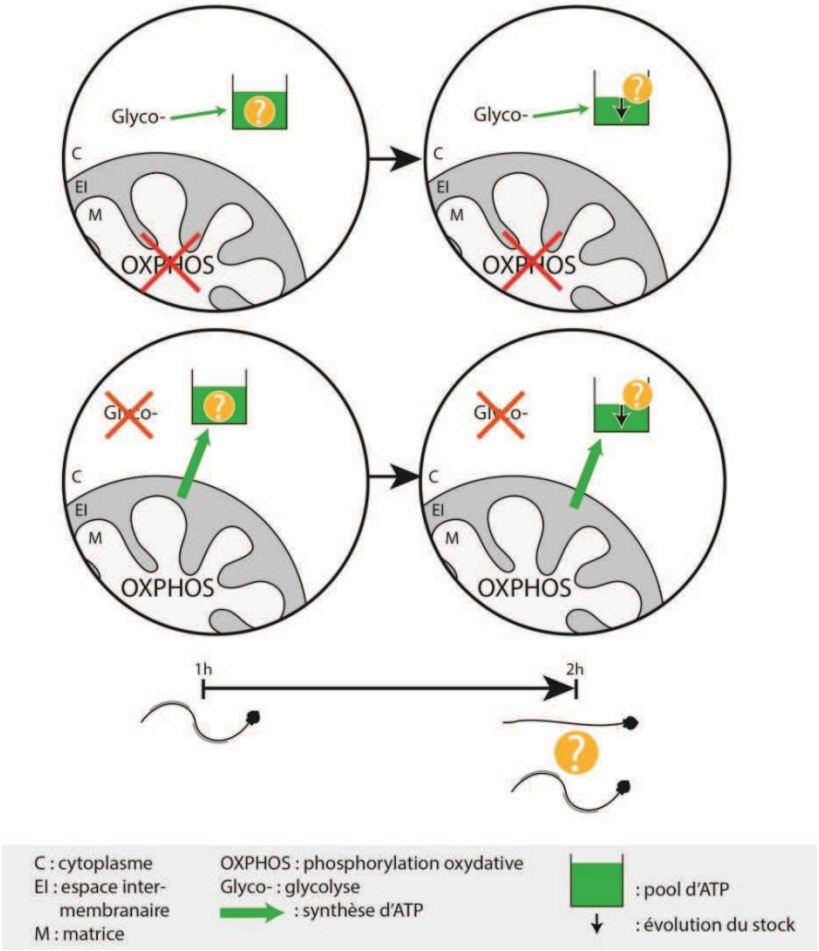
Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology 67, 661–672. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.10.003

Chapitre 2

Rôle de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative dans la production d'ATP du spermatozoïde d'huître creuse

---

Le travail mené dans le premier chapitre a permis de confirmer la durée de mouvement du spermatozoïde d'huître creuse et le maintien du contenu intracellulaire en ATP précédemment observés par Suquet et al. (2010). Le rôle de la phosphorylation oxydative dans la synthèse d'ATP a été suggéré mais reste à confirmer. Afin d'étudier l'implication de cette voie dans la production d'énergie du spermatozoïde d'huître creuse, une approche pharmacologique à l'aide d'inhibiteurs de la phosphorylation oxydative et de la glycolyse a été réalisée. La question scientifique est schématisée dans la figure suivante :



Cette étude est présentée sous forme d'un article.

Respective roles of glycolysis and oxidative phosphorylation in ATP production for spermatozoon motility in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.

Myrina. Boulais[1*], Nelly Le Goïc[2], Marc Suquet[1], Claudie Quéré[3], Pierre Boudry[3], Philippe Soudant[2]

[1]*Ifremer, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Site Expérimentale d'Argenton, Argenton, France ;*
[2]*IUEM, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France ;*
[3]*Ifremer, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Centre de Bretagne, Plouzané, France ;*

** Corresponding author e-mail: myrina.boulais@gmail.com*

Abstract

In spermatozoa of Pacific oyster, steady decrease in intracellular ATP content during the first hours of the movement phase stimulates mitochondrial oxidative phosphorylation. This allows the maintenance of a high intracellular ATP content until the end of the movement phase (**chapter 1**). Using chemical inhibitors, we investigated the roles of oxidative phosphorylation (OXPHOS) and glycolysis in fueling ATP for motility of spermatozoa in this species. Inhibitions of mitochondrial respiratory chain complexes I (C I) and III (C III) reduced mitochondrial membrane potential (MMP), intracellular ATP content and oxygen consumption of spermatozoa. However, spermatozoon movement features were differently impacted depending on the blocked complex. Inhibition of C I reduced spermatozoon velocity whereas inhibition of complex III totally suppresses movement of spermatozoa. The use of an OXPHOS uncoupler reduced MMP and highly increased spermatozoon oxygen consumption without impacting movement features and intracellular ATP content of spermatozoa. On the other hand, blocking ATP-synthase activity by oligomycin or glycolysis by 2-deoxy-D-glucose (2-DG) had no impact on spermatozoon cellular, biochemical and movement features. These results suggest that alternative ATP producing pathways might contribute to sustain energy production when OXPHOS is inhibited. However, when C I and C III are blocked, such alterative ATP producing pathways are less efficient or not even functional resulting in impaired movement features of

spermatozoa. We propose that reactive oxygen species generated at C I and C III might be involved in the impairment of spermatozoon biochemical and movement features.
Keywords: Oxidative phosphorylation / Glycolysis / ATP production / Sperm motility / Crassostrea gigas

Introduction

Spermatozoa require motility for a more or less long period of time to actively reach and penetrate the oocytes. The duration of this period strongly varies between animal species, notably in relation with their mode of reproduction, and requires appropriate energy. Since flagellar movement occurs partly through reaction catalyzed by dynein-ATPase in the flagella (Cosson, 1996), adenosine triphosphate (ATP) is needed to fuel spermatozoon movement. There are two major metabolic pathways to produce ATP, oxidative phosphorylation (OXPHOS) and glycolysis.

OXPHOS is the most efficient mean of producing ATP, producing nineteen times more ATP than glycolysis. OXPHOS takes place in the mitochondrion and requires the coordinated operation of two main components, the respiratory chain and the ATP-synthase, both located in the inner mitochondrial membrane (Piomboni et al., 2012). The mitochondrial respiratory chain is involved in the transport of reducing equivalents from some electron donors to the molecule of O_2 with the final formation of H_2O. The respiratory chain uses the free energy released during this process for the generation of an electrochemical gradient of protons across the inner mitochondrial membrane. ATP-synthase uses this proton gradient for the synthesis of ATP (Piomboni et al., 2012). A strict coupling is therefore required between respiration and phosphorylation.

Techniques to investigate the role of OXPHOS mainly use inhibitors of mitochondrial respiratory chain complexes and of ATP-synthase as well as OXPHOS uncoupler. The functionality of the respiratory chain can be inhibited by blocking the transport of reducing equivalents at different complex levels. Mitochondrial complexes I, II, III and IV can be blocked by addition of rotenone, 3-nitropropionic acid (3-NP), antimycin A and potassium cyanide, respectively. Oligomycin can be used to inhibit the ATP-synthase activity. Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) or carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) are commonly used as OXPHOS uncouplers. One reliable assay to give information about mitochondrial respiratory chain functionality is the rate of mitochondrial oxygen consumption (Ferramosca et al., 2008; Brand and Nicholls, 2011; Stendardi et al., 2011). It is an accurate measure of the electron flow of the mitochondrial respiratory chain, and is generally

measured by polarography using a Clark-type oxygen electrode. This method, combined with the use of inhibitors of mitochondrial respiratory chain and ATP-synthase as well as an OXPHOS uncoupler, demonstrated that OXPHOS fuels ATP for movement in spermatozoa of turbot (*Psetta maxima*), but cannot compensated for ATP hydrolysis, leading to the exhaustion of intracellular ATP content in the flagellum and the end of movement (Dreanno, 1998). Another assay to give information about mitochondrial respiratory chain functionality is the mitochondrial membrane potential (MMP) (Stendardi et al., 2011), as it results from the electrochemical gradient of protons across the inner mitochondrial membrane. Monitoring MMP in a cell allows establishing the time at which mitochondria depolarize. Recent developments in flow cytometry methods have enabled accurate and rapid analysis of spermatozoon MMP (Marchetti et al., 2002; Marchetti et al., 2004; Gallon et al., 2006; Le Goic et al., 2013) using specific dye such as JC-1. This latter can selectively enter into mitochondria and reversibly change colour from green to orange as the membrane potential increases (Marchetti et al., 2004). MMP of human spermatozoa has been reported as an indicator of their quality (Kasai et al., 2002; Marchetti et al., 2002 and 2004; Espinoza et al., 2009). Brand and Nicholls (2011) mentioned that large changes in respiration are associated with rather small changes in MMP, thus measurement of MMP is less sensitive to change than the one of respiratory rate. Thus, combination of mitochondrial respiration and MMP assays is much more powerful and informative than measurement of either alone.

The role of glycolysis can be investigated using a similar approach. Glycolysis can be inhibited by blocking degradation of glucose or of some glycolytic intermediates. 2-deoxy-D-glucose (2-DG) is an antimetabolite of glucose which inhibits the glycolytic pathway (Takei et al., 2014). 2-DG can enter into the cell and is phosphorylated to 2-DG-6-phosphate by hexokinase. 2DG-6-phosphate, however, cannot be metabolized further (Hiipakka and Hammerstedt, 1978). 2-DG was found to be a competitive inhibitor to glucose in mice spermatozoa (Mukai and Okuno, 2004). Iodoacetate and sodium fluoride can also be used to inhibit glycolytic pathway. Iodoacetate inhibits glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase, *i.e.*, the "upper part" of glycolysis, whereas sodium fluoride inhibits enolase, *i.e.*, the "lower part" of glycolysis (Ronquist et al., 2013).

In the Pacific oyster, spermatozoa are characterized by a long movement duration (>24 hours) together with maintenance of high intracellular ATP content (Suquet et al., 2010; Boulais et al., **chapter 1**). Boulais et al. (**chapter 1**) suggested that steady decrease of intracellular ATP content during the first hours of spermatozoon movement phase stimulates simultaneously OXPHOS, which maintains a high intracellular ATP content (75% of the initial concentration) until the end of the movement phase of Pacific oyster spermatozoa. These results were obtained

from measurements of MMP and intracellular ATP content. The necessity to validate the role of OXPHOS in fueling ATP of Pacific oyster spermatozoa using more specific approaches has been pointed out by these authors.

The aim of the present study was to explore the respective roles of the two main metabolic pathways to produce energy in the form of ATP, OXPHOS and glycolysis, in fueling ATP for motility of Pacific oyster spermatozoa. We examined the effects of specific inhibitors of mitochondrial respiratory chain (rotenone and antimycin A), ATP-synthase (oligomycin), glycolysis (2-DG) and an OXPHOS uncoupler (CCCP) on movement, intracellular ATP content, MMP and oxygen consumption features of Pacific oyster spermatozoa.

Materials and methods

Collection of sperm

During the natural spawning period (June-September), three year old mature oysters (mean weight±SEM: 72.5±2.3g) were collected from farmed stock in the Bay of Brest (Brittany, France). Sperm was collected by stripping (n=4 to 5 males) according to Boulais et al. (**chapter 1**). Briefly, spermatozoa were collected in 5 mL of sea water (19°C) filtered at 1 µm (FSW). Concentration of spermatozoa was determined by flow cytometer (duplicates) and was adjusted to 7.10^8 spermatozoa.mL^{-1} by further dilution in FSW, in a 20 mL plastic bowl. Spermatozoon suspensions were incubated in FSW during 30 minutes allowing spermatozoa to undergo a process known as capacitation, which leads to hyperactivated motility (Demoy-Schneider et al., 2013).

Chemical inhibitors of OXPHOS and glycolysis

The involvement of oxidative phosphorylation and glycolysis in ATP fueling for spermatozoon movement was performed through pharmaco-chemical approach using chemical inhibitors (Fig.1). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Different concentrations of inhibitors (Table 1) were tested to obtain the most efficient one, *i.e.*, the concentration which decreased MMP without affecting the percentage of dead spermatozoa, following the methodology used by Donaghy et al. (2012). For each chemical concentration, a working solution was prepared in FSW by dilution of a stock solution (100-fold more concentrated than the working solution). Diluents (DMSO: dimethyl sulfoxide, EtOH: ethanol and ultrapure water) were shown to be non-toxic for oyster spermatozoa, as we observed no differences between the control in FSW and working solutions of diluents on viability, MMP and movement features of

spermatozoa. The optimal concentration of each chemical (Table 1) was then used to assess inhibitor effect on spermatozoon oxygen consumption and intracellular ATP content.

After capacitation, individual spermatozoon suspensions (7.10^8 spermatozoa.mL^{-1}) were collected and incubated with the different inhibitor concentrations for one hour (19°C) and then, sampled in triplicates for analyses.

Table 1. Range of tested and optimal concentrations of chemicals and concentration of diluents. DMSO: dimethyl sulfoxide, EtOH: ethanol.

Chemicals	Range of tested concentrations	Optimal concentration	Final concentration of diluent
Rotenone	0.05-10 µM	0.1 µM	0.1% DMSO
Antimycin A	0.05-1 µM	0.5 µM	0.1% EtOH
Oligomycin	0.05-1 µM	1 µM	0.1% EtOH
CCCP	0.05-1 µM	1 µM	0.1% DMSO
2-DG	0.2-50 mM	20 mM	0.1% Ultrapure water

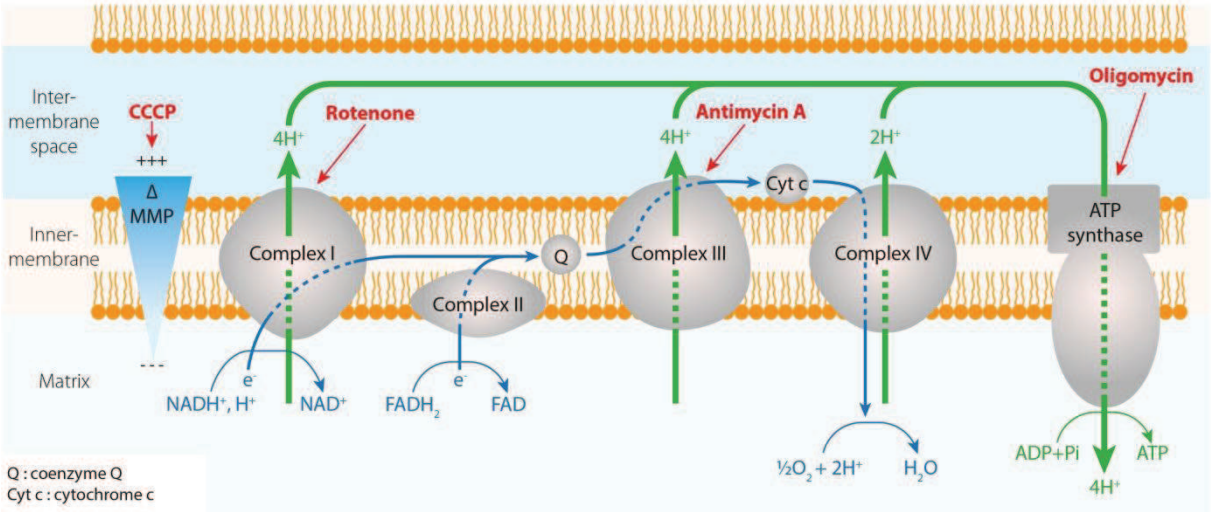


Fig.1. Sub-cellular molecular targets of mitochondrial respiratory chain and ATP-synthase inhibitors.

Motility features of spermatozoa

To measure movement features of spermatozoa 25 µL of the spermatozoon suspension were diluted in 475 µL of FSW containing 1g.L^{-1} of pluronic acid. Then, 10µl of diluted suspension were transferred to a cellule Fast-Read® 102 (Fisher Scientific) and spermatozoon movement characteristics were observed under a microscope (dark field, Olympus BX51, X20 magnification), connected to a video camera (Imaging source DMK 22BUC03). The percentage of motile spermatozoa and their velocity (VAP: Velocity of the Average Path) were assessed using a CASA plug-in developed for the Image J software (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007)

and adapted to Pacific oyster spermatozoa. Calibration settings are the following ones: frame rate: 60 frames sec^{-1}, minimum number of spermatozoa observed for each sample: 30, minimum VAP for motile ($\mu m.sec^{-1}$): 10, minimum track length: 14 frames.

Flow cytometry analyses

The analyses of spermatozoon viability and mitochondrial membrane potential (MMP) were performed using an EasyCyte Plus cytometer (Guava Millipore) according to Le Goic et al. (2013). Briefly, analyses were carried out on a 200 µL sample after dilution of spermatozoon suspension in FSW (concentration: 10^6 spermatozoa.mL^{-1} for viability; 10^7 spermatozoa.mL^{-1} for MMP). Viability was measured using a 10 minutes dual staining with SYBR-14 (final concentration: 1µM) and propidium iodide (PI; final concentration: 10 $\mu g.mL^{-1}$). Results were expressed as percentages of live, dying and dead spermatozoa. MMP was measured using the potential-dependent J-aggregate-forming delocalized lipophilic cationic probe JC-1, after a 10 minute incubation period (final concentration 5 µM). To reach probe equilibrium, sample was diluted ten times in FSW. MMP was thus estimated by orange/green fluorescence ratio.

Oxygen consumption

Oxygen consumption of spermatozoa was measured by polarography using a water-jacketed O_2 monitoring system (Qubit System, Kingston, Ontario, Canada). Temperature was controlled at 19°C by a circulating refrigerated water bath. For each assay, 800 µL of FSW was added in the three chambers of the system to record dissolved oxygen concentration of seawater. Five minutes later, 7.10^9 spermatozoa were added in each chamber in order to assess their oxygen consumption in FSW for a 10 minute period. Then, the chemical was introduced in two of the three chambers and changes in oxygen consumption of spermatozoa were measured during one hour. The third chamber was used as a control of oxygen consumption of spermatozoa in FSW (without chemical). Oxygen consumption was then estimated by calculating the slope of dissolved oxygen using the Logger Pro 3.6.1 software.

Intracellular ATP content

Intracellular ATP content of spermatozoa was assessed according to Boulais et al. (**chapter 1**). Briefly, 5.10^6 spermatozoa in 500 µL of FSW were transferred in a 2 mL cryotube (Nunc™), and stored in liquid nitrogen until later analysis. Intracellular ATP content was assessed in triplicates by bioluminescence (kit ATPlite, Perkin Elmer) using a plate reader (EnSpire™ 2300 Multilabel Reader, PerkinElmer).

Statistical analysis

Data are presented as percentages of control (*i.e.*, without inhibitor) and expressed as mean ± SEM. Data expressed as a ratio or percentage were arcsine square root transformed prior statistical analysis and the means were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Fisher a posteriori test. The following statistical significance values were reported: * for $p<0.05$, ** for $p<0.01$ and *** for $p<0.001$. Statistical analyses were performed using Statistica 6 software.

Results

Inhibition of glycolysis

Incubation of oyster spermatozoa with 2-DG had no impact on spermatozoon movement features, MMP, intracellular ATP content and oxygen consumption.

Inhibition of the ATP-synthase

Oligomycin did not alter oyster spermatozoon movement features, MMP, intracellular ATP content, and oxygen consumption.

Uncoupling oxidative phosphorylation (OXPHOS)

Incubation of oyster spermatozoa with CCCP did not impact spermatozoon movement features and the percentage of dead spermatozoa at all tested concentrations (Fig.2A). CCCP at 1µM did not change the intracellular ATP content (Fig.2B). CCCP reduced MMP in a concentration dependent manner and highly increased spermatozoon oxygen consumption at 1 µM.

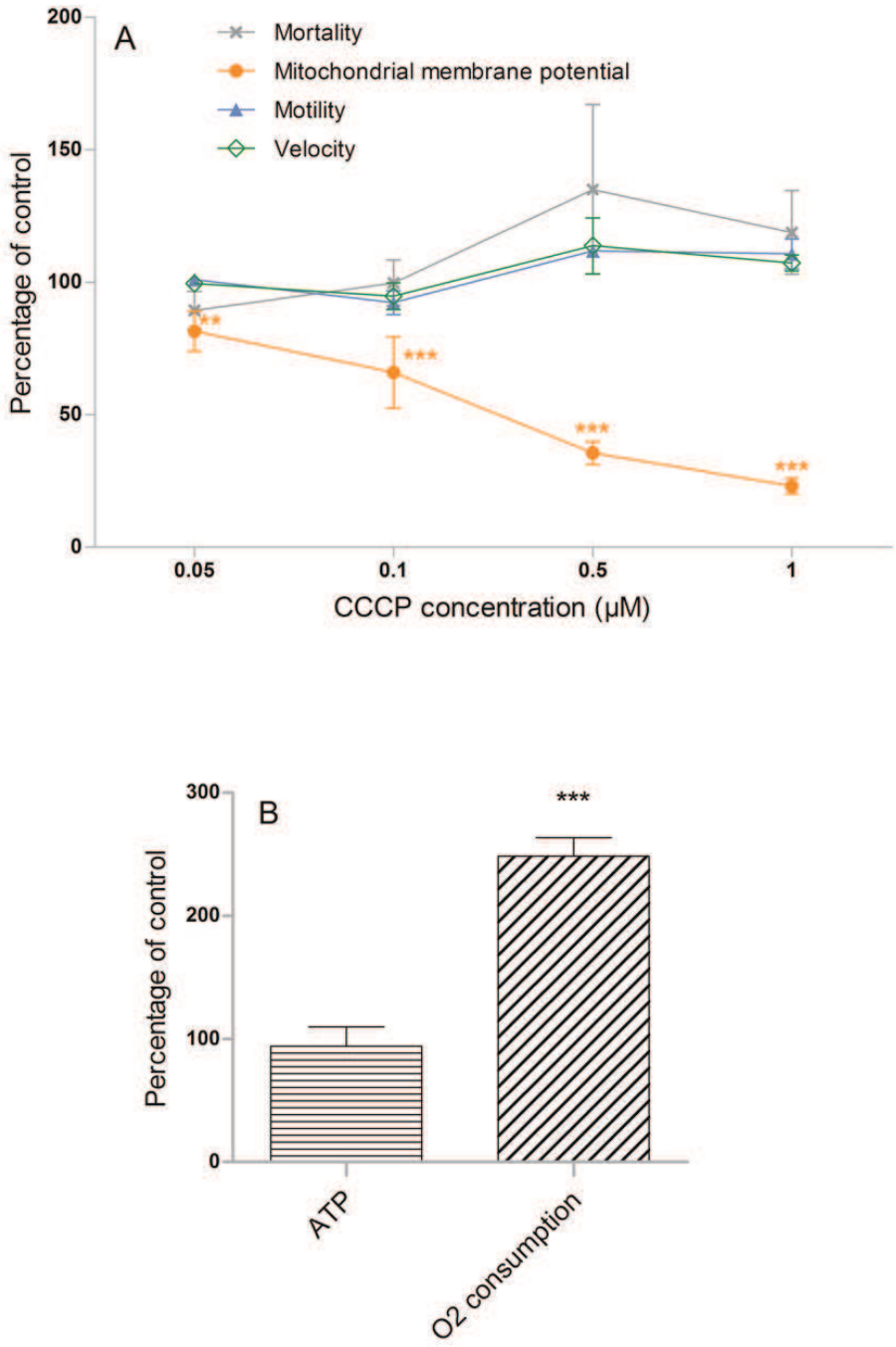


Fig.2. Effects of CCCP (A) on the percentage of dead spermatozoa (Mortality), mitochondrial membrane potential, percentage of motile spermatozoa (Motility) and velocity of motile spermatozoa (Velocity) in Pacific oyster, effects of 1 µM of CCCP (B) on intracellular ATP content and oxygen consumption of spermatozoa (n=4, except n=5 for intracellular ATP content and oxygen consumption). Asterisks indicate a significant difference with the control,* for $p<0.05$, ** for $p<0.01$ and *** for $p<0.001$.

Inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain

Incubation of oyster spermatozoa with rotenone reduced MMP for all of tested concentrations in a dose dependent manner (Fig.3A). The percentage of dead spermatozoa increased at the highest concentration of rotenone to reach 10% of dead spermatozoa. Rotenone was so considered as cytotoxic for oyster spermatozoa at concentration above 10 µM. Rotenone drastically reduced velocity of motile spermatozoa. It was noticed that spermatozoa were "twitching", *i.e.*, showing an erratic and fragmented movement, rather than a progressive forward movement. However, rotenone did not impact the percentage of motile spermatozoa. Rotenone (0.1 µM) significantly reduced intracellular ATP content (down to 78% of the control value) and completely inhibited oxygen consumption of spermatozoa at the same concentration (Fig.3B).

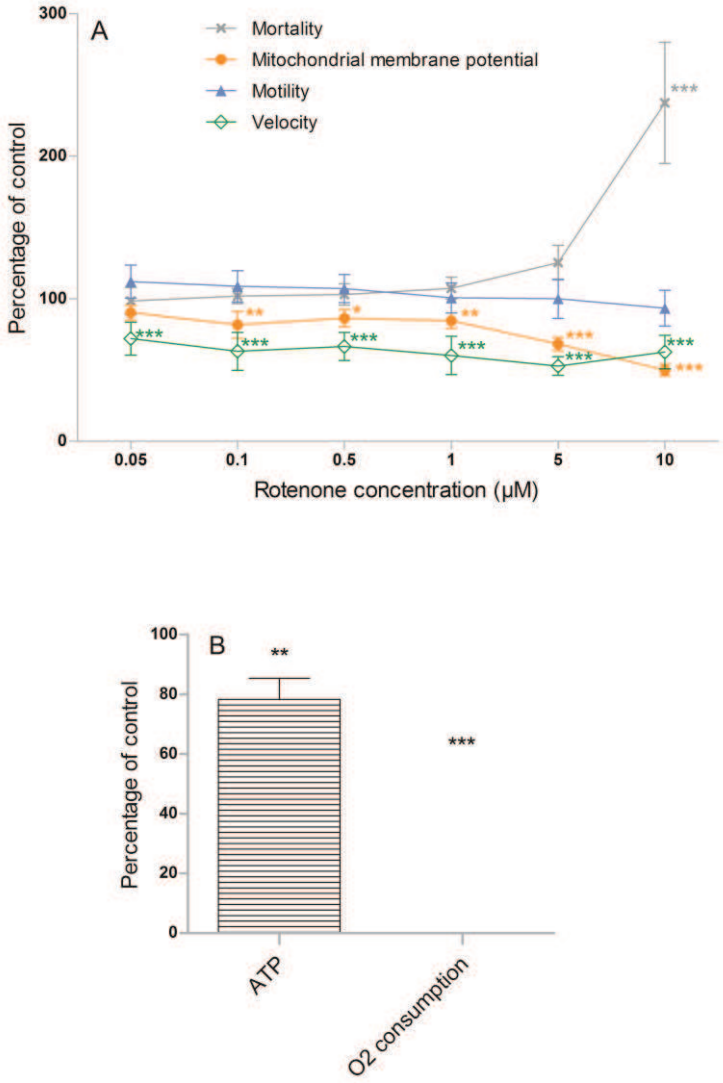


Fig.3. Effects of rotenone (A) on the percentage of dead spermatozoa (Mortality), mitochondrial membrane potential, percentage of motile spermatozoa (Motility) and velocity of motile spermatozoa (Velocity) in Pacific oyster, effects of 0.1 µM of rotenone (B) on intracellular ATP content and oxygen consumption in spermatozoa (n=4, except n=5 for intracellular ATP content and oxygen consumption). Asterisks indicate a significant difference with the control,* for $p<0.05$, ** for $p<0.01$ and *** for $p<0.001$.

Inhibition of complex III of the mitochondrial respiratory chain

Incubation of spermatozoa with antimycin A did not result in viability reduction at all tested concentrations (Fig.4A). MMP was significantly reduced at 0.5 and 1µM of antimycin A. The percentage of motile spermatozoa was drastically reduced at 0.05 and 0.1 µM of antimycin A and motility was totally inhibited at higher concentrations. Antimycin A at 0.5 µM decreased intracellular ATP content of spermatozoa down to 70% of the control value, and completely inhibited oxygen consumption of spermatozoa (Fig.4B).

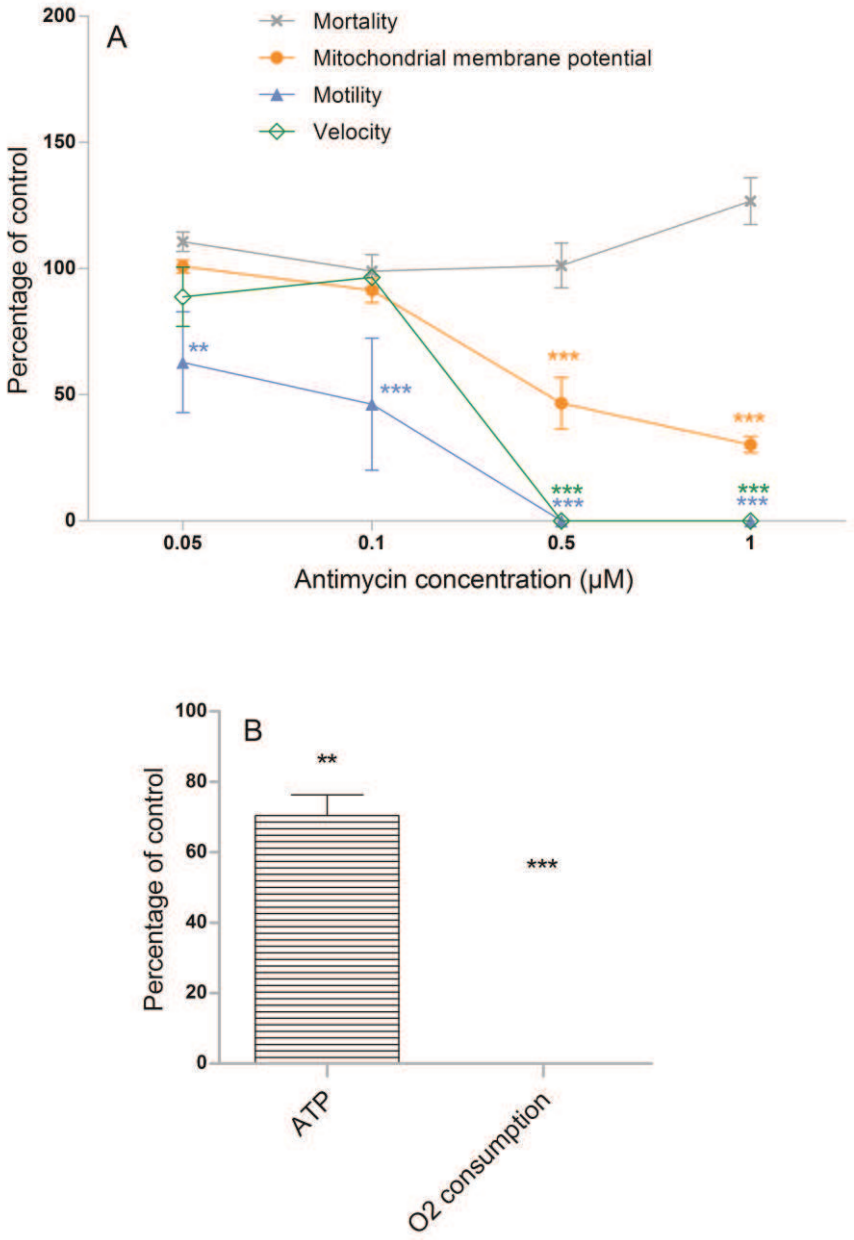


Fig.4. Effects of antimycin A (A) on the percentage of dead spermatozoa (Mortality), mitochondrial membrane potential, percentage of motile spermatozoa (Motility) and velocity of motile spermatozoa (Velocity) in Pacific oyster, effects of 0.5 µM of antimycin A (B) on intracellular ATP content and oxygen consumption in spermatozoa (n=4, except n=5 for intracellular ATP content and oxygen consumption). Asterisks indicate a significant difference with the control,* for $p<0.05$, ** for $p<0.01$ and *** for $p<0.001$.

Discussion

In our study, the respective roles of oxidative phosphorylation (OXPHOS) and glycolysis in fueling ATP for motility of Pacific oyster spermatozoa were explored, using inhibitors of mitochondrial respiratory chain (rotenone and antimycin A), ATP-synthase (oligomycin), glycolysis (2-DG), and an OXPHOS uncoupler (CCCP).

The application of a glycolysis inhibitor, the 2-DG which is a glucose analog entering into the cell and then phosphorylated to DOG-6-phosphate, did not result in any changes of the measured cellular, biochemical and movement parameters (movement features, MMP, intracellular ATP content and oxygen consumption). These results suggest that glycolysis is not required to synthetize ATP for a one hour period of Pacific oyster spermatozoon movement.

Incubation of oyster spermatozoa with oligomycin, an inhibitor of ATP-synthase, did not impact both MMP and O_2 consumption. Oligomycin prevents the phosphorylation of ADP into ATP (Piomboni et al., 2012), but does not directly affect mitochondrial respiratory chain functionality, *i.e.*, substrate oxidation, electron flow and oxygen reduction (Brand and Nicholls, 2011). Consequently, oxygen consumption was maintained at its basal rate. This process could have led to proton accumulation in the intermembrane space, but no increase of the MMP was measured. Maintenance of the MMP during ATP-synthase inhibition might rely on the leak of protons out of the inter membrane space through the inner mitochondrial membrane (Porter and Brand, 1995). Similar results were reported in oyster hemocytes: MMP of hemocytes incubated with oligomycin was not altered from 0.01 to 0.1 µM (Donaghy et al., 2012). In Pacific oyster spermatozoa, addition of the uncoupling agent CCCP at 1 µM drastically decreased MMP and increased by more than two fold spermatozoon oxygen consumption. Indeed dissipation of the proton gradient across the inner mitochondrial membrane by CCCP induced maximal electron flow capacity of the mitochondrial respiratory chain, and thus maximal rate of mitochondrial oxygen consumption (Oellermann et al., 2012). Similar results were reported with CCCP and FCCP in sea urchin spermatozoa (Ardon et al., 2009) and Pacific oyster hemocytes (Donaghy et al., 2012). On the other hand, incubation with FCCP did not change oxygen consumption in turbot spermatozoa (Dreanno et al., 1999). It has been demonstrated that the addition of an uncoupler caused maximal respiration rate of mitochondria (Brand and Nicholls, 2011), meaning that spermatozoon electron flow capacity of the mitochondrial respiratory chain can potentially be greatly enhanced in Pacific oyster spermatozoa. This capacity would allow spermatozoa to cope with high energy demand processes, such as capacitation and fertilization or metabolism adaptation to cope with fluctuating environmental conditions.

Both oligomycin and CCCP did not impact intracellular ATP content and movement features of Pacific oyster spermatozoa. This observation suggests that OXPHOS is not required for ATP fueling flagellar movement during one hour of spermatozoon movement. ATP sustaining flagellar movement of spermatozoa may partially originate from ATP synthesis through glycolysis or from mobilization of ATP storage molecules such as phosphagens. Phosphagens are high-energy components such as arginine- or creatine- phosphate (Saudrais et al., 1998) which allow the storage of energy for subsequent use during periods of high energy needs or when OXPHOS is unable to meet ATP demand due to elevated metabolism (Gade, 1988). In sea urchin spermatozoa, phosphagens were shown to be part of a shuttle distributing evenly the energy all along the axoneme to the dynein-ATPases (Tombes and Shapiro, 1985; Tombes et al., 1987) which hydrolyze ATP to produce flagellar beat for spermatozoon motility (Christen et al., 1982; Christen et al., 1983).

The roles of complexes I (C I) and III (C III) of the mitochondrial respiratory chain in cellular, biochemical and movement parameters of Pacific oyster spermatozoa were explored using respectively rotenone and antimycin A. Both inhibitors block mitochondrial respiratory chain functionality, *i.e.*, the electron transfer, and by consequence oxygen reduction to water by complex IV. Thus, rotenone and antimycin A incubations of oyster spermatozoa decreased MMP and inhibited oxygen consumption of spermatozoa.

Incubation of spermatozoa with rotenone did not impact the percentage of motile spermatozoa, meaning that oxygen consumption is not required for motility of oyster spermatozoa. Intracellular ATP content of spermatozoa was reduced down to 78.3% of the control value, assuming that such ATP level is not limiting for motility of spermatozoa, as demonstrated previously in Pacific oyster spermatozoa (Boulais et al., **chapter 1**). Such level of ATP should also be sufficient to sustain spermatozoon velocity in Pacific oyster (Boulais et al., **chaper 1**), suggesting that reduced velocity of spermatozoa is not due to limited ATP content but rather to an effect induced in the flagellum by blocking C I. Such action in the flagellum is supported by spermatozoa "twitching", *i.e.*, showing erratic and fragmented movement, rather than showing progressive forward movement. Spermatozoa "twitching" were also obtained in spermatozoa of sea urchin *Evechinus chloroticus*, mussel *Perna canaliculus* and abalone *Haliotis iris*, incubated with rotenone (Adams et al., 2003). It has been demonstrated that C I is involved in reactive oxygen species (ROS) production, which is enhanced by rotenone (Liu et al., 2002; Turrens, 2003; Koppers et al., 2008). It could be speculated that rotenone decreased velocity of spermatozoa through a process related to ROS generation by C I. It has been reported that rotenone induces peroxidative damage in the midpiece of human spermatozoa, leading to the loss of velocity (Koppers et al., 2008). In boar spermatozoa, it has been suggested that ROS exert a

negative effect in the axoneme disrupting ATP utilization or to interfere with the contractile mechanism (Guthrie and Welch, 2012). On the other hand, the decrease in intracellular ATP content observed for oyster spermatozoa incubated with rotenone may be due to i) reduce capacity or incapacity to stimulate ATP production through alternative metabolic pathways when C I is blocked and/or ii) direct or indirect effect of potential ROS generated at C I on ATP catabolism.

Incubation of spermatozoa with antimycin A inhibited completely the movement of spermatozoa. As for rotenone, this result is difficult to explain by reduced intracellular ATP content, suggesting that blocking C III induced a process leading to movement inhibition of spermatozoa. This is sustained by a reduced percentage of motile spermatozoa assessed before the MMP decrease (0.05 and 0.1 µM of antimycin A) and thus before OXPHOS inhibition. C III is involved in ROS generation which is enhanced by antimycin A in spermatozoa of human and sea urchin *Pseudocentrotus depressus* (Chen et al., 2003; Kazama and Hino, 2012). It could be speculated that antimycin A induced motility inhibition through a process related to C III ROS generation. Furthermore, the decrease in intracellular ATP content down to 70.4% of the control value for spermatozoa incubated with antimycin A cannot be explained by ATP consumption by dynein-ATPases as no movement is observed. As for spermatozoon incubation with rotenone, it suggests a reduced capacity or incapacity to stimulate ATP production through alternative metabolic pathways when C III is blocked and/or ii) a direct or indirect effect of potential ROS generated at C III on ATP catabolism.

Differences obtained in motion features of spermatozoa incubated with rotenone and antimycin A might be related to the different location of ROS production and release in spermatozoa. In human spermatozoa, it has been demonstrated that rotenone is different from antimycin A by the fact that ROS are generated at complex I rather than complex III and, as a result, are located in the mitochondrial matrix rather than in the intermembrane space (Koppers et al., 2008). These authors suggested that ROS generated in the mitochondrial matrix can induce peroxidative damages in the midpiece of spermatozoa if ROS production overwhelmed the intramitochondrial antioxidant defense enzymes. ROS released in the intermembranous space can be rapidly dismutated to H_2O_2 in the cytoplasm and escapes to the extracellular space.

Our results highlight that the metabolism of Pacific oyster spermatozoa differs from the one studied in spermatozoa of other marine species. Indeed, intracellular ATP content and movement features of spermatozoa are not changed when ATP synthesis through OXPHOS is blocked. We suggest that Pacific oyster spermatozoa regulate ATP production through stimulation of glycolysis or mobilization of phosphagens. The alternative metabolic pathways are as efficient as OXPHOS to produce ATP during one hour of motility. This is supported by

the constant intracellular ATP content assessed in spermatozoa incubated with oligomycin and CCCP. However, when mitochondrial respiratory chain is blocked with rotenone or antimycin A, such alterative ATP producing pathways are less efficient or not even functional and movement features of spermatozoa are negatively affected. The effects of rotenone and antimycin A on oyster spermatozoa still need to be investigated. Potential ROS production induced by these chemicals could be assessed to clarify their role in limiting intracellular ATP content and movement features of Pacific oyster spermatozoa. The metabolic pathways producing ATP when OXPHOS is blocked remains to be explored. Incubation of oyster spermatozoa with both CCCP and 2-DG would allow understanding the roles of OXPHOS and glycolysis in fueling ATP. Monitoring endogenous metabolites using 31P & 1H-NMR to establish an overview of the metabolic status of spermatozoa during the movement phase could evaluate potential involvement of phosphagens of Pacific oyster spermatozoa.

Acknowledgements

The authors want to thank the technical team of Ifremer's facilities in Argenton. We are grateful to Eve Julie Arsenault-Pernet for technical assistance. This work was partly supported by the European project ReproSeed (FP7-KBBE-2009-3), coordinated by Dr. J.-L. Nicolas. M. Boulais was funded by Ifremer and by a doctoral grant from Région Bretagne.

References

Adams, S., Hessian, P., Mladenov, P., 2003. Flow cytometric evaluation of mitochondrial function and membrane integrity of marine invertebrate sperm. Invertebr. Reprod. Dev. 44, 45–51. doi:10.1080/07924259.2003.9652552

Ardon, F., Rodriguez-Miranda, E., Beltran, C., Hernandez-Cruz, A., Darszon, A., 2009. Mitochondrial inhibitors activate influx of external Ca^{2+} in sea urchin sperm. Biochim. Biophys. ACTA-Bioenerg. 1787, 15–24. doi:10.1016/j.bbabio.2008.10.003

Brand, M.D., Nicholls, D.G., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. Biochem. J. 435, 297–312. doi:10.1042/BJ20110162

Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J., 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria - Central role of complex III. J. Biol. Chem. 278, 36027–36031. doi:10.1074/jbc.M304854200

Christen, R., Schackmann, R., Shapiro, B., 1982. Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. J. Biol. Chem. 257, 4881–4890.

Christen, R., Schackmann, R., Shapiro, B., 1983. Metabolism of sea urchin: interrelationships between intracellular pH, ATPase activity and mitochondrial respiration. J. Biol. Chem. 258, 5392–5399.

Cosson, J., 1996. A moving image of flagella: News and views on the mechanisms involved in axonemal beating. Cell Biol. Int. 20, 83–94. doi:10.1006/cbir.1996.0012

Demoy-Schneider, M., Schmitt, N., Suquet, M., Labbé, C., Boulais, M., Prokopchuk, G., Cosson, J., 2013. Biological characteristics of sperm in two oyster species: the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. In "Spermatozoa: Biology, Motility and Function and Chromosomal abnormalities", Chapter 2, Nova Science Publishers Inc., Brenda T. Erickson Editor, ISBN: 978-1-63, p. 15-74.

Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goic, N., Lambert, C., Volety, A.K., Soudant, P., 2012. Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster Crassostrea gigas: A Mitochondrial Involvement. PLOS ONE 7. doi:10.1371/journal.pone.0046594

Dreanno, C., 1998. Régulation de la mobilité des spermatozoïdes de turbot (Psetta maxima) et de bar (Dicentrarchus labrax) : Etude du métabolisme énergétique, du contrôle ionique, de la morphologie et du pouvoir fécondant. Thesis, Univ. Rennes, France.

Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M., Seguin, F., Dorange, G., Billard, R., 1999. Nucleotide content, oxydative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period. Mol. Reprod. Dev. 53, 230–243. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<230::AID-MRD12>3.0.CO;2-H

Espinoza, J.A., Schulz, M.A., Sanchez, R., Villegas, J.V., 2009. Integrity of mitochondrial membrane potential reflects human sperm quality. Andrologia 41, 51–54. doi:10.1111/j.1439-0272.2008.00878.x

Ferramosca, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Coppola, L., Zara, V., 2008. Oxygen uptake by mitochondria in demembranated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. Int. J. Androl. 31, 337–345. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00775.x

Gade, G., 1988. Energy-metabolism during anoxia and recovery in shell adductor and foot muscle of the gastropod mollusk *Haliotis lamellosa* formation of the novel anaerobic end product tauropine. Biol. Bull. 175, 122–131. doi:10.2307/1541899

Gallon, F., Marchetti, C., Jouy, N., Marchetti, P., 2006. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. Fertil. Steril. 86, 1526–1530. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.055

Guthrie, H.D., Welch, G.R., 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. Theriogenology 78, 1700–1708. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.05.002

Hiipakka, R., Hammerstedt, R., 1978. 2-deoxyglucose transport and phosphorylation by bovine sperm. Biol. Reprod. 19, 368–379. doi:10.1095/biolreprod19.2.368

Kasai, T., Ogawa, K., Mizuno, K., Nagai, S., Uchida, Y., Ohta, S., Fujie, M., Suzuki, K., Hirata, S., Hoshi, K., 2002. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. Asian J. Androl. 4, 97–103.

Kazama, M., Hino, A., 2012. Sea urchin spermatozoa generate at least two reactive oxygen species; the type of reactive oxygen species changes under different conditions. Mol. Reprod. Dev. 79, 283–295. doi:10.1002/mrd.22025

Kazama, M., Sato, T., Hino, A., 2012. Spontaneous generation of reactive oxygen species and effect on motility and fertilizability of sea urchin spermatozoa. Zygote Camb. Engl. 1–13. doi:10.1017/S0967199412000445

Koppers, A.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., McLaughlin, E.A., Aitken, R.J., 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93, 3199–3207. doi:10.1210/jc.2007-2616

Le Goic, N., Hegaret, H., Fabioux, C., Miner, P., Suquet, M., Lambert, C., Soudant, P., 2013. Impact of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on Pacific oyster reproductive output: application of flow cytometry assays on spermatozoa. Aquat. Living Resour. 26, 221–228. doi:10.1051/alr/2013047

Liu, Y.B., Fiskum, G., Schubert, D., 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. J. Neurochem. 80, 780–787. doi:10.1046/j.0022-3042.2002.00744.x

Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., Marchetti, P., 2002. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. Hum. Reprod. 17, 1257–1265. doi:10.1093/humrep/17.5.1257

Marchetti, C., Jouy, N., Leroy-Martin, B., Defossez, A., Formstecher, P., Marchetti, P., 2004. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. Hum. Reprod. 19, 2267–2276. doi:10.1093/humrep/deh416

Mukai, C., Okuno, M., 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. Biol. Reprod. 71, 540–547. doi:10.1095/biolreprod.103.026054

Oellermann, M., Poertner, H.O., Mark, F.C., 2012. Mitochondrial dynamics underlying thermal plasticity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) hearts. J. Exp. Biol. 215, 2992–3000. doi:10.1242/jeb.068163

Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., Zara, V., 2012. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. Int. J. Androl. 35, 109–124. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x

Porter, R., Brand, M., 1995. Mitochondrial proton conductance and H+/0 ratio are independent of electron transport rate in isolated hepatocytes. Biochem. J. 310, 379–382.

Ronquist, K.G., Ek, B., Stavreus-Evers, A., Larsson, A., Ronquist, G., 2013. Human prostasomes express glycolytic enzymes with capacity for ATP production. Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab. 304, E576–E582. doi:10.1152/ajpendo.00511.2012

Saudrais, C., Fierville, F., Loir, M., Le Rumeur, E., Cibert, C., Cosson, J., 1998. The use of phosphocreatine plus ADP as energy source for motility of membrane-deprived trout spermatozoa. Cell Motil. Cytoskeleton 41, 91–106.

Stendardi, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Palumberi, D., Serafini, F., Ferramosca, A., Zara, V., 2011. Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. Int. J. Androl. 34, 247–255. doi:10.1111/j.1365-2605.2010.01078.x

Suquet, M., Labbe, C., Brizard, R., Donval, A., Le Coz, J.R., Quere, C., Haffray, P., 2010. Changes in motility, ATP content, morphology and fertilisation capacity during the movement phase of tetraploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. Theriogenology 74, 111–117. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.01.021

Takei, G.L., Miyashiro, D., Mukai, C., Okuno, M., 2014. Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm. J. Exp. Biol. 217, 1876–1886. doi:10.1242/jeb.090985

Tombes, R., Shapiro, B., 1985. Metabolite channeling - A phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. Cell 41, 325–334. doi:10.1016/0092-8674(85)90085-6

Tombes, R., Brokaw, C., Shapiro, B., 1987. Creatine kinase dependent energy transport in sea urchin spermatozoa - Flagellar wave attenuation and theorical analysis of high energy phosphate diffusion. Biophys. J. 52, 75–86.

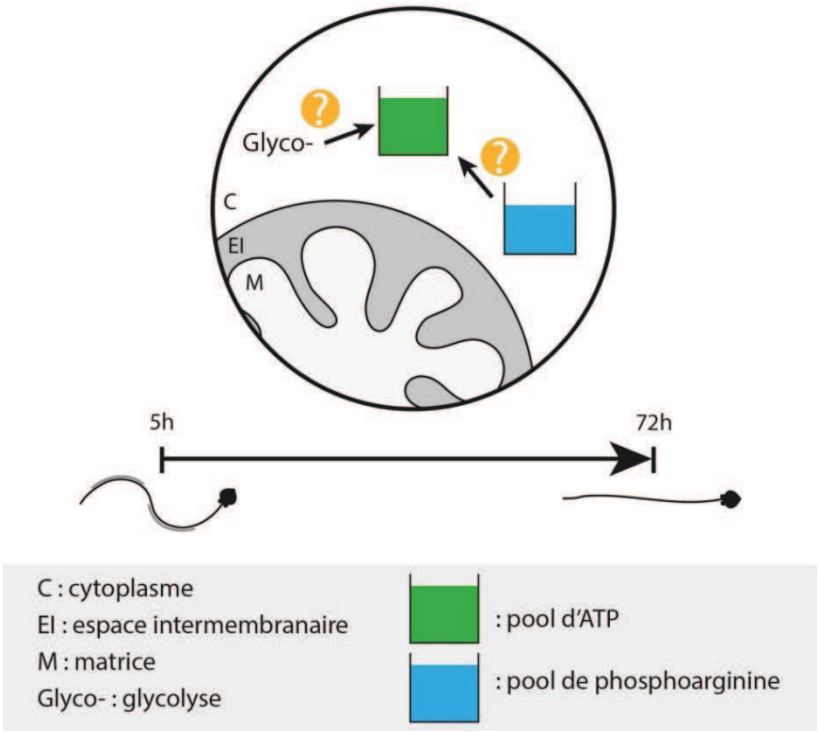
Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol.-Lond. 552, 335–344. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478

Chapitre 3

Analyse des métabolites par RMN au cours de la phase de mouvement du spermatozoïde d'huître creuse

---

L'étude présentée dans le chapitre précédent a mis en évidence la capacité du spermatozoïde d'huître creuse à compenser efficacement la production d'ATP, pendant une durée limitée d'une heure, lorsque la phosphorylation oxydative est bloquée. Il a été suggéré que la glycolyse et les phosphagènes participent au maintien du contenu intracellulaire en ATP. Cependant, la présence de la glycolyse ou de phosphagènes n'a pas été décrite chez le spermatozoïde de cette espèce, tout comme le facteur contrôlant l'arrêt du mouvement (chapitre 1). Afin de clarifier ces points, le prochain travail a pour objectif d'identifier les principaux métabolites présents dans le spermatozoïde d'huître creuse en cours de mouvement et lors de l'arrêt de la phase de nage.



Ce travail est présenté sous forme d'un article.

^{1}H and ^{31}P-Nuclear Magnetic Resonance analyses of metabolic changes of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa during the movement phase.

Myrina Boulais[1*], Gaëlle Simon[2], Claudie Quéré[3], Marc Suquet[1], Pierre Boudry[3], Philippe Soudant[4]

[1]Ifremer, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Site Expérimental d'Argenton, Argenton, France ;

[2] Université de Bretagne Occidentale, UFR Sciences et Techniques, Plateforme technologique de Résonance Magnétique Nucléaire, Résonance Paramagnétique Électronique et Spectrométrie de Masse, Brest, France ;

[3] Ifremer, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Centre de Bretagne, Plouzané, France ;

[4]IUEM, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France ;

** Corresponding author e-mail: myrina.boulais@gmail.com*

Abstract

ATP metabolism of Pacific oyster spermatozoa appears to differ from results recorded in other invertebrate species. Spermatozoa are characterized by a long movement duration (>24h), sustained by a high capacity to maintain intracellular ATP level. A global description of spermatozoon metabolites was employed to better understand the metabolic processes sustaining such a long movement phase, and to identify mechanisms involved in controlling the end of spermatozoon movement. An overview of the metabolic profiles of Pacific oyster spermatozoa using ^{1}H-NMR and ^{31}P-NMR spectroscopy was established to detect changes between the first part and the end of the movement phase. Between 5h post activation and the end of the movement phase (72h post activation), the metabolic profiles resulted in an increase in osmolyte and phosphoarginine levels, a decrease in phosphomonoester (PME) and phosphodiester (PDE) concentrations and no changes of ATP, ADP and Pi contents. A major portion of spermatozoon metabolites is devoted to deal with osmotic regulation and energy supply. It highlights the efficient balance between energy demand and supply of Pacific oyster spermatozoa. Energy metabolism impairment is not the cause for the end of spermatozoon movement. Alternative hypothesis of spermatozoon movement cessation such as alterations of the plasma membrane or

intracellular osmotic changes may be suggested. This is the first study reporting the accumulation of a phosphoarginine at the end of spermatozoon movement phase in marine species that exhibit external fertilization.

Keywords: Crassostrea gigas / spermatozoa / motility / ^{1}H-NMR / ^{31}P-NMR / Phosphagen

Introduction

Broadcast spawning is commonly observed in benthic invertebrates, for which external fertilization incorporates the synchronous release of spermatozoa and oocytes. The movement of spermatozoa is essential for fertilization success. In externally fertilizing species, spermatozoon movement relies entirely on intracellular ATP storage and/or endogenous substrates to fuel ATP to dynein-ATPases located in the flagellum. ATP synthesis of sea urchin spermatozoa is sustained by oxidative phosphorylation (OXPHOS), from the oxidation of endogenous lipids (Mohri, 1957; Mita and Nakamura, 1993): in the order of Echinoida, *e.g.*, *Hemicentrotus pulcherrimus, Anthocidaris crassispina*, *Paracentrotus lividus*, ATP is obtained through oxidation of endogenous phosphatidylcholine, whereas in the orders of Arbacioida, *e.g.*, *Arbacia lixula*, Clypeasteroida, *e.g.*, *Clypeaster japonicus*, and Diadematoida, *e.g.*, *Diadema setosum*, triglycerides are the substrates catabolized (for review, Mita and Nakamura, 1998). In sea urchins, the phosphagen phosphocreatine was shown to be involved in ATP transport from the mitochondrion to the distal part of the flagellum, ensuring spermatozoon movement (Tombes et al., 1987). Phosphagens allow the storage of chemical energy in phosphoanhydride bond of ATP (Meyer et al., 1984). Because phosphagens are smaller molecules than ATP, they can diffuse out of the mitochondrion. In sea urchins, the amount of ATP hydrolyzed by dynein ATPases in the flagellum is much greater than that of ATP produced by OXPHOS. As a consequence, a rapid decline of the intracellular ATP content is recorded after activation of spermatozoa in seawater, which leads to the end of spermatozoon movement (Mohri, 1958; Mita and Yasumasu, 1983; Mita et al., 1994a). In bivalves, energy metabolism fueling the movement phase of spermatozoa has been little documented. In the king scallop, *Pecten maximus*, spermatozoon motility seems to rely on intracellular ATP content accumulated prior spawning. The intracellular ATP content decreases during the movement phase to its exhaustion leading to the end of movement (Suquet et al., 2013). ATP metabolism of Pacific oyster spermatozoa appears to be different from results recorded in other invertebrate species. They are characterized by a long movement duration (>24h), sustained by a high capacity to maintain intracellular ATP level: 75% to 94% of their

initial ATP content is still present at the end of the 24h movement period (Suquet et al., 2010; Boulais et al., **chapter 1**). Thus, the end of the movement of Pacific oyster spermatozoa cannot be explained by a low intracellular ATP content. Alternative hypothesis have been suggested, such as plasma membrane alterations leading to impairment of progressive bending waves along the flagellum and/or to potential intracellular osmotic or pH changes or disruption of ATP transport from the mitochondria to the flagellum (Boulais et al., **chapter 1**). In Pacific oyster spermatozoa, OXPHOS may produce ATP during the movement phase of Pacific oyster spermatozoa but alternative ATP producing pathways, such as glycolysis or the mobilization of phosphagens, might contribute to sustain energy production when mitochondrial ATP synthesis is inhibited (Boulais et al., **chapters 1 and 2**). Identification of phosphagens and of substrates potentially catabolized by spermatozoa to sustain ATP production during the movement phase remains to be investigated. Because of complex *in vivo* metabolic processes and of the difficulty to mimic them *in vitro*, a global description of the metabolic status of these specialized cells is required. Then, such a global description would identify mechanisms involved in controlling the end of spermatozoon movement.

High resolution nuclear magnetic resonance (NMR) is a rapid and non-destructive technique to measure the metabolic profiles of cells, tissues, biofluids, and even whole organisms (Tuffnail et al., 2009; Viant et al., 2003). This technique allows to rapidly provide accurate data on the concentrations of a wide range of small-molecule (<1000 Da) metabolites simultaneously and on the same individual, overcoming the constraints of traditional metabolic investigations (Tikunov et al., 2010). Traditional separation techniques, such as chromatography and electrophoresis, are dependent on detection methods (*i.e.*, UV-Vis, electrochemical, mass spectrometry), requiring a previous knowledge of analytes and the use of concentration calibrants for each compound studied. Conversely, NMR spectroscopy detects resonances of metabolites which are not even expected or difficult to find by biochemical classical analyses (Tikunov et al., 2010). Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR) spectroscopy is suitable for the detection of a large range of endogenous low molecular weight metabolites since practically all metabolite molecules contain protons (Zhang et al., 2011b). In turn, phosphorus nuclear magnetic resonance (^{31}P-NMR) spectroscopy allows investigating high-energy-phosphate metabolism (Hudsmith et al., 2009) in cells or tissues, and thus *in vivo* bioenergetics by measuring phosphorus-containing metabolites (*e.g.*, ATP, ADP, inorganic phosphate, phosphagens). Using ^{1}H-NMR, Tikunov et al. (2010) identified key metabolic compounds such as mitochondrial metabolites in adductor muscle and glycogen in stomach, digestive gland, mantle and gill of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). ^{31}P-NMR spectroscopy was used in heart tissues of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus*, and revealed higher levels of energy

metabolites and phosphoarginine under toxic stress (Hanana et al., 2012). In spermatozoa of turbot (*Psetta maxima*), this technique showed that energy required during the movement phase results from anaerobic fermentation and oxidative phosphorylation (Dreanno et al., 2000).

In this context, the metabolite characterization of Pacific oyster spermatozoa during the first part and the end of the movement phase might provide insight into the underlying mechanisms involved in energy supply and in cessation of movement. The objective of the present study was to establish an overview of the metabolic profiles of Pacific oyster spermatozoa using ^{1}H-NMR and ^{31}P-NMR spectroscopy and to detect possible changes between the first part and the end of the movement phase.

Material and methods

Collection of sperm

Three year old mature oysters (mean weight±SEM: 72.5±2.3g) were collected in October from farmed stock in the Bay of Brest (Brittany, France). Sperm was collected by stripping (n=6 males) in 5 mL of sea water (19°C) filtered at 1 µm (FSW) according to Boulais et al. (**chapter 1**). After dilution to 1/10000 in FSW, concentration of spermatozoa were determined by Coulter Counter (triplicates) and adjusted to 4.10^{8} spermatozoa.mL^{-1} by further dilution in FSW, in 50 mL Falcon tubes. In order to avoid bacterial proliferation during the movement phase, chloramphenicol was added at a final concentration of 25 µg.mL^{-1}. Spermatozoon suspensions were incubated at room temperature (19°C) and changes in movement features and metabolic profiles in relation with time post activation were studied by spermatozoon sampling at the first part (5h post activation) and at the end of the movement phase, *i.e.*, when spermatozoon movement stopped (72 hours post activation). We assumed that a 5h movement duration allows spermatozoa to undergo a process known as capacitation, which leads to hyperactivated movement (Demoy-Schneider et al., 2013), and to settle metabolism pathways required to sustain the motility phase.

Motility and velocity of spermatozoa

Movement features were recorded according to Boulais et al. (**chapter 2**). Briefly, spermatozoon suspensions were diluted 20 times in FSW containing 1g.L^{-1} of pluronic acid. Diluted suspensions were transferred to a Fast-Read® 102 (Fisher Scientific) cell and movement

characteristics were observed under a microscope (dark field, Olympus BX51, X20 magnification), connected to a video camera (Imaging source DMK 22BUC03). The percentage of motile spermatozoa and their velocity (VAP: Velocity of the Average Path) were assessed using a CASA plug-in developed for the Image J software (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007).

Sampling for NMR spectroscopy and preparation for metabolite extraction

Sample preparation for metabolite extraction was adapted from Dreanno et al. (2000). At both sampling points (5 and 72h post activation), 4 mL of spermatozoon suspensions (4.10^8 spermatozoa.mL^{-1}) were individually transferred in two 5 mL cryotubes (Nunc^{TM}): one for ^{1}H-NMR and one for ^{31}P-NMR spectroscopy. Spermatozoa were concentrated by spinning in a refrigerated centrifuge (4°C) at 1500 g for 20 minutes. The supernatant was then removed and 4 mL of spermatozoon suspension were added and centrifuged again (same conditions used). The step was repeated one more time and cryotubes were stored in liquid nitrogen until metabolite extraction.

Extraction of metabolites

In a refrigerate room at 4°C, 1 mL of 3M perchloric acid was added into cryotubes. Samples were crushed on ice using a polytron® homogeneizer (PT2500E, Fisher Scientific) and centrifuged (10000g, 15 min, 4°C). Supernatants were collected in 50 mL Falcon tubes, adjusted to pH 7.6 by the addition of 3M potassium hydroxide at 0.4M of potassium chloride, and centrifuged (10000g, 15 min, 4°C). Supernatants were transferred into 25 mL glass tubes, lyophilized 48h and stored at -80°C until NMR analysis.

NMR spectroscopy

^{1}H and ^{31}P-NMR acquisitions were recorded on a BRUKER Avance III HD 500 spectrometer equipped with an indirect 5 mm triple resonance probehead TBI ^{1}H/ {BB} /^{13}C. NMR analyses were performed on lyophilized perchloric extracts resuspended in 700 µL of 100% of deuterium oxide. Solutions were introduced in 5 mm NMR tubes. Trimethylsilylpropionic acid (TSP) and phosphonoacetic acid (H_3PO_4) were added as quantitative internal references for, respectively, ^{1}H and ^{31}P analyses. ^{1}H NMR spectra were recorded using a 30° pulse, a relaxation delay of 10s and 64 scans. ^{31}P NMR spectra were obtained using a 90° pulse, a relaxation delay of 4s and 10 000 scans. Spectra were phased,

baseline was corrected and calibrated (TSP at 0.0 ppm for ^{1}H and H_3PO_4 at 0.00 ppm for ^{31}P) and integrations of peaks were calculated to quantify metabolites. Metabolite concentrations were then expressed in nmoles.10^{-9} spermatozoa. Identifications of metabolites were confirmed by the COSY DQF (Double-quantum filtered ^{1}H–^{1}H correlated spectroscopy), HMQC ^{1}H–^{13}C (Heteronuclear multiple quantum coherence ^{1}H–^{13}C) and HMBC ^{1}H–^{13}C (Heteronuclear multiple bond coherence ^{1}H–^{13}C) sequences or by addition of standard compounds.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM. Data expressed as percentages were arcsine square root transformed. The mean values of spermatozoon characteristics (metabolites and movement features), sampled 5h and 72h post activation, were compared using a Student t-test. The following statistical significance values were reported: * for $p<0.05$, ** for $p<0.01$ and *** for $p<0.001$. Statistical analyses were performed using Statistica 6 software.

Results

Motility and velocity of spermatozoa

Five hour post activation, 74.4 ± 4.3% of spermatozoa were motile, with a mean velocity of 58.3 ± 6.4 $\mu m.sec^{-1}$. No movement was observed at 72h post activation.

^{1}H-NMR spectroscopy of spermatozoa

Figure 1 presents ^{1}H-NMR spectra [0-5.5 ppm] obtained from spermatozoa of one representative male at 5h and 72h post activation in FSW. No significant peak was detected in the part of spectrum above 4.5 ppm. However, differences in peaks can be observed between the two samplings in the spectral region ranging between 4.5 and 0 ppm. ^{1}H-NMR spectra of spermatozoa showed peaks corresponding to low molecular weight acid-soluble endogenous metabolites (amino acids, osmolytes, energy related metabolites…). The most abundant amino acids in Pacific oyster spermatozoon spectra were glycine betaine (GB) with two singlets at 3.34 and 3.98 ppm, glycine with a singlet at 3.63 ppm and taurine with two triplets at 3.33 and 3.49 ppm. One other organic compound of lower concentration was homarine with a singlet at 4.44 ppm and other peaks in the aromaric area. Furthermore, the resonance peaks of glycerol (3.63, 3.72 and 3.86 ppm), alanine (1.55 and 3.86 ppm) and succinate (2.47 ppm) were identified. In order to assess spermatozoon metabolic variations observed between the first part and the end of movement phase of spermatozoa, the abundance of the various metabolites was approximated by the integration of peak intensity. The most abundant metabolites are listed in Table 1. Between 5h post activation and the end of the movement phase (72h post activation), the metabolic profiles resulted in a significant increase in glycine, taurine, GB levels, a decrease in succinate content and in no significant changes in homarine, glycerol and alanine concentrations.

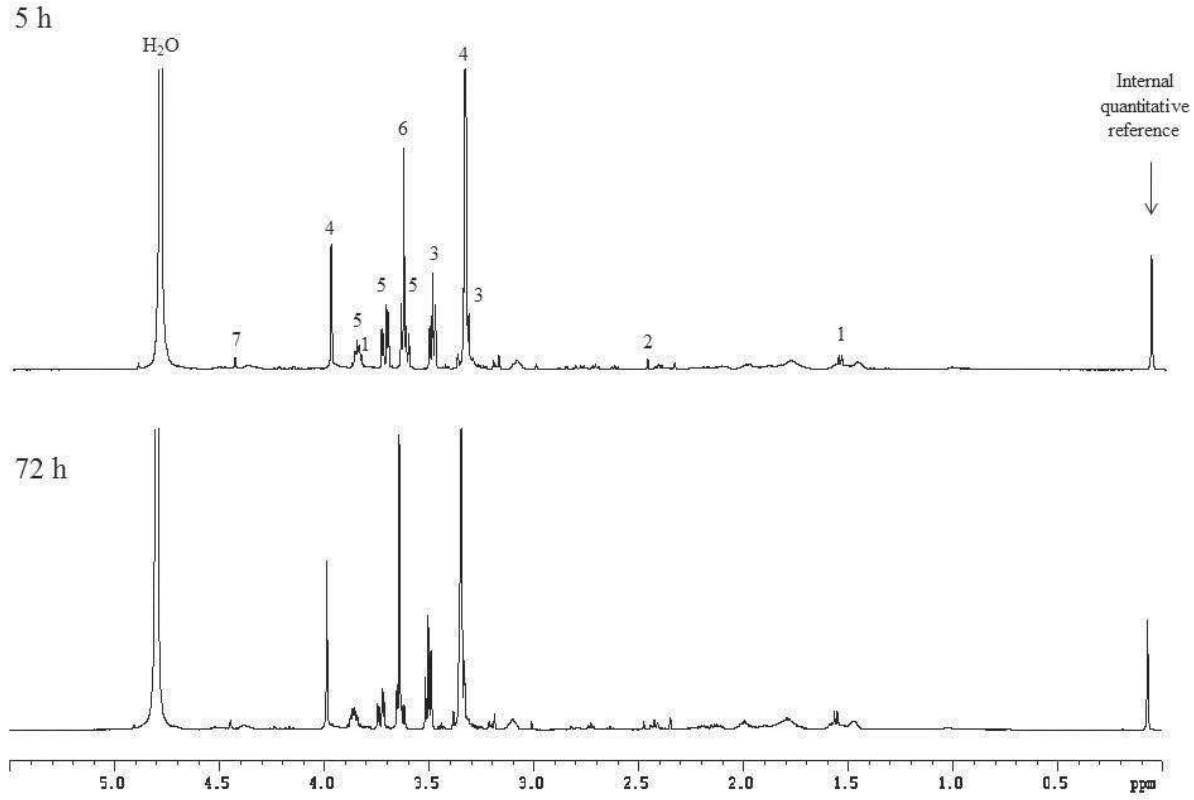


Fig.1. Representative one dimensional 500 MHz ^{1}H NMR spectra of perchloric extracts of spermatozoa of one Pacific oyster in D_2O at 25°C. The assignment of major compounds is reported: Alanine (1), Succinate (2), Taurine (3), Glycine betaine (4), Glycerol (5), Glycine (6), Homarine (7). Chemical shifts in ppm are given with trimehylsilylpropionic acid (TSP) as a reference, TSP being also used as a quantitative reference.

Table 1. Concentration of identified metabolites in the 1H-NMR spectra of perchloric acid extracts of spermatozoa, at 5h and 72h post activation in seawater (mean±SEM).

	Time post activation		
Metabolite (nmol.10^{-9} spermatozoa)	5h	72h	
Glycine	158.3±15.9	204.0±23.2	**
Taurine	158.4±21.8	176.2±29.7	*
Glycine betaine	125.3±14.6	150.2±19.6	*
Homarine	8.4±1.4	9.0±1.6	
Glycerol	182.9±30.5	222.5±42.8	
Alanine	27.4±4.2	24.5±4.4	
Succinate	5.9±0.9	3.7±0.7	*

Asterisks indicate a significant difference in metabolite concentration between 5h and 72h,* for $p<0.05$, ** for $p<0.01$ and *** for $p<0.001$.

^{31}P-NMR spectroscopy of spermatozoa

Figure2 shows representative ^{31}P-NMR spectra obtained from spermatozoa of one representative male at 5h and 72h post activation in FSW. Spectral assignments of β-ATP (δ=- 18.3 ppm), α-ATP (δ=- 9.9 ppm), α-ADP (δ=- 9.3 ppm), γ-ATP (δ=- 5.2 ppm) and β-ADP (δ=- 4.7 ppm) were assigned on the basis of their chemical shifts as characterized by previously published data (Thebault et al., 1999). The resonance peaks of inorganic phosphate (Pi), phosphomonoesters (PME) and phosphodiesters (PDE) were also identified in Pacific oyster spermatozoa. Phosphoarginine was identified as the unique phosphagen. As shown in Table 2, spermatozoon metabolic profiles showed significant changes in major compounds during the movement phase: decrease in PME and PDE and increase of phosphoarginine. However, no significant changes of ATP, ADP and Pi were observed.

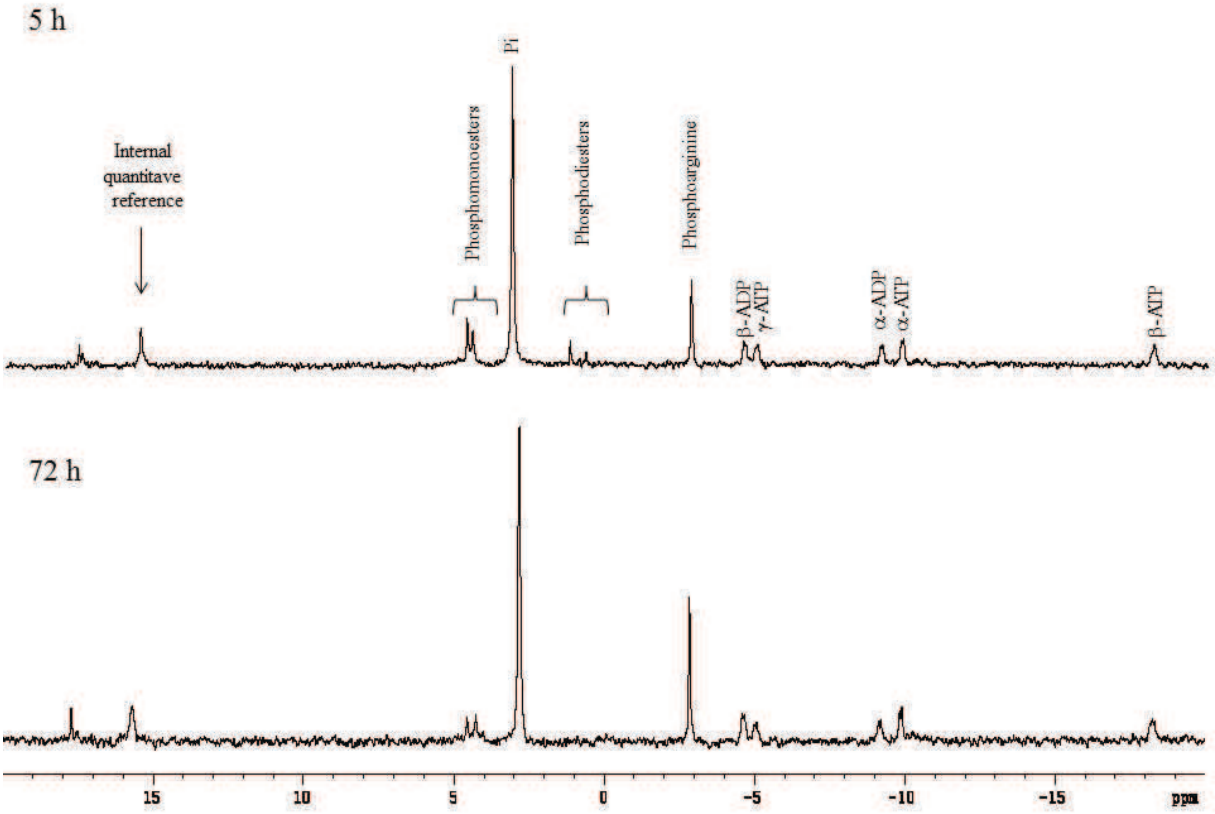


Fig.2. Representative one dimensional 202 MHz ^{31}P NMR spectra of perchloric extracts of spermatozoa of one Pacific oyster in D_2O at 25°C. Chemical shifts in ppm are given with trimehylsilylpropionic acid (TSP) as reference. Phosphonoacetic acid is used as a quantitative reference.

Table 2. Concentration of identified metabolites in the ^{31}P-NMR spectra of perchloric acid extracts of spermatozoa, at 5h and 72h post activation in seawater (mean±SEM).

	Time post activation		
Metabolite (nmol.10^{-9} spermatozoa)	5h	72h	
ATP	24.0±3.5	26.2±3.1	
ADP	15.1±2.4	18.7±3.8	
ADP/ATP	0.7±0.2	0.7±0.1	
Pi	109.6±14.8	144.3±33.2	
PME	31.7±4.3	12.3±3.7	*
PDE	14.0±2.5	4.2±2.1	*
Phosphoarginine	42.7±5.4	74.5±9.2	*

Pi: inorganic phosphate, PME: phosphomonoesters, PDE: phosphodiesters. Asterisks indicate a significant difference in metabolite concentration between 5h and 72h,* for $p<0.05$, ** for $p<0.01$ and *** for $p<0.001$.

Discussion

In our study, ^{1}H and ^{31}P-NMR spectroscopy were successfully used to assess the changes of metabolic profile between the first part and the end of Pacific oyster spermatozoon movement phase.

^{1}H-NMR spectrum of Pacific oyster spermatozoa was dominated by free amino acids (glycine, taurine, homarine), a methylamine (glycine betaine: GB) and glycerol. These solutes play a key physiological role in the osmotic regulation, and thus in cell volume homeostasis of marine organisms (Preston, 2005). It has been reported in previous studies that free amino acids constitute a large fraction of the metabolome of marine invertebrate species, such as carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*, Eastern oyster, and Pacific oyster (Toyohara et al., 2005; Tikunov et al., 2010; Hanana et al., 2012). Furthermore, free amino acids contribute to the intracellular pool of organic osmolytes in all the mollusc species investigated, to protect them against highly fluctuating extracellular osmolarity of their environment (Yancey, 2005). It has been reported that osmolytes can be actively accumulated or released in carpet-shell clam and in Pacific oyster gill tissue when the salinity varies (Lee et al., 2004; Zhang et al., 2011 a and b). In the present study, glycine, GB and taurine concentrations increased between the two successive samplings. Glycine acts as an osmolyte and is also involved in energetic functions. This molecule can enter the Krebs cycle through the glyoxylate pathway and also participates in glycolysis through the formation of serine (Nakada et al., 1955). In both pathways, glycine can serve as a 2 carbon energy source, ultimately generating ATP. However, the increase of glycine assessed at the end of the movement phase, excludes a primary role of glycine as substrate for ATP production. The

increase of organic osmolytes suggests that spermatozoa face intracellular osmotic changes during or at the end of the movement phase.

Alanine and succinate were identified in Pacific oyster spermatozoa using ^{1}H-NMR spectroscopy. It has been reported that these metabolites are the most common end products in marine species during environmental anoxia (Santini et al., 2001). Their accumulation is a clear biomarker of anaerobiosis in molluscs (Kluytmans and Zandee, 1983; Zandee et al., 1986). The weak concentrations of alanine and succinate observed, in respect to other metabolites, and the absence of increase of both components at the end of the movement phase, suggest that anaerobic pathways were not stimulated. This hypothesis is supported by the absence of end product accumulation from lactate- or opine- pathways at the end of the movement phase. The opine pathways are functionally analogous to the lactate one, at least in energetic term. They play a role during anaerobiosis and in anoxia survival, *i.e.,* generating a low rate of energy production over a long period of time in marine species of the lower (Porifera, Cnidaria, Nemertina) and middle (Mollusca, Annelida, Brachiopoda, Sipuncula) phyla (Livingstone, 1991). Furthermore, succinate is the substrate of the complex II (succinate dehydrogenase complex) of the mitochondrial respiratory chain. The decrease of succinate level between the two successive samplings suggests that oxidative phosphorylation occurred in Pacific oyster spermatozoa.

Using ^{31}P-NMR spectroscopy, it is possible to identify and measure phosphorus-containing metabolites and thus to explore energy metabolism. The ATP, ADP and Pi levels remained unchanged between the two successive sampling. Our results suggest that no alteration of the energy status of spermatozoa occurred at the end of the movement phase, compared to the first part of the movement period. The concentrations of ADP, ATP and Pi play a key role in cell energetic state because they are involved in the regulation of metabolic processes such as oxidative phosphorylation: it has been reported that mitochondrial respiration may be either controlled by the levels of Pi, ADP or ATP (Chance and Williams, 1956). Furthermore, the concentrations of ADP, ATP and Pi regulate dynein-ATPase activity (Yagi, 2000). ADP induces a competitive inhibition on these enzymes (Penningroth and Peterson, 1986; Omoto, 1991). We assume that ATP, ADP and Pi concentrations of Pacific oyster spermatozoa are highly controlled, possibly to sustain a constant ATP synthesis and thus flagellar beat capacity. These results confirm the fact that intracellular ATP content is not the main factor explaining the end of spermatozoon movement in Pacific oyster (Boulais et al., **chapter 1**).

^{31}P-NMR spectra of spermatozoa identified other phosphorus-containing metabolites, such as phosphodiesters (PDE) and phosphomonoesters (PME). PDE are generally identified as glycerophosphorylcholine (GPC) and glycerophosphorylethanolamine (GPE) in mammalian

tissues, or serine ethanolamine phosphate (SEP) and threonine ethanolamine phosphate (TEP) in non-mammalian tissues (Roberts and Lowe, 1954; Porcella et al., 1965; Burt and Ribolow, 1994). PME are identified as phosphocholine and phosphoethanolamine. Both PME and PDE constitute building blocks for the synthesis of membrane phospholipids, such as phosphatildyl lipids (Thebault et al., 2003). PME are also identified as glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate but these compounds generally contribute only very little to the PME peak in spectra (Van der Grond et al., 1990 and 1991; Dreanno et al., 2000). Thus, PME and PDE may be related to phospholipid and glycolytic metabolisms. PME and PDE were the only metabolites to decrease between the first part and the end of the movement period and different hypotheses may be suggested. First, the decrease in PME and PDE may reflect phospholipid degradation of plasma membrane of Pacific oyster spermatozoa during or at the end of the movement phase. In one hand, phospholipids might have been used as substrates for energy synthesis as fatty acids derived from phospholipids can be metabolized through β-oxidation to ultimately produce ATP in mitochondria. Previous studies have shown the oxidation of phospholipids to synthetize ATP of sea urchins *Hemicentrotus pulcherrimus* and *Paracentrotus lividus* spermatozoa (Mita and Ueta, 1988; Mita et al., 1994b). In a separate study, changes in phospholipid and triacylglycerol contents of Pacific oyster spermatozoa were explored. No changes in neutral and polar lipid classes were found between 5h and 12h post activation in sea water for spermatozoa of 4 males (Data not shown). Although this study stopped at 12h, the hypothesis of lipid catabolism to produce ATP in Pacific oyster spermatozoa is ruled out. On the other hand, potential phospholipid degradation might reflect plasma membrane alterations occurring at the end of spermatozoon movement. Possibly such alterations may have led to the loss of membrane permeability and intracellular osmotic changes. The increase in organic osmolytes at 72h post activation of Pacific oyster spermatozoa would sustain this hypothesis. Intracellular osmotic changes possibly affected spermatozoon homeostasis, resulting in the loss of spermatozoon movement capacity. Plasma membrane alterations of Pacific oyster spermatozoa at the end of the movement phase were previously reported (Suquet et al., 2010). The second hypothesis to explain PME decrease at the end of the movement phase may be related to catabolism of glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate during the movement phase of Pacific oyster spermatozoa. It would suggest that glycolysis occurred during the movement phase, probably to fuel substrates to the Krebs cycle and thus to OXPHOS as no end-product accumulation from lactate- or opine- pathways were found at the end of the movement phase. As intracellular ATP content was not reduced at the end of the movement phase, the reduced level of these substrates is not the cause of movement cessation.

In this work, phosphoarginine level increased (1.7 fold) between the first part and the end of spermatozoon movement. Phosphagens are high energy phosphate components involved in buffering cellular ATP level and allow the storage of chemical energy in phosphoanhydride bond of ATP (Meyer et al., 1984). Thus, phosphagen hydrolysis represents a potential source of energy. In sea urchin and turbot spermatozoa, phosphagens in the form of phosphocreatine is used primarily for movement. As a consequence, phosphagen concentration decreases during spermatozoon movement phase of both species (Tombes et al., 1987; Dreanno et al., 2000). Phosphagens are also involved in ATP transport from the mitochondrion to sites of utilization and in the maintenance of a stable ATP/ADP ratio at these sites via local transphosphorylation (Jacobus, 1985; Kammermeier, 1987). Thus, in Pacific oyster spermatozoa, phosphoarginine may be involved in energy storage and transport in the form of high energy phosphate and in maintenance of a stable ATP/ADP ratio at dynein-ATPases sites, ensuring their proper functioning by limiting ADP accumulation at these sites. The increase of phosphoarginine level at the end of the movement phase suggests that energy was stored in the form of high energy phosphate. Two hypotheses are suggested to explain such accumulation. On one hand, phosphoarginine may have been produced and accumulated during spermatozoon movement phase. Such energy storage could be subsequently used to face high energy demands during the fertilization process, including induction of the acrosome reaction and spermatozoon-oocyte fusion. It has been reported that a high level of ATP is required for this process in sea urchin (Christen et al., 1983; Christen et al., 1986). On the other hand, phosphoarginine might be accumulated at the end of spermatozoon movement due to cessation of ATP hydrolysis by dynein-ATPases. The reason of such storage remains to be investigated in Pacific oyster spermatozoa. Phosphagens are broadly distributed among spermatozoa of marine invertebrate species exhibiting external fertilization. They are usually found in the form of phosphocreatine, such as in spermatozoa of the lugworm *Arenicola marina* or of sea urchins (Tombes et al., 1987; Kamp et al., 1995). In these species, duration of spermatozoon movement is shorter than the one observed for Pacific oyster spermatozoa: over 5h in *Arenicola marina* (Pacey et al., 1994) and a maximum of 12h in sea urchin spermatozoa (Ohtake et al., 1996). It could be argued that a phosphoarginine may be advantageous for spermatozoa exhibiting longer movement phase as in Pacific oyster, because phosphoarginine has lower ATP-buffering properties than phosphocreatine. This allows phosphoarginine pool to be more slowly discharged than phosphocreatine pool (Ellington, 1989). It has been reported that such properties are advantageous in stressful environments where hypoxia and frequent intracellular acidosis prevail (Grieshaber et al., 1994). Such conditions might lead to a rapid dissipation of the phosphocreatine pool, which would not be the case for the phosphoarginine (Ellington, 1989).

Conclusion

Our study assessed changes in metabolic profile during the movement phase of Pacific oyster spermatozoa using NMR spectroscopy. This work provides a basis for future metabolomic studies. To our knowledge, this is the first NMR analysis applied to Pacific oyster spermatozoa, identifying key metabolic compounds. Clearly, the major portion of spermatozoon metabolites is devoted to deal with osmotic and energy cell regulations. No alteration of the energy status (*i.e.*, ATP, ADP, Pi) of spermatozoa occurred during their movement phase, highlighting the efficient balance between energy demand and supply of Pacific oyster spermatozoa. This is the first study reporting the presence of phosphoarginine in Pacific oyster spermatozoa and its accumulation at the end of spermatozoon movement phase in marine species that exhibit external fertilization. Alteration of the energy status is not the cause for the end of spermatozoon movement. Alternative hypothesis of spermatozoon movement cessation such as alterations of the plasma membrane or intracellular osmotic changes might be suggested. Further studies are needed to investigate the mechanisms of movement cessation. The identification of PDE and PME may be helpful and remains to investigate. The use of carbohydrates as substrates for ATP synthesis could be explored by measuring glucose and glycogen contents during spermatozoon movement phase. Furthermore, the major peaks of ^{1}H and ^{31}P-NMR spectra being identified in the present study, monitoring the distribution and the kinetics of osmolytes and phosphorus-containing metabolites might be useful to study the mechanisms of adaptation to environmental changes or to improve cryopreservation protocols.

Acknowledgements

The authors want to thank the technical team of Ifremer's facilities in Argenton. This work was partly supported by the European project Reproseed (FP7-KBBE-2009-3), co-coordinated by J-L Nicolas. M. Boulais was funded by Ifremer and by a doctoral grant from Région Bretagne.

References

Brokaw, C., 1987. Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation. J. Cell. Biochem. 35, 175–184. doi:10.1002/jcb.240350302

Burt, C., Ribolow, H., 1994. Glycerol phosphorylcholine (GPC) and serine ethanolamine phosphodiester (SEP) - Evolutionary mirrored metabolites and their potential metabolic roles. Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol. 108, 11–20.

Chance, B., Williams, G., 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem. 17, 65–134.

Christen, R., Schackmann, R., Dahlquist, F., Shapiro, B., 1983. 31P-NMR analysis of sea urchin sperm activation - Reversible formation of high energy phosphate compounds by changes in intracellular pH. Exp. Cell Res. 149, 289–294. doi:10.1016/0014-4827(83)90400-7

Christen, R., Schackmann, R., Shapiro, B., 1986. Ionic regulation of sea urchin sperm motility, metabolism and fertilizing capacity. J. Physiol.-Lond. 379, 347–365.

Demoy-Schneider, M., Schmitt, N., Suquet, M., Labbé, C., Boulais, M., Prokopchuk, G., Cosson, J., 2013. Biological characteristics of sperm in two oyster species: the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. In "Spermatozoa: Biology, Motility and Function and Chromosomal abnormalities", Chapter 2, Nova Science Publishers Inc., Brenda T. Erickson Editor, ISBN: 978-1-63, p. 15-74.

Dreanno, C., Seguin, F., Cosson, J., Suquet, M., Billard, R., 2000. H-1-NMR and P-31-NMR analysis of energy metabolism of quiescent and motile turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. J. Exp. Zool. 286, 513–522. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(20000401)286:5<513::AID-JEZ9>3.0.CO;2-5

Ellington, W., 1989. Phosphocreatine represents a thermodynamic and functional improvement over other muscle phosphagens. J. Exp. Biol. 143, 177–194.

Faure, C., 1996. Paramètres physiologiques de l'émission et de l'activation des gamètes mâles de deux mollusques bivalves: la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg). Thesis. University of Paris 7, France.

Grieshaber, M.K., Hardewig, I., Kreutzer, U., Pörtner, H.O., 1994. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.125, 43–147.

Hanana, H., Simon, G., Kervarec, N., Mohammadou, S., B. A. and Cerantola, 2012. HRMAS NMR as a tool to study metabolic responses in heart clam *Ruditapes decussatus* exposed to Roundup (R). Talanta 97, 425–431. doi:10.1016/j.talanta.2012.04.057

Hudsmith, L.E., Tyler, D.J., Emmanuel, Y., Petersen, S.E., Francis, J.M., Watkins, H., Clarke, K., Robson, M.D., Neubauer, S., 2009. P-31 cardiac magnetic resonance spectroscopy during leg exercise at 3 Tesla. Int. J. Cardiovasc. Imaging 25, 819–826. doi:10.1007/s10554-009-9492-8

Jacobus, W., 1985. Theorical support for the heart phosphocreatine energy transport shuttle based on the intracellular diffusion limited mobility of ADP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 1035–1041. doi:10.1016/0006-291X(85)91240-9

Kammermeier, H., 1987. Why do cells need phosphocreatine and a phosphocreatine shuttle. J. Mol. Cell. Cardiol. 19, 115–118. doi:10.1016/S0022-2828(87)80550-3

Kamp, G., Englisch, H., Muller, R., Westhoff, D., Elsing, A., 1995. Comparison of the two different phosphagen systems in the lugworm *Arenicola marina*. J. Comp. Physiol. B - Biochem. Syst. Environ. Physiol. 165, 496–505.

Kluytmans, J., Zandee, D., 1983. Comparative study of the formation and excretion of anaerobic fermentation products in bivalves and gastropods. Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol. 75, 729–732. doi:10.1016/0305-0491(83)90125-6

Lee, N.H., Han, K.N., Choi, K.S., 2004. Effects of salinity and turbidity on the free amino acid composition in gill tissue of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J. Shellfish Res. 23, 129–133.

Livingstone, D., 1991. Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom. Am. Zool. 31, 522–534.

Meyer, R., Sweeney, H., Kushmerick, M., 1984. A simple analysis of the phosphocreatine shuttle. Am. J. Physiol. 246, C365–C377.

Mita, M., Yasumasu, I., 1983. Metabolism of lipid and carbohydrate in sea urchin spermatozoa. Gamete Res. 7, 133–144. doi:10.1002/mrd.1120070205

Mita, M., Nakamura, M., 1993. Phosphatidylcholine is an endogenous substrate for energy metabolism in spermatozoa of sea urchins of the order Echinoidea. Zoolog. Sci. 10, 73–83.

Mita, M., Fujiwara, A., Desantis, R., Yasumasu, I., 1994a. High-energy phosphate compounds in spermatozoa of the sea urchin *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*. Comp. Biochem. Physiol. -Physiol. 109, 269–275. doi:10.1016/0300-9629(94)90129-5

Mita, M., Oguchi, A., Kikuyama, S., Yasumasu, I., Desantis, R., Nakamura, M., 1994b. Endogenous substrates for energy metabolism in spermatozoa of the sea urchins *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*. Biol. Bull. 186, 285–290. doi:10.2307/1542274

Mita, M., Nakamura, M., 1998. Energy metabolism of sea urchin spermatozoa: An approach based on echinoid phylogeny. Zoolog. Sci. 15, 1–10. doi:10.2108/zsj.15.1

Mita, M., Ueta, N., 1988. Energy metabolism of sea urchin spermatozoa, with phosphatidylcholine as the preferred substrate. Biochim. Biophys. Acta 959, 361–369.

Mohri, H., 1957. Endogenous substrates of respiration in sea-urchin spermatozoa. J. Fac. Sci. Tokyo Univ. IV. 8, 51-63.

Mohri, H., 1958. Adenosine triphosphatases of sea urchin spermatozoa. J. Fac. Univ. Tokyo IV. 8, 307-315.

Nakada, H., Friedmann, B., Weinhouse, S., 1955. Pathways of glycine catabolism in rat liver. J. Biol. Chem. 216, 583–592.

Niitsuhosoya, N., Ishida, K., Mohri, H., 1987. Changes in intracellular concentrations of cyclic nucleotides during the initiation process of starfish sperm motility. Dev. Growth Differ. 29, 563–569.

Ohtake, T., Mita, M., Fujiwara, A., Tazawa, E., Yasumasu, I., 1996. Degeneration of respiratory system in sea urchin spermatozoa during incubation in seawater for long duration. Zoolog. Sci. 13, 857–863. doi:10.2108/zsj.13.857

Omoto, C., 1991. Mechanochemical coupling in cilia. Int. Rev. Cytol.- Surv. Cell Biol. 131, 255–292.

Pacey, A., Cosson, J., Bentley, M., 1994. The acquisition of forward motility in the spermatozoa of the polychaete *Arenicola marina*. J. Exp. Biol. 195, 259–280.

Penningroth, S., Peterson, D., 1986. Evidence for functional differences between 2 flagellar dynein ATPases. Cell Motil. Cytoskeleton 6, 586–594. doi:10.1002/cm.970060607

Porcella, G., Floridi, A., Ciammaru, A., 1965. Distribution and biological significance of L-serine ethanolamine and L-threonine ethanolamine phosphates. Comp. Biochem. Physiol. 14, 413–&. doi:10.1016/0010-406X(65)90215-X

Preston, R.L., 2005. Transport of amino acids by marine invertebrates. Comparative Physiology and Biochemistry 265, 410-421.

Roberts, E., Lowe, I., 1954. Occurence of the O-phosphodiester of L-serine and ethanolamine in turtle tissue. J. Biol. Chem. 211, 1–12.

Santini, G., Bruschini, C., Pazzagli, L., Pieraccini, G., Moneti, G., Chelazzi, G., 2001. Metabolic responses of the limpet *Patella caerulea* (L.) to anoxia and dehydration. Comp. Biochem. Physiol. -Mol. Integr. Physiol. 130, 1–8. doi:10.1016/S1095-6433(01)00361-0

Suquet, M., Labbe, C., Brizard, R., Donval, A., Le Coz, J.R., Quere, C., Haffray, P., 2010. Changes in motility, ATP content, morphology and fertilisation capacity during the movement phase of

tetraploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. Theriogenology 74, 111–117. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.01.021

Suquet, M., Quere, C., Mingant, C., Lebrun, L., Ratiskol, D., Miner, P., Cosson, J., 2013. Effect of sampling location, release technique and time after activation on the movement characteristics of scallop (*Pecten maximus*) sperm. Aquat. Living Resour. 26, 215–220. doi:10.1051/alr/2013048

Thebault, M.T., Kervarec, N., Pichon, R., Nonnotte, G., Le Gal, Y., 1999. A P-31 nuclear magnetic resonance study of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. Comptes Rendus Acad. Sci. Ser. Iii-Sci. Vie-Life Sci. 322, 537–541. doi:10.1016/S0764-4469(00)88522-4

Thebault, M., Kervarec, N., Pichon, R., Nonnotte, G., Le Gal, Y., 2003. Distribution and potential role of cytosolic water-soluble phosphodiesters in fish. Physiol. Biochem. Zool. 76, 553–565.

Tikunov, A.P., Johnson, C.B., Lee, M.K., Haakil and Stoskopf, Macdonald, J.M., 2010. Metabolomic Investigations of American Oysters Using H-1-NMR Spectroscopy. Mar. Drugs 8, 2578–2596. doi:10.3390/md8102578

Tombes, R., Brokaw, C., Shapiro, B., 1987. Creatine kinase-dependent energy transport in sea urchin spermatozoa-Flagellar wave attenuation and theorical analysis of high energy phosphate diffusion. Biophys. J. 52, 75–86.

Toyohara, H., Ikeda, M., Goto, C., Sawada, H., Hosoi, M., Takeuchi, K., Hayashi, I., Imamura, S., Yamashita, M., 2005. Osmo-responsive expression of oyster amino acid transporter gene and analysis of the regulatory region involved. Fish. Sci. 71, 465–470. doi:10.1111/j.1444-2906.2005.00989.x

Tuffnail, W., Mills, G.A., Cary, P., Greenwood, R., 2009. An environmental H-1 NMR metabolomic study of the exposure of the marine mussel *Mytilus edulis* to atrazine, lindane, hypoxia and starvation. Metabolomics 5, 33–43. doi:10.1007/s11306-008-0143-1

Vandergrond, J., Seijkens, D., Mali, W., 1990. In vitro P-31 NMR-spectroscopy of the reproductive-organs of the male-rat-an improved preparation method. Magn. Reson. Med. 15, 462–468.

Van der Grond, J., Dijkstra, G., Roelofsen, B., Mali, W., 1991. 31P-NMR determination of phosphomonoesters on relation to phospholipid biosynthesis in testis of the rat at different ages. Biochim. Biophys. Acta 1074, 189–194. doi:10.1016/0304-4165(91)90060-T

Viant, M.R., Rosenblum, E.S., Tjeerdema, R.S., 2003. NMR-based metabolomics: A powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. Environ. Sci. Technol. 37, 4982–4989. doi:10.1021/es034281x

Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology 67, 661–672. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.10.003

Yagi, T., 2000. ADP-dependent microtubule translocation by flagellar inner-arm dyneins. Cell. Struct. Funct. 25, 263–267. doi:10.1247/csf.25.263

Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. J. Exp. Biol. 208, 2819–2830. doi:10.1242/jeb.01730

Zandee, D., Holwerda, D., Kluytmans, J., Dezwaan, A., 1986. Metabolic adaptations to environmental anoxia in the intertidal bivalve mollusk *Mytilus edulis* L. Neth. J. Zool. 36, 322–343.

Zhang, L., Liu, X., You, L., Zhou, D., Wang, Q., Li, F., Cong, M., Li, L., Zhao, J., Liu, D., Yu, J., Wu, H., 2011a. Benzo(a)pyrene-induced metabolic responses in Manila clam *Ruditapes philippinarum* by proton nuclear magnetic resonance (H-1 NMR) based metabolomics. Environ. Toxicol. Pharmacol. 32, 218–225. doi:10.1016/j.etap.2011.05.006

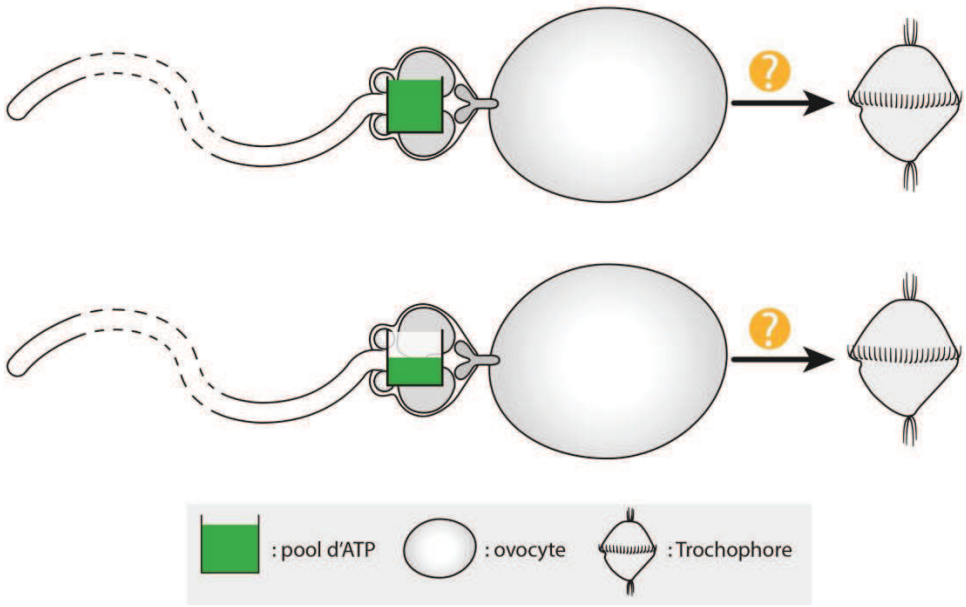
Zhang, L., Liu, X., You, L., Zhou, D., Wu, H., Li, L., Zhao, J., Feng, J., Yu, J., 2011b. Metabolic responses in gills of Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to copper using NMR-based metabolomics. Mar. Environ. Res. 72, 33–39. doi:10.1016/j.marenvres.2011.04.002

Chapitre 4

Implication du métabolisme énergétique dans le succès à la fécondation du spermatozoïde d'huître creuse

---

Le métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse assure le maintien du contenu en molécules à liaisons riches en énergie (ATP et phosphoarginine) au cours de la phase de mouvement (chapitres 1, 2, 3). L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est de déterminer l'implication du contenu intracellulaire en ATP dans le succès de fécondation du spermatozoïde de cette espèce. La question scientifique est schématisée dans la figure suivante :



Ce travail est présenté sous forme d'un article.

Individual variability of cellular and biochemical characteristics of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa: involvement in fertilization success

Myrina Boulais[1*], Philippe Soudant[2], Nelly Le Goïc[2], Claudie Quéré[3], Pierre Boudry[3], Marc Suquet[1]

[1]*Ifremer, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Site Expérimental d'Argenton, Argenton, France ;*
[2]*IUEM, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France ;*
[3]*Ifremer, UMR 6539 (UBO-CNRS-IRD-Ifremer), LEMAR, Centre de Bretagne, Plouzané, France ;*

** Corresponding author e-mail: myrina.boulais@gmail.com*

Abstract

Fertilization of the oocyte is a critical process depending on functional features of the spermatozoon. Spermatozoa must undergo a process known as capacitation, which promotes hyperactivated motility and acrosomal exocytosis. Capacitation processes require high level of adenosine triphosphate (ATP). In Pacific oyster, spermatozoa are characterized by a high intracellular ATP at the end of the movement phase. Relationships among cellular and biochemical features of spermatozoa (percentage of motile spermatozoa, velocity, viability, mitochondrial membrane potential and intracellular ATP content of spermatozoa) were explored and their potential roles in the fertilization capacity of spermatozoa were investigated using simple and multiple linear regressions. Our results demonstrated that intracellular ATP content is related to cell death processes of Pacific oyster spermatozoa. Decrease in spermatozoon viability and intracellular ATP content reduces its capacity to successfully fertilize the oocyte or the normal development of embryo. Our results highlight the crucial role of intracellular ATP level in spermatozoon viability and fertilization capacity. Thus, the maintenance of high level of intracellular ATP content during the movement phase of Pacific oyster spermatozoa is probably devoted to ensure the fertilization success of this species. Finally, the individual variability of intracellular ATP content and viability of spermatozoa is suggested to be related to differences between males in the timing of maturation

Keywords: Crassostrea gigas / spermatozoa / fertilization / motility / viability / ATP

Introduction

Fertilization of the oocyte is a critical process depending on functional features of the spermatozoon. Motility is one of the crucial functions of male gamete, allowing spermatozoon to actively reach and penetrate the oocyte. Spermatozoa require maturation during their transfer along the gonoduct before they become competent for fertilization. In particular, they must undergo a process known as capacitation, which promotes fully activated motility (forward translation and efficient flagellar beat) and acrosomal exocytosis, depending on the species (Buffone et al., 2012). In Pacific oyster, before fully activated motility, spermatozoon movement is very erratic due to the absence of progressive propagation of waves and of translational movement in the flagella (Faure, 1996; Demoy-Schneider et al., 2013). Acrosomal reaction exposes proteins that bond the spermatozoon to the oocyte (Hylander and Summers, 1977; Moy et al., 2008) and acrosome enzyme content (*e.g.*, acid glycohydrolases, proteases, esterases, etc.) enables the spermatozoon to penetrate the oocyte (Akcha et al., 2012). In turbot (*Psetta maxima*), European seabass (*Dicentrarchus labrax*), sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*) and Pacific oyster, a low percentage of motile spermatozoa at the end of the movement phase was related to reduce fertilization capacity (Levitan et al., 1991; Dreanno, 1998; Suquet et al., 2010). Capacitation, including fully activated motility and acrosomal exocytosis, requires a high level of adenosine triphosphate (ATP) (Cosson, 1996; Demoy-schneider et al., 2013). Fully activated motility depends on the propagation of bending waves along the length of the flagellum which occurs partly through reaction catalyzed by dynein-ATPase and requires a high level of adenosine triphosphate (ATP) (Cosson, 1996; Demoy-schneider et al., 2013). In sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus*, it has been suggested that acrosomal reaction may be prevented by a lack of ATP (Christen et al., 1983 ; 1986). Furthermore, intracellular ATP content may control the stability of spermatozoon binding to the oocyte surface in this species (Hirohashi and Lennarz, 1998). Thus, intracellular ATP content must sufficiently sustain processes such as fully activated motility, acrosomal exocytosis and binding to oocyte in order to achieve fertilization. In sea bass, intracellular spermatozoon ATP content is used to predict their fertilization capacity (Zilli et al., 2004).

In Pacific oyster, spermatozoa are characterized by a long movement duration (>24 hours) together with maintenance of high intracellular ATP content (Suquet et al., 2010; Boulais et al., **chapters 1 and 3**). In addition, accumulation of high energy phosphate in the form of phosphoarginine has been reported at the end of spermatozoon movement phase in this species (Boulais et al., **chapter 3**). These authors suggested that maintenance of high intracellular ATP content and energy storage of spermatozoa may be required to ensure the success of fertilization

in this species. In this context, relationships among cellular, biochemical and movement features of spermatozoa (percentage of motile spermatozoa, velocity, viability, mitochondrial membrane potential and intracellular ATP content) were explored and their potential roles in the fertilization capacity of spermatozoa were investigated using simple and multiple linear regressions.

Material and methods

Collection of sperm

During the natural spawning period (June), three year old mature oysters (mean weight±SEM: 72.5±2.3g) were collected from farmed stock in the Bay of Brest (Brittany, France). Sperm was collected by stripping (n=21 males) according to Boulais et al. (**chapter 1**). Briefly, spermatozoa were collected in 5 mL of sea water (19°C) filtered at 1 µm (FSW). Concentration of spermatozoa was determined by flow cytometer (duplicates) and was adjusted to 7.10^8 spermatozoa.mL^{-1} by further dilution in FSW, in a 20 mL plastic bowl. Spermatozoon suspensions were incubated in FSW during 1 hour allowing spermatozoa to undergo capacitation.

Motility features of spermatozoa

Movement features were recorded according to Boulais et al. (**chapter 1**). Briefly, spermatozoon suspensions were diluted 20 times in FSW containing 1g.L^{-1} of bovine serum albumin (BSA). Then, 7µl of diluted suspension were used to assess the percentage of motile spermatozoa and their velocity (VAP: Velocity of the Average Path) using a CASA plug-in developed for the Image J software (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007) and adapted to Pacific oyster spermatozoa.

Flow cytometry analyses

The analyses of spermatozoon viability and mitochondrial membrane potential (MMP) were performed using an EasyCyte Plus cytometer (Guava Millipore) according to Le Goic et al. (2013). Briefly, analyses were carried out on 200 µL samples after dilution of spermatozoon suspension in FSW (concentration: 10^6 spermatozoa.mL^{-1} for viability; 10^7 spermatozoa.mL^{-1} for MMP). Viability was measured using a 10 minutes dual staining with SYBR-14 (final concentration: 1µM) and propidium iodide (PI ; final concentration: 10 µg.mL^{-1}). SYBR-14 stains DNA in cells with intact membranes only otherwise this dye would leak out the cell (Silva and Gadella, 2006). PI can only enter in spermatozoa with deteriorated membranes and labels the

cellular DNA. Results were expressed as percentages of live, dying and dead spermatozoa. MMP was measured using the potential-dependent J-aggregate-forming delocalized lipophilic cationic probe JC-1, after a 10 minute incubation (final concentration 5 µM). To reach probe equilibrium, sample was diluted ten times in FSW. MMP was thus estimated by orange/green fluorescence ratio. Fluorescence is given in arbitrary units. Values from FSC (Forward Scatter: relative cell size) and SSC (Side Scatter: relative cell complexity) detectors were also acquired to estimate morphologic parameters of cells.

Intracellular ATP content

Intracellular ATP content of spermatozoa was assessed according to Boulais et al. (**chapter 1**). Briefly, 5.10^6 spermatozoa in 500 µL of FSW were transferred in a 2 mL cryotube (Nunc™), and stored in liquid nitrogen until later analysis. Intracellular ATP content was assessed in triplicates by bioluminescence (kit ATPlite, Perkin Elmer) using a plate reader (EnSpire™ 2300 Multilabel Reader, PerkinElmer).

Spermatozoon fertilization capacity

Spermatozoon fertilization capacity was estimated using oocytes of three pools of five females each. Oocytes were collected by stripping, counted and fertilized according to Song et al. (2009), except for the limiting spermatozoa to oocyte ratio: 300 spermatozoa per oocyte were used to fertilize 25 000 oocytes in 50 mL of FSW (triplicates). After 30 minutes of contact between spermatozoa and oocytes, beakers were filled up to 1.8 L with FSW for incubation. To estimate the fertilization capacity of each male, trochophore yields were assessed 24 hours after fertilization (number of trochophores/number of oocytes, 20°C): each beaker was sieved on a 40 µm mesh and concentrated in a 10 mL graduated cylinder. The number of trochophores was estimated by microscopic counts (3*50µl) adding a few drops of RCL2 (Alphelys) to prevent trochophore movement.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± confidence interval at 95% (CI95%). Data expressed as a rate or percentage were arcsine square root transformed. Relationships among spermatozoon features and then with the trochophore yield were investigated using simple and multiple linear regressions. Statistical analyses were performed using Statgraphics software.

Results

Morphological parameters of spermatozoa show a low variability (Fig.1a). Using SYB-14 and PI double staining, mean populations of live, dying and dead spermatozoa of the 21 males were estimated by drawing three regions on the cytogram of SYBR-14 and PI fluorescences for each male (Fig.1b). A high mean percentage of live spermatozoa (89.2 ± 3.6) was assessed on the 21 males studied. The mean characteristics of Pacific oyster spermatozoa are presented in table 1.

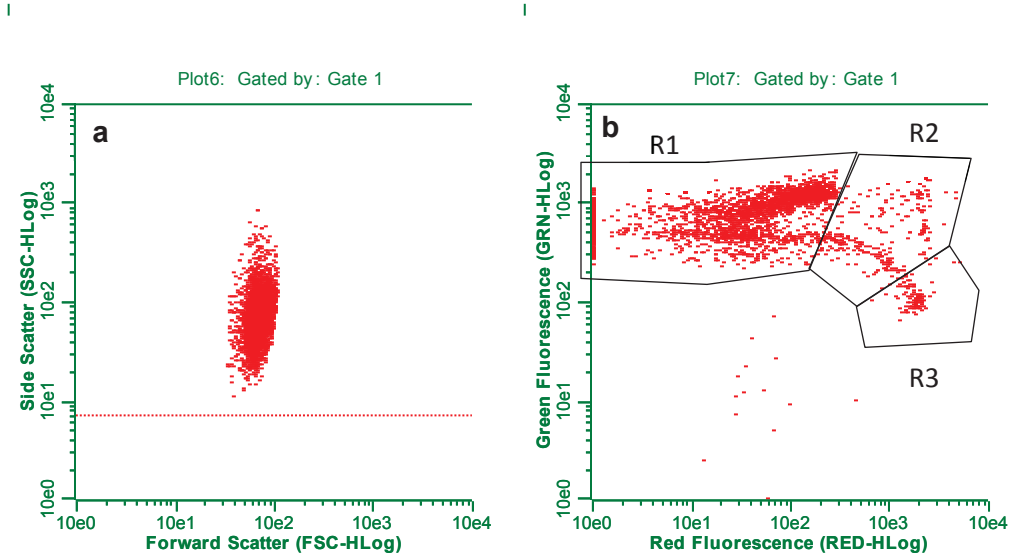


Fig. 1. (a) Density plot of FSC (relative cell size) vs. SSC (relative cell complexity) cytogram of spermatozoa of one representative male (n > 6000 events). (b) Discrimination of live, dying and dead spermatozoa stained with both SYBR-14 and PI of one representative male. R1: SYBR-14-stained live cells, R2: SYBR-14- and PI-stained dying cells, and R3: PI-stained dead cells.

Table 1

Mean value of cellular, biochemical and movement features of Pacific oyster spermatozoa and trochophore yields. Results are expressed as mean (n=21, except n=19 for intracellular ATP content) ±CI95%.

Feature	Mean ± CI95%
FSC: Relative cell size	63.7 ± 3.4
SSC: Relative cell complexity	75.2 ± 3.5
Live spermatozoa (%)	89.2 ±3.6
Dying spermatozoa (%)	6.6 ± 2.5
Dead spermatozoa (%)	2.2 ± 0.7
Mitochondrial Membrane Potential (orange/green fluorescence ratio)	4.3 ± 0.4
Intracellular ATP content (nmol.10^{-9} spermatozoa)	157.2 ± 35.3
Motile spermatozoa (%)	73.4 ± 6.5
Spermatozoon velocity (µm.sec^{-1})	45.6 ± 3.0
Trochophore yield (%)	35.0 ± 9.0

Using simple linear regressions, a positive linear relationship was observed between percentage of motile spermatozoa and spermatozoon velocity (R^2=0.50, p<0.001, Fig.2a) and a negative one with percentage of dead spermatozoa (R^2=0.26, p<0.05, Fig.2b).

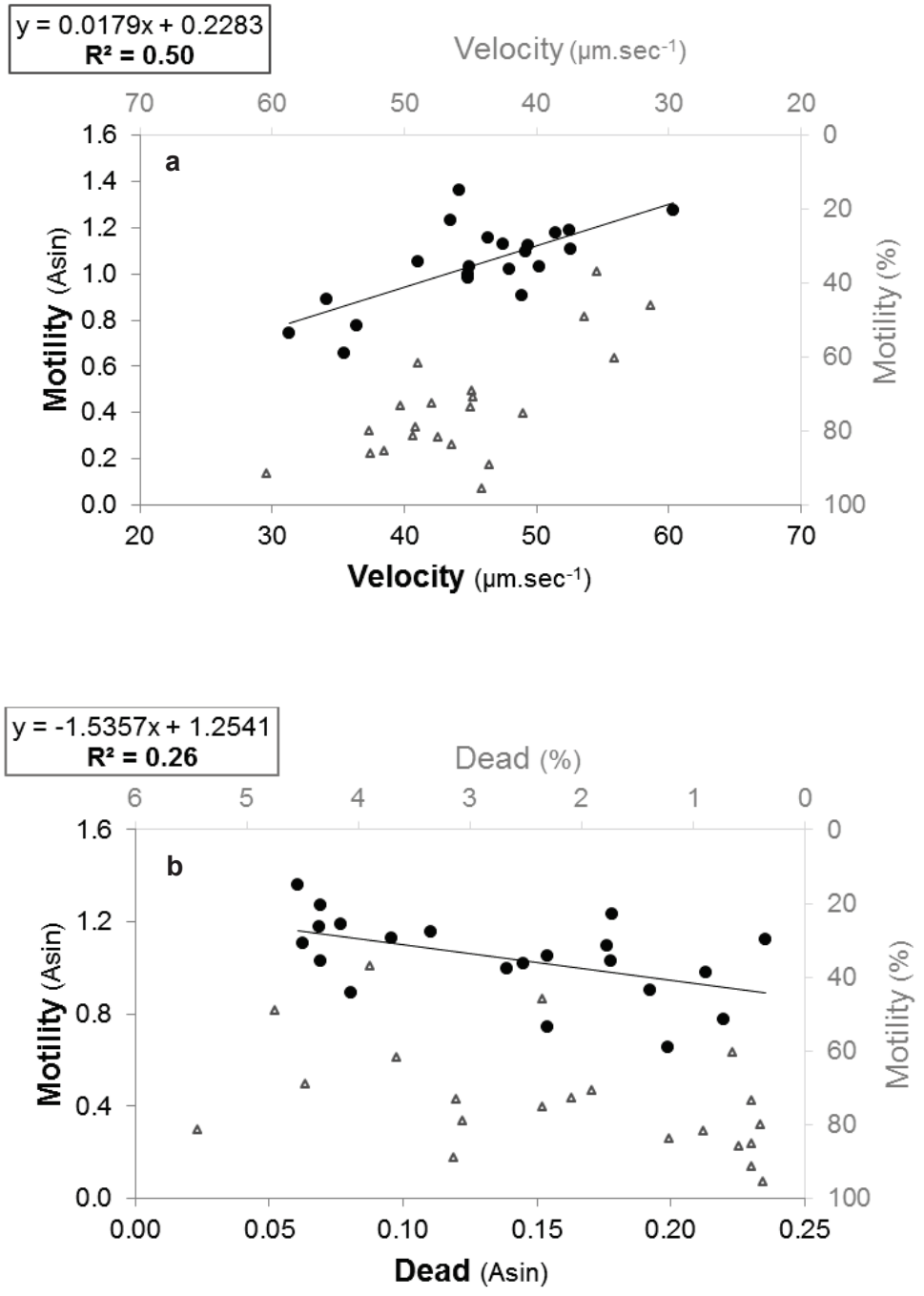
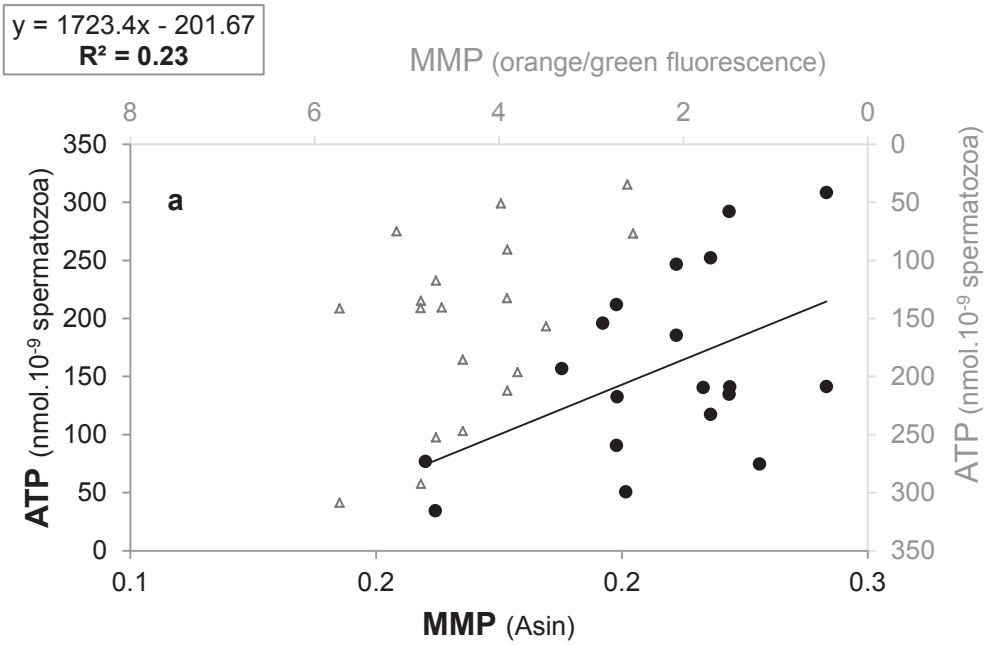
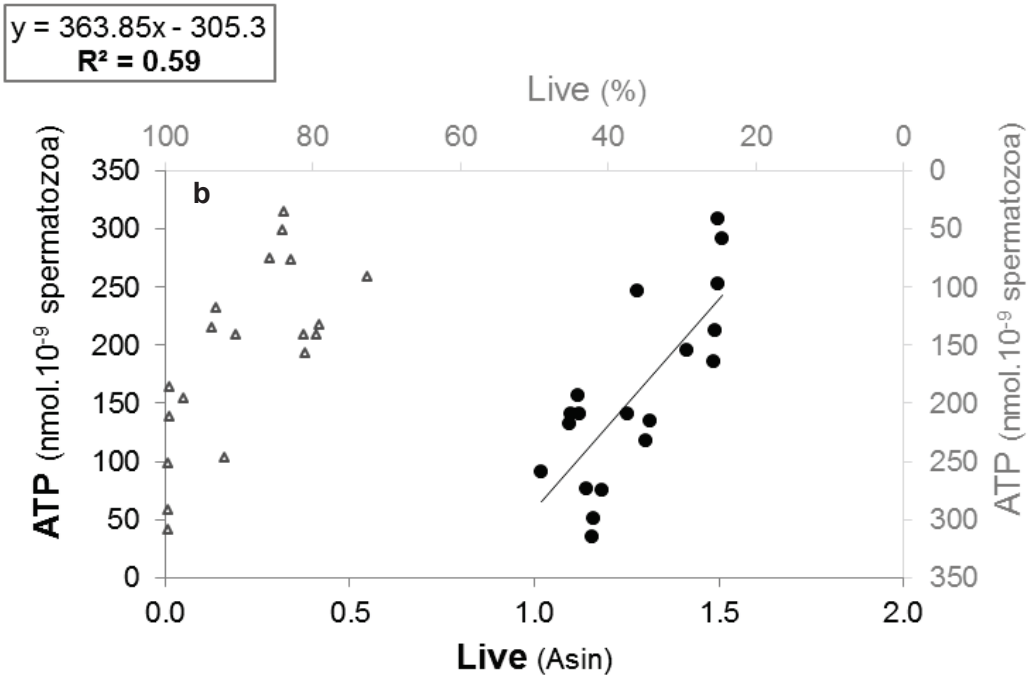


Fig.2. Significant linear relationships between cellular and movement characteristics of spermatozoa (n=21). a: Percentage of motile spermatozoa (Motility) and velocity, b: Percentages of motile (Motility) and dead (Dead) spermatozoa. Non transformed (Δ) and arcsine square root transformed (●) data.

Intracellular ATP content was positively correlated to MMP (R^2=0.23, $p<0.05$, Fig.3a) and to percentage of live spermatozoa (R^2=0.59, $p<0.001$, Fig.3b). Intracellular ATP content was also negatively related to percentages of dying (R^2=0.47, $p<0.01$, Fig.3c) and dead (R^2=0.37, $p<0.01$, Fig.3d) spermatozoa.





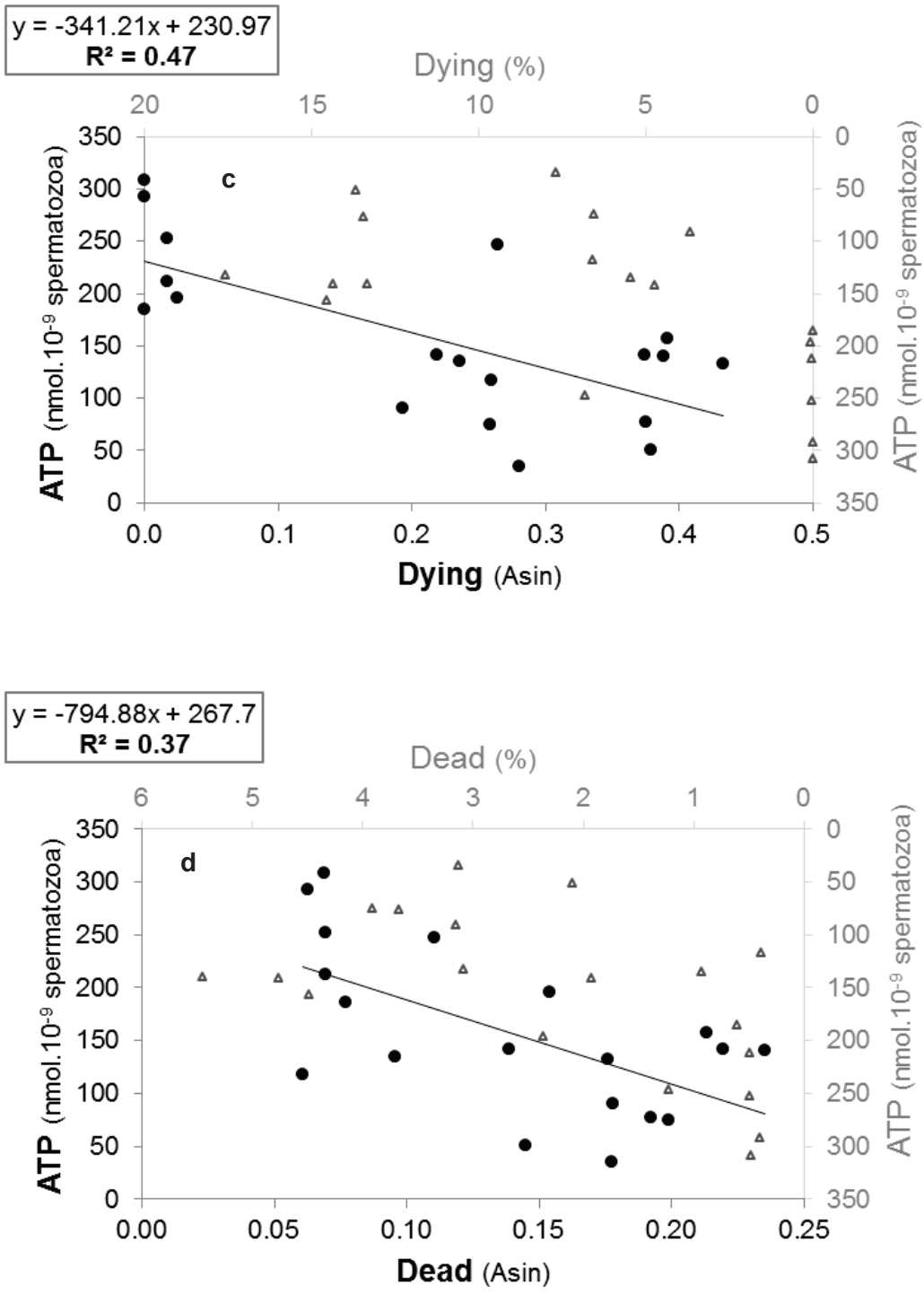
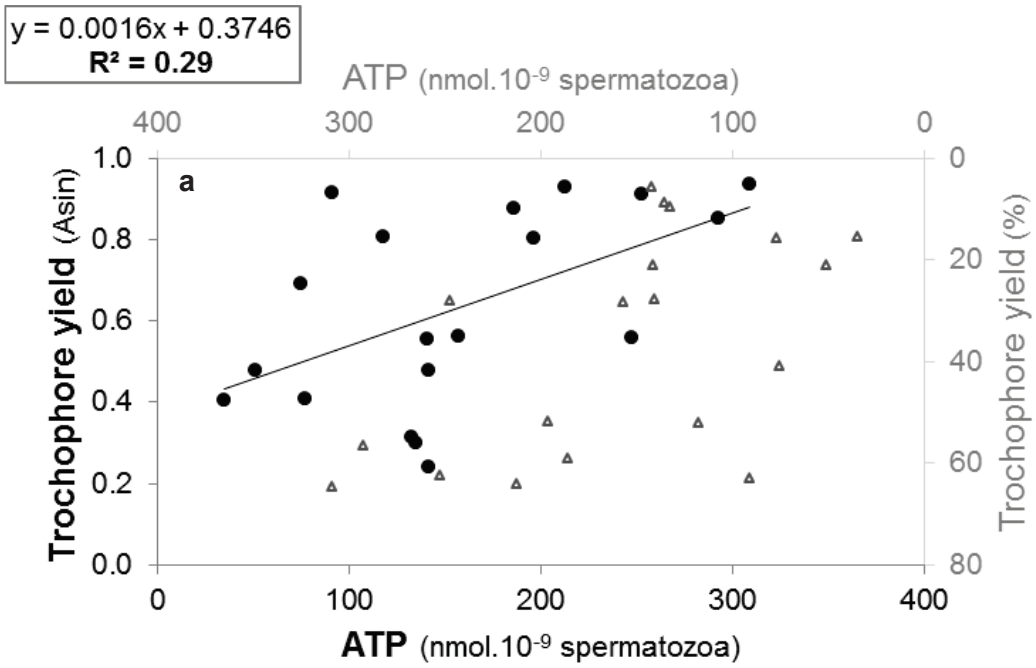
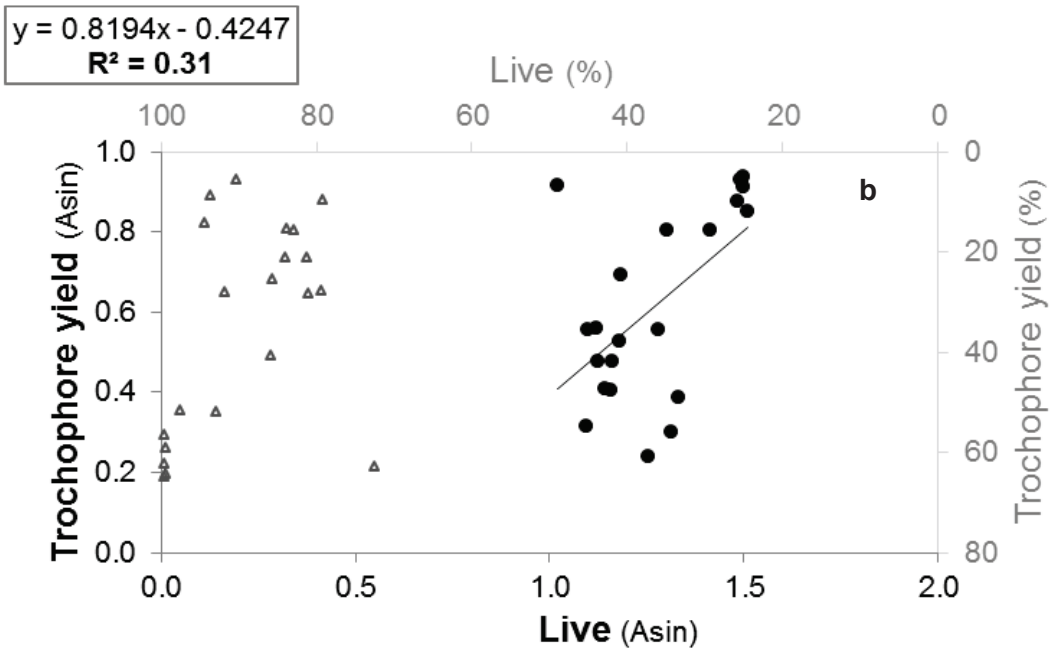


Fig.3. Significant linear relationships between cellular and biochemical characteristics of spermatozoa (n=21, except n=19 for intracellular ATP content). a: Intracellular ATP content (ATP) and mitochondrial membrane potential (MMP), b: Intracellular ATP content (ATP) and percentage of live spermatozoa (Live), c: Intracellular ATP content (ATP) and percentage of dying spermatozoa (Dying), d: Intracellular ATP content (ATP) and percentage of dead spermatozoa (Dead). Non transformed (Δ) and arcsine square root transformed (●) data.

A linear positive relationship was found between trochophore yield and intracellular ATP content (R^2=0.29, p<0.05, Fig.4a) and percentage of live spermatozoa (R^2=0.31, p<0.01, Fig.4b), and a negative one with percentage of dying spermatozoa (R^2=0.53, p<0.001, Fig.4c). Using multiple regressions, the individual variability of the trochophore yield was explained at 28% (p<0.05) by a model including intracellular ATP content and the percentage of live spermatozoa and at 51% (p<0.01) by a model including intracellular ATP content and percentage of dying spermatozoa.





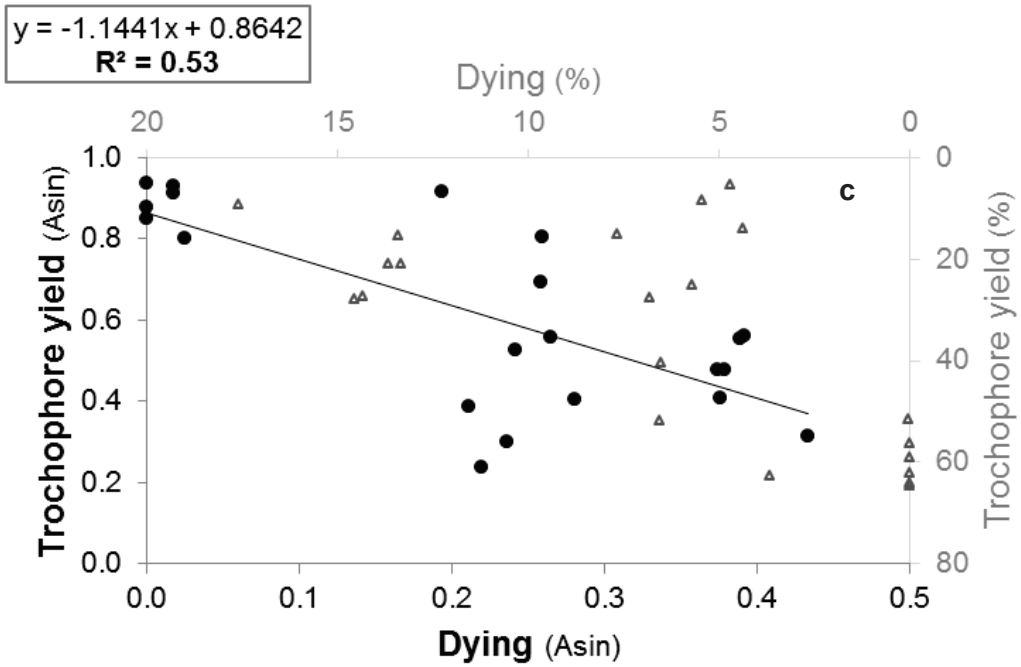


Fig.4. Significant linear relationships between trochophore yield and cellular and biochemical characteristics of spermatozoa (n=21, except n=19 for intracellular ATP content). a: trochophore yield and intracellular ATP content of spermatozoa (ATP), b: trochophore yield and percentage of live spermatozoa (Live), c: trochophore yield and dying spermatozoa (Dying). Non transformed (Δ) and arcsine square root transformed (●) data.

Discussion

In the present study, the relationships between spermatozoon cellular and biochemical characteristics and their potential involvements in fertilization capacity were investigated using simple and multiple regression analyses on 21 individual males.

The percentage of motile spermatozoa was found positively related to velocity (R^2=0.50, $p<0.001$), suggesting that both parameters depend on spermatozoon maturity. Spermatozoa must undergo a final step of maturation during their transfer along the gonoduct (Faure, 1996), process known as capacitation which promotes fully activated motility and acrosomal exocytosis. Capacitation involves intrinsic biochemical modifications and leads to a gamete that is fully competent and committed to fertilization (Buffone et al., 2012). Despite spermatozoa were here incubated one hour in FSW to undergo capacitation, this process resulted in movement characteristics quite variable between the 21 sperm samples studied; percentage of motile spermatozoa from 37% up to 96% and velocity from 31.3 $\mu m.sec^{-1}$ up to 60.4 $\mu m.sec^{-1}$. Variability in spermatozoon capacitation process may be related to differences in the maturation timing between males. As previously reported in Pacific oyster, some oysters within the same

population can be ready to spawn earlier than others (Boudry et al., 2002). The individual variability observed here could be due to the harvesting of oysters during the early part of the reproduction season (June). Furthermore, such differences could have been accentuated by stripping gonads, which could lead to collect immature spermatozoa. It has been reported that spermatogonia are found together with spermatozoa in ripe gonad of Pacific oyster because their proliferation are continuous throughout the reproductive cycle (Franco et al., 2010).

Mitochondrial membrane potential (MMP) is an indicator of mitochondrial respiratory chain functionality as it results from the electrochemical gradient of protons across the inner mitochondrial membrane. The relationship between MMP and intracellular ATP content of spermatozoa (R^2=0.23, $p<0.05$) suggests that intracellular ATP content is partly linked to the activity of the ATP-synthase as the proton gradient across the mitochondrial inner membrane is used by the ATP-synthase to phosphorylate ADP to ATP. The weak relationship between intracellular ATP content and MMP highlights that other parameters contribute to intracellular ATP content in spermatozoa. To function efficiently, OXPHOS requires a high proton gradient but also the activity of the ATP-synthase, which for Pacific oyster spermatozoa can be inhibited with oligomycin without impacting the MMP (Boulais et al., **chapter 2**). In addition, ATP can be produced through glycolytic pathway or phosphoarginine hydrolysis in spermatozoa of this species (Boulais et al., **chapters 2 and 3**). Finally, intracellular ATP content assessed one hour post activation partly results from ATP storage accumulated during spermatozoon maturation in the gonad (Suquet et al., 2010; Boulais et al., **chapter 1**). Thus, the variability of the intracellular ATP content of spermatozoa observed between males, from 34.5 to 308.5 nmol.10^{-9} spermatozoa, suggests that some males accumulated more intracellular ATP in spermatozoa than others. Alternatively, it suggests spermatozoon differential efficiency to produce ATP during the movement phase.

Relationships between intracellular ATP content and viability of Pacific oyster spermatozoa were found (positive with live: R^2=0.59, $p<0.001$; negative with dying: R^2=0.47, $p<0.01$; or negative with dead: R^2=0.37, $p<0.01$). Furthermore, a threshold in the intracellular ATP content could be settled at 185.5 nmol.10^{-9} spermatozoa above which 98% to 100% of spermatozoa are viable (Fig. 3b). Viability assay using dual staining with SYBR-14 and PI allows determining cell death of spermatozoa. Our results assume that intracellular ATP content and cell death processes are related for Pacific oyster spermatozoa. Two hypotheses are suggested to explain such a relationship. First, it could be speculated that intracellular ATP level controls spermatozoon viability, considering that ATP is required in many intracellular regulatory mechanisms, such as phosphorylation of proteins, and as signaling molecules ensuring spermatozoon functionalities. For example, most cell extrudes Na^+ in exchange for K^+ by the

Na^+/K^+-ATPase (Lang et al., 1998). It has been reported that ATP level is a factor determining cell death by apoptosis and necrosis (Eguchi et al., 1997). Second, it could be hypothesized that cell death processes resulted in a reduced capacity to produce ATP. However, overall it is hard to determine based on our results which hypothesis is most likely to be the right one.

In the present study, the percentages of motile and dead spermatozoa were negatively linked (R^2=0.26, $p<0.05$). It has been reported that human spermatozoa exhibiting apoptotic cascade are characterized by motility loss and oxidative damage (Koppers et al., 2011). Thus, in Pacific oyster, the apoptotic processes of spermatozoa might have led to their death and then to the end of movement. The percentages of motile and dying spermatozoa were not correlated, assuming that the end of movement is a consequence of spermatozoon death rather than being related to apoptotic processes. The weak coefficient of determination observed between the percentages of motile and dead spermatozoa suggests that other mechanisms lead to the end of movement. Intracellular ATP content might not be involved in this process as no relationship was found between intracellular ATP content and the percentage of motile spermatozoa. This confirms previous studies where the end of movement was not related to a depletion of intracellular ATP content (Boulais et al., **chapters 1 and 3**). These authors suggested that potential plasma membrane alterations and/or intracellular osmotic changes might lead to the end of the movement phase in Pacific oyster spermatozoa.

The fertilization capacity of spermatozoa, estimated by the trochophore yield, was positively related to the percentage of live spermatozoa (R^2=0.31, $p<0.01$) and negatively correlated to the percentage of dying spermatozoa (R^2=0.53, $p<0.001$). These results revealed that once spermatozoon undergoes cell death processes, spermatozoon capacity to successfully fertilize the oocyte or normal development of embryo are negatively affected. Considering that PI stains DNA of spermatozoa with compromised membranes, potential DNA damage may have occurred and resulted in a reduced capacity to success oocyte fertilization or in developmental abnormalities during embryogenesis. Lewis and Galloway (2009) reported DNA damage of mussel, *Mytilus edulis*, spermatozoa led to severe developmental abnormalities of the resulting embryos. In our study, spermatozoa with a high intracellular ATP content seem to be more likely to successfully fertilize oocyte as trochophore yield was positively correlated to intracellular ATP content of spermatozoa (R^2=0.29, $p<0.05$). In Pacific oyster, fertilization process requires acrosomal reaction to bind and penetrate the oocyte (Akcha et al., 2012). In sea urchin, a correlation between the levels of high energy phosphate compounds and spermatozoon ability to fertilize has been reported (Christen et al., 1983). High ATP levels are generally required for spermatozoa to fertilize oocytes of sea urchins (Christen et al., 1986). These authors suggested that acrosome reaction requires ATP and can be prevented when ATP is lacking. Hirohashi and

Lennarz (1998) suggested that spermatozoon intracellular ATP content controls the stability of spermatozoon binding to the oocyte surface in sea urchin. As in sea urchin, intracellular ATP content of Pacific oyster spermatozoa may sustain the process of acrosomal reaction and/or the binding to the oocyte during fertilization. Combined influence of intracellular ATP content and the percentages of live and dying spermatozoa on trochophore yield was also evaluated through multiple regressions. The model including intracellular ATP content and percentage of live spermatozoa explained 28% ($p<0.05$) of the trochophore yield variability, whereas the one including dying spermatozoa accounted for 51% ($p<0.01$) of trochophore yield variability. Both multiple regressions failed to better explain the variance of the trochophore yield.

To conclude, intracellular ATP content appeared related to cell death processes of Pacific oyster spermatozoa: if ATP level is too limited, lower than 185.5 $nmol.10^{-9}$ spermatozoa, the spermatozoon viability of cell population started to be negatively affected. The decrease of spermatozoon viability and intracellular ATP content reduces its capacity to successfully fertilize the oocyte or the normal development of embryo. Although relationships between these parameters have to be clarified, our results highlight the crucial role of intracellular ATP level in spermatozoon viability and fertilization capacity. Thus, the maintenance of a high level of intracellular ATP content during the movement phase of Pacific oyster spermatozoa is probably necessary to ensure the fertilization capacity of spermatozoa. To better understand relationships between intracellular ATP content, viability and fertilization capacity of spermatozoa, ATP changes related to cell death mechanisms of Pacific oyster spermatozoa have to be determined and could be explored using double staining with annexin V and PI, allowing the differentiation among early apoptotic, necrotic and viable cells. Finally, the variability of intracellular ATP content and viability of spermatozoa is suggested to be related to differences between males in the timing of maturation. The use of these parameters as potential predictors of spermatozoon maturity and fertilization capacity may be of interest.

Acknowledgements

The authors want to thank the technical team of Ifremer's facilities in Argenton. This work was partly supported by the European project Reproseed (FP7-KBBE-2009-3), co-coordinated by J-L Nicolas. M. Boulais was funded by Ifremer and by a doctoral grant from Région Bretagne.

References

Akcha, F., Spagnol, C., Rouxel, J., 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. Aquat. Toxicol. 106, 104–113. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.018

Boudry, P., Collet, B., Cornette, F., Hervouet, V., Bonhomme, F., 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. Aquaculture 204, 283–296. doi:10.1016/S0044-8486(01)00841-9

Buffone, M.G., Ijiri, T.W., Cao, W., Merdiushev, T., Aghajanian, H.K., Gerton, G.L., 2012. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. Mol. Reprod. Dev. 79, 4–18. doi:10.1002/mrd.21393

Christen, R., Schackmann, R., Dahlquist, F., Shapiro, B., 1983. 31P-NMR analysis of sea urchin sperm activation - Reversible formation of high energy phosphate compounds by changes in intracellular pH. Exp. Cell Res. 149, 289–294. doi:10.1016/0014-4827(83)90400-7

Christen, R., Schackmann, R., Shapiro, B., 1986. Ionic regulation of sea urchin sperm motility, metabolism and fertilizing capacity. J. Physiol.-Lond. 379, 347–365.

Cosson, J., 1996. A moving image of flagella: News and views on the mechanisms involved in axonemal beating. Cell Biol. Int. 20, 83–94. doi:10.1006/cbir.1996.0012

Demoy-Schneider, M., Schmitt, N., Suquet, M., Labbé, C., Boulais, M., Prokopchuk, G., Cosson, J., 2013. Biological characteristics of sperm in two oyster species: the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. In "Spermatozoa: Biology, Motility and Function and Chromosomal abnormalities", Chapter 2, Nova Science Publishers Inc., Brenda T. Erickson Editor, ISBN: 978-1-63, p. 15-74.

Eguchi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. Cancer Res. 57, 1835–1840.

Faure, C., 1996. Paramètres physiologiques de l'émission et de l'activation des gamètes mâles de deux mollusques bivalves: la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg). Thesis. University of Paris 7, France.

Franco, A., Jouaux, A., Mathieu, M., Sourdaine, P., Lelong, C., Kellner, K., Berthelin, C.H., 2010. Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. Cell Tissue Res. 340, 201–210. doi:10.1007/s00441-009-0923-6

Hirohashi, N., Lennarz, W., 1998. Sperm-egg binding in the sea urchin: A high level of intracellular ATP stabilizes sperm attachment to the egg receptor. Dev. Biol. 201, 270–279. doi:10.1006/dbio.1998.8984

Hylander, B., Summers, R., 1977. Ultrastructural analysis of gametes and early fertilization in 2 bivalves mollusks, *Chama macerophylla* and *Spisula solidissima* with special reference to gamete binding. Cell Tissue Res. 182, 469–489.

Koppers, A.J., Mitchell, L.A., Wang, P., Lin, M., Aitken, R.J., 2011. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. Biochem. J. 436, 687–698. doi:10.1042/BJ20110114

Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Haussinger, D., 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Physiol. Rev. 78, 247–306.

Le Goic, N., Hegaret, H., Fabioux, C., Miner, P., Suquet, M., Lambert, C., Soudant, P., 2013. Impact of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on Pacific oyster reproductive output: application of flow cytometry assays on spermatozoa. Aquat. Living Resour. 26, 221–228. doi:10.1051/alr/2013047

Levitan, D., Sewell, M., Chiang, F., 1991. Kinetics of fertilization in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: Interaction of gamete dilution, and contact time. Biol. Bull. 181, 371–378. doi:10.2307/1542357

Lewis, C., Galloway, T., 2009. Reproductive Consequences of Paternal Genotoxin Exposure in Marine Invertebrates. Environ. Sci. Technol. 43, 928–933. doi:10.1021/es802215d

Moy, G.W., Springer, S.A., Adams, S.L., Swanson, W.J., Vacquier, V.D., 2008. Extraordinary intraspecific diversity in oyster sperm bindin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 1993–1998. doi:10.1073/pnas.0711862105

Silva, P.F.N., Gadella, B.M., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology 65, 958–978. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.010

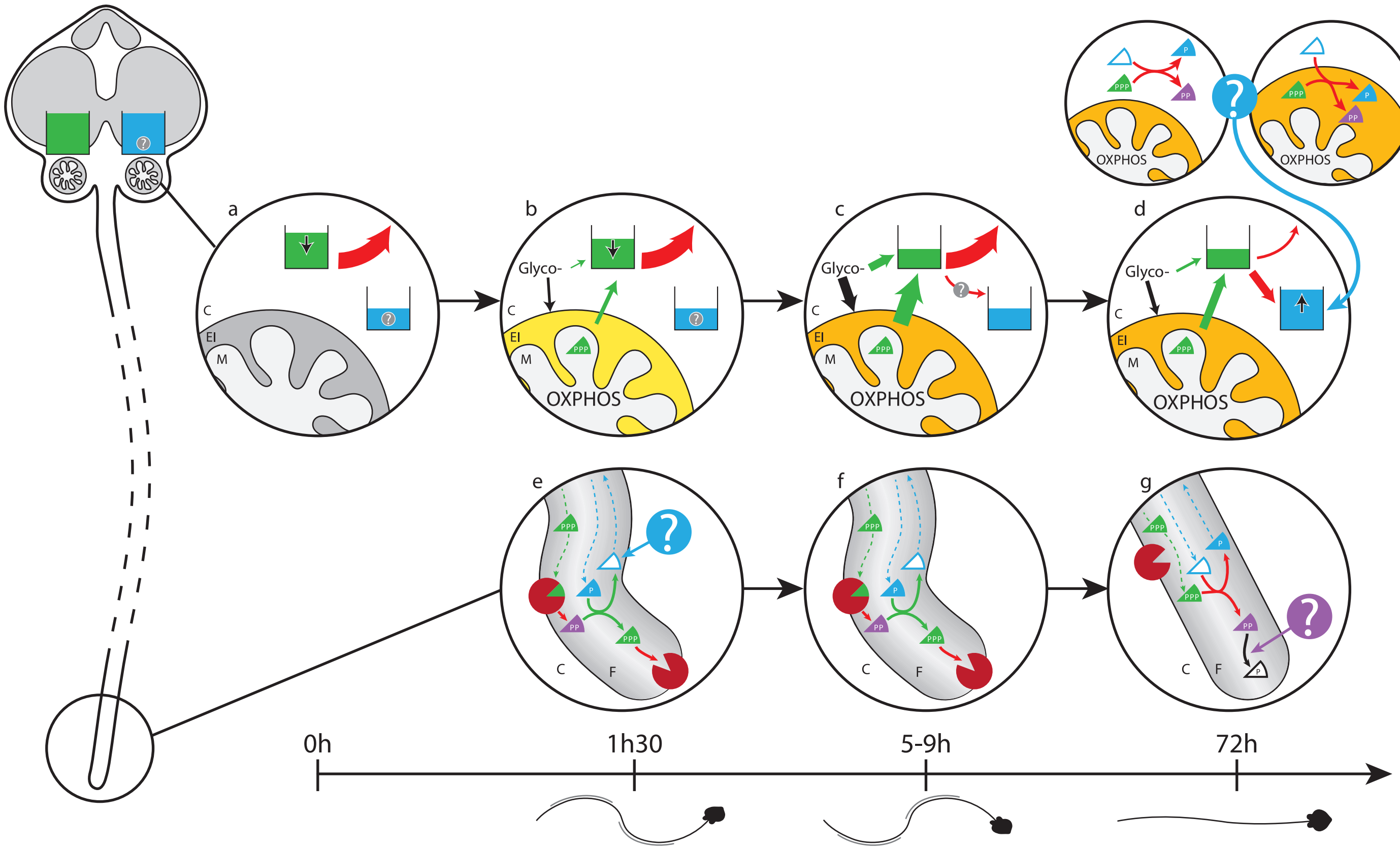
Song, Y.P., Suquet, M., Queau, I., Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. Aquaculture 287, 311–314. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018

Suquet, M., Labbe, C., Brizard, R., Donval, A., Le Coz, J.R., Quere, C., Haffray, P., 2010. Changes in motility, ATP content, morphology and fertilisation capacity during the movement phase of tetraploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. Theriogenology 74, 111–117. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.01.021

Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology 67, 661–672. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.10.003

Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., Vilella, S., 2004. Adenosine triphosphate concentration and beta-D-glucuronidase activity as indicators of sea bass semen quality. Biol. Reprod. 70, 1679–1684. doi:10.1095/biolreprod.103.027177

Représentation schématique des mécanismes biochimiques possibles soutenant le mouvement des spermatozoïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas*



C : cytoplasme
EI : espace inter-membranaire
M : matrice
F : flagelle

Glyco- : glycolyse
OXPHOS : phosphorylation oxydative
: synthèse d'ATP
: dégradation d'ATP
} l'épaisseur du trait représente le flux
: potentiel membranaire mitochondrial

: pool d'ATP
: pool de phosphoarginine
: évolution du stock

PPP : ATP
PP : ADP
P : AMP

P : phosphoarginine
: arginine
: dynéine-ATPase

Discussion générale et perspectives

Les travaux menés dans le cadre de cette étude ont permis de mettre en évidence une **durée de mouvement du spermatozoïde d'huître creuse allant jusqu'à 72 heures** post activation dans l'eau de mer (chapitre 3). Une telle durée de la phase de nage n'a pas été observée auparavant chez cette espèce ni chez une espèce d'invertébrés marins à fécondation externe, étudiée jusqu'à ce jour (Introduction, chapitre 1). A l'inverse, la vitesse moyenne de déplacement du spermatozoïde est la plus faible observée chez les bivalves (chapitre 1). Ces caractéristiques de mouvement sont permises par le maintien d'**un contenu intracellulaire en ATP élevé** (75% de la valeur mesurée à 1h30 post activation), **mesuré jusqu'à la fin de la phase de mouvement** (chapitres 1 et 3). Les travaux réalisés au cours de cette étude ont permis de mettre en évidence une modification du contenu intracellulaire en ATP et de l'activité mitochondriale au cours des premières heures de mouvement du spermatozoïde d'huître creuse : **le contenu intracellulaire en ATP est partiellement hydrolysé, stimulant la production d'ATP par la phosphorylation oxydative** (OXPHOS) (chapitre 1, figure 18 : a, b, e). La stimulation progressive d'OXPHOS permet de limiter la diminution du contenu intracellulaire en ATP**, autorisant le maintien d'un niveau d'ATP intracellulaire élevé et constant jusqu'à l'arrêt du mouvement** du spermatozoïde (75% de la valeur mesurée à 1h30 post activation) (Figure 18 : c, d, f, g). Une fois OXPHOS stimulée, **les niveaux d'ADP et Pi intracellulaires sont également maintenus constants**, permettant le fonctionnement optimal des dynéine-ATPases à l'origine du battement flagellaire (chapitres 3). La phosphoarginine pourrait être impliquée dans la régulation des contenus en ATP et ADP du spermatozoïde d'huître creuse mais cette hypothèse doit être confirmée (Figure 18 : c, d, f, g).

L'augmentation de la consommation en oxygène du spermatozoïde en présence de CCCP (chapitre 2) montre que **la respiration mitochondriale basale peut être augmentée jusqu'à être doublée**. Cette capacité ne se retrouve pas chez toutes les espèces : chez le turbot, la consommation en oxygène du spermatozoïde n'augmente pas en présence de FCCP. La capacité d'augmentation de la respiration mitochondriale basale pourrait **permettre au spermatozoïde d'huître creuse de faire face à une forte demande en énergie** en stimulant la production d'ATP par OXPHOS.

L'approche pharmacologique, réalisée à l'aide d'inhibiteurs d'OXPHOS, a permis de mettre en évidence la **capacité du spermatozoïde d'huître creuse à compenser efficacement, pendant une durée limitée d'une heure, l'inhibition de la synthèse d'ATP par OXPHOS** (chapitre 2). Le maintien du contenu intracellulaire en ATP pourrait être lié à la stimulation de la **glycolyse et/ou à la mobilisation du pool intracellulaire de phosphoarginine**, sans que ce mécanisme n'affecte la capacité de mouvement du spermatozoïde. La dynamique des métabolites intracellulaires en présence d'oligomycin permettrait de déterminer la contribution respective de la glycolyse et du pool de phosphoarginine lorsque la production mitochondriale d'ATP est bloquée. Le dosage de l'activité de certaines enzymes de la glycolyse pourrait également être envisagé. De plus, reproduire l'approche pharmacologique en utilisant une durée d'incubation supérieure à une heure permettrait d'apporter des informations sur la capacité de ces voies à compenser l'inhibition de la production mitochondriale d'ATP à plus long terme.

La nature des substrats endogènes utilisés pour la synthèse d'ATP n'a pas été identifiée au cours de ces travaux. Cependant, il a été montré que le spermatozoïde d'huître creuse **ne catabolise pas les lipides endogènes** au cours des 12 premières heures de la phase de mouvement (chapitre 3). Le métabolisme du spermatozoïde d'huître creuse se différencie donc de celui de l'oursin chez lequel le catabolisme des lipides est l'unique voie métabolique permettant la synthèse d'ATP. Il serait intéressant de déterminer l'existence de potentielles réserves en glycogène et en glucose et leurs contributions comme substrats énergétiques dans les spermatozoïdes d'huître creuse.

L'arrêt du mouvement du spermatozoïde d'huître creuse en raison de la **décroissance des vagues flagellaires, n'est pas lié à un changement des contenus intracellulaires en ATP, ADP et Pi** (chapitre 3, Figure 18 : c, d, f, g). Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude suggèrent que **d'autres facteurs sont impliqués dans le contrôle du mouvement du spermatozoïde, tels que des changements dans l'équilibre osmotique intracellulaire et/ou des lésions de la membrane plasmique**. Des mesures d'osmolarité interne et des changements morphologiques et structuraux du spermatozoïde au cours de la phase de nage permettraient d'éclaircir ces hypothèses. L'identification des phosphomonoesters (PME) et phosphodiesters (PDE), dont les concentrations diminuent en fin de la nage (chapitre 3), s'avère également nécessaire à la compréhension des mécanismes d'arrêt du mouvement et pourrait apporter des informations sur la nature des substrats catabolisés au cours de la phase du mouvement du spermatozoïde d'huître creuse. Le passage d'étalons de ces composés en ^{31}P-Résonance Magnétique Nucléaire (^{31}P-RMN) pourrait permettre leur identification. Dans un objectif de

compréhension des mécanismes d'arrêt du mouvement, le rôle du pH interne serait à étudier. Il a été montré que le **pH du milieu de dilution joue un rôle prépondérant sur la mobilité des spermatozoïdes** (Boulais *et al.*, 2014, poster en annexe 2). Ainsi, l'inactivation des spermatozoïdes dans la gonade serait liée à son pH acide (moyenne ± SD : pH 5.82 ± 0.48). La dilution des spermatozoïdes dans l'eau de mer (pH voisin de 8.0) induirait une alcalinisation du pH interne de ces cellules, permettant l'activation des dynein-ATPases, comme démontré chez l'oursin (Christen *et al.*, 1983). L'alcalinisation du spermatozoïde pourrait moduler les niveaux intracellulaires d'un second messager, l'AMP cyclique (AMPc ; Sanchez *et al.*, 2001), impliqué dans la régulation du mouvement via l'activation de la phosphorylation de protéines de l'axonème par la protéine kinase A (PKA). L'utilisation de marqueurs du pH interne, tel que le 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) (Ozkan et Mutharasan, 2002), devrait permettre la mise en évidence du rôle du pH dans la régulation du mouvement. Le rôle de l'AMPc peut être étudié à l'aide de produits pharmacologiques agissants sur les voies AMPc, tels que l'inhibiteur de l'AMPc phosphodiesterase IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine) ou H-89 (5-isoquinoline-sulfonamide), un inhibiteur de la PKA.

Les travaux réalisés au cours de cette étude ont permis de montrer **un lien entre le contenu intracellulaire en ATP et la viabilité du spermatozoïde** (chapitre 4). Il n'a pas été déterminé si un faible niveau d'ATP intracellulaire conduit à la mort cellulaire du spermatozoïde, ou inversement. **Le lien entre ces paramètres pourrait être interprété en terme de balance énergétique et être attribué au degré de maturité du spermatozoïde**. Un spermatozoïde immature n'aurait pas accumulé, avant dilution dans l'eau de mer, suffisamment d'ATP ou de substrats indispensables à l'alimentation en énergie des mécanismes intracellulaires assurant le fonctionnement du spermatozoïde. Un tel spermatozoïde n'aurait pas non plus la « maturité fonctionnelle » permettant de réguler le niveau intracellulaire en ATP. Afin d'éclaircir le lien entre contenu intracellulaire en ATP, viabilité et maturité du spermatozoïde, il serait intéressant d'étudier les mécanismes de mort cellulaire chez le spermatozoïde d'huître creuse à différents stades de maturité de ces cellules. La détection des spermatozoïdes en nécrose, en apoptose et viables pourrait être réalisée par marquage couplant l'annexine V et iodure de propidium (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit).

Un spermatozoïde viable avec un contenu élevé en ATP semble essentiel au processus de fécondation, incluant la réaction acrosomale, la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte et la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte (chapitre 4, Figure 19). Le lien entre ces paramètres reste à déterminer et nécessite, au préalable, la compréhension des liens entre contenu intracellulaire en ATP et viabilité du spermatozoïde. Il pourrait ensuite être envisagé de bloquer la synthèse d'ATP du spermatozoïde et d'évaluer sa capacité de fécondation en parallèle à la réduction du contenu intracellulaire en ATP. Ces travaux nécessiteraient des mises au point préalables et pourraient être réalisés par incubation des spermatozoïdes avec de l'oligomycin, bloquant ainsi la synthèse d'ATP par OXPHOS.

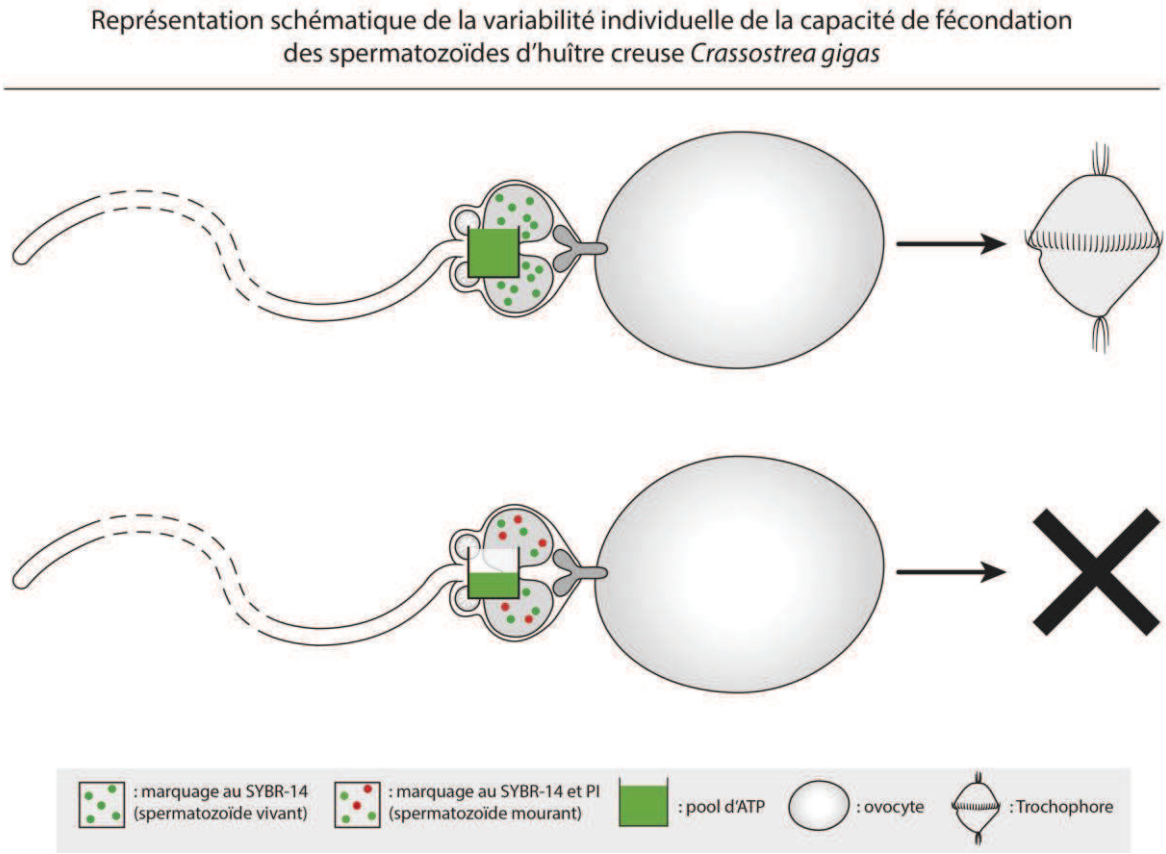


Figure 19 : Représentation schématique de la variabilité individuelle de la capacité de fécondation des spermatozoïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas*

L'accumulation de phosphoarginine observée à la fin de la phase de mouvement (Figure 18 : d et g) **pourrait également jouer un rôle dans le processus de fécondation**, permettant de libérer rapidement de l'ATP en cas de fort besoin en énergie. Néanmoins, cette hypothèse doit être confirmée. Des études complémentaires pourraient coupler des mesures de la capacité de fécondation et des contenus intracellulaires en phosphoarginine et en ATP, de l'induction de la réaction acrosomale du spermatozoïde d'huître creuse.

Les résultats acquis au cours de ce travail devront être confrontés aux conditions naturelles de ponte de l'espèce. L'effet de la densité ou de la dispersion des spermatozoïdes ainsi que d'autres facteurs comme la température ou la présence de courants sur le mouvement et le métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse devraient compléter ce travail.

Conclusion

L'objectif de cette thèse était (1) de confirmer les caractéristiques cellulaires et biochimiques du spermatozoïde d'huître creuse, (2) d'identifier les voies de synthèse d'ATP et leurs substrats et (3) de déterminer l'implication du métabolisme énergétique dans le succès à la fécondation du spermatozoïde de cette espèce. Très peu de données étaient disponibles sur ce sujet et les études réalisées avant le présent travail concernaient essentiellement la description du mouvement et du contenu intracellulaire en ATP du spermatozoïde au cours de la phase de mouvement.

Cette étude a permis de confirmer la durée de mouvement et le maintien d'un contenu intracellulaire en ATP élevé jusqu'à la fin de la phase de mouvement du spermatozoïde d'huître creuse. Le rôle de la phosphorylation oxydative dans la synthèse d'ATP du spermatozoïde de cette espèce a été mis en évidence. La production d'ATP par cette voie semble être régulée par les concentrations intracellulaires en ATP, ADP et Pi afin de maintenir une production constante et élevée d'ATP, assurant le fonctionnement des dynéines-ATPases. Le spermatozoïde d'huître creuse montre une très grande plasticité dans l'utilisation de ses voies de production d'énergie, assurant la synthèse d'ATP lorsque la mitochondrie n'est pas fonctionnelle, pour une période limitée à une heure dans notre étude. De plus, l'accumulation de métabolites phosphorylés à haut potentiel énergétique à la fin de la phase de mouvement ont révélé la capacité de stockage de l'ATP produit s'il n'est pas utilisé par les dynéines-ATPases. Le spermatozoïde d'huître creuse ne semble pas cataboliser les lipides endogènes au cours de la phase de mouvement et la nature des substrats endogènes utilisés pour la synthèse d'ATP reste à déterminer.

La capacité de régulation du métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse lui confère un probable fort potentiel d'adaptation dans un environnement potentiellement très variable (oxygène disponible, température…). Cette adaptation du métabolisme énergétique associée à la capacité du spermatozoïde à synthétiser de l'énergie tout au long de sa longue phase de nage pourraient constituer les éléments métaboliques favorisant la rencontre du spermatozoïde et de l'ovocyte, émis de façon synchrone dans l'environnement. Le métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse pourrait ainsi contribuer au succès du peuplement observé de cette espèce.

Le développement et la combinaison de techniques d'analyse telles que la mesure du potentiel de membrane mitochondriale, du contenu intracellulaire en ATP, des métabolites phosphorylés à haut potentiel énergétique, de la consommation en oxygène, de la viabilité et des caractéristiques du mouvement ont permis de réaliser une approche intégrative de la physiologie cellulaire et du métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse.

Cette étude procure les bases pour de futures recherches sur le métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse. Les connaissances et techniques développées au cours de ces travaux pourront être utilisées dans le but d'améliorer les protocoles de gestion des gamètes d'huître creuse tels que la cryopréservation. D'autre part, ces résultats pourront être appliqués dans le cadre d'études portant sur l'impact des changements environnementaux sur les capacités de reproduction de l'huître creuse.

Bibliographie

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1986. Biologie Moléculaire de la Cellule. Flammarion Médecine Sciences, Paris, 1146 p.

Amaral, A., Paiva, C., Baptista, M., Sousa, A.P., Ramalho-Santos, J., 2011. Exogenous glucose improves long-standing human sperm motility, viability, and mitochondrial function. Fertil. Steril. 96, 848–850. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.07.1091

Amemiya, I., 1929. On the sex-change of the Japanese common oyster, *Ostrea gigas* Thunberg. Proc. Imp. Acad. 5, 284-286.

Austin, C., Lutwakma, C., Mann, T., 1964. Spermatophores and spermatozoa of squid *Loligo pealii*. Proc. R. Soc. Ser. B-Biol. Sci. 161, 143+. doi:10.1098/rspb.1964.0085

Becker, T., Gebert, M., Pfanner, N., van der Laan, M., 2009. Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. Curr. Opin. Cell Biol. 21, 484–493. doi:10.1016/j.ceb.2009.04.002

Beis, I., Newsholme, E., 1975. Contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. Biochem. J. 152, 23–32.

Beninger, P.G., Le Pennec, M., 1991. Reproductive system. In: Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture (Ed.Shumway, S.E.), Elsevier Press, Amsterdam, pp. 177-223.

Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. Mar. Biotechnol. 2, 136–145.

Bessman, S., Carpenter, C., 1985. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. Annu. Rev. Biochem. 54, 831–862. doi:10.1146/annurev.biochem.54.1.831

Bessman, S., Geiger, P., 1981. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. Science 211, 448–452. doi:10.1126/science.6450446

Billard, R., 1969. Ultrastructure comparée de spermatozoïdes de quelques poissons téléostéens. In : Quaderno, 137, Ac. Naz. Dei Licei : “comparative spermatology”, Proceedings of the First Int. Symposium. 1-5 July, Rome, Siena, Baccetti B. (Ed), Academic Press, pp. 71-79.

Billard, R., Cosson, M.P., 1990. The energetics of fish sperm motility. In: Controls of sperm motility, biological and clinical aspects. C. Gagnon (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 153–173.

Blesbois, E., 2011. Gamètes et fécondation chez les oiseaux. INRA Prod. Anim., 24 (3), 259-272.

Boulais, M., Corporeau, C., Huvet, A., Bernard, I., Quéré, C., Quillien, V., Fabioux, C., Suquet, M. Assessment of oocyte quality in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Soumis à Aquaculture.

Briere, J.J., Favier, J., El Ghouzzi, V., Djouadi, F., Benit, P., Gimenez, A.P., Rustin, P., 2005. Succinate dehydrogenase deficiency in human. Cell. Mol. Life Sci. 62, 2317–2324. doi:10.1007/s00018-005-5237-6

Buffone, M.G., Ijiri, T.W., Cao, W., Merdiushev, T., Aghajanian, H.K., Gerton, G.L., 2012. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. Mol. Reprod. Dev. 79, 4–18. doi:10.1002/mrd.21393

Burke, R.D., 1983. The induction of metamorphosis of marine invertebrate larvae : stimulus and response. Can. J. Zool. 61, 1701-1719.

Buroker, N., 1983. Sexuality with respect to shell length and group size in the japanese oyster *Crassostrea gigas*. Malacologia 23, 271–279.

Chavez-Villalba, J.E., 2001 Conditionnement expérimental de l'huître *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 187 p.

Christen, R., Gatti, J., Billard, R., 1987. Trout sperm motility: the transsient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. Eur. J. Biochem. 166, 667–671. doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb13565.x

Christen, R., Schackmann, R., Shapiro, B., 1983. Metabolism of sea urchin: interrelationships between intracellular pH, ATPase activity and mitochondrial respiration. J. Biol. Chem. 258, 5392–5399.

Coleman, N., 1986. A review of introductions of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around the world and a discussion of the possible ecological consequences of introducing the species into Victoria, Australia. Marine Ressources Management Branch, Fisheries and Wildlife Service, Department of Conservation, Forests and Lands, Queescliff, Victoria, Australia, pp. 39.

Comps, M., 1978. Evolution des recherches et études récentes en pathologie des huîtres. Oceano. acta 1, 522-262.

Cosson, 1992. Les micromoteurs flagellaires. In Nanotechnologies et micromachines, annexe I, ed. Masson,129-142.

Cosson, J., Groison, A.-L., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C., Billard, R., 2008. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. Reproduction 136, 277–294. doi:10.1530/REP-07-0522

Cosson, J., Huitorel, P., Barsanti, L., Walne, P., Gualtieri, P., 2001. Flagellar movements and controlling apparatus in flagellates. Crit. Rev. Plant Sci. 20, 297–308. doi:10.1016/S0735-2689(01)80039-3

Danshina, P.V., Geyer, C.B., Dai, Q., Goulding, E.H., Willis, W.D., Kitto, G.B., McCarrey, J.R., Eddy, E.M., O'Brien, D.A., 2010. Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) Is Essential for Sperm Function and Male Fertility in Mice. Biol. Reprod. 82, 136–145. doi:10.1095/biolreprod.109.079699

Demoy-Schneider, M., Levêque, A., Schmitt, N., Pennec, M.L., Cosson, J., 2012. Motility activation and metabolism characteristics of spermatozoa of the black-lip-pearl oyster *Pinctada margaritifera* var: cumingii (Jameson, 1901). Theriogenology 77, 53–64. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.07.014

Demoy-Schneider, M., Schmitt, N., Suquet, M., Labbé, C., Boulais, M., Prokopchuk, G., Cosson, J., 2013. Biological characteristics of sperm in two oyster species: the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. In "Spermatozoa: Biology, Motility and Function and Chromosomal abnormalities", Chapter 2, Nova Science Publishers Inc., Brenda T. Erickson Editor, ISBN: 978-1-63, p. 15-74.

Devauchelle, N., Boussaid, B., Le Pennec, G., Salain, G., Dorange, G., 1998. Organization of the genital tract of the japanese oyster, *Crassostrea gigas*. International congress on invertebrate reproduction and development.

Dong, Q.X., Eudeline, B., Huang, C., Tiersch, T.R., 2005a. Standardization of photometric measurement of sperm concentration from diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquac. Res. 36, 86–93. doi:10.1111/j.1365-2109.2004.01188.x

Dong, Q.X., Huang, C.J., Tiersch, T.R., 2005b. Spermatozoal ultrastructure of diploid and tetraploid Pacific oysters. Aquaculture 249, 487–496. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.03.009

Dreanno, C., 1998. Régulation de la mobilité des spermatozoïdes de turbot (*Psetta maxima*) et de bar (*Dicentrarchus labrax*) : Etude du métabolisme énergétique, du contrôle ionique, de la morphologie et du pouvoir fécondant. Thesis, Univ., France.

Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M., Cibert, C., Fauvel, C., Dorange, G., Billard, R., 1999a. Effects of osmolality, morphology perturbations and intracellular nucleotide content during the movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 116, 113–125.

Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M., Seguin, F., Dorange, G., Billard, R., 1999b. Nucleotide content, oxydative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period. Mol. Reprod. Dev. 53, 230–243. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<230::AID-MRD12>3.0.CO;2-H

Eggleton, P., Eggleton, G.P., 1928. Further observations on phosphagen. J. Physiol.-Lond. 65, 15–24.

Ellington, W., 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. Annu. Rev. Physiol. 63, 289–325. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.289

Ellington, W., Kinsey, S., 1998. Functional and evolutionary implications of the distribution of phosphagens in primitive-type spermatozoa. Biol. Bull. 195, 264–272. doi:10.2307/1543138

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

Fabioux, C., 2004. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas* : Intérêt pour le contrôle de la reproduction en écloserie. Thèse, Univ. Bretagne Occidentale, France, 196p.

Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J., Minguant, C., Le Pennec, M., 2004. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 320, 592–598. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.009

Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. Aquaculture 250, 458–470. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.038

Faure, C., 1996. Paramètres physiologiques de l'émission et de l'activation des gamètes mâles de deux mollusques bivalves: la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg). Thesis. University of Paris 7, 255 p.

Ferramosca, A., Provenzano, S.P., Coppola, L., Zara, V., 2012. Mitochondrial Respiratory Efficiency is Positively Correlated With Human Sperm Motility. Urology 79, 809–814. doi:10.1016/j.urology.2011.12.042

Ford, W., 2006. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? Hum. Reprod. Update 12, 269–274. doi:10.1093/humupd/dmi053

Franzen, A., 1956. On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among Invertebrates. Zool. Bidr. Upps. 31, 355-482.

Galstoff, P., 1930. The role of chemical stimulation in the spawning reactions of *Ostrea virginica* and *Ostrea gigas*. Proc. Nat.Acad. Sci. 16, 555–559.

Galtsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica*. In: Fisheries bulletin, 480 pp.

Gardiner, D., 1978. Utilization of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes. Comp. Biochem. Physiol. -Physiol. 59, 165–168. doi:10.1016/0300-9629(78)90200-1

Geay, A., Bouquet A.L., 2009. Suivi du recrutement de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en Charente-maritime en 2009 : Rapport de synthèse. Rapport de contrat Creaa-SRC Poitou Charentes, 32 p + annexes. *http://www.creaa.fr/*

Gérard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launay, S., Heurtebise, C., Ledu, C., Phelipot, P., 1995. Contrôle de la gamétogenèse des huîtres creuses et plates. Relations « reproduction » et « génétique ». La Reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves

Cultivés en France. Rapport du groupe de travail. Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer, 99-112.

Gibbons, B., Baccetti, B., Gibbons, I., 1985. Live and reactivated motility in the 9 + 0 flagellum of Anguilla sperm. Cell Motil. Cytoskeleton 5, 333–350.

Gilbert, S.F., 1996. Biologie du développement. De Boeck Université, Paris, 892 pp.

Goulletquer, P., 1997. Natural reproduction cycle of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. La Reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves Cultivés en France. IFREMER, Nantes.

Guo, X.M., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K., 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. Evolution 52, 394–402. doi:10.2307/2411076

Grizel, H., Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). J. Cons. Explor. Mer. 47, 399-403.

Grizel, H., 1996. Quelques exemples d'introductions et de transferts de mollusques. Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties 15, 401-408.

Hanana, H., Simon, G., Kervarec, N., Mohammadou, S., B. A. and Cerantola., 2012. HRMAS NMR as a tool to study metabolic responses in heart clam *Ruditapes decussatus* exposed to Roundup (R). Talanta 97, 425–431. doi:10.1016/j.talanta.2012.04.057

Hecketsweiler, B., Hecketsweiler, P., 2012. Voyage en biochimie. Circuits en biochimie humaine, nutritionnelle et métabolique. 3ème édition. Elsevier SAS, 72 pp.

Hereng, T.H., Elgstoen, K.B.P., Cederkvist, F.H., Eide, L., Jahnsen, T., Skalhegg, B.S., Rosendal, K.R., 2011. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. Hum. Reprod. 26, 3249–3263. doi:10.1093/humrep/der317

Hess, R.A., 1999. Spermatogenesis, overview. In: *Encyclopedia of reproduction*, (Eds Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 539-545.

Holzbaur, E., Vallee, R., 1994. Dyneins: molecular structure and cellular function. Annu. Rev. Cell Biol. 10, 339–372. doi:10.1146/annurev.cb.10.110194.002011

Hutchings, J.A., Bishop, T.D., McGregor-Shaw, C.R., 1999. Spawning behaviour of Atlantic cod, *Gadus morhua*: evidence of mate competition and mate choice in a broadcast spawner. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56, 97-104.

Jacobus, W., 1985. Theorical support for the heart phosphocreatine energy transport shuttle based on the intracellular diffusion limited mobility of ADP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 1035–1041. doi:10.1016/0006-291X(85)91240-9

Jouin, C., 1978. Spermatozoïde non flagella et fecundation externe chez *Protodriloides symbioticus* (Giard) (Annélides Polychètes, Archiannélides). Vie et milieu, 28-29 (3), 473-478.

Kammermeier, H., 1987. Why do cells need phosphocreatine and a phosphocreatine shuttle. J. Mol. Cell. Cardiol. 19, 115–118. doi:10.1016/S0022-2828(87)80550-3

Kammermeier, H., 1993. Meaning of energetic parameters. Basic Res. Cardiol. 88, 380–384. doi:10.1007/BF00795405

Kamp, G., Busselmann, G., Lauterwein, J., 1996. Spermatozoa: Models for studying regulatory aspects of energy metabolism. Experientia 52, 487–494. doi:10.1007/BF01919321

Kamp, G., Englisch, H., Muller, R., Westhoff, D., Elsing, A., 1995. Comparison of the two different phosphagen systems in the lugworm *Arenicola marina*. J. Comp. Physiol. B - Biochem. Syst. Environ. Physiol. 165, 496–505.

Katkansky, S.C., Sparks, A.K., 1966. Seasonal sexual pattern in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Washington state. Fisheries Research Paers 2, 10 pp.

Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F., 1996. The Eastern oyster *Crassostrea virginica* Maryland Sea Grant College, Maryland, 733 pp.

Koike, K., 1985. Comparative ultrastructural studies on the spermatozoa of the Prosobranchia (Mollusca: Gastropoda). Sci. Rept. Fac. Educ. Gunma Univ. 34, 33-153.

Krzyzosiak, J., Molan, P., Vishwanath, R., 1999. Measurements of bovine sperm velocities under true anaerobic and aerobic conditions. Anim. Reprod. Sci. 55, 163–173. doi:10.1016/S0378-4320(99)00016-0

Lambert, C., Battaglia, D., 1993. Loss of the paternal mitochondrion during fertilization. Zoolog. Sci. 10, 31–37.

Lango-Reynoso, F., 1999. Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 139 pp.

Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Pennec, M., Hatt, P.J., 1999. Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest", France. Invertebr. Reprod. Dev. 36, 141–144. doi:10.1080/07924259.1999.9652690

Lango-Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., Cochard, J., Le Pennec, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 190, 183–199. doi:10.1016/S0044-8486(00)00392-6

Le Goïc, N., Hégaret, H., Boulais, M., Béguel, J.P., Lambert, C., Fabioux, C., Soudant, P., 2014. Flow cytometric assessment of morphology, viability, and production of reactive oxygen species of *Crassostrea gigas* oocytes. Application to Toxic dinoflagellate (*Alexandrium minutum*) exposure. Article first published online: 18 OCT 2014 | doi: 10.1002/cyto.a.22577.

Lessman, C., 1998. Oogenesis in nonmammalian vertebrates. In: Encyclopedia of Reproduction (Eds. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 498-508.

Lin, H.F., 1997. The Tao of stem cells in the germline. Annu. Rev. Genet. 31, 455–491. doi:10.1146/annurev.genet.31.1.455

Li, Q., Osada, M., Mori, K., 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. Fish. Sci. 66, 502–508. doi:10.1046/j.1444-2906.2000.00067.x

Lubet, P., 1991. Bases biologiques de la culture des mollusques. In : Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture (Ed. Barnabé, G.), Lavoisier, Tec&Doc, pp. 99-212.

Lubet, P., Mathieu, M., 1999. Applications à la conchyliculture des récentes acquisitions sur la biologie des mollusques bivalves. Année Biol. 38, 27-50.

Mainwood, G., Rakusan, K., 1982. A model for intracellular energy transport. Can. J. Physiol. Pharmacol. 60, 98–102.

Malakhov, V.V., Medvedeva, L.A., 1985. Embryonic development of giant oysters. Sov. J. Mar. Biol. 11, 39-45.

Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. J. Mar.Biol. Assoc. U.K. 59, 95-110.

Matsumoto, T., Nakamura, A.M., Mori, K., Kayano, T., 2003. Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Zoolog. Sci. 20, 37–42. doi:10.2108/zsj.20.37

Maurer, D., Auby, I., Barbier, C., Schirr Bonnans, I., Tournaire, MP., Rumèbe, M., Cantin, C., Debort H., Cariou, T., Navarro, R., Simonnet, B., Mayer, M., 2009. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon : Année 2009. RST/LER/AR/09-009, 47 p. http://www.ifremer.fr/delar/reprodhuitre.htm

Marteil, L., 1976. La conchyliculture française. Partie 2. Biologie de l'huître et de la moule. 194pp.

Miki, K., Qu, W., Goulding, E., Willis, W., Bunch, D., Strader, L., Perreault, S., Eddy, E., O'Brien, D., 2004. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 16501–16506. doi:10.1073/pnas.0407708101

Mita, M., Nakamura, M., 1993. Phosphatidylcholine is an endogenous substrate for energy metabolism in spermatozoa of sea urchins of the order Echinoidea. Zoolog. Sci. 10, 73–83.

Mita, M., Nakamura, M., 1998. Energy metabolism of sea urchin spermatozoa: An approach based on echinoid phylogeny. Zoolog. Sci. 15, 1–10. doi:10.2108/zsj.15.1

Mita, M., Oguchi, A., Kikuyama, S., Desantis, R., Nakamura, M., 1994. Ultrastructural study of endogenous energy substrates in spermatozoa of the sea urchin urchins *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*. Zoolog. Sci. 11, 701–705.

Mitchell, D., 1994. Cell and molecular biology of flagellar dyneins. Int. Rev. Cytol. - Surv. Cell Biol. Vol 155 155, 141–180.

Mohri, H., 1957. Endogenous substrates of respiration in sea-urchin spermatozoa. J. Fac. Sci. Tokyo Univ. IV. 8, 51-63.

Odet, F., Duan, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Kung, A., Eddy, E.M., Goldberg, E., 2008. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (Ldhc) is required for male fertility. Biol. Reprod. 79, 26–34. doi:10.1095/biolreprod.108.068353

Ohtake, T., Mita, M., Fujiwara, A., Tazawa, E., Yasumasu, I., 1996. Degeneration of respiratory system in sea urchin spermatozoa during incubation in seawater for long duration. Zoolog. Sci. 13, 857–863. doi:10.2108/zsj.13.857

Orlenko, A., 1994. The acclimatization of giant oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia, Mytiliformes, Crassostreidae) and the principal stages of its introduction in the Black sea. Zool. Zhurnal 73, 51–54.

Ozkan, P., Mutharasan, R., 2002. A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-AM. Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj. 1572, 143–148. doi:10.1016/S0304-4165(02)00303-3

Paniagua-Chavez, C.G., Acosta Ruiz, M.J., 1995. Gonadal development of *Crassostrea gigas* in Bahia San Quintin, Baja California, Mexico. Ciencas Marinas 21, 225-242.

Perchec, G., Jeulin, C., Cosson, J., André, F., Billard, R., 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. J. Cell Sci. 108, 747–753.

Picton, H.M., Gosden, R.G., 1999. Oogenesis in mammals. In: Encyclopedia of reproduction, (Eds. Knobil, E., Neill, J.D.), Academic press, San Diego, pp. 489-497.

Pouvreau, S., Maurer, D., Auby, I., Soletchnik, P., Mille, D., Bernard, I., Bedier, E., 2008. Physilogical aspects of reproduction, nutrition and growth "Marine molluscs in a changing environment". http://archimer.ifremer.fr/

Prieur, D., 1971 Recherches bibliographiques sur le développement embryonnaire des mollusques bivalves, Mémoire de DEA d'Océanographie Biologique, Faculté des Sciences de Paris, 33 pp.

Ramalho-Santos, J., Varum, S., Amaral, S., Mota, P.C., Sousa, A.P., Amaral, A., 2009. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. Hum. Reprod. Update 15, 553–572. doi:10.1093/humupd/dmp016

Ramirez, M.E.V., Le Pennec, M., Dorange, G., Devauchelle, N., Nonnotte, G., 1999. Assessment of female gamete quality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Invertebr. Reprod. Dev. 36, 73–78. doi:10.1080/07924259.1999.9652680

Redondo-Müller, C., Cosson, J., Billard, R., 1991. In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. Mol. Reprod. Dev. 29, 259–270. doi:10.1002/mrd.1080290308

Rivière, G., 2011. Etude par RMN de la créatine kinase musculaire et d'un nouveau domaine de liaison à l'ubiquitine dans la protéine STAM2. Thèse, Univ. Lyon, France, 196 p.

Robin, Y., 1964. Biological distribution of guanidines and phosphagens in marine annelida and related phyla from californai with note on pluriphosphagens. Comp. Biochem. Physiol. 12, 347–&. doi:10.1016/0010-406X(64)90065-9

Robin, Y., 1974. Phosphagens and molecular evolution in worms. Biosystems 6, 49–56. doi:10.1016/0303-2647(74)90010-0

Robin, Y., Klotz, C., Guillou, Y., Benyamin, Y., 1975. Spermatozoa-specific isoenzyme of arginine kinase in sabellid worms. Biochemical and immunological comparison with muscle enzyme. Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol. 52, 387–392. doi:10.1016/0305-0491(75)90150-9

Robitaille, P., Mumford, K., Brown, G., 1987. 31P-Nuclear Magentic Resonance study of trout spermatozoa at rest, after motility, and during short term storage. Biochem. Cell Biol.-Biochim. Biol. Cell. 65, 474–485.

Rolfe, D.F.S., Brown, G.C., 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. Physiol. Rev. 77, 731–758.

Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., Garcia-Martin, L., Lopez, J., 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 155, 249–262. doi:10.1016/0022-0981(92)90066-J

Ruiz-Pesini, E., Diez-Sanchez, C., Lopez-Perez, M.J., Enriquez, J.A., 2007. The role of the mitochondrion in sperm function: Is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process?, in: Mitochondrion in the Germline and Early Development, Current Topics in Developmental Biology. Elsevier Academic Press Inc, 525 B STREET, SUITE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495 USA, pp. 3–19.

Ruiz-Pesini, E., Lapeña, A.-C., Díez-Sánchez, C., Pérez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Díaz, M., Urriés, A., Montoro, L., López-Pérez, M.J., Enríquez, J.A., 2000. Human mtDNA Haplogroups Associated with High or Reduced Spermatozoa Motility. Am. J. Hum. Genet. 67, 682 – 696. doi:http://dx.doi.org/10.1086/303040

Sanchez, D., Labarca, P., Darszon, A., 2001. Sea urchin sperm cation-selective channels directly modulated by cAMP. Febs Lett. 503, 111–115. doi:10.1016/S0014-5793(01)02713-2

Schon, E. A., Santra, S., Pallotti, F. and Girvin, M. E., 2001. "Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis". Semin Cell Dev Biol 12(6), 441-448.

Smith, P., Ozaki, H., Fujio, Y., 1986. No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. N. Z. J. Mar. Freshw. Res. 20, 569–574.

Steele, S., Mulcahy, M., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 79, 673–686. doi:10.1017/S0025315498000836

Stendardi, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Palumberi, D., Serafini, F., Ferramosca, A., Zara, V., 2011. Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. Int. J. Androl. 34, 247–255. doi:10.1111/j.1365-2605.2010.01078.x

Storey, B.T., 2008. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. Intern. J. Dev. Biol. 52, 427–437. doi:10.1387/ijdb.072522bs

Stoss, J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. Fish Physiol. 9, 305–350.

Summers, K., Gibbons, I., 1971. Adenosine Triphosphate-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 68, 3092–&. doi:10.1073/pnas.68.12.3092

Suquet, M., Labbe, C., Brizard, R., Donval, A., Le Coz, J.R., Quere, C., Haffray, P., 2010. Changes in motility, ATP content, morphology and fertilisation capacity during the movement phase of tetraploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. Theriogenology 74, 111–117. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.01.021

Suquet, M., Quere, C., Mingant, C., Lebrun, L., Ratiskol, D., Miner, P., Cosson, J., 2013. Effect of sampling location, release technique and time after activation on the movement characteristics of scallop (*Pecten maximus*) sperm. Aquat. Living Resour. 26, 215–220. doi:10.1051/alr/2013048

Tesarik, J., Testart, J., 1989. La féconation. La Recherche 213 (20), 1009-1030.

Tikunov, A.P., Johnson, C.B., Lee, M.K., Haakil and Stoskopf., Macdonald, J.M., 2010. Metabolomic Investigations of American Oysters Using H-1-NMR Spectroscopy. Mar. Drugs 8, 2578–2596. doi:10.3390/md8102578

Tombes, R., Brokaw, C., Shapiro, B., 1987. Creatine kinase-dependent energy transport in sea urchin spermatozoa-Flagellar wave attenuation and theorical analysis of high energy phosphate diffusion. Biophys. J. 52, 75–86.

Thomson, J.M., 1952. The acclimatization and growth of the Pacific oyster (*Gryphaea gigas*) in Australia. Aust. J. Mar. Freshwater. Res. 3, 64-73.

Thomson, J.M., 1958. The naturalization of the Pacific oyster in Australia. Aust. J. Mar. Freshwater. Res. 10, 144-149.

Turner, R., 2003. Tales from the tail: What do we really know about sperm motility? J. Androl. 24, 790–803.

Vallee, R., 1993. Molecular analysis of the microtubule motor dynein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 8769–8772. doi:10.1073/pnas.90.19.8769

Van Thoai, N., Robin, Y., 1969. Guanidine compounds and phosphagens. In Chemical Zoology, ed. MFlorkin, BT Scheer, pp. 163–203. New York: Academic. 548 pp.

Verdonk, N.H., Van den Biggelaar, J.A.M., 1983. Early development and the formation of the germ layers. In: *The Mollusca*. Development (Ed.N.H. Verdonk, J.A.M.V.d.B., Tompa, A.S.), Academic Press, New york, pp. 91-122.

Waller, T.R., 1981. Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linné. In: Contrib. Zool., Smithson, pp.70.

Williams, A., Ford, W., 2001. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. J. Androl. 22, 680–695.

Wishart, G., 1984. Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability. J. Reprod. Fertil. 71, 113–118.

Sites internet:

Site animal cell biology : http://animalcellbiology.wordpress.com/

Site cnc france : http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx

Site NIMPIS 2002 :
http://nrmonline.nrm.gov.au/?utf8=%E2%9C%93&search_field=all_fields&q=crassostrea+gigas

Annexes

Annexe 1

Dosage des lipides neutres et polaires au cours du mouvement du spermatozoïde d'huître creuse.

Matériel et méthodes

Le dosage des lipides des spermatozoïdes a été réalisé sur quatre individus matures (poids moyen ±SEM : 72.5±2.3g) récoltés au mois de septembre parmi des animaux issus d'élevage et maintenus dans la rade de Brest (site de la Pointe du château). Le sperme a été collecté par « stripping » individuel des mâles d'après la méthode décrite dans le chapitre 1. La concentration en spermatozoïdes des milieux d'incubation a été ajustée à 4.10^8 spermatozoïdes.mL^{-1} dans un volume final de 20 mL d'eau de mer stérile et du chloramphenicol (25 µg.mL^{-1}) a été ajouté afin d'éviter une prolifération bactérienne. Les spermatozoïdes ont été incubés à température ambiante (20°C) et échantillonnés à 5h et à 12h post activation dans l'eau de mer : pour chaque mâle 2.10^9 spermatozoïdes ont été collectés dans un tube en verre de 15 mL et centrifugés (20 minutes, 1500g, 4°C). Après élimination du surnageant, 5 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2:1 ; v:v) ont été ajoutés. Les tubes ont ensuite été passés au vortex et aux ultrasons (4 x 1 min, à température ambiante). 10 µL de butyle hydroxytoluène (BHT) à 1µg/µL ont été ajouté aux extraits lipidiques comme antioxydants. Ils ont ensuite été conservés sous atmosphère d'azote à -80°C.

Les différentes classes de lipides neutres et de lipides polaires ont été analysées séparément par HPTLC (High performance Thin layer chromatography) sur des plaques de verre (20x20 mm) imprégnées de silice 60 (Merck). Un lavage préliminaire de la plaque a été réalisé avec un mélange hexane / diéthyl éther (97:3, v/v) dans le cas des lipides neutres, et avec un mélange méthyl acétate / isopropanol / chloroforme / méthanol / KCl (0.25%) (10:10:10:4:3.6; v:v) dans le cas des lipides polaires, afin d'enlever les possibles impuretés. Les plaques ont ensuite été activées à 110°C pendant 30 minutes. Les extraits lipidiques ont été déposés (15 µL dans le cas des lipides neutres et 5 µL dans celui des lipides polaires) par un passeur automatique

(CAMAG). Un double développement a permis de séparer les lipides neutres. Lors de la première migration, un mélange hexane / diéthyl éther / acide acétique (20/5/0.5, v:v:v) a été utilisé et un mélange hexane / diéthyl éther (93/3, v:v) lors de la deuxième. Les lipides polaires ont eux été séparés après un seul développement, en utilisant, comme solvant d'élution, un mélange méthyl acétate / isopropanol / chloroforme / méthanol / KCl (0.25%) (10:10:10:4:3.6; v:v).

Après révélation par immersion des plaques dans une solution d'acide cuprique et d'acide phosphorique suivie d'un chauffage à 120°C pendant 20 minutes, les différentes classes de lipides neutres et de lipides polaires sont apparues sous forme de taches noires. Six classes de lipides neutres (alcools, acides gras libres, esters de stérols, éthers de glycérides, triglycérides et stérols libres) et sept classes de lipides polaires (phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, cardiolipide, céramide aminoéthylphosphonate et lysophosphatidylcholine) ont pu être séparées et identifiées par comparaison avec des standards. La quantification a été réalisée par étalonnage externe, par densitométrie, à l'aide d'un scanner réglé à 370 nm et du logiciel Wincats (CAMAG).

Résultats

Aucune différence dans le contenu en lipides neutres et polaires du spermatozoïde d'huître creuse n'a été mesurée entre 5h et 12h post activation dans l'eau de mer (Figure 20).

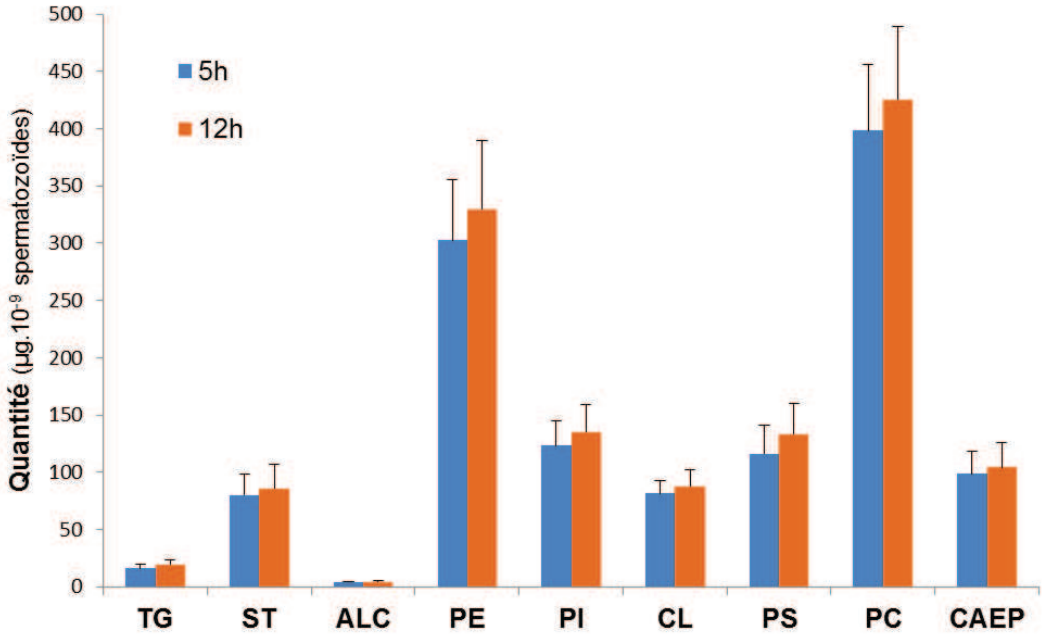


Figure 20 : Lipides neutres et polaires du spermatozoïde d'huître creuse mesurés entre 5h et 12h post activation dans l'eau de mer. TG : triglycéride, ST : stérols libres, ALC : alcools, PE : phosphatidylethanolamine, PI : phosphatidylinositol, CL: cardiolipide, PS: phosphatidylsérine, PC : phosphatidylcholine, CAEP : céramide aminoéthylphosphonate.

Annexe 2

Poster présenté au congrès Physiomar 14, La Serena, Chili, 3 au 6 novembre 2014.

Effect of pH on activation and movement regulation of sperm in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*).

[1]Ifremer, UMR 6539 Lemar, Station expérimentale d'Argenton, France.
[2]University of South Bohemia, Vodnany, Czech Republic.
msuquet@ifremer.fr

Ifremer

Myrina Boulais[1], Boris Dzyuba[2], Marc Suquet[1], M.E. Julie Arsenault-Pernet[1], Florent Malo[1], Sylvie Gros, Yanouck Epelboin[1], Jacky Cosson[2]

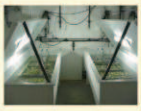
Introduction

* Pacific oyster sperm immotile in testes.
* Sperm swimming triggered when diluted in seawater
* Factor inducing sperm movement in Pacific oyster still non identified

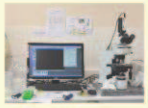
Aim of the study: effect of pH on the movement of
1) testicular sperm,
2) swimming sperm (already activated sperm).

Material & Methods

* Sperm sampled during natural spawning period of oysters (June to September).



* 2 types of sperm studied:
  - **Testicular sperm** (directly sampled in testes and immotile),
  - **Swimming** sperm (gonad stripped in seawater and movement already triggered for 10 minutes).



* Activating medium (AM):
  - SW 35‰, pluronic acid 1%
  - pH buffer: acetate (15mM) or Tris (20mM)
  - pH range: from 4.5 to 9.5 (adjusted).

* Sperm activation conditions:
  - **Testicular sperm:** 2µl sperm activated in 500µl AM, observation 1 and 5 minutes post activation.
  - **Swimming sperm**: after a 10min movement in SW, 2° activation in AM, observation 5 min post 2° activation.

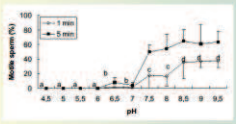
* For both sperm, % of motile sperm and swimming speed (VAP: Velocity of the Average Path) estimated on films using image J-CASA.

* Data: mean ± SD, statistiques: ANOVA+Fisher a posteriori test ($P<0.05$; n=5 males).

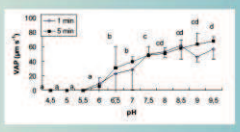
Acknowledgements
- Technical team of hatchery (Argenton/Ifremer)
- Reproseed (FP7-KBBE-2009-3)
- Aquaexcel (0014/02/09/24a)

Results

Testicular sperm:

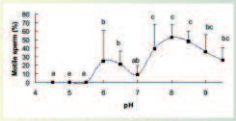


A significant increase of the % of motile sperm in relation with pH of AM.

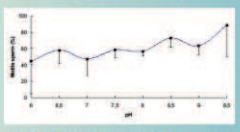


A significant increase of sperm swimming speed in relation with pH of AM.

Swimming sperm:



A significant increase of the % of motile sperm in relation with pH of AM.



No significant difference of VAP in relation with pH of AM.

Conclusions

* The movement of testicular Pacific oyster sperm is prevented by the relative acidity measured in testes : pH=5.82 ± 0.48.
* Higher values of pH trigger sperm movement when testicular sperm is transferred to seawater.
* Previously activated sperm (« swimming sperm ») is more tolerant to pH changes than testicular one (movement observed at pH <7, no changes observed on VAP).
* Further research: effect of salinity and presence of ions in activating medium.
* Activation of Pacific oyster sperm must be also studied at a group scale (spawning behaviour of Pacific oysters, sperm dilution at sea…).

Annexe 3

Liste des publications et participation aux congrès

Chapitre d'ouvrage :

Demoy-Schneider M, Schmitt N, Suquet M, Labbé C, Boulais M, Prokopchuk G, Cosson J. **Biological characteristics of sperm in two oyster species: the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and the black-lip pearl oyster, *Pinctada* margaritifera**. In "Spermatozoa: Biology, Motility and Function and Chromosomal abnormalities", Chapter 2, Nova Science Publishers Inc., Brenda T. Erickson Editor, ISBN: 978-1-63, p. 15-74.

Articles dans les revues à comité de lecture:

Boulais, M, Soudant, P, Le Goïc, N, Quéré, C, Boudry, P, Suquet, M. **Individual variability of cellular and biochemical characteristics of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa: involvement in fertilization success**. In Prep.

Boulais, M, Simon, G, Quéré, C, Suquet, M, Boudry, P, Soudant, P. **^{1}H and ^{31}P-Nuclear Magnetic Resonance analyses of metabolic changes of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa during the movement phase**. In Prep.

Boulais, M, Le Goïc, N, Suquet, M, Quéré, C, Boudry, P, Soudant, P. **Respective roles of glycolysis and oxidative phosphorylation in ATP production for spermatozoon motility in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.** In Prep.

Boulais, M, Soudant, P, Le Goïc, N, Quéré, C, Boudry, P, Suquet, M. **Changes of cellular, biochemical and movement parameters during the motility phase of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, spermatozoa.** In Prep.

Boulais M, Corporeau C, Huvet A, Bernard I, Quere C, Quillien V, Fabioux C, Suquet M. **Assessment of oocyte quality in Pacific oyster, *Crassostrea gigas***. Soumis à Aquaculture. IF: 2.009. En revision.

Le Goïc N, Hegaret H, **Boulais M**, Beguel JP, Lambert C, Fabioux C, Soudant P. **Flow cytometry to assess morphology, viability and production of oxygen reactive species of *Crassostrea gigas* oocytes. Application to toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* exposure**. Accepté dans Cytometry, Part A. IF: 3.711

Suquet M, Labbé C, Puyo S, Mingant C, Quittet B, **Boulais M**, Queau I, Ratiskol D, Diss B, Haffray P. **Survival, Growth and Reproduction of Cryopreserved Larvae from a Marine Invertebrate, the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*)**. PLoS One. 2014 Apr 2; 9(4):e93486. IF: 3.73. http://archimer.ifremer.fr/doc/00190/30092/28635.pdf

Corporeau C, Vanderplancke G, **Boulais M**, Suquet M, Quéré C, Boudry P, Huvet A, and Madec S. **Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas***. J Proteomics 2012 Oct 22;75(18):5554-63. IF: 4.088. http://archimer.ifremer.fr/doc/00098/20925/18534.pdf

M. Suquet, J. Cosson, A. Donval, C. Labbe, **M. Boulais**, P. Haffray, I. Bernard, C. Fauvel. **Marathon vs sprint racers: an adaptation of sperm characteristics to the reproductive strategy of Pacific oyster, turbot and seabass**. J. Appl. Ichthyol. 28 (2012), 956–960. IF : 0.902. http://archimer.ifremer.fr/doc/00111/22220/20059.pdf

Communications orales:

Demoy-Schneider, M., Schmitt, N., Suquet, M., Labbé, C., **Boulais, M**., Prokopchuk, G., Cosson, J. **Biological characteristics of sperm in two oyster species: the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*)**. Oral presentation at the congress "Aquaculture Europe", October 2014, Donostia-San Sebastian, Spain.

Sussarellu R, Soudant P, Lambert C, Fabioux C, Paul-Pont I, Corporeau C, Laot C, Le Goïc N, Quillien V, Hegaret H, Cassone AL, Arsenault-Pernet MEJ, **Boulais M**, Mingant C, Robbens J, Suquet M, Huvet A. **Experimental long term exposure of microplastics affects oyster reproduction**. Oral presentation at the congress "Physiomar", November 2014, La Serana, Chile.

Boulais M, Le Goïc N, Suquet M, Quéré C, Boudry P, Fauvel C, Soudant P. **The role of mitochondria in energy production for Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm motility**. Oral presentation at the congress of the "Society for Experimental Biology Annual Meeting 2014", July 2014, Manchester, England.

Boulais M, Le Goïc N, Suquet M, Quéré C, Boudry P, Fauvel C, Soudant P. **ATP as a key factor for Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm movement and fertilization capacity**. Oral presentation at the congress "National Shellfisheries Association", March 2014, Jacksonville, Florida.

Béguel JP, **Boulais M**, Mercier M, Lambert C, Huvet A, Soudant P, Le Goïc N, Dudognon T, Quillien V, Suquet M, Fabioux C. **Antioxidant protection of intra-gonadic and free gametes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas***. Oral presentation at the congress "National Shellfisheries Association", March 2014, Jacksonville, Florida.

Suquet M, Arsenault-Pernet MEJ, Le Goïc N, Soudant P, Mingant C, Sussarellu R, **Boulais M**, Epelboin Y, Huvet A. **Microplastics are love-killers for Pacific oysters!** Oral presentation at the congress "Fate and impact of microplastics in marine ecosystems", January 2014, Brest, France.

Boulais M, Le Goïc N, Suquet M, Quéré C, Boudry P, Fauvel C, Soudant P. **Biological and energetic characteristics of sperm of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to its fertilization capacity**. Oral presentation at the congress "Biology of Fish Gametes", September 2013, Faro, Portugal.

Suquet M, Labbé C, Puyo S, Quittet B, Mingant C, **Boulais M**, Queau I, Ratiskol D, Diss B, Haffray P. **Thawed Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae grow and reproduce at the same rate as fresh ones**. Oral presentation at the congress "Biology of Fish Gametes", September 2013, Faro, Portugal.

Suquet M, Quéré C, **Boulais M**, Mingant C, Lebrun L, Queau I. **Effects of maturation process and time *post* activation on sperm characteristics in scallop (*Pecten maximus*)**. Oral presentation at the congress "PHYSIOMAR12", September 2012, Santiago de Compostela, Spain.

Suquet M, **Boulais M**, Corporeau C, Huvet A, Quéré C, Bernard I. **Quality criteria of Pacific oyster oocytes**. Oral presentation at the congress "PHYSIOMAR10", November 2010, Quebec, Canada.

Posters:

Boulais M, Dzyuba B, Suquet M, Arsenault-Pernet EJ, Malo F, Boudry P, Epelboin Y, Cosson J. **Effect of pH on activation and movement regulation of sperm in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*).** Poster presentation at the congress "Physiomar", November 2014, La Serana, Chile.

Madec S, Vanderplancke G, **Boulais M**, Suquet M, Quéré C, Guévélou E, Huvet A, Boudry P, Corporeau C**. Proteomic identification of quality factors in the oocyte of Pacific oyster *Crassostrea gigas***. Poster presentation at the "European Protomic Association", Juillet 2012, Glasgow, United Kingdom.

Rimond F, **Boulais M**, Henaff F, Fauvel C, Wilson Leedy J, Cosson J, Robert R., Suquet M. **Image J casa: A tool to assess the swimming characteristics of various cell types**. Poster presentation at the "European Aquaculture Society", October 2010, Porto, Portugal, Special publication, pp. 1110-1111.

Métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse (*Crassostrea gigas*)

Résumé
Cette thèse présente une étude du métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Les principaux objectifs sont (1) d'établir la dynamique des caractéristiques cellulaires et biochimiques du spermatozoïde de cette espèce durant la phase de mouvement, (2) d'identifier les voies de synthèse d'ATP et leurs substrats et (3) de déterminer l'implication du métabolisme énergétique dans le succès à la fécondation du spermatozoïde de cette espèce. Les résultats de ce travail montrent la longue durée du mouvement (de 24 à 72h) du spermatozoïde d'huître creuse et le maintien d'une concentration élevée en ATP intracellulaire, jusqu'à la fin du mouvement. Le rôle de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) dans la synthèse d'ATP a été mis en évidence. Le spermatozoïde d'huître creuse montre une grande plasticité dans l'utilisation de ses voies de production d'énergie, assurant la synthèse d'ATP par d'autres voies qu'OXPHOS lorsque la mitochondrie est inhibée. L'accumulation de phosphoarginine en fin de mouvement montre une capacité de stockage de l'ATP synthétisé. La nature des substrats endogènes utilisés pour la synthèse d'ATP reste cependant à déterminer. La forte capacité de régulation du métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse, associée à la possibilité de synthétiser de l'énergie au cours de sa longue phase de nage, contribuent probablement au succès du peuplement observé chez cette espèce. Ce travail apporte une première description du métabolisme énergétique du spermatozoïde d'huître creuse, améliorant la connaissance fine de cette cellule.

Mots clés : *Crassostrea gigas*, Reproduction, Fécondation, Sperme, Analyse du mouvement, Métabolisme énergétique, RMN, Cytométrie en flux.

Energy metabolism of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa

Abstract
The present study aims at describing the energy metabolism of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, spermatozoon. The main objectives are: (1) describing the kinetic of cellular and biochemical characteristics of Pacific oyster spermatozoon during its movement phase, (2) identifying the metabolic pathways to produce energy and their substrates, (3) determining the involvement of energy metabolism in fertilization success. The results showed the long duration (ranging 24 to 72h) of the movement of Pacific oyster spermatozoon and the maintenance of a high intracellular ATP content until the end of the movement phase. The role of oxidative phosphorylation (OXPHOS) in ATP production was highlighted. Alternative ATP producing pathways might contribute to sustain energy production when OXPHOS is impaired, showing the high adaptation capacity of Pacific oyster spermatozoa. An increase of phosphoarginine content observed at the end of the movement phase suggests energy storage capacity. Endogenous substrates involved in ATP synthesis must be determined. Both the high regulation capacity of the energy metabolism of Pacific oyster spermatozoa and their ability to restore energy stores catabolized during movement likely contribute to the successful settlement observed in the wild. In conclusion, this work provided a fine description of energetic metabolism of Pacific oyster spermatozoon.

Key-words: *Crassostrea gigas*, Reproduction, Fertilization, Sperm, Movement analysis, Energetic metabolism, NMR, Flow cytometry.