



université de bretagne
occidentale



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

Éric GUÉVÉLOU

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

Étude fonctionnelle de l'AMP-activated protein kinase chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Thèse soutenue le 19 décembre 2012

devant le jury composé de :

Fabienne FOUFELLE

Directrice de Recherche, UMRS 872 Inserm/
rapporteur

Pascal FAVREL

Professeur des Universités, Université de Caen Basse-Normandie /
rapporteur

Julia MORALES

Chargée de Recherche, UMR 7150 CNRS/UPMC /
examineur

Marc BLONDEL

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier,
Université de Bretagne Occidentale /
examineur

Vianney PICHEREAU

Professeur des Universités, Université de Bretagne Occidentale /
examineur

Charlotte CORPOREAU

Directrice de Recherche, Ifremer /
encadrant scientifique

Arnaud HUVET

Directeur de Recherche, Ifremer /
directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

École Doctorale Sciences de la Mer

Mention : Biologie marine

**Étude fonctionnelle de
l'AMP-activated protein kinase
chez l'huître creuse
*Crassostrea gigas***

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

Département Ressources Biologiques et Environnement

Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins

UMR 6539 LEMAR

Technopole Brest-Iroise

29280 Plouzané, France

Éric GUÉVÉLOU

19 décembre 2012



Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Département de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins et au Laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins de l'IFREMER Brest. Je remercie chaleureusement Chantal Cahu et Pierre Boudry pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe de recherche.

Je remercie la région Bretagne et l'Ifremer pour avoir financé mes trois années de thèse. Merci à l'Europôle Mer et la Région Bretagne de m'avoir aidé à financer mon congrès et mon projet de recherche en Australie. Je remercie l'École doctorale des Sciences de la Mer, Christophe Hémon, Fred Jean et Elisabeth Bondu pour leur aide.

J'exprime toute ma gratitude à Fabienne Foufelle et Pascal Favrel qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier Julia Morales, Marc Blondel ainsi que Vianney Pichereau pour leur participation à ce jury.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse pour leurs disponibilités et leurs précieux conseils. Merci donc à Joëlle Dupont, Didier Flament, Vianney Pichereau et Pierre Boudry pour avoir fait partie de ces comités de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement mes encadrants, mes « parents scientifiques » pour avoir assuré de concert la direction et l'encadrement scientifique de cette thèse. Merci à vous d'avoir toujours été là pour m'encadrer, me conseiller. Ces attentions m'ont permis de gagner en maturité (pas uniquement scientifique). Merci à la « féminine/iste » Charlotte Corporeau pour sa générosité, sa simplicité et sa spontanéité ! Merci au « commandant de bord » Arnaud Huvet, pour sa rigueur, sa précision, et son réalisme. Merci à vous de m'avoir ouvert les portes de l'IFREMER ainsi que du LEMAR et de m'avoir fait confiance au cours de ces années. Travailler à vos côtés a été pour moi un réel plaisir personnel et professionnel. Une pensée pour Zélie Corporeau et Naig Huvet qui sont nées au cours de ces quatre années.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de cette thèse (pardon à ceux que j'ai pu oublier).

Un grand merci à Émilie Baugin (alias Ayrton Senna), ma stagiaire préférée, j'ai passé de très bons moments à travailler avec toi. Merci d'avoir tant chanté avec moi les chansons de Chérie FM (Daniel Balavoine) sur le trajet d'Argenton. Je te souhaite plein de réussite et plein de bonheur !

Je remercie Véronique Loiseau, Dominique Iliou et Yvette Lemonnier pour m'avoir toujours accueilli dans votre bureau avec le sourire et pour avoir été là pour m'aider dans les tâches administratives. Merci à Claudie Quéré, Jean-Yves Daniel et Virgile Quillien pour leur aide et leur grand professionnalisme. Travailler et discuter avec vous a été un grand plaisir. Je tiens à remercier Stéphanie Madec, Philippe Miner, Catherine Séguineau et Fabrice Pernet pour avoir toujours été disponible pour m'aider quand j'en avais besoin. Merci aussi à Caroline Fabioux, Philippe Soudant, Doudou Kraffe, Vianney Pichereau pour leurs conseils et leur disponibilité.

Au niveau de la station d'Argenton, je tiens à remercier Isabelle Quéau, désolé de ne pas avoir trouvé de carte plus olé-olé d'Australie, mais bon les kangourous je trouve ça un peu olé-olé. Un grand merci à Christian Mingant (mon futur beau-père) et Luc Le Brun (Santiags forever !) pour leur aide précieuse et leur humour. Venir travailler à Argenton avec vous devenait une partie de plaisir ! Je tiens aussi à remercier aussi Marianne Alunno-Bruscia, Marc Suquet (Professeur Tournesol), Stéphane Pouvreau et René Robert.

Merci à Elodie Fleury, j'espère que j'ai su prolonger « l'héritage » et que tu es moins jalouse de moi maintenant ;) . Merci à Rossana Sussarellu « l'italiana » pour ton aide tout au long de ma thèse et ce depuis ma première semaine de stage de master 2. Merci de m'avoir appris à ouvrir les huîtres à « l'italienne » et de m'avoir initié aux techniques de dissection en condition azote, tard au cours d'une soirée d'hiver dans une salle mal éclairée de l'UBO... Merci à Magali Hervy pour nos longues discussions passionnantes ! Les sessions goûter-philosophie du vendredi vont me manquer. Merci à Clarissa Galindo, Nolwenn Dheilley, Florian Geay, Julien Normand, Ismaël Bernard et Yoann Thomas pour leurs disponibilités et leurs aides précieuses sur de nombreux sujets (pas que scientifiques).

Merci à François Henaff « méchant diable », pour tes cours de cuisine normande, nos sorties et nos bonnes rigolades au Tara Inn au Cube tous les jours de la semaine jusqu'à des heures pas possibles. Merci pour le tour d'Irlande, magique. Bonne chance pour la suite ! Merci à Estelle Floc'h, Matthieu Dussauze, Nicolas Cadour, Florian Lelchat pour nos belles soirées de master et de thèse à me partager votre humour caustique et vos connaissances en particulier sur les guerres mondiales.

Merci à Sabine Azouri, aka « Nadine », pour sa joie et son partage culturel ! Merci de m'avoir fait voyager au Liban par la pensée. ;) . Je remercie Aditya Kersacodi-Watson, pour sa gentillesse et sa générosité. Merci de m'avoir fait goûter à ta cuisine Indo-Australo-Néo-Zélandaise : tes pizzas sont excellentes, d'ailleurs tu ne m'as toujours pas donné la recette. ;) . Merci Gwenallou Vanderplancke, pour ton dynamisme et ta bonne humeur inoxydable. Même dans un bar bondé, musique à fond et loin de toi, j'entendrai encore le son de ta voix ! ;) . Je

remercie Katia Asmani pour sa gentillesse et pour me faire partager un peu de la culture kabyle. Merci à Coraline « Pony Pony Run Run » Mercier pour nos soirées foot et discothèque mémorables ! Merci à Modibo Diallo pour sa gentillesse et pour m'avoir fait partager un peu de la vie malienne.

Merci à l'italiano Massimo Milan (Maaa tranquillo bichone, i compioni del mondo siamo noi !), pour ton accueil en Italie quasiment tous les étés. Je t'avais dit qu'on allait trouver le manoir le Prajou ! Facile ! Merci aussi aux italiens Serena Milan et Marianna Pauletto pour leur gentillesse.

Un énorme merci à Jean-Philippe Béguel, mon POTE, mon romain (SPQR, per sempre, fluctuat nec mergitur, cave canem, ...), pour avoir été là dans les bons et les mauvais moments. Merci pour New York City, sans toi j'aurais été « seul-tout ». Merci pour Ouessant et le saut en parachute de folie ! Merci de m'avoir aidé à m'intégrer au LEMAR. Merci pour tant d'autres choses ! Merci à Chloé Carpot d'avoir compris que tu ne faisais pas le poids face au Bichon et que PJ-Harvey m'aimait plus que toi ;) . Merci à mon filleul Rocky d'avoir montré ton affection en me bavant dessus toute une nuit. :P

Je remercie Kaarle Joonas Parikka, le Belgo-finlandais (va falloir que tu te décides un jour ça commence à devenir louche... J'dis ça, j'dis rien...). Merci pour les nombreux délires youtube : Belsunce breakdown, Zezinho Corrêa, c'est la fête dans mon slim, Djamalski, ... That's twinty nine baby ! Vivement le tour de Finlande avec toi ! Merci aussi à Nina Wauters, Pauline Vannier, Christian Beuvar, Julien Loussouarn (beau gosse) pour les moments passés avec vous !

Merci à Myrina Boulais « la Belette », ma sœur adoptive. Merci pour ton soutien de tous les instants, tes conseils avisés, ta bonne humeur et ta motivation permanente. J'ai énormément appris grâce à toi !

Merci à Tony Dudugnon, « le tigre le plus dark du Poitou ! », pour ta gentillesse et d'avoir rigolé à mes blagues même les moins bonnes... Merci à Romain Lavaud « le bourguignon » et Bastien Pablo, mon pompier préféré. Merci à Malwenn « hippie » Lassudrie. Merci à Sébastien Artigaud, le mec le plus « hipster » de Brest ! Merci à Cédric Le Bris pour ton humour ravageur, le « party » chez toi et pour avoir apprécié à sa juste valeur mes mollets musclés. Merci à Marcaurélio « Gayzou » Franzetti pour le guacamole toujours excellent. Merci à Morgana Tagliarolo, pour tes cours de cuisine italienne (ton rizotto est une tuerie), tes cours de salsa et bien d'autres choses. Merci à la confrérie « culturelle » 1-κ. Merci à Camille Lacroix « Quemille Leu Croics » on se connaissait avant de se connaître (sic !). Désolé d'avoir « nettoyé » ton bureau de Sydney, mais bon il était vraiment dégueulasse surtout le petit post-it... Merci à Mélanie Mercier, pour ta bonne humeur normande. Tu sais bien qu'après

Avranches, les gens sont... bizarres ;). Merci à Adeline Bidault « la M... » pour ta bonheur humeur et ton sourire. Merci à Mathias « à poil » Lama Lama. Merci à Mélanou Bunelou « la lionne » pour ton aide dans les moments difficiles. J'espère que tu arriveras à trouver ton équilibre et le bonheur.

Merci aux « australiens » de m'avoir accueilli et m'avoir fait découvrir ce beau pays si particulier. Merci à Ana Rubio de m'avoir accueilli et tant aider dans la ville tentaculaire de Sydney. Je me souviendrai toujours de ma première nuit à Sydney où des opossums ont décidé de faire une bataille rangée sur mon toit... Merci à Ika Paul-Pont pour les soirées passées ensemble. Je me rappellerai toujours de cette sortie magique en bateau dans la baie de Sydney ! Merci à Mattias Roth, c'était un plaisir de parler avec toi, merci de ta disponibilité. Merci à Adams Wilkins pour les balades et la plongée. Merci à David Raftos et à Sham Nair, c'était un plaisir de travailler avec vous. Merci à Rob Parker, dream team oyster rocks ! Merci aux "tasmaniens" Rob Direen et David Wu de m'avoir accueilli comme un membre de leur famille.

Merci à mes « vieux » amis, Audrey Laforest, Anne-Laure Lopin, Jean-Sébastien Boulc'h, Yohann Benard, Vincent Vigouroux et Christophe Le Vaillant pour avoir été à mes côtés depuis de si nombreuses années...

Merci à mes professeurs de collège et lycée Sainte-Anne Bruno Acquitter et Oliver Polard pour m'avoir transmis le goût de la biologie et de l'histoire. Vous êtes le commencement de mon aventure universitaire ! Merci à Pierre-Olivier de Franco de m'avoir soutenu et m'avoir montré comment réussir un doctorat. Merci de tes conseils et de ta patience.

Un remerciement tout particulier à Joana « djodjo » Teixeira de Sousa, « il est oùùù Myrtillooooo ». Merci de m'avoir tant soutenu et aidé lors des moments difficiles. Si cette période s'est si bien passée, c'est en grande partie grâce à toi. Obrigado ! Maintenant je compte sur toi pour m'apprendre le portugais, sans « camel facing ». Carrega Benfica !

Enfin un énorme merci à ma famille d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir tout le temps soutenu. Merci à Maryvonne Guévelou, Remy Guévelou, Isabelle Salou, Gaël Salou, Rozenn Salou mais aussi à Ganache, Dali et Maya.

Sommaire

Introduction générale	1
Introduction générale 1^{ère} partie : L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> .	2
I. Éléments de biologie générale	2
I.1. Répartition et taxonomie.....	2
I.2. Écologie	3
I.3. Anatomie.....	4
II. Reproduction	6
II.1. Hermaphrodisme	6
II.2. Développement de la gonade	6
II.3. Reproduction et phase larvaire	9
III. Contrôle général de l'énergie	10
III.1. Gestion des réserves	10
III.2. Régulation de l'énergie	10
Introduction générale 2^{ème} partie : L'AMP-activated protein kinase (AMPK).....	13
I. Régulation de la balance énergétique et découverte de l'AMPK.....	13
II. Structure de l'AMPK	14
II.1. AMPK : structure complexe et conservée	14
II.2. AMPK alpha	15
II.3. AMPK beta	16
II.4. AMPK gamma	18
II.5. Localisation et associations des sous-unités	19
II.6. Orthologues et AMPKs related kinases	20
III. Activation et modulation de l'AMPK	22
III.1. Activation.....	22
III.2. Modulation de l'activité.....	25

IV. Rôle de l'AMPK dans la régulation de l'énergie.....	30
IV.1. Mode d'action de l'AMPK.....	30
IV.2. Régulation centrale de l'énergie.....	30
IV.3. Régulation périphérique de l'énergie.....	32
IV.4. Régulation de la reproduction.....	37

Contexte et objectifs de thèse	44
---	-----------

Premier chapitre : Caractérisation des sous-unités α de l'AMPK chez <i>Crassostrea gigas</i> et régulation au cours de l'hypoxie	47
---	-----------

I. Contexte de l'étude.....	48
II. Synthèse	49
II.1. Plusieurs isoformes de la sous-unité α existent	49
II.2. Détection tissulaire des isoformes de la sous-unité α	50
II.3. Comportement des isoformes de la sous-unité α au cours de l'hypoxie.....	50
II.4. Conclusion de cette étude.....	50
III. Article 1 : « Regulation of truncated AMP-activated protein kinase α (AMPK α) in response to hypoxia in the muscle of Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> »	52

Deuxième chapitre : Caractérisation des sous-unités β et γ et régulation sexe-spécifique de l'AMPK	87
--	-----------

I. Contexte de l'étude.....	88
II. Synthèse	89
II.1. AMPK trimère	89
II.2. Mise au point de l'estimation de l'activité de l'AMPK.....	89
II.3. L'AMPK pendant la gamétogenèse.....	91
II.4. Conclusion de cette étude.....	92
III. Article 2 : « Sex-specific regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> »	94

Troisième chapitre : Analyse fonctionnelle de l'AMPK	133
I. Contexte de l'étude	134
II. Matériel et méthode	136
II.1. Matériel biologique.....	136
II.2. Conditionnement.....	136
II.3. Injections chroniques d'AICAR	137
II.4. Mesures biométriques et prélèvements.....	138
II.5. Broyage et extraction des protéines.....	139
II.6. Histologie semi-quantitative	139
II.7. Dosage de la phosphorylation Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK.....	141
II.8. Dosage de l'ATP, ADP et AMP par HPLC.....	141
II.9. Dosage du glycogène par colorimétrie.....	142
II.10. Analyses statistiques.....	142
III. Résultats	143
III.1. Survie	143
III.2. Poids des huîtres survivantes	144
III.3. Consommation algale	144
III.3. Analyses histologiques.....	145
III.4. Analyses biochimiques.....	146
III.5. Recherche de corrélations entre les différents paramètres étudiés.....	148
IV. Discussion	149
IV.1. Effet du jeune	149
IV.2. Effets de l'AICAR.....	150
V. Conclusions	155
Discussion générale et perspectives	157
I. Caractérisation du système AMPK chez <i>C. gigas</i>	159
I.1. Conservation des sous-unités.....	159
I.2. La voie de signalisation AMPK chez <i>C. gigas</i>	161
II. AMPK kinase fonctionnelle chez <i>C. gigas</i>	164
II.2. Distribution tissulaire des sous-unités.....	164
II.2. Structure du trimère	166
II.3. Estimation de l'activité de l'AMPK	167

III. Implication de l'AMPK dans la gestion de l'énergie.....	168
III.1. Rôle des sous-unités α tronquées.....	168
III.2. Phosphorylation du résidu Thr172 de la sous-unité α	169
III.3. Étude fonctionnelle par la privation de nourriture et l'AICAR	170
VI. Perspectives	173
VI.1. Études de protéomique à haut débit	173
VI.2. Étude de l'énergie au niveau central chez <i>C. gigas</i>	174
VI.3. Recherche de l'AMPK chez d'autres bivalves marins.....	175
 Bibliographie.....	 177

Répertoire des figures

- Figure 1 :** Première illustration scientifique de l'huître creuse (*Ostrea gigas*) par Thunberg publiée en 1793 dans Kongliga Vetenskaps Academiens. Légende originale : Tab. VI. Fig. 1. Description des deux coquilles vues de l'extérieur : a) coquille inférieure, b) coquille supérieure ; Fig. 2. Description des deux coquilles vues de l'intérieur a) coquille inférieure, b) coquille supérieure ; Fig. 3. Description d'une huître oblongue plus petite et plus jeune qui est enfermée dans ses deux coquilles. (Traduction : Madame Emere Lodewijks et Monsieur Kaarle Parikka)..... 2
- Figure 2 :** Bancs d'huîtres creuses sauvages situés dans l'estuaire de la rivière du Faou en rade de Brest, Finistère, France (Copyrights : Cochet-Environnement / Hélène Cochet 2010). 3
- Figure 3 :** Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en période de reproduction dans sa valve inférieure. Par ordre alphabétique : Bo. : bouche ; Br. : branchies ; Cc. : capuchon céphalique ; Cp. : cavité péricardique ; G. : gonade ; Gt. : gonoducte ; Lc. : ligament charnière ; M. : manteau ; Ml. : muscle lisse ; Ms. : Muscle strié ; Mv. : masse viscérale ; Pl. : palpes labiaux ; Te. : tentacules ; U. : umbo ; Vi. : valve inférieure (d'après illustration provenant de Normand 2009)..... 5
- Figure 4 :** Organisation des tubules gonadiques mâles et femelles de *Crassostrea gigas* pendant la gamétogenèse. Représentation schématique de la coupe transversale d'un tubule. GSC : cellule germinale souche (germal stem cell) (d'après illustration provenant de Fabioux 2004). 8
- Figure 5 :** Maturation gonadique chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Coupes histologiques transversales de gonades colorées à l'hématoxyline et à l'éosine représentant les stades de gamétogenèse de 0 à 3 et la lignée femelle et mâle (images Virgile Quillien, d'après l'illustration provenant de Normand 2009)..... 8
- Figure 6 :** Cycle de développement de *Crassostrea gigas* (d'après illustration provenant de Fabioux 2004). 9
- Figure 7 :** Illustration des domaines et principales phosphorylations couplés à la structure cristallographique de la sous-unité α de l'AMPK. 15
- Figure 8 :** Illustration des domaines et principales phosphorylations couplés à la structure cristallographique de la sous-unité β de l'AMPK. Par ordre alphabétique : CBM : carbohydrate-binding module - containing family 48 ; Ser : sérine ; Thr : thréonine (d'après illustrations provenant de Kemp et al., 2003). 17

Figure 9 : Illustration des différents domaines couplés à la structure cristallographique de la sous-unité γ de l'AMPK. AMP : adénosine monophosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; CBS : cystathionine- β -synthase (d'après illustrations provenant de Kemp et al., 2003).....	18
Figure 10 : Modèle 3D en « ruban » d'un hétérotrimère de l'AMPK appartenant à <i>S. pombe</i> . Les sous-unités α , β et γ sont représentées en jaune, bleu et vert respectivement. Une molécule d'AMP (modèle moléculaire CPK) liée au CBS est représentée. Le domaine kinase (KD : Kinase domaine) et le CBM (GBD) sont indiqués (d'après illustration provenant de Townley and Shapiro 2007).....	19
Figure 11 : Arbre phylogénique des kinases apparentées à l'AMPK (d'après illustration provenant de Manning et al., 2002).	21
Figure 12 : L'AMP active l'AMPK via quatre mécanismes distincts : (1) Activation allostérique de l'AMPK ; (2) Liaison de l'AMP à l'AMPK rendant le site catalytique (Thr172) moins accessible pour les protéines phosphatases (PP) ; (3) Liaison de l'AMP à l'AMPK rendant le site catalytique (Thr172) plus accessible aux AMPK kinases (AMPKK) ; (4) Activation allostérique des AMPKK. (d'après illustration provenant de Hardie et al., 1999).	22
Figure 13 : Représentation schématique de l'activation de l'AMPK par AMP. A : En absence d'AMP, le complexe existe principalement dans la conformation inactive. Les sous-unités α et γ n'interagissent pas ensemble directement (reliées indirectement par la sous-unité β). Dans cet état, la phosphorylation Thr172 et l'accès à des substrats par le domaine catalytique sont bloqués par le domaine d'auto-inhibition. B : Dans la conformation active, l'inhibition du domaine catalytique par le domaine d'auto-inhibition est levée. La liaison de l'AMP aux domaines CBS de la sous-unité γ provoque un changement conformationnel qui va permettre au site actif de phosphoryler ses cibles et empêcher les protéines phosphatases d'agir (d'après illustrations provenant de Cheung et al., 2000).....	23
Figure 14 : Hormones et cytokines qui activent (vert) ou inhibent (rouge) l'activité de l'AMPK dans plusieurs tissus centraux et périphériques. Par ordre alphabétique : GLP-1 : glucagon-like peptide 1 ; IL-6 : interleukine 6 (d'après illustration provenant de Lim et al., 2010). ..	27
Figure 15 : Entrée, dégradation et activation de l'AMPK par l'AICAR. Par ordre alphabétique : ADP : adénosine diphosphate ; AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléoside ; AMP : adénosine monophosphate kinase ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; ATP : adénosine triphosphate ; ZMP : zeatin riboside-5-monophosphate (d'après illustration provenant de Corton et al., 1995).....	28

Figure 16 : Régulation de l'activation de l'AMPK au niveau de l'hypothalamus. L'AMPK est activée dans des conditions de déficit en énergie soit par des signaux physiologiques ou physiopathologiques. Ces signaux peuvent soit augmenter l'AMP cellulaire et permettre l'activation de l'AMPK par LKB1, ou soit augmenter le niveau de Ca^{2+} intracellulaire et permettre l'activation de l'AMPK par CaMKK β . En revanche, les signaux de surplus d'énergie inhibent l'activation de l'AMPK et favorisent la déphosphorylation de l'AMPK. L'AMPK module de nombreuses cibles en les phosphorylant et permet de restaurer le pool d'ATP disponible. Par ordre alphabétique : α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone ; AMP : adénosine monophosphate ; Ca^{2+} : ion calcium ; CaMKK β : Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase β ; GLP1 : glucagon-like peptide 1; LKB1 : liver kinase B1. (d'après illustration provenant de Ramamurthy and Ronnett, 2012). 31

Figure 17 : Régulation du métabolisme lipidique par l'AMPK. Par ordre alphabétique : ACC : acétyl-CoA carboxylase ; AG : acide gras ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; AMPKK : AMP-activated protein kinase kinase ; ATP : adénosine triphosphate ; ChREBP : carbohydrate response element binding protein ; CPT1 : palmitoyltransferase carnitine ; FAS : fatty acid synthase ; FAT/CD36 : fatty acid translocase/Cluster of differentiation 36 ; G3-P : glycérol-3 phosphate ; HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA ; LHS : lipase hormonosensible ; MCD : malonyl-CoA décarboxylase ; MtGPAT : mitochondrial glycérol-3-acyl transférase ; PKA : protéine kinase A ; SREBP-1c : sterol regulatory element binding protein 1c ; TG : tryglycérides. 33

Figure 18 : Régulation du métabolisme glucidique par l'AMPK. Par ordre alphabétique : AKT : protéine kinase B ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; ATP : adénosine triphosphate ; F6-P : fructose-6-phosphate ; FoxO1 : forkhead box transcription factor O1 ; G6-P : glucose-6-phosphate ; GEF : GLUT4 enhancer factor ; GLUT : glucose transporter ; HNF4 α : hepatocyte nuclear factor 4 alpha ; MEF2 : myocyte enhancer factor 2 ; PEP : phosphoénolpyruvate ; PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase ; PFK-1 : phosphofructokinase-1 ; PFK-2 : phosphofructokinase-2 ; Pi3K : phosphatidylinositol 3-kinase ; TORC2 : transducer of regulated cyclic-AMP response element binding activator 2. 35

Figure 19 : Régulation de la synthèse protéique par l'AMPK. Par ordre alphabétique : AKT : protéine kinase B ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; CREM τ : cAMP-response element modulator- τ ; eEF2 : eukaryotic elongation factor 2 kinase ; eIF-4E : eukaryotic initiation factor 4E ; Era : récepteurs aux œstrogènes α ; GDP : guanosine diphosphate ; GTP : guanosine triphosphate ; mTOR : mammalian target of rapamycin ; rheb : homolog enriched in brain ; TSC : tuberous sclerosis complex ; SKAR : 6K1

Aly/REF-like substrate ; S6K1 : p70 ribosomal S6 kinase ; 4E-BP1 : elongation factor-4E binding protein1. 36

Figure 20 : Illustration de l'ovulation et du corps jaune chez les mammifères. Les composants où la présence de l'AMPK a été identifiée sont indiqués. 40

Figure 21 : Schéma du dispositif expérimental. Chaque condition est testée en duplicat de bac. 136

Figure 22 : Photographie du dispositif expérimental. Ici, six bacs de 30 individus, maintenus à jeun. 137

Figure 23 : Réalisation d'une injection dans la région du manteau-gonade. 138

Figure 24 : Schématisation du conditionnement. Les flèches indiquent les jours de prélèvements. Les encoches indiquent les différentes injections. 138

Figure 25 : Taux de survie après 52 jours d'expérimentation pour chacune des conditions. Les écarts-types obtenus entre les duplicats de bac sont indiqués par les barres d'erreur. L'astérisque (*) indique une différence significative. 143

Figure 26 : Masse fraîche des huîtres vivantes estimée après 52 jours de conditionnement. Les écarts-types obtenus entre les duplicats de bac sont indiqués par les barres d'erreur. 144

Figure 27 : Aire gonadique moyenne exprimée en pourcentage chez les huîtres à jeun, les huîtres nourries témoins et les huîtres nourries injectées dose 500. Les écarts-types obtenus entre les aires gonadiques des individus sont indiqués par les barres d'erreur. La lettre « n » désigne le nombre d'individus par condition. Les lettres romaines désignent les différences significatives indiquées par le test de rang multiple de Student-Newman-Keuls à 95 %... 146

Figure 28 : Quantification de la phosphorylation en Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK en unités relatives chez les huîtres à jeun, les huîtres nourries témoins et les huîtres nourries injectées dose 500 chez les huîtres à jeun, les huîtres nourries témoins et les huîtres nourries injectées dose 500. Les écarts-types obtenus entre les aires gonadiques des individus sont indiqués par les barres d'erreur. La lettre « n » désigne le nombre d'individus par condition. Les lettres romaines désignent les différences significatives indiquées par le test de rang multiple de Student-Newman-Keuls à 95 %..... 147

Figure 29 : Moyenne des concentrations en nucléotides exprimée en pmol par mg de poudre azotée. (A) Effet de l'injection d'AICAR chez des individus nourris. (B) Effet de la privation de nourriture. Les écarts-types sont représentés par les barres d'erreur. Les astérisques (*) indiquent une différence significative par rapport aux témoins. 148

Répertoire des tableaux

Tableau 1 : Mise en relation des sous-unités de l'AMPK caractérisées chez les mammifères et des orthologues présents chez la levure (<i>S. cerevisiae</i>) et la plante (<i>A. thaliana</i>) (d'après Polge and Thomas 2007).....	20
Tableau 2 : Description des phases de maturité gonadique chez les femelles <i>C. gigas</i> (d'après Steele and Mulcahy 1999).....	140
Tableau 3 : Description des phases de maturité gonadique chez les mâles <i>C. gigas</i> (d'après Steele and Mulcahy 1999).....	140
Tableau 4 : Consommation algale moyenne par condition exprimée en cellule/jour/huître.	144
Tableau 5 : Répartition des sexes et des stades de maturité (suivant l'échelle de Steele et Mulcahy, 1999) chez les huîtres nourries témoins, nourries injectées dose 500 et à jeun témoins. La lettre « n » désigne le nombre d'individus par condition.	145
Tableau 6 : Protéines présentant des homologies avec les exons 2, 3 et 4 de la sous-unité α de l'AMPK décrite chez <i>C. gigas</i>	164

Liste des principales abréviations utilisées

α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone
ACC : acétyl-CoA carboxylase
ADP : adénosine diphosphate
AG : acide gras
AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléoside
AKT : protéine kinase B
AMP adénosine monophosphate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
AMPK : AMP-activated protein kinase (symbole officiel HUGO : PRKA)
AMPKK : AMP-activated protein kinase kinase
AMPK-RK : AMPK related kinase
Ara : 9- β -D-arabinofuranosyladenine
ATP : adénosine triphosphate
BET : bromure d'éthidium
BRSK : brain-specific kinases
Ca²⁺ : ion calcium
CaMKK : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase
CBM : carbohydrate-binding module-containing family 48 (GBD)
CBS : cystathionine β -synthase
ChREBP : carbohydrate response element binding protein
CPK : modèle moléculaire de Corey, Pauling et Koltun
CPT1 : palmitoyltransferase carnitine
CREM τ : cAMP-response element modulator- τ
E1 : estrone
E2 : 17 β -œstradiol
E3 : estriol
eEF2 : eukaryotic elongation factor 2 kinase
EGCG : épigallocatechine gallate
eIF-4E : eukaryotic initiation factor 4E
ER α : récepteur aux œstrogènes α
ERK : extracellular signal-regulated kinase
ERO : espèce réactive de l'oxygène
EST : expressed sequence tag (marqueur de séquence exprimée)
F6-P : fructose-6-phosphate
FAS : fatty acid synthase
FAT/CD36 : fatty acid translocase/Cluster of differentiation 36

FoxO1 : forkhead box transcription factor O1
FSH : hormone folliculo-stimulante
G3-P : glycérol-3 phosphate
G6-P : glucose-6-phosphate
GBD : glycogen binding domain (CMB)
GDP : guanosine diphosphate
GEF : GLUT4 enhancer factor
GLP1 : glucagon-like peptide 1
GLUT : glucose transporter
GnRH : gonadotropin-releasing hormone
GPR54: G protein-coupled receptor 54
GSC : cellule germinale souche
GTP : guanosine triphosphate
GVBD : rupture de la vésicule germinative
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA
HNF4 α : hepatocyte nuclear factor 4 alpha
HUGO : human genome organisation
ILP : insuline-like peptide
IL-6 : interleukine 6
KD : kinase domain
KISS1 : kisspeptine 1
KSR2 : kinase suppressors of Ras 2
LH : hormone lutéinisante
LHS : lipase hormonosensible
LKB1 : liver kinase B1 (STK11)
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MAPKKK : mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MARK : microtubule affinity regulating kinase
MCD : malonyl-CoA décarboxylase
MEF2 : myocyte enhancer factor 2
MELK: maternal embryonic leucine zipper kinase
MO25 : scaffolding mouse protein 25
MtGPAT : mitochondrial glycérol-3-acyl transférase
mTOR : mammalian target of rapamycin
NPY : neuropeptide Y
NuaK : AMP-activated protein kinase family member 5
PEG : polyéthylène glycol
PEP : phosphoénolpyruvate
PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase

PFK-1 : phosphofructokinase-1
PFK-2 : phosphofructokinase-2
Pi3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PKA : protéine kinase A
PRKA : protein kinase A (abréviation HUGO de l'AMPK)
PTEN : phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome TEN
p450scc : p450 side chain cleavage
rheb : homolog enriched in brain
S6K1 : p70 ribosomal S6 kinase
Ser : sérine
SIK : salt-inducible kinase
SKAR : S6K1 Aly/REF-like substrate
SMAD : contraction de small body size et mothers against decapentaplegic
SNF : sucrose non fermenting
SnRK : SNF1-related kinases
SREBP-1c : sterol regulatory element binding protein 1c
StAR: steroidogenic acute regulatory protein
STK11 : sérine/thréonine kinase 11 (LKB1)
STRAD : STE20-related adaptor protein
TAK1 : transforming growth factor β (TGF- β)-activated kinase 1
TG : tryglycérides
TGF- β : transforming growth factor β
THC : delta-9-tétrahydrocannabinol
Thr : thréonine
TORC2 : transducer of regulated cyclic-AMP response element binding activator 2
TSC : tuberous sclerosis complex
TZD : thiazolidinediones
ZMP : zeatin riboside-5-monophosphate
2-DG : 2-deoxy-D-glucose
3 β HSD : 3 β -hydroxysteroid-deshydrogenase
³²P : phosphore 32
4E-BP1 : elongation factor-4E binding protein1

Introduction générale

Introduction générale 1^{ère} partie :

L'huître creuse *Crassostrea gigas*

I. Éléments de biologie générale

I.1. Répartition et taxonomie

L'huître creuse *Crassostrea gigas*, plus communément appelée en France « huître japonaise » ou « huître du Pacifique », a été pour la première fois scientifiquement décrite au cours du XVIII^e siècle lors d'un voyage au Japon par le botaniste et naturaliste suédois Carl Peter Thunberg (Thunberg, 1793) (Figure 1). *Crassostrea gigas* serait donc originaire des côtes nord est d'Asie et plusieurs vagues d'importations volontaires ou accidentelles ont disséminé l'espèce dans de nombreuses régions du monde. Cette espèce se retrouve aujourd'hui sur de nombreux littoraux, asiatiques (Chew, 1990; Thunberg, 1793), africains (Galil, 2000; Robinson et al., 2005; Shafee and Sabatie, 1986), américains (Buschmann et al., 1996; Mann et al., 1991; Nascimento, 1991; Orensanz et al., 2002; Pauley et al., 1988), océaniques (Dinamani, 1971; Thomson, 1952; Thomson, 1959) et européens (Grizel and Héral, 1991; Orlenko, 1994; Streftaris et al., 2005).

Crassostrea gigas est un mollusque bivalve de l'ordre des *Ostreoida*, de la famille des *Ostreoidae* et du genre *Crassostrea*. Selon le world register of marine species (WoRMS, marinespecies.org), plus de 20 espèces sont recensées comme appartenant au genre *Crassostrea*.

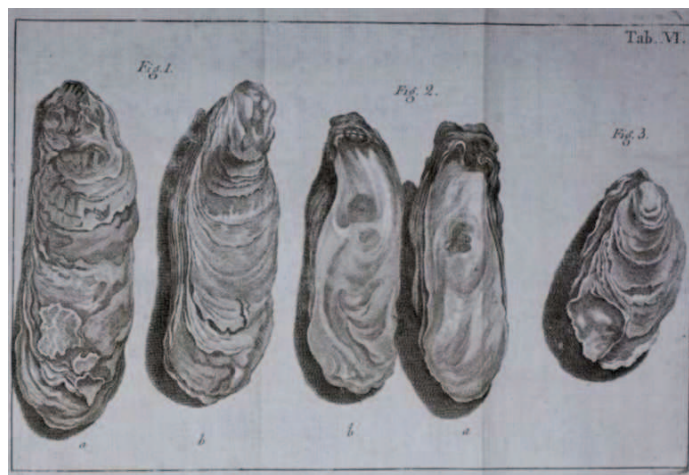


Figure 1 : Première illustration scientifique de l'huître creuse (*Ostrea gigas*) par Thunberg publiée en 1793 dans Kongliga Vetenskaps Akademiens. Légende originale : Tab. VI. Fig. 1. Description des deux coquilles vues de l'extérieur : a) coquille inférieure, b) coquille supérieure ; Fig. 2. Description des deux coquilles vues de l'intérieur a) coquille inférieure, b) coquille supérieure ; Fig. 3. Description d'une huître oblongue plus petite et plus jeune qui est enfermée dans ses deux coquilles. (Traduction : Madame Emere Lodewijks et Monsieur Kaarle Parikka).

I.2. Écologie

Le cycle de vie de *C. gigas* comprend une phase adulte benthique en zone littorale et une phase larvaire pélagique. La fécondation se produit dans la colonne d'eau après émission des gamètes. Cette fécondation et cette phase larvaire extérieures peuvent durer plusieurs semaines et permettent d'assurer un fort potentiel dispersif à cette espèce. Les huîtres juvéniles et les adultes sont des animaux sédentaires. L'huître adulte a été décrite comme pouvant vivre jusqu'à 40 ans en milieu tempéré avec une longévité corrélée positivement avec le degré de latitude géographique (Pauley et al., 1988). La fixation se produit sur des substrats meubles ou durs des zones intertidales, infralittorales ou estuariennes généralement dans des endroits abrités. Les récifs formés par des bancs naturels d'huîtres modifient considérablement l'écosystème par leur forte abondance et leur activité de filtration. Ces conditions offrent un nouveau type de substrat qui peut lui-même abriter d'autres espèces (Boudeau et al., 2004; Leff, 2003). Les récifs ainsi formés forment une véritable biocénose (Zhang et al., 2012b) pouvant abriter plusieurs communautés de poissons et d'invertébrés, principalement des crustacés (Ruas et al., 2012). Les huîtres filtrent d'importants volumes d'eau pour respirer et se nourrir, elles sont donc en interaction permanente avec leur environnement.

Par conséquent, la fixation définitive de l'huître expose cette espèce à une forte variabilité de leur environnement : variabilité temporelle (marée, saison), variabilité spatiale (position sur l'estran), modifications des paramètres physico-chimiques (température, salinité) et exposition à des agressions biotiques (parasitisme, prédation, ...) ou abiotiques (variations physicochimiques, pollutions anthropiques, ...). Cette grande variabilité des conditions externes module l'expression des fonctions physiologiques et se traduit à l'échelle phénotypique par une importante plasticité.



Figure 2 : Bancs d'huîtres creuses sauvages situés dans l'estuaire de la rivière du Faou en rade de Brest, Finistère, France (Copyrights : Cochet-Environnement / Hélène Cochet 2010).

I.3. Anatomie

L'anatomie de l'huître présente les caractéristiques des mollusques bivalves (Figure 3). Son corps mou est protégé par une coquille calcique à deux valves de formes irrégulières et asymétriques. Les valves sont généralement blanchâtres et présentent de nombreuses stries et tâches de couleur pourpre ou grise qui rayonnent à partir de l'umbo (U.) (Pauley et al., 1988). La valve inférieure creuse (Vi.) et la valve supérieure plus plane sont jointes par un ligament charnière (Lc.) et un muscle adducteur puissant (Kennedy, 1996). Le muscle adducteur, responsable de la fermeture des valves est composé de deux parties distinctes. Le muscle lisse (Ml.), le plus souvent de couleur blanche, est un muscle à action lente qui peut rester statique après contraction en maintenant une tension pendant plusieurs heures. Le muscle strié (Ms.), dont la couleur peut varier du jaune pâle au mauve translucide, est un muscle à action rapide possédant une activité plus phasique permettant la fermeture rapide de la coquille (Elliott and Bennett, 1982).

Le manteau (M.) est une membrane tégumentaire délimitant la cavité palléale. Il épouse la forme de chacune des valves sans y être directement attaché et entoure les autres organes internes de l'animal. La surface du manteau permet la croissance calcique des deux valves (Furuhashi et al., 2009; Quayle, 1969). Les deux lobes qui composent le manteau se rejoignent dans la partie postérieure au niveau de la charnière des deux valves formant un capuchon céphalique (Cc.). Ce dernier couvre l'entrée du système digestif, la bouche (Bo.) ainsi que les deux paires de palpes labiaux (Pl.).

Les branchies (Br.), dont la couleur varie le plus souvent entre le vert le bleu, s'étendent à partir de la bouche en suivant la forme du manteau jusqu'au muscle adducteur. Les branchies, suspendues dans la cavité palléale, sont composées de quatre feuillets finement lamellés qui, avec l'aide du manteau, peuvent créer un courant d'eau permanent. Ce dernier permet la possibilité d'assurer un apport en oxygène et en nutriments. Les branchies assurent le déplacement des particules alimentaires jusqu'au niveau des palpes labiaux et de la bouche (Kennedy, 1996).

La partie dorsale est occupée par la masse viscérale (Mv.) qui contient les principaux constituants de l'appareil digestif. La bouche (Bo.) est reliée à un estomac muni d'un stylet cristallin assurant le broyage et une première digestion. Les glandes digestives assurent une digestion intracellulaire dans l'intestin. Ce dernier débouche par un système excrétoire qui permet d'évacuer les fèces vers l'extérieur de la cavité palléale. En période de reproduction, la gonade (G.) se développe entre le manteau et la masse viscérale, en entourant cette dernière. La

gonade, organe transitoire, se prolonge par un gonoducte (Gt.) qui aboutit contre la partie latérale du muscle adducteur à l'intérieur de la cavité palléale.

Le système circulatoire des huîtres est partiellement clos. Il est composé de vaisseaux et de sinus cœlomiques. Le fluide circulant, appelé hémolymphe, passe dans ces vaisseaux fermés mais aussi dans les sinus semi-ouverts et dans tous les tissus en dehors des vaisseaux. Le cœur, composé d'un ventricule et de deux oreillettes est enfermé dans une cavité péricardique (Cp.) située entre la masse viscérale (Mv.) et le muscle adducteur.

Le système nerveux de l'huître est relativement simple et peu décrit dans la littérature. Il ne possède pas de centre de contrôle principal et est principalement constitué de ganglions. Deux ganglions viscéraux fusionnés sont situés à la jonction du muscle strié et du muscle lisse au niveau muscle adducteur et deux ganglions cérébroïdes sont localisés à la jointure des palpes labiaux. Plusieurs nerfs reliant les différents ganglions ont déjà été décrits chez *Crassostrea virginica* (Galtsoff, 1964). Les principaux organes sensitifs de *C. gigas* sont des tentacules (Te.) sensibles à la lumière et aux changements physico-chimiques situés le long du bord du manteau.

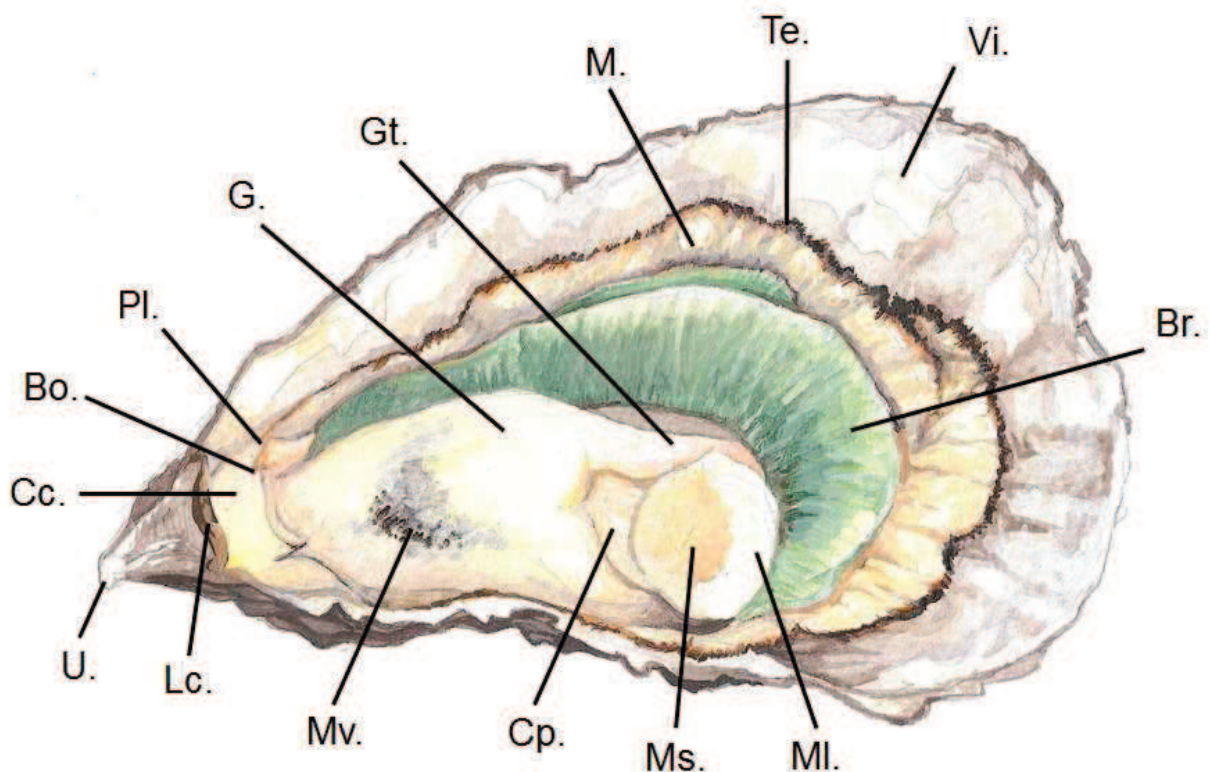


Figure 3 : Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en période de reproduction dans sa valve inférieure. Par ordre alphabétique : Bo. : bouche ; Br. : branchies ; Cc. : capuchon céphalique ; Cp. : cavité péricardique ; G. : gonade ; Gt. : gonoducte ; Lc. : ligament charnière ; M. : manteau ; Ml. : muscle lisse ; Ms. : Muscle strié ; Mv. : masse viscérale ; Pl. : palpes labiaux ; Te. : tentacules ; U. : umbo ; Vi. : valve inférieure (d'après illustration provenant de Normand 2009).

II. Reproduction

L'huître creuse *C. gigas* est un mollusque bivalve qui présente une fécondité très élevée (Pauley et al., 1988). Elle alloue près de 55 % de son budget énergétique annuel à la reproduction (van der Veer et al., 2006), et sa gonade quand elle est mature peut représenter plus de 60 % du volume de la masse viscérale (Fabioux et al., 2005). De plus, chez *C. gigas*, le premier développement gonadique a généralement lieu au cours de la première année (Pauley et al., 1988). De par ses caractéristiques, l'huître creuse constitue un excellent modèle pour étudier les mécanismes liés à la reproduction chez les invertébrés marins.

II.1. Hermaphrodisme

L'huître creuse est un mollusque hermaphrodite protandre de type alternatif irrégulier (Galtsoff, 1964; Katkansky and Sparks, 1966). *Crassostrea gigas* est généralement mâle lors de la première saison de reproduction et des changements de sexe ont été observés de façon alternative et irrégulière chez un même individu lors des autres saisons de reproduction (Guo et al., 1998; Pauley et al., 1988). L'orientation de son genre sexuel est mal connue et semble dépendre de l'action simple ou simultanée de facteurs environnementaux et génétiques (Guo et al., 1998; Naimi et al., 2009; Yusa, 2007). Une faible proportion d'individus morphologiquement hermaphrodites, pour lesquels des cellules germinales des deux sexes sont présentes simultanément dans la gonade, est généralement trouvée dans les populations (Lango-Reynoso, 1999).

II.2. Développement de la gonade

La gonade de l'huître a un développement particulier. En effet c'est un organe qualifié de transitoire et de diffus : transitoire car la gonade suit un cycle de développement et de résorption annuel, et diffus car elle ne forme pas un organe indépendant, mais se développe dans le tissu conjonctif entourant la masse viscérale à partir de cellules germinales souches (« germinal stem cells » ou GSC) (Fabioux, 2004; Normand, 2009). Le déroulement de la gamétogenèse a été fractionné en plusieurs grands stades (Berthelin et al., 2001; Steele and Mulcahy, 1999).

Pendant la période de repos sexuel (stade 0), la gonade n'est représentée que par quelques GSC disséminés au sein du tissu conjonctif en périphérie de la masse viscérale (Fabioux et al., 2004). Les GSC ont une grande capacité mitotique et elles forment une population cellulaire capable d'auto-renouvellement qui sert de source à la production de gamètes durant la vie sexuelle active des organismes (Lin, 1997). À partir de ces GSC se développent et se divisent intensément par mitose les premières cellules germinales différenciées appelées gonies

(ovogonies ou spermatogonies) (stade 1) (Figures 4 et 5). Les gonies sont des cellules de petite taille (6 µm de diamètre) composées d'un gros noyau et d'une fine couche de cytoplasme granuleux (Kennedy, 1996; Lango-Reynoso et al., 2000). Les gonies se différencient ensuite en cytes primaires (ovocytes ou spermatocytes) et entrent en méiose (stade 2). La maturité (stade 3) est caractérisée par la présence de gamètes (ovocytes matures ou spermatozoïdes) envahissant les tubules gonadiques. La gamétogenèse 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) (Figure 4).

Chez les mâles : les spermatocytes primaires poursuivent leur méiose et se différencient successivement en spermatocytes secondaires (spermatocytes II), en spermatides et en spermatozoïdes (1,5 à 3 µm de diamètre pour la tête) (Franco et al., 2008). La taille des cellules germinales mâles diminue au fur et à mesure de leur différenciation, leur noyau se condense et le cytoplasme devient quasiment inexistant (Kennedy, 1996) (Figures 4 et 5).

Chez les femelles : lorsque les ovogonies se différencient en ovocytes primaires (20 à 30 µm de diamètre), leur noyau s'agrandit et le cytoplasme devient plus dense et granuleux au fur et à mesure de la maturation (vitellogenèse), traduisant une accumulation d'ARN messagers, de protéines et de lipides (Kennedy, 1996; Li et al., 2000). Le développement des ovocytes chez *C. gigas* est supporté par les réserves, essentiellement du glycogène, contenues dans les cellules vésiculeuses du tissu conjonctif environnant et probablement par les cellules auxiliaires des ovocytes (Berthelin et al., 2000b; Matsumoto et al., 2003). Les ovocytes une fois remplis de vitellus atteignent la maturité (40 à 50 µm de diamètre) et se détachent de la paroi du tubule et deviennent libres au centre du tubule gonadique (Lango-Reynoso et al., 2000) (Figures 4 et 5). Les ovocytes émis lors de la ponte sont bloqués en prophase I de méiose. L'émission dans l'eau de mer, puis la fécondation déclenchent successivement la reprise de la méiose et la rupture de la vésicule germinative (« germinal vesicle break-down » ou GVBD), puis l'expulsion du premier globule polaire (Leclerc et al., 2000).

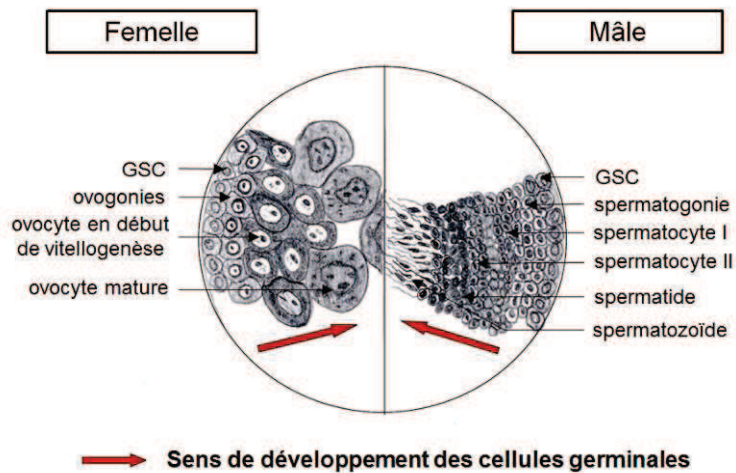


Figure 4 : Organisation des tubules gonadiques mâles et femelles de *Crassostrea gigas* pendant la gamétogenèse. Représentation schématique de la coupe transversale d'un tubule. GSC : cellule germinale souche (germinal stem cell) (d'après illustration provenant de Fabioux 2004).

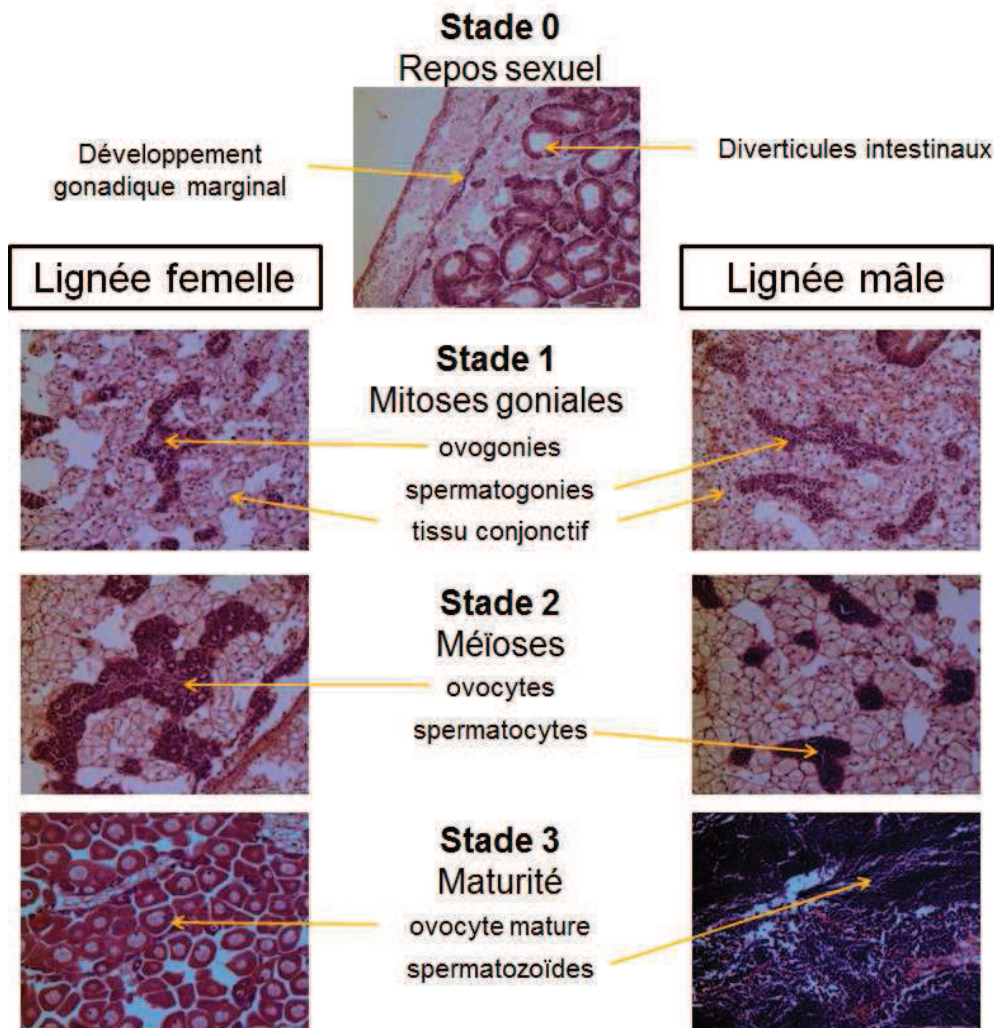


Figure 5 : Maturation gonadique chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Coupes histologiques transversales de gonades colorées à l'hématoxyline et à l'éosine représentant les stades de gamétogenèse de 0 à 3 et la lignée femelle et mâle (images Virgile Quillien, d'après l'illustration provenant de Normand 2009).

II.3. Reproduction et phase larvaire

L'huître creuse possède un mode de reproduction ovipare externe : les spermatozoïdes et ovocytes matures sont libérés dans l'eau de mer et la fécondation se déroule dans la colonne d'eau. Après fécondation, le développement de l'œuf passe progressivement par les stades morula, blastula, gastrula (environ 7 h après fécondation) jusqu'à atteindre le stade larve trochophore (environ 16 à 24 h après fécondation), caractérisé par une structure en forme de toupie et la présence des cils lui permettant de se mouvoir dans le milieu. À ce stade, les larves se nourrissent sur leurs réserves, principalement réalisées lors de la maturation des ovocytes. La larve développe ensuite une première coquille embryonnaire en forme caractéristique de D atteignant ainsi le stade de larve D (environ 24 à 48 h après fécondation). À partir de ce stade, la larve commence la captation du phytoplancton et donc ne dépend plus uniquement des réserves parentales pour assurer son développement. Le stade larve véligère (environ 7 à 14 jours après la fécondation) est marqué par l'apparition progressive d'un pied qui permet à la larve de se fixer et de réaliser une réorganisation complète appelée métamorphose. Une fois le stade larve métamorphosée atteint (environ 30 jours), la jeune huître développe alors toutes les caractéristiques de l'huître adulte en passant par le stade juvénile appelé naissain (Figure 6).

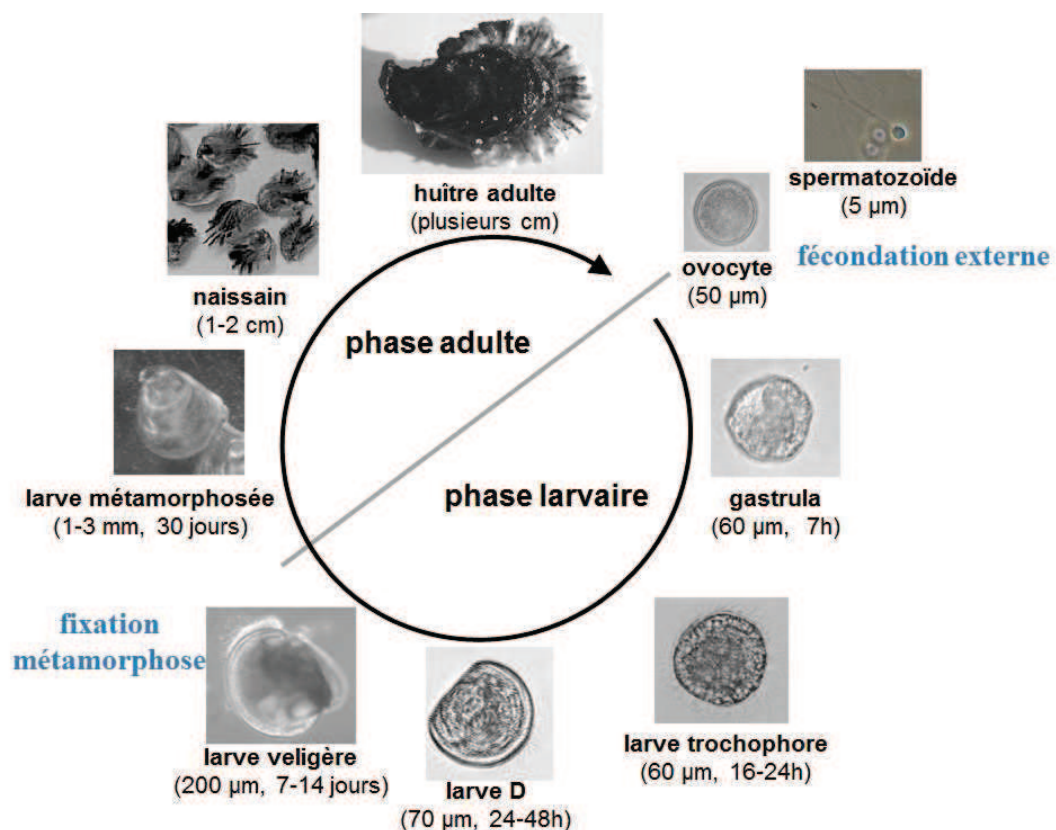


Figure 6 : Cycle de développement de *Crassostrea gigas* (d'après illustration provenant de Fabioux 2004).

III. Contrôle général de l'énergie

III.1. Gestion des réserves

Les mollusques marins vivant dans les eaux peu profondes et en zone tempérée présentent un cycle saisonnier marqué dans la synthèse, le stockage et l'utilisation des réserves énergétiques biochimiques (Berthelin et al., 2001; Kennedy, 1996). L'huître creuse adulte possède un mode de vie totalement sédentaire, l'accès à l'énergie via l'alimentation dépend donc des ressources disponibles dans le milieu environnant et l'huître doit donc pallier au mieux aux variations du milieu environnant en constituant des réserves énergétiques. D'une façon générale, les réserves sont accumulées pendant les périodes où la disponibilité de nourriture est importante (fin de l'été et au cours de l'automne dans les zones tempérées). Ces réserves se font au moment où les besoins énergétiques majeurs pour la croissance somatique et germinale ont déjà été assurés. Les réserves sont ensuite utilisées afin de maintenir le métabolisme pendant les périodes de faible approvisionnement en nutriment (en hiver) et pour initier la gamétogenèse (Kennedy, 1996). En effet, la production massive de gamètes lors de la reproduction des huîtres occasionne d'importantes dépenses énergétiques qui sont majoritairement soutenues par l'utilisation de réserves préalablement constituées. Chez les bivalves, les réserves énergétiques sont essentiellement constituées par du glycogène. Ce dernier est un polymère ramifié de glucose (Whitman et al., 1985), qui sert de « réservoir à unités de glucose » (Hadari et al., 1992). En plus du glycogène, des lipides dits de réserve sont aussi stockés et peuvent représenter 2 à 15 % du poids sec (Deslous-Paoli and Héral, 1988; Deslous-Paoli et al., 1982). Le glycogène peut également être utilisé pour néo-synthétiser les lipides qui sont transférés au vitellus des ovocytes durant la vitellogenèse (Kennedy, 1996). Chez *C. gigas*, les cellules vésiculeuses impliquées dans le stockage de l'énergie sont majoritairement trouvées dans les palpes labiaux et la région gonade-manteau (Berthelin et al., 2000a; Mathieu and Lubet, 1993).

III.2. Régulation de l'énergie

De par son statut très dépendant du milieu, la gestion de la balance énergétique apparaît comme un aspect crucial de l'équilibre physiologique de *C. gigas*. Une forte relation existe entre la nourriture, les réserves et la reproduction (Berthelin et al., 2001; Fabioux, 2004; Jouaux, 2010; Kennedy, 1996) mais la compréhension globale des régulations et de l'interaction de ces trois parties est encore assez peu connue.

De nombreux facteurs exocrines, tels la quantité de nourriture (Chavez-Villalba et al., 2003; Deslous-Paoli et al., 1982), la température et la photopériode (Fabioux et al., 2005; Héral et al., 1986), ont déjà été décrits comme ayant une influence sur la mise en réserve et l'utilisation

de ces réserves au cours de la gamétogenèse. La synchronisation observée au cours des phases d'utilisation de l'énergie et particulièrement pour la mise en place des cellules liées à la gamétogenèse suggère l'existence de régulations de type hormonale. De plus, chez les bivalves, l'utilisation du glycogène pourrait être soumise à régulation par des facteurs neuroendocriniens de manière synchronisée avec la gamétogenèse (Robbins et al., 1990; Robbins et al., 1991). Plusieurs types de régulations hormonales existent, elles possèdent des modes d'action distincts : soit des effets localisés via des régulations autocrines ou paracrines soit des effets plus globaux avec les régulations endocrines. Les régulations endocrines et nerveuses travaillent en association pour réguler le métabolisme et l'homéostasie. Contrairement au système nerveux, la régulation endocrine agit plus lentement et a généralement des effets à plus long terme. La régulation endocrine est caractérisée par la sécrétion de signaux dans le système circulant lui permettant d'agir dans presque tout l'organisme apportant ainsi des changements dans de nombreuses activités métaboliques. Plusieurs acteurs intervenant dans les régulations paracrines et endocrines ont été identifiés chez l'huître creuse :

- Deux peptides apparentés à la « gonadotropin-releasing hormone » (GnRH) ont été caractérisés par spectrométrie de masse à partir d'extraits de ganglions viscéraux de *C. gigas* (Bigot et al., 2012). Au niveau transcriptionnel, plusieurs différences significatives ont été observées dans les ganglions au cours de la reproduction et lors de différentes conditions trophiques. La présence de GnRH dans les ganglions démontre leur implication dans la gestion des besoins en énergie pendant la reproduction (Bigot et al., 2012).

- Le neuropeptide Y (NPY) et l'insuline sont impliqués aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés dans les processus de la régulation de la balance énergétique tels que de la prise alimentaire, l'utilisation de l'énergie pour la croissance, la reproduction et le métabolisme basal (de Jong-Brink et al., 2001; Schneider, 2004). Cinq récepteurs apparentés à NPY ont été mis en évidence chez *C. gigas*. Certains de ces récepteurs présentent des variations d'expression au cours de la gamétogenèse dans la gonade (Bigot, 2012; Lafore, 2008).

- Plusieurs éléments appartenant à la famille des stéroïdes, l'estrone (E1), la 17 β -œstradiol (E2) et l'estriol (E3) ont été caractérisés chez *C. gigas* (Le Curieux-Belfond et al., 2001; Matsumoto et al., 1997). Une augmentation de E2 a été observée au cours de la gamétogenèse suggérant un rôle des stéroïdes dans la vitellogenèse (Matsumoto et al., 2003). Un récepteur aux œstrogènes principalement exprimé lors de la maturité des animaux a été identifié chez l'huître creuse (Matsumoto et al., 2007).

- Différents éléments de la voie insuline ont été identifiés chez *C. gigas* : un ligand de type ILP (« insuline-like peptide ») qui présente une expression dans les ganglions viscéraux

avec une variation observée au cours de la gamétogenèse (Hamano et al., 2005) ; un récepteur CIR (Gricourt et al., 2003) et plusieurs acteurs de la voie de signalisation insuline (Ras, PTEN et p70S6K) ont aussi été caractérisés (Jouaux et al., 2011).

- Les facteurs de croissance (transforming growth factor ou TGF) composent une superfamille de cytokines polypeptidiques. Le groupe β (TGF β) intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que la différenciation et la prolifération cellulaire au cours du développement. Plusieurs éléments de la superfamille des TGF β ont été identifiés chez *C. gigas* (Corporeau et al., 2011; Fleury et al., 2008; Herpin et al., 2005; Herpin et al., 2004; Huvet et al., 2012; Lelong et al., 2007; Lelong et al., 2000). L'inhibition ciblée par injection d'ARN interférents ou l'immuno-inhibition par injection d'anticorps ont tous les deux induit, aussi bien chez les femelles que chez les mâles, une diminution de l'aire gonadique, témoin de l'effort de reproduction (Corporeau et al., 2011; Huvet et al., 2012).

Introduction générale 2^{ème} partie :

L'AMP-activated protein kinase (AMPK)

I. Régulation de la balance énergétique et découverte de l'AMPK

De par ses nombreuses implications dans les réactions biochimiques des voies qui régulent le métabolisme, l'adénosine triphosphate (ATP) est considérée comme une véritable « monnaie énergétique » de la cellule (Knowles, 1980). Cette molécule découverte en 1929 par le biochimiste allemand Karl Lohmann (Lohmann, 1929), se compose structurellement d'une base purique (adénine) attachée à un sucre à 5 carbones (ribose) mais surtout de trois groupes phosphates placés à la suite qui peuvent être hydrolysés et donner de l'adénosine diphosphate (ADP) ou de façon directe ou indirecte de l'adénosine monophosphate (AMP). Ces libérations de groupements phosphates sont hautement énergétiques et permettent aux cellules de trouver de l'énergie rapidement pour fonctionner. Les concentrations de ces molécules servent donc de « batterie » énergétique pour les cellules : lorsque les groupements phosphates sont libérés par les processus de métabolisme, transformant l'ATP en ADP ou AMP, l'énergie disponible diminue ; inversement lorsque les groupements phosphates se font rattacher par des processus de catabolisme, l'énergie disponible augmente. Il est particulièrement vital pour les cellules aérobiques de garder une « batterie » énergétique suffisamment chargée en maintenant les ratios ATP:AMP et ATP:ADP à des concentrations permettant la vie cellulaire. Sur Terre, l'ATP a été caractérisée comme étant la source majoritaire d'énergie cellulaire dans tous les grands règnes du vivant montrant son importance et donc l'implication de mécanismes moléculaires spécifiques pour moduler cette « batterie » énergétique.

Au début des années 1970, deux unités de recherches distinctes supposent l'existence d'un régulateur sensible à la concentration en AMP cytosolique ayant un effet inhibiteur sur des molécules liées à la synthèse des acides gras : l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Carlson and Kim, 1973) et le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl (HMG)-CoA réductase (HMG-CoA réductase) (Beg et al., 1973). À la fin des années 1980, l'implication d'un inhibiteur unique de l'ACC et de l'HMG-CoA réductase toujours en réponse à une augmentation de la concentration AMP est démontrée (Carling et al., 1987). Cette découverte permet d'identifier cette protéine inhibitrice comme étant l'« AMP-activated protein kinase » (Carling and Hardie, 1989). De nombreuses recherches ultérieures ont permis de montrer que l'AMPK n'agissait pas uniquement sur la synthèse des acides gras, mais aussi sur de nombreuses autres voies métaboliques, telles que la synthèse protéique ou la synthèse glucidique, lui permettant de jouer non seulement un rôle clé

dans la détection intracellulaire de l'ATP, mais aussi ayant un rôle plus global du maintien de l'équilibre de l'énergie dans les cellules (Carling, 2004).

Depuis la parution du séquençage du génome humain au début des années 2000 (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), l'organisation du génome humain (human genome organisation ou HUGO) attribue un nom et un symbole unique aux gènes humains, renommant officiellement par la même occasion l'AMP-activated protein kinase (AMPK) en PRKA (protein kinase A). Pour des raisons historiques et pratiques, nous continuerons de garder la dénomination AMPK tout au long de cette thèse de doctorat.

II. Structure de l'AMPK

II.1. AMPK : structure complexe et conservée

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase dont le rôle majeur est de permettre l'adaptation des cellules aux facteurs de stress nutritionnels et environnementaux. La purification de l'AMPK dans le foie de rat (Davies et al., 1994; Mitchelhill et al., 1994) a révélé une structure hétérotrimérique, constituée d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ dont l'assemblage est essentiel à son activité et à sa stabilité (Carling, 2004; Dyck et al., 1996). L'association des trois sous-unités permet d'augmenter de 50 à 100 fois l'activité de l'AMPK (Dyck et al., 1996). Chez l'homme, ces sous-unités sont codées par sept gènes différents et sont présentes sous plusieurs isoformes : $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$ (Chen et al., 1999; Cheung et al., 2000; Stapleton et al., 1994; Thornton et al., 1998). Ces différentes isoformes permettent la formation de 12 complexes hétérotrimériques possibles ($\alpha\beta\gamma$). Chaque sous-unité possède ses propres domaines structuraux qui sont retrouvés chez toutes les espèces où l'AMPK a été décrite. Les gènes codants pour les orthologues des différentes sous-unités de l'AMPK ont été identifiés chez de nombreuses espèces eucaryotes, aussi bien vertébrés comme chez le rat *Rattus norvegicus* (Carling et al., 1989) et l'Homme *Homo sapiens* (Beri et al., 1994), qu'invertébrés : la drosophile *Drosophila melanogaster* (Yoshida et al., 1999), le ver nématode *Caenorhabditis elegans* (Apfeld et al., 2004; Beale, 2008), les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Celenza and Carlson, 1986; Schmidt and McCartney, 2000) et *Schizosaccharomyces pombe* (Townley and Shapiro, 2007), et les plantes : *Arabidopsis thaliana* (Bouly et al., 1999) et *Physcomitrella patens* (Thelander et al., 2004). À ce jour, une seule exception a été trouvée chez l'organisme eucaryote *Encephalitozoon cuniculi*. Ce champignon est un parasite intracellulaire obligatoire dont le génome limité (Katinka et al., 2001) semble avoir perdu non seulement ses mitochondries, mais aussi plusieurs kinases dont l'AMPK. Dans ce cas de figure, la cellule hôte subviendrait aux fonctions manquantes (Miranda-Saavedra et al., 2007).

II.2. AMPK alpha

La sous-unité α possède au niveau de sa partie N-terminale un domaine catalytique de type sérine/thréonine kinase (Figure 7) (Hanks et al., 1988). Ce domaine kinase comporte l'acide aminé polaire thréonine 172 (Thr172) placé entre deux motifs caractéristiques de nombreuses kinases activées par phosphorylation : aspartate, phénylalanine, glycine (Asp-Phe-Gly) et alanine, proline et glutamate (Ala-Pro-Glu) (Hardie et al., 1998; Hawley et al., 1996). La phosphorylation du résidu Thr172 a été identifiée comme étant déterminante et requise pour l'activité de l'AMPK (Hawley et al., 1996) et demeure le principal site de régulation de l'enzyme (Stein et al., 2000). D'autres sites de phosphorylation semblant jouer un rôle dans la régulation de l'activité ont été caractérisés sur la sous-unité catalytique α située en thréonine 258 (Thr258), sérine 404 (Ser404) et sérine 485 (Ser485) (Kemp et al., 2003). La sous-unité α contient en son milieu de séquence un domaine d'auto-inhibition réprimant l'activité kinase en l'absence d'AMP (Crute et al., 1998). L'extrémité C-terminale est constituée d'un domaine de liaison aux sous-unités β et γ (Iseli et al., 2005). Plusieurs autres sites potentiels de phosphorylation ont été décrits au niveau de l'extrémité C-terminale de la sous-unité α 1 (thréonine 373, thréonine 379, thréonine 481, thréonine 517, sérine 499, sérine 514, sérine 515) (Steinberg and Kemp, 2009; Villen et al., 2007). Le rôle physiologique de ces phosphorylations est inconnu mais leur localisation dans les domaines conservés laisse suggérer leurs rôles potentiels. Par exemple, les Ser514 et Ser515 sont positionnées au niveau du domaine de liaison des sous-unités β et γ indiquant un possible rôle en tant que signal de couplage entre les sous-unités (Steinberg and Kemp, 2009). Les deux isoformes α 1 et α 2 possèdent une activité comparable mais présentent des affinités de substrat différentes, ce qui leur suggère des rôles physiologiques différents dans la cellule (Woods et al., 1996).

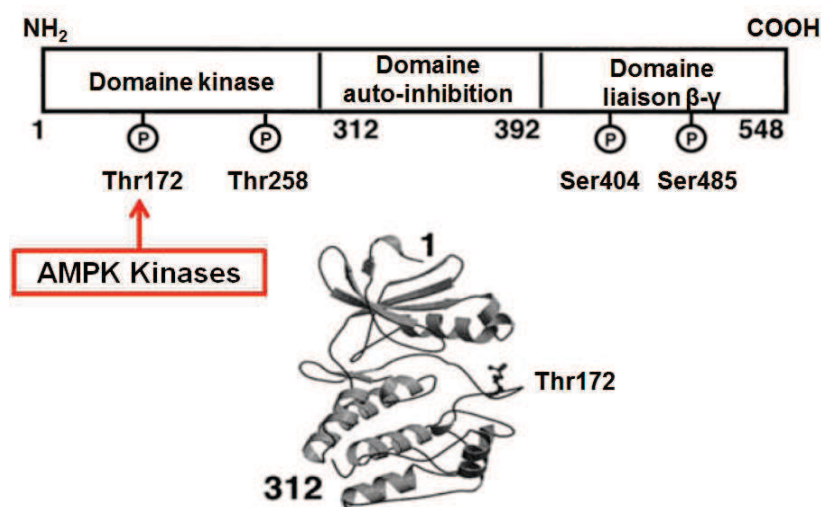


Figure 7 : Illustration des domaines et principales phosphorylations couplés à la structure cristallographique de la sous-unité α de l'AMPK.

Par ordre alphabétique : Ser : sérine ; Thr : thréonine (d'après illustrations provenant de Kemp et al., 2003).

II.3. AMPK beta

La sous-unité β est l'une des deux sous-unités régulatrices de l'AMPK (Figure 8). Elle possède deux régions conservées. La première région est un domaine de liaison aux carbohydrates (« carbohydrate-binding module - containing family 48 » ou CBM) (www.cazy.org/CBM48.html). Ce domaine était précédemment appelé « glycogen binding domain » (GBD) (Hudson et al., 2003; Polekhina et al., 2003). Le CMB permet à l'AMPK d'estimer le statut des réserves énergétiques via la quantité et la qualité du glycogène auquel il se lie (Koay et al., 2007; Koay et al., 2010; McBride et al., 2009). Contrairement au ratio AMP:ATP qui active à court terme l'activité AMPK, l'état des réserves permettrait donc de moduler et d'activer à moyen terme cette même activité (McBride and Hardie, 2009). La deuxième région conservée est un domaine C-terminal nécessaire pour former un complexe avec les sous-unités α et γ (domaine de liaison α - γ) (Iseli et al., 2005; Thornton et al., 1998). La partie N-terminale possède la particularité de pouvoir être modifiée par myristoylation. Cette modification post-traductionnelle pourrait contrôler la localisation intracellulaire de la sous-unité β , mais aussi faciliter les interactions avec d'autres protéines (Mitchelhill et al., 1997; Warden et al., 2001). Plusieurs autres modifications post-traductionnelles utilisant la phosphorylation de résidus sérine ont été caractérisées pour la sous-unité β : sérine 24/25 (Ser24/Ser25), sérine 96 (Ser96), sérine 101 (Ser101), sérine 108 (Ser108) et sérine 182 (Ser182) (Mitchelhill et al., 1997; Warden et al., 2001; Woods et al., 2003b). Tout comme la myristoylation en position N-terminale, la phosphorylation des sites Ser24/25 et Ser182 jouerait un rôle dans la localisation intracellulaire (Warden et al., 2001). En effet, le site de phosphorylation Ser24/25, caractéristique de l'isoforme AMPK β 1, est caractérisé comme étant impliqué dans la localisation nucléaire (Warden et al., 2001), site qui n'existe pas pour l'isoforme AMPK β 2 (Chen et al., 1999; Mitchelhill et al., 1997). Sur l'isoforme β 1, des sites d'autophosphorylation ont été localisés en Ser96, Ser101 et Ser108. Cette dernière semble être nécessaire pour l'activité de l'enzyme (Warden et al., 2001; Woods et al., 2003b). Des différences d'affinité aux carbohydrates via le CBM ont été observées entre les isoformes β 1 et β 2 (Bieri et al., 2012; Koay et al., 2010)

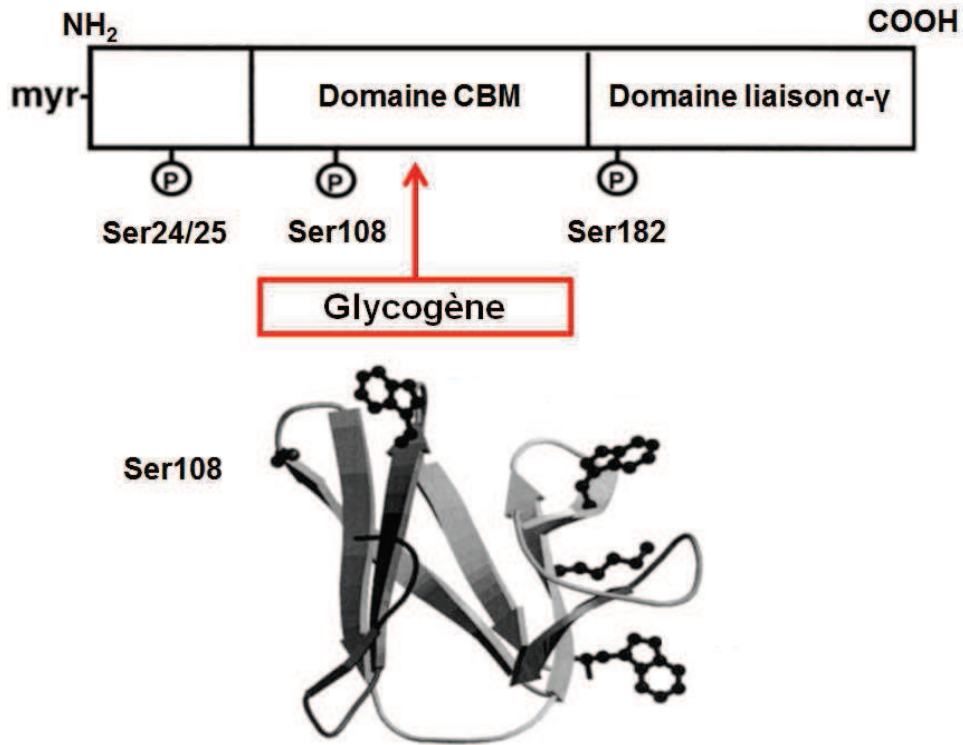


Figure 8 : Illustration des domaines et principales phosphorylations couplés à la structure cristallographique de la sous-unité β de l'AMPK. Par ordre alphabétique : CBM : carbohydrate-binding module - containing family 48 ; Ser : sérine ; Thr : thréonine (d'après illustrations provenant de Kemp et al., 2003).

II.4. AMPK gamma

La deuxième sous-unité régulatrice de l'AMPK est la sous-unité γ (Figure 9). À l'extrémité N-terminale, elle contient quatre répétitions en tandem d'une structure connue sous le nom de « cystathionine- β -synthase » (CBS). Ces structures se lient par paire et forment deux modules appelés « domaines Bateman ». Chaque domaine permet la liaison d'une molécule d'AMP, d'ADP ou d'ATP de façon mutuellement exclusive (Bateman, 1997; Kemp, 2004; Scott, 2004). Chez d'autres espèces, les isoformes γ 1, 2 ou 3 diffèrent par la longueur de leurs extrémités N-terminales, qui ne possèdent pas de domaines spécifiques décrits (Adams et al., 2004). De plus, la sous-unité γ 2 a été caractérisée sous deux isoformes : γ 2L (forme longue de 569 acides aminés) et γ 2S (forme courte de 328 acides aminés). Cependant la signification physiologique de ces isoformes reste assez peu explorée (Cheung et al., 2000; Lang et al., 2000). Chez les trois isoformes γ , une région de 25 acides aminés placés immédiatement en position N-terminale de la structure CBS1 a été caractérisée comme étant responsable de la liaison de la sous-unité γ avec la sous-unité β (Bevan, 2001; Townley and Shapiro, 2007). Des études sur les orthologues SNF1 et SNF4 de *S. cerevisiae* ont permis de démontrer l'existence d'une liaison directe entre la sous-unité γ et la sous-unité α (Amodeo et al., 2007).

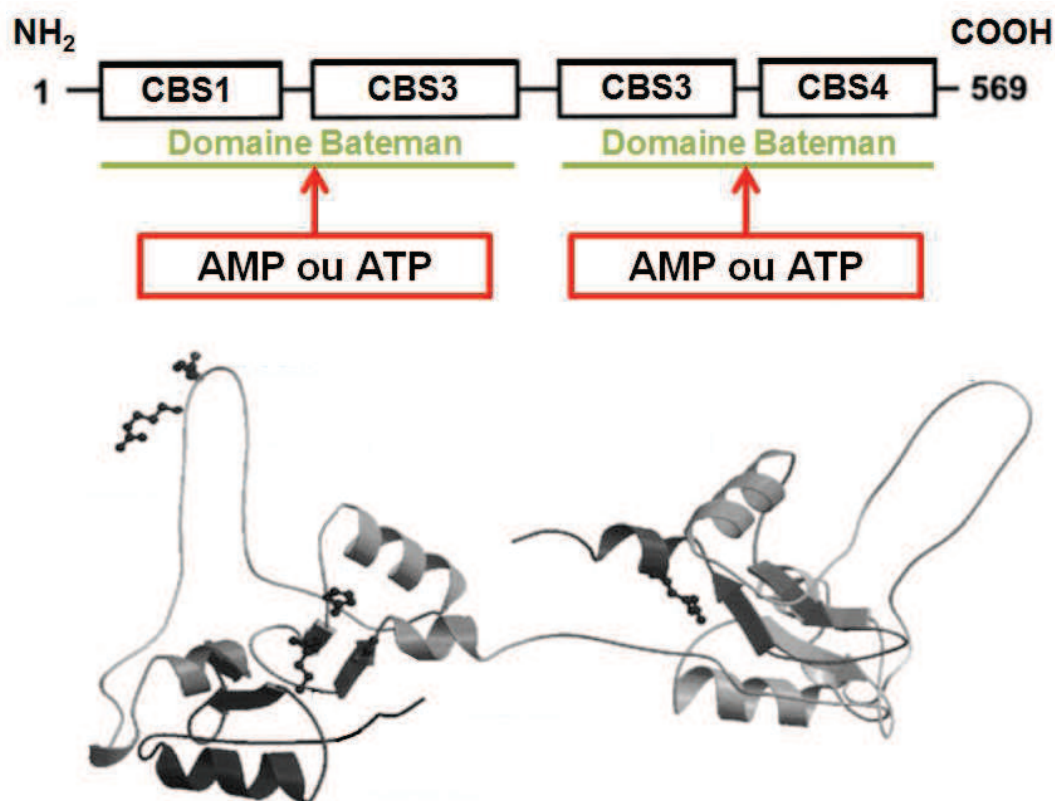


Figure 9 : Illustration des différents domaines couplés à la structure cristallographique de la sous-unité γ de l'AMPK. AMP : adénosine monophosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; CBS : cystathionine- β -synthase (d'après illustrations provenant de Kemp et al., 2003).

II.5. Localisation et associations des sous-unités

L'architecture moléculaire précise du trimère AMPK a été définie à partir des orthologues présents dans les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae* (Amodeo et al., 2007; Townley and Shapiro, 2007). Ces descriptions structurales, couplées à de nombreuses expériences fonctionnelles, ont permis de caractériser, localiser et définir le rôle fonctionnel de ces sous-unités (Figure 10).

La localisation intracellulaire des sous-unités est variable. En effet, la sous-unité $\alpha 1$ est surtout cytosolique tandis que la sous-unité $\alpha 2$ est davantage localisée dans le noyau des cellules, suggérant une régulation directe de l'expression des gènes (da Silva Xavier et al., 2000; Salt et al., 1998a). Plus globalement, une répartition tissulaire des sous-unités existe également. En effet, les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ ont été observées comme étant majoritairement exprimées dans le foie (Stapleton et al., 1996; Thornton et al., 1998) tandis que $\alpha 2$ et $\beta 2$ ont été observées plus fortement exprimées dans les muscles squelettiques et cardiaques (Thornton et al., 1998; Wojtaszewski et al., 2000). La sous-unité $\gamma 3$ a été caractérisée comme spécifique du muscle (Cheung et al., 2000). Au niveau des associations, des trimères semblent être privilégiés. En effet dans le foie de rat, les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ s'associent préférentiellement avec $\beta 1$ et $\gamma 1$ alors que dans le muscle squelettique, $\alpha 2$ s'associe plutôt avec $\beta 2$ et $\gamma 1$ ou $\gamma 3$ (Chen et al., 1999).

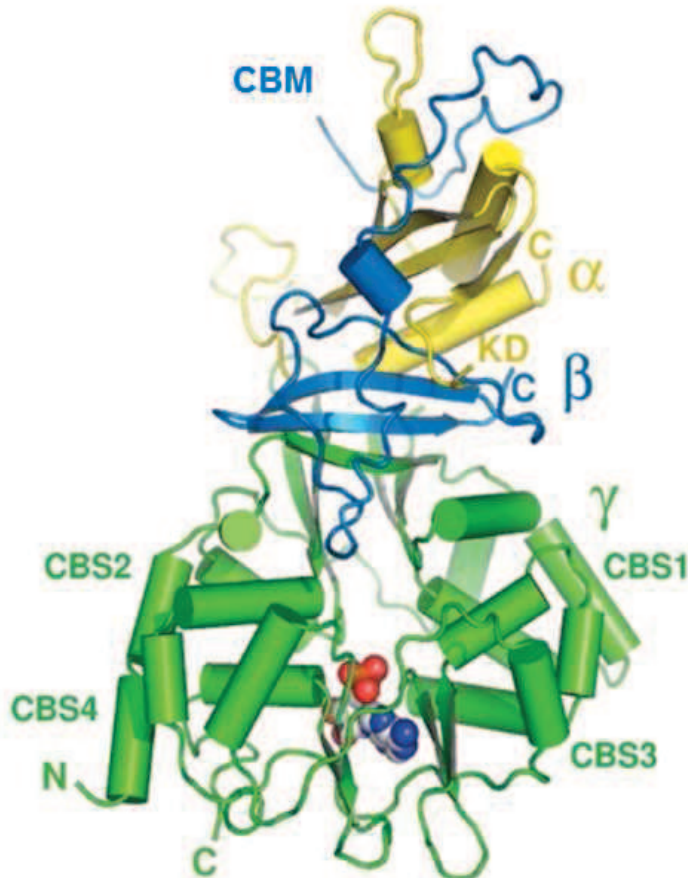


Figure 10 : Modèle 3D en « ruban » d'un hétérotrimère de l'AMPK appartenant à *S. pombe*. Les sous-unités α , β et γ sont représentées en jaune, bleu et vert respectivement. Une molécule d'AMP (modèle moléculaire CPK) liée au CBS est représentée. Le domaine kinase (KD : kinase domaine) et le CBS (GBD) sont indiqués (d'après illustration provenant de Townley and Shapiro 2007).

II.6. Orthologues et AMPKs related kinases

Lors des recherches menées sur la régulation et les différentes fonctions que pouvait avoir l'AMPK dans la cellule, l'une des découvertes les plus importantes a été que l'AMPK est structurellement et fonctionnellement similaire à un autre complexe de type protéine kinase dénommé « sucrose non fermenting 1 » (SNF1) caractérisé chez la levure *S. cerevisiae* (Gao et al., 1995; Mitchelhill et al., 1994). SNF1 est nécessaire lors d'une privation en glucose, source de carbone préférentiellement utilisée chez cette espèce (Carlson, 1999; Celenza and Carlson, 1986). Des orthologues des sous-unités β et γ appelés respectivement GAL83 et SNF4 ont pu être caractérisés (Tableau 1) (Jiang and Carlson, 1997). Des orthologues des trois sous-unités AMPK appelés « SNF1-related kinases » (SnRK) ont aussi été trouvés chez les plantes (Tableau 1) (Bouly et al., 1999; Gissot et al., 2004; Gissot et al., 2006). SnRK1 permet de détecter un déficit énergétique causé par une carence en nutriments, un stress environnemental ou des cycles alternés de lumière et d'obscurité (Polge and Thomas, 2007).

Tableau 1 : Mise en relation des sous-unités de l'AMPK caractérisées chez les mammifères et des orthologues présents chez la levure (*S. cerevisiae*) et la plante (*A. thaliana*) (d'après Polge and Thomas 2007).

Structure	Mammifères	Référence(s)	Levure (<i>S. Cerevisiae</i>)	Référence(s)	Plante (<i>A. thaliana</i>)	Référence(s)
Sous-unité α (catalytique)	AMPK $\alpha 1, \alpha 2$	Carling et al., 1989 Stapleton et al., 1994	SNF1	Jiang and Carlson, 1997	SnRK1 $\alpha 1, \alpha 2$	Bouly et al., 1999
Sous-unité β (régulatrice)	AMPK $\beta 1, \beta 2$	Mitchelhill et al., 1994 Davies et al. 1994	SIP1, SIP2, GAL83	Jiang and Carlson, 1997	SnRK1 $\beta 1, \beta 2,$ $\beta 3, \beta \gamma$	Bouly et al., 1999 Gissot et al., 2004
Sous-unité γ (régulatrice)	AMPK $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$	Mitchelhill et al., 1994 Davies et al. 1994	SNF4	Jiang and Carlson, 1997	SnRK1 $\gamma 1, \gamma 2$	Bouly et al., 1999 Gissot et al., 2006

Après la découverte de similarité entre AMPK, SNFs, SnRKs, et plusieurs autres kinases apparentées à l'AMPK (AMPK related kinase ou AMPK-RK) ont été découvertes telles que les « brain-specific kinases 1 et 2 » (BRSK1/2), les « salt-inducible kinases » (SIKs), les « maternal embryonic leucine zipper kinase » (MELKs), les « microtubule affinity regulating kinases » (MARKs), les NuaKs (Bright et al., 2009; Manning et al., 2002) (Figure 11). Les fonctions physiologiques de la plupart de ces kinases ne sont pas bien comprises, mais contrairement à l'AMPK, elles ne semblent pas toutes modulées par le stress.

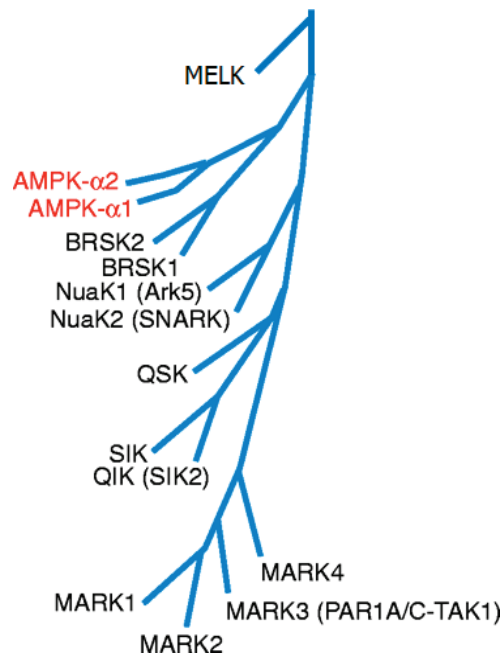


Figure 11 : Arbre phylogénique des kinases apparentées à l'AMPK (d'après illustration provenant de Manning et al., 2002).

III. Activation et modulation de l'AMPK

III.1. Activation

Théorie de l'activation par l'AMP par Hardie et al., 1999

Il a été estimé théoriquement que les cellules saines placées dans des conditions idéales maintiennent un rapport ADP:ATP de l'ordre de 1 pour 10 et un rapport d'AMP:ATP de l'ordre de 1 pour 100 (Hardie and Hawley, 2001). Lorsque cette balance énergétique est perturbée par un facteur environnemental, la production d'ATP chute et le rapport ADP:ATP ainsi que le rapport AMP:ATP sont modifiés. C'est l'augmentation de la concentration cellulaire en AMP qui va permettre l'activation de l'AMPK par quatre mécanismes distincts (Figure 12 et Figure 13) (Hardie et al., 1999). L'AMP se lie aux domaines Bateman situés sur la sous-unité γ . Cette liaison permet une activation allostérique faible (1) mais surtout provoquerait un changement de conformation de l'hétérotrimère (Figure 12) (Cheung et al., 2000). Ce changement de conformation aurait un double effet. Tout d'abord, l'accès au site catalytique serait plus difficile pour les phosphatases empêchant la déphosphorylation du site Thr172 (2). Puis, parallèlement, un accès au site catalytique serait favorisé pour les AMPK kinases augmentant donc la phosphorylation de la Thr172 (3). Enfin, l'AMP permettrait une activation allostérique des AMPK kinases (4). Les effets activateurs (2) et (4) sont antagonisés par des concentrations élevées en ATP. (Corton et al., 1995; Davies et al., 1995). L'inactivation de l'AMPK se produit par déphosphorylation de la Thr172 réalisée par différentes protéines phosphatases (PP). La famille des « phosphoprotéines phosphatases » (PPP) et des protéines « phosphatase métal dépendantes » (PPM) ont été caractérisées comme étant efficaces *in vitro* (Carling et al., 1989; Davies et al., 1995).

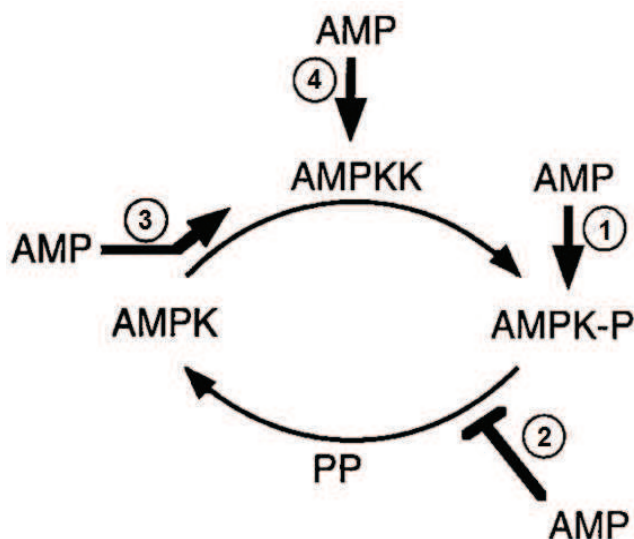


Figure 12 : L'AMP active l'AMPK via quatre mécanismes distincts : (1) Activation allostérique de l'AMPK ; (2) Liaison de l'AMP à l'AMPK rendant le site catalytique (Thr172) moins accessible pour les protéines phosphatases (PP) ; (3) Liaison de l'AMP à l'AMPK rendant le site catalytique (Thr172) plus accessible aux AMPK kinases (AMPKK) ; (4) Activation allostérique des AMPKK. (d'après illustration provenant de Hardie et al., 1999).

Une autre activation allostérique de l'AMPK a été découverte par l'intermédiaire d'une élévation du rapport créatine/phosphocréatine intracellulaire dans le muscle (Ponticos et al., 1998). En effet, lors d'une augmentation du niveau de phosphocréatine une inhibition allostérique de l'AMPK indépendante des AMPK kinases a été constatée (Winder and Hardie, 1999). Le pool intracellulaire de phosphocréatine a été caractérisé comme étant une source pour renouveler l'ATP et aurait donc une action dans le maintien des rapports ADP:ATP et AMP:ATP (Jacobus, 1985; Saks et al., 1985).

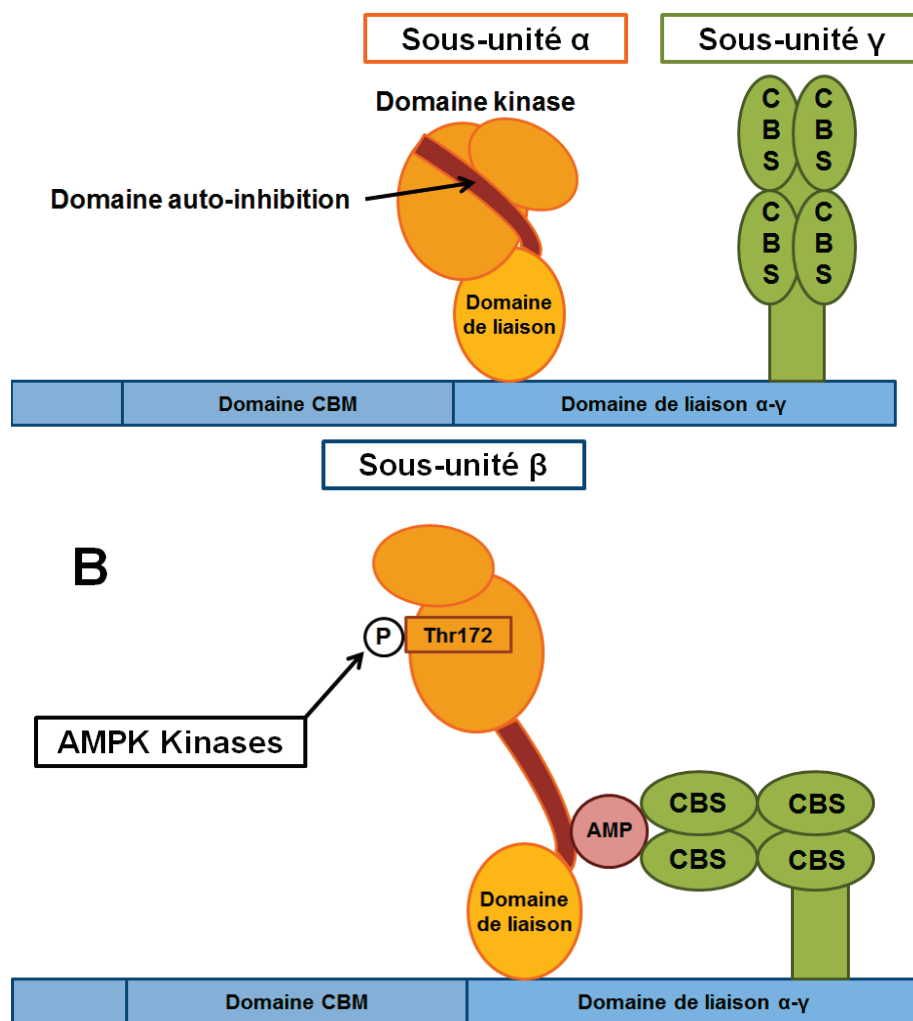


Figure 13 : Représentation schématique de l'activation de l'AMPK par AMP. A : En absence d'AMP, le complexe existe principalement dans la conformation inactive. Les sous-unités α et γ n'interagissent pas ensemble directement (reliées indirectement par la sous-unité β). Dans cet état, la phosphorylation Thr172 et l'accès à des substrats par le domaine catalytique sont bloqués par le domaine d'auto-inhibition. B : Dans la conformation active, l'inhibition du domaine catalytique par le domaine d'auto-inhibition est levée. La liaison de l'AMP aux domaines CBS de la sous-unité γ provoque un changement conformationnel qui va permettre au site actif de phosphoryler ses cibles et empêcher les protéines phosphatases d'agir (d'après illustrations provenant de Cheung et al., 2000).

Activation par les AMPK kinases

L'activation de l'AMPK exige la phosphorylation du résidu Thr172 situé dans le domaine kinase de la sous-unité α réalisé par des kinases appelées AMPK kinases (Hawley et al., 1996).

La protéine kinase « liver kinase B1 » (LKB1 aussi appelée « Serine/threonine kinase 11 » STK11) a été la première AMPK kinase décrite (Hawley et al., 2003; Shaw et al., 2004b; Woods et al., 2003a). Pour être fonctionnelle, LKB1 doit former un complexe avec deux autres unités auxiliaires : « STE20-related adaptor protein α/β » (STRAD α ou STRAD β) et « scaffolding mouse protein 25 α/β » (MO25 α ou MO25 β) (Baas et al., 2003; Boudeau et al., 2003). L'association des trois sous-unités est nécessaire pour une activité complète (Hawley et al., 2003). Le complexe LKB1/STRAD/MO25 semble posséder une activité basale continue et ne semble pas être augmenté par la concentration en AMP. La capacité du complexe LKB1/STRAD/MO25 à augmenter l'activité de l'AMPK serait facilitée par le changement de conformation de l'AMPK par l'AMP (Figure 13), faisant du site catalytique de la sous-unité α de l'AMPK un substrat plus facilement accessible pour LKB1 (Hawley et al., 2003). Le complexe LKB1/STRAD/MO25 a été caractérisé comme étant responsable de la phosphorylation et l'activation de plusieurs AMPK related kinase possédant des sites de phosphorylation similaires à la Thr172 de la sous-unité α (Lizcano et al., 2004). La kinase LKB1 est exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules (Luukko et al., 1999).

Deux autres AMPK kinases ont été caractérisées comme étant impliquées dans l'activation de l'AMPK : « calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase » α ou β (CaMKK α ou CaMKK β) (Hawley et al., 2005). L'activation de l'AMPK par les CaMKKs se fait principalement dans les tissus du système nerveux (Anderson et al., 1998), où une augmentation du calcium intracellulaire (Ca^{2+}) va activer la voie de signalisation CaMKK amenant à une phosphorylation de l'AMPK au niveau du résidu Thr172. Cette activation est principalement due à l'action de la kinase CaMKK β (Hawley et al., 2005). Contrairement au complexe LKB1/STRAD/MO25 qui est indirectement sensible à l'augmentation de l'AMP intracellulaire, l'activation par la CaMKK β n'est pas liée au changement de rapport AMP/ATP mais uniquement au niveau de calcium intracellulaire. Le calcium intracellulaire peut donc exercer en synergie avec l'augmentation du niveau en AMP pour moduler l'activité AMPK (Hardie, 2011). De plus, en regardant de plus près les différences entre ces deux complexes, nous pouvons remarquer que la CaMKK β est particulièrement plus répandue dans les cellules du cerveau et du sang alors que le complexe LKB1 se trouve dans la plupart des organes périphériques impliqués dans la régulation de l'équilibre énergétique tels que le foie et les muscles striés.

Le recensement des AMPK kinases n'est pas définitif, et plusieurs autres kinases ont été identifiées comme responsables de la phosphorylation de la Thr172. La « transforming growth factor β (TGF β)-activated kinase 1 » (TAK1), membre de la famille des « mitogen-activated protein kinase kinase kinase » (MAPKKK), est capable de phosphoryler *in vitro* l'AMPK (Momcilovic et al., 2006). La « kinase suppressor of Ras 2 » (KSR2), est capable de phosphoryler *in vitro* et *in vivo* l'AMPK (Costanzo-Garvey et al., 2009).

III.2. Modulation de l'activité

L'AMPK a été caractérisée comme étant un capteur et un régulateur important de l'énergie aussi bien au niveau cellulaire que de l'organisme entier (Carling, 2004). L'activité de l'AMPK et sa cascade de signalisation sont donc soumises à de nombreuses régulations aussi bien endogènes qu'exogènes (Figure 14).

Le stress métabolique

Le maintien de l'homéostasie est crucial pour la survie et le développement des cellules et plus généralement de l'organisme. Le stress métabolique correspond à une demande accrue d'énergie en réponse à une modification de l'environnement cellulaire. Par exemple une utilisation augmentée de l'énergie lors d'un effort physique intense ou en réponse à un stress extérieur modifie l'équilibre basal des rapports AMP:ATP et ADP:ATP induisant l'activation de l'AMPK (Hardie and Hawley, 2001). AMPK va être activée pour fournir les muscles en ATP et en glucose lors d'un exercice musculaire intense (Hayashi et al., 1998; Winder and Hardie, 1996). La quantité et la qualité du glycogène intracellulaire est aussi capable d'activer l'AMPK via le domaine CBM de la sous-unité β (McBride et al., 2009; McBride and Hardie, 2009; Priebe et al., 2011; Salt et al., 1998b). L'activité de l'AMPK peut être modulée par les changements thermiques (Bartrons et al., 2004; Frederich et al., 2009; Mulligan et al., 2007), le changement de pH intracellulaire (Ponticos et al., 1998), le stress hyperosmotique (Fryer et al., 2002c), et le stress oxydant (Choi et al., 2001). Les changements de la concentration en oxygène, tels que l'hypoxie (Kemp et al., 1999; Marsin et al., 2000), l'anoxie (LaRue and Padilla, 2011; Rider et al., 2009) ou l'ischémie (Kudo et al., 1995) ont été caractérisés pour activer l'AMPK.

Régulations endocrines

Des orthologues de l'AMPK ont été caractérisés dans les eucaryotes unicellulaires les plus simples tels que *S. cerevisiae* (Celenza and Carlson, 1986) et *Giardia lamblia* (Adam, 2000). La découverte de l'AMPK dans ces organismes simples et sûrement très anciens (Fujiya, 1970; Grizel, 1996a) suggèrent que le système AMPK existait avant l'évolution des hormones et

des cytokines. Ces derniers semblent avoir acquis au cours de l'évolution la possibilité de moduler le système AMPK (Hardie, 2008).

Cytokines

Les adipokines sont des cytokines secrétées dans la circulation sanguine par les cellules adipeuses (adipocytes) et régulent l'ensemble de la balance énergétique au niveau de l'organisme. AMPK intègre les signaux nutritionnels et hormonaux au niveau des tissus périphériques et de l'hypothalamus, lui permettant de transmettre les signaux adipokines (leptine, adiponectine, la résistine) pour réguler la prise alimentaire, la prise de poids et l'homéostasie du glucose et des lipides (Kahn et al., 2005). Leptine et adiponectine activent l'AMPK favorisant l'entrée du glucose dans les cellules et l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique, stimulant ainsi la dépense énergétique corporelle (Minokoshi et al., 2002; Tomas et al., 2002). La leptine et l'adiponectine ont aussi été caractérisées comme étant impliquées dans la stimulation de l'activité de l'AMPK dans le foie (Yamauchi et al., 2002; Yu et al., 2004). La résistine a un effet inverse. Dans les tissus périphériques tels que le muscle squelettique de rat, elle diminue la phosphorylation de l'AMPK (Palanivel and Sweeney, 2005). Bien que la leptine active l'AMPK dans les tissus périphériques que sont le muscle et le foie, une inhibition de l'activité de l'AMPK par cette même leptine a été observée dans l'hypothalamus de souris (Minokoshi et al., 2004).

L'hormone digestive ghréline, secrétée par l'estomac et le pancréas (Volante et al., 2002), semble aussi avoir des effets contrastés sur les tissus centraux et périphériques. En effet, chez le rat, la ghréline a été caractérisée comme inhibant l'activité AMPK dans le cœur, le foie et le tissu adipeux (Barazzoni et al., 2005; Kola et al., 2005) tandis qu'après injection intra-péritonéale, elle a été caractérisée comme stimulant l'activité de l'AMPK dans l'hypothalamus (Andersson et al., 2004; Andrews et al., 2008; Kola et al., 2005). Une autre cytokine, l'interleukine 6 (IL-6) a été caractérisée comme augmentant la phosphorylation de l'AMPK dans les adipocytes et le muscle de souris *in vitro* et *in vivo* (Kelly et al., 2004).

Hormones

Les deux hormones pancréatiques, l'insuline et le glucagon, ont été caractérisées pour moduler l'activité de l'AMPK. Au niveau du cerveau, l'AMPK est impliquée dans l'intégration des signaux périphériques ce qui lui permet d'agir sur la sécrétion de l'insuline (Viollet et al., 2003). Cependant, l'insuline possède aussi un effet régulateur sur l'AMPK. En quantité suffisante, elle permet de diminuer l'activité de l'AMPK dans l'hypothalamus (Minokoshi et al., 2004). Le glucagon a pour sa part une action stimulant l'activité de l'AMPK (Kimball et al., 2004; Sim and Hardie, 1988). La noradrénaline (aussi appelée norépinéphrine) est une hormone

de la médulla qui a été caractérisée pour activer l'AMPK dans les adipocytes blancs et bruns de souris (Hutchinson et al., 2005; Mulligan et al., 2007).

Les glucocorticoïdes ont été caractérisés comme stimulant l'activité AMPK au niveau de l'hypothalamus, favorisant l'appétit et inhibant l'activité AMPK dans les tissus périphériques, stimulant ainsi la lipogenèse et la mise en réserves des lipides (Christ-Crain et al., 2008). Au niveau de l'hypothalamus, l'activation de l'AMPK par la ghréline et les glucocorticoïdes passerait par une activation d'autres hormones : les endocannabinoïdes (Di et al., 2005; Kola et al., 2008).

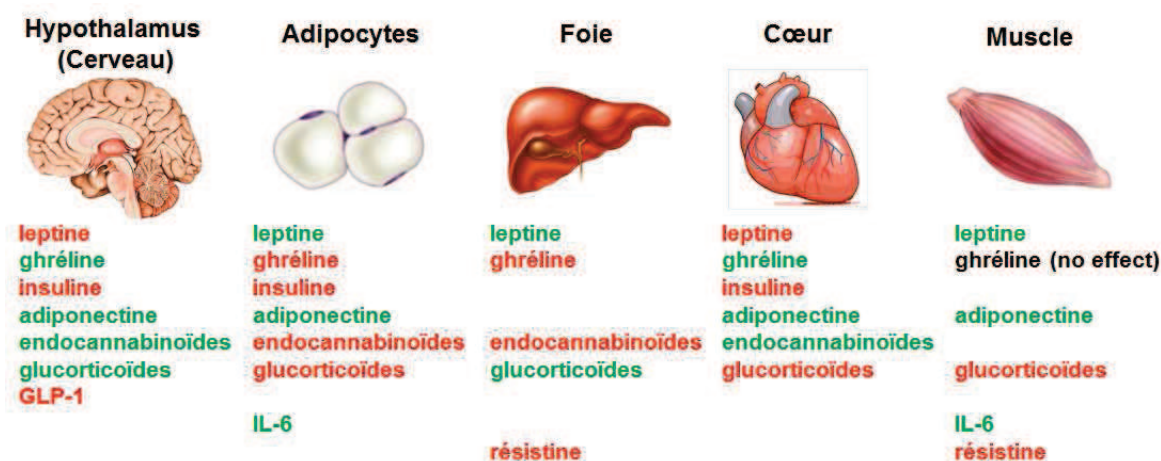


Figure 14 : Hormones et cytokines qui activent (vert) ou inhibent (rouge) l'activité de l'AMPK dans plusieurs tissus centraux et périphériques. Par ordre alphabétique : GLP-1 : glucagon-like peptide 1 ; IL-6 : interleukine 6 (d'après illustration provenant de Lim et al., 2010).

Régulations xénobiotiques

Depuis plusieurs années, l'AMPK a été désignée comme une cible d'intérêt pour trouver de nouvelles molécules traitant le diabète non insulino-dépendant (type 2) (Winder and Hardie, 1999). L'utilisation de criblages de banques chimiques a permis la découverte de nombreuses autres molécules d'origine naturelle ou synthétique qui activent directement ou indirectement l'AMPK.

Agents pharmacologiques

La metformine et la phenformine sont des molécules de la famille des biguanides utilisées comme médicament pour réguler la glycémie dans le diabète de type 2 (DeFronzo and Goodman, 1995). Ces deux agents pharmacologiques sont impliqués dans l'activation de l'AMPK (Hawley et al., 2003; Zhou, 2001), activation modulée par l'AMPK kinase LKB1 (Shaw et al., 2005). Les biguanides inhibent le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (NADH-unbiquionone reductase) amenant à une chute du niveau d'ATP intracellulaire qui va augmenter l'activité de

l'AMPK (El-Mir et al., 2000; Owen et al., 2000). Plusieurs molécules appartenant à une autre classe de molécules antidiabétiques, les « thiazolidinediones » (TZDs) (rosiglitazone, troglitazone et pioglitazone), ont elles aussi un effet activateur sur l'AMPK dans le muscle de souris (Fryer et al., 2002b). Ces molécules augmentent l'activité de l'AMPK en passant par un mécanisme impliquant une augmentation du rapport AMP:ATP (Fryer et al., 2002b).

La molécule de synthèse « 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléoside » (AICAR) (Leckie et al., 1981) a aussi été caractérisée comme étant un agoniste de l'AMPK (Corton et al., 1995). Chez les vertébrés, la plupart des voies métaboliques régulées par AMPK ont été identifiées *in vivo* et *in vitro* grâce à ce composé analogue de l'AMP (Towler and Hardie, 2007). L'AICAR entre dans les cellules par les transporteurs de l'adénosine (Gadalla et al., 2004), puis est converti par l'adénosine kinase en « zeatin riboside-5-monophosphate » (ZMP) (Vincent et al., 1996). Le ZMP possède une structure très proche de l'AMP ce qui va lui permettre d'activer l'AMPK de la même façon qu'une augmentation de la concentration en AMP (cf. Introduction générale 1^{ère} partie, partie III.1) (Figure 15) (Corton et al., 1995; Van Den Berghe and Gruber, 1993; Vincent et al., 1991). La molécule commerciale de chimiothérapie permetrexed (Taylor, 1993) inhibe trois enzymes de la voie de synthèse des purines avec pour résultat une augmentation du ZMP intracellulaire et donc une activation de l'AMPK similaire à celle de l'AICAR (McLeod et al., 2000; Rothbart et al., 2010).

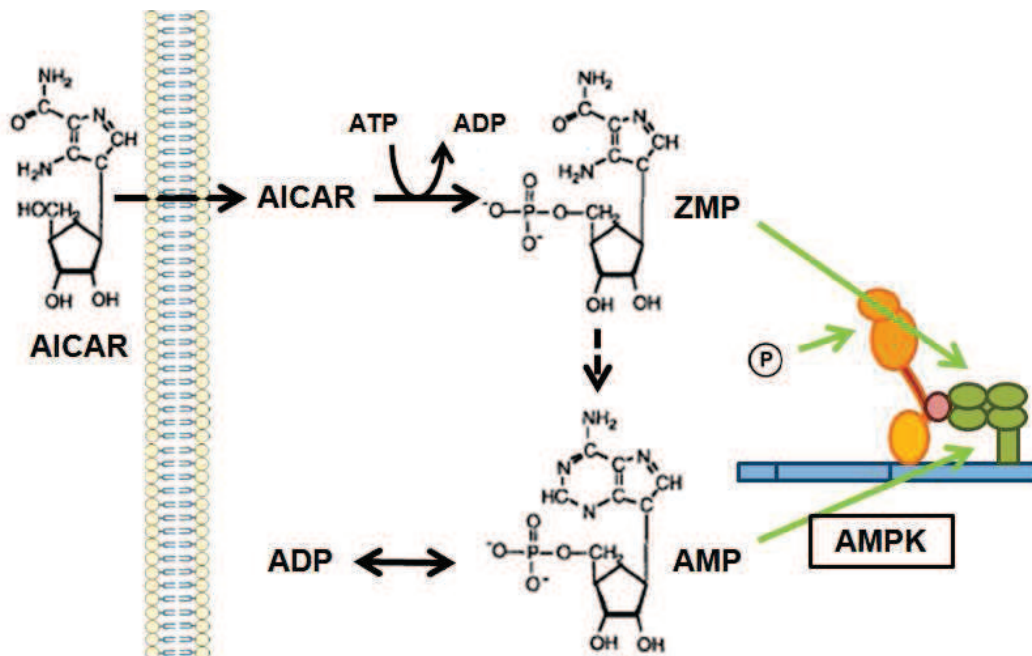


Figure 15 : Entrée, dégradation et activation de l'AMPK par l'AICAR. Par ordre alphabétique : ADP : adénosine diphosphate ; AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléoside ; AMP : adénosine monophosphate kinase ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; ATP : adénosine triphosphate ; ZMP : zeatin riboside-5-monophosphate (d'après illustration provenant de Corton et al., 1995).

Des polyphénols (resvératrol, apigénine, S17834, quercétine) qui peuvent être trouvés dans la peau de plusieurs fruits, sont capables d'activer l'AMPK (Ahn et al., 2008; Baur et al., 2006; Zang et al., 2006). Cependant, le resvératrol peut inhiber l'AMPK lors d'une exposition aiguë (Skrobuk et al., 2012). Chez le rat, le delta-9-tétrahydrocannabinol (THC) (Mechoulam and Gaoni, 1965), un cannabinoïde exogène, augmente l'activité de l'AMPK dans l'hypothalamus et le cœur mais inhibe cette activité dans le foie et le tissu adipeux et n'a aucun effet dans le muscle (Kola et al., 2005). L'arctigénine est un composé retrouvé dans de nombreuses plantes qui active l'AMPK en passant par l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire dans les muscles de souris (Huang et al., 2012). De nombreux dérivés de plantes ou nutraceutiques présentés comme bénéfiques dans la lutte contre le diabète ou le cancer ont été caractérisés comme activant l'AMPK : la berbérine (Lee et al., 2006), l'honokiol (Nagalingam et al., 2012), le curcumin (Pan et al., 2008), la famille des capsaïcinoïdes (Hwang et al., 2008), le ginsénoside Rh2 (Hwang et al., 2007), l'isoginkgétine (Liu et al., 2007), la génisteine (Yan et al., 2011), l'acide kaïnique (Yoon et al., 2008), l'épigallocatechine gallate (EGCG) (Hwang et al., 2005), le sulforaphane (Lee et al., 2012), le D-xylose et ses dérivés (Gruzman et al., 2008). Récemment, la perte de poids induite par la nicotine est associée à l'inactivation de l'AMPK au niveau de l'hypothalamus (Martinez de Morentin et al., 2012).

Plusieurs autres molécules synthétiques ont été caractérisées comme modulant l'activité l'AMPK au niveau central ou périphérique. Certaines de ces molécules activent AMPK : le « 2-deoxy-D-glucose » (2-DG) (Kim et al., 2004), l'A23187 (Hawley et al., 2005), la thiényridine (A-769662) (Cool et al., 2006), le PT1 (Pang et al., 2008), l'isoprotérénol (Gauthier et al., 2008), l'ampkinone (6f) (Oh et al., 2010), le WS070117 (Lian et al., 2011), le WZB117 (Liu et al., 2012), l'ETC-1002 (Srivastava et al., 2012). Par contre, certaines de ces molécules synthétiques ont été caractérisées comme inhibant l'activité AMPK : le 9-β-D-arabinofuranosyladenine (Ara) (Kim et al., 2004), le compound C (dorsomorphine) (Kim et al., 2004), le C75 (Kim et al., 2004), l'acide alpha-lipoïque (Kim et al., 2004), la céruline (Landree et al., 2004), le RSVA314 et le RSVA405 (Vingtdeux et al., 2011).

Poisons métaboliques

Plusieurs poisons métaboliques, ont été caractérisés comme stimulant l'activité AMPK (Hardie, 2004) : L'arsénite, un inhibiteur du cycle de l'acide citrique (TCA) (Corton et al., 1994) ; l'antimicine A et l'azide, deux inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale (Witters et al., 1991) ; l'oligomycine, un inhibiteur d'ATPases (Marsin et al., 2000) ; le dinitrophénol qui perturbe le transport des protons dans la membrane mitochondriale (Witters et al., 1991). Cependant, aucun d'entre eux n'a été décrit comme spécifique de l'AMPK.

IV. Rôle de l'AMPK dans la régulation de l'énergie

IV.1. Mode d'action de l'AMPK

Une fois activée, l'AMPK va maintenir l'homéostasie énergétique au sein de la cellule, d'une part en stimulant les voies productrices d'ATP et d'autre part en inhibant les voies consommatrices d'ATP (Hardie and Hawley, 2001; Hardie et al., 2006; Kahn et al., 2005). Pour activer ou inhiber ces voies, l'AMPK va phosphoryler les cibles possédant les motifs caractéristiques cibles et ainsi moduler leur activité (Gwinn et al., 2008; Mihaylova and Shaw, 2011). L'AMPK exerce des effets rapides en phosphorylant directement ces cibles. L'AMPK peut aussi avoir des effets à long terme en phosphorylant des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes codant différentes enzymes (Jorgensen et al., 2007; Leff, 2003). La régulation de l'expression des gènes par AMPK passe aussi par une régulation cytoplasmique de la stabilité des ARN messagers. En effet, dans des cellules de carcinome colorectal humain (RKO), l'AMPK diminue les niveaux cytoplasmiques de HuR, une protéine de liaison des ARN messagers qui facilite leur traduction. (Wang et al., 2002b).

IV.2. Régulation centrale de l'énergie

L'ensemble des isoformes de l'AMPK a été caractérisé dans tous les tissus du système nerveux central de souris : cortex, hypothalamus, corps calleux, cervelet, moelle épinière, noyau facial, et bulbe olfactif (Turnley et al., 1999). La présence de l'AMPK dans des zones impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire, en particulier l'hypothalamus (Han et al., 2005; Kim et al., 2004), a permis de caractériser l'AMPK comme étant un détecteur du statut nutritionnel à un niveau central de l'organisme (Figure 16) (Kola, 2008). L'activité de l'AMPK dans l'hypothalamus intègre les signaux anorexigènes et orexigènes régulant la prise alimentaire, la dépense énergétique et le poids corporel (Andersson et al., 2004; Foretz et al., 2006; Han et al., 2005; Kim et al., 2004; Kola et al., 2005; Minokoshi et al., 2004). Au niveau de l'hypothalamus, l'activité de l'AMPK hypothalamique peut être régulée par de nombreux signaux orexigènes indiquant un « déficit énergétique » et les signaux anorexigènes indiquant un « surplus d'énergie » (Ramamurthy and Ronnett, 2012).

Plusieurs signaux orexigènes augmentant l'activité AMPK et la prise de nourriture ont été décrits : le jeûne, l'hypoglycémie, la ghréline, l'adiponectine, les endocannabinoïdes, les hormones thyroïdiennes, les glucocorticoïdes (Figure 15) (Andersson et al., 2004; Han et al., 2005; Kola et al., 2008; Kola et al., 2005; Kubota et al., 2007; Lopez et al., 2008; Lopez et al., 2010; McCrimmon et al., 2004; Shimizu et al., 2008; Tanaka et al., 2007). La ghréline augmente

la prise alimentaire et la masse adipeuse en stimulant l'hypothalamus (Codd et al., 1989; Dickson et al., 1993) en particulier dans les neurones synthétisant le « neuropeptide Y » (NPY) (Morris, 1989) et l'« agouti-related peptide » (AgRP) (Kamegai et al., 2001). La ghréline active l'AMPK permettant une libération de NPY et de l'AgRP qui vont stimuler la prise alimentaire (Kohno et al., 2008; Minokoshi et al., 2004).

Plusieurs signaux anorexigènes inhibant l'activité AMPK et réduisant la prise alimentaire ont été décrits : la réalimentation, l'hyperglycémie, la leptine, l'insuline, la résistine, la nicotine, l'« α -melanocyte stimulating hormone » (α -MSH), le « glucagon-like peptide 1 » (GLP-1) (Figure 15) (Andersson et al., 2004; Gao et al., 2007; Martinez de Morentin et al., 2012; Minokoshi et al., 2004; Namkoong et al., 2005; Seo et al., 2008; Steinberg et al., 2006; Tanaka et al., 2007).

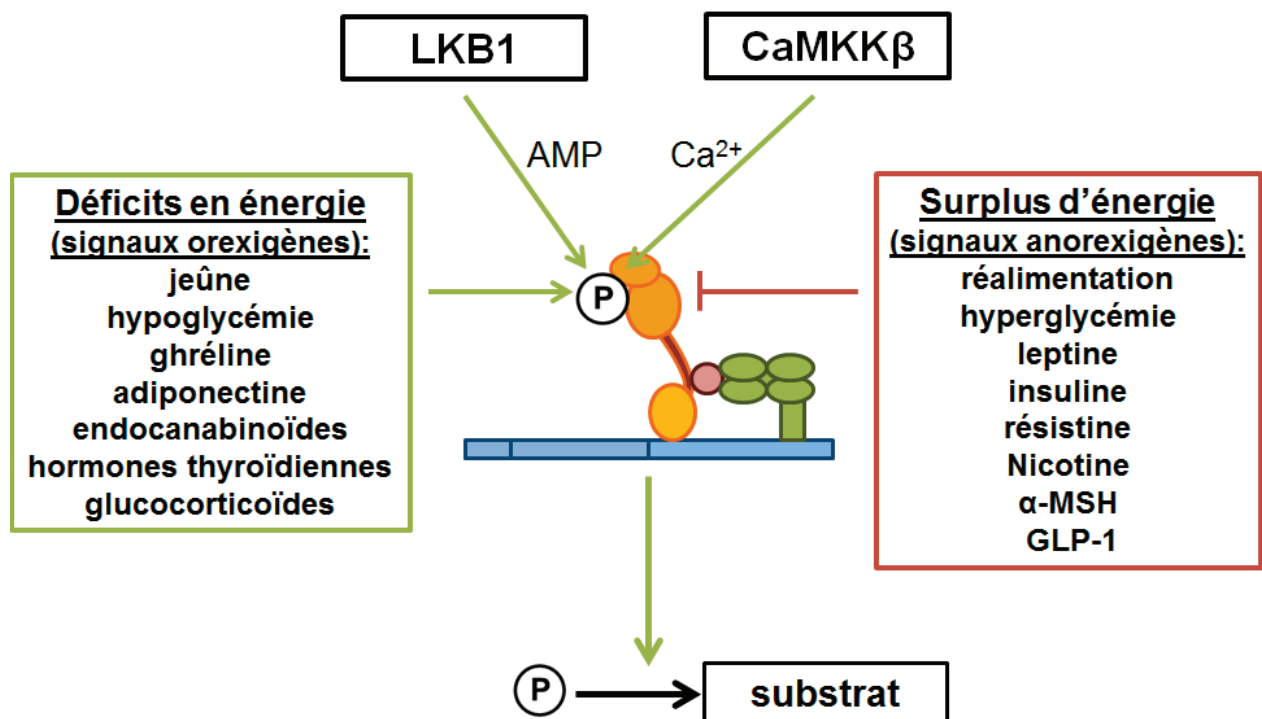


Figure 16 : Régulation de l'activation de l'AMPK au niveau de l'hypothalamus. L'AMPK est activée dans des conditions de déficit en énergie soit par des signaux physiologiques ou physiopathologiques. Ces signaux peuvent soit augmenter l'AMP cellulaire et permettre l'activation de l'AMPK par LKB1, ou soit augmenter le niveau de Ca²⁺ intracellulaire et permettre l'activation de l'AMPK par CaMKK β . En revanche, les signaux de surplus d'énergie inhibent l'activation de l'AMPK et favorisent la déphosphorylation de l'AMPK. L'AMPK module de nombreuses cibles en les phosphorylant et permet de restaurer le pool d'ATP disponible. Par ordre alphabétique : α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone ; AMP : adénosine monophosphate ; Ca²⁺ : ion calcium ; CaMKK β : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β ; GLP1 : glucagon-like peptide 1 ; LKB1 : liver kinase B1. (d'après illustration provenant de Ramamurthy and Ronnett, 2012).

IV.3. Régulation périphérique de l'énergie

En plus de son rôle central dans la gestion des effets anorexigènes et orexigènes au niveau de l'hypothalamus, l'AMPK a aussi été caractérisée comme étant impliquée dans la gestion des métabolismes lipidiques, glucidiques et protéiques (Carling, 2004). Dans ce chapitre, pour des raisons de compréhension, une présentation séparée de l'implication de l'AMPK dans ces trois métabolismes a été choisie.

Régulation du métabolisme lipidique

La voie AMPK joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme des lipides (Figure 17). L'AMPK favorise l'entrée dans les cellules des acides gras en favorisant la translocation vers la membrane plasmique de la « fatty acid translocase/Cluster of differentiation 36 » (FAT/CD36) (Luiken et al., 2003). L'oxydation des acides gras implique une étape limitante régulée par le « palmitoyltransférase carnitine » (CPT1). CPT1 permet le transférer dans la mitochondrie les acyl-CoA couplés à des acides gras libres riches en énergie. Ce processus est inhibé allostériquement par le malonyl-CoA (Ruderman et al., 1999) qui est lui-même synthétisé par l'« acétyl-CoA carboxylase » (ACC) (Trumble et al., 1995). L'activité de l'ACC est inhibée par phosphorylation réversible directement par l'AMPK (Carlson and Kim, 1973; Winder and Hardie, 1996; Winder et al., 1997). Au cours d'une demande d'énergie, l'AMPK activée va inhiber l'ACC qui va réduire la concentration en malonyl-CoA, favorisant l'entrée dans la mitochondrie des acyl-CoA via CPT1. Une fois dans la mitochondrie, les acyl-CoA vont subir une β -oxydation (oxydation des acides gras) permettant de produire de l'ATP et donc de restaurer l'énergie dans la cellule (Figure 17) (Hutber et al., 1997; Merrill et al., 1998). L'AMPK permet d'augmenter l'activité de la « malonyl-CoA décarboxylase » (MCD), diminuant encore plus les concentrations intracellulaires de malonyl-CoA (Assifi et al., 2005). L'oxydation des acides gras peut se faire dans le muscle (Hopkins et al., 2003; Zong et al., 2002), le foie (Foretz et al., 2005) et le tissu adipeux (Matejkova et al., 2004). La leptine et l'adiponectine stimulent l'oxydation des acides gras dans le foie et le muscle squelettique en passant par une activation de l'AMPK dans ces tissus (Minokoshi et al., 2002; Tomas et al., 2002).

L'AMPK est capable d'inhiber l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras tels que l'ACC et la « fatty acid synthase » (FAS), en inhibant l'activité de deux facteurs de transcription : « sterol regulatory element binding protein 1c » (SREBP1c) et « carbohydrate response element binding protein » (ChREBP) (Foretz et al., 2005; Kawaguchi et al., 2002; Zhou, 2001).

L'AMPK inhibe la synthèse des triglycérides en empêchant l'activité de la « mitochondrial glycérol-3-acyl transférase » (mtGPAT) au niveau des muscles et du foie de rat (Muio et al., 1999). L'AMPK inhibe l'HMG-CoA reductase en phosphorylant son résidu Ser871 (Beg et al., 1973; Carling et al., 1989). Cette action a pour conséquence d'inhiber la voie du mévalonate et en particulier la synthèse du cholestérol et des stéroïdes (Henin et al., 1995). Assez paradoxalement, une augmentation de l'activité AMPK inhibe la dégradation des triglycérides en acides gras via l'inactivation de la « lipase hormonosensible » (LHS) (Anthonsen et al., 1998; Garton et al., 1989; Kraemer and Shen, 2002; Sullivan et al., 1994). Cependant, la « protéine kinase A » (PKA), protéine sensible aux niveaux d'AMP cyclique (AMPC) intracellulaires, exercerait une inhibition de l'activité de l'AMPK en phosphorylant le motif Ser173 de la sous-unité α , entravant ainsi le site actif Thr172 (Djouder et al., 2010). PKA une fois activée permet la stimulation de la lipolyse (Belfrage et al., 1984).

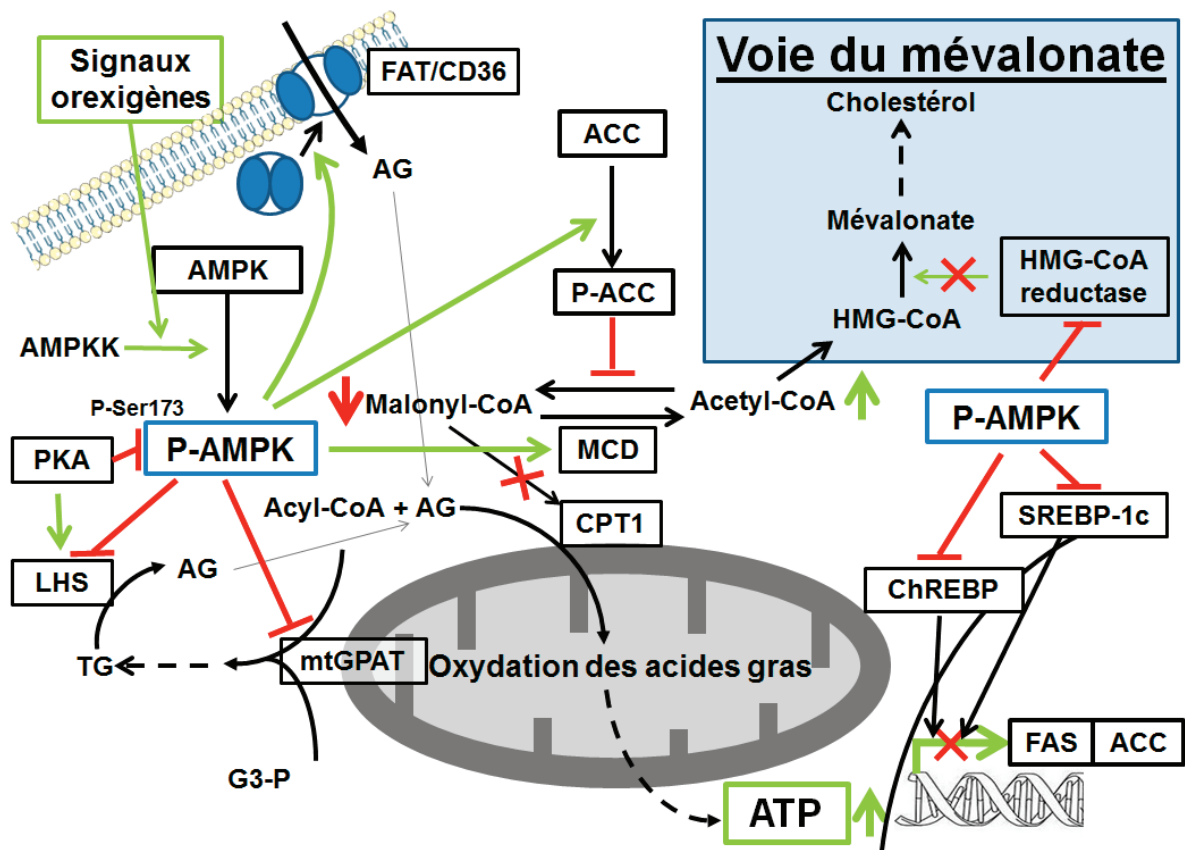


Figure 17 : Régulation du métabolisme lipidique par l'AMPK. Par ordre alphabétique : ACC : acétyl-CoA carboxylase ; AG : acide gras ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; AMPKK : AMP-activated protein kinase kinase ; ATP : adénosine triphosphate ; ChREBP : carbohydrate response element binding protein ; CPT1 : palmitoyltransferase carnitine ; FAS : fatty acid synthase ; FAT/CD36 : fatty acid translocase/Cluster of differentiation 36 ; G3-P : glycérol-3 phosphate ; HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA ; LHS : lipase hormonosensible ; MCD : malonyl-CoA décarboxylase ; MtGPAT : mitochondrial glycérol-3-acyl transférase ; PKA : protéine kinase A ; SREBP-1c : sterol regulatory element binding protein 1c ; TG : tryglycérides.

Régulation du métabolisme glucidique

Au niveau du métabolisme glucidique, l'activation de l'AMPK va favoriser le transport de glucose dans les tissus insulino-sensibles par une voie indépendante de l'insuline (Figure 18). Dans la cellule, plutôt que de stocker le glucose sous forme de glycogène par la « glycogène synthase » (GS) (Carling and Hardie, 1989), réaction coûteuse en énergie, l'AMPK va favoriser la mise en place de l'oxydation du glucose pour pouvoir générer de l'énergie (Foretz et al., 2006). Le rôle de l'AMPK sur le métabolisme glucidique a été démontré par l'augmentation de l'entrée du glucose lors d'une stimulation *in vitro* de l'activité de l'AMPK par AICAR dans les cellules musculaires de rat (Merrill et al., 1997). Les transporteurs membranaires « glucose transporter » (GLUT) (Bell et al., 1990; Fukumoto et al., 1989; James et al., 1989) permettent l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et adipeuses. La voie insuline et l'activité de contraction du muscle (Lund et al., 1995) favorisent les translocations aux membranes plasmiques de certains GLUT principalement via les voies de signalisation impliquant le « phosphatidylinositol 3-kinase » (Pi3K) et « la protéine kinase B » (PKB ou AKT) (Farese, 2001; Kirwan and del Aguila, 2003; Tsao et al., 2001). L'AMPK activée a aussi été caractérisée comme stimulant les translocations de GLUT1 et GLUT4 aux membranes ce qui favorise l'entrée du glucose dans les cellules. L'AMPK favorise l'expression de GLUT1, GLUT4 et l'expression et l'activité de l'hexokinase II (Hex II) (Fryer et al., 2002a; Holmes et al., 1999). Les translocations par l'AMPK se font de manière indépendante de la PI3K et de l'insuline (Russell et al., 1999). En plus de favoriser les translocations des GLUT, l'AMPK permet de réguler leurs concentrations. En effet, une activation de l'AMPK a été corrélée avec une augmentation de l'activation de plusieurs facteurs de transcription de GLUT4 : isoformes de la famille des « myocyte enhancer factor 2 » (MEF2) et du « GLUT4 enhancer factor » (GEF) (Holmes et al., 2005; Ju et al., 2005).

Dans les cellules musculaires cardiaques *in vivo* et *in vitro*, l'AMPK est capable de stimuler la glycolyse en activant la « phosphofructokinase-2 » (PFK-2) (Marsin et al., 2000). La PFK-2 est l'enzyme responsable de la synthèse du fructose 2,6-bisphosphate. Ce dernier active de façon allostérique la « phosphofructokinase-1 » (PFK-1), enzyme clé de la glycolyse.

L'activation pharmacologique de l'AMPK par l'AICAR et la metformine a permis de caractériser une diminution de niveau d'expression de deux gènes impliqués dans la néoglucogénèse : la « phosphoenolpyruvate carboxykinase » (PEPCK) et la « glucose-6-phosphatase » (G6Pase) (Lochhead et al., 2000; Yuan et al., 2002). La régulation par l'AMPK de la transcription de ces gènes impliquerait l'inhibition de la translocation dans le noyau du co-activateur « transducer of regulated cyclic-AMP response element binding activator 2 »

(TORC2). La non-translocation dans le noyau de TORC2 empêcherait l'activation du facteur de transcription « cAMP response element binding protein » (CREB) et donc l'expression du « peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha » (PGC-1 α) (Herzig et al., 2001; Koo et al., 2005). Cette cascade aboutit à l'inhibition de la néoglucogénèse via PGC-1 α , caractérisé comme étant un co-activateur essentiel à l'activation des gènes PEPCK et G6Pase (Ropelle et al., 2009). Des inhibitions transcriptionnelles de PEPCK et G6Pase ont aussi été observées lors d'inhibition par l'AMPK des facteurs de transcription « hepatocyte nuclear factor 4 alpha » (HNF4 α) et « forkhead box transcription factor O1 » (FoxO1) (Barthel et al., 2002; Hong et al., 2003; Leclerc et al., 2001; Wang et al., 2011).

La quantité et la qualité du glycogène intracellulaire sont aussi capables d'inhiber l'AMPK en se liant au domaine CBM de la sous-unité β . Plus le glycogène sera ramifié plus le glycogène inhibera allostériquement l'AMPK. Cette inhibition ne provoque pas de déphosphorylation du résidu Thr172, mais inhibe sa phosphorylation aussi bien par LKB1 que par CaMKK β (McBride et al., 2009).

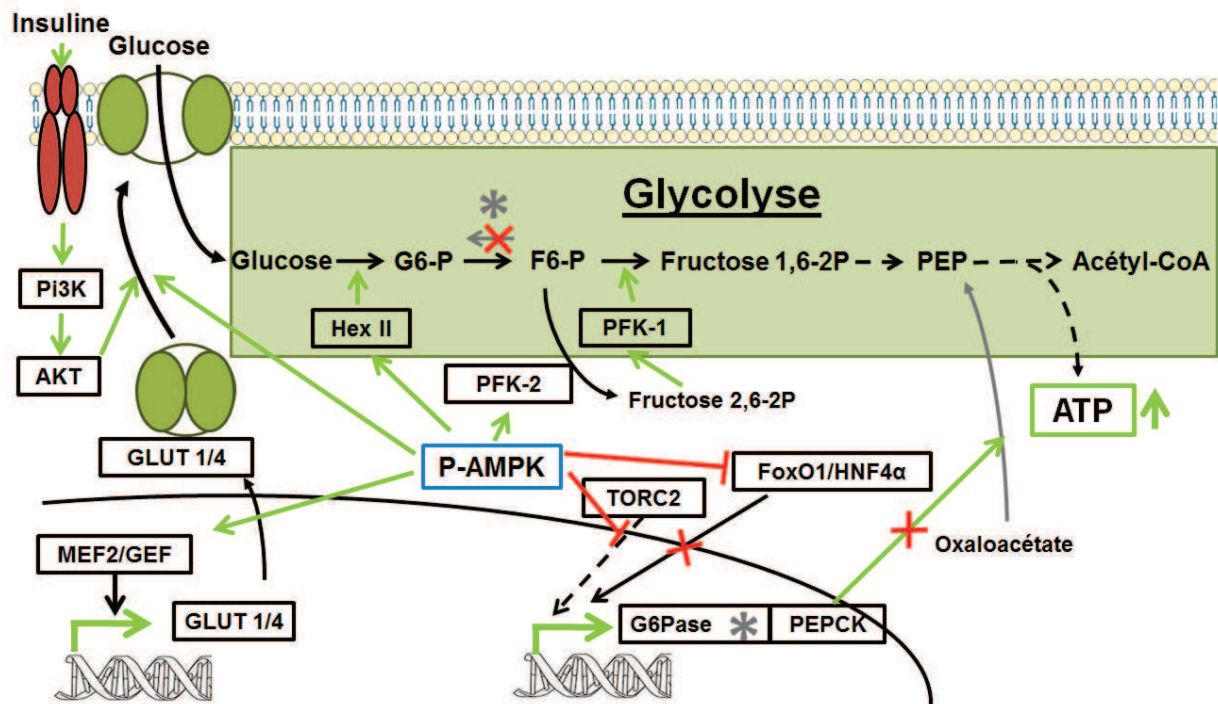


Figure 18 : Régulation du métabolisme glucidique par l'AMPK. Par ordre alphabétique : AKT : protéine kinase B ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; ATP : adénosine triphosphate ; F6-P : fructose-6-phosphate ; FoxO1 : forkhead box transcription factor O1 ; G6-P : glucose-6-phosphate ; GEF : GLUT4 enhancer factor ; GLUT : glucose transporter ; HNF4 α : hepatocyte nuclear factor 4 alpha ; MEF2 : myocyte enhancer factor 2 ; PEP : phosphoénolpyruvate ; PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase ; PFK-1 : phosphofructokinase-1 ; PFK-2 : phosphofructokinase-2 ; Pi3K : phosphatidylinositol 3-kinase ; TORC2 : transducer of regulated cyclic-AMP response element binding activator 2.

Régulation de la synthèse protéique

La synthèse protéique est un processus anabolique complexe très consommateur d'énergie, inhibée par l'AMPK (Figure 19). Dans les hépatocytes, AMPK active directement l'« eukaryotic elongation factor 2 kinase » (eEF2 kinase) sur son résidu Ser398 qui à son tour va phosphoryler et inhiber eEF2 et ainsi inhiber la synthèse protéique (Browne et al., 2004; Browne and Proud, 2004; Horman et al., 2002). L'AMPK inhibe aussi la voie « mammalian target of rapamycin » (mTOR) en activant la protéine « tuberous sclerosis 2 » (TSC2) sur ses résidus sérine différents de ceux ciblés par les autres kinases décrites de TSC2 (Corradetti et al., 2004; Inoki et al., 2003b; Liu et al., 2006; Shaw et al., 2004a). TSC1 et TSC2 forment un complexe qui va réguler la protéine « homolog enriched in brain » (rheb) par une action GTPase (Inoki et al., 2003a). Lorsque le complexe TSC1-TSC2 est activé, il permet une augmentation du niveau de rheb-GDP au détriment de rheb-GTP. mTOR étant activé par des niveaux élevés de rheb-GTP, une inhibition de l'activité mTOR est donc observée. Cette inhibition empêche la phosphorylation par mTOR de la « p70 ribosomal S6 kinase » (S6K1) et l'« elongation factor-4E binding protein 1 » (4E-BP1). Ce dernier maintient donc son inhibition sur le facteur d'initiation « eukaryotic initiation factor 4E » (eIF-4E) (Pain, 1996) et donc la traduction des protéines est inhibée. Une fois phosphorylée, la kinase S6K1 est capable de moduler de nombreuses cibles impliquées dans la synthèse des protéines et la prolifération cellulaire (Laplante and Sabatini, 2012; Magnuson et al., 2012) : « S6K1 Aly/REF-like substrate » (SKAR) ou « cAMP-response-element modulator » (CREM τ) un facteur de transcription impliqué dans la spermatogénèse (Degroot et al., 1994) et le récepteur aux œstrogènes α (ER α) (Yamnik et al., 2009). De plus, S6K1 est aussi capable d'inhiber l'eEF2 kinase (Wang et al., 2002a).

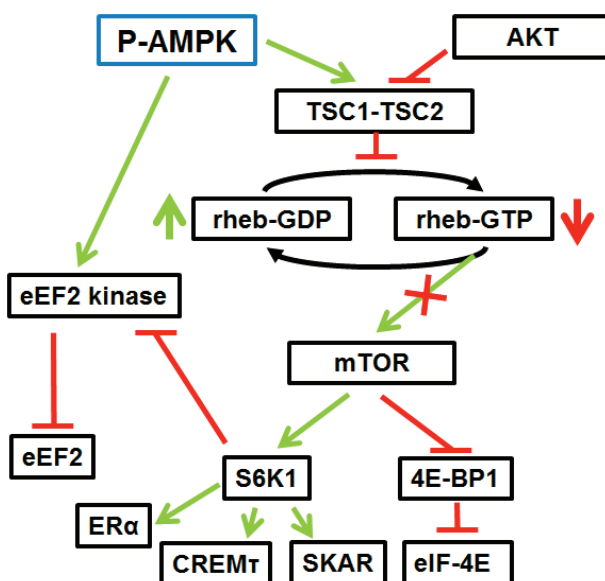


Figure 19 : Régulation de la synthèse protéique par l'AMPK. Par ordre alphabétique : AKT : protéine kinase B ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; CREM τ : cAMP-response element modulator- τ ; eEF2 : eukaryotic elongation factor 2 kinase ; eIF-4E : eukaryotic initiation factor 4E ; ER α : récepteurs aux œstrogènes α ; GDP : guanosine diphosphate ; GTP : guanosine triphosphate ; mTOR : mammalian target of rapamycin ; rheb : homolog enriched in brain ; TSC : tuberous sclerosis complex ; SKAR : 6K1 Aly/REF-like substrate ; S6K1 : p70 ribosomal S6 kinase ; 4E-BP1 : elongation factor-4E binding protein1.

IV.4. Régulation de la reproduction

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, le système AMPK est sensible à de nombreux stimuli, principalement témoins d'une baisse de l'énergie disponible, qui lui permettent d'agir en chef d'orchestre afin de pallier de façon rapide mais aussi à plus long terme aux demandes énergétiques. Véritable senseur et régulateur majeur de l'énergie au niveau cellulaire, tissulaire et corporel, l'AMPK est impliquée dans la régulation des métabolismes lipidiques, glucidiques et protéiques des tissus périphériques. Au niveau plus central de l'hypothalamus, l'AMPK est impliquée dans les dépenses énergétiques et la prise alimentaire. Kinase ubiquitaire, elle a aussi été caractérisée dans les tissus reproducteurs mâle et femelle. En plus de sa sensibilité aux hormones et cytokines, dont certaines impliquées dans la reproduction, l'AMPK possède la capacité de moduler la synthèse des hormones stéroïdiennes via le cholestérol. C'est assez naturellement qu'au cours des années 2000, il a été suggéré que ce régulateur majeur de l'énergie soit impliqué dans les processus très coûteux en énergie de la reproduction (Tosca et al., 2005).

En raison de sa simplicité anatomique et génétique, le nématode *C. elegans* est devenu un modèle animal intensivement étudié. De nombreuses analyses de la fonction de gènes ont été réalisées par la technique de l'ARN interférence dans ce modèle (Izant and Weintraub, 1984; Kamath and Ahringer, 2003). L'inhibition au niveau des ARN messagers a montré que les orthologues de AMPK $\alpha 1$ et AMPK $\alpha 2$ ainsi que LKB1 sont des facteurs essentiels nécessaires à la prolifération germinale en réponse aux signaux neuroendocrines générés par des changements dans les voies insuline ou TGF β (Narbonne and Roy, 2006).

Reproduction au niveau central

L'AMPK est exprimée dans l'hypothalamus et est capable d'intégrer des signaux nutritionnels et hormonaux (leptine, ghréline and adiponectine) afin d'adapter le comportement alimentaire et les dépenses énergétiques (Foretz et al., 2006). Le complexe hypothalamo-hypophysaire contrôle la fonction de reproduction au niveau central permettant la sécrétion de la neurohormone sexuelle « gonadotropin-releasing hormone » (GnRH) ainsi que les gonadotrophines : « hormone lutéinisante » (LH) et « hormone folliculo-stimulante » (FSH).

Recherches d'évidences dans les cultures cellulaires

Les utilisations de l'AICAR et de la metformine, deux agonistes de l'AMPK, sur des cultures cellulaires de neurones à GnRH immortalisés (GT1-7) ont permis une augmentation des phosphorylations de l'AMPK et de l'ACC amenant à une inhibition de la sécrétion de la GnRH,

effet totalement annulé par le compound C, antagoniste de l'AMPK (Coyral-Castel et al., 2008). De plus, l'injection seule du compound C dans une lignée cellulaire de neurones hypothalamiques immortalisés (GT1-7) a permis une augmentation de la sécrétion de la GnRH (Cheng et al., 2011). Toujours dans les cellules GT1-7, l'adiponectine inhibe l'expression d'une protéine impliquée dans la régulation des gonadotrophines, la « kisspeptine 1 » (KISS1), via une activation de l'AMPK (Wen et al., 2012).

La protéine KISS1 stimule la sécrétion de gonadotrophines par l'hypophyse en stimulant la libération de GnRH. KISS1 se lie à son récepteur « G protein-coupled receptor 54 » (GPR54) lui-même exprimé par les neurones à GnRH (Dungan et al., 2006). Sur des cultures cellulaires de neurones hypothalamiques provenant de fœtus de rat (E18 et E19 (Bergonzelli et al., 2001)), l'injection de metformine couplée à des faibles concentrations de glucose a permis de diminuer la phosphorylation de l'AMPK. Cette baisse de phosphorylation a permis l'augmentation de l'expression du NPY (Chau-Van et al., 2007). Le NPY participe à la régulation des fonctions reproductives principalement en modulant, au niveau du système nerveux central de plusieurs espèces, la GnRH et les gonadotrophines (LH, FSH) (Kaynard et al., 1990; Khorram et al., 1987; McDonald et al., 1989). Les effets spécifiques du NPY sur la reproduction au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire sont ambigus et semblent dépendre de l'espèce étudiée, du statut endocrinien et le mode d'administration (Wojcik-Gladysz and Polkowska, 2006). Le NPY est également connu comme un facteur orexigène. Par conséquent, le NPY est considéré comme faisant le lien entre la nutrition et la reproduction au niveau du système nerveux central (Acosta-Martinez et al., 2007; Fatemi et al., 2012; Markiewicz et al., 2003). Dans les cultures cellulaires d'hypophyse de rat, l'activation de l'AMPK par la metformine a permis d'inhiber les sécrétions de FSH et de LH via l'inhibition de deux protéines responsables de leur sécrétion : « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) 3/1 et de la SMAD2 (contraction de « small body size » et « mothers against decapentaplegic ») (Tosca et al., 2011). *In vitro*, une stimulation de l'AMPK au niveau central semblerait avoir un effet inhibiteur sur la reproduction.

Recherches d'évidences in vivo

Une privation de glucose provoque une diminution de la sécrétion des hormones hypothalamiques, et l'AMPK serait impliquée dans la sensibilité aux variations de glucose des neurones à GnRH chez le rat (Roland and Moenter, 2011a; Roland and Moenter, 2011b). *In vivo*, chez la ratte, l'injection intracérébroventriculaire d'AICAR a aussi permis d'augmenter les phosphorylations de l'AMPK et l'ACC spécifiquement dans l'hypothalamus, augmentant significativement la prise alimentaire et diminuant significativement la période entre deux cycles œstraux (Coyral-Castel et al., 2008). Toujours chez la ratte, les injections d'AICAR et

d'adiponectine en intracérébroventriculaire ont permis d'inhiber la sécrétion de GnRH en passant par l'activation de l'AMPK et l'inhibition de la kinase « extracellular signal-regulated kinase » (ERK) (Cheng et al., 2011). La voie MAPK/ERK joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes, en particulier dans les processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose (Schaeffer and Weber, 1999). D'un côté, ERK a été caractérisée comme étant régulée négativement par l'AMPK (Kim et al., 2001; Shibata et al., 2004) et d'un autre côté, comme étant un élément régulant la sécrétion de la GnRH (Sasson et al., 2006), faisant d'elle un candidat possible à l'inhibition de la sécrétion de la GnRH par l'AMPK au niveau central.

L'AMPK semble donc jouer un rôle de senseur de l'énergie disponible au niveau central, en intégrant les signaux nutritionnels et hormonaux d'une diminution de l'énergie disponible. L'AMPK permettrait donc de bloquer l'activité de reproduction, coûteuse en énergie car fortement anabolique.

AMPK au niveau des ovaires

Avant de commencer son développement, les ovocytes immatures sont principalement composés d'un noyau appelé vésicule germinative. Suite à des stimuli appropriés, les ovocytes immatures débutent une maturation complexe qui commence par une rupture de la vésicule germinative (« germinal vesicle breakdown » ou GVBD). Après cette étape, l'ovocyte poursuit son processus de maturation complexe en se développant et en accumulant des réserves, étapes nécessaires à la réussite du développement de l'embryon après fertilisation avec un spermatozoïde (Osanai and Kyojuka, 1985; Stricker et al., 2010a). Chez la plupart des animaux, le GVBD se produit avant la fécondation. Cependant, dans plusieurs cas, le GVBD est observé après la fécondation et donc après la maturation de l'ovocyte. Ce cas de figure est observé chez *C. gigas* (Osanai and Kyojuka, 1985) et plusieurs espèces de bivalves (Stricker, 1999). Malgré cela, ces espèces assurent une maturation de l'ovocyte qui implique les métabolismes lipidiques, glucidiques et protéiques et qui donc implique un réseau complexe chaperonné par les protéines kinases (Stricker, 2011; Stricker et al., 2010a).

Localisation ovocytaire

La présence de l'AMPK a été identifiée dans les différents types de cellules spécifiques du follicule ovarien : ovocytes, cellules de la granulosa, cellules de la thèque, le corps jaune (corpus luteum), cellules du cumulus, chez plusieurs espèces invertébrées (Carattino et al., 2005; Tosca et al., 2007a; Tosca et al., 2006a; Tosca et al., 2005) et dans les ovocytes d'invertébrés (Stricker et al., 2010b).

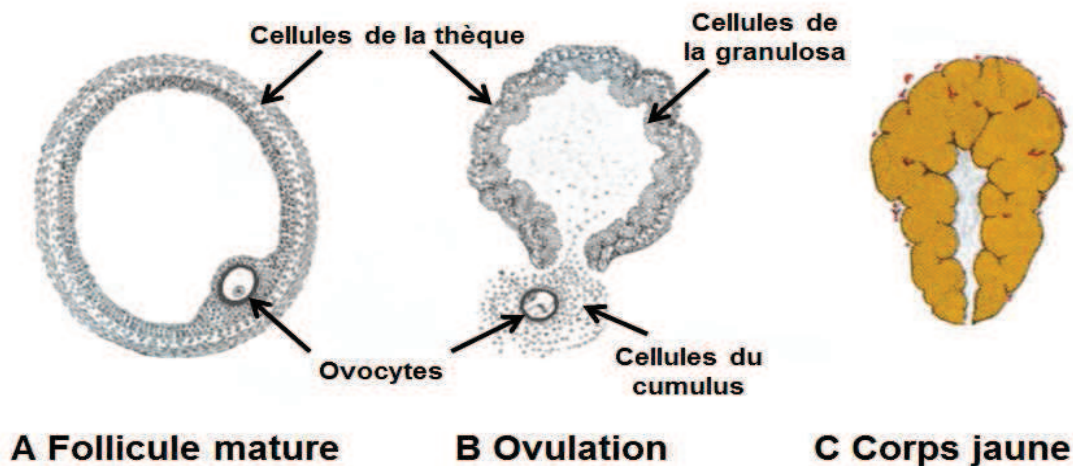


Figure 20 : Illustration de l'ovulation et du corps jaune chez les mammifères. Les composants où la présence de l'AMPK a été identifiée sont indiqués.

Implication dans la stéroïdogénèse

Plusieurs études ont été menées sur le rôle de l'AMPK dans la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa. Après stimulations pharmacologiques par l'AICAR ou la metformine, AMPK inhibe la sécrétion de deux hormones stéroïdiennes : l'estradiol et la progestérone (Tosca et al., 2007a; Tosca et al., 2006a; Tosca et al., 2005 ; Tosca et al., 2006b). Ces diminutions s'expliquent par une inhibition de l'expression de certains facteurs de la stéroïdogénèse : deux enzymes clés de la stéroïdogénèse : le 3 β -hydroxysteroid-deshydrogenase (3 β HSD) (Tosca et al., 2005), la p450 side chain cleavage (p450sc) (Tosca et al., 2006a) ; et une protéine impliquée dans le transport du glucose vers la mitochondrie « steroidogenic acute regulatory protein » (StAR) (Tosca et al., 2006a). L'inhibition de l'estradiol et de la progestérone a été aussi caractérisée comme passant par une inhibition de la voie MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular-regulated kinase) (Tosca et al., 2006a; Tosca et al., 2005).

Régulation de la reproduction par l'AMPK dépendante de l'animal : Cas du GVBD

Chez le ver némerte (*Cerebratulus sp.*), il a été démontré que l'inhibition de l'AMPK permet de bloquer la réalisation du GVBD. Cette régulation par l'AMPK est dépendante de la concentration intraovocytaire de l'AMPc. En effet, une concentration élevée en AMPc désactive l'AMPK probablement en limitant la disponibilité de l'AMP et/ou en inhibant directement l'AMPK (Stricker et al., 2010b). L'implication de l'AMPK dans la réalisation de GVBD d'espèces mammifères est plus controversée. En effet, tout comme le ver némerte, l'activation de l'AMPK permet le blocage du GVBD dans les ovocytes entourés des cellules du cumulus de la vache et de la truie (Bilodeau-Goeseels et al., 2007; Mayes et al., 2007; Tosca et al., 2007b),

tandis que chez la souris, une activation de l'AMPK va déclencher le GVBD aussi bien dans les ovocytes seuls que dans les ovocytes entourés des cellules du cumulus (Chen and Downs, 2008; Downs and Chen, 2006; Downs et al., 2002). Sur un même mécanisme clé et particulièrement conservé, les effets de l'AMPK peuvent donc varier selon les espèces, nécessitant une meilleure compréhension des mécanismes propres de chaque espèce en particulier l'arrêt de la méiose précédant le GVBD (Bilodeau-Goeseels, 2011). Ces observations soulèvent la possibilité de régulations ovocytaires complexes impliquant sûrement plusieurs types cellulaires et plusieurs autres acteurs (Bilodeau-Goeseels, 2008; Stricker et al., 2010a).

AMPK au niveau des testicules

Localisation testiculaire

Les présences des kinases LKB1 et de l'AMPK ont été identifiées dans le testicule de rat (Cheung et al., 2000) (Towler et al., 2008; Woods et al., 2003a), plus précisément dans les cellules germinales, dans les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli (Tanwar et al., 2012; Tartarin et al., 2012; Towler et al., 2008). Plusieurs AMPK-related kinases : MARK4, BRSKs, NUARK2, et SNRK ont aussi été caractérisées dans le testicule (Bessone et al., 1999; Bright et al., 2009; Jaleel et al., 2005; Lefebvre et al., 2001).

Quantité, qualité et succès de fécondation des spermatozoïdes

Le nombre final de cellules de Sertoli atteint pendant la période de prolifération détermine la capacité de production de sperme chez l'adulte. La gonadotrophine FSH, un mitogène majeur des cellules de Sertoli, a été caractérisée comme étant un inhibiteur de l'AMPK. De plus, l'activation pharmacologique de l'AMPK a permis de démontrer son implication dans l'inhibition de la prolifération des cellules de Sertoli via l'inhibition de mTORC (Riera et al., 2012). En diminuant le nombre de cellule de Sertoli, l'AMPK activée diminuerait donc la quantité de spermatozoïdes produits.

L'inactivation de la sous-unité $\alpha 1$ de l'AMPK dans les cellules somatiques et germinales de testicules de rat a permis de montrer le rôle de l'AMPK dans la qualité des spermatozoïdes (Tartarin et al., 2012). Tartarin et al. 2012 soulèvent l'idée que l'AMPK serait impliquée dans la mise en place du cytosquelette par les cellules de Sertoli et les cellules germinales, en particulier dans l'organisation des mitochondries et la conception de la forme de la tête des spermatozoïdes. Ces résultats sont appuyés par l'observation de l'implication de l'AMPK dans le maintien d'un tissu de jonction dense entre les cellules de Sertoli, contribuant ainsi à la préservation d'un environnement optimal pour une spermatogenèse de qualité (Galardo et al., 2010). L'AMPK et LKB1 seraient aussi impliquées dans le succès de reproduction en ayant une influence sur la

motilité. En effet, ces deux kinases régulent positivement la motilité des spermatozoïdes via l'organisation des mitochondries (de Llera et al., 2012; Towler et al., 2008). Dans les testicules où AMPK a été inhibée par « knock-out », la mauvaise organisation des mitochondries dans les spermatozoïdes couplée à leur baisse de motilité serait expliquée par l'implication de l'AMPK dans la biogenèse des mitochondries (Jager et al., 2007). Au niveau du testicule, l'AMPK activée aurait un effet contrasté sur les spermatozoïdes, d'un côté diminuerait la quantité de spermatozoïdes produit en inhibant la prolifération des cellules de Sertoli et d'un autre côté assurerait la qualité des spermatozoïdes via la mobilité et la structure de la tête, en optimisant l'organisation des cellules somatiques.

Implication dans la stéroïdogénèse

L'AMPK est aussi impliquée dans la stéroïdogénèse du testicule. En effet dans les testicules où l'AMPK a été inhibée, une augmentation 5 fois plus importante du cholestérol et une augmentation significative des quantités de StAR, 3 β HSD et P450cc (1,9 3,1 et 1,8 fois respectivement), ont été observées en comparaison aux témoins (Tartarin et al., 2012).

Généralités sur la qualité des gamètes

Chez de nombreuses espèces, la taille des ovocytes est beaucoup plus grande que celle des spermatozoïdes et donc le sperme est le plus souvent considéré comme énergétiquement moins cher à produire que les ovocytes (Bateman, 1948; Parker, 1982). Cette théorie, appelée « Bateman principe », ne semble toutefois pas être applicable aux espèces qui se reproduisent par ponte extérieure où l'investissement de chaque sexe est considéré à peu près équivalent (Don, 1998).

La reproduction sexuée implique la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde. Ces deux gamètes haploïdes apportent un nombre identique de matériel génétique permettant de constituer une nouvelle cellule diploïde. L'ovocyte et le spermatozoïde sont extrêmement différents par leur taille, leur composition et leur activité. En règle générale, le spermatozoïde est une petite cellule au cytoplasme très réduit, tandis que l'ovocyte est une cellule volumineuse dont le cytoplasme contient de grandes quantités de transcrits et de protéines, appelés facteurs maternels. La transmission à l'embryon de facteurs parentaux, non reliés à la transmission de matériel génétique, est apparue comme un phénomène de régulation important influençant le développement de l'embryon (Christians, 2003; Gehring et al., 2009; Gehring et al., 2004; Sturtevant, 1923). Un mauvais métabolisme maternel est capable de provoquer une maturation ovocytaire de moins bonne qualité impactant négativement le développement de l'embryon

(Fleming et al., 2011; Lawlor et al., 2012). Certains de ces effets de transmission de facteurs maternels seraient contrôlés par la voie de signalisation AMPK, principalement par une inhibition ou une diminution de l'activité AMPK (Philp et al., 2008; Ratchford et al., 2007; Zhu et al., 2004; Zhu et al., 2008). De plus, certains gènes impliqués dans le développement embryonnaire sont soumis à l'empreinte parentale. Un gène soumis à empreinte est un gène dont l'activité est différente pour l'une des deux copies parentales. Normalement, la plupart des gènes sont actifs ou inactifs de la même façon pour les deux copies. Dans le cas d'une empreinte parentale, l'une des deux copies est réprimée permettant l'expression d'un gène soit maternel soit paternel (Babinet, 1993; Monk, 1988). Cette empreinte est régulée soit par modification de la transcription, soit par épigénétisme (Surani, 1991). Ainsi, par ce mécanisme, le spermatozoïde pourrait transmettre ses facteurs paternels à l'embryon (Renard et al., 1988).

Contexte et objectifs de thèse

L'huître creuse *C. gigas* est un organisme marin atypique qui a su s'adapter avec succès à de nombreux écosystèmes, principalement grâce à ses capacités exceptionnelles de reproduction et son adaptation aux stress environnementaux. Ces deux fonctions particulièrement dynamiques demandent une modulation de l'énergie importante aussi bien au niveau de la gestion des réserves que de leurs utilisations. C'est pour toutes ces raisons que l'étude de la kinase AMPK, acteur majeur de la gestion de l'énergie, s'est avérée intéressante dans la compréhension de la physiologie de cet organisme.

Comme nous avons pu le voir lors de cette introduction générale, l'AMPK est un régulateur majeur de l'énergie, qui semble intervenir très tôt dans la cascade de la régulation. Chez de nombreuses espèces eucaryotes, le système AMPK peut être régulé par un grand nombre de stimuli et est impliqué dans la régulation de multiples voies biochimiques. Dans ce contexte, il est inévitable que, dans certains cas, des paradoxes apparaissent principalement à cause de compréhensions incomplètes de la biologie. L'accumulation de données provenant de différents modèles biologiques, d'expérimentations en milieux plus ou moins contrôlés (*in vivo*, *in vitro*, *in silico*) et d'études fonctionnelles sont importantes pour mieux comprendre le rôle de l'AMPK (Carling et al., 2012). En plus d'être impliquée dans des régulations globales liées à une déplétion en énergie, l'AMPK semble être aussi engagée dans plusieurs fonctions clés de la reproduction. Son implication passe par un contrôle aussi bien au niveau central qu'au niveau périphérique chez la femelle et chez le mâle. De manière plus globale, la compréhension de l'action des voies de signalisation au cours de la reproduction est d'autant plus complexe qu'elle fait intervenir de nombreux acteurs et varie entre les différents modes de reproduction du monde vivant.

L'objectif du travail présenté dans cette thèse était de réaliser l'étude fonctionnelle de la voie de signalisation AMP-activated protein kinase chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

- La première partie de cette thèse a permis de caractériser au niveau génomique et protéique la conservation de la sous-unité catalytique de l'AMPK et d'étudier son fonctionnement lors d'un stress hypoxique. Deux isoformes tronquées au niveau du domaine catalytique ont pu être caractérisées. Une augmentation rapide de la quantité de protéines de ces sous-unités a été corrélée positivement avec une hypoxie à 30 %.

- La deuxième partie a permis de caractériser la présence des deux autres sous-unités composant le trimère AMPK ainsi que la mise au point d'un dosage de l'activité de

l'AMPK. Ces outils témoins du fonctionnement de l'AMPK, couplés à plusieurs éléments impliqués dans les voies glucidiques et lipidiques préalablement caractérisées ont permis de réaliser une étude visant à caractériser les voies impliquées dans la gestion de l'énergie au cours d'un cycle annuel de reproduction en conditions naturelles.

- Une troisième partie, consacrée à une étude fonctionnelle en milieu contrôlé a été réalisée. Cette étude avait pour but de mieux comprendre le rôle de l'AMPK dans la gestion de l'énergie comme suggéré dans les deux précédentes. Deux approches différentes ont été réalisées de façon séparée et cumulée : une approche physiologique, où une stimulation de l'activité de l'AMPK a été testée par une privation de nourriture et une stimulation abiotique de l'AMPK par injection du composé chimique pharmacologique AICAR.

Enfin, dans une dernière partie nous avons réalisé une discussion générale, synthétisant les résultats obtenus témoignant de l'implication de la voie AMPK dans la gestion de l'énergie chez l'huître creuse *C. gigas*. Une mise en perspectives des études réalisées au cours de ce doctorat conclut cette partie.

Premier chapitre :
Caractérisation des sous-unités α
de l'AMPK chez *Crassostrea gigas*
et régulation au cours de l'hypoxie

I. Contexte de l'étude

Depuis la description et l'implication de cette kinase comme régulateur de nombreuses cibles métaboliques à la fin des années 1980 (Carling and Hardie, 1989), peu d'études ont caractérisé l'AMPK chez les invertébrés marins. Ainsi, l'AMPK a été décrite chez le crustacé *Artemia sp.* (Zhu et al., 2007), plusieurs espèces de crabes, le homard *Homarus americanus*, une espèce de zooplancton (Frederich et al., 2009; Jost et al., 2012; Pinz et al., 2005) et le ver némerte *Cerebratulus sp.* (Stricker, 2011; Stricker, 2012; Stricker et al., 2010a; Stricker et al., 2010b). Au niveau des mollusques, l'AMPK a uniquement été décrite chez un gastéropode pulmoné terrestre *Otala lactea* (Ramnanan et al., 2010). Ce chapitre présente la première étude qui caractérise et quantifie l'expression de la sous-unité α de la kinase AMPK, chez l'huître creuse *C. gigas*.

Les bivalves marins sessiles, tels que *C. gigas*, sont exposés à de fortes variabilités des paramètres physico-chimiques environnementaux. La variation de l'oxygène disponible est une condition jouant un rôle important dans la modification de la gestion de l'énergie et de l'utilisation des ressources chez les bivalves. En réponse à des changements d'oxygène, les bivalves peuvent adapter la vitesse de filtration de l'eau en changeant le taux de ventilation par les branchies et la durée d'ouverture/fermeture des valves (Tran et al., 2000). Ce contexte rend *C. gigas* modèle intéressant pour l'étude de l'impact de l'hypoxie sur les organismes en milieu marin en particulier dans le muscle adducteur, organe responsable de la fermeture des valves.

Le but de ce travail de doctorat était d'obtenir des informations sur les gènes, les protéines et les régulations de l'AMPK dans notre modèle *C. gigas*. Ceci afin de pouvoir tester et valider des outils de quantification de cette kinase dans les tissus de l'huître. Pour cette première étude, nous disposons d'une base de données génomiques d'EST (expressed sequence tag) générée lors de programmes d'étude précédents dans le laboratoire (Fleury et al., 2009). Grâce au nombre de données disponibles (82 312 contigs), nous avons pu caractériser la sous-unité α de l'AMPK de *C. gigas*. Les travaux exposés dans ce premier article sont en révision dans le « Journal of Comparative Physiology - Part B ». Ils présentent la régulation de l'expression aux niveaux des ARN messagers et des protéines de la sous-unité α de l'AMPK dans le muscle lisse et le muscle strié de *C. gigas* au cours d'un conditionnement hypoxique en laboratoire. Les changements de la concentration en oxygène, tels que l'hypoxie, ont été démontrés comme étant les meilleures conditions activatrices d'AMPK (Kemp et al., 1999). Grâce à ces travaux, nous mettons en évidence une régulation originale de la sous-unité α de l'AMPK dans le muscle lisse et strié de l'huître en réponse à l'hypoxie. En effet, l'hypoxie augmente la quantité d'isoformes

tronquées de la sous-unité α de l'AMPK (45 kDa), alors que la protéine AMPK α entière (62 kDa) est maintenue à un niveau constant.

II. Synthèse

II.1. Plusieurs isoformes de la sous-unité α existent

La recherche par oligonucléotides spécifiques placés en position « start » et « stop » du gène de la sous-unité α a permis de découvrir trois isoformes exprimées de cette sous-unité. Un ADN complémentaire d'une sous-unité α de 1 647 paires de base codant une protéine de 62 kDa théorique. Deux autres ADN complémentaires de sous-unités α plus petites de 1 212 et 1 284 paires de base codant pour des protéines de 46 kDa et 48 kDa ont été caractérisés. L'isoforme de 62 kDa correspond à une taille observée chez de nombreuses espèces où la sous-unité α a été décrite. Les deux isoformes courtes de la sous-unité α sont issus d'un épissage alternatif de la première sous-unité. Elles sont tronquées au niveau d'une grande partie de leur domaine kinase, et en particulier le site de phosphorylation situé en Thr172. La seule description connue d'une sous-unité α de l'AMPK tronquée dans son domaine catalytique provient d'une séquence du génome de l'organisme invertébré *C. elegans* (Wormbase.org) (Yook et al., 2012). Cette espèce possède une isoforme tronquée en région N-terminale à laquelle il manque une partie du domaine kinase mais conserve le site de phosphorylation Thr172. Aucune donnée fonctionnelle n'a été obtenue sur cette isoforme tronquée.

Il est à noter qu'un doute peut subsister quant à la corrélation entre l'observation des ARN messagers et de la détection à la taille attendue des sous-unités α tronquées dans le même tissu. Aucune preuve directe ne permet de lier ces deux observations. C'est d'ailleurs ce point particulier qui contrarie un examinateur de cet article scientifique. Nous cherchons à vérifier que les anticorps hétérologues que nous avons utilisés reconnaissent bien l'une ou l'autre ou les deux protéines tronquées identifiées en ARN messager. Plusieurs éléments tendent à confirmer que cette protéine provient bien de la traduction des ARN messagers tronqués. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été traduites puis comparées aux séquences antigéniques que reconnaissent les deux anticorps hétérologues utilisés par les services techniques du fournisseur d'anticorps (Cell Signaling Technology). Ces derniers ont confirmé que les anticorps monoclonaux utilisés ciblent une région située au niveau des 30 premiers acides aminés en position N-terminale des deux sous-unités α de l'AMPK humaine. Par homologie de séquence, nous avons pu confirmer que chez *C. gigas* cette région se trouve fortement conservée avec les deux sous-unités α de l'homme (cf. Figure 2 de l'article 1 : Regulation of truncated AMP-activated protein kinase α (AMPK α) in response to hypoxia in the muscle of Pacific oyster

Crassostrea gigas). Afin de vérifier que les anticorps hétérologues que nous avons utilisés reconnaissent bien l'une ou l'autre ou les deux protéines tronquées identifiées en ARN messager, une approche d'immunoprécipitation utilisant ces anticorps, couplée à une analyse de spectrométrie de masse est actuellement en cours de réalisation.

II.2. Détection tissulaire des isoformes de la sous-unité α

Une quantification des sous-unités α a été réalisée dans les principaux organes de *C. gigas* au cours d'un stade de repos sexuel (stade 0). La sous-unité α complète de 62 kDa est retrouvée de façon ubiquitaire dans les tissus. Les isoformes α tronquées, indifférenciables par quantification sur membrane en Western blot, sont exprimées de façon tissu-spécifique, et principalement dans le muscle lisse et le muscle strié. Chez les vertébrés, les sous-unités composant le trimère AMPK ont été caractérisées à la fois dans le muscle strié (Musi and Goodyear, 2003; Saha et al., 2000) et le muscle lisse, essentiellement le muscle lisse cardio-vasculaire (Ferri, 2011; Sung et al., 2011). Ces caractérisations, couplées à de nombreuses études fonctionnelles, ont permis de caractériser l'importance de la voie AMPK dans la régulation de l'énergie dans les muscles (Sanchez et al., 2012).

II.3. Comportement des isoformes de la sous-unité α au cours de l'hypoxie

Dans le muscle strié et dans le muscle lisse, la sous-unité α complète n'a montré aucune différence significative dans la variation de quantité au cours du temps en condition hypoxique par comparaison aux témoins placés en normoxie. Cependant, nous avons réussi à montrer une réponse à l'hypoxie spécifique du muscle lisse au niveau des sous-unités α tronquées. L'augmentation de la quantité en protéine des isoformes tronquées a été corrélée avec une augmentation significative de la quantité de l'AKT. Cette kinase est une enzyme clé de la voie de signalisation de l'insuline qui contrôle le métabolisme du glucose intracellulaire.

II.4. Conclusion de cette étude

L'activité musculaire (Hayashi et al., 1998; Hutber et al., 1997) ainsi que les concentrations faibles en oxygène, telles que l'hypoxie (Kemp et al., 1999; Marsin et al., 2000), ou l'anoxie (LaRue and Padilla, 2011; Rider et al., 2009) sont des conditions qui ont été caractérisées pour stimuler l'activation de l'AMPK sans provoquer de changement significatif de la quantité de protéines. Ces observations sont confirmées dans notre étude, où la sous-unité α entière ne montre pas de changements significatifs au niveau de la quantité de protéine.

Cependant, nos résultats démontrent que chez l'huître une réponse muscle spécifique à l'hypoxie au niveau de la quantité des sous-unités α tronquées existe. Il semblerait que ces sous-unités tronquées soient nécessaires pour le maintien du métabolisme aérobie pendant un temps d'au moins 6 h dans le muscle lisse permettant de remplir son rôle de fermeture des valves. Six heures correspondent à la durée pendant laquelle une huître placée sur l'estran est fermée en condition naturelle au cours de la basse marée. *Crassostrea gigas* est souvent posée ou fixée sur son substrat sur la valve inférieure creuse (Quayle, 1969). Cette position lui permet pendant les périodes d'émersion de garder de l'eau de mer dans la cavité palléale. Les valves fermées piègent ainsi cette eau ce qui permet à l'huître de résister à la dessiccation et d'utiliser l'air dissous pour respirer (Grieshaber et al., 1994; Newell, 1979). L'air dissous, une fois consommé peut être renouvelé grâce à une ouverture des valves permettant un transfert d'oxygène entre l'air atmosphérique et l'eau de mer présente dans la cavité palléale. Ce renouvellement d'oxygène permet de maintenir la condition de normoxie plus longtemps (Lent, 1968; Rafrafi and Uglow, 2009). Les huîtres ont été volontairement placées dans une eau hypoxique pour éviter ce phénomène de réoxygénation. Au cours de cette étude, le muscle adducteur, responsable de la fermeture et du maintien de la fermeture des valves, se trouve donc doublement stimulé car il subit d'un côté un environnement hypoxique et d'un autre côté doit utiliser de l'énergie pour pouvoir fournir une activité musculaire.

La caractérisation d'une régulation significative de ces sous-unités tronquées n'a jamais été décrite lors d'études sur l'AMPK chez les autres modèles, et pose des questions concernant leur rôle physiologique. Une hypothèse a été soulevée : les formes tronquées de la sous-unité α de l'AMPK agiraient en tant que régulateur transdominant négatif de la fonction exercée par la kinase entière, par compétition pour la liaison aux sous-unités régulatrices β et γ . Cette hypothèse est à confirmer par des études complémentaires. Par exemple, la liaison des sous-unités α tronquées avec les sous-unités β et γ pourrait être étudiée *in vitro* à l'aide des protéines recombinantes. Par ailleurs, des expériences utilisant la technique de l'ARN interférent ciblant l'une des isoformes de la sous-unité α permettraient de mieux comprendre leur rôle physiologique.

III. Article 1 : « Regulation of truncated AMP-activated protein kinase α (AMPK α) in response to hypoxia in the muscle of Pacific oyster *Crassostrea gigas* »

Article sous presse dans le journal « *Journal of Comparative Physiology - Part B* ». ISSN : 0174-1578. DOI: 10.1007/s00360-013-0743-6. Impact factor 2011 : 1,966.

Regulation of truncated AMP-activated protein kinase α (AMPK α) in response to hypoxia in the muscle of Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

Eric Guévelou^a, Arnaud Huvet^a, Rossana Sussarellu^{a,b}, Massimo Milan^c, Ximing Guo^d, Li Li^e, Guofan Zhang^e, Virgile Quillien^a, Jean-Yves Daniel^a, Claudie Quéré^a, Pierre Boudry^a and Charlotte Corporeau^{a*}.

^a Ifremer, UMR 6539 LEMAR, Centre Bretagne Z.I. Pointe du Diable. 29280 Plouzané, France.

^b CNRS IUEM-UBO, UMR 6539 LEMAR, Place Nicolas Copernic. 29280 Plouzané, France.

^c Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padova, Viale dell'Università 16, Legnaro, Padua, Italy.

^d Haskin Shellfish Research Laboratory, Institute of Marine and Coastal Sciences, Rutgers, the State University of New Jersey 6959 Miller Avenue, Port Norris, NJ 08349, USA.

^e Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, No. 7 Nanhai road, Qingdao, 266071 China.

*Corresponding author: Dr. Charlotte Corporeau, Ifremer, UMR 6539 LEMAR, Centre Bretagne Z.I. Pointe du Diable. 29280 Plouzané, France.

Tél: +33 2 98 22 47 64

Fax: + 33 2 98 22 46 53

E-mail: Charlotte.Corporeau@ifremer.fr

ABSTRACT

AMP-activated protein kinase α (AMPK α) is a key regulator of energy balance in many model species during hypoxia. In a marine bivalve, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, we analyzed the protein content of adductor muscle in response to hypoxia during 6 h. In both smooth and striated muscles, the amount of full-length AMP-activated protein kinase α (AMPK α) remained unchanged during hypoxia. However, hypoxia induced a rapid and muscle-specific response concerning truncated isoforms of AMPK α . In the smooth muscle, a truncated isoform of AMPK α was increased from 1 to 6 h of hypoxia, and was linked with accumulation of AKT kinase, a key enzyme of the insulin signaling pathway which controls intracellular glucose metabolism. In this muscle, aerobic metabolism was maintained over the 6 h of hypoxia, as mitochondrial citrate synthase activity remained constant. In contrast, in striated muscle, hypoxia did not induce any significant modification of neither truncated AMPK α nor AKT protein content, and citrate synthase activity was altered after 6 h of hypoxia. Together, our results demonstrate that hypoxia response is specific to muscle type in Pacific oyster, and that truncated AMPK α and AKT proteins might be involved in maintaining aerobic metabolism in smooth muscle. Such regulation might occur *in vivo* during tidal intervals that cause up to 6 h of hypoxia.

metabolism in smooth muscle. Such regulation might occur *in vivo* during tidal intervals that cause up to 6 h of hypoxia.

Keywords: Marine bivalve, *Crassostrea gigas*, Hypoxia, AMP-activated protein kinase, Alternative splicing, Adductor muscle.

1. INTRODUCTION

Sessile benthic marine mollusks of the intertidal zone, such as the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, are exposed to large changes in environmental conditions every day. Over the tidal cycle, temporal variation in environmental factors such as oxygen availability or food supply may be considerable (Newell 1979). Moreover, eutrophication may increase organic matter in the water column, reducing levels of available oxygen, which can lead to hypoxia and sometimes anoxia (Gray et al. 2002; Wu 2002). Sessile organisms cannot escape from unfavorable environmental conditions and must adapt to oxygen variation in their environment; therefore, they would be expected to be tolerant of oxygen deprivation. This context makes marine bivalves good model species to study mechanisms involved in oxygen deprivation response (Storey 1993).

Hypoxia is a key environmental condition that plays a role in changing energy management and resource utilization in bivalves. Bivalves can adapt filtration rate in response to hypoxia by changing either the ventilation rate over the gills or the duration of valve opening/closing (Tran et al. 2000). After prolonged hypoxia, the oyster energetic metabolism is modified by a switch from the aerobic to the anaerobic ATP production pathway (Le Moullac et al. 2007a). The oxygen critical point threshold (P_{cO_2}), at which oysters switch to anaerobic metabolism, was determined at approximately 3 mg/L of oxygen (close to 30 % oxygen saturation), depending on water temperature (Le Moullac et al. 2007b). To identify pathways that are activated or altered in response to hypoxia, a transcriptomic study was conducted in *C. gigas* during long-term hypoxia at 30 % oxygen saturation (Sussarellu et al. 2010). In the digestive gland, the principal biological processes that were up- or down-regulated were respiration, energetic metabolism assessed by the respiratory chain compartment and antioxidant defense in response to oxidative stress observed during hypoxia and/or normoxic recovery (Sussarellu et al. 2010). Lastly, a compensatory increase in activities of two mitochondrial enzymes, citrate synthase and cytochrome c oxidase, was reported in *Crassostrea virginica* after 2 weeks of hypoxia, suggesting that this species has both a better tissue aerobic capacity to compensate for reduced oxygen availability and a lower sensitivity to hypoxia than *C. gigas* (Ivanina et al. 2011).

In vertebrates, the AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway has been described as the key system regulating energy balance in cells during hypoxic conditions (Hardie 2007). AMPK is a heterotrimeric kinase composed of a catalytic α -subunit and two regulatory subunits, β and γ . Genes encoding the three subunits of AMPK are highly conserved among the eukaryotic species, including vertebrates, invertebrates, plants, fungi, and protozoa (Hardie

2003). In human, 2 or 3 genes encode each subunit, giving rise to 12 possible heterotrimeric combinations, and splice variants further increase the potential diversity of AMPK proteins (Towler and Hardie 2007).

In mammals, AMPK is activated by metabolic stresses such as glucose deprivation, oxidative phosphorylation, ischemia or lack of oxygen (Hardie 2008). A high cellular ratio of AMP/ATP triggers the phosphorylation and stimulation of AMPK kinase activity (Choi et al. 2001). AMPK activation is regulated at the post-translational level through phosphorylation and dephosphorylation. Many phosphorylation sites have been described in AMPK subunits α and β (Hawley et al. 1996; Woods et al. 2003; Mitchelhill et al. 1997). In rat liver, the AMPK α threonine 172 site has been identified as the determinant and required phosphorylation site for stimulation of AMPK kinase activity (Neumann 2003; Hawley et al. 1996; Suter et al. 2006). The amino-acid sequence surrounding threonine 172 is highly conserved in all AMPK α homologues, suggesting that threonine 172 phosphorylation is important for AMPK activation in all species (Stapleton et al. 1996; Carling et al. 2011).

Once activated by low energy status, AMPK activates ATP-producing catabolic pathways such as lipolysis, glycolysis and glucose uptake, and deactivates ATP-consuming anabolic pathways such as glycogen synthesis and lipogenesis (Hardie 2004). Activated AMPK can rapidly phosphorylate and activate a wide array of target key metabolic enzymes (Hardie 2004). Long-term effects of AMPK activity have also been demonstrated on the gene expression of several metabolic enzymes involved in glucose homeostasis (Viollet et al. 2003; Hardie 2003; Sato et al. 2011). Another signaling pathway linked to mammalian cell survival during energy deficiency in hypoxic conditions is the phosphatidylinositol 3 kinases (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway, which regulates glucose metabolism and controls cell apoptosis (Kim et al. 2012; Parcellier et al. 2008; Alvarez-Tejado et al. 2001). The kinase AKT is activated by serine/threonine phosphorylation so as to increase glucose transport into cells to provide ATP to serve as fuel (Manning and Cantley 2007).

Few studies have investigated AMPK in mollusks or marine invertebrates, although AMPK α has been already described in a terrestrial pulmonate gastropod (Ramnanan et al. 2010), the brine shrimp (Zhu et al. 2007), some crab species, lobster, one zooplankton species (Frederich et al. 2009; Jost et al. 2012) and a nemertean worm (Stricker 2011; Stricker et al. 2010). To date, only one study has characterized AMPK α threonine 172 phosphorylation in a marine invertebrate (*Cancer irroratus*) subjected to oxygen depletion (Pinz et al. 2005), and no data are available on genes or AMPK protein subunits in oysters.

The main objectives of this study were to characterize the AMPK α isoforms and to define their potential role in the hypoxic response of the Pacific oyster *C. gigas*. The hypoxic response

of oyster was explored in the adductor muscle, which is composed of smooth and striated muscle, by quantifying the protein content of AMPK α isoforms using heterologous antibodies.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Biological material

2.1.1. Hypoxia conditioning and muscles sampling

Oyster conditioning and sampling were performed as described by Sussarellu et al. (2011). Briefly, to analyze the hypoxic response, 120 wild Pacific oysters aged approximately 24 months were sampled during their sexual resting stage (January 2009) from an oyster farm in the Bay of Brest (Plougastel, France) and transported to the ORPHY laboratory facilities (UBO, Brest, France) where they were placed in eight 50 L tanks ($n = 15$ oysters per tank) and acclimated for 12 h in fully oxygenated through-flowing seawater.

The oysters were then kept out of the water for 3 h air drying to simulate a low tide, before being re-immersed in sea water in 8 tanks. In four tanks, oysters were maintained under normoxic conditions for 6 hours in fully oxygenated through-flowing seawater (oxygen at 8.8 mg/L, 100 % oxygen saturation at 11 °C, 34 salinity). In four other tanks, hypoxic conditions were maintained for 6 hours by reducing oxygen down to 2.6 mg/L (30 % oxygen saturation at 11 °C, 34 salinity), using an oxygen depletion system as described by Pichavant et al. (2000). Hypoxic oxygen concentrations were reached by bubbling nitrogen through seawater in a reservoir tank supplying the 4 rearing tanks. Surface gas exchanges in the experimental tanks were limited by positioning the water outflow below the water surface. Oxygen concentration in the tank was monitored regularly and adjusted, when necessary, to keep hypoxia level constant throughout the experiment. Water flow rates were 0.7 and 3.6 L/min under hypoxic and normoxic conditions, respectively. Water was collected in a reservoir, re-oxygenated with electric pumps, filtered (0.22 μm) and UV-treated, before being re-circulated through the system. Samples of 5 oysters were taken from each tank after 1, 3, and 6 hours. These oysters were opened and dissected: the two parts composing the adductor muscle (smooth and striated muscle) were separated, pooled ($n = 5$) and immediately frozen in liquid nitrogen. For each condition and sampling time (hypoxia and normoxia), 4 pools of 5 muscles (striated and smooth separately) were sampled, one for each tank. These pools were ground using a Danguomeau homogenizer at -180°C and stored at -80°C for further analysis.

2.1.2. Wild oyster tissue sampling

To analyze a specific protein content in several oyster tissues, six wild Pacific oysters aged approximately 36 months (live weight 59.5 ± 10.5 g) were collected during their sexual

resting stage (January 2009) in the Bay of Brest (Plougastel, France). The oysters were opened and their tissues rapidly dissected. The tissues sampled were mantle edge, digestive gland, mantle, palps, smooth muscle, striated muscle, heart, gills and visceral ganglia. After dissection, specific tissues from several animals were pooled and immediately stored in liquid nitrogen for further utilization. For each tissues, 4 pools have been made of 4four oysters ($n = 4$). These pools were ground at $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ using a Danguomeau homogenizer and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for later analysis.

2.2. Methods

2.2.1. Cloning of AMPK α isoforms

Total RNA of striated muscle (sampled from wild oyster tissues) was extracted using Extract-All (Eurobio), at a concentration of 50 mg frozen powder /1.5 mL buffer. Samples were then treated with DNase I (1 U/ μg total RNA, Sigma) and RNA quality was assessed using RNA nano chips and Agilent RNA 6000 nano reagents (Agilent Technologies) according to manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured at 260 nm using an ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies), with the conversion factor 1OD = 40 μg /mL RNA. From 2 μg total RNA, RT-PCR amplifications were carried out as described by Huvet et al. (2004).

Two primers were designed based on an ampk α sequence extracted from a draft genome assembly covering the start and stop codons: Cg-ampk α -Start (5'-CGGAGAAGTCCTCCTCCTCT-3') and Cg-ampk α -Stop (5'-CTATCTGGCCAGTGTGGTGA-3'). Putative ampk α cDNAs were amplified using the corresponding primers pair via PCR with an annealing temperature of 45 $^{\circ}\text{C}$ (protocol in Bacca et al. 2005). The PCR products were electrophoresed on 1 % (w/v) agarose in 1x TAE buffer gels (TAE, tris, acetic acid, 0.5M EDTA) and stained with ethidium bromide. Gel-extracted PCR products (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen) were cloned using the TOPO TA cloning kit vector (Invitrogen), plasmids were then purified (Nucleospin Plasmid DNA plasmid purification, Macherey-Nagel), digested (restriction enzyme *EcoR*1) and sequenced (Beckman Coulter Genomics).

Homology searches were performed with the obtained DNA sequences using a BLASTX searches (Altschul et al. 1997). The DNA sequences were then converted into predicted amino acid sequences using the ExpASy translate tool (Gasteiger et al. 2003) and a multiple alignment was performed on selected sequences using CLUSTALW (Combet et al. 2000). Protein domain conservation was performed using ExpASy prosite (de Castro et al. 2006) and SMART (Schultz et al. 1998; Letunic et al. 2011).

2.2.2. Total protein extraction

Total protein extracts were obtained from the tissues sampled in wild *C. gigas* oysters and from pools of striated and smooth muscle from the hypoxia and normoxia conditioned oysters, according to Corporeau and Auffret (2003). To solubilize proteins, powdered tissues were homogenized in a lysis buffer containing phosphatase and protease inhibitors (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 0.5 % Igepal, 5 mL phosphatase inhibitor cocktail II, 2 tablets Complete EDTA free protease inhibitor cocktail; pH 8.8 at 4°C). Total protein extracts were then quantified using a DC protein assay (Biorad) and concentration was determined quantitatively using 96-well micro-plates (Nunc) and a micro-plate reader connected to KC4 v3 software (Bio-Tek Instruments, Inc).

2.2.3. Citrate synthase activity

Prior to quantification of citrate synthase activity (CS), each protein lysate was adjusted to a final concentration of 3.5 mg/mL by adding lysis buffer. CS activity was measured in a medium containing 100 mM Tris-HCl pH 8, 0.2 mM acetyl coA, 0.1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The reaction was initiated by addition of 0.5 mM oxaloacetate (final concentration) in a total volume of 200 μ L and the activity was measured for 10 minutes at room temperature at 412 nm ($\epsilon = 13,600$ L/mol/cm).

2.2.4 Western blot analysis

Prior to Western blot analysis, each protein lysate was adjusted to a final concentration of 5 mg/mL by adding lysis buffer. Protein samples were then denatured by Laemmli solution (0.6 M Tris-HCl, 1 mL glycerol, 10 % w/v SDS, 0.5 mL 0.1 % w/v bromophenol blue, 0.5 mL β -mercaptoethanol) and 90 μ g of each protein extract was loaded onto a 10 % SDS-polyacrylamide gel. Proteins were then transferred to a PVDF membrane (Biorad) for immunodetection on Western blot. Immunodetection was performed with several heterologous antibodies directed against AMPK α that were validated for their cross reactivity in *C. gigas*: cell signaling technology (CST) technical services blasted the antigenic epitope sequence of heterologous anti-AMPK α antibodies against the genome of *C. gigas*, very recently available (Zhang et al. 2012), and demonstrated that only AMPK α protein of *C. gigas* could be recognized by these antibodies (CST; personal communication). Thus, immunodetection was performed with several anti-AMPK α antibodies (Ozyme, CST): a rabbit monoclonal anti-AMPK α antibody directed against amino terminal sequence of human AMPK α (dilution 1:1,000; CST #2603), a rabbit monoclonal anti-AMPK α antibody directed against residues surrounding Lys40 of human AMPK α (dilution 1:1000; CST #5832), and a mouse monoclonal antibody directed against purified recombinant human AMPK α 1 protein (dilution 1:1,000; CST #2793). We also used a polyclonal anti-AKT

antibody directed against carboxy-terminal sequence 215 of mouse Akt (dilution 1:1,000; CST #9272).

Immunodetection was performed either with monoclonal anti human AMPK α antibodies (dilution 1:1,000; rabbit #2603 and rabbit # 5832 for 46 and 48 kDa isoforms and mouse #2793 for entire 62 kDa; Ozyme, CST) or a rabbit polyclonal anti-AKT antibody (dilution 1:1,000; #9272; Ozyme, CST). To ensure for cross-reactivity of heterologous antibodies, Cell Signaling Technology technical services confirmed using blast that the antigenic region of these commercially available antibodies recognized *C. gigas* AMPK α proteins (CST; personal communication). Blots were revealed using an HRP-linked secondary goat anti-rabbit or anti-mouse antibody (dilution 1:5,000) and a HRP detection kit (Biorad). The amount of protein detected was quantified using MULTI-ANALYST software (Biorad), with the background signal removed. The value obtained is expressed in OD/mm² and represents the band intensity expressed as mean count per pixel multiplied by the band surface.

To insure that identical amounts of total protein samples were loaded into the gels, membranes were dehybridized after visualization and signals quantified by incubation for 1 h at room temperature in dehybridizing buffer (100 mM glycine, 100 mM NaCl, pH 3.2), and rehybridization with an anti-histone H3 antibody (dilution 1:5,000; #9715; CST), as described by Fabioux et al. (2009).

2.2.5 Statistical analysis

Statgraphics software (StatPoint Technologies, Inc.) was used for all statistical analyses. For multiple comparisons within the same factor, we used the Fisher's least significant difference (LSD) procedure at the 95 % confidence interval. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

3. RESULTS

3.1. Cloning and characterization of *Crassostrea gigas* ampk α

Using specific primers, we identified in the muscle of *C. gigas* three ampk α clones of 1,212, 1,284 and 1,647 base pairs respectively. These sequences encoded three isoforms of AMPK α protein, named C.gigas_alpha_truncated 1 (GenBank accession number JX104212), C.gigas_alpha_truncated 2 (GenBank accession number JX104213) and C.gigas_alpha_like (GenBank accession number JX104214). As shown in figure 1, both truncated isoforms of AMPK α corresponded to alternative spliced variants of the ampk α gene (GenBank accession number JX402632, Fig. 1). The 1,647 base pairs cDNA encoded an entire AMPK α protein of

62 kDa, and the 1,212 and 1,284 base pairs cDNAs encoded two truncated isoforms of 46 and 48 kDa, respectively (Fig. 2).

The three AMPK α sequences showed more than 70 % conservation with AMPK α subunits in other species. The entire AMPK α protein of 62 kDa contains the kinase domain, the binding domain for β and γ subunits, and the conservation of the threonine 172 active site and of two motifs surrounding threonine 172 (Asp-Phe-Gly and Ala-Pro-Glu) which is a characteristic phosphorylation site in kinase (Hardie et al. 1998) (Fig. 2). Blast results did not reveal closer relationship to AMPK α isoforms characterized in vertebrate as $\alpha 1$, $\alpha 2$. Both truncated AMPK α isoforms of 46 and 48 kDa were deleted in the kinase domain and lacked the threonine 172 phosphorylation site, although they conserved the C-terminal binding domain for β and γ subunits to form an heterotrimer (Towler and Hardie 2007) (Fig. 2). *C.gigas_alpha_truncated 2* contained an additional group of 24 amino acids that was not characterized in the *C.gigas_alpha_truncated 1* in the C-terminal region. All three *C. gigas* AMPK conserved the threonine 258 but missed the serine 485 phosphorylation sites (Fig. 2).

3.2. Characterization of *Crassostrea gigas* akt

Among the *C. gigas* EST sequences in GigasDatabase (Fleury et al. 2009), we identified a sequence corresponding to the *C. gigas* akt gene (GenBank accession number FP004887). The corresponding partial amino acid sequence showed more than 60 % conservation with akt2 of Atlantic salmon *Salmo salar* (FJ969488), akt of blackback land crab *Gecarcinus lateralis* (ADM87425) and akt2 of ferret *Mustela putorius furo* (AER94007). We also demonstrated the conservation of the pleckstrin homology (PH) domain needed for anchorage of AKT to the cell membrane (Alessi et al. 1996) (Fig. 3).

3.3. Tissue-specific detection of AMPK α isoforms protein

All the anti-AMPK α antibodies we used could recognize two bands in Western blot, one at 62 kDa and one other at 48 kDa, but not at the same level of specificity, depending on the antibody we used. The band at 62 kDa corresponded to the predicted size of the full-length AMPK α protein while the band at 48 kDa corresponded to truncated isoforms of AMPK α .

The anti-AMPK α antibody CST #2793 (produced against a human recombinant AMPK $\alpha 1$ protein) recognized mainly the full-length AMPK α protein of 62 kDa and very lightly recognized the truncated isoforms at 48 kDa (very poor signal obtained after long exposure to ECL). This antibody allowed us to show that the entire AMPK α protein was expressed in alloyster tissues (data not shown).

In contrast, the anti-AMPK α antibody CST #2603 (produced against a synthetic peptide derived from the aminoterminal sequence of human AMPK α) and the anti-AMPK α antibody

CST #5832 (produced against a synthetic peptide corresponding to residues surrounding lys40 of human AMPK α) recognized very rapidly the truncated isoforms at 48 kDa and very poorly the full-length AMPK α protein at 62 kDa after a long ECL exposure. Using these antibodies, we were able to show that truncated AMPK α isoforms at 48 kDa were specific for several tissues, mainly expressed in smooth and striated muscles (Fig. 4). Based on the calculated molecular weight of truncated AMPK α isoforms identified in *C. gigas* muscle, this band could be assigned to specific antibody recognition of either one variant or both variants of truncated AMPK α isoforms in *C. gigas*. We could not determine whether this band corresponded to a specific truncated isoform of 46 or 48 kDa AMPK α , or both, since the band was large with rapid and high density and obtained in low resolution SDS-PAGE gels (10 % acrylamide). Figure 4 illustrates how *C. gigas* truncated AMPK α isoform was specifically expressed in five different tissues of oysters sampled at the sexual resting stage: the striated muscle had the highest density with 73.46 OD/mm², followed by the smooth muscle with 42.20 OD/mm². Much lower densities were observed for the mantle edge (2.43 OD/mm²), heart (0.34 OD/mm²) and visceral ganglia (0.07 OD/mm²). Bands of even lower density were detected in the other tissues.

3.4. AMPK α protein level during hypoxia

Figure 5 a shows Western blot representative images obtained for the detection of the entire AMPK α protein. Its quantification demonstrated that the entire AMPK α amount did not vary statistically during normoxia and hypoxia in both muscles (two-way ANOVA: $F = 1.55$; $p = 0.2253$; data not shown).

In smooth muscle, the protein content of truncated AMPK α isoform significantly increased as early as 1 h after the hypoxia treatment started, compared with normoxia, and this increase was observed throughout the 6 h of hypoxia in the experiment (Two-way ANOVA: $F = 8.92$; $p = 0.0002$; Fig. 5 b). In striated muscle, no significant difference was observed in the protein content of truncated AMPK α isoform between hypoxic and normoxic conditions (Two-way ANOVA: $F = 1.62$; $p = 0.2058$; Fig. 5 c).

3.5. Citrate synthase activity during hypoxia

In striated muscle, the activity of the citrate synthase was significantly modified (Two-way ANOVA: $F = 3.75$; $p = 0.00167$; Fig. 6 b). This activity increased slightly after 3 h of hypoxia (+ 12.3 %) before significantly decreasing at 6 h (- 22.5 %) in comparison with normoxia, where it remained stable. In smooth muscle, no significant difference was measured in the activity of the citrate synthase either between treatments or between points in time within treatments (Two-way ANOVA: $F = 0.57$; $p = 0.7206$; Fig. 6 a).

3.6. AKT protein level during hypoxia

To quantify AKT protein content in these muscles, we used a heterologous monoclonal anti-AKT antibody. This antibody allowed us to detect a single band in SDS-PAGE at approximately 38 kDa (Fig. 7). In smooth muscle (Fig. 7 a), this antibody showed that the AKT protein content was significantly (by 6.4 times) higher in the hypoxic condition than in the normoxic condition at 1 h (Two-way ANOVA: $F = 3.00$; $p = 0.0382$). A higher AKT protein content was maintained in hypoxia compared with normoxia after 3 and 6 h of the treatment (1.5 and 4.6 relative OD/mm², respectively), but these differences were not significant (Fig. 7 a). In striated muscle (Fig. 7 b), no significant difference was observed in AKT protein content between hypoxic and normoxic conditions (Two-way ANOVA: $F = 0.82$; $p = 0.5543$).

4. DISCUSSION

4.1. *Crassostrea gigas* AMPK α isoforms

An important finding of the present study is that we identified two truncated AMPK α protein isoforms of 46 and 48 kDa that were tissue-specifically expressed in *C. gigas*, mainly in smooth and striated muscles. In contrast, the entire AMPK α of 62 kDa was ubiquitously expressed. Both truncated isoforms resulted from alternative splicing of the full-length *ampka* gene. Alternative splicing was already reported for some genes in *C. gigas* and the spliced variants may present a tissue-specific expression and a specific function (Rodet et al. 2008).

As demonstrated for genes involved in stress response in *C. gigas* (Kawabe and Yokoyama 2011a), we can hypothesize that hypoxia could have increased the alternative splicing leading to accumulation of truncated AMPK α in smooth muscle.

In all species, the size of the full-length AMPK α protein is around 62 kDa (Apfeld et al. 2004; Beri et al. 1994; Carling et al. 1989; Yoshida et al. 1999; Zhu et al. 2007) as in oyster, where we demonstrated that the entire AMPK α had a molecular weight of 62 kDa. However, both truncated AMPK α were 33 % shortened. They contained a truncated kinase domain and missed the threonine 172 phosphorylation site, important for AMPK activation in all species (Stapleton et al. 1996; Carling et al. 2011). We described the *in vivo* expression of these truncated isoforms of AMPK α in smooth and striated muscle when compared with other tissues. In *Artemia franciscana*, one truncated isoform of AMPK α was found in addition to the entire AMPK α . In fact, the entire AMPK α 2 is a 515-amino acid protein with a calculated molecular mass of approximately 58 kDa, and the truncated isoform results from a 244-base pair deletion in its encoding mRNA that caused a frameshift, introducing a new translation stop codon that shortened the C-terminal of AMPK α 2. This truncated protein had 313 amino acids with a calculated molecular mass of 36 kDa (Zhu et al. 2007). Nevertheless, this truncated isoform of AMPK α kept its entire kinase domain and its activation through phosphorylation (Carling et al. 1989; Zhu et al. 2007). As reported in wormbase.org, in *Caenorhabditis elegans*, an AMPK α isoform named AAK-1b is truncated in its kinase domain and conserved its threonine 172 phosphorylation site but no functional data were obtained on this truncated kinase isoform (Yook et al. 2012).

4.2. Muscle-specific regulation of truncated AMPK α and AKT

Crassostrea gigas inhabits the intertidal zone and shows high tolerance to stress conditions such as hypoxia and heat shock (Kawabe and Yokoyama 2011b). In *C. gigas*, the adductor muscle is one of the primary organs involved in responses to biotic or abiotic environmental variations, such as hypoxia (Le Moullac et al. 2007a; Samain and McCombie

2008). Valve closure is usually considered as a general stress response of marine bivalves to a wide variety of environmental stressors (Manley 1983; Akberali and Trueman 1985). Valve closure isolates the soft tissues from the external environment, which leads to a gradual decline of the oxygen in the mantle cavity water, and ultimately anoxia (Heinonen et al. 1997). In *C. gigas*, a prolonged 24 h period of hypoxia at 2 mg/L of oxygen was already reported to significantly reduce valve opening (Le Moullac 2008). At the cellular level, hypoxia was shown to slow down glycolysis (Le Moullac et al. 2007a) and to induce increased activity of the electron transfer system within the respiratory chain (Le Moullac et al. 2007b). In the context of the frequent environmental changes to which the species is exposed, energy supply to the adductor muscle could well be a priority at the organism level to insure survival of the whole animal by keeping the valves closed more often/longer to protect the oyster against external stresses.

Indeed, in many species, the AMPK signaling pathway is involved in the coordination of anabolic and catabolic metabolic processes in various tissues, including cardiac and skeletal muscle, adipose tissue, pancreas and liver (Khan et al. 2006). In vertebrates, AMPK subunits have been reported in both striated muscle (Saha et al. 2000; Musi and Goodyear 2003) and smooth muscle, mainly cardiovascular smooth muscle (Ferri 2011; Sung et al. 2011), which led to the identification of AMPK as an important intracellular signaling pathway in these muscles.

In our study, we demonstrated a rapid and muscle-specific regulation of truncated AMPK α protein content by hypoxia in oysters while the amount of the entire AMPK α remained constant. Truncated AMPK α protein content was accumulated in smooth muscle after as little as 1 h of hypoxia and this continued throughout the 6 h of the treatment. We demonstrated that citrate synthase activity was maintained during 6 h of hypoxia in smooth muscle, while it slightly decreased in striated muscle. Mitochondrial citrate synthase is a key enzyme in aerobic energy production and is a useful indicator of general physiological status of *C. gigas* (Garcia-Esquivel et al. 2001, 2002; Pernet et al. 2012). Citrate synthase activity reflects the mitochondrial oxidation capacity resulting from changes in mitochondrial number and activity (Tripathi and Verma 2004). In our experiment, as citrate synthase activity in smooth muscle did not show any difference between normoxic and hypoxic conditions, we suggest that its aerobic capacity was maintained during the 6 h of hypoxia, resulting in a higher metabolic performance than in the striated muscle. Since adductor muscle is not a storage tissue for glycogen in *C. gigas* (Berthelin et al. 2000), it needs to be supplied with glucose at a high rate to maintain an aerobic pathway of energy production. In the two oyster species *C. gigas* and *C. virginica*, the adductor muscle has been seen to use the PEPCK or PK pathway to allow high glycolysis in order to provide ATP for contractile activity (Greenway and Storey 1999; Le Moullac et al. 2007a). In adductor muscle of

C. virginica, hypoxic conditions up-regulate mitochondrial enzymes, such as citrate synthase, in order to avoid metabolic depression and to provide better survival by minimizing physiological stress of oysters (Ivanina et al. 2011). Citrate synthase activity is an excellent marker of aerobic metabolism in vertebrates (Hanke et al. 2008) and invertebrates such as oysters (Ivanina et al. 2011; Pernet et al. 2012).

Our hypothesis is that, in the smooth muscle of *C. gigas*, the increase of truncated AMPK α and AKT could be related to the maintaining of mitochondrial citrate synthase activity under short-term hypoxia to avoid metabolic depression. In many species, the role of oxygen stress on AMPK has been largely studied in relation to the fact that AMPK is viewed as a master regulator of energy (Hardie 2003). In general, AMPK switches on catabolic processes that provide alternative routes for generating ATP, such as glucose uptake, glycolysis, fatty acid oxidation or mitochondrial biogenesis (Hardie 2008). In rat skeletal muscle, conditions that cause reduction in cellular fuel status, including contraction, hypoxia, inhibition of oxidative phosphorylation, and hyperosmolar stress, have been demonstrated to increase AMPK activity and glucose transport (Hayashi et al. 2000). In cultures of rat skeletal muscle cells, AMPK can regulate glucose consumption (Hong et al. 2012). In skeletal muscle of mice, AMPK appears to be an obligate intermediate in the pathway to accelerate glucose uptake during hypoxia, to sustain ATP availability and cell survival in this tissue (Mu et al. 2001). Our experiment showed a rapid (from 1 h of hypoxia) and persistent (up to 6 h) increase in AKT protein content in the smooth muscle concomitant with the increase in truncated AMPK α protein content, supporting the hypothesis of an increased glucose uptake in this muscle under hypoxic conditions. AKT is the key kinase, regulated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473, involved in the insulin signaling pathway, which regulates glucose metabolism, glucose entry into the cell and controls cell survival, especially under stressful conditions (Manning and Cantley 2007). Indeed, in rat skeletal muscle, AKT is activated in response to a high energy demand during prolonged exercise and leads to enhanced glucose transport and survival by increasing insulin sensitivity (Funai et al. 2010). Some elements of the insulin pathway have already been characterized in *C. gigas*: an insulin-related peptide cDNA (Hamano et al. 2005), an insulin-like receptor CIR (Gricourt et al. 2003) and Ras, Pten and p70S6K, three potential elements of the oyster insulin pathway (Jouaux et al. 2011). In vertebrates, hypoxia is known to activate the AKT cell survival pathway to maintain protection from apoptosis (Alvarez-Tejado et al. 2001; Kim et al. 2012). In vertebrate cell culture, the hypoxia-induced activation of AKT is observed even after 3-4 h of hypoxia but can be prevented by treatment with cycloheximide, suggesting that de novo protein synthesis is required (Alvarez-Tejado et al. 2001). AKT is also important for ischemia protection in human heart (Mullonkal and Toledo-Pereyra 2007). In mouse soleus muscle, glycogen

content, AMPK activity and AKT activity did not differ significantly between hypoxia and control treatments, but insulin stimulation led AKT phosphorylation to be significantly higher in hypoxia than the control. This experiment emphasized the key role of insulin in AKT pathway under hypoxic conditions (Gamboa et al. 2011). In mouse cardiomyocytes, activation of both AKT and AMPK are important for maintaining glucose metabolism during oxidative stress (Horie et al. 2008), and a direct link was recently demonstrated between AMPK and AKT signaling pathways for promoting energy conservation and survival of skeletal muscle exposed to ischemia (Chopra et al. 2011). In fact, evidence has been found for a direct cross talk between AKT and AMPK that promotes cell survival in low energy status conditions under hypoxia in brain and heart in vertebrates (Kovacic et al. 2003; Bertrand et al. 2006). Such a relationship was also recently demonstrated in crucian carp heart (Stenslokken et al. 2008).

4.3. Putative *in vivo* function for truncated AMPK α during hypoxia

Many studies have shown that phosphorylation of threonine 172 is required for AMPK kinase activity to produce the respective cellular effects of activated AMPK signaling (Neumann 2003; Hawley et al. 1996; Hardie et al. 1998). Indeed, under hypoxic conditions, AMPK α is regulated in the muscle at the post-translational level through threonine 172 phosphorylation, leading to AMPK kinase activation and downstream events in vertebrate models (Wadley et al. 2006). Due to its high conservation in *C. gigas*, we can assume that the kinase activity of the entire AMPK α protein of 62 kDa could also be regulated through threonine 172 phosphorylation to act on downstream targets. Indeed, in the liver of anoxia-tolerant goldfish (*Carassius auratus*) after 30 min of hypoxia (oxygen at 0.3 mg/L), no changes in the quantity of total protein were observed, despite an increase in AMPK activity of nearly 5.5 fold (Jibb and Richards 2008). In contrast, in heart of crucian carp *Carassius carassius* after 10 days of hypoxia (oxygen at 0.3 mg/L), no significantly changes in total protein and activity of AMPK α were observed compared with control conditions (Stenslokken et al. 2008).

As far as we know, our study is the first description of accumulation of truncated AMPK α protein in response to hypoxia in the smooth muscle of *C. gigas*. As demonstrated, the truncated AMPK α did contain neither the entire kinase domain nor the threonine 172 phosphorylation site.

We thus can suppose that it might have another function than the entire AMPK α in response to hypoxia in the smooth muscle of oyster. Studies that are very recently published show that truncated kinase might play a very important role in the modulation of the entire

kinase response (Noy et al. 2012). Moreover, alternative splice variants of some proteins were very recently demonstrated to play a major role in the metabolism (Ruas et al. 2012).

We can hypothesize that, in oyster, the truncated AMPK α isoforms could serve as an *in vivo* modulator of the downstream AMPK α signaling during hypoxia in the smooth muscle. Indeed, since the truncated isoforms conserved the ligand binding domain for β and γ subunits, these truncated AMPK α could have kept the ability to bind AMPK α ligands such as β and γ subunits and/or downstream binding partners. Indeed, using a constructed mutant, Ramanathan et al. (2010) demonstrated that a truncated human AMPK α in its kinase domain can conserve its binding capacity with β and γ subunits. Moreover, the truncation of the kinase domain in human AMPK α rendered the heterotrimer less soluble, indicating that truncated AMPK α could exert its regulatory function through modulation of biochemical properties of AMPK complex and/or partners. We can conclude that the rapid increase in the protein amount of truncated AMPK α in smooth muscle could modulate the signaling pathway of the full-length AMPK α , and could have led to the protection of the citrate synthase activity during 6 h of hypoxia. Further investigations are needed to quantify the activity of the entire AMPK α response in presence of the truncated isoforms in *C. gigas*.

Response to hypoxia through the expression of truncated AMPK α was smooth muscle specific. Although both form part of the adductor muscle, smooth and striated muscles do not have the same metabolism and function. Indeed, in mollusks, the slow-acting smooth muscle can go into a catch state after contraction, and tension can be maintained for many hours with a small ATP turnover. In contrast, the quicker-acting muscle, usually striated to some extent, has phasic activity responsible for the rapid closure of the shell (Elliott and Bennett 1982). We showed that, in oyster, the aerobic metabolism in the smooth muscle might be more protected against an environmental stress such as hypoxia and that the hypoxic response of smooth muscle seems to be mediated by the regulation of AMPK α isoforms.

5. CONCLUSION

In this study, we showed that two truncated AMPK α isoforms, that lost the kinase domain and the determinant threonine 172 phosphorylation site, might play a role in the metabolic response during hypoxia in the smooth muscle of *C. gigas*. Our experiments suggested that the *in vivo* accumulation of truncated AMPK α , through alternative splicing, might serve as a modulator of the entire AMPK α response in order to maintain aerobic capacity and glucose homeostasis via AKT. Pacific oysters thus appeared as a good model to understand the environmental regulation of AMPK α signaling.

6. FIGURES

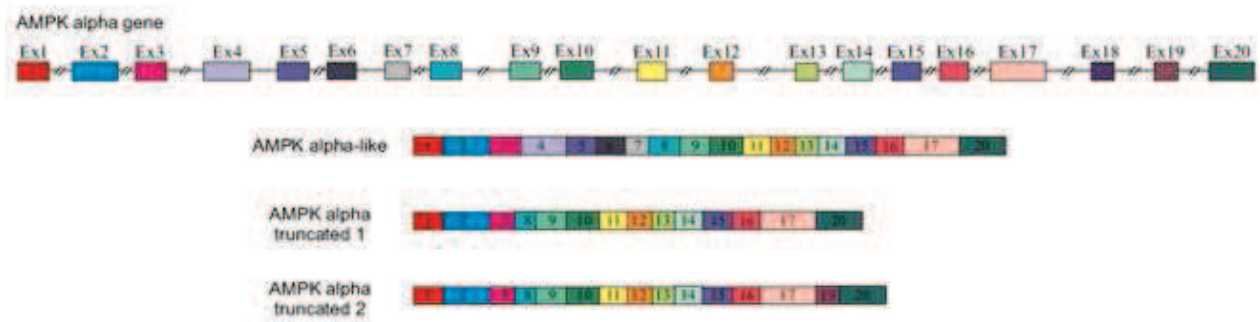


Figure 1: Diagram representing the intron-exon structure of the *C. gigas* AMPK *ampk* alpha gene (GenBank accession number JX402632) and the three AMPK mRNAs obtained by alternative splicing of exons. AMPK alpha_like: GenBank accession number JX104214. AMPK alpha_truncated 1: GenBank accession number JX104212. AMPK alpha_truncated 2: GenBank accession number JX104213.

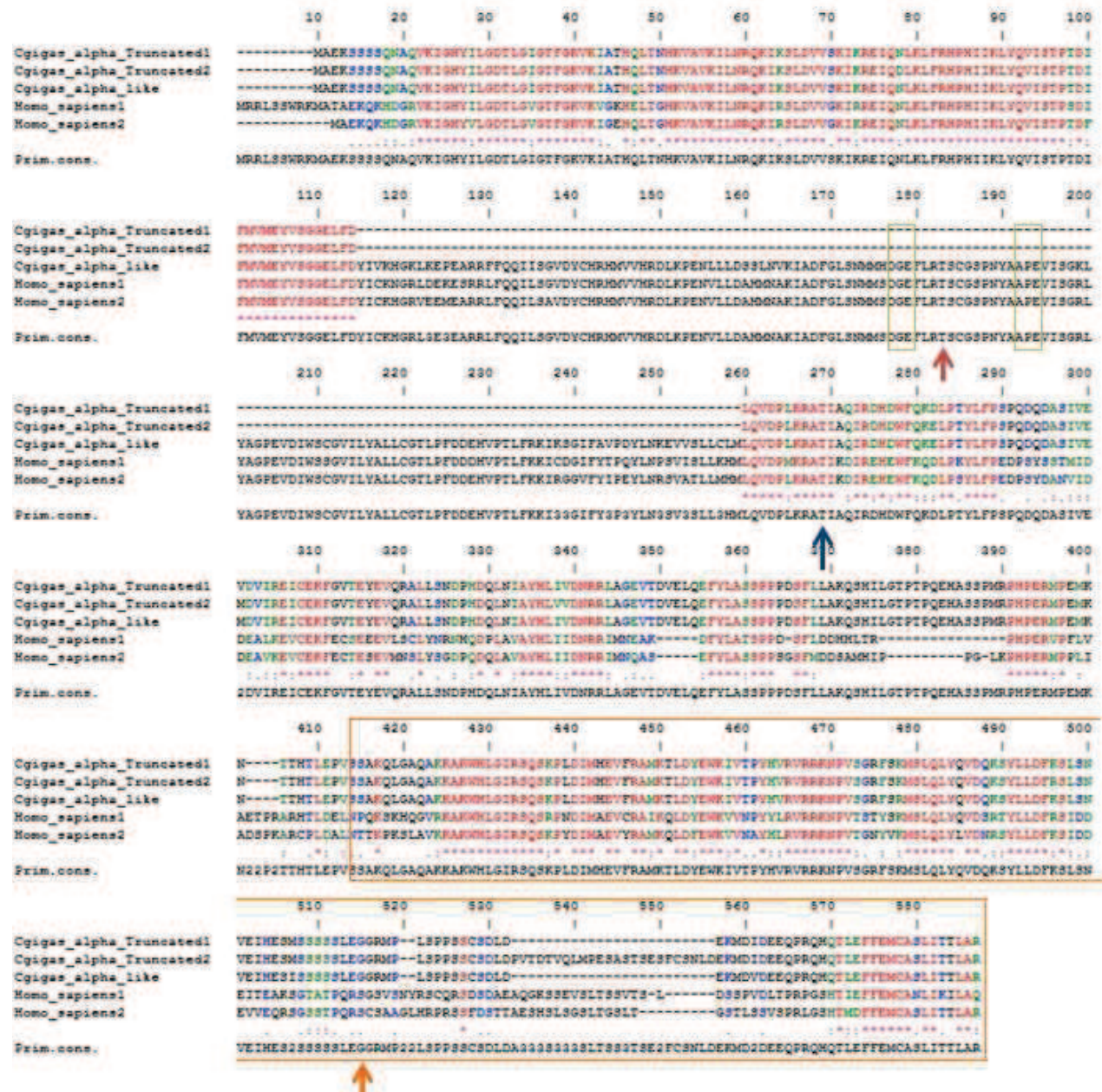


Figure 2: Amino acid alignment of *Crassostrea gigas* AMPK alpha_Truncated 1 (GenBank accession number JX104212), AMPK alpha_Truncated 2 (GenBank accession number JX104213), with the full-length AMPK_alpha_like (GenBank accession number JX104214), *Homo sapiens* AMPK α 1 and α 2 (NM006251 and AAH69823). Sequence conservation is indicated in red for complete conservation among the compared species, in green for strong similarity, in blue for weak similarity and black where there is no conservation. Red, blue and orange arrows threonine 172, threonine 258 and serine 485 phosphorylation sites, respectively. Green squares characteristic motifs surrounding the threonine 172 site in kinase (Asp–Phe–Gly and Ala–Pro–Glu). Orange square binding domain for β and γ subunits. “Prim.cons.” line contains the consensus sequence (the most common amino acid at position). In case of a tie between two amino acid frequencies, a number is reported in this line.

Premier chapitre :

Caractérisation des sous-unités α de l'AMPK chez *Crassostrea gigas* et régulation au cours de l'hypoxie

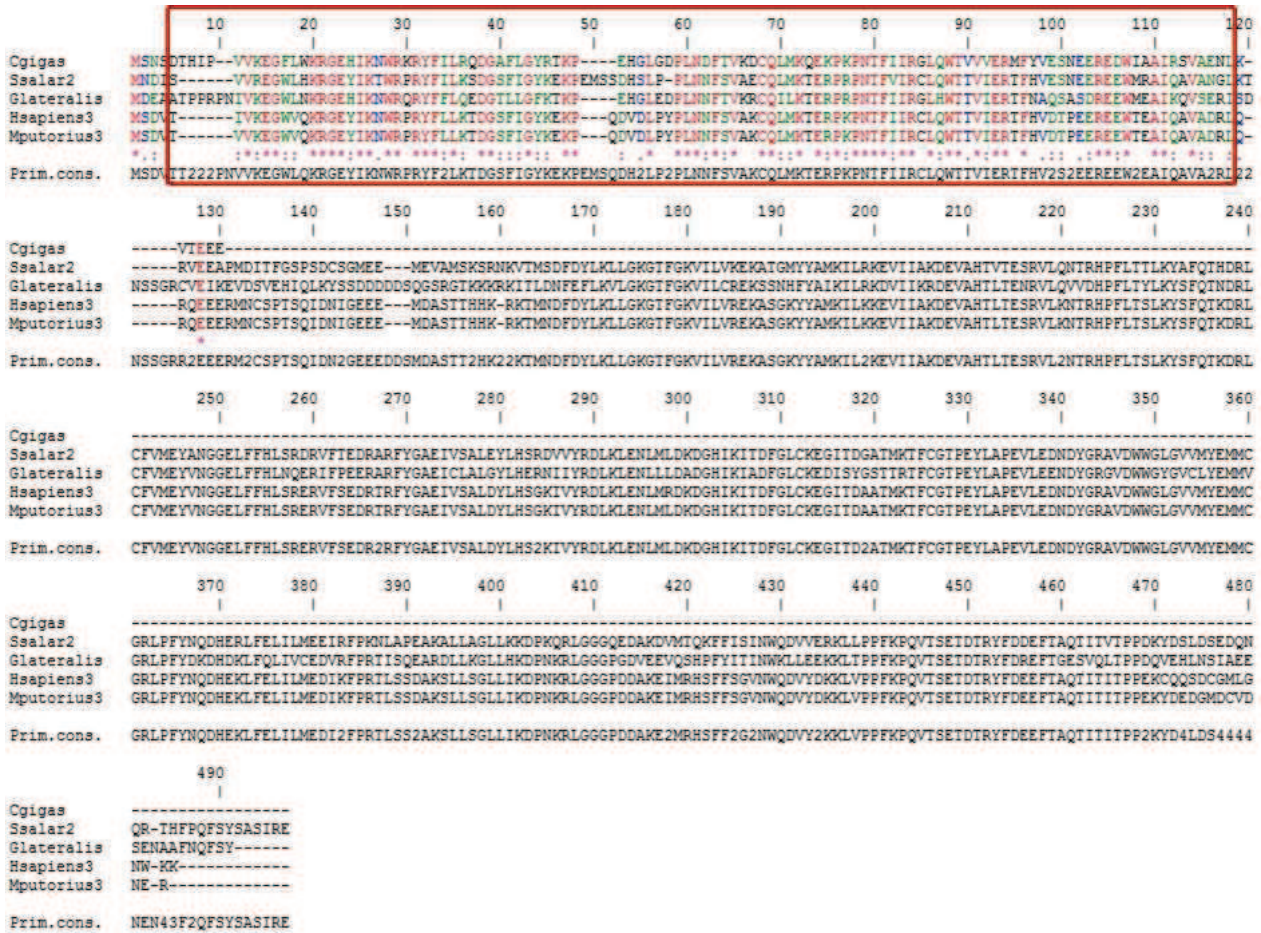


Figure 3: Amino acid alignment of *Crassostrea gigas* AKT (GenBank accession number FP004887), AKT2 of Atlantic salmon *Salmo salar* Ssalar2 (GenBank accession number FJ969488), AKT of blackback land crab *Gecarcinus lateralis* Glateralis (GenBank accession number ADM87425), AKT3 of *Homo sapiens* Hsapiens3 (GenBank accession number BC121154) and AKT2 of Ferret *Mustela putorius furo* Mputorius3 (GenBank accession number AER94007). Sequence conservation is indicated in red for complete conservation among the compared species, in green for strong similarity, in blue for weak similarity, and in black where there is no conservation. Red square pleckstrin homology (PH) domain. “Prim.cons” line contains the consensus sequence (the most common amino acid at position). In case of a tie between two amino acid frequencies, a number is reported in this line.

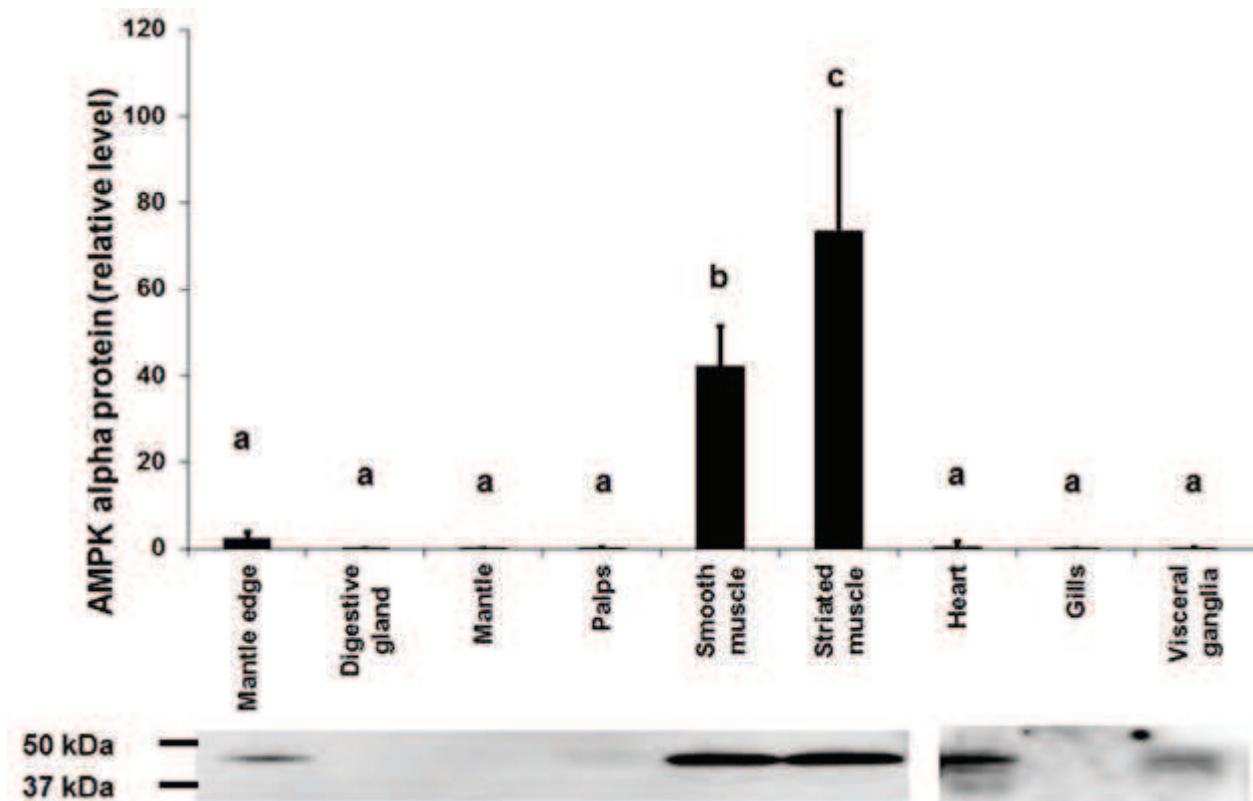


Figure 4: Levels of truncated AMPK α protein quantified on Western blot (expressed in relative OD/mm²); for different oyster tissues sampled in wild oysters at the sea shore: mantle edge, digestive gland, mantle, palps, smooth muscle, striated muscle, heart, gills and visceral ganglia during sexual resting stage ($n = 4$). The protein values presented on the graph were calculated from 4 blots and a representative Western blot of truncated AMPK α is shown under the graph. Columns and bars show mean \pm SD. Different letters indicate a significant difference between tissues ($p < 0.05$)

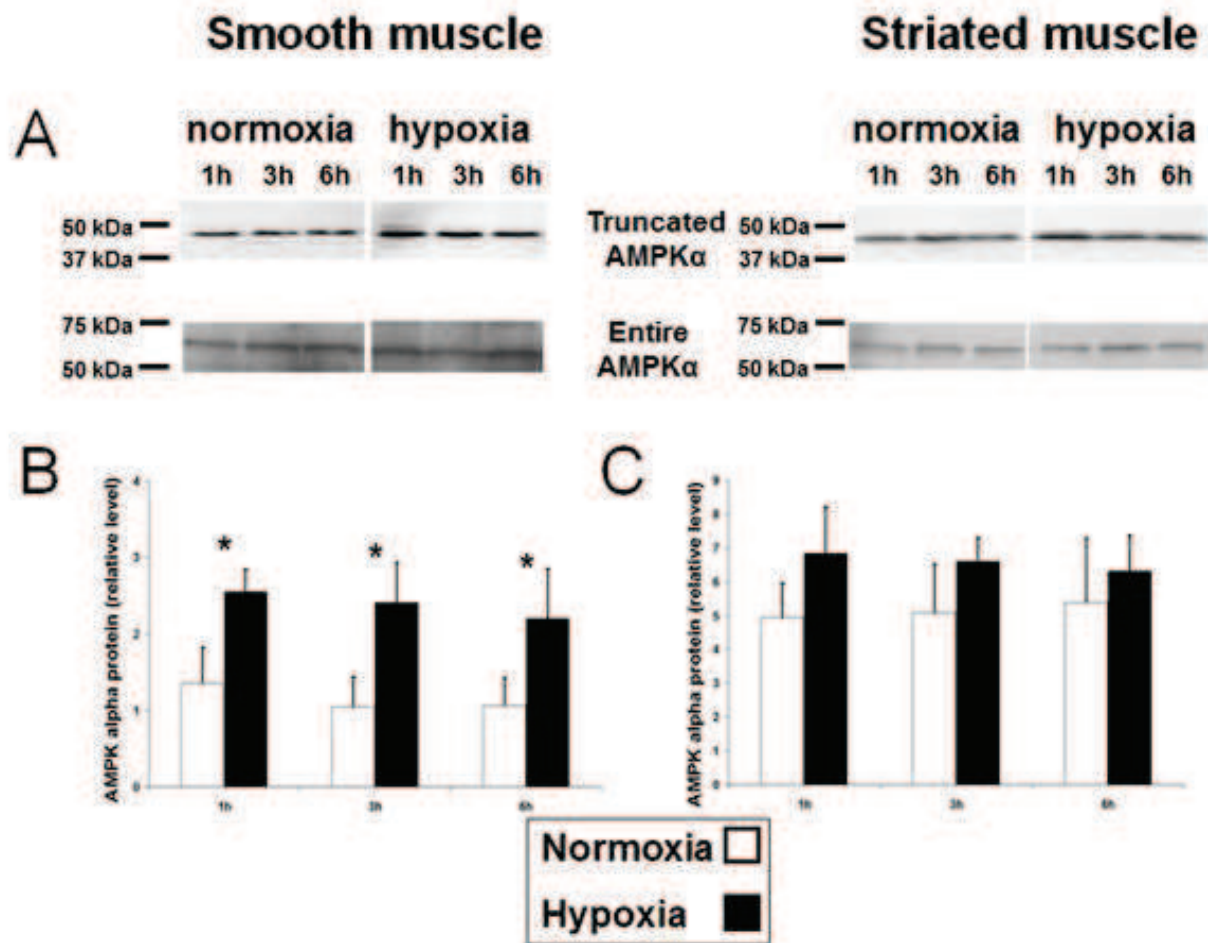


Figure 5: Western blot of truncated AMPK α and entire AMPK α protein in smooth and striated muscle of oysters exposed to normoxia ($n = 4$) or hypoxia ($n = 4$) measured after 1, 3 and 6 h of challenge. **a** Representative images of truncated AMPK α at 46–48 kDa and entire AMPK α at 62 kDa. **b** Quantification of truncated AMPK α protein during normoxia (white bars; $n = 4$) or hypoxia (black bars; $n = 4$) in smooth muscle. **c** Quantification of truncated AMPK α protein during normoxia (white bars; $n = 4$) or hypoxia (black bars; $n = 4$) in striated muscle. The protein values presented on the graph were quantified on 4 Western blots and expressed in relative level of OD/mm². Columns and bars show mean \pm SD. Asterisks indicate a significant difference between conditions ($p < 0.05$).

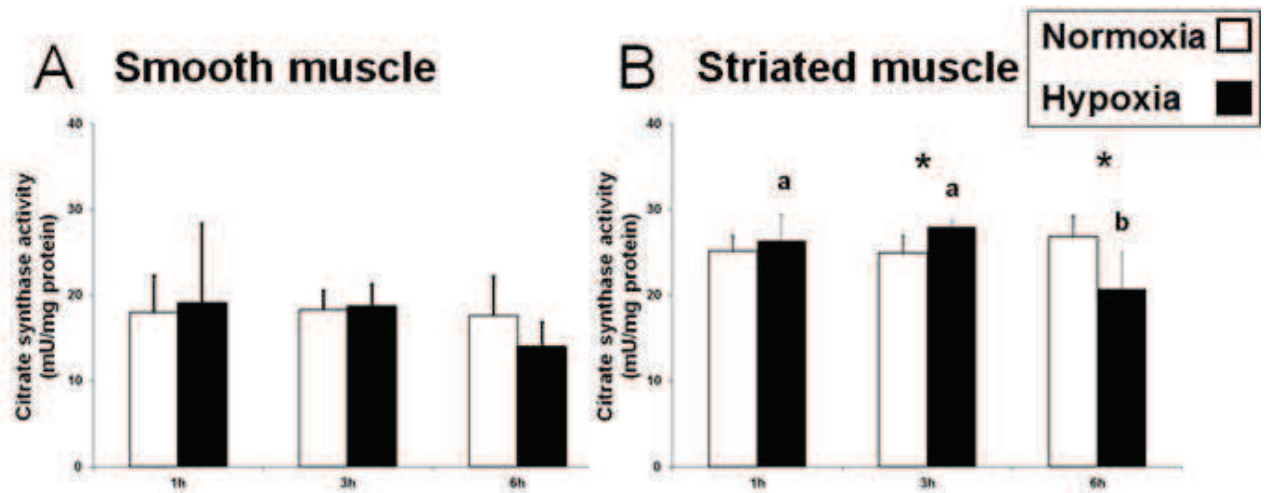


Figure 6: Enzymatic assay of citrate synthase in smooth and striated muscle of oysters exposed to normoxia ($n = 4$) or hypoxia ($n = 4$) measured after 1, 3 and 6 h of challenge. **a** Citrate synthase activity during normoxia (*white bars*; $n = 4$) or hypoxia (*black bars*; $n = 4$) in smooth muscle; **b** Citrate synthase activity during normoxia (*white bars*; $n = 4$) or hypoxia (*black bars*; $n = 4$) in striated muscle. Different letters indicate significant differences along the temporal sampling ($p < 0.05$). Asterisks indicate significant differences between conditions ($p < 0.05$).

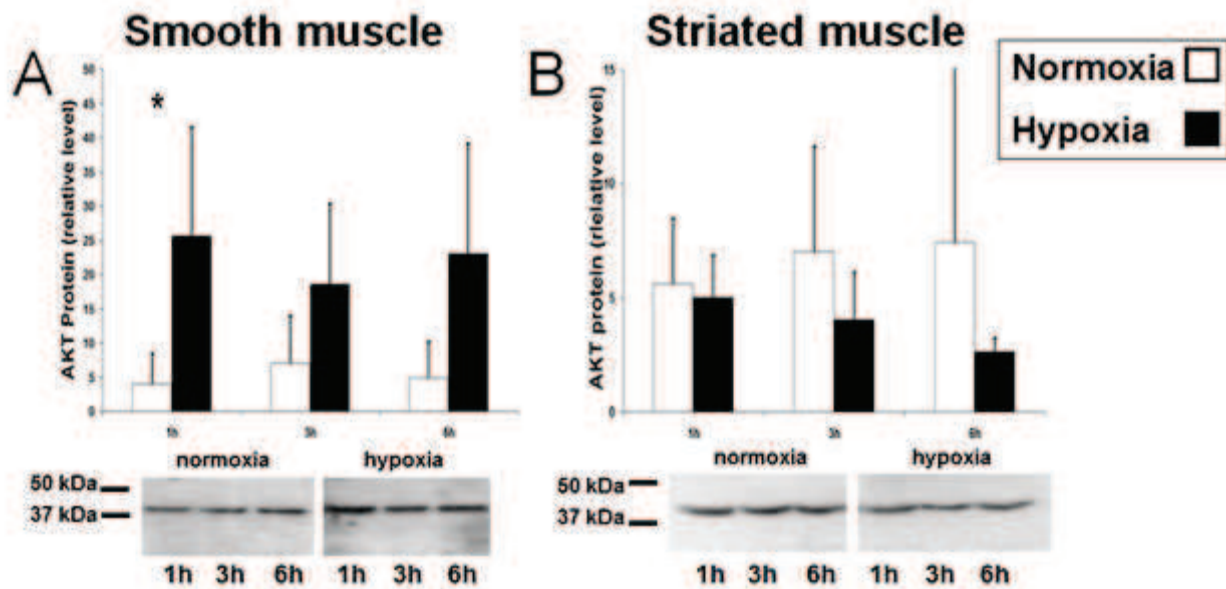


Figure 7: Western blot of AKT protein in smooth and striated muscle of oysters exposed to normoxia ($n = 4$) or hypoxia ($n = 4$) measured after 1, 3 and 6 h of challenge. **a** Quantification of AKT protein during normoxia (white bars; $n = 4$) or hypoxia (black bars; $n = 4$) in smooth muscle. **b** Quantification of AKT protein during normoxia (white bars; $n = 4$) or hypoxia (black bars; $n = 4$) in striated muscle. The protein values presented on the graph were calculated from 4 blots and a representative western blot of truncated AMPK α is shown under the graph. Columns and bars show mean \pm SD. Asterisks indicate significant differences between conditions ($p < 0.05$).

7. ACKNOWLEDGEMENTS

The present research project was supported by “Europole Mer” (www.europolemer.eu; project “OxyGenes”) and by the ANR (project “Gametogenes” ANR-08-GENM-041) with collaboration supported National Basic Research Program of China (973 Program, no. 2010CB126401). Eric Guévelou was funded by Ifremer and a *Région Bretagne* doctoral grant.

Genome information collected for this publication was obtained upon the support provided by the Ministry of Foreign Affairs (MAE).

The authors are grateful to Karine Pichavant of the ORPHY laboratory for logistic support, the organization of the experimental hypoxic system and for technical support during the animal conditioning. The authors are indebted to Chantal Cahu for advice and support. We thank Helen McCombie for her help with editing the English.

The authors declare that they have no conflict of interest.

8. REFERENCES

- Akberali HB, Trueman ER (1985) Effects of environmental-stress on marine bivalve mollusks. *Adv Mar Biol* 22:101–198. doi:10.1016/S0065-2881(08)60051-6
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15(23):6541–6551
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17):3389–3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389
- Alvarez-Tejado M, Naranjo-Suarez S, Jimenez C, Carrera AC, Landazuri MO, del Peso L (2001) Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J Biol Chem* 276(25):22368–22374. doi:10.1074/jbc.M011688200
- Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R (2004) The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev* 18(24):3004–3009. doi:10.1101/gad.1255404
- Bacca H, Huvet A, Fabioux C, Daniel JY, Delaporte M, Pouvreau S, Van Wormhoudt A, Moal J (2005) Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 140(4):635–646. doi:10.1016/j.cbpc.2005.01.005
- Beri RK, Marley AE, See CG, Sopwith WF, Aguan K, Carling D, Scott J, Carey F (1994) Molecular cloning, expression and chromosomal localisation of human AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 356(1):117–121. doi:10.1016/0014-5793(94)01247-4
- Berthelin CH, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 125(3):359–369. doi: 10.1016/S0305-0491(99)00187-X
- Bertrand L, Ginion A, Beauloye C, Hebert AD, Guigas B, Hue L, Vanoverschelde JL (2006) AMPK activation restores the stimulation of glucose uptake in an *in vitro* model of insulin-resistant cardiomyocytes via the activation of protein kinase B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1):H239–H250. doi:10.1152/ajpheart.01269.2005

Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG (1989) Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem/FEBS* 186(1–2):129–136. doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb15186.x

Carling D, Mayer FV, Sanders MJ, Gamblin SJ (2011) AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat Chem Biol* 7(8):512–518. doi:10.1038/nchembio.610

Choi SL, Kim SJ, Lee KT, Kim J, Mu J, Birnbaum MJ, Soo Kim S, Ha J (2001) The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. *Biochem Biophys Res Commun* 287(1):92–97. doi:10.1006/bbrc.2001.5544

Chopra I, Li HF, Wang H, Webster KA (2011) Phosphorylation of the insulin receptor by AMP-activated protein kinase (AMPK) promotes ligand-independent activation of the insulin signalling pathway in rodent muscle. *Diabetologia* 55(3):783–794. doi:10.1007/s00125-011-2407-y

Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deleage G (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 25(3):147–150. doi:10.1016/S0968-0004(99)01540-6

Corporeau C, Auffret M (2003) In situ hybridisation for flow cytometry: a molecular method for monitoring stress-gene expression in hemolymph cells of oysters. *Aquat Toxicol* 64(4):427–435. doi:10.1016/S0166-445X(03)00099-7

de Castro E, Sigrist CJ, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, Bairoch A, Hulo N (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 34 (Web Server issue):362–365. doi:10.1093/nar/gkl124

Elliott A, Bennett PM (1982) Structure of the thick filaments in molluscan adductor muscle. *Soc Gen Physiol Ser* 37:11–28

Fabioux C, Corporeau C, Quillien V, Favrel P, Huvet A (2009) *In vivo* RNA interference in oyster-vasa silencing inhibits germ cell development. *FEBS J* 276(9):2566–2573. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06982.x

Ferri N (2011) AMP-activated protein kinase and the control of smooth muscle cell hyperproliferation in vascular disease. *Vasc Pharmacol*. doi:10.1016/j.vph.2011.10.003

Fleury E, Huvet A, Lelong C, de Lorgeril J, Boulo V, Guéguen Y, Bachère E, Tanguy A, Moraga D, Fabioux C, Lindeque P, Shaw J, Reinhardt R, Prunet P, Davey G, Lapegue S, Sauvage C, Corporeau C, Moal J, Gavory F, Wincker P, Moreews F, Klopp C, Mathieu M, Boudry P, Favrel P (2009) Generation and analysis of a 29,745 unique expressed sequence tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. BMC Genomics 10:341. doi:10.1186/1471-2164-10-341

Frederich M, O'Rourke MR, Furey NB, Jost JA (2009) AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, *Cancer irroratus*: an early indicator of temperature stress. J Exp Biol 212 (Pt 5):722–730. doi:10.1242/jeb.021998

Funai K, Schweitzer GG, Castorena CM, Kanzaki M, Cartee GD (2010) *In vivo* exercise followed by *in vitro* contraction additively elevates subsequent insulin-stimulated glucose transport by rat skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 298(5):E999–E1010. doi:10.1152/ajpendo.00758.2009

Gamboa JL, Garcia-Cazarin ML, Andrade FH (2011) Chronic hypoxia increases insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol 300(1):R85–R91. doi:10.1152/ajpregu.00078.2010

Garcia-Esquivel Z, Bricelj VM, Gonzalez-Gomez MA (2001) Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J Exp Mar Biol Ecol 263(1):77–103. doi: 10.1016/S0022-0981(01)00300-8

Garcia-Esquivel Z, Bricelj VM, Felbeck H (2002) Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 133(1):63–77. doi:10.1016/S1095-6433(02)00112-5

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res 31(13):3784–3788. doi:10.1093/nar/gkg563

Gray JS, Wu RSS, Or YY (2002) Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. Mar Ecol Prog Ser 238:249–279. doi: 10.3354/meps238249

Greenway SC, Storey KB (1999) The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. J Exp Mar Biol Ecol 242(2):259–272. doi:10.1016/S0022-0981(99)00103-3

Gricourt L, Bonnac G, Boujard D, Mathieu M, Kellner K (2003) Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *Gen Comp Endocrinol* 134(1):44–56. doi:10.1016/s0016-6480(03)00217-x

Hamano K, Awaji M, Usuki H (2005) cDNA structure of an insulin-related peptide in the Pacific oyster and seasonal changes in the gene expression. *J Endocrinol* 187(1):55–67. doi:10.1677/joe.1.06284

Hanke N, Meissner JD, Scheibe RJ, Endeward V, Gros G, Kubis HP (2008) Metabolic transformation of rabbit skeletal muscle cells in primary culture in response to low glucose. *Biochim Biophys Acta* 1783(5):813–825. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.12.012

Hardie DG (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 546(1):113–120. doi:10.1016/s0014-5793(03)00560-x

Hardie DG (2004) The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117(Pt 23):5479–5487. doi:10.1242/jcs.01540

Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Bio* 8(10):774–785. doi:10.1038/Nrm2249

Hardie DG (2008) AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obesity* 32(Suppl 4):7–12. doi:10.1038/ijo.2008.116

Hardie DG, Carling D, Carlson M (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67:821–855. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.821

Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271(44):27879–27887. doi:10.1074/jbc.271.44.27879

Hayashi T, Hirshman MF, Fujii N, Habinowski SA, Witters LA, Goodyear LJ (2000) Metabolic stress and altered glucose transport—activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes* 49(4):527–531. doi:10.2337/diabetes.49.4.527

Heinonen J, Kukkonen J, Penttinen OP, Holopainen IJ (1997) Effects of hypoxia on valve-closure time and bioaccumulation of 2,4,5-trichlorophenol by the freshwater clam *Sphaerium corneum* [L]. *Ecotoxicol Environ Saf* 36(1):49–56. doi: 10.1006/eesa.1996.1486

Hong NY, Cui ZG, Kang HK, Lee DH, Lee YK, Park DB (2012) *p*-Synephrine stimulates glucose consumption via AMPK in L6 skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.085

Horie T, Ono K, Nagao K, Nishi H, Kinoshita M, Kawamura T, Wada H, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K (2008) Oxidative stress induces GLUT4 translocation by activation of P13-K/Akt and dual AMPK kinase in cardiac myocytes. *J Cell Physiol* 215(3):733–742. doi:10.1002/Jcp.21353

Huvet A, Herpin A, Degremont L, Labreuche Y, Samain JF, Cunningham C (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343(1):211–220. doi:10.1016/j.gene.2004.09.008

Ivanina AV, Froelich B, Williams T, Sokolov EP, Oliver JD, Sokolova IM (2011) Interactive effects of cadmium and hypoxia on metabolic responses and bacterial loads of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin. *Chemosphere* 82(3):377–389. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.075

Jibb LA, Richards JG (2008) AMP-activated protein kinase activity during metabolic rate depression in the hypoxic goldfish, *Carassius auratus*. *J Exp Biol* 211(Pt 19):3111–3122. doi:10.1242/jeb.019117

Jost JA, Podolski SM, Frederich M (2012) Enhancing thermal tolerance by eliminating the pejus range: a comparative study with three decapod crustaceans. *Mar Ecol Prog Ser* 444:263–274. doi:10.3354/Meps09379

Jouaux A, Heude-Berthelin C, Sourdain P, Blin JL, Mathieu M, Kellner K (2011) Identification of Ras, Pten and p70S6K homologs in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and diet control of insulin pathway. *Gen Comp Endocrinol* doi:10.1016/j.ygcen.2011.12.008

Kawabe S, Yokoyama Y (2011a) Novel isoforms of heat shock transcription factor 1 are induced by hypoxia in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 315(7):394–407. doi:10.1002/jez.685

Kawabe S, Yokoyama Y (2011b) Role of hypoxia-inducible factor alpha in response to hypoxia and heat shock in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol.* doi:10.1007/s10126-011-9394-3

Khan T, Hixon JA, Stauffer JK, Lincoln E, Back TC, Brenner J, Lockett S, Nagashima K, Powell D, Wigginton JM (2006) Therapeutic modulation of Akt activity and antitumor efficacy of interleukin-12 against orthotopic murine neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 98(3):190–202. doi:10.1093/jnci/djj021

Kim TR, Cho EW, Paik SG, Kim IG (2012) Hypoxia-induced SM22 α in A549 cells activates the IGF1R/PI3K/Akt pathway, conferring cellular resistance against chemo- and radiation therapy. *FEBS Lett* doi:10.1016/j.febslet.2011.12.036

Kovacic S, Soltys CLM, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JRB (2003) Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem* 278(41):39422–39427. doi:10.1074/jbc.M305371200

Le Moullac G (2008) Adaptation du métabolisme respiratoire de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat Université de Bretagne Occidentale, 161

Le Moullac G, Bacca H, Huvet A, Moal J, Pouvreau S, Van Wormhoudt A (2007a) Transcriptional regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during prolonged hypoxia. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 307(7):371–382. doi:10.1002/jez.390

Le Moullac G, Quéau I, Le Souchu P, Pouvreau S, Moal J, Le Coz JR, Samain JF (2007b) Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature. *Mar Biol Res* 3(5):357–366. doi:10.1080/17451000701635128

Letunic I, Doerks T, Bork P (2011) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkr931

Manley AR (1983) The effects of copper on the behavior, respiration, filtration and ventilation activity of *Mytilus Edulis*. *Mar Biol Assoc UK* 63(1):205–222

Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129(7):1261–1274. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009

Mitchelhill KI, Michell BJ, House CM, Stapleton D, Dyck J, Gamble J, Ullrich C, Witters LA, Kemp BE (1997) Posttranslational modifications of the 5-AMP-activated protein kinase beta1 subunit. *J Biol Chem* 272(39):24475–24479. doi:10.1074/jbc.272.39.24475

Mu J, Brozinick JT Jr, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ (2001) A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7(5):1085–1094. doi:10.1016/S1097-2765(01)00251-9

Premier chapitre :

Caractérisation des sous-unités α de l'AMPK chez *Crassostrea gigas* et régulation au cours de l'hypoxie

Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra LH (2007) Akt in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg Off J Acad Surg Res* 20(3):195–203. doi:10.1080/08941930701366471

Musi N, Goodyear LJ (2003) AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiol Scand* 178(4):337–345. doi:10.1046/j.1365-201X.2003.01168.x

Neumann D (2003) Mammalian AMP-activated protein kinase: functional, heterotrimeric complexes by co-expression of subunits in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 30(2):230–237. doi:10.1016/s1046-5928(03)00126-8

Newell RC (1979) *Biology of intertidal animals*. Mar Ecol Surveys Ltd., Kent

Noy P, Sawasdichai A, Jayaraman PS, Gaston K (2012) Protein kinase CK2 inactivates PRH/Hhex using multiple mechanisms to de-repress VEGF-signalling genes and promote cell survival. *Nucleic Acids Res*. doi:10.1093/nar/gks687

Parcellier A, Tintignac LA, Zhuravleva E, Hemmings BA (2008) PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal* 20(1):21–30. doi:10.1016/j.cellsig.2007.07.010

Pernet F, Barret J, Gall PL, Corporeau C, Dégremont L, Lagarde F, Pépin JF, Keck N (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practises in the Thau lagoon. *Aquac Environ Interact*. doi:10.3354/aei00041

Pichavant K, Person-Le-Ruyet J, Le Bayon N, Sévère A, Le Roux A, Quémener L, Maxime V, Nonnotte G, Boeuf G (2000) Effects of hypoxia on growth and metabolism of juvenile turbot. *Aquaculture* 188(1–2):103–114. doi:10.1016/s0044-8486(00)00316-1

Pinz I, Perry DJ, Frederich M (2005) Activation of 5'-AMP activated protein kinase during anaerobiosis in the rock crab, *Cancer irroratus*. *Bull Mt Desert Isl Biol Lab* 44:31–32

Ramanathan L, Sheth PR, Ogas P, Xiao L, Le HV (2010) Purification and characterization of truncated human AMPK alpha 2 beta 2 gamma 3 heterotrimer from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* 70(1):13–22. doi:10.1016/j.jep.2009.10.007

Ramnanan CJ, McMullen DC, Groom AG, Storey KB (2010) The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. *Mol Cell Biochem* 335(1–2):91–105. doi:10.1007/s11010-009-0246-7

Rodet F, Lelong C, Dubos MP, Favrel P (2008) Alternative splicing of a single precursor mRNA generates two subtypes of gonadotropin-releasing hormone receptor orthologues and their variants in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene* 414(1–2):1–9. doi:10.1016/j.gene.2008.01.022

Ruas JL, White JP, Rao RR, Kleiner S, Brannan KT, Harrison BC, Greene NP, Wu J, Estall JL, Irving BA, Lanza IR, Rasbach KA, Okutsu M, Nair KS, Yan Z, Leinwand LA, Spiegelman BM (2012) A PGC-1 α soform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* 151(6):1319–1331. doi:10.1016/j.cell.2012.10.050

Saha AK, Schwarsin AJ, Roduit R, Masse F, Kaushik V, Tornheim K, Prentki M, Ruderman NB (2000) Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside. *J Biol Chem* 275(32):24279–24283. doi:10.1074/jbc.C000291200

Samain JF, McCombie H (2008) Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The mostest project. Edition Ifremer Quae

Sato T, Toyoshima A, Hiraki T, Ohta Y, Katayama K, Arai T, Tazaki H (2011) Effects of metformin on plasma concentrations of glucose and mannose, G6Pase and PEPCK activity, and mRNA expression in the liver and kidney of chickens. *Br Poult Sci* 52(2):273–277. doi:10.1080/00071668.2011.560595

Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11):5857–5864

Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE (1996) Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem* 271(2):611–614. doi:10.1074/jbc.271.2.611

Stenslokken KO, Ellefsen S, Stecyk JA, Dahl MB, Nilsson GE, Vaage J (2008) Differential regulation of AMP-activated kinase and AKT kinase in response to oxygen availability in crucian carp (*Carassius carassius*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(6):1803–1814. doi:10.1152/ajpregu.90590.2008

Storey KB (1993) Molecular mechanisms of metabolic arrest in molluscs. In: *Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation*. CRC Press, Boca Raton, pp 253–269

Stricker SA (2011) Potential upstream regulators and downstream targets of AMP-activated kinase signaling during oocyte maturation in a marine worm. *Reproduction* 142(1):29–39. doi:10.1530/Rep-10-0509

Premier chapitre :

Caractérisation des sous-unités α de l'AMPK chez *Crassostrea gigas* et régulation au cours de l'hypoxie

Stricker SA, Swiderek L, Nguyen T (2010) Stimulators of AMP-activated kinase (AMPK) inhibit seawater- but not cAMP-induced oocyte maturation in a marine worm: implications for interactions between cAMP and AMPK signaling. *Mol Reprod Dev* 77(6):497–510. doi:10.1002/mrd.21177

Sung JY, Woo CH, Kang YJ, Lee KY, Choi HC (2011) AMPK induces vascular smooth muscle cell senescence via LKB1 dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 413(1):143–148. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.071

Sussarellu R, Fabioux C, Le Moullac G, Fleury E, Moraga D (2010) Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Mar Genomics* 3(3–4):133–143. doi: 10.1016/j.margen.2010.08.005

Sussarellu R, Fabioux C, Le Goic N, Lambert C, Soudant P, Moraga D (2011) Molecular and cellular response to short-term oxygen variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol* 412:87–95. doi: 10.1016/j.jembe.2011.11.007

Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D (2006) Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *Biol Chem* 281(43):32207–32216. doi:10.1074/jbc.M606357200

Towler MC, Hardie DG (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 100(3):328–341. doi:10.1161/01.RES.0000256090.42690.05

Tran D, Boudou A, Massabuau JC (2000) Mechanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can J Zool* 78(11):2027–2036. doi:10.1139/cjz-78-11-2027

Tripathi G, Verma P (2004) Sex-specific metabolic changes in the annual reproductive cycle of a freshwater catfish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 137(1):101–106. doi:10.1016/j.cbpc.2003.10.005

Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Flamez D, Mu J, Wojtaszewski JF, Schuit FC, Birnbaum M, Richter E, Burcelin R, Vaulont S (2003) Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1):216–219. doi:10.1042/

Wadley GD, Lee-Young RS, Canny BJ, Wasuntarawat C, Chen ZP, Hargreaves M, Kemp BE, McConell GK (2006) Effect of exercise intensity and hypoxia on skeletal muscle AMPK signaling and substrate metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(4):E694–E702. doi:10.1152/ajpendo.00464.2005

Woods A, Vertommen D, Neumann D, Turk R, Bayliss J, Schlattner U, Wallimann T, Carling D, Rider MH (2003) Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 278(31):28434–28442. doi:10.1074/jbc.M303946200

Wu RSS (2002) Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Mar Pollut Bull* 45(1–12):35–45. doi:10.1016/S0025-326X(02)00061-9

Yook K, Harris TW, Bieri T, Cabunoc A, Chan J, Chen WJ, Davis P, de la Cruz N, Duong A, Fang R, Ganesan U, Grove C, Howe K, Kadam S, Kishore R, Lee R, Li Y, Muller HM, Nakamura C, Nash B, Ozersky P, Paulini M, Raciti D, Rangarajan A, Schindelman G, Shi X, Schwarz EM, Ann Tuli M, Van Auken K, Wang D, Wang X, Williams G, Hodgkin J, Berriman M, Durbin R, Kersey P, Spieth J, Stein L, Sternberg PW (2012) WormBase 2012: more genomes, more data, new website. *Nucleic Acids Res* 40 (Database issue):735–741. doi:10.1093/nar/gkr954

Yoshida EN, Benkel BF, Fong Y, Hickey DA (1999) Sequence and phylogenetic analysis of the SNF4/AMPK gamma subunit gene from *Drosophila melanogaster*. *Genome* 42(6):1077–1087

Zhang G, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, Yang P, Zhang L, Wang X, Qi H, Xiong Z, Que H, Xie Y, Holland PW, Paps J, Zhu Y, Wu F, Chen Y, Wang J, Peng C, Meng J, Yang L, Liu J, Wen B, Zhang N, Huang Z, Zhu Q, Feng Y, Mount A, Hedgecock D, Xu Z, Liu Y, Domazet-Lošo T, Du Y, Sun X, Zhang S, Liu B, Cheng P, Jiang X, Li J, Fan D, Wang W, Fu W, Wang T, Wang B, Zhang J, Peng Z, Li Y, Li N, Chen M, He Y, Tan F, Song X, Zheng Q, Huang R, Yang H, Du X, Chen L, Yang M, Gaffney PM, Wang S, Luo L, She Z, Ming Y, Huang W, Huang B, Zhang Y, Qu T, Ni P, Miao G, Wang Q, Steinberg CE, Wang H, Qian L, Liu X, Yin Y (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490(7418):49–54. doi:10.1038/nature11413

Zhu XJ, Feng CZ, Dai ZM, Zhang RC, Yang WJ (2007) AMPK alpha subunit gene characterization in artemia and expression during development and in response to stress. *Stress* 10(1):53–63. doi:10.1080/10253890601130773

Deuxième chapitre :
Caractérisation des sous-unités β et γ
et régulation sexe-spécifique de l'AMPK

I. Contexte de l'étude

L'huître creuse est un organisme possédant une reproduction atypique. En effet, comme nous avons pu le voir au cours de l'introduction de ce document, *C. gigas* est un bivalve hermaphrodite alternatif qui présente une fécondité très élevée. Cette production massive de gamètes occasionne d'importantes dépenses énergétiques qui sont majoritairement soutenues par l'utilisation de réserves préalablement constituées. De plus, la gonade de l'huître possède un développement particulier. Lors de chaque période de reproduction, l'huître doit reconstituer intégralement son tissu gonadique et mettre en place les structures permettant d'assurer le développement d'un nombre de gamètes souvent très important.

Au cours du premier chapitre de thèse, nous avons validé plusieurs outils et acquis des données importantes sur la régulation de la sous unité α et de ses isoformes de l'AMPK dans les muscles lisses et striés responsables de la fermeture des valves au cours d'une exposition forcée à l'hypoxie. Ces outils développés nous ont aussi permis de caractériser la présence des trois isoformes de la sous-unité α dans de nombreux tissus de l'huître creuse et en particulier dans le manteau-gonade au cours du repos sexuel (stade 0). La sous-unité α entière, d'une taille de 62 kDa, a été trouvée assez fortement exprimée dans le manteau, tandis que les sous-unités α tronquées, jouant potentiellement un rôle régulateur au cours de l'hypoxie, n'ont quant à elles été détectées que très faiblement.

Dans ce second chapitre, la caractérisation et la quantification de l'expression des sous-unités β et γ de l'AMPK ainsi que sept cibles appartenant aux métabolismes lipidiques et glucidiques chez l'huître creuse *C. gigas* sont présentées. De plus, une technique fiable de mesure de l'activité de cette kinase chez l'huître creuse *C. gigas* a aussi été développée au cours de cette étude. Cette étude avait pour ambition de décrire et étudier *in vivo* le comportement de l'AMPK et de plusieurs de ses cibles plus ou moins directes appartenant à la voie de signalisation AMPK au cours d'un cycle annuel de reproduction échantillonné en milieu naturel.

II. Synthèse

II.1. AMPK trimère

Chez la majorité des espèces eucaryotes, la kinase AMPK pour être pleinement fonctionnelle doit être formée d'une liaison de trois protéines comprenant une sous-unité α catalytique et deux sous-unités dites de soutien appelées β et γ . L'étude précédente a permis de confirmer que plusieurs isoformes de la sous-unité α catalytique existaient chez *C. gigas* et qu'elles possédaient toutes le domaine de liaison aux sous-unités de soutien. Lors de recherches effectuées dans les bases de données, pour chaque sous-unité de soutien, une seule isoforme a été trouvée. La description des domaines conservés et l'étude phylogénétique ont permis d'affilier ces sous-unités à des orthologues déjà décrits. La sous-unité β décrite chez *C. gigas* montre une absence du site de phosphorylation sérine 24/25, site caractéristique des sous-unités $\beta 1$ décrite chez les autres espèces. La sous-unité β de *C. gigas* a été caractérisée comme étant une isoforme $\beta 2$. L'affiliation de la sous-unité γ aux autres orthologues est principalement liée aux homologies de séquences placées en position N-terminale, région décrite comme étant la plus variable entre les isoformes $\gamma 1$, 2 et 3. L'analyse phylogénétique a permis d'affilier la sous-unité γ de l'AMPK au groupe des isoformes $\gamma 2$. La caractérisation de ces trois sous-unités et en particulier la conservation des domaines de liaison entre elles ainsi que l'observation d'une phosphorylation sur le résidu Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK confirment que les trois sous-unités de l'AMPK peuvent former un trimère fonctionnel chez l'huître creuse *C. gigas*.

II.2. Mise au point de l'estimation de l'activité de l'AMPK

Plusieurs méthodes d'estimation de l'activité existent pour AMPK. La méthode de dosage de l'activité de façon directe passe par l'estimation de l'incorporation par l'AMPK d'un groupement phosphore radioactif (^{32}P) sur un motif peptidique spécifique. Plusieurs motifs peptidiques ont été caractérisés comme étant des cibles de phosphorylation spécifique de l'AMPK (Davies et al., 1989). Les peptides d'intérêt les plus utilisés sont les peptides SAMS, AMARA et LNR. Une autre technique plus indirecte consiste à quantifier la phosphorylation du résidu Thr172 situé dans le domaine kinase de la sous-unité α . La phosphorylation de ce résidu par les AMPK kinases a été caractérisée comme requise pour l'activité de l'AMPK (Hawley et al., 1996). De plus, une corrélation entre l'activité de phosphorylation de l'AMPK et sa phosphorylation sur le résidu Thr172 a été démontrée (Park et al., 2002). Cette découverte, permet d'utiliser le dosage de la phosphorylation du résidu Thr172 comme témoin indirect de l'activité de la kinase. Le résidu Thr172 est très conservé chez les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Stapleton

et al., 1996). Malgré une fréquente cohabitation cellulaire (Salt et al., 1998a), ces deux isoformes peuvent présenter des localisations cellulaires et tissulaires (Stapleton et al., 1996; Wojtaszewski et al., 2000) ainsi que des affinités de substrats différents (Woods et al., 1996). Ces observations laissent suggérer que l'emploi de peptides synthétiques comme substrats de phosphorylation pour témoigner de l'activité des deux isoformes ne serait pas optimal (Dale et al., 1995; Michell et al., 1996). Même si elle ne témoigne que de l'activité indirecte de l'AMPK, l'utilisation d'anticorps dirigés vers la phosphorylation en Thr172, possède l'avantage de cibler une zone conservée chez l'ensemble des isoformes de la sous-unité α . D'ailleurs la quantification de la phosphorylation en Thr172 a été corrélée de façon positive significativement avec l'activité directe cumulée des deux sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans le muscle humain (Wojtaszewski et al., 2002).

La mesure de la phosphorylation du peptide d'intérêt SAMS par radioactivité et la mesure de la phosphorylation de la Thr172 par Western blot ont été testées chez *C. gigas*. L'utilisation d'un anticorps hétérologue dirigé contre la phosphorylation en Thr172 de la sous-unité α a permis de détecter après électrophorèse monodimensionnelle et Western blot une seule bande à la taille attendue d'environ 62 kDa. L'obtention de la séquence entière de la sous-unité α de l'AMPK chez *C. gigas* lors de l'étude précédente a permis au fournisseur de l'anticorps hétérologue (Cell Signaling Technology) de confirmer la cross-réactivité de cet anticorps à 100 % avec le domaine très conservé du résidu Thr172. La mesure de la phosphorylation du peptide d'intérêt SAMS par radioactivité, a permis de détecter un signal sur le témoin positif choisi (cerveau de rat) et un signal relativement faible sur plusieurs tissus de l'huître (muscle lisse, muscle strié et gonade). Ces valeurs d'activité faibles n'ont pas pu être corrélées avec les quantifications de la phosphorylation de la Thr172 par Western blot. En plus des raisons de non spécificité peptidique citées dans le paragraphe précédent, il est possible que l'étape de concentration spécifique de la fraction contenant AMPK ne soit pas idéale chez *C. gigas*. En effet, pour augmenter le signal AMPK mesuré, une étape de concentration utilisant le « polyéthylène glycol » (PEG) a été réalisée sur les échantillons (20 μ L de l'échantillon, 380 μ L de tampon de lyse, 100 μ L de PEG 50 % sur roue à 4°C pendant au moins 12 h et récupération du culot après plusieurs étapes de centrifugation/nettoyage). Il est possible que cette méthode de précipitation, validée pour les tissus adipeux et hépatiques de rat, ne soit peut-être pas optimale pour précipiter les mêmes éléments dans des tissus différents (Fahie-Wilson and Halsall, 2008), et donc dans notre cas l'AMPK présente dans les tissus de l'huître. Pour ces raisons, la mesure indirecte de l'AMPK utilisant la quantification de la phosphorylation du résidu Thr172 a été jugée plus fiable pour quantifier l'activité totale de cette kinase *C. gigas*. Cependant, cette

mesure témoigne de façon indirecte de l'activité de l'AMPK et une validation plus directe permettra de confirmer les mesures d'activités observées.

Au cours de ce doctorat, une estimation directe de l'activité a été testée en essayant de mesurer la phosphorylation par anticorps hétérologue en Western blot du résidu Ser79 de l'ACC, cible de phosphorylation directe de l'AMPK (Ha et al., 1994). Cependant, cette expérience n'a pas permis de mesurer un signal dans les tissus de l'huître sûrement dû à la non-spécificité de l'anticorps hétérologue utilisé. Plusieurs autres pistes sont envisageables pour mesurer l'activité directe de l'AMPK chez l'huître et ainsi la corrélérer à la mesure indirecte. Dans le cas de la mesure directe de l'activité AMPK par incorporation de ^{32}P sur un peptide d'intérêt, lors de l'étape de la concentration, la précipitation utilisant le PEG pourrait être remplacée par une immunoprécipitation. De plus, la mesure de l'incorporation du ^{32}P pourrait être testée sur d'autres substrats tels que les peptides AMARA et LNR. Étant donné notre volonté dans un premier temps de détecter et quantifier l'activité AMPK totale chez l'huître creuse, nous avons préféré estimer l'activité de cette kinase en utilisant la méthode indirecte de quantification du niveau de phosphorylation du résidu Thr172 par l'utilisation d'anticorps hétérologues.

II.3. L'AMPK pendant la gamétogenèse

La phosphorylation de la Thr172 a été quantifiée dans le manteau/gonade lors du repos sexuel ainsi que dans la gonade au cours de tous les stades de la reproduction aussi bien chez les femelles que chez les mâles. Chez les mâles, le niveau de phosphorylation de la Thr172 reste significativement constant tout au long de la gamétogenèse, du stade de repos sexuel jusqu'à la maturation. Ces niveaux de phosphorylation ne sont d'ailleurs pas significativement différents de ceux observés chez les femelles entre le repos sexuel et le stade de méiose (stade 2). Cependant, bien que chez les femelles, le niveau de phosphorylation de la Thr172 reste constant jusqu'au stade des méioses, une diminution hyper significative est observée pour les gonades femelles au cours du stade de maturation (stade 3).

Les ARN messagers de trois sous-unités ont été trouvés exprimés à tous les stades de gamétogenèse chez les individus indifférenciés, les femelles et les mâles. Plusieurs variations ont été observées, principalement au niveau des ARN messagers significativement plus forts chez les mâles par rapport aux femelles à tous les stades de la gamétogenèse et une tendance à la diminution des niveaux des ARN messagers pendant le déroulement de la gamétogenèse chez les mâles. Les variations des niveaux d'ARN messagers observées ne semblent pas avoir d'impact sur le maintien de la phosphorylation en Thr172.

II.4. Conclusion de cette étude

Nous avons démontré une régulation négative du niveau de phosphorylation en Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK au stade 3 de gamétogenèse chez la femelle, alors que ce niveau de phosphorylation est maintenu chez le mâle à ce même stade. Chez les huîtres, au cours de la maturation, le cytoplasme des ovocytes devient de plus dense en plus granuleux se chargeant d'ARN messagers, de protéines et de lipides (Kennedy, 1996). L'accumulation de ces réserves, appelées vitellus, est un processus anabolique incompatible avec l'activation de l'AMPK, expliquant la baisse de la quantité de phosphorylation observée à ce stade chez les femelles. Les niveaux d'ARN messagers observés au cours de la gamétogenèse ne suivent pas le même profil que les niveaux de phosphorylation en Thr172, suggérant l'existence des régulations post-traductionnelles. Dans plusieurs cultures cellulaires, il a été démontré que l'expression des ARN messagers et la quantité de protéines sont généralement positivement corrélées (Anderson and Seilhamer, 1997; Chen et al., 2002; Greenbaum et al., 2003; Guo et al., 2008). Cependant, plusieurs études suggèrent que la force du degré de corrélation varie grandement entre les gènes et seule une partie des ARN messagers montrent une forte corrélation avec la quantité de protéines. Plusieurs processus biologiques complexes tels l'édition, l'épissage, la dégradation des ARN messagers non-sens, la polyadénylation, la 5'cap ou les différences dans les structures secondaires des ARN messagers pourraient affecter les quantités d'ARN messagers et de protéines à de nombreux échelons. De plus, les degrés de corrélation faibles ou non significatifs pourraient s'expliquer par les méthodes technologiques actuelles utilisées pour quantifier les ARN messagers et les protéines à haut débit. Ces techniques actuelles proposent des quantifications pas suffisamment précises, permettant de déceler uniquement les variations les plus significatives. De par ces constats, la mise en relation des niveaux d'ARN messagers avec une modification post traductionnelle telle qu'une phosphorylation a peu de chance de montrer une corrélation forte.

Au cours de la gamétogenèse chez *C. gigas*, les trois sous-unités α , β et γ suivent les mêmes profils d'expression. Les sous-unités sont significativement plus exprimées chez les mâles que chez les femelles à tous les stades de la gamétogenèse. De plus, chez les mâles, le niveau des ARN messagers est plus important lors des premiers stades de gamétogenèse lors des mitoses et méioses goniales. Ces différences, principalement entre les deux sexes, peuvent s'expliquer par des inégalités au niveau du taux de renouvellement, de stockage et de dégradation des ARN messagers.

L'AMPK peut réguler les voies métaboliques soit en ayant un effet à court terme d'activation/inhibition soit à plus long terme modulant l'expression de certains gènes via

l'activation de facteurs de transcription. Au cours de cette étude, nous avons étudié les niveaux d'ARN messagers de plusieurs protéines impliquées soit dans le métabolisme du glucose (PI3K, AKT et CREB) soit dans le métabolisme des acides gras (ACC, NCOA4, CaMK4 et SREBP1). Ces protéines sont liées plus ou moins directement à la voie de signalisation AMPK, mais aucun de leurs niveaux d'ARN messagers n'a été corrélé avec les niveaux de phosphorylation en Thr172. Plusieurs corrélations positives significatives ont été constatées entre les niveaux d'ARN messagers de la pi3k et des ARN messagers de ncoa4, de camk4 et des trois sous-unités de l'AMPK. Ces corrélations et les profils des niveaux des ARN messagers analysés au cours de la gamétogenèse pour ces cibles suggèrent que les métabolismes des acides gras via les niveaux d'ARN messagers de ncoa4 et camk4 et du glucose via le niveau d'ARN messagers de la pi3k, pourraient représenter le réseau d'énergie supportant la gamétogenèse chez l'huître creuse. La production massive de gamètes lors de la reproduction cause d'importantes dépenses énergétiques qui sont majoritairement soutenues par l'utilisation de réserves préalablement constituées. Ces réserves sont de nature glycogénique et lipidique (Berthelin et al., 2000a; Berthelin et al., 2000b; Berthelin et al., 2001; Deslous-Paoli and Héral, 1988; Deslous-Paoli et al., 1982; Kennedy, 1996). La kinase PI3K a été caractérisée comme faisant partie des enzymes clés impliquées dans le contrôle du métabolisme par l'insuline (Bieri et al., 2012; Viana et al., 2007), permettant par exemple de réguler l'absorption du glucose dans les cellules en favorisant les translocations aux membranes plasmiques de certains GLUT (Farese, 2001; Tsao et al., 2001). La PI3K fait donc partie de la voie insuline dont plusieurs éléments appartenant à cette voie ont déjà été caractérisés chez *C. gigas* (Gricourt et al., 2003; Hamano et al., 2005; Jouaux et al., 2011).

III. Article 2 : « Sex-specific regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* »

Article soumis au journal « Marine Biotechnology » le 6 novembre 2012.
ISSN : 1436-2236. Impact factor 2011 : 3,430.

Sex-specific regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

Eric Guévelou¹, Arnaud Huvet¹, Clara E. Galindo-Sánchez², Massimo Milan³, Virgile Quillien¹, Jean-Yves Daniel¹, Claudie Quéré¹, Pierre Boudry¹ and Charlotte Corporeau^{1*}.

¹ Ifremer, Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin (UMR 6539, LEMAR), Plouzané, France.

² Departamento de Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja California, México.

³ Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padova, Legnaro (Padova), Italy.

*Corresponding author: Dr. Charlotte Corporeau, Ifremer, Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin (UMR 6539, LEMAR), BP 70, 29280 Plouzané, France.

Tél : +33 2 98 22 47 64.

Fax : + 33 2 98 22 46 53.

E-mail : Charlotte.Corporeau@ifremer.fr

Short title: AMPK sex-specific regulation in *C. gigas*

ABSTRACT

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* displays a high energy allocation to reproduction. In order to understand energy management during gametogenesis, we characterized the mRNA sequences of the AMP-activated protein kinase (AMPK) subunits β and γ and of putative AMPK-related targets following bio-informatics mining on existing genomic resources. The *ampk α* mRNA sequence had been previously characterized. We analyzed the mRNA expression of AMPK α , β and γ and activation of the catalytic AMPK α subunit in the gonads of male and female oysters sampled through a reproductive cycle. We also quantified the mRNA expression of genes belonging to fatty acid and glucose metabolism. *Ampk α* mRNA levels were over-expressed in males and up-regulated at the first stage of gametogenesis, when mitotic activity and the differentiation of germinal cells occurs. AMPK α threonine 172 phosphorylation appeared almost inhibited in the mature female gonads, indicating a way in which accumulation of reserves in oocytes could be promoted. Some targets of fatty acid and glucose metabolism appeared correlated with the expression of *ampk* subunits at the mRNA level but not with threonine 172 phosphorylation. The AMPK system seems to be functional in the gonad of *C. gigas*. Observed sex-specific variations of *ampk* subunit mRNAs were not related to the level of AMPK α threonine 172 phosphorylation. AMPK may play a sex-dependent role in the management of energy during gametogenesis via the regulation of mRNA expression of targets such as *akt* for females or *creb* and *ncoa4* for males, which might be involved in the energetic network of oyster reproduction.

Keywords: AMP-activated protein kinase, *Crassostrea gigas*, gametogenesis, marine bivalve, reproduction.

1. INTRODUCTION

In the Lophotrochozoa clade of bilaterian animals, some marine bivalves such as the Pacific oyster *Crassostrea gigas* have a unique reproductive cycle. *Crassostrea gigas* is an irregular successive hermaphrodite, meaning that most individuals first develop as males (Pauley et al., 1988) and may then change sex between different reproductive seasons (Amemiya, 1929). In temperate regions, *C. gigas* exhibits a seasonal reproductive cycle, mainly driven by temperature and food availability (Fabioux et al., 2005). The *C. gigas* gonad is a diffuse and non-permanent tissue composed of somatic cells and germ cells that surround the digestive gland (Fabioux et al., 2004a). As a result, oyster gonad is a mixed tissue including storage tissue, smooth muscle fibers and infiltrated hemocytes. Like many marine invertebrates, Pacific oysters have very high fecundity (Galtsoff, 1930, Royer et al., 2008). Adults allocate nearly 55 % of their annual energy budget to reproduction (van der Veer et al., 2006) and, when mature, the gonad represents up to 60 % of the volume of the visceral mass (Fabioux et al., 2005). Gametogenesis is a period of negative energy balance where most of the stored energy is used for gamete production (Soletchnik et al., 1997, Berthelin et al., 2000). As a result, gametogenesis might have a major impact on several physiological functions, such as defense and growth, and therefore on survival. In fact, reproduction has often been suggested as the potential reason why higher summer mortality occurs in oysters during reproduction (Ernande et al., 2003, Huvet et al., 2010, Pernet et al., 2012, Samain et al., 2007, Soletchnik et al., 1999): individuals with high energy investment in gametogenesis would have less energy available for maintenance and defense.

In vertebrates, the physiological mechanisms that control energy metabolism are linked with those that control reproduction through energetic signaling pathways, which integrate energy intake, storage and expenditure to allow animals to reach reproductive maturity. When these signaling pathways are deregulated, animals are less fertile (Schneider, 2004, Wade and Jones, 2004). In the past, gonad differentiation and development in oysters were studied by measuring the expression of genes potentially involved in reproduction (for example Cg-foxL2 (Naimi et al., 2009a, Santerre et al., 2012), Cg-DMI (Naimi et al., 2009b), vasa termed oylvlg (Fabioux et al., 2004b), og-TgF β (Fleury et al., 2008, Corporeau et al., 2011) or elements belonging to the insulin pathway (Hamano et al., 2005, Gricourt et al., 2003, Jouaux et al., 2011) and recently by a genome-wide expression profiling that identified gonad- and sex-specific genes and potential markers of early sex differentiation in *C. gigas* (Dheilly et al., 2012). Despite this work, our understanding of the mechanisms of the regulation of gonad development versus storage tissue is still limited (Berthelin et al., 2000, Bacca et al., 2005).

In vertebrates, the energetic signaling pathway of AMP-dependent kinase (AMPK) plays a major role in the balance between reproduction and energy metabolism to control gametogenesis (Tosca and Dupont, 2007, Tosca et al., 2008). AMPK is a heterotrimeric kinase composed of a catalytic α -subunit and two regulatory subunits, β and γ . Genes encoding the three subunits of AMPK are highly conserved in eukaryotic species for which complete genome sequences are available, including vertebrates, invertebrates, plants, fungi, and protozoa (Hardie, 2003). In humans, two or three genes encode each subunit, giving rise to 12 possible heterotrimeric combinations, with spliced variants further increasing the potential diversity of AMPK proteins (Kemp et al., 2003). AMPK activation requires the presence of all three subunits (Dyck et al., 1996) and its kinase activity is regulated at the post-translational level. Many phosphorylation sites have been described in AMPK subunits α and β (Hawley et al., 1996, Mitchelhill et al., 1997, Woods et al., 2003b). AMPK α threonine 172 has been identified as the determinant and required phosphorylation site for activation of AMPK kinase (Neumann, 2003, Hawley et al., 1996, Suter et al., 2006). A high cellular ratio of AMP/ATP triggers the phosphorylation and activation of AMPK (Choi et al., 2001). Once activated by low energy status, AMPK rapidly phosphorylates and modulates a wide array of downstream targets, mainly glucose and fatty acid metabolic enzymes. AMPK stimulates ATP-producing catabolic pathways, such as lipolysis, glycolysis and glucose uptake, while it inhibits ATP-consuming anabolic pathways, such as glycogen synthesis and lipogenesis (Hardie, 2004).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

Oysters were produced in March 2005 at the Ifremer hatchery in La Tremblade (Charente-Maritime, France), from wild oyster genitors (progeny "G4t2n" as described in Boudry et al., 2008). Juveniles were then reared at the Ifremer Bouin nursery (Pays de la Loire, France). In April 2006, the one-year-old oysters were put in standard field culture (300 oysters per bag, 17 bags in total) for three years in Locmariaquer (Morbihan, France).

Fourteen bags were dedicated to sampling and the three remaining bags used to estimate the mortality by monthly counting of dead and live oysters. From November 2008 through June 2009, dead oysters were removed from the bags and around 60 were collected at random from the 14 bags (5 per bag) monthly. At each sampling time, oysters were opened, the shell removed, and a 3-mm cross section of the visceral mass excised just in front of the pericardial region for histological processing and examination. The left part of the gonad was immediately frozen, crushed to a fine powder at -196°C with a Danguomeau mill and stored in liquid nitrogen for further analyses.

2.2. Methods

2.2.1 Histology

For all studied individuals, the 3-mm cross sections were immediately fixed in modified Davidson's solution (Latendresse et al., 2002) at 4°C for 48 h. Sections were dehydrated in ascending ethanol solutions, cleared with with Microclearing (Diapath), a xylene substitute, and embedded in paraffin wax. Five- μm thick sections were cut, mounted on glass slides and stained with Harry's hematoxylin-eosin Y (Martoja and Martoja-Pierson, 1967). The histological slides were examined under a light microscope to determine the sex and the gametogenic stage of each individual, according to the reproductive scale reported by Steele and Mulcahy (1999).

The initial stage of gametogenesis, stage 0, is considered a sexual resting stage where small clusters of self-renewing stem cells appear scattered in the conjunctive tissue. At this stage, the sex of an individual cannot be determined by histological observations. After this stage 0, germ cells divide by mitosis during stage 1; meiosis occurs during stage 2; and stage 3 is the stage of ripeness when spawning can occur (Berthelin et al., 2001, Fabioux et al., 2004b, Steele and Mulcahy, 1999). Starting from stage 1, males and females follow sex-specific differentiation for gametogenesis. Three different stages were observed for each sex and considered in the present study, as follows.

For females: Stage 1 (developing early active): Oogonia arising from stem cells along the follicle; no free oocytes. Connective tissue is very abundant. Stage 2 (developing late active):

Free and attached oocytes present with distinct nuclei that stain paler than the cytoplasm. Stage 3 (ripe): Free oocytes with distinct nuclei and nucleoli.

For males: Stage 1 (developing early active): Many small follicles; spermatogonia and spermatocytes numerous, no spermatozoa. Stage 2 (developing late active): Follicle cells contain predominantly spermatids and spermatozoa; characteristic swirling pattern of spermatozoa, with tails toward follicle lumen, in centre of follicle. Stage 3 (ripe): Inter-follicular tissue and germinal epithelium are inconspicuous. Follicles filled with spermatozoa oriented with tails to follicle lumen forming a characteristic swirling pattern that completely fills the follicle.

2.2.2. Database mining

All the genes analyzed in this study were identified from the GigasDatabase (www.sigenae.org, (Fleury et al., 2009)). Homology searches obtained from GigasDatabase were confirmed, or in some cases modified, by one-by-one annotation of the selected ESTs using a BLASTX search (Altschul et al., 1997) and protein domain conservation using ExPASy prosite (de Castro et al., 2006) and SMART (Schultz et al., 1998), following cDNA sequence conversion into predicted amino acid using the ExPASy translate tool (Gasteiger et al., 2003). Multiple alignments of predicted amino acids of oyster sequences were performed with a range of AMPK sequences from vertebrates and invertebrates including *C. gigas* sequences released from the oyster genome project (Zhang et al., 2012), using CLUSTALW (Combet et al., 2000).

2.2.3. Phylogenetic tree construction

BLAST searches were performed on the NCBI protein collection nr/prot database and ENSEMBL protein database (<http://www.ensembl.org/index.html>), using the blastx option with default settings in order to retrieve AMPK β and AMPK γ orthologs in both vertebrate and invertebrate species. For phylogenetic tree construction, all amino acid sequences were aligned using the MUSCLE program, by applying the default settings. The resulting alignment was analyzed with the Neighbor-Joining method (MEGA, software version 5.0).

2.2.4. Real-time PCR analyses

Total RNA of each individual was isolated using Extract-all (Eurobio), at a concentration of 1ml/50mg powder. Samples were then treated with DNase I (1 U/ μ g total RNA, Sigma) to prevent DNA contamination. RNA quality was assessed using RNA nano chips and Agilent RNA 6000 nano reagents (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured using an ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies) at 260 nm, using the conversion factor 1OD = 40 μ g/L RNA. From 2 μ g of total RNA, RT-PCR amplifications were carried out for 10 mRNA as described in (Fabioux et al., 2004a). In the present study, amplification of the

housekeeping gene elongation factor I (eIF) cDNA (primers in (Fabioux et al., 2004a) was used as an internal control for gene expression. Indeed, this gene presented a steady-state level of expression (CV = 3.1 %) and we did not observe any significant difference between Cq values for eIF between the treatments (Two-way ANOVA: $F = 1.97$; $p = 0.084$). PCR efficiency (E) was estimated for each primer pair by constructing standard curves to ensure that E ranged from 98 to 102 %. Real-time PCR amplifications were then carried out in triplicate with 5 μ L cDNA (1/10 dilution) in a total volume of 15 μ l, using the iQ SYBR Green Supermix (Biorad) and an Icyler (Biorad) (protocol in (Huvet et al., 2004). Samples were deposited in random positions in each plate. Each run included a cDNA reference, negative controls (each total RNA sample with DNase I treatment), and blank controls (water) analyzed for each primer pair. Melting curve analysis was systematically performed for all genes in order to verify the specificity of the PCR product. For a studied gene “i”, results were expressed as $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Pfaffl, 2001) with $\Delta Cq = Cq(i) - Cq(eIF)$ and $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq$ of cDNA sample - ΔCq of the cDNA reference. The primer sequences were designed using Primer 3 software (Rozen and Skaletsky, 2000). Targeted genes and PCR efficiencies are listed in Table 1.

2.2.5. Total protein extraction

For each individual, 150 mg of powdered tissue was homogenized in a lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 0.5 % Igepal; pH 8.8 at 4°C) enriched with phosphatase and protease inhibitors (5 mL phosphatase inhibitor cocktail II, 1 tablet Complete EDTA free protease inhibitor cocktail per 25 ml). Total proteins were then extracted as described by Le Foll et al., 2007 (Le Foll et al., 2007). Briefly, total protein lysates were obtained after homogenization with an Ultra-Turax and soft centrifugation at 3,000 g for 1 h at 4°C. The lipid layer was in the upper phase and was easily eliminated by pipetting. The interphase, which contained the proteins, was collected and the small pellet of cell debris was discarded. The interphase was then centrifuged at 10,000 g for 45 min at 4°C to ensure total lipid depletion. The interphase was collected, aliquoted and stored at -80°C. For each lysate, the total protein content was quantified using a DC protein assay (Bio-Rad) with 96-well microplates (Nunc) in a microplate reader (Bio-Tek® Synergy) and KC4 v3 software to compare results with a calibration curve of standard proteins (Bovine Serum Albumin) provided with the DC protein assay kit. Each protein lysate was then adjusted to a final concentration of 3 mg/mL by adding lysis buffer, and stored at -80°C until further analysis.

2.2.6. Western blot analyses

For each individual, 90 μ g of protein lysate was denatured by Laemmli solution (0.6 M Tris-HCl, 1 mL glycerol, 10 % w/v SDS, 0.5 mL 0.1 % w/v bromophenol blue, 0.5 mL Beta mercaptoethanol) and loaded onto 10 %/SDS/polyacrylamide gel. Proteins were then transferred to a PVDF membrane (Biorad) for immunodetection on Western blot. Immunodetection was performed with a rabbit monoclonal anti-phospho-threonine 172 AMPK α antibody (dilution 1:1000; CST #2535; Ozyme, Cell Signaling Technology). To ensure cross-reactivity of the heterologous antibody, Cell Signaling Technology technical services blasted and confirmed that the antigenic region of this commercially available anti-phospho- threonine 172 AMPK α antibody was present at 100 % in the *C. gigas* protein (Cell Signaling Technology; personal communication). Blots were then revealed using a horseradish peroxidase-linked secondary goat anti-rabbit antibody (dilution 1:5000) and a horseradish peroxidase (HRP) detection kit (Biorad). The relative amount of protein detected was quantified using MULTI-ANALYST software (Biorad) with the background signal removed. The value obtained was expressed in OD/ and represents the band intensity expressed as mean count per pixel, multiplied by the band surface. To ensure that identical amounts of total protein samples were loaded into the gels, membranes were dehybridized after visualization and signals quantified by incubation for 1 h at room temperature in dehybridizing buffer (100 mM glycine, 100 mM NaCl pH 3.2), and rehybridized with an anti-histone H3 antibody (dilution 1:5000; # 9175; Ozyme, Cell Signaling Technology), as described in Fabioux et al., 2009 (Fabioux et al., 2009).

2.2.7. Statistical analyses

Statgraphics software (StatPoint Technologies, Inc.) was used for all statistical analyses. Student-Newman-Keuls multiple comparison of sample means with a 95 % confidence interval was used to compare between stages of gametogenesis for the same sex. For comparison between sexes at the same stage of gametogenesis, we used two-sided t-tests of two independent samples with the significance threshold of $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***). Results are expressed as mean \pm standard error (SE). A matrix of Spearman correlations coefficients was made between all variables with adjusted Holm-Bonferonni correction p-values.

3. RESULTS

3.1. Characterization of $\text{ampk}\beta$ and γ subunits

Ampk β subunit: Among the *C. gigas* EST sequences available in GigasDatabase (Fleury et al., 2009), we identified several contigs annotated as $\text{ampk}\beta$ that were not automatically merged in a unique contig due to insufficient alignment score and/or overlap length. Multiple alignments of these contigs (Sigenae accession numbers: CU991642, FU6OSJA01AUVKV, FU6OSJA01BDGCM) were performed manually using ClustalW. This allowed us to correct the sequence avoiding some false stop codons created by sequencing errors and thus create a new contig (Fig. 1 A). Blasting the recently published complete genome sequence of *C. gigas* showed only one significant result that matched with our $\text{ampk}\beta$ mRNA sequence (GenBank accession number: EKC39833; (Zhang et al., 2012)). The 807 base pair cDNA obtained encoded an entire AMPK β protein of 268 amino acids and 30 kDa that showed more than 65 % conservation with AMPK β subunits in other species. The phylogenetic placement of this sequence in relation to AMPK β sequences found in other species showed that *C. gigas* AMPK β is not strongly linked to the other AMPK β isoforms already described (Fig 1 B). The N-terminal myristoylation site, responsible for membrane binding (Mitchelhill et al., 1997, Warden et al., 2001) is present (Fig. 1 A). Both the glycogen-binding domain (β -GBD), which is responsible for binding AMPK to glycogen (Polekhina et al., 2003, Hudson et al., 2003), and the $\alpha\gamma$ -subunit binding sequence ($\alpha\gamma$ -SBS), which is responsible for binding AMPK β to AMPK α and AMPK γ (Iseli et al., 2005), were conserved in *C. gigas*. Comparing amino acid sequences, *C. gigas* AMPK β GBD and $\alpha\gamma$ -SBS respectively share 62 % and 40 % similarity with *Homo sapiens* AMPK β 2. Several serine phosphorylation sites have been characterized in the AMPK β subunit (Mitchelhill et al., 1997, Warden et al., 2001, Woods et al., 2003b). In *C. gigas*, the serine 24/25, serine 96 and serine 101 phosphorylation sites are missing, while serine 108, positioned at serine 102 in *C. gigas* AMPK β , and serine 182 phosphorylation sites are conserved (Fig. 1 A).

Ampk γ subunit: Among the *C. gigas* EST sequences in GigasDatabase (Fleury et al., 2009), we identified a sequence of 1,185 base pairs corresponding to the complete *C. gigas* AMPK γ mRNA (Sigenae accession number: FU6OSJA01ADEEL). The 1,185 base pair cDNA encoded an entire AMPK γ protein of 394 amino acids with a molecular weight of 44 kDa and showed more than 41 % amino acid sequence conservation with AMPK γ subunits from other species. This sequence has 99 % identity with a *C. gigas* AMPK γ 2 mRNA subunit characterized in the complete genome sequence of *C. gigas* (GenBank accession number: EKC25878;(Zhang et al., 2012)). In other species, the γ isoforms 1, 2 or 3 differ in the length of their N-terminal extensions, which are not predicted to have any domain structure (Adams et al., 2004). The

phylogenetic placement of our sequence in relation to AMPK γ sequences found in other species suggested that *C. gigas* AMPK γ is slightly linked to AMPK γ 2 isoforms (Fig 2 B). The four tandem repeats as cystathionine β -synthase (CBS) motif, termed Bateman domains (Bateman, 1997), are conserved in *C. gigas* (Fig 2 A). *Crassostrea gigas* AMPK γ 2 CBS1, CBS2, CBS3 and CBS4 have amino acid sequence similarity of more than 80 %, 54 %, 65 %, and 52 % with *H. sapiens* AMPK γ 2 CBS (GenBank accession number: NP_057287), respectively.

3.2. Ampk α , β 2 and γ 2 mRNA during gametogenesis

Based on histological examination of the gonad section, we selected 13 sexually undifferentiated oysters (stage 0) and 10 males and 10 females for each stage of gametogenesis (stages 1, 2 and 3). As shown in Figure 3, all three subunits of AMPK were expressed in gonads at all stages of gametogenesis, in sexually undifferentiated oysters as well as in males and females. During the time-course of male gametogenesis, ampk α mRNA levels were significantly higher in stage 0 and stage 1 than in the more advanced reproductive stages; Males at stage 3 had ampk α mRNA levels 50 % lower than males at stage 1 (Fig. 3 A). Male ampk β 2 and ampk γ 2 mRNA levels showed no significant decrease during the time course of gametogenesis (Fig. 3 B and C). In females, all three ampk subunits, ampk α , ampk β 2 and ampk γ 2 showed similar mRNA levels in female at stages 1, 2 and 3 (Fig. 3).

3.3. AMPK α threonine 172 phosphorylation during gametogenesis

The potential for cross-reactivity of the heterologous anti-phospho-threonine 172 AMPK α antibody was verified by Cell Signaling Technology technical services (see Methods). A single band with an apparent molecular weight of 62 kDa was observed by SDS-PAGE using the monoclonal anti-phospho-threonine 172 AMPK α antibody (Fig. 4 A). The band was rapidly detected at a high level with no background, and its molecular weight corresponded to the calculated molecular weight of the *C. gigas* AMPK α (Guévelou et al., submitted). Phosphorylation on threonine 172 AMPK α was detected in gonads of both males and females at all reproductive stages (Fig. 4 A). In males, level of phosphorylation on threonine 172 AMPK α was constant during all stages of gametogenesis. In contrast, the level of phosphorylation on threonine 172 AMPK α in females, appeared constant from stage 0 to stage 2 but was reduced by 88 % from stage 2 to stage 3 (Fig. 4 B). Thus, only one differential amount of phosphorylation was observed between the sexes at stage 3 with a 11.5 fold higher level in male compared with female gonads.

3.4. mRNA targets of AMPK signaling pathway during gametogenesis

3.4.1. mRNAs encoding enzymes of fatty acid metabolism

Using GigasDatabase (Fleury et al., 2009), four mRNAs belonging to fatty acid metabolism were characterized in *C. gigas*. They encoded Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), Nuclear receptor co-activator 4 (NCOA4), Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase type IV (CaMK4) and Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 (SREBP1).

The ACC cDNA sequence (Sigenae accession number HS120730) was identified as a 2,858 base pair sequence including the 3'UTR region (178 base pairs) but missing the 5'UTR and the beginning of the coding region. Blasting on the complete genome sequence of *C. gigas* published very recently (Zhang et al., 2012) revealed the sequence coincides (40 % identity) with the partial *C. gigas* ACC mRNA subunit (GenBank accession number EKC42779). The complete deduced *C. gigas* ACC protein contained 1,513 amino acids. Ncoa4 sequence (GenBank accession number AM855314) was identified as a 3,520 base pair sequence. This complete cDNA sequence has a 5'UTR (266 base pairs) and 3'UTR region (1,460 base pairs) and encodes a complete *C. gigas* NCOA4 protein of 597 amino acids. This sequence is 99 % similar with the *C. gigas* ncoa4 mRNA subunit obtained in the complete oyster genome sequence (GenBank accession number: EKC34356) and shows a conservation of N-terminal androgen receptor (AR)-associated coregulator 70. The Camk4 sequence (Sigenae accession number AM856845) was identified as a 750 base pair sequence. From blast and alignment, this cDNA sequence appears partial and is missing both 5'UTR and 3'UTR as well as start-end parts of the coding region. The partial *C. gigas* CaMK4 protein is 250 amino acids long and shows more than 59 % identity with *C. gigas* CaMK4 mRNA complete genome sequence (GenBank accession number: EKC30614) (Zhang et al., 2012). The complete deduced *C. gigas* CaMK4 protein is 287 amino acids long. The Srebp1 sequence (Sigenae accession number BQ426935) was identified as a 2,485 base pair sequence. The 5'UTR and the beginning of the coding region are not characterized. The 3'UTR region is 168 base pairs long. The partial *C. gigas* SREBP1 protein is 771 amino acids long and corresponds to GenBank accession number: EKC21309 in the complete genome sequence (76 % identity). The complete deduced *C. gigas* Srebp1 protein is 997 amino acids long.

Acc mRNA relative levels were stable during gametogenesis in the two sexes (Fig. 5 A). Ncoa4 mRNA remained constant in males over the course of gametogenesis and was significantly lower than level at stage 0 (Fig. 5 B). Ncoa4 mRNA levels show a sex-specific expression, indeed, ncoa4 was significantly over-expressed in male gonad compared to female

gonad in stages 1, 2 and 3. Ncoa4 mRNA (Fig.5 B) displayed a gene expression pattern similar than that of *ampk β 2* and *ampk γ 2* (Fig. 3 B and C). Sex-specific expression was also found for *camk4* and *srebp1* mRNAs indeed from male stage 1 to male stage 3, 55 % significant decrease was observed for *camk4* mRNA level whereas no variation was observed between the female stages. For *srebp1* mRNA level, an increase of 35 % was quantified from stage 1 to stage 3 (Fig. 5 C and D).

3.4.2. mRNAs encoding enzymes of glucose metabolism

The mRNA levels of three genes of glucose metabolism that, according to the literature, could be putative downstream targets of AMPK signaling pathway were measured. By querying the GigasDatabase, we found three ESTs that fell into this selection. These ESTs encoded the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit (PI3K), protein kinase AKT (AKT) and the cAMP Responsive Element Binding protein (CREB).

The PI3K sequence (Sigenae accession number HS190998) was identified as a 693 base pair sequence. Based on blast and alignment work with characterized vertebrate pi3k sequences, this *C. gigas* cDNA sequence appeared partial, as the 5'UTR and the beginning of the coding region are missing. The stop codon was characterized and 3'UTR region is 153 base pairs long. Partial *C. gigas* PI3K deduced protein is 179 amino acids long and corresponds to the 922 amino acids long PI3K *C. gigas* sequence found in in the complete genome sequence (GenBank accession number EKC40180) (Zhang et al., 2012). The akt sequence (Sigenae accession number FP002673) has been identified as a 794 base pair sequence in which the 3'UTR and the end of the coding region have not been characterized yet and the 5'UTR is 145 base pairs long. By blast on the oyster genome sequence, no significant result matched with our *C. gigas* AKT mRNA. The partial *C. gigas* AKT deduced protein is 216 amino acids long with more than 54 % similarity with the same region of *Haemaphysalis longicornis* AKT (GenBank accession number BAK26531). Lastly, the creb sequence (Sigenae accession number AM859217) was identified. This complete cDNA sequence of 2,178 base pairs has a 5'UTR of 165 base pairs and a 3'UTR of 1,155 base pairs long. The partial *C. gigas* CREB deduced protein is 285 amino acids long corresponds to the *C. gigas* CREB mRNA (100 % similarity) characterized recently in the complete genome sequence of *C. gigas* (GenBank accession number: EKC32156).

Gene expression of these mRNAs belonging to glucose metabolism was assayed by real-time PCR. Between stage 0 and later stages of gametogenesis, the level of PI3K mRNA decreased in males, while an increase was observed in females (Fig. 6 A). Akt mRNA level showed a significant decrease of 56 % between stages 0 and 3 in males over the course of gametogenesis, while female samples showed mRNA levels significantly lower in stages 1 and 2 than in stages 0 and 3 (Fig. 6 B).

Creb mRNA levels showed no significant difference during the gametogenesis in females, those in males creb were 4.62 greater in stage 3 compared to the other stages. Finally, differences between male and female mRNA relative levels were observed for pi3k, akt and creb. For pi3k mRNA relative level, males expressed more (average mean 100 %) compared to females, regardless of the stage. For creb, mRNA levels were significantly higher in males than in females at stages 2 and 3. For Akt, significant differences were observed between sexes at stages 1 and 3, in the opposite direction: a higher value in males at stage 1 and a lower one at stage 3.

3.5. Multi-variable correlations between AMPK α threonine 172 phosphorylation level and AMPK target mRNA relative levels

A Spearman correlation coefficient matrix was calculated to ascertain the relationship among all the variables including AMPK α threonine 172 phosphorylation level and relative mRNA levels, using the adjusted Holm-Bonferonni correction p-value (Table 2). No significant correlations between AMPK α threonine 172 phosphorylation level and other mRNA levels were found. Looking at the relationships between mRNA relative levels only, mRNA levels of ampk α appeared positively correlated with ampk β and ampk γ (Table 2). All ampk subunits showed significant correlations with glucose metabolism-related pi3k mRNA levels. For fatty acid metabolism, ampk α and ampk β mRNA levels showed a correlation with camk4 mRNA levels and ncoa4 (this latter only with ampk α mRNA level). No significant correlation between targets of lipid and glucose metabolisms was found. While looking at correlations between these two metabolisms, positive correlations were revealed between pi3k mRNA levels and ncoa4-camk4 mRNA levels (Table 2).

4. DISCUSSION

4.1. AMPK β and AMPK γ mRNAs in *Crassostrea gigas*

In the Pacific oyster, we characterized the two non-catalytic subunits of the AMPK heterotrimer, AMPK β 2 and AMPK γ 2, to make a complete characterization of the AMPK system with the three subunits, including the AMPK α previously characterized (Guévelou et al., submitted). In examining the phylogenetic tree generated, the *C. gigas* AMPK β subunit seems to be slightly closer to the AMPK β 1 group sequence. Nevertheless, in *C. gigas* AMPK β , the serine 24/25 phosphorylation site is absent, suggesting that *C. gigas* AMPK β is related to an AMPK β 2 subunit. Indeed, the serine 24/25 phosphorylation site is characteristic of the AMPK β 1 isoform, which is responsible for its nuclear localization (Warden et al., 2001), and this specificity is lost in the AMPK β 2 isoform (Mitchelhill et al., 1997, Chen et al., 1999). Several other specific phosphorylation sites (Mitchelhill et al., 1997, Warden et al., 2001, Woods et al., 2003a) have been characterized in *C. gigas* AMPK β 2. The determinant serine 108 phosphorylation site, required for the activation of AMPK enzyme (Warden et al., 2001) appeared conserved and positioned at serine 102 in *C. gigas*. The serine 182 phosphorylation site is also conserved. Serine 182 probably regulates the localization of the subunit but has no effect on AMPK kinase activity (Warden et al., 2001). Both serine 96 and serine 101 are not conserved in the *C. gigas* AMPK β 2 subunit.

Examining the phylogenetic tree generated, the *C. gigas* AMPK γ subunit seems to be slightly closer to the AMPK γ 2 group sequence. In *C. gigas*, AMPK γ 2 contained the 4-tandem-repeat cystathionine β -synthase (CBS) motif termed Bateman (Bateman, 1997). CBS domains are known to regulate the activity of AMPK in response to binding molecules with adenosyl groups such as AMP or ATP (Kemp, 2004), and therefore constitute important domains for the functionality of the AMPK system.

4.2. AMPK functioning in the gonad during gametogenesis

For AMPK α , which is already characterized in *C. gigas* for mRNA the deduced amino-acid sequence surrounding threonine 172 was characterized (Guévelou et al., submitted). This amino-acid sequence is highly conserved in all AMPK α homologues and is important for activation (Stapleton et al., 1996, Carling et al., 2011). We assayed the phosphorylation on AMPK α threonine 172 using Western blot, as has been done in many other species (Lim et al., 2012, Sanders et al., 2007, Tosca et al., 2005). AMPK kinase activation through phosphorylation at threonine 172 has been already described in the gonad in vertebrates but its role remains unclear (Tosca et al., 2008). The master regulator AMPK might thus be necessary in oyster in order to maintain the energy available in the gonad through gametogenesis. We clearly showed a

sex-specific amount of AMPK α threonine 172 phosphorylation that has not previously been reported *in vivo* in other species. At the mature stage (stage 3), the threonine 172 phosphorylation of AMPK α was almost completely inhibited in late vitellogenic oocytes. Only one study has previously reported a sexual dimorphism of AMPK activation, which was reported in human muscle and suggested to be due to the sex-specific muscle morphology reported in women: a higher proportion of type I muscle fibers exist in women compared with men (Roepstorff et al., 2006). In oysters, AMPK probably does not play a role in cytoplasmic maturation of oocytes, whereas in vertebrate models, many studies report the involvement of protein AMPK activation in oocyte maturation. For example, using immunohistochemistry, AMPK α 1 was localized in rat granulosa cells, corpus luteum, oocytes and, less abundantly, in theca cells (Tosca et al., 2005). In cell culture, AMPK activation through pharmacological compounds 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (AICAR) stimulates and accelerates the germinal vesicle breakdown (GVBD) of the mouse oocyte (Downs et al., 2002, Chen et al., 2006, LaRosa and Downs, 2006). Vitellogenesis requires full synthesis of glucose and fatty acid reserves into oocytes (Bhatnagar and Bansal, 2011), and might be incompatible with an active AMPK signaling pathway that switches off ATP-consuming anabolic pathways (Hardie, 2003). Conversely, pharmacological stimulated AMPK reduces the steroid hormone progesterone secretion in rat granulosa cells (Tosca et al., 2005) and in a marine worm, AMPK agonist blocked sea-water induced GVBD (Stricker, 2012). In these models, since no data could be obtained in the *in vivo* activation of AMPK during oogenesis, the question was not resolved of whether AMPK played a role during cytoplasmic maturation of oocytes or only in germinal vesicle breakdown (GVBD) (Tosca et al., 2008). Pacific oysters have external fertilization and release their gametes into seawater where prophase-arrested oocytes reinitiate meiosis, undergo GVBD, and proceed to metaphase I where they are arrested again until fertilization (Kyoizuka et al., 1997). Taken together, our results show that AMPK activation might not be necessary for late vitellogenesis in oyster but rather for GVBD, which was not assayed here. Further analysis will be necessary to determine whether AMPK is activated or not and, therefore, whether it is important for GVBD in mature oocytes.

In male gonads, phosphorylation on AMPK α threonine 172 was observed at a constant level from stage 1 to stage 3, suggesting that it is important in the production, differentiation and maturation processes of spermatozooids. Major defects in male fertility were observed in transgenic male mice lacking *ampk α* (Tartarin et al., 2012). Spermatozoa had structural abnormalities and were less motile than in control mice, associated with a 50 % decrease in mitochondrial activity and a 60 % decrease in basal oxygen consumption (Tartarin et al., 2012). In oyster, the origin of the constant threonine 172 phosphorylation levels in males could be

linked with a specific expression of liver kinase B1 (LKB1), the master upstream kinase for AMPK threonine 172 phosphorylation site (Hawley et al., 2003, Woods et al., 2003a). Indeed, a short isoform of LKB1 specifically expressed in the testis was reported to play a major role for sperm maturation in mice (Shaw, 2008). Mice lacking LKB1 revealed a near complete absence of mature spermatozoa, and spermatids were completely non-motile and displayed abnormal acrosome morphology (Shaw, 2008). In male oysters, the long-term phosphorylation observed on threonine 172 during gametogenesis could induce mitochondrial biogenesis and up-regulation of mitochondrial enzyme content, as was already reported after long-term activation of AMPK in skeletal muscles of mouse (Zong et al., 2002). In vertebrates, chronic activation of AMPK promotes mitochondrial biogenesis and expression of nuclear-encoded mitochondrial genes by up-regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) (Hardie, 2011). Further studies are thus needed to analyze PGC-1 α expression in male oysters.

In this study, we demonstrated sex-specific variation of ampk subunit mRNA expression although AMPK α threonine 172 phosphorylation was activated during gametogenesis in both sexes. Ampk α was over-expressed in males during the first stages of gametogenesis, when mitotic activity and differentiation of germinal cells occurred and mRNA of all subunits, Ampk α , β and γ , were up-regulated in males at all stages of gametogenesis compared with females. These sex-dependent mRNA levels could be due to different balances between the processes of translation and mRNA degradation between males and females. Indeed, the regulation of mRNA degradation has a central role in the control of gene expression (Elkon et al., 2010, Grigull et al., 2004, Wilusz and Wilusz, 2004) and degradation of mRNA has been shown to be linked with processing bodies (P-bodies) and related granules (Olszewska et al., 2012). P-bodies and related granules, called “male germ granules” and “maternal mRNA storage granules”, have been observed in different organisms such as mammals and yeasts (Olszewska et al., 2012). P-bodies and granules both accumulate a fraction of translationally silent mRNAs and thus could be defined as sites of mRNA storage, reversible mRNA repression and mRNA degradation (Olszewska et al., 2012, Seydoux and Braun, 2006).

4.3. Regulation of the AMPK system during gametogenesis

AMPK effects are known to be mediated both by short-term phosphorylation of downstream regulatory proteins and by long-term effects of AMPK activation on gene expression (Viollet et al., 2009). AMPK regulates its targets by phosphorylation with the goal of acutely stimulating catabolic processes while inhibiting anabolic processes to restore cellular energy homeostasis. It has been also proved that the AMPK system can chronically modify gene transcription (Ramamurthy and Ronnett, 2012, Hardie, 2011). In oysters, we tried to link the

AMPK α threonine 172 phosphorylation levels, a key determinant of AMPK activity (Hawley et al., 1996, Stein et al., 2000), to mRNA relative levels of different targets belonging to the AMPK pathway during gametogenesis. The partial or complete mRNA sequences of these seven AMPK-related targets (ACC, CREB, Akt, PI3K, SREBP1, CamK4, Ncoa4) were obtained by bioinformatic data mining in available *C. gigas* genomic databases (especially Sigenae.org) and were confirmed or completed, when partial, using the complete genome sequence that was very recently published (Zhang et al., 2012). Unfortunately, using the strict Holm-Bonferonni correction, no significant correlation was found between AMPK α threonine 172 phosphorylation and the targets we selected. We can conclude, based on our assay of threonine 172 phosphorylation, that these mRNA targets are not directly regulated by AMPK activation. We also demonstrated that the mRNA levels of *ampk* α , β and γ show positive correlation with mRNA levels of three main targets: two belonging to fatty acid oxidation (*camk4* and *ncoa4*), and one belonging to glucose metabolism (*pi3k*). This could indicate a common regulation of mRNA expression of all these genes, *ampk* subunits, *camk4* and *ncoa4*, during gametogenesis in oyster, and therefore a common master regulator that remains to be discovered. In *C. gigas*, *camk4* mRNA levels are up-regulated during early stages of gametogenesis, such as early mitosis. The calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CAMK4) is a kinase that has a limited tissue distribution (lymphocytes, neurons and male germ cells). The activating factors of CAMK4 are not yet clear, however, a lack of CAMK4 protein expression is responsible for infertility in males of various species. In mouse, CAMK4 is expressed in male germ cells and spermatids and has been implicated in controlling the differentiation of germ cells into mature spermatozoa (Blaeser et al., 2001). In *C. gigas*, comparing sex-specific mRNA levels, *ncoa4* seems to be more expressed in male development and mainly during maturation stages. *Ncoa4* encodes an androgen receptor coactivator and may interact with androgen receptor-like in a ligand-dependent manner. In mouse, *Ncoa4* protein has been detected in male and female reproductive tissues and also in oocytes (Kollara and Brown, 2010, Stanton and Green, 2001). *Ncoa4* has been characterized to interact and enhances the transcriptional activity of multiple ligand-activated nuclear receptors, like the androgen receptor (AR), estrogen and progesterone (Kollara and Brown, 2010, Yeh and Chang, 1996, Evangelou et al., 2000). A Spearman correlation coefficient matrix also showed a statistical association between *pi3k* and *ampk* mRNA levels and between *ncoa4* and *camk4* mRNA relative levels. These correlations and the temporal expression of these two targets suggest that the expression of these genes are strongly involved during the early stage of reproduction, especially in females compared to males. Fatty acid metabolism reflected by *ncoa4* and *camk4* and glucose metabolism through master kinase *pi3k* could represent the energy network that supports gametogenesis in oyster, as already

suggested by several studies in which different key target of insulin pathway were characterized (Hamano et al., 2005, Gricourt et al., 2003, Jouaux et al., 2011).

4.4. Suggested roles of AKT, PI3K and CREB in oyster reproduction management

Some targets that we selected as linked with AMPK pathway did not show any correlation with AMPK activation, but showed stage and/or sex-specific mRNA levels during gametogenesis in oyster. In *C. gigas*, creb mRNA levels showed a significant increased expression in males during the late stage of gametogenesis. The glucose metabolism-related transcription factor CREB has been described to be involved in gluconeogenesis, and regulates the growth of oocytes and sperm (Kwok et al., 2006, Waeber et al., 1991). Activated CREB has been shown to be essential for maintaining spermatogenesis in Sertoli cells (Walker, 2010) and CREB positively auto-regulates its own expression by binding to a CRE-like element in its promoter (Don and Stelzer, 2002). In the freshwater hydrozoan hydra, CREB has been shown to play a role in promeiotic or meiotic stages (Chera et al., 2007), but no involvement during maturation stage has been clearly identified.

The protein kinase AKT, the major downstream target of PI3K, was characterized in oocytes and sperm of several species (Andersen et al., 1998, Lee et al., 2007, Hixon and Boekelheide, 2003). In *C. gigas* females at stage 3, compared with males and other stages, a significant increase of akt mRNA levels was demonstrated. Akt mRNA levels might be more important during the resting stage, when early mitosis can occur, and for males at stage 1. (Lee et al., 2007) showed that the PI3K-Akt pathway plays a central role in the self-renewal of spermatogonial stem cells and also plays important roles in differentiating spermatogonia. In *C. gigas*, we can hypothesize that AKT helps the early mitotic proliferation that occurs at the end of sexual resting stage.

4.5. Conclusion

The Bateman principle shows that, in many species, eggs are much larger than sperm and thus sperm are often considered energetically cheaper to produce than eggs (Bateman, 1948, Huber et al., 2011, Parker, 1982). However, this principle does not seem to be true for species that reproduce by spawning, where the investment made by each investment can be considered approximately equal (Don, 1998). During gametogenesis, oysters produce a greater number of gametes per male than per female. This difference of quantity occurs during mitosis when germ cells divide massively to start gamete production. The stage 1 differences seen between male and female mRNA levels of pi3k, akt and ncoa4, suggest that targets are necessary to support the massive germ cell division observed during mitosis.

AMPK signaling was sex-specifically regulated depending on gender in the gonad of *C. gigas*. AMPK activation was constant for male gametogenesis and was disrupted during late vitellogenesis in females. Recent advances in gamete signaling pathways revealed that AMPK is involved in gamete quality of *Sus scrofa* (de Llera et al., 2012). A high individual variability of gamete quality was reported in *C. gigas* (Corporeau et al., 2012, Boudry et al., 2002) and it would be interesting to test whether AMPK signaling could play a role in gamete quality in our model. Looking more deeply on the energy network described by the Spearman correlation coefficient matrix, we can say that network organization with gene clusters can be drawn for managing the energy during the energy spending period of *C. gigas* gametogenesis. The importance of AMPK and different mRNA targets that have been characterized as being potentially involved in *C. gigas* reproduction could be assessed by developing functional *in vivo* studies in order to disrupt or enhance the metabolic pathways by using pharmacological stimulation with AMPK inhibitor AICAR (Corton et al., 1995) or RNA interference disruption technology recently developed in oyster (Fabioux et al., 2009, Huvet et al., 2012).

5. TABLES

Table 1: Nucleotide sequences of *Crassostrea gigas* primers used for real-time PCR amplification.

Targets		Nucleotide sequence	Signae accession number	GenBank accession number	PCR efficiency (%)	Reference
AMPK α	sens	5'- TCCTTCTAGACAGCAGCCTCA -3'		JX104214	102	Guévelou et al., 2012
	anti-sens	5'- TTGGTGAACCCAGCTGGTA -3'				
AMPK β	sens	5'- ACTGGCACTCGACAGCTTG -3'	CU991642, FU60SJA01AUVKV, FU60SJA01BDGCM		99	This study
	anti-sens	5'- CTTCTCTCCCGTTTCCTG -3'				
AMPK γ	sens	5'- GGAGCTGAAGGACAAACAGC -3'	FU60SJA01ADEEL		100	This study
	anti-sens	5'- GGAGGTGATGAGGTCTTGA -3'				
ACC	sens	5'- ATGGTAGCCTGGCAGATGAC -3'	HS120730		100	This study
	anti-sens	5'- GCTGGTCTGAATGACCCAAT -3'				
NCOA4	sens	5'- TGAGAGCATCAACAGCTTCG -3'	AM855314		99	This study
	anti-sens	5'- CATCTTGTTCAGCGTCTCA -3'				
CAMK4	sens	5'- ATGTTGGTGGCAGTGAC -3'	AM856845		99	This study
	anti-sens	5'- TGGAGAGACCGAAGTCAGC -3'				
SREBP1	sens	5'- ACAGTGCCACATCCACCAC -3'	BQ426935		100	This study
	anti-sens	5'- TGACCACCATTGTCCCAAC -3'				
PI3K	sens	5'- GACACACTGCCCTTGACCT -3'	HS190998		100	This study
	anti-sens	5'- GGTGGACCAGCTCTTGTCT -3'				
AKT	sens	5'- AGAAGCCCAAGCCAAACAC -3'	FP002673		99	This study
	anti-sens	5'- ATGGCAGCAATCCAGTCTC -3'				
CREB	sens	5'- CTCGCTCAGTCAGCCATAC -3'	AM859217		100	This study
	anti-sens	5'- ACTGGTGCTACCCTGACCAC -3'				

Nucleotide code: G, guanine; C, cytosine; A, adenine; T, thymine
Degenerate code: K=G or T; M=A or C; R=A or G; S=G or C; Y=C or T; B=C, G or T; D=A, G or T; H=A, C or T; V=A, C or G; N=A, G, C or T.

Table 2: Matrix of Spearman correlation coefficients among AMPK α threonine 172 phosphorylation level and mRNA relative levels of the 10 targeted genes (ampk α , ampk β , ampk γ , acc, ncoa4, camk4, sreb1 pi3k, akt, and creb.) The p value is given and a + sign indicates a significant positive correlation with adjusted Holm-Bonferonni correction p-value.

	AMPK α -T172	ampk α	ampk β	ampk γ	acc	ncoa4	camk4	sreb1	pi3k	akt	creb
AMPK α -T172		0,019	0,005	0,020	0,692	0,446	0,022	0,041	0,010	0,090	0,238
ampk α			0,000	0,000	0,012	0,001	0,001	0,605	0,000	0,204	0,004
ampk β		+		0,003	0,466	0,022	0,001	0,236	0,000	0,876	0,070
ampk γ		+			0,005	0,012	0,079	0,812	0,001	0,277	0,004
acc						0,651	0,567	0,029	0,295	0,002	0,049
ncoa4		+					0,587	0,064	0,000	0,328	0,003
camk4		+	+					0,326	0,000	0,597	0,212
sreb1									0,966	0,014	0,608
pi3k		+	+	+		+	+			0,243	0,043
akt											0,179
creb											

6. FIGURES

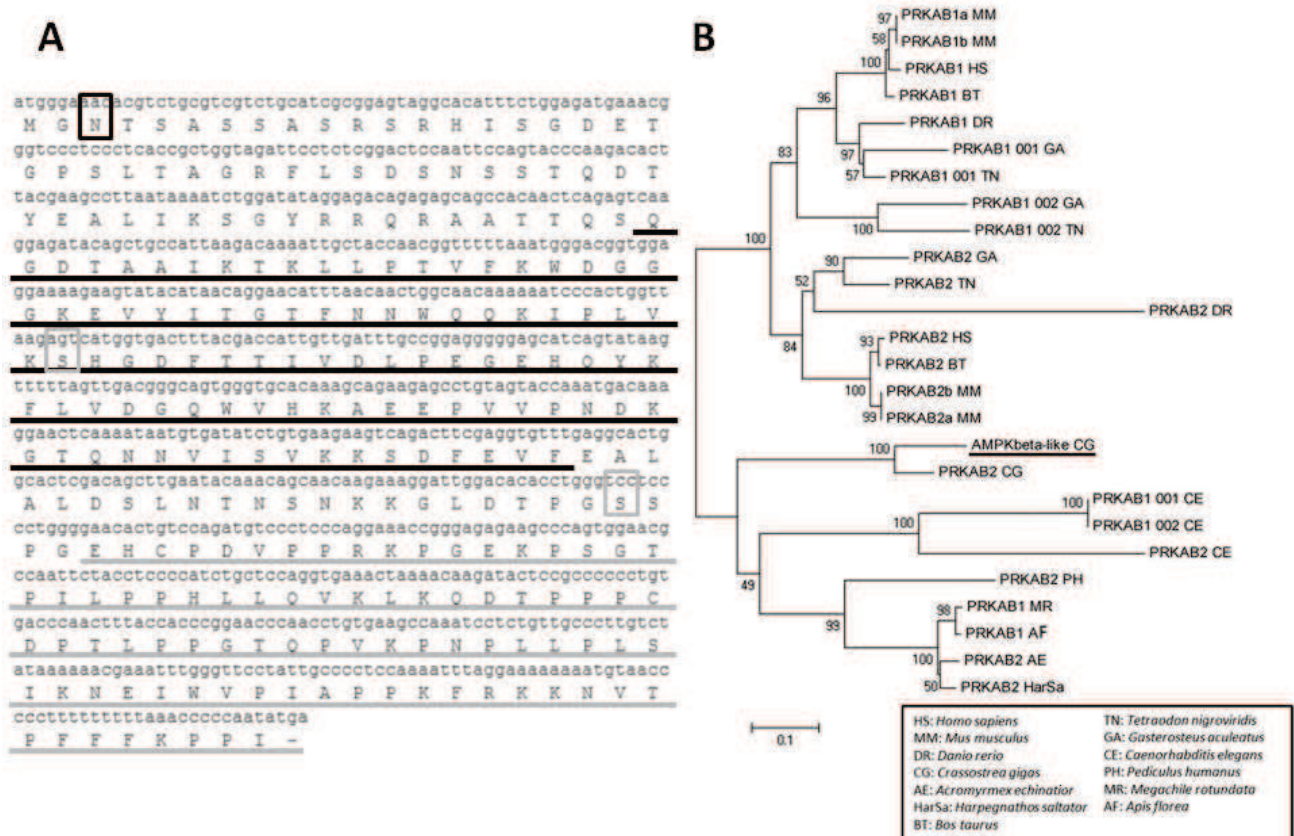


Figure 1: (A) Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Crassostrea gigas* AMPK β -like (*C.gigas*_AMPK beta-like), obtained by merging 3 contigs matching AMPK β 2 (Sigenae accession number: CU991642, FU6OSJA01AUVKV and FU6OSJA01BDGCM). Black square: myristoylation site. Grey squares: serine 108 and serine 182 phosphorylation sites. Black underscore: glycogen binding domain. grey underscore: $\alpha\gamma$ -subunit binding sequence. (B) Phylogenetic tree of AMPK β -like comparing to other AMPK β subunits found in other species.

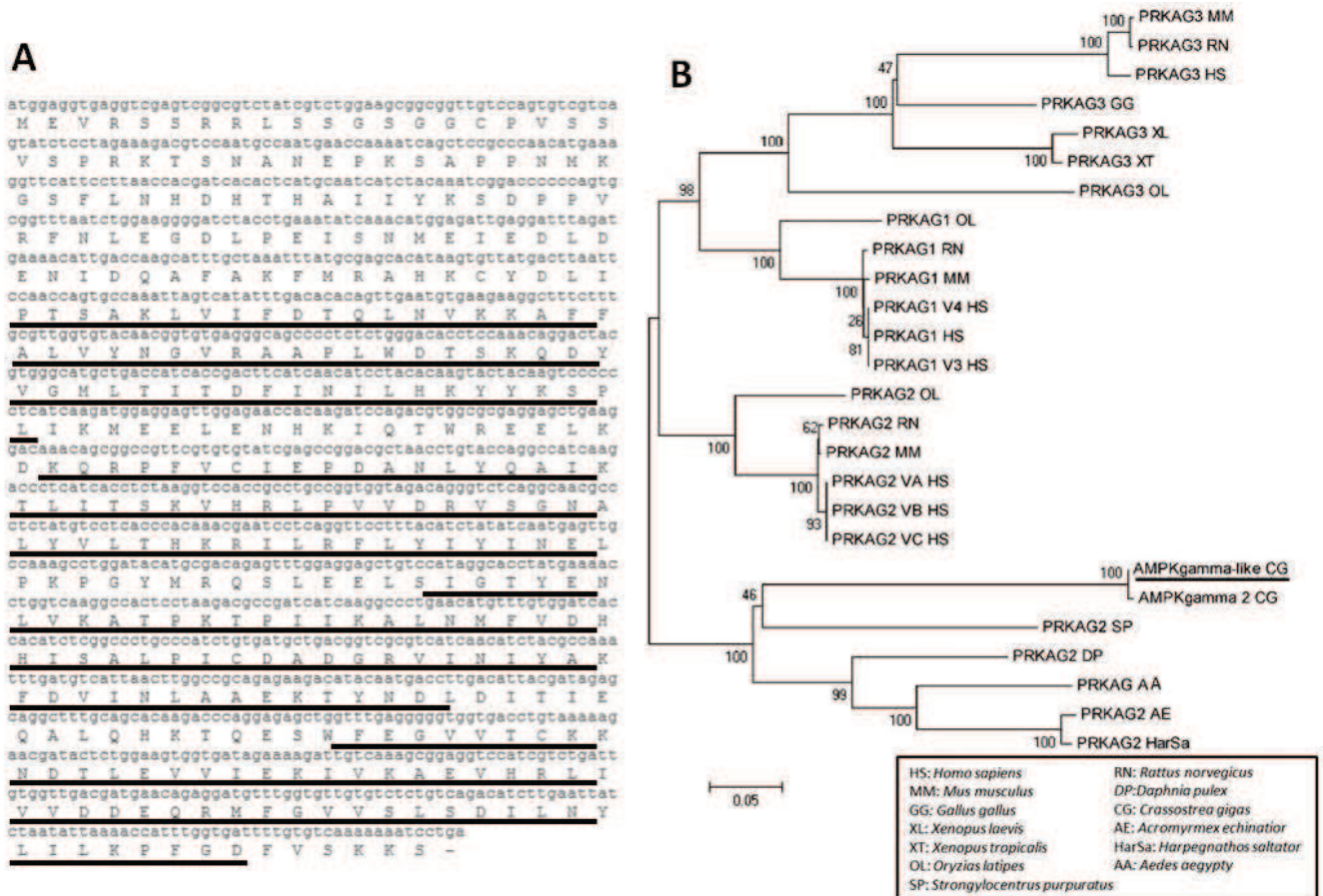


Figure 2: (A) Nucleotide and deduced amino acid alignment of *Crassostrea gigas* AMPK γ 2 (C.gigas_AMPK gamma-like; Sigenae accession number: FU6OSJA01ADEEL). Black underscores: cystathionine β -synthase motifs. (B) Phylogenetic tree of AMPK γ -like compared to other AMPK γ subunits found in other species.

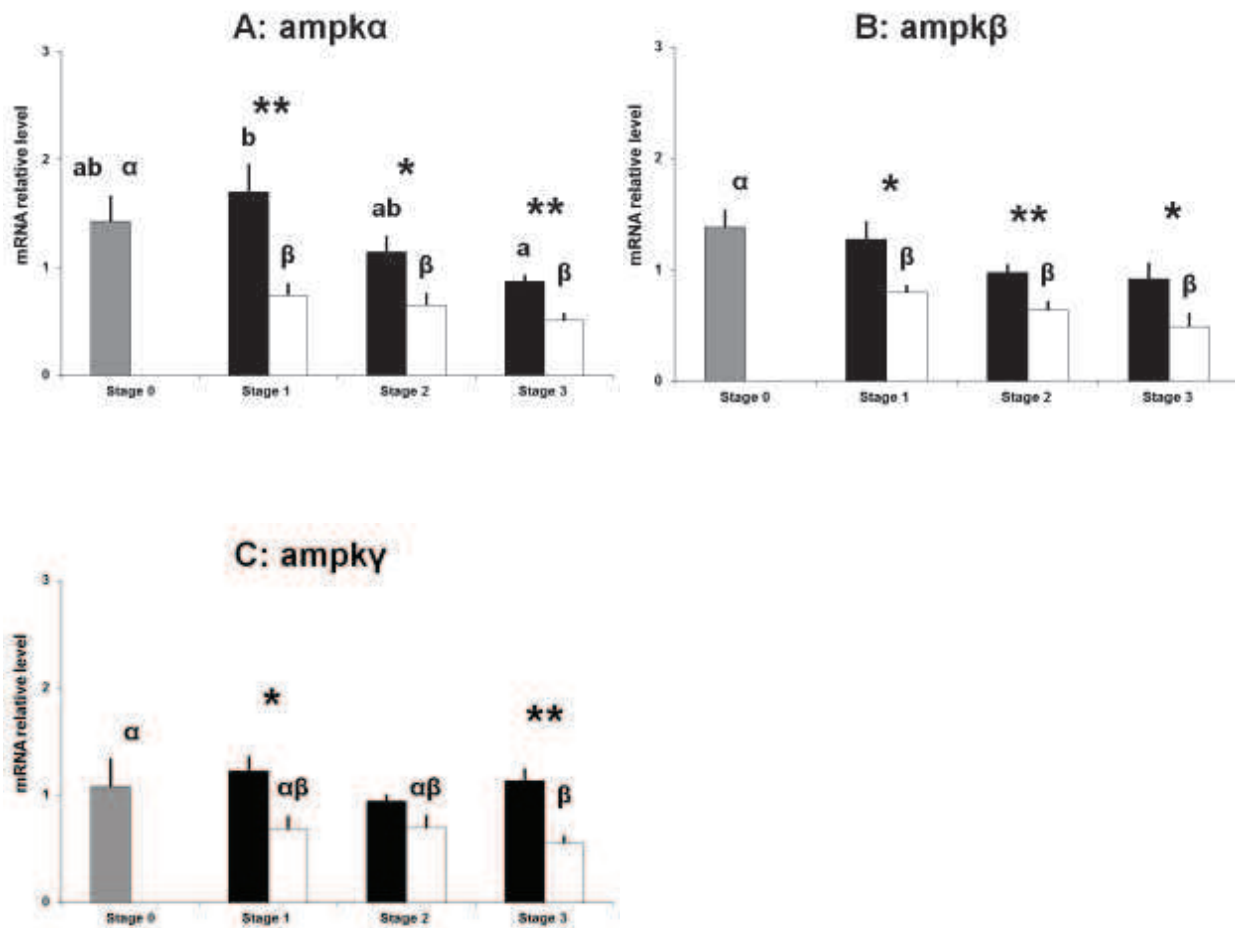


Figure 3: Relative levels of ampk α (A), ampk β (B), and ampk γ (C) transcripts in the gonad during different reproductive stages. Results are expressed as number of copies per copy of efl. Gray bar: sexually undifferentiated oysters (n = 13). Black bars: males (n = 10). White bars: females (n = 10). Columns and bars show mean \pm SE. Different letters indicate a significant difference between stages. Asterisks indicate a significant difference between male and female with $p < 0.05$ (*) or $p < 0.01$ (**).

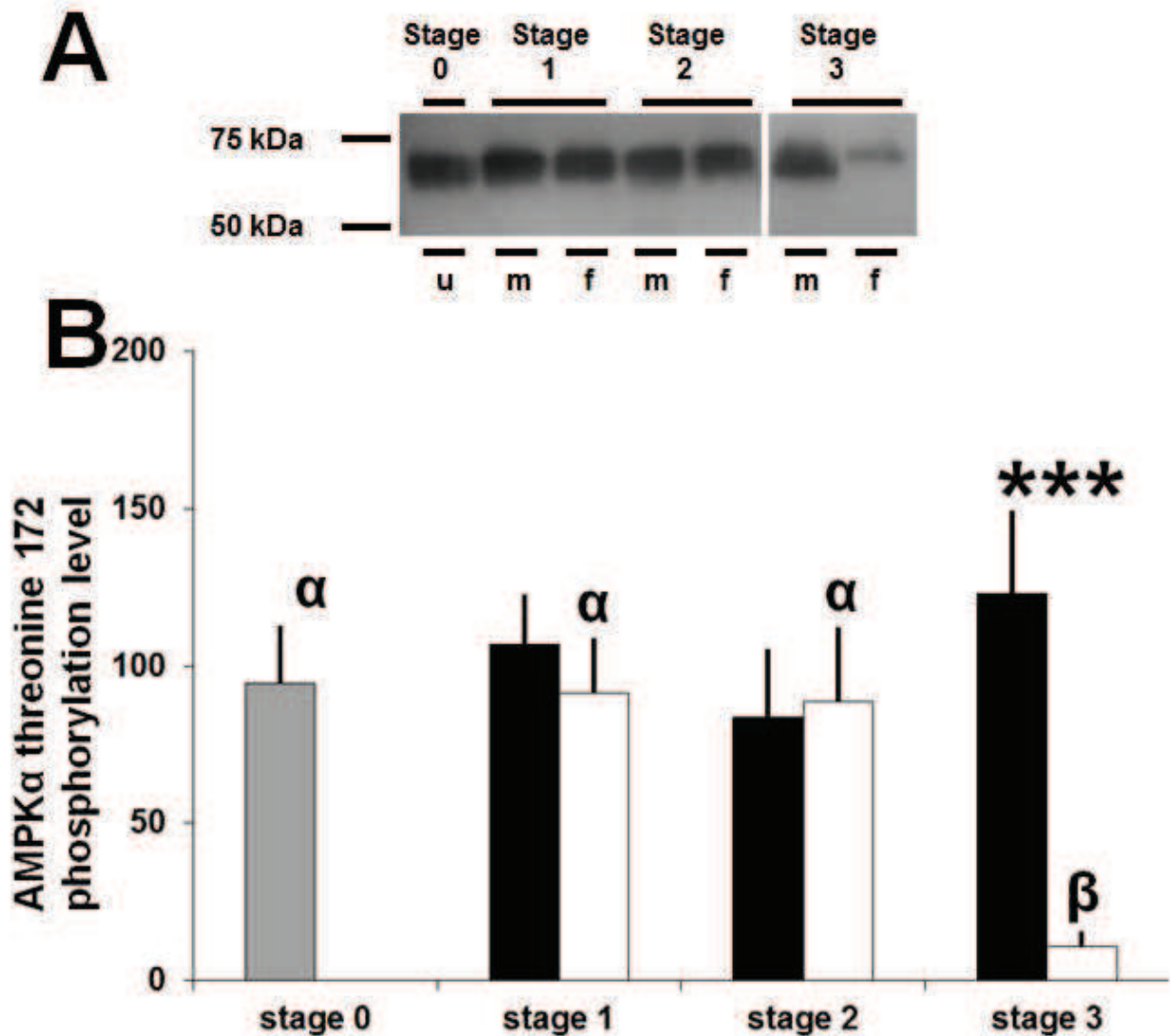


Figure 4: Western blot of AMPK α threonine 172 phosphorylation in the gonad of oysters according to sex and four different reproductive stages. (A) Representative images of AMPK α threonine 172 phosphorylation detection at 62 kDa. u: sexually undifferentiated; m: male; f: female. (B) Quantification of AMPK α threonine 172 phosphorylation protein. The protein values presented on the graph were quantified on 4 western blots and expressed in relative level of OD/mm². Gray bar: sexually undifferentiated oysters (n = 13). Black bars: males (n = 10). White bars: females (n = 10). Columns and bars show mean \pm SE. Different letters indicate a significant difference between stages. Asterisks indicate a significant difference between male and female with $p < 0.001$ (***)

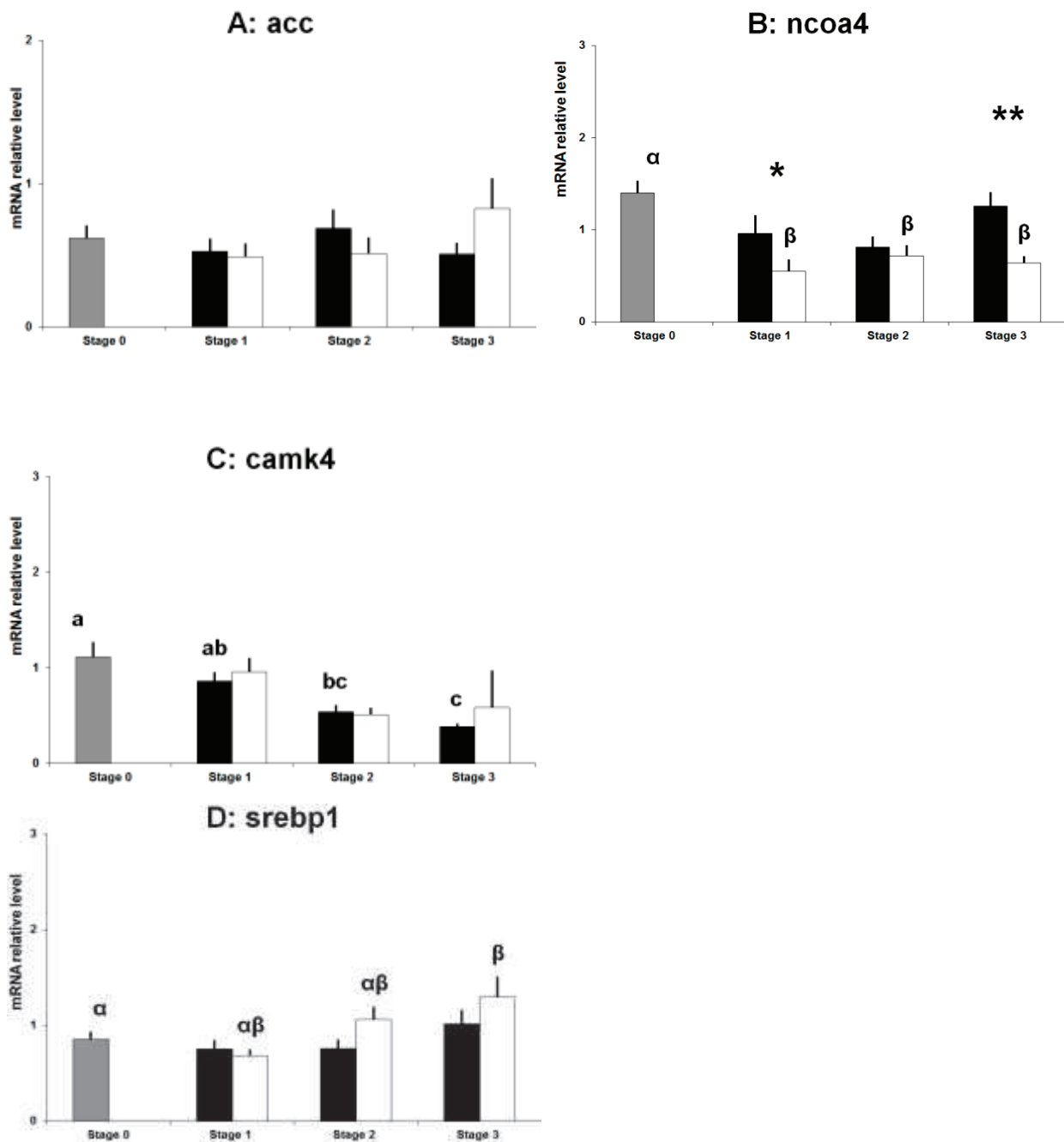


Figure 5: Relative levels of *acc* (A), *ncoa4* (B), *camk4* (C) and *srebp1* (D) transcripts in the gonad according to four different reproductive stages and sexes. Results are expressed as number of copies per copy of *ef1*. Gray bar: sexually undifferentiated oysters (n = 13). Black bars: males (n = 10). White bars: females (n = 10). Columns and bars show mean \pm S.E. Different letters indicate a significant difference between stages. Asterisks indicate a significant difference between males and females with $p < 0.05$ (*) or $p < 0.01$ (**).

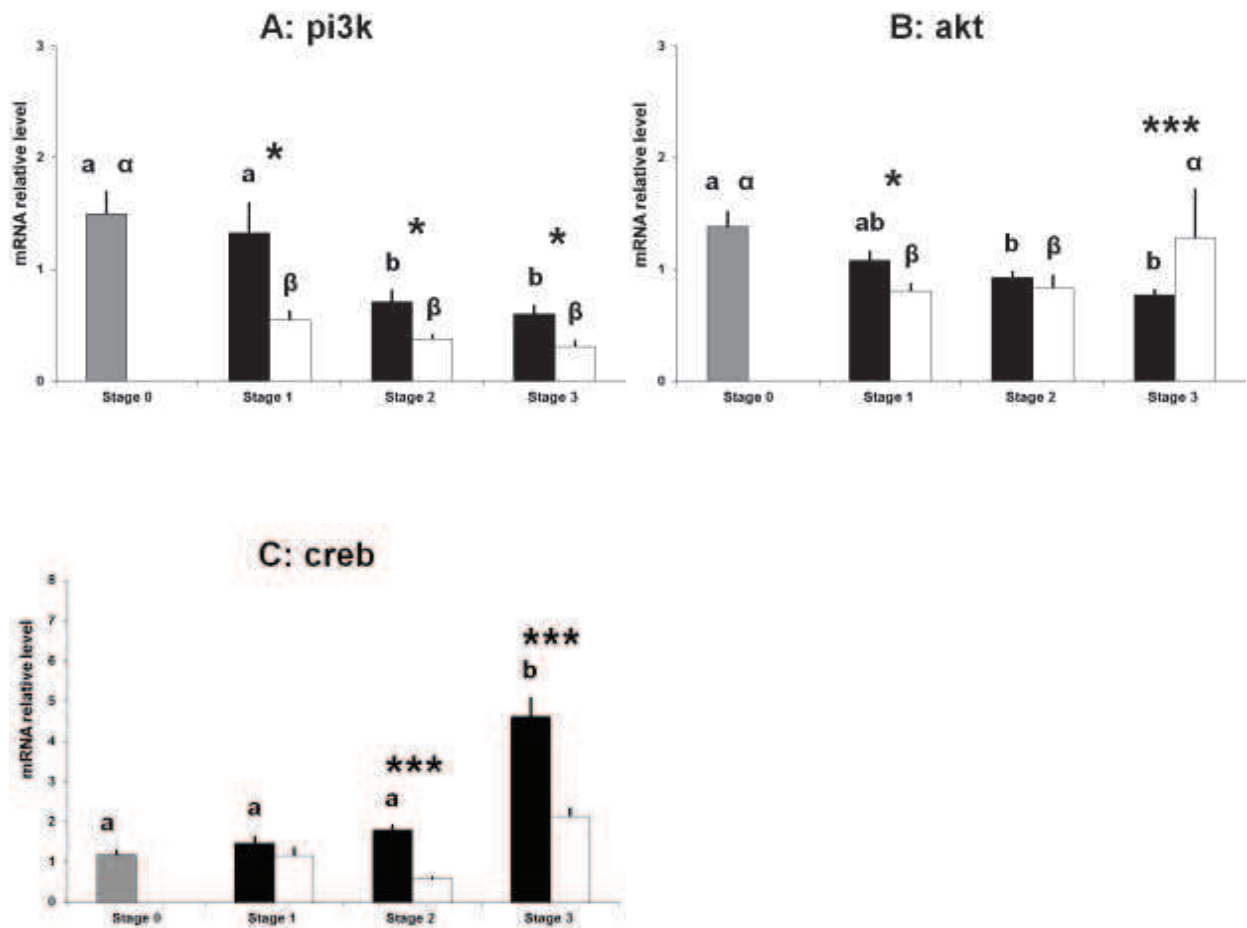


Figure 6: Relative levels of pi3k (A), akt (B), and creb (C) transcripts in the gonad according to sex and four different reproductive stages. Results are expressed as number of copies per copy of efl. Gray bar: sexually undifferentiated oysters (n = 13). Black bars: males (n = 10). White bars: females (n = 10). Columns and bars show mean \pm SE. Different letters indicate a significant difference between stages. Asterisks indicate a significant difference between males and females with $p < 0.05$ (*) or $p < 0.001$ (**).

7. ACKNOWLEDGEMENTS

The present research project was supported by the “GIS Europole Mer” (www.europolemer.eu) project “OxyGenes” and by the ANR project “Gametogenes” (ANR-08-GENM-041). Eric Guévelou was funded by Ifremer and a Région Bretagne doctoral grant. We thank Helen McCombie and Jérôme La Peyre for their help with editing the English. We greatly thank the staff of Ifremer at the La Tremblade experimental hatchery and Bouin nursery for providing the oysters, and those at La Trinité station for the use of their in situ rearing facilities.

8. CONFLICTS OF INTEREST

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

9. REFERENCES

- Adams, J., Chen, Z. P., Van Denderen, B. J., Morton, C. J., Parker, M. W., Witters, L. A., Stapleton, D. & Kemp, B. E. 2004. Intrasteric control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein science*, 13, 155-165.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25, 3389-3402.
- Amemiya, I. 1929. On the sex-change of the Japanese common oyster, *Ostrea gigas* Thunberg. *Proceedings of the Imperial Academy (of Japan)*, 5, 284-286.
- Andersen, C. B., Roth, R. A. & Conti, M. 1998. Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *The Journal of biological chemistry*, 273, 18705-18708.
- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A. & Moal, J. 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and molecular biology*, 140, 635-646.
- Bateman, A. 1997. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends in Biochemical Sciences*, 22, 12-13.
- Bateman, A. J. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2, 349-368.
- Berthelin, C. H., Kellner, K. & Mathieu, M. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and molecular biology*, 125, 359-369.
- Berthelin, C. H., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M. & Kellner, K. 2001. Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Invertebrate Reproduction & Development*, 40, 79-86.
- Bhatnagar, M. C. & Bansal, G. 2011. *Developmental Biology*.
- Blaeser, F., Toppari, J., Heikinheimo, M., Yan, W., Wallace, M., Ho, N. & Chatila, T. A. 2001. CaMKIV/Gr is dispensable for spermatogenesis and CREM-regulated transcription in male germ cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 281, 931-937.

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.

Boudry, P., Dégremont, L. & Haffray, P. 2008. The genetic basis of summer mortality in Pacific oyster spat and potential for improving survival by selective breeding in France. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*, the Morest project. Edition Ifremer Quae, 153-196.

Carling, D., Mayer, F. V., Sanders, M. J. & Gamblin, S. J. 2011. AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nature chemical biology*, 7, 512-518.

Chen, J., Hudson, E., Chi, M. M., Chang, A. S., Moley, K. H., Hardie, D. G. & Downs, S. M. 2006. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption *in vitro*. *Developmental biology*, 291, 227-238.

Chen, Z., Heierhorst, J., Mann, R. J., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Witters, L. A., Lynch, G. S., Kemp, B. E. & Stapleton, D. 1999. Expression of the AMP-activated protein kinase beta1 and beta2 subunits in skeletal muscle. *FEBS letters*, 460, 343-348.

Chera, S., Kaloulis, K. & Galliot, B. 2007. The cAMP response element binding protein (CREB) as an integrative HUB selector in metazoans: clues from the hydra model system. *Biosystems*, 87, 191-203.

Choi, S. L., Kim, S. J., Lee, K. T., Kim, J., Mu, J., Birnbaum, M. J., Soo Kim, S. & Ha, J. 2001. The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. *Biochemical and biophysical research communications*, 287, 92-97.

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. & Deleage, G. 2000. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 147-150.

Corporeau, C., Groisillier, A., Jeudy, A., Barbeyron, T., Fleury, E., Fabioux, C., Czjzek, M. & Huvet, A. 2011. A functional study of transforming growth factor-beta from the gonad of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine biotechnology*, 13, 971-980.

Corporeau, C., Vanderplancke, G., Boulais, M., Suquet, M., Quere, C., Boudry, P., Huvet, A. & Madec, S. 2012. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics*.

Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A. & Hardie, D. G. 1995. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *European journal of biochemistry / FEBS*, 229, 558-565.

- de Castro, E., Sigrist, C. J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A. & Hulo, N. 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic acids research*, 34, 362-365.
- de Llera, A. H., Martin-Hidalgo, D., Gil, M. C., Garcia-Marin, L. J. & Bragado, M. J. 2012. AMP-Activated Kinase AMPK Is Expressed in Boar Spermatozoa and Regulates Motility. *PLoS One*, 7.
- Dheilly, N., Lelong, C., Huvet, A., Kellner, K., Dubos, M. P., Riviere, G., Boudry, P. & Favrel, P. 2012. Gametogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. *PLoS One*, 7, 36353.
- Don, J. & Stelzer, G. 2002. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*, 187, 115-124.
- Don, L. 1998. Does Bateman's Principle Apply to Broadcast-Spawning Organisms? Egg Traits Influence in Situ Fertilization Rates Among Congeneric Sea Urchins. *Evolution*, 52, 1043-1056.
- Downs, S. M., Hudson, E. R. & Hardie, D. G. 2002. A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. *Developmental biology*, 245, 200-212.
- Dyck, J. R., Gao, G., Widmer, J., Stapleton, D., Fernandez, C. S., Kemp, B. E. & Witters, L. A. 1996. Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic beta and gamma subunits. *The Journal of biological chemistry*, 271, 17798-17803.
- Elkon, R., Zlotorynski, E., Zeller, K. I. & Agami, R. 2010. Major role for mRNA stability in shaping the kinetics of gene induction. *BMC genomics*, 11, 259.
- Ernande, B., Clobert, J., McCombie, H. & Boudry, P. 2003. Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): a quantitative genetic study. *Journal of Evolutionary Biology*, 16, 399-414.
- Evangelou, A., Jindal, S. K., Brown, T. J. & Letarte, M. 2000. Down-regulation of transforming growth factor beta receptors by androgen in ovarian cancer cells. *Cancer research*, 60, 929-935.
- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P. & Huvet, A. 2009. *In vivo* RNA interference in oyster-vasa silencing inhibits germ cell development. *FEBS journal*, 276, 2566-2573.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Penec, M. & Pouvreau, S. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250, 458-470.

Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Minguant, C. & Le Pennec, M. 2004a. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. Biochemical and biophysical research communications, 320, 592-598.

Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F. & Huvet, A. 2004b. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. Biochemical and biophysical research communications, 315, 897-904.

Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P. & Huvet, A. 2008. Characterization of a gonad-specific transforming growth factor- β superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. Gene, 410, 187-196.

Fleury, E., Huvet, A., Lelong, C., de Lorgeril, J., Boulo, V., Gueguen, Y., Bachere, E., Tanguy, A., Moraga, D., Fabioux, C., Lindeque, P., Shaw, J., Reinhardt, R., Prunet, P., Davey, G., Lapegue, S., et al. 2009. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. BMC genomics, 10, 341.

Galtsoff, P. S. 1930. The Role of Chemical Stimulation in the Spawning Reactions of *Ostrea Virginica* and *Ostrea Gigas*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 16, 555-559.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. & Bairoch, A. 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic acids research, 31, 3784-3788.

Gricourt, L., Bonnac, G., Boujard, D., Mathieu, M. & Kellner, K. 2003. Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. General and Comparative Endocrinology, 134, 44-56.

Grigull, J., Mnaimneh, S., Pootoolal, J., Robinson, M. D. & Hughes, T. R. 2004. Genome-wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals posttranscriptional control of ribosome biogenesis factors. Molecular and cellular biology, 24(12), 5534-5547.

Hamano, K., Awaji, M. & Usuki, H. 2005. cDNA structure of an insulin-related peptide in the Pacific oyster and seasonal changes in the gene expression. The Journal of endocrinology, 187, 55-67.

- Hardie, D. G. 2003. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. FEBS letters, 546, 113-120.
- Hardie, D. G. 2004. The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. Journal of cell science, 117, 5479-5487.
- Hardie, D. G. 2011. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. Genes & development, 25, 1895-1908.
- Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R. & Hardie, D. G. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. Journal of biology, 2, 28.
- Hawley, S. A., Davison, M., Woods, A., Davies, S. P., Beri, R. K., Carling, D. & Hardie, D. G. 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. The Journal of biological chemistry, 271, 27879-27887.
- Hixon, M. L. & Boekelheide, K. 2003. Expression and localization of total Akt1 and phosphorylated Akt1 in the rat seminiferous epithelium. Journal of andrology, 24, 891-898.
- Huber, R., Bannasch, D. L. & Brennan, P. 2011. Aggression, Academic Press.
- Hudson, E. R., Pan, D. A., James, J., Lucocq, J. M., Hawley, S. A., Green, K. A., Baba, O., Terashima, T. & Hardie, D. G. 2003. A Novel Domain in AMP-Activated Protein Kinase Causes Glycogen Storage Bodies Similar to Those Seen in Hereditary Cardiac Arrhythmias. Current Biology, 13, 861-866.
- Huvet, A., Fleury, E., Corporeau, C., Quillien, V., Daniel, J.Y., Riviere, G., Boudry, P. & Fabioux, C. 2012. *In vivo* RNA Interference of a Gonad-Specific Transforming Growth Factor- β in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Marine Biotechnology, 14, 402-410.
- Huvet, A., Herpin, A., Degremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.-F. & Cunningham, C. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. Gene, 343, 211-220.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C. & Boudry, P. 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. Aquaculture, 304, 95-99.

- Iseli, T. J., Walter, M., van Denderen, B. J., Katsis, F., Witters, L. A., Kemp, B. E., Michell, B. J. & Stapleton, D. 2005. AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *The Journal of biological chemistry*, 280, 13395-13400.
- Jouaux, A., Franco, A., Heude-Berthelin, C., Sourdaire, P., Blin, J. L., Mathieu, M. & Kellner, K. 2011. Identification of Ras, Pten and p70S6K homologs in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and diet control of insulin pathway. *General and Comparative Endocrinology*, 176, 28-38.
- Kemp, B. E. 2004. Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *Journal of clinical investigation*, 113, 182-184.
- Kemp, B. E., Stapleton, D., Campbell, D. J., Chen, Z. P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J. J., Katsis, F., van Denderen, B., Jennings, I. G., Iseli, T., Michell, B. J. & Witters, L. A. 2003. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochemical Society Transactions*, 31, 162-168.
- Kollara, A. & Brown, T. J. 2010. Variable expression of nuclear receptor coactivator 4 (NcoA4) during mouse embryonic development. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 58, 595-609.
- Kwok, R. P., Liu, X. T. & Smith, G. D. 2006. Distribution of co-activators CBP and p300 during mouse oocyte and embryo development. *Molecular reproduction and development*, 73, 885-894.
- Kyozuka, K., Deguchi, R., Yoshida, N. & Yamashita, M. 1997. Change in intracellular Ca^{2+} is not involved in serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase in oocytes of the marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Developmental Biology*, 182, 33-41.
- LaRosa, C. & Downs, S. M. 2006. Stress stimulates AMP-activated protein kinase and meiotic resumption in mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, 74, 585-592.
- Latendresse, J. R., Warbritton, A. R., Jonassen, H. & Creasy, D. M. 2002. Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid. *Toxicologic Pathology*, 30, 524-533.
- Le Foll, C., Corporeau, C., Le Guen, V., Gouygou, J. P., Berge, J. P. & Delarue, J. 2007. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids dissociate phosphorylation of Akt from phosphatidylinositol 3'-kinase activity in rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 292, 1223-1230.

- Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., Kimura, T., Nakano, T., Ogura, A. & Shinohara, T. 2007. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development*, 134, 1853-1859.
- Lim, C. T., Lolli, F., Thomas, J. D., Kola, B., Korbonits, M. r., Masayasu, K. & Kenji, K. 2012. Chapter Seventeen - Measurement of AMP-Activated Protein Kinase Activity and Expression in Response to Ghrelin.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Martoja, R. & Martoja-Pierson, M. 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, Paris, Masson.
- Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., House, C. M., Stapleton, D., Dyck, J., Gamble, J., Ullrich, C., Witters, L. A. & Kemp, B. E. 1997. Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase beta1 subunit. *The Journal of biological chemistry*, 272, 24475-24479.
- Naimi, A., Martinez, A. S., Specq, M. L., Diss, B., Mathieu, M. & Sourdain, P. 2009a. Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and molecular biology*, 154, 134-142.
- Naimi, A., Martinez, A. S., Specq, M. L., Mrac, A., Diss, B., Mathieu, M. & Sourdain, P. 2009b. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, 152, 189-196.
- Neumann, D. 2003. Mammalian AMP-activated protein kinase: functional, heterotrimeric complexes by co-expression of subunits in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 30, 230-237.
- Olszewska, M., Bujarski, J. J. & Kurpisz, M. 2012. P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: mini-review. *Cell biochemistry and function*, 30, 177-182.
- Parker, G. A. 1982. Why are there so many tiny sperm - Sperm competition and the maintenance of 2 Sexes. *Journal of Theoretical Biology*, 96, 281-294.
- Pauley, G. B., Van Der Raay, B. & Troutt, D. 1988. *Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) - Pacific oyster*. United States Fish Wildlife Service. Biological Report, 82, 28.
- Pernet, F., Barret, J., Gall, P. L., Corporeau, C., Dégremont, L., Lagarde, F., Pépin, J. F. & Keck, N. 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practises in the Thau lagoon. *Aquaculture Environment Interactions*.

- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29, 45.
- Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B. J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S. C., Jennings, I. G., Campbell, D. J., Witters, L. A., Parker, M. W., Kemp, B. E. & Stapleton, D. 2003. AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Current Biology*, 13, 867-871.
- Ramamurthy, S. & Ronnett, G. 2012. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and Energy-Sensing in the Brain. *Experimental neurobiology*, 21, 52-60.
- Roepstorff, C., Thiele, M., Hillig, T., Pilegaard, H., Richter, E. A., Wojtaszewski, J. F. & Kiens, B. 2006. Higher skeletal muscle alpha2AMPK activation and lower energy charge and fat oxidation in men than in women during submaximal exercise. *The Journal of physiology*, 574, 125-138.
- Royer, J., Segueineau, C., Park, K. I., Pouvreau, S., Choi, K. S. & Costil, K. 2008. Gametogenic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture*, 277, 313-320.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology*, 132, 365-386.
- Samain, J. F., Degremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bedier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., et al. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*, 268, 227-243.
- Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A. & Carling, D. 2007. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *The Biochemical journal*, 403, 139-148.
- Santerre, C., Sourdain, P. & Martinez, A. S. 2012. Expression of a natural antisense transcript of Cg-Foxl2 during the gonadic differentiation of the oyster *Crassostrea gigas*: first demonstration in the gonads of a lophotrochozoa species. *Sexual development*, 6, 210-221.
- Schneider, J. E. 2004. Energy balance and reproduction. *Physiology & behavior*, 81, 289-317.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 5857-5864.

- Seydoux, G. & Braun, R. E. 2006. Pathway to totipotency: lessons from germ cells. *Cell*, 127, 891-904.
- Shaw, R. J. 2008. LKB1: cancer, polarity, metabolism, and now fertility. *The Biochemical journal*, 416, 1-3.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P. & Gouletquer, P. 1999. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquatic Living Resources*, 12, 131-143.
- Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N. & Gouletquer, P. 1997. Ecophysiology of maturation and spawning in oyster (*Crassostrea gigas*): Metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. *Aquatic Living Resources*, 10, 177-185.
- Stanton, J. L. & Green, D. P. L. 2001. A set of 840 mouse oocyte genes with well-matched human homologues. *Molecular Human Reproduction*, 7, 521-543.
- Stapleton, D., Mitchelhill, K. I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B. J., Teh, T., House, C. M., Fernandez, C. S., Cox, T., Witters, L. A. & Kemp, B. E. 1996. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *The Journal of biological chemistry*, 271, 611-614.
- Steele, S. & Mulcahy, M. F. 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79, 673-686.
- Stein, S. C., Woods, A., Jones, N. A., Davison, M. D. & Carling, D. 2000. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *The Biochemical journal*, 345 (Part 3), 437-443.
- Stricker, S. A. 2012. Inhibition of germinal vesicle breakdown by antioxidants and the roles of signaling pathways related to nitric oxide and cGMP during meiotic resumption in oocytes of a marine worm. *Reproduction*, 143, 261-270.
- Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T. & Neumann, D. 2006. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 281, 32207-32216.
- Tartarin, P., Guibert, E., Toure, A., Ouiste, C., Leclerc, J., Sanz, N., Briere, S., Dacheux, J.-L., Delaleu, B., McNeilly, J. R., McNeilly, A. S., Brillard, J.-P., Dupont, J., Foretz, M., Viollet, B. & Froment, P. 2012. Inactivation of AMPK α 1 Induces Asthenozoospermia and Alters Spermatozoa Morphology. *Endocrinology*, 153, 3468-3481.

Tosca, L., Chabrolle, C. & Dupont, J. 2008. AMPK: a link between metabolism and reproduction? *Medecine sciences*, 24, 297-300.

Tosca, L. & Dupont, J. 2007. Un role de la kinase activé par l'AMP (AMPK) dans le métabolisme et la reproduction. *Regard sur la Biochimie*.

Tosca, L., Froment, P., Solnais, P., Ferre, P., Foufelle, F. & Dupont, J. 2005. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 146, 4500-4513.

van der Veer, H. W., Cardoso, J. F. M. F. & van der Meer, J. 2006. The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. *Journal of Sea Research*, 56, 107-124.

Viollet, B., Athea, Y., Mounier, R., Guigas, B., Zarrinpashneh, E., Horman, S., Lantier, L., Hebrard, S., Devin-Leclerc, J., Beauloye, C., Foretz, M., Andreelli, F., Ventura-Clapier, R. & Bertrand, L. 2009. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 14, 19-44.

Wade, G. N. & Jones, J. E. 2004. Neuroendocrinology of nutritional infertility. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 287, 1277-1296.

Waeber, G., Meyer, T. E., LeSieur, M., Hermann, H. L., Gerard, N. & Habener, J. F. 1991. Developmental stage-specific expression of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein CREB during spermatogenesis involves alternative exon splicing. *Molecular endocrinology* 5, 1418-1430.

Walker, W. H. 2010. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 365, 1557-1569.

Warden, S. M., Richardson, C., O'Donnell, J., Jr., Stapleton, D., Kemp, B. E. & Witters, L. A. 2001. Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *The Biochemical journal*, 354, 275-283.

Wilusz, C. J. & Wilusz, J. 2004. Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends in genetics*, 20, 491-497.

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. & Carling, D. 2003a. LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Current Biology*, 13, 2004-2008.

Woods, A., Vertommen, D., Neumann, D., Turk, R., Bayliss, J., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D. & Rider, M. H. 2003b. Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*, 278, 28434-28442.

Yeh, S. & Chang, C. 1996. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 5517-5521.

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W., Paps, J., Zhu, Y., et al. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490, 49-54.

Zong, H., Ren, J. M., Young, L. H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M. J. & Shulman, G. I. 2002. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15983-15987.

Troisième chapitre :
Analyse fonctionnelle de l'AMPK

I. Contexte de l'étude

Les deux études précédentes démontrent que chez *C. gigas* l'hétérotrimère AMPK existe et la mesure de sa phosphorylation sur le résidu Thr172 de la sous-unité α permet de penser que cette kinase est fonctionnelle. Afin de définir son rôle chez l'huître, nous avons mené une étude fonctionnelle par approche pharmacologique *in vivo*. Puisque le chapitre précédent a permis de suggérer un rôle, qui reste à élucider, de l'AMPK dans la gamétogenèse de *C. gigas*, cette étude fonctionnelle a été réalisée dans des conditions environnementales contrôlées favorisant le développement gamétogénétique de l'huître.

Chez l'huître creuse, plusieurs facteurs environnementaux ont déjà été décrits comme ayant une influence sur la reproduction ainsi que la mise en réserve et l'utilisation de ces réserves essentiellement pour soutenir le développement gamétogénétique. Chez cette espèce possédant une grande plasticité phénotypique, la maîtrise de facteurs tels que la température et l'apport de nourriture permet de contrôler de façon précise sa gamétogenèse. Ces deux paramètres sont connus pour favoriser respectivement le processus de gamétogenèse et stimuler l'effort de reproduction (Chavez-Villalba et al., 2003; Chavez-Villalba et al., 2002; Fabioux et al., 2005). Un conditionnement à 19°C et une modulation de la quantité de nourriture apportée nous a permis de réaliser un développement gamétogénétique contrôlé.

L'identification de la fonction d'un gène et de sa protéine correspondante nécessite de développer des approches fonctionnelles basées sur la caractérisation des phénotypes observés lors de modifications par inhibitions ou stimulations spécifiques. Chez les bivalves marins, l'absence de lignées cellulaires stables (Quinn et al., 2009) ne permet pas de réaliser des approches classiques d'étude par génomique fonctionnelle, telles que la mutagenèse dirigée. L'ARN interférence est une technique alternative à la mutagenèse. Cette technique, développée à l'origine chez le ver nématode *C. elegans* (Fire et al., 1998), permet d'étudier les phénotypes associés à une perte de fonction d'un gène aussi bien de façon *in vitro* que *in vivo*. Couplée à la maîtrise du cycle de reproduction, la technique de l'ARN interférence a permis de développer des analyses fonctionnelles ciblées de gènes impliqués dans la reproduction chez *C. gigas* (Beguel et al., 2013; Fabioux et al., 2009; Huvet et al., 2012). D'autres approches fonctionnelles ont également été validées chez *C. gigas*, telles que l'immuno-inhibition par injection d'anticorps dirigé contre une protéine cible sécrétée pour inhiber sa fonction (Corporeau et al., 2011).

C'est grâce à l'ensemble de ces technologies de maîtrise de la physiologie en milieu contrôlé et aux analyses fonctionnelles développées sur l'huître creuse au sein du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés de l'Ifremer, et grâce à la caractérisation du système AMPK que

l'étude d'une modulation *in vivo* de cette kinase a été envisagée chez *C. gigas*. Cette étude fonctionnelle de l'AMPK a été réalisée en utilisant deux approches différentes. Tout d'abord, une approche physiologique, où une stimulation de l'activité de l'AMPK a été testée par une privation de nourriture au long d'un cycle de reproduction. Le jeûne est un facteur orexigène connu pour activer AMPK (Ramamurthy and Ronnett, 2012), mais aussi un facteur important ralentissant l'investissement reproducteur chez l'huître (Berthelin et al., 2001; Fabioux, 2004; Jouaux, 2010; Kennedy, 1996). Couplée à cette stimulation physiologique, une stimulation abiogène de l'AMPK a été réalisée par injection du composé chimique pharmacologique AICAR. Cette molécule de synthèse a été caractérisée comme pouvant stimuler l'activité AMPK (Corton et al., 1995). Chez plusieurs espèces, de nombreuses voies métaboliques régulées par AMPK ont été identifiées *in vivo* et *in vitro* grâce à ce composé analogue de l'AMP (Towler and Hardie, 2007). L'AICAR entre dans les cellules, puis est transformé en ZMP, molécule possédant une structure très proche de l'AMP ce qui va lui permettre d'activer l'AMPK en mimant une augmentation en AMP dans la cellule et donc une baisse de l'énergie disponible (Corton et al., 1995; Van Den Berghe and Gruber, 1993; Vincent et al., 1991).

Cette étude a fait en partie l'objet d'un stage de 9 mois de janvier à septembre 2011. Ce stage était encadré par le Dr. Arnaud Huvet et moi-même, et réalisé par Mademoiselle Émilie Baugin en vue de l'obtention du diplôme de Master 2 « Génétique, Génomique et Biotechnologies » basé à la faculté de médecine de l'Université de Bretagne Occidentale de Brest.

II. Matériel et méthode

II.1. Matériel biologique

L'acclimatation des huîtres et leur conditionnement de 8 semaines (du 24 janvier au 18 mars 2011) ont été réalisés au sein de la station expérimentale du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés de l'Ifremer située à Argenton. 510 huîtres sauvages en provenance du bassin d'Arcachon ont été acclimatées et traitées par antibiotique pendant une semaine, dans un bac de stabulation. La température a été progressivement augmentée d'un degré par jour jusqu'à atteindre $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Cette température, favorable au développement reproducteur des huîtres (Chavez-Villalba et al., 2002) a été utilisée tout au long de l'expérimentation. Après retrait des balanes présentes sur la coquille, afin d'éviter les compétitions trophiques, et pesée individuelle, les huîtres ont été réparties de façon homogène à biomasse constante dans des bacs d'expérimentation, à raison de 30 individus par bac et deux bacs par condition (Figures 21 et 22). Les huîtres ont été marquées individuellement au niveau de la valve supérieure à l'aide d'une étiquette fixée par une colle époxyde (Araldite).

II.2. Conditionnement

Les huîtres ont été divisées en deux lots : selon leur condition trophique « nourries » et « à jeun ». Pour les huîtres nourries, l'alimentation, constituée d'un mélange en proportions égales de deux microalgues, *Chaetoceros gracilis* et *Isochrysis galbana*, a été apportée à raison d'environ $5,7 \times 10^9 \pm 0,8 \times 10^9$ cellules/huître/jour (Chavez-Villalba et al., 2002; Song et al., 2009). La prise alimentaire a été suivie de façon journalière au cours de l'expérimentation par la mesure du nombre de cellules algales en entrée et en sortie des bacs à l'aide d'un compteur électronique de cellules (Beckman Coulter®, Multisizer™ 3 Coulter Counter).

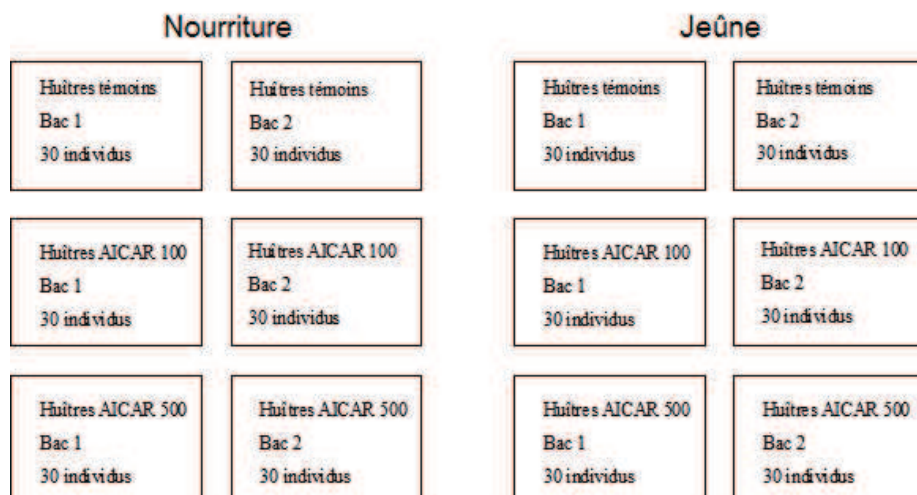


Figure 21 : Schéma du dispositif expérimental. Chaque condition est testée en duplicat de bac.

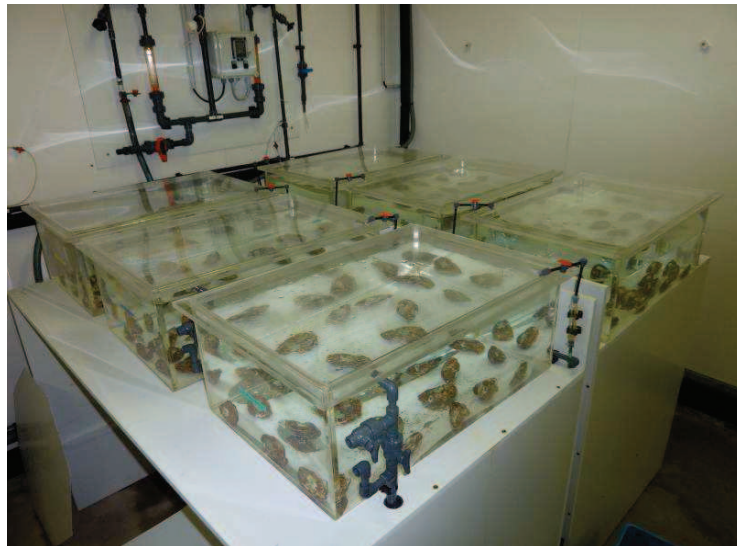


Figure 22 : Photographie du dispositif expérimental. Ici, six bacs de 30 individus, maintenus à jeun.

II.3. Injections chroniques d'AICAR

Les huîtres ont été meulées à la jointure des deux valves, à environ 1 cm du muscle adducteur dans une région permettant des injections directes dans la région gonadique (Figure 24). Le meulage a été préféré à l'anesthésie (Culloty and Mulcahy, 1992; Suquet et al., 2009) afin d'exclure les risques éventuels d'interaction entre les solutions injectées et l'anesthésiant.

Trois types d'injections hebdomadaires ont été effectués à la fois sur des individus à jeun et des individus nourris. Les huîtres témoins ont reçu une injection d'eau de mer stérile filtrée sur 1µm. Pour les huîtres administrées avec l'agent pharmacologique « 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléoside » (AICAR) [CAS : 2627-69-2] (Interfine Chemicals #61446), deux types d'injections ont été réalisés à 100 et 500 mg d'AICAR par kg de masse fraîche. Pour estimer cette masse fraîche, le poids total des huîtres (en gramme) a été pris. Au laboratoire, à partir d'abaques, une formule mathématique a été développée qui donne un coefficient pour estimer la masse fraîche à partir du poids total d'une huître :

$$\text{Masse fraîche (g)} = \text{poids total (g)} \times 0,13$$

Ce calcul a permis de définir le volume à injecter pour chaque individu pour avoir une dose de 100 ou de 500 mg d'AICAR par kg de masse fraîche. L'AICAR, sous forme de poudre anhydre a été dissout dans de l'eau de mer stérile. Cette solution, préparée la veille des injections, était conservée au réfrigérateur pendant la nuit.

Huit injections ont été effectuées aux jours 2, 9, 16, 24, 30, 36, 44 et 52 du conditionnement (Figure 24). Les huîtres témoins ont reçu un volume d'eau de mer équivalent à celui estimé pour une dose forte d'AICAR. L'injection a été réalisée en 2 à 3 points de piqûre au

niveau de la région du manteau/gonade. Les seringues (Terumo® 1 ml) et les aiguilles (Terumo Neolus® 26G x23) ont été changées entre chaque condition.



Figure 23 : Réalisation d'une injection dans la région du manteau-gonade.

II.4. Mesures biométriques et prélèvements

Au cours de l'expérimentation, des mesures biométriques ont été réalisées chaque semaine. Deux prélèvements ont été réalisés respectivement à 10 jours (Temps 1) et 53 jours (Temps 2) après le début de l'alimentation, 24 heures après l'injection. Lors du prélèvement, l'huître est ouverte et une coupe de 5 mm est réalisée au niveau de la masse viscérale à environ 0,5 cm de la cavité péricardique pour les analyses histologiques. La coupe est immédiatement fixée dans 15 mL de fixateur de Davidson dans des piluliers individuels et conservée à 4°C. Pour chacune des huîtres, la gonade a été disséquée. Chaque tissu a été placé dans une nacelle en aluminium stérile refroidie préalablement à l'azote liquide puis immédiatement congelé dans l'azote liquide pour les mesures biochimiques ultérieures. Une mesure du poids frais des palpes a été réalisée.

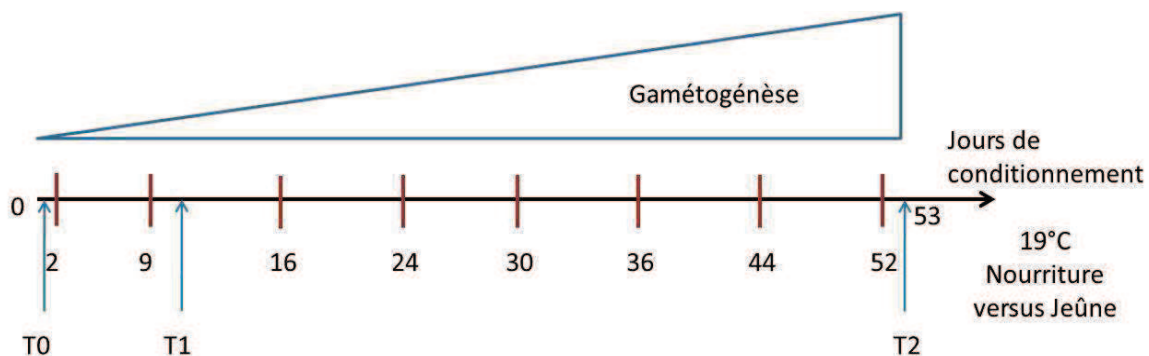


Figure 24 : Schématisation du conditionnement. Les flèches indiquent les jours de prélèvements. Les encoches indiquent les différentes injections.

II.5. Broyage et extraction des protéines

Pour chaque individu, les échantillons de tissu gonadique placés en azote liquide ont été broyés (Retsch MM200®, 20 secondes à 30Hz) afin d'obtenir une poudre homogène qui a été aliquotée en cryotubes (Cryovial ® stérile PK/100 T310-2A (2 ml), T309-5A (5 ml), Symport) et conservée dans l'azote liquide. Environ 100 mg de poudre d'azote ont été incubés dans 1,5 mL de tampon de lyse (Hepes 1M, NaF 1M, NaPPi 0,25M, EDTA 0,5M, EGTA 0,5M, Glycérol 10 %, Triton 1 %, DTT 1M, PMSF 100mM, aprotinine 10 µg/µL, pepstatine 1 µg/µL NaPPi) vortexés et placés dans la glace. Les protéines ont ensuite été extraites par centrifugation (15 minutes, 18 000 G, 4°C). Le surnageant a été récupéré, homogénéisé et aliquoté dans des tubes Eppendorfs. Les protéines extraites ont été stockées à -80°C.

II.6. Histologie semi-quantitative

Les coupes histologiques de chaque individu ont été déshydratées dans des solutions de concentrations décroissantes en éthanol, lavées avec du Claral®, puis incluses en bloc de paraffine (station d'enrobage LEICA EG 1150 H). Des coupes de 5 µm ont été réalisées dans ces blocs à l'aide d'un microtome (LEICA RM2155). Elles ont ensuite été montées sur lame de verre et colorées à l'hématoxyline de Mayer et à l'éosine Y (Martoja and Martoja-Pierson, 1967). Les lames ont été examinées sous microscope afin de déterminer le sexe et le stade de gamétogenèse selon le fractionnement de reproduction proposé par de Steele et Mulcahy, 1999 décrite dans les Tableaux 2 et 3. Chaque coupe histologique a été scannée (scanner HP Scanjet 6300 C) et agrandie à 400 %. L'analyse de l'aire gonadique est basée sur la coloration différentielle des tissus en histologie. La surface totale de la coupe ainsi que la surface de chaque tissu de la masse viscérale (tissu conjonctif, gonade, glande digestive) ont été calculées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (IMAQ vision Builder, National Instrument). Le rapport de la surface qu'occupe la gonade par rapport à l'aire qu'occupe la surface totale de la coupe est exprimée en pourcentage et permet ainsi d'estimer l'aire gonadique, témoin de l'investissement reproducteur (Fabioux et al., 2005).

Troisième chapitre :
Analyse fonctionnelle de l'AMPK

Tableau 2 : Description des phases de maturité gonadique chez les femelles *C. gigas* (d'après Steele and Mulcahy 1999).

Stade 0	indifférencié	Pas de présence évidente de follicule à la périphérie de la glande digestive.
Stade 1	développement précoce	Les ovogonies émergent des cellules souches le long du follicule, pas d'ovocyte libre. Tissu conjonctif très abondant.
Stade 2	développement tardif	Ovocytes libres et attachés présents avec noyaux distincts apparaissant légèrement plus colorés que le cytoplasme.
Stade 3	mature	Ovocytes libres avec noyaux et nucléoles distincts.
Stade 4	ponte partielle	Grand nombre d'ovocytes libres visibles mais peu denses, occupant le centre du lumen du follicule.
Stade 5	ponte totale	Parois folliculaires éclatées et follicules vides ; canaux génitaux femelles matures ; quelques phagocytes présents
Stade 6	post-ponte	Follicules effondrés et petits. Grand nombre de phagocytes. Ovocytes résiduels en cytolyse.
Stade 7	résorption	Tissu conjonctif apparent dans les follicules. Ovocytes en cours de cytolyse et macrophages présents dans certains follicules.

Tableau 3 : Description des phases de maturité gonadique chez les mâles *C. gigas* (d'après Steele and Mulcahy 1999).

Stade 0	indifférencié	Pas de présence évidente de follicule à la périphérie de la glande digestive.
Stade 1	développement précoce	Quelques petits follicules ; nombreux spermatogonies et spermatocytes, pas de spermatozoïde.
Stade 2	développement tardif	Follicules contenant principalement des spermatides et des spermatozoïdes. Au centre du follicule, modèle tourbillonnant caractéristique des spermatozoïdes, avec queue tournée vers la lumière du follicule.
Stade 3	mature	Tissu interfolliculaire et épithélium germinale peu visibles. Follicules remplis de spermatozoïdes formant des tourbillons caractéristiques, remplissant entièrement le follicule.
Stade 4	ponte partielle	Follicules partiellement vides, avec grand nombre de spermatozoïdes mais peu compacts.
Stade 5	ponte totale	Majorité des follicules vides ou partiellement vides avec trace de sperme dans les spermiductes de quelques individus.
Stade 6	post-ponte	Tissu conjonctif en développement rapide entre les follicules effondrés. Cellules germinales cytolysées dans le lumen. Nombreux phagocytes.
Stade 7	résorption	Tissu conjonctif apparent dans les follicules. Infiltration de cellules lymphatiques dans les follicules. Spermatocytes denses dans les follicules.

II.7. Dosage de la phosphorylation Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK

Pour chaque individu, un échantillon de 90 mg de lysat de protéine a été dénaturée par la solution de Laemmli (0,6 M Tris-HCl, 1 mL de glycérol, 10 % p / v de SDS, 0,5 mL à 0,1 % p / v de bleu de bromophénol, 0,5 mL Beta mercaptoéthanol). Une migration électrophorétique monodimensionnelle a été réalisée dans un gel de polyacrylamide à 10 % de SDS. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (Biorad) afin de réaliser l'immunodétection. L'immunodétection est réalisée avec un anticorps monoclonal de lapin anti-AMPK α phospho-thréonine 172 (dilution 1:1000 ; CST # 2535 ; Cell Signaling Technology). Afin d'assurer la cross-réactivité des anticorps hétérologues, les services techniques de Cell Signaling Technology nous ont confirmé que la région antigénique reconnue par l'anticorps dirigé vers la phospho-thréonine 172 de la sous-unité α de l'AMPK était présent à 100 % sur la protéine décrite chez *C. gigas* (Cell Signaling Technology, communication personnelle). Les membranes ont ensuite été révélées à l'aide d'un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à l'« horseradish peroxidase » (HRP) (dilution 1:5000) et par un kit de détection de l'HRP (Biorad). Le signal obtenu sur film autoradiographique (Amersham hyperfilm ECL, GE Healthcare) a été quantifié en utilisant un logiciel MULTI-ANALYST (Biorad), en enlevant uniformément le signal du bruit de fond. La valeur obtenue est exprimée en OD/mm² et représente l'intensité de la bande exprimée en valeur moyenne par pixel, multipliée par la surface de la bande. Afin de s'assurer que des quantités identiques d'échantillons ont été déposées dans les gels, les membranes ont été déshybridées par incubation pendant 1 h à température ambiante dans un tampon de déshybridation (100 mM de glycine, NaCl 100 mM pH 3,2), et réhybridées avec un anticorps dirigé vers l'histone H3 (dilution 1:5000 ; # 9175 ; Cell Signaling Technology), comme décrit dans (Fabioux et al., 2009).

II.8. Dosage de l'ATP, ADP et AMP par HPLC

Les nucléotides ont été extraits dans la gonade à partir d'un aliquot de 150 à 200 mg de poudre azotée selon le protocole de (Le Moullac et al., 2007). La poudre azotée a d'abord été broyée (broyeur Kinematica Polytron®) dans 2 mL de TCA 0,5M (8 %). Après centrifugation (10 min, 4 000rpm, 4°C), 1 mL de surnageant a été récupéré puis neutralisé par 1,4 mL d'amine fréon (1 mL de trioctylamine pour 5 mL de trifluoro trichloro ethane). Une fois la neutralité vérifiée sur du papier pH, le surnageant a été réparti dans des tubes Beckman (DASLAB®, nirco, s.a). Les tubes ont été conservés à -20°C jusqu'à leur analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Colonne ODS Hypersil 15 cm Thermo Electron

corporation, Injecteur HPLC Autosampler 460 Kontron Instruments, Pompe L-7100 LaChrom Merck Hitachi). Les spectres chromatographiques ont été analysés à l'aide du logiciel Kromasystem 2000.

II.9. Dosage du glycogène par colorimétrie

Pour chaque individu, le dosage du glycogène dans la gonade a été réalisé en adaptant le protocole de (Franco et al., 2010). Le glycogène a été extrait pendant 1 h à 4°C à partir de 100 mg de poudre azotée auquel ont été ajoutés 3 mL de TCA 15 %. Une sonication a été réalisée lorsque nécessaire. Après centrifugation (10 minutes, 3 500 tours/min, 4°C), le glycogène a été précipité par l'ajout de 4 mL d'éthanol absolu sur 500 µL de surnageant et laissé une nuit à 4°C. Après centrifugation (30 minutes, 3500tours/min, 4°C), le culot de glycogène a été repris dans 200 µL d'eau. 20 µL d'échantillon et d'une gamme étalon (de 0 à 1 mg/mL de glycogène) ont ensuite été déposés en triplicat sur une plaque 96 puits. Les échantillons trop concentrés ont été dilués dans de l'eau pour être déposés. 130 µL de KI_2CaCl_2 ont ensuite été ajoutés dans chacun des puits. Après 20 minutes à température ambiante, la plaque a été lue à 450 nm.

II.10. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics plus 5.0. Pour la réalisation des différents tests, les valeurs représentant une proportion telles que l'aire gonadique ont été transformées à l'aide d'une transformation angulaire par la fonction $\text{Arcsin}\sqrt{\text{proportion}}$. La normalité des données a été vérifiée par un test de Kolmogorov-Smirnov. L'homoscédasticité des données a été vérifiée par un test de Bartlett. Lorsque les données remplissent les conditions de normalité et d'homoscédasticité, une analyse normale de la variance (ANOVA) a été réalisée pour mettre en évidence une significativité ou non des différences entre les données. Les différences sont reportées significatives quand la probabilité p est inférieure à 0,05. Les corrélations ont été évaluées par une corrélation de rang de Pearson. Dans le cas où les différences observées sont significatives, une correction de Bonferroni a été appliquée afin de mettre en évidence les valeurs significativement différentes.

Si les données ne remplissent pas les conditions de normalité et/ou d'homoscédasticité, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé. Les différences observées sont reportées significatives au seuil de 5 %. Pour comparer les différences d'aire gonadique et de phosphorylation du résidu Thr172, un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls à 95 % a été réalisé. Pour comparer les mortalités et la répartition des sexes des tests de χ^2 ont été réalisés. Lorsque les effectifs étaient inférieurs à 5, une correction de Yates a été appliquée.

III. Résultats

III.1. Survie

Chez les huîtres à jeun, l'injection du composé abiogène AICAR a modifié la survie. Au bout du 36^{ème} jour d'expérimentation, les premières mortalités ont été observées chez les huîtres à jeun injectées à la dose 500 mg/kg et au bout du 44^{ème} jour pour les huîtres injectées à la dose 100 mg/kg. En fin de conditionnement, pour les huîtres à jeun injectées à la dose 500 mg/kg, le taux de survie est de 66,67 % soit un pourcentage de mortalité cumulée de 32,33 %, tandis que pour les huîtres à jeun injectées à la dose 100 mg/kg, le taux de survie est de 93 % soit un pourcentage de mortalité cumulée de 7 %. Le test de Chi² avec correction de Yates indique qu'une différence significative est observée en relation avec la dose injectée (Chi² = 27,651 ; $p = 0,00004$). Les mortalités observées à la dose 500 mg/kg sont significativement différentes des deux conditions à jeun. Lors du prélèvement final, plusieurs huîtres à jeun injectées à la dose 100 mg/kg mais surtout à la dose 500 mg/kg se trouvaient visuellement dans un mauvais état général et leurs valves se maintenaient difficilement fermées. Ces huîtres ont été qualifiées de moribondes, état précédant la mort. Étant donné l'état des huîtres à jeun injectées à la dose 500 mg/kg, cette condition n'a pas été retenue pour poursuivre les analyses du temps 2 (52^{ème} jour de conditionnement). Chez les huîtres nourries, l'injection de l'AICAR n'a pas ou très peu modifié la survie. Aucune mortalité n'a été observée chez les huîtres nourries injectées à la faible dose d'AICAR 100 mg/kg sur l'ensemble de l'expérimentation et une seule huître a été retrouvée morte chez les nourries injectées à la forte dose 500 mg/kg (Figure 25).

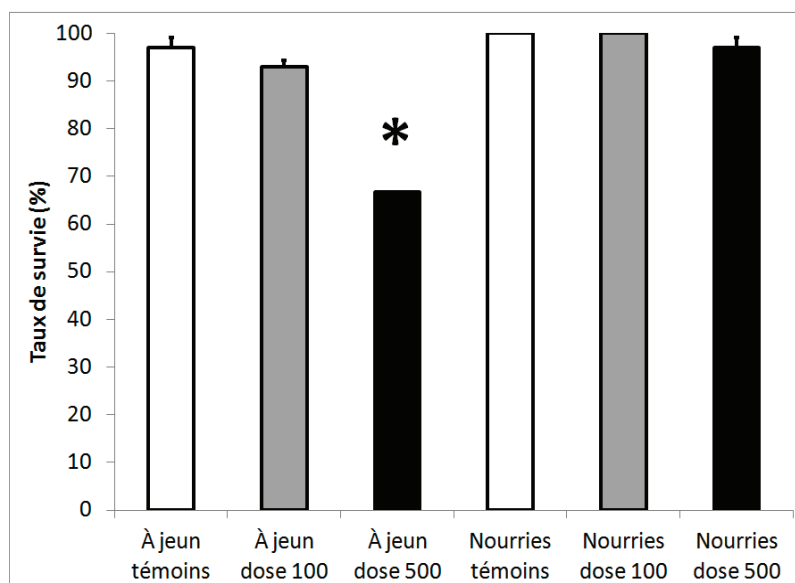


Figure 25 : Taux de survie après 52 jours d'expérimentation pour chacune des conditions. Les écarts-types obtenus entre les duplicats de bac sont indiqués par les barres d'erreur. L'astérisque (*) indique une différence significative.

III.2. Poids des huîtres survivantes

Les mesures biométriques de poids total et de poids de la coquille après dissection ont permis par soustraction d'estimer le poids de masse fraîche de chaque individu après 52 jours de conditionnement. Aucune différence significative n'a été observée entre les conditions (Figure 26).

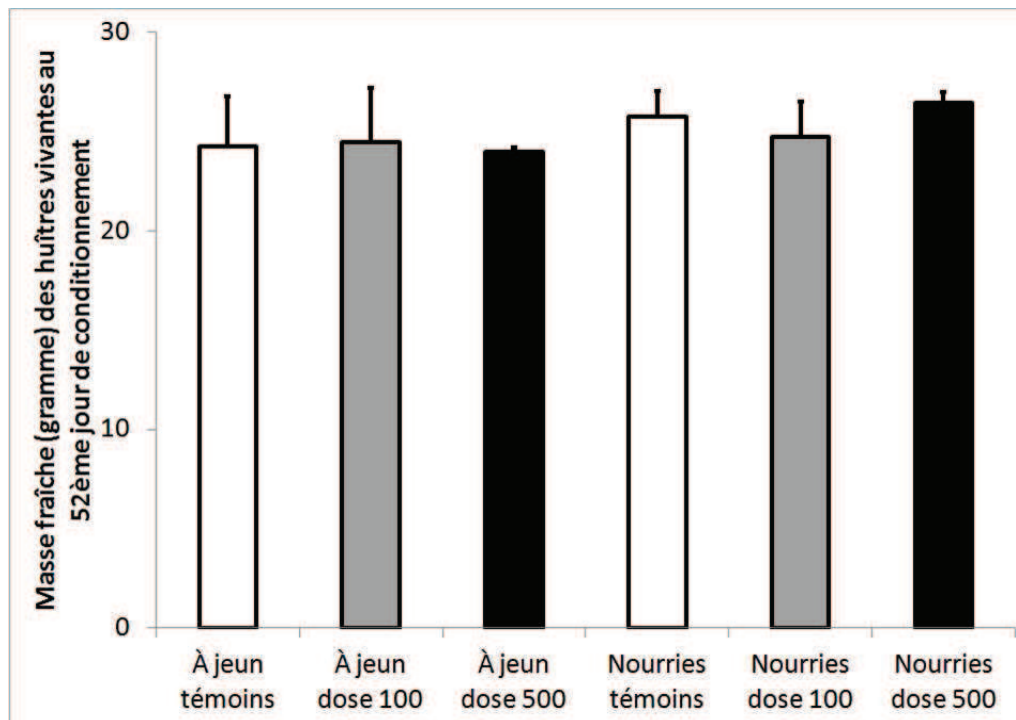


Figure 26 : Masse fraîche des huîtres vivantes estimée après 52 jours de conditionnement. Les écarts-types obtenus entre les duplicats de bac sont indiqués par les barres d'erreur.

III.3. Consommation algale

Chez les huîtres nourries, malgré une légère diminution de la consommation algale pour les individus injectés, aucune différence significative n'a été observée entre les conditions. En moyenne dans les trois conditions, les huîtres ont consommé $1,09 \times 10^8 \pm 3,78 \times 10^6$ cellules/jour/huître (Tableau 4).

Tableau 4 : Consommation algale moyenne par condition exprimée en cellule/jour/huître.

Condition	Nourries témoins	Nourries dose 100	Nourries dose 500
Consommation algale (cellules/jour/huître)	$1,13 \times 10^8 \pm 1,50 \times 10^6$	$1,07 \times 10^8 \pm 2,70 \times 10^6$	$1,08 \times 10^8 \pm 3,05 \times 10^6$

III.3. Analyses histologiques

Le jeun, et l'injection d'AICAR sont deux conditions connues pour simuler une déplétion en énergie. Afin de déterminer si ces deux conditions et si leurs effets cumulés avaient un effet sur la physiologie de l'huître, dans un premier temps, nous avons focalisé nos analyses histologiques et biochimiques dans la gonade sur trois conditions « extrêmes ». Ces conditions font partie des groupes d'huîtres prélevées au temps final de l'expérimentation (temps 2 ; 52^{ème} jour de conditionnement) : les huîtres nourries injectées avec de l'eau de mer (Nourries témoins), les huîtres à jeun injectées avec de l'eau de mer (Jeun témoins), les huîtres nourries injectées avec de l'AICAR à forte dose 500 mg/kg (Nourries dose 500).

Sexes et stades de maturité

En fin d'expérimentation, après 52 jours de conditionnement, les huîtres à jeun témoins analysées restent pour la majorité au stade indifférencié : 53,8 % des individus sont en stade 0 de gamétogenèse (Tableau 5). Au niveau de la répartition des sexes, les huîtres à jeun témoin ont 53,8 % d'indifférenciés, 46,2 % de femelles et 7,7 % de mâles. Sur les 22 huîtres nourries témoins sélectionnées, 77,3 % se trouvent en stade 3 de gamétogenèse c'est-à-dire matures à la fin de l'expérimentation. Au niveau des répartitions des sexes, les huîtres nourries témoins ont une répartition : 77,3 % de femelles et 22,7 % de mâles. Aucune huître n'est restée au stade indifférencié (tableau 5). L'injection d'AICAR n'a pas perturbé la cinétique de gamétogenèse puisque là aussi 77,3 % des huîtres étaient matures (tableau 5). Les huîtres nourries injectées à la dose 500 % mg/kg d'AICAR ont une répartition de 68,2 % de femelles et 31,8 % de mâles. Aucune huître n'est restée en stade indifférencié (Tableau 5). Aucune différence significative de la répartition des sexes n'a été observée entre les conditions nourries témoins et nourries injectées à la dose 500 ($\text{Chi}^2 = 0,458$; $p = 0,50$). Une différence significative a été observée dans la répartition des stades entre les conditions nourries témoins et à jeun témoins ($\text{Chi}^2 = 29,401$; $p = 0,000006$), tandis qu'aucune différence significative n'a été observée entre les conditions nourries et nourries injectées à la dose 500 ($\text{Chi}^2 = 0,129$; $p = 0,719$).

Tableau 5 : Répartition des sexes et des stades de maturité (suivant l'échelle de Steele et Mulcahy, 1999) chez les huîtres nourries témoins, nourries injectées dose 500 et à jeun témoins. La lettre « n » désigne le nombre d'individus par condition.

Condition	n	Répartition des sexes (%)			Répartition des stades (%)				
		indifférencié	femelle	mâle	0 : indifférencié	1 : mitoses	2 : méioses	3 : maturité	ponte/resorption
À jeun témoins	26	53,8	46,2	7,7	53,8	23,1	11,5	3,8	7,7
Nourries témoins	22	0	77,3	22,7	0	0	22,7	77,3	0
Nourries dose 500	22	0	68,2	31,8	0	0	22,7	77,3	0

Pourcentage de l'aire gonadique

Des différences significatives de l'aire gonadique ont été trouvées entre la condition à jeun témoin et les deux conditions nourries témoin et nourries dose 500. Aucune différence significative de l'aire gonadique n'a été observée entre les sexes pour les huîtres placées dans les mêmes conditions (Figure 27).

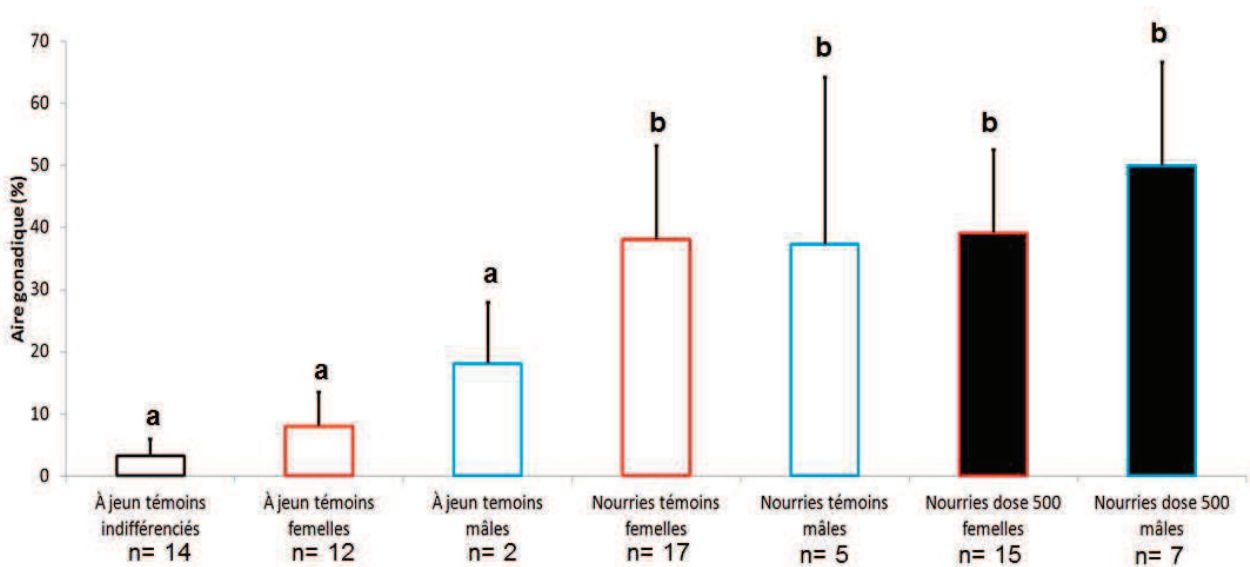


Figure 27 : Aire gonadique moyenne exprimée en pourcentage chez les huîtres à jeun, les huîtres nourries témoins et les huîtres nourries injectées dose 500. Les écarts-types obtenus entre les aires gonadiques des individus sont indiqués par les barres d'erreur. La lettre « n » désigne le nombre d'individus par condition. Les lettres romaines désignent les différences significatives indiquées par le test de rang multiple de Student-Newman-Keuls à 95 %.

III.4. Analyses biochimiques

Comme pour des analyses d'histologie, les analyses biochimiques de la gonade ont été faites sur les trois mêmes groupes d'huîtres parmi ceux prélevés au temps final de l'expérimentation : Nourries témoins, À jeun témoins, Nourries dose 500.

Dosage de la phosphorylation en Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK dans la gonade

En fin d'expérimentation, après 52 jours de conditionnement, le dosage de la phosphorylation Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK a été réalisé sur des individus femelles et mâles issus des trois conditions. Ces mesures ont permis de caractériser des différences significatives entre les femelles et les mâles aussi bien chez les huîtres nourries témoins que les huîtres nourries injectées à 500 mg/kg d'AICAR mais n'ont pas révélé de différences significatives entre les huîtres injectées par AICAR et les huîtres injectées par de l'eau de mer stérile (Figure 28).

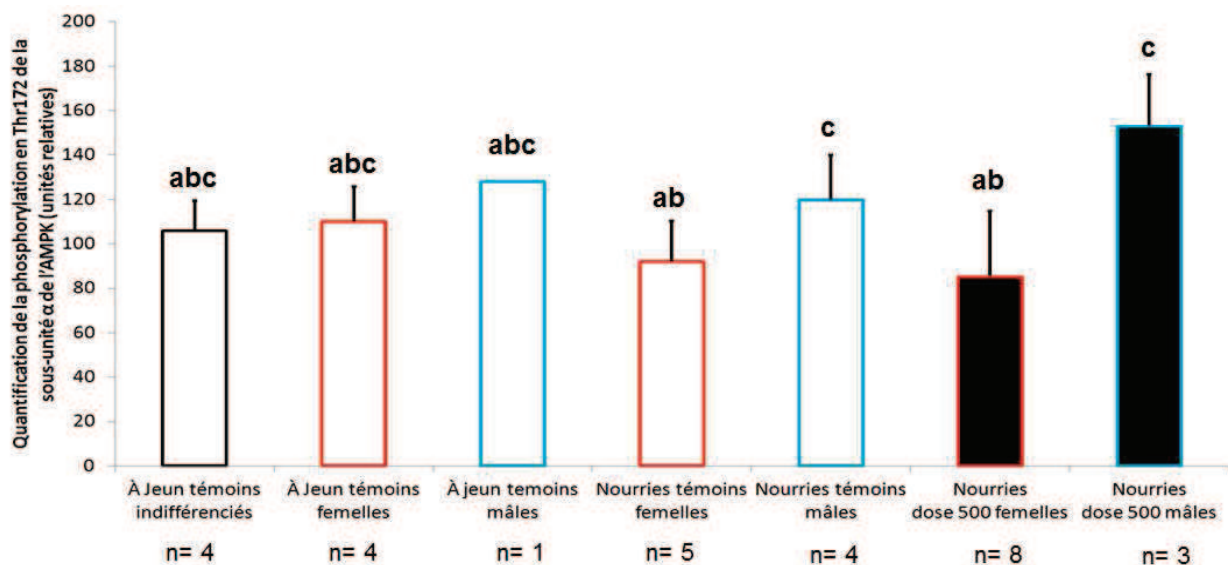


Figure 28 : Quantification de la phosphorylation en Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK en unités relatives chez les huîtres à jeun, les huîtres nourries témoins et les huîtres nourries injectées dose 500 chez les huîtres à jeun, les huîtres nourries témoins et les huîtres nourries injectées dose 500. Les écarts-types obtenus entre les aires gonadiques des individus sont indiqués par les barres d'erreur. La lettre « n » désigne le nombre d'individus par condition. Les lettres romaines désignent les différences significatives indiquées par le test de rang multiple de Student-Newman-Keuls à 95 %.

Concentration en nucléotides dans la gonade

Les dosages des nucléotides ATP, ADP et AMP sont présentés individuellement en pmol/mg de poudre de tissus. Les analyses de variance à deux facteurs (sexe et condition) indiquent que les quantités en nucléotides ne sont pas impactées par le facteur sexe, mais uniquement par le facteur condition. Nous avons donc choisi pour ce dosage de présenter uniquement le facteur condition (Figure 29). L'injection d'AICAR à une dose de 500 mg/kg affecte significativement la concentration des trois nucléotides en comparaison aux huîtres nourries (Figure 29. A) : elle augmente les concentrations en ADP et en AMP de façon

significative (augmentation de 15 % et 82 % respectivement). A l'inverse, elle diminue la concentration en ATP (diminution de 17 %). Il est intéressant de noter que le pool total en adénylates des individus injectés AICAR est plus important de 5,85 % que celui des individus témoins, bien que cette différence ne soit pas significative.

La privation de nourriture n'affecte pas significativement la teneur en nucléotides (Figure 29. B). Cependant, le pool total en adénylates des individus à jeun est inférieur d'environ 7,16 % à celui des individus témoins. Le ratio AMP:ATP a été modulé à la fois par les injections d'AICAR et par la privation de nourriture. Les individus injectés avec une dose de 500 mg/kg d'AICAR voient leur ratio augmenter de 120 % par rapport aux individus témoins et le ratio des individus à jeun est augmenté de 53 %.

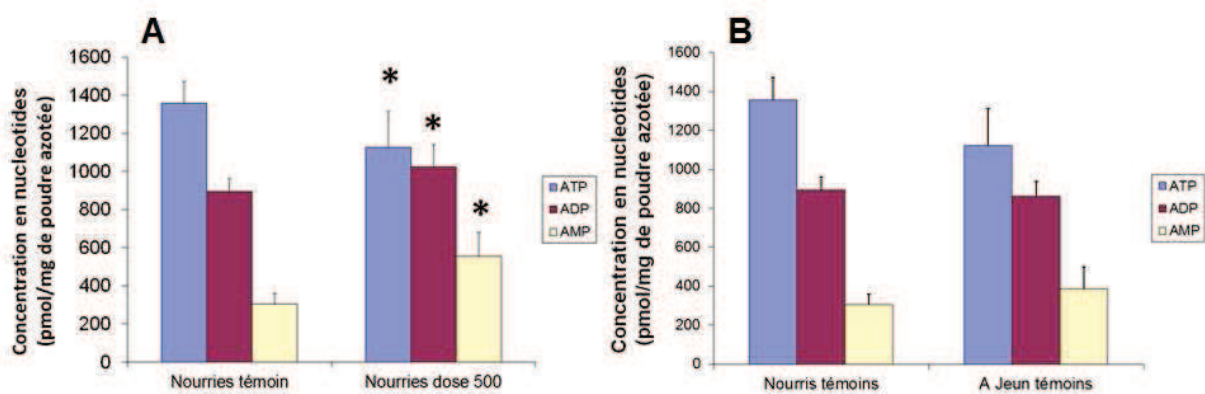


Figure 29 : Moyenne des concentrations en nucléotides exprimée en pmol par mg de poudre azotée. (A) Effet de l'injection d'AICAR chez des individus nourris. (B) Effet de la privation de nourriture. Les écarts-types sont représentés par les barres d'erreur. Les astérisques (*) indiquent une différence significative par rapport aux témoins.

III.5. Recherche de corrélations entre les différents paramètres étudiés

Une matrice de corrélation de Pearson a été calculée avec des valeurs ajustées par correction de Holm-Bonferroni afin de déterminer la relation entre toutes les variables mesurées parmi les animaux prélevés au temps final de l'expérimentation (temps 2 ; 52^{ème} jour de conditionnement) : les huîtres nourries injectées avec de l'eau de mer (appelés « Nourries témoins »), les huîtres à jeun injectées avec de l'eau de mer (appelées « À jeun témoins »), les huîtres nourries injectées avec de l'AICAR à forte dose 500 mg/kg (appelées « Nourries dose 500 »). En utilisant la correction stricte de Holm-Bonferroni, aucune corrélation significative entre les différents paramètres mesurés n'a été conservée. En excluant la correction de Holm-Bonferroni, deux corrélations significatives apparaissent entre l'aire gonadique et le glycogène ($p = 0,069$) et entre l'ADP et l'AMP ($p = 0,0042$).

IV. Discussion

IV.1. Effet du jeune

Gamétogenèse et effort de reproduction

Chez les huîtres à jeun témoins, l'aire gonadique moyenne ne dépasse pas les 7 % et la grande majorité des huîtres reste au stade indifférencié. Ces observations sont en accord avec Enriquez-Diaz, 2004 qui a montré que l'investissement reproducteur était corrélé à la nourriture disponible (Enriquez-Diaz, 2004). Il est possible que les réserves en glycogène réalisées préalablement par les huîtres aient été utilisées comme support énergétique pour la survie mais également pour l'amorce d'une gamétogenèse qui a pu être observée chez certaines de ces huîtres. En effet, plusieurs huîtres à jeun témoins ont été observées à différents stades de gamétogenèse plus ou moins avancés avec en corollaire de faibles aires gonadiques. Malgré la privation de nourriture, responsable du faible investissement reproducteur observé, les huîtres ont été placées à une température idéale de 19°C facilitant le développement de la gamétogenèse (Chavez-Villalba et al., 2002).

Modulation de l'activité AMPK par le jeun

Concernant la modulation physiologique d'AMPK par la privation de nourriture que nous n'avons pas observée ici chez l'huître, les conclusions de plusieurs études divergent. Il semblerait que la réponse au jeûne soit transitoire, dépendante du temps, dépendante de l'organe et de l'espèce (de Lange et al., 2006). Par exemple, un jeûne de 24 h induit une activation d'AMPK dans le foie (Munday and Hardie, 1984; Witters et al., 1994) et le cœur de rat (Clark et al., 2004), mais pas dans le muscle soléaire du rat (Kaushik et al., 2001) ni dans le muscle gastrocnémien de la souris (Gonzalez et al., 2004). Il est possible que l'AMPK dans la gonade de l'huître ne soit pas sensible au jeûne induit ici compte tenu du fait que les huîtres sont capables de survivre plus de 400 jours sans apport nutritif (Whyte et al., 1990) et potentiellement capable de diminuer leur métabolisme lors de stress (Sokolova et al., 2012).

Ces résultats pourraient laisser penser que le dosage de l'activité ne serait pas optimal dans notre modèle. Plusieurs biais techniques pourraient être soulevés au cours de ces expérimentations. En effet, même si nous nous sommes attachés à prélever de façon rapide en condition azotée les tissus, il est toujours possible que le prélèvement n'ait pas été assez rapide pour préserver l'état phosphorylé de l'AMPK. De plus, les prélèvements 24 h après les dernières injections pourraient être trop distants, permettant à l'activité AMPK de retrouver son niveau physiologique de phosphorylation. Enfin, faute à une confirmation de la corrélation des

estimations de l'activité par dosages directs et indirects chez *C. gigas*, il n'est pas à exclure que la quantification indirecte de l'activité par la phosphorylation du résidu Thr172 ne témoigne pas de l'activité directe de l'AMPK. Une explication plus précise de cette constatation a été réalisée plus tôt dans ce manuscrit (cf. Deuxième chapitre : Régulation sexe-spécifique de l'AMPK, partie II.2).

IV.2. Effets de l'AICAR

Modulation de l'activité AMPK par l'AICAR

Chez l'huître, huit injections chroniques d'AICAR à la dose de 500 mg/kg n'ont pas permis d'observer une augmentation significative de la quantité de phosphorylation du résidu Thr172 situé sur la sous-unité α de l'AMPK. Afin d'observer des possibles modifications phénotypiques, les concentrations utilisées au cours de l'expérimentation ont été adaptées de protocoles d'injections intrapéritonéales et intramusculaires chez le rat. Par exemple, des injections intramusculaires chroniques ont été réalisées chez le rat pendant 28 jours (Jorgensen et al., 2007). Ainsi, au cours de cette expérience, le composé AICAR a été injecté à la dose de 500 mg/kg tous les 2 jours durant les 6 premiers jours, puis tous les jours durant le reste de l'expérimentation. Plusieurs prélèvements ont été effectués, systématiquement 24 h après une injection. Des injections intrapéritonéales de 250 mg/kg d'AICAR chez le rat, 3 fois par jour pendant 8 jours ont été suivies de prélèvements réalisés 12 à 16 heures après la dernière injection (Nakano et al., 2006). Ces expérimentations ont permis de confirmer que le calendrier des injections et les doses choisies dans notre protocole pourraient être efficaces sur notre modèle. De plus, afin de réaliser ces injections chroniques, nous nous sommes basés sur les protocoles d'injections d'ARN interférents menées sur *C. gigas* au sein du laboratoire qui ont démontré une diffusion du produit injecté dans toute la gonade (Fabioux et al., 2009). Une injection hebdomadaire sans anesthésie de volumes avoisinant les 300 μ L a ainsi été jugée comme étant le meilleur compromis pour ne pas induire des effets stressant supplémentaires.

Les huîtres ont été meulées à la jointure des deux valves, dans une région permettant des injections directes dans la région gonadique et donc de ne pas anesthésier les huîtres. Plusieurs raisons expliquent la non-utilisation de techniques d'anesthésie dans notre expérimentation. Un protocole d'anesthésie simple et reproductible utilisant une balnéation dans du chlorure de magnésium a été développé pour *C. gigas* au sein du laboratoire de physiologie des invertébrés (Suquet et al., 2009). Les auteurs de cette étude soulignent la possibilité que des expositions répétées à l'anesthésie au chlorure de magnésium puissent provoquer des effets secondaires. De plus, une potentielle réaction croisée entre les deux composés abiogènes n'est pas à exclure

(Romano et al., 2005). En effet, l'AICAR a été caractérisée comme stimulant la voie de signalisation énergétique AMPK (Corton et al., 1995), tandis que le chlorure de magnésium provoque une anesthésie et donc un ralentissement du métabolisme (Suquet et al., 2009).

Il serait possible qu'au cours de notre expérimentation, la stimulation par AICAR sur l'activité AMPK se déroule de manière brève au moment de l'injection et ne dure pas suffisamment longtemps pour observer une augmentation de la phosphorylation en Thr172 après 24 heures (durée entre la dernière injection et le prélèvement). Il a été démontré dans le muscle squelettique de souris que l'activité de l'AMPK était retombée à un niveau basal, quelques heures après une injection simple d'AICAR (Jorgensen et al., 2007; Nakano et al., 2006). De plus, le protocole d'injection a été adapté d'expériences d'injection d'ARN interférents menés sur l'huître creuse (Fabioux et al., 2009). Les limites principales de cette méthode résident dans le manque de reproductibilité des injections d'une huître à l'autre. Le produit peut être excrété rapidement ou peut avoir une très faible pénétration dans les tissus comme montré avec l'utilisation d'ARN double brins (Shim and Kwon, 2010). Même si les variances au niveau de la phosphorylation du résidu Thr172 entre les conditions nourries témoins et nourries dose 500 ne sont pas significativement différentes (ANOVA $F = 0,50$; $p = 0,4896$), ces raisons pourraient expliquer pourquoi l'injection de l'AICAR n'a aucun effet physiologique observable. En plus de l'excrétion et de la faible pénétration, il est aussi envisageable que l'AICAR ne se comporte pas de la même façon chez *C. gigas* par rapport aux autres espèces modèles. La présence de deux isoformes de l'adénosine kinase (numéros GenBank : EKC31015 et EKC26322), responsables de la transformation de l'AICAR en ZMP (Vincent et al., 1996), laisse penser que la transformation de l'AICAR en ZMP est réalisable dans cette espèce. Cependant, la diffusion et le devenir de l'AICAR au sein de l'huître creuse n'a pas encore été étudiée. L'AICAR pourrait par exemple être marqué par radioactivité (Allegra et al., 1987; Atkins et al., 1982; Mauser et al., 1985), afin de pouvoir suivre sa diffusion et mesurer son temps de rétention dans l'huître. Il serait aussi possible de vérifier l'efficacité des injections d'AICAR en mesurant la concentration en ZMP par HPLC (Corton et al., 1995). Une évaluation du comportement de l'activité de l'AMPK pendant un temps court (de 0 à 24 h) après injection ponctuelle d'AICAR pourrait être réalisée grâce à une cinétique de phosphorylation de la Thr172. Cette étude permettrait de valider l'efficacité de l'AICAR à stimuler l'AMPK chez l'huître creuse et de calculer le temps de maintien de l'activité AMPK après une stimulation par AICAR. Enfin, une étude *in vitro* sur des lignées cellulaires d'huîtres ou de bivalves marins serait une piste intéressante pour mieux comprendre la modulation de l'AMPK par des composés exogènes tels qu'AICAR. En effet, les lignées cellulaires permettent des approches rapides sur du matériel abondant et standardisé avec une grande maîtrise des conditions expérimentales autorisant ainsi l'étude de mécanismes

physiologiques de manière directe. Cependant, aucune lignée cellulaire stable n'a pu être développée chez les bivalves, seules des primo-cultures de plusieurs tissus pendant 14 jours sont possibles (Quinn et al., 2009).

Quoiqu'il en soit, même si une stimulation de l'AMPK par AICAR pourrait être suspectée mais non observée ici pour les raisons évoquées dans le paragraphe précédent, aucun phénotype que ce soit reproducteur ou énergétique n'a semblé être profondément impacté par le composé AICAR et encore moins par une éventuelle stimulation d'AMPK non détectée (voir discussion des paragraphes suivants).

Gamétogenèse et effort de reproduction

L'estimation de l'aire gonadique témoigne de l'investissement reproducteur. L'injection d'AICAR à la dose 500 mg/kg dans la gonade chez les huîtres nourries n'a modifié ni l'investissement reproducteur, ni le développement de la gonade en comparaison aux huîtres nourries témoins (c'est-à-dire sans injection d'AICAR mais dans les mêmes conditions). En effet, les huîtres nourries témoins et nourries injectées à 500 mg/kg d'AICAR se trouvent majoritairement en stade de maturité (stade 3) au 52^{ème} jour de conditionnement. De plus, aucun changement significatif du ratio femelle/mâle n'a été observé alors que les injections ont commencé lors du stade de repos sexuel (stade 0), stade où le genre sexuel n'est pas encore déterminé. Nous avons eu l'occasion de démontrer lors du chapitre précédent qu'au cours d'un cycle annuel en milieu naturel, la phosphorylation en Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK est régulée de façon sexe-spécifique. Une baisse significative de la phosphorylation en Thr172 chez les femelles de stade 3 est observée par rapport aux femelles des autres stades (0, 1 et 2) et par rapport aux mâles de stade 3. Notre étude en milieu contrôlé montre que les niveaux de phosphorylations de la Thr172 sont significativement plus forts chez les mâles que chez les femelles en stade 3 de gamétogenèse pour toutes les huîtres ayant été nourries et ayant donc réalisé une gamétogenèse. Cette observation confirme les résultats observés lors de l'étude précédente.

Les estimations des aires gonadiques, témoins de l'effort de reproduction, ne montrent pas de différences significatives après injection d'AICAR suggérant que la reproduction n'a pas été impactée par l'injection du composé abiogène. Il est possible que l'absence de différences phénotypiques observées soit liée au fait que la phosphorylation en Thr172 ne soit modifiée que de façon ponctuelle due à une action brève d'AICAR. De plus, comme démontré au cours d'un cycle annuel, la phosphorylation en Thr172 pourrait être à son maximum tout au long de la gamétogenèse, à l'exception du stade de maturité (stade 3) chez les femelles où l'accumulation de réserves observées passerait par une extinction du signal AMPK. Les « pulses » que

représenteraient les injections hebdomadaires ne modèleraient donc pas plus un système déjà à son maximum d'activité ou sinon auraient une action trop faible dans le temps pour obtenir un phénotype sur la gamétogenèse. De plus, l'AMPK a été caractérisée pour jouer un effet sur la qualité des gamètes émis : chez les femelles, au niveau du GVBD ainsi que la mise en place du vitellus et chez les mâles dans la structure et la motilité des spermatozoïdes. Étant donné que la stimulation de l'AMPK par l'AICAR ne semble pas avoir modifié la quantité de gamètes produits. Il serait intéressant d'étudier si cette stimulation a modifié la qualité des gamètes. Plusieurs techniques ont été développées récemment au sein du laboratoire de physiologie des invertébrés pour estimer la qualité des gamètes produits par *C. gigas*. Ainsi, des prélèvements d'ovocytes et de spermatozoïdes exposés de façon répétée à un agent stimulant l'activité AMPK pourraient être examinés qualitativement et quantitativement par des analyses de protéines impliquées dans la qualité des ovocytes (Corporeau et al., 2012) ou des mesures biométriques, telles que la motilité des spermatozoïdes (Suquet et al., 2010).

Le premier temps de prélèvement devra également être pris en compte pour quantifier l'effet d'AICAR sur la phosphorylation en Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK à plus court terme. Ceci afin de rechercher, par exemple, que les effets de l'AICAR n'induisent pas une modification de la cinétique de gamétogenèse. En effet, les huîtres nourries injectés à 500 mg/kg et les huîtres témoins se trouvaient quasiment toutes en stade final de gamétogenèse. Aucun indice sur la vitesse d'accomplissement de cette de maturation n'est donc pour l'instant disponible et l'analyse du premier temps de prélèvement permettrait potentiellement de répondre à cette question.

Mortalités et modulation du pool des adénylates

La privation de nourriture combinée aux injections chroniques d'AICAR à la dose 500 mg/kg semble avoir induit des effets délétères chez l'huître pouvant conduire à la mort. La sévérité des effets entraînés est liée à la concentration d'AICAR injectée puisque le taux de mortalité est plus important à la dose 500 mg/kg qu'à la dose 100 mg/kg. Les observations histologiques ne montrant aucune figure de nécrose, les mortalités ne semblent probablement pas associées à un effet toxique du composé. Si l'AICAR avait un effet toxique comme il a pu être suggéré précédemment *in vitro* (Ayasolla et al., 2005; Lopez, 2008; Rebora et al., 2005), des mortalités auraient été observées chez les individus nourris injectés à la dose de 500 mg/kg, ce qui n'est pas le cas dans cette étude. Cependant, pour faire face à des stress trop importants, l'huître pourrait ralentir une partie de son métabolisme et ainsi ralentir ou annuler la dégradation de l'AICAR, qui s'accumulerait dans les tissus. Ce ralentissement métabolique a déjà été caractérisé chez plusieurs espèce de bivalves (Larade and Storey, 2007; Sokolova et al., 2012;

Storey, 1993; Storey and Storey, 1990). Ainsi, si le composé AICAR n'était pas dégradé, huit injections à 500 mg/kg, donneraient en cumulé 4 000 mg/kg. Cette dose dépasserait les doses létales médianes (DL50) (Trevan, 1927) de l'AICAR déjà décrites uniquement par prise orale chez des espèces vertébrées. La DL50 de l'AICAR a été estimée à 3 200 mg/kg chez le lapin, 980 mg/kg chez le rat et à 300 mg/kg chez la souris (ClearSynth ®, données personnelles : <http://www.clearsynth.com/docs/MSD-CS-T-01235.pdf>).

Il est possible qu'AICAR, connu pour stimuler une déplétion d'énergie chez d'autres organismes, puisse pousser l'huître à mobiliser ses réserves énergétiques. Chez les huîtres nourries, les injections d'AICAR à la dose 500 mg/kg ont conduit à une augmentation du ratio AMP:ATP de 120 % par rapport aux témoins. L'AICAR semble donc avoir permis, chez l'huître, la création de conditions favorables à une activation de l'AMPK. Par ailleurs, le pool total des adénylates (ATP, ADP et AMP) des individus injectés à la forte dose d'AICAR est légèrement supérieur à celui des individus témoins. Cela pourrait s'expliquer par une adaptation de l'huître face à une déplétion en énergie éventuellement induite par AICAR. L'huître augmenterait son potentiel énergétique en gonflant son pool de nucléotides.

Depuis plusieurs années, l'AICAR a été largement utilisé *in vitro* et *in vivo* pour activer l'AMPK. Cependant, il a été démontré que l'AICAR pourrait avoir des effets sur d'autres cibles que l'AMPK, principalement sur des enzymes régulant l'AMP et les phosphorylations oxydatives de la mitochondrie (Guigas et al., 2007; Longnus et al., 2003; Shang and Lehrman, 2004; Vincent et al., 1992; Vincent et al., 1991). L'utilisation d'activateurs ou d'inhibiteurs plus spécifiques de l'AMPK permettrait de mieux définir son rôle dans la gestion de l'énergie chez l'huître. De plus, une stimulation de l'activité de l'AMPK par l'AICAR a été décrite comme augmentant les capacités de production d'ATP en stimulant la biogenèse mitochondriale. Il serait intéressant de mettre en évidence cet effet par l'étude du niveau d'expression de gènes traduisant une activité mitochondriale telle que l'expression des gènes codant les enzymes du cycle du citrate (malate ou succinate déshydrogénase, ALA synthase), de la chaîne du transport d'électron (cytochrome c) ou encore de l'oxydation des acides gras (Winder et al., 2000).

Les huîtres maintenues à jeun et à 19°C, ne disposent que de leurs réserves effectuées avant l'expérimentation. Il est donc possible que l'effet cumulatif d'un manque d'apport en nutriments par l'alimentation (À jeun), d'une température favorisant la gamétogenèse (19°C) et de la stimulation d'une déplétion en énergie (AICAR) induit un catabolisme trop important allant jusqu'à l'épuisement des réserves énergétiques et pouvant conduire à la mort. Ces résultats tendent à démontrer qu'AICAR a induit une activité catabolique chez l'huître. Au contraire, les huîtres nourries et injectées à la même dose de 500 mg/kg d'AICAR ne subissent pas de

mortalité, car l'alimentation constituerait l'apport en nutriments et/ou en réserves pour supporter le catabolisme imposé par AICAR.

Tous ces résultats tendent à démontrer que l'activation chronique d'AMPK ne perturberait pas les processus de gamétogenèse mâle ou femelle, les gamètes se développent et peuvent aller jusqu'à la maturité. Il semblerait ici que l'AMPK n'ait aucun rôle direct dans la gamétogenèse. En effet, le knock-out du gène codant pour la sous-unité α n'a pas perturbé la gamétogenèse chez la souris mâle (Tartarin et al., 2012). En revanche, cette inhibition a perturbé la qualité des spermatozoïdes et donc la fertilité (Tartarin et al., 2012).

Au cours de cette étude, plusieurs conditions n'ont pas encore été analysées. Des études sur les échantillons du premier temps de prélèvement (10 jours de conditionnement) permettront d'estimer si l'injection d'AICAR a pu provoquer des modifications à plus court terme, notamment sur la cinétique de la gamétogenèse.

V. Conclusions

Cette étude est la première étude fonctionnelle d'une voie de signalisation par injection *in vivo* d'un composé abiogène chez l'huître creuse. Cette étude fonctionnelle de l'AMPK a été réalisée en utilisant une approche physiologique (jeûne, nourriture), Une approche pharmacologique par injection du composé chimique AICAR. Plusieurs changements physiologiques ont été observés tels qu'une mortalité augmentée de façon dépendante de la dose injectée d'AICAR chez les huîtres placées à jeun et une augmentation significative des concentrations en ATP, ADP et AMP liée à l'injection d'AICAR chez les huîtres nourries. Ces deux effets traduisent une possible action de l'AICAR sur la physiologie de l'huître. L'AICAR a été caractérisé comme étant un composé stimulant l'activité AMPK. Cependant, les premiers résultats analysés montrent que l'injection d'AICAR n'a pas permis d'observer un changement significatif du niveau de phosphorylation du résidu Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK. Plusieurs explications et perspectives d'études ont été présentées au cours de la discussion, soulevant la nécessité de mieux cerner le devenir et l'action de l'AICAR dans l'huître et en particulier sa relation avec l'AMPK.

Discussion générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

L'huître creuse *C. gigas* a commencé à être cultivée au cours du XVIIe siècle dans la baie d'Hiroshima au Japon. Ses qualités organoleptiques et ses caractéristiques exceptionnelles de croissance ont favorisé la culture de *C. gigas* par rapport à celles d'autres espèces d'huîtres présentes dans cette baie (Fujiya, 1970). Cette croissance rapide couplée à sa capacité importante de reproduction (Pauley et al., 1988) et son large spectre d'adaptabilité à divers biotopes (Grizel, 1996b) ont favorisé *C. gigas*, après plusieurs vagues d'importations volontaires ou accidentelles, à se développer sur de nombreux littoraux dans le monde (Miossec et al., 2009). Ces importations ont permis cette espèce à devenir à certains endroits une espèce cultivée principalement pour les mêmes raisons qui lui ont permis d'être cultivée initialement en Baie d'Hiroshima. Au fil des siècles, *C. gigas* est devenue l'espèce de coquillage la plus cultivée dans le monde. Ce quasi-monopole d'élevage ostréicole et de commerce associé sont des raisons qui ont soutenu une recherche intensive sur l'huître *C. gigas*. L'huître est également particulièrement intéressante au niveau phylogénétique puisqu'elle appartient aux mollusques bivalves, comportant plus de 12 000 espèces, au sein du groupe des Lophotrochozoaires (annélides, mollusques, plathelminthes), groupe peu documenté au niveau biologique et génomique. De nombreux autres intérêts, notamment physiologiques et écologiques, font de *C. gigas* un modèle invertébré marin très étudié. L'huître creuse est un organisme sessile qui possède une physiologie adaptée aux changements de condition environnementale. En milieu tempéré, cette espèce opportuniste invasive possède un cycle de reproduction saisonnier principalement influencé par la température et la nourriture. Cette espèce hermaphrodite protandre alternative irrégulière possède une très forte fécondité caractéristique des stratégies de reproduction de type « r ». Les huîtres ont enfin un intérêt en tant qu'espèce sentinelle de l'environnement, dans les habitats marins côtiers et estuariens, où la perturbation des écosystèmes est observée et dont l'origine est majoritairement anthropique.

En milieu tempéré, l'huître fait face aux variations du milieu environnant en constituant des réserves énergétiques qui seront utilisées afin de maintenir son métabolisme pendant les périodes de faible approvisionnement en nutriment et pour initier la gamétogenèse (Kennedy, 1996). Chez cette espèce, une forte relation existe entre la nourriture, les réserves et la reproduction (Berthelin et al., 2001; Fabioux, 2004; Jouaux, 2010; Kennedy, 1996).

L'AMPK, est une kinase très conservée chez les eucaryotes qui a été caractérisée comme étant sensible à de nombreux stimuli biologiques lui permettant de jouer le rôle de détecteur de l'énergie. D'un autre côté, cette kinase possède un rôle de régulateur dynamique de la gestion de

l'énergie en modulant de nombreuses voies métaboliques aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organisme entier (Carling, 2004).

Les objectifs de cette thèse de doctorat étaient de caractériser et de décrire les éléments appartenant à la voie de signalisation énergétique AMPK chez l'huître creuse *C. gigas* et de comprendre leur implication dans la gestion de l'énergie en ayant une attention particulière sur le rôle que cette kinase pourrait avoir au cours de la gamétogenèse.

I. Caractérisation du système AMPK chez *C. gigas*

I.1. Conservation des sous-unités

La kinase AMPK possède une structure composée par la liaison de trois protéines différentes entre elles : une sous-unité catalytique α et deux sous-unités régulatrices β et γ . Cet assemblage trimérique est essentiel à son activité et à sa stabilité (Carling, 2004; Dyck et al., 1996). Chaque sous-unité possède des domaines structuraux caractéristiques très conservés entre les espèces qui permettent à l'AMPK d'être sensible à de nombreux stimuli et d'exercer son activité de régulation de l'énergie. Des orthologues de chacune des sous-unités ont été caractérisés chez l'huître creuse *C. gigas*.

L'utilisation d'oligonucléotides spécifiques placés en positions 5' et 3' a permis de détecter par PCR trois isoformes de la sous-unité catalytique exprimées en ARN messagers. Une sous-unité α de 1 647 paires de base codant une protéine de 62 kDa théorique α a été décrite. Cette taille correspond à la taille observée chez de nombreuses espèces. Cette sous-unité α entière a conservé les domaines caractéristiques de cette protéine tels que le domaine de liaison aux sous-unités β et γ , et le domaine kinase. Ce dernier a montré une conservation du résidu Thr172 et entourant ce résidu, des motifs caractéristiques des sites de phosphorylation dans les kinases (Asp-Phe-Gly et Ala-Pro-Glu). Deux autres sous-unités α plus petites de 1 212 et 1 284 paires de bases codant pour des protéines de 46 kDa et 48 kDa ont été caractérisées. Ces deux isoformes courtes sont issues d'épissage alternatif du gène codant pour la sous-unité α entière. Elles sont tronquées au niveau d'une grande partie de leur domaine kinase, et en particulier du site de phosphorylation situé en Thr172.

Lors de recherches effectuées dans les bases de données et notamment dans les séquences du génome de l'huître, une seule isoforme de chacune de ces sous-unités de l'AMPK a pu être trouvée. Dans les séquences du génome de l'huître, la sous-unité α trouvée précédemment grâce à l'utilisation d'oligonucléotides a ainsi pu être de nouveau caractérisée. Pour les sous-unités β et γ , la description des domaines conservés et l'étude phylogénétique ont permis d'affilier ces sous-unités à des orthologues déjà décrits. La sous-unité β a été caractérisée comme étant plus proche

des isoformes $\beta 2$ décrites chez les autres espèces. Chez cette sous-unité, deux domaines caractéristiques importants sont conservés : le domaine de liaison aux carbohydrates (CBM) et le domaine de liaison aux sous-unités α et γ . L'affiliation de la sous-unité γ aux autres orthologues est principalement liée aux homologies de séquences placées en position N-terminale, région décrite comme étant la plus variable entre les isoformes $\gamma 1$, 2 et 3. L'analyse phylogénétique a permis d'affilier la sous-unité γ de l'AMPK au groupe des isoformes $\gamma 2$. Chez cette sous-unité γ , les quatre domaines de liaison aux adénylates (CBS) spécifiques de cette sous-unité ont été caractérisés.

La sous-unité γ de l'AMPK permet de déterminer l'énergie disponible dans la cellule grâce à des liaisons compétitives de l'AMP et l'ATP au niveau des domaines CBS (Cheung et al., 2000). Ce mécanisme de sensibilité permet une régulation allostérique du complexe AMPK. Ces domaines CBS ne sont pas exclusifs à la sous-unité γ de l'AMPK. Ils peuvent se retrouver dans de nombreuses protéines (Ignoul and Eggermont, 2005) aussi bien chez des organismes eucaryotes que procaryotes (Bateman, 1997). La forte conservation des mécanismes de liaison des nucléotides observée chez plusieurs protéines appartenant au groupe des Archaea, micro-organismes unicellulaires procaryotes, a récemment conduit à supposer qu'un système de sensibilité et de régulation de l'énergie de type AMPK pourrait exister chez les procaryotes (Gomez-Garcia et al., 2010; King et al., 2008). Cependant, pour l'instant seules des protéines ayant une structure similaire à la sous-unité γ ont été trouvées chez ces êtres vivants anucléés, laissant suggérer que la structure de type « sous-unité γ » serait la forme ancestrale de sensibilité à l'énergie dans la cellule. Des mutations dans la séquence de la sous-unité γ ont été caractérisées comme étant impliquées dans plusieurs maladies héréditaires humaines (Arad et al., 2002; Blair et al., 2001; Scott, 2004). La meilleure compréhension du fonctionnement de ces sous-unités γ et principalement aux niveaux des différences observées entre les espèces permettrait d'ouvrir de nouvelles voies dans le traitement de ces maladies, ou plus globalement dans le traitement des maladies où l'apport en énergie est crucial (Motoshima et al., 2006; Viollet et al., 2010). L'huître creuse peut faire face à des variations importantes des paramètres physico-chimiques du milieu et a su adapter avec succès sa physiologie en conséquence. Une caractérisation approfondie du rôle de la sous-unité γ ainsi qu'une recherche de toutes les protéines comportant des domaines CBS dans l'huître creuse permettrait possiblement de mieux comprendre le fonctionnement de cette catégorie de protéines dans la gestion de la sensibilité de l'énergie aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes.

I.2. La voie de signalisation AMPK chez *C. gigas*

La kinase AMPK se trouve au centre d'un véritable réseau fortement ramifié et contrôlant toute une grande partie du métabolisme énergétique. L'AMPK se trouve ainsi en relation avec de nombreuses protéines impliquées dans les métabolismes lipidiques, glucidiques et protéiques (Carling, 2004). L'augmentation des données génomiques jusqu'à l'arrivée du premier assemblage complet du génome (Zhang et al., 2012a) a permis de caractériser les séquences des gènes appartenant à ces métabolismes chez *C. gigas*. Afin de confirmer l'existence d'une voie de signalisation AMPK chez *C. gigas*, des recherches d'homologies ont été menées dans les bases de données existantes permettant de caractériser la présence des AMPK kinases, de plusieurs cibles importantes de l'AMPK et des AMPK-related kinases.

AMPK kinases

L'activation de l'AMPK exige la phosphorylation du résidu Thr172 situé dans le domaine kinase de la sous-unité α . Cette phosphorylation est réalisée par des kinases appelées AMPK kinases (Hawley et al., 1996). Seules quatre AMPK kinases ont été caractérisées pour l'instant. Une recherche par blast sur les séquences du génome chez *C. gigas* a permis de caractériser plusieurs protéines présentant des similarités avec les AMPK kinases déjà décrites chez les autres espèces :

- La protéine kinase LKB1 (aussi appelée STK11) forme un complexe trimérique avec deux autres protéines STAD et MO25 (Boudeau et al., 2003). Chez *C. gigas*, la kinase STK11 (EKC34679) présente 63 % d'homologie avec la STK11 décrite chez l'homme (NP000446), « STE20-related kinase adapter protein alpha » (OYG_10026400) présente 47 % d'homologie avec la STRAD β décrite chez l'homme (NP061041) et la « Calcium-binding protein 39 » (EKC24327) présente 65 % avec la protéine MO25 décrite chez l'homme (AF113536).
- Une seule kinase appartenant à la famille des CaMKK a été caractérisée : la calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1 (EKC35271). Elle présente 64 % d'homologie avec la CaMKK décrite chez l'homme (AAD04566).
- Une KRS1 (EKC39301) a aussi été trouvée et présente 43 % avec KRS2 humaine (AAQ24226).
- Les recherches d'homologies dans les bases de données du génome pour la kinase TAK1 n'ont pas donné de résultats.

La conservation de ces AMPK kinases confirme que plusieurs activateurs importants de l'AMPK décrits chez de nombreuses espèces existent chez l'huître creuse. Des études visant à

caractériser l'implication de ces différentes AMPK kinases dans l'activation de l'AMPK au cours de stress chez *C. gigas* peuvent être envisagées.

Caractérisation de cibles de l'AMPK

Pour restaurer l'énergie disponible, l'AMPK module de nombreuses cibles impliquées dans les métabolismes lipidiques, glucidiques et protéiques (Carling, 2004). Chez l'huître creuse, les réserves énergétiques, essentiellement constituées par le glycogène et des lipides, constituent des éléments essentiels pour sa survie et sa reproduction. Or, les métabolismes lipidiques et glucidiques ont été caractérisés comme étant fortement modulés par l'AMPK. Afin de décrire la voie de signalisation AMPK chez *C. gigas*, nous nous sommes donc plus particulièrement focalisés sur la caractérisation d'éléments importants impliqués dans ces deux métabolismes connus comme étant régulés par l'AMPK. Au cours des travaux réalisés pendant ce doctorat, les séquences génomiques provenant du premier assemblage du génome n'étaient pas encore disponibles, le génome de *C. gigas* ayant été publié en octobre 2012. Ainsi, ce sont les recherches dans la banque de données GigasDatabase d'EST préalablement générées chez l'huître (Fleury et al., 2009) et dans les bases publiques type GenBank qui nous ont permis de sélectionner plusieurs cibles directes ou indirectes appartenant principalement aux métabolismes glucidiques et lipidiques. Au niveau du métabolisme des lipides, par exemple nous avons caractérisé le NCOA4. Cette protéine joue un rôle essentiel au niveau de l'activité transcriptionnelle de récepteurs nucléaires, comme les récepteurs des androgènes (AR), de l'œstrogène et de la progestérone (Evangelou et al., 2000; Kollara and Brown, 2010; Yeh and Chang, 1996). Au niveau du métabolisme des glucides, nous avons caractérisé la Pi3K et l'AKT responsables de l'entrée du glucose dans la cellule (Farese, 2001; Kirwan and del Aguila, 2003; Tsao et al., 2001). Les nombreuses cibles caractérisées par l'accumulation de données génomiques nous permettent de disposer d'un large éventail de cibles potentielles de l'AMPK chez l'huître. La publication du premier assemblage du génome va permettre de rechercher d'autres cibles connues chez d'autres espèces pour être modulées par l'AMPK. Des études au niveau génomique par microarray ou protéomique par spectrométrie de masse de ces cibles permettront ainsi de mieux caractériser leurs implications dans les voies énergétiques en particulier en relation avec la kinase AMPK. Des analyses sur des échantillons possédant une activité AMPK contrastée permettraient d'identifier les voies de régulation liées à cette kinase.

Caractérisation des AMPK-related kinases

Véritable capteur de l'énergie disponible mais aussi régulateur de l'homéostasie, l'AMPK est vite devenue une kinase d'intérêt pour étudier de nombreux processus physiologiques liés à

l'énergie disponible, en particulier dans des maladies humaines importantes comme le cancer et le diabète. Un nombre restreint de kinases possèdent un domaine catalytique qui présente de fortes homologies avec le domaine catalytique de la sous-unité α de l'AMPK. Cette caractéristique a permis de les regrouper sous le terme d'AMPK-related kinase (AMPK-RK). Dans le génome humain, une recherche d'homologies au niveau du domaine catalytique de la sous-unité α a permis de découvrir plusieurs AMPK-RK (Manning et al., 2002). Cette famille comprend douze protéines : BRSK1, BRSK2, NUAK1, NUAK2, SIK1, SIK2, SIK3, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4 et MELK.

Les principaux activateurs connus de l'AMPK, tels que l'AICAR, la phenformine ou une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire ne semblent pas activer les AMPK-RK (Lizcano et al., 2004; Sakamoto et al., 2004). Une seule exception a été décrite pour la kinase NUAK2 qui est activée par l'AICAR (Lefebvre et al., 2001). Ces résultats indiquent que la modulation de l'activité des AMPK-RK est en partie différente de celle de l'AMPK (Bright et al., 2009). Ainsi, les AMPK-RK ne semblent pas être sensibles aux niveaux intracellulaires des adénosines et de l'ion calcium (Ca^{2+}). Cependant, exceptée la kinase MELK, toutes les AMPK-RK ont été caractérisées comme étant activées par LKB1 (Lizcano et al., 2004). Globalement, ces kinases possèdent la même organisation structurale avec un domaine catalytique placé en position en N-terminale. Il a été démontré *in vitro* que les AMPK-RK phosphorylent les mêmes cibles (peptides SAMS, AMARA et LNR) à des niveaux différents, indiquant que ces enzymes possèderaient une spécificité de substrat *in vivo*. L'association de ces AMPK-RK avec des sous-unités de régulation n'est encore pas clairement définie. Ces caractéristiques laissent à penser que ces AMPK-RK réguleraient les mêmes cibles que l'AMPK en offrant une variation dans la réponse, sûrement dépendant de type de régulation dont elles sont dépendantes.

Une recherche d'homologies de chacun des exons composant la sous-unité α de *C. gigas* a été réalisée dans le génome de l'huître creuse. Seize protéines présentent des fortes homologies avec les exons 2, 3 et 4 (Tableau 6). Ces trois exons appartiennent tous au domaine catalytique de la sous-unité α chez *C. gigas*. Par homologie, plusieurs protéines ont pu être reliées aux AMPK-RK décrites chez les autres espèces : BRSK2, MARK3, une possible MARK-like, MELK, NUAK1, SIK2 et SIK3.

Tableau 6 : Protéines présentant des homologies avec les exons 2, 3 et 4 de la sous-unité α de l'AMPK décrite chez *C. gigas*.

Description	équivalent chez les espèce modèles	Numéro d'accension NCBI	Homologie		
			Exon 2	Exon 3	Exon 4
BR serine/threonine-protein kinase 2	BRSK2	EKC23298	+	+	+
MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	MARK3	EKC37431		+	+
Hormonally up-regulated neu tumor-associated kinase	MARK-like (?)	EKC27908			+
Maternal embryonic leucine zipper kinase	MELK	EKC27344		+	+
NUAK family SNF1-like kinase 1	NUAK1	EKC30027			+
Serine/threonine-protein kinase QSK	SIK3	EKC37439			+
Serine/threonine-protein kinase SIK2	SIK2	EKC26425			+
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta chain		EKC29682			+
Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain, testis/liver isoform		EKC30288			+
serine/threonine-protein kinase Check point kinase 1-like		EKC39820			+
Serine/threonine-protein kinase PLK4		EKC30578			+
SNF-related serine/threonine-protein kinase		EKC35152			+
Testis-specific serine/threonine-protein kinase 1		EKC40939			+
Transcription factor LBX1		EKC18924			+
hypothetical protein CGI_10018149		EKC39731			+
hypothetical protein CGI_10019851		EKC26933			+

La découverte des AMPK-RK ouvre la voie à de nombreuses autres régulations parallèles et/ou complémentaires à l'AMPK sûrement liées à des stimuli différents. Des analyses plus approfondies permettraient de comprendre leurs rôles dans la gestion de l'énergie dans ce modèle.

II. AMPK kinase fonctionnelle chez *C. gigas*

La description des trois sous-unités composant le trimère AMPK chez *C. gigas* a permis de confirmer que ces protéines ont conservé les domaines de liaison entre elles. Le domaine kinase de la sous-unité α est très proche de ceux décrits chez les autres espèces eucaryotes. L'activité de cette kinase est liée à ce domaine kinase qui va par phosphorylations de cibles protéiques, activer les voies productrices d'ATP et inhiber les voies consommatrices d'ATP et permettre ainsi de restaurer l'énergie disponible dans la cellule.

II.2. Distribution tissulaire des sous-unités

Suite à la caractérisation des trois sous-unités de l'AMPK, plusieurs outils de mesure de l'expression au niveau des ARN messagers et des protéines ont été développés. Ces outils ont été utilisés pour réaliser une étude de la distribution tissulaire dans les principaux organes de *C. gigas* au cours d'un stade de repos sexuel (stade 0). Les tissus étudiés sont : branchies, bord de manteau, cœur, glande digestive, manteau, muscle lisse, muscle strié, palpes et ganglions viscéraux.

Au niveau moléculaire, les séquences en acides nucléiques des sous-unités de l'AMPK ont permis le dessin d'oligonucléotides spécifiques. Les efficacités d'amplification de ces oligonucléotides par PCR en temps réel ont été validées, permettant la mise au point de la quantification des ARN messagers. Ainsi, la présence d'ARN messagers des trois sous-unités de l'AMPK a été retrouvée dans l'ensemble des tissus testés sans présenter de différence

significative. Le positionnement des oligonucléotides dans la région conservée du domaine kinase a permis d'estimer uniquement le niveau des ARN messagers de la sous-unité α entière. Hormis la délétion d'une grande partie du domaine kinase, les sous-unités α tronquées ne présentent pas de variations nucléotidiques significatives par rapport à la sous-unité α entière. Une alternative afin de quantifier l'expression de ces sous-unités tronquées serait de réaliser une PCR semi-quantitative en utilisant des oligonucléotides de part et d'autre de la zone tronquée produisant ainsi des amplicons de taille différente entre les variants visualisables et quantifiables sur gel d'agarose (Huvet et al., 2003).

Au niveau protéique, plusieurs anticorps hétérologues ont été testés afin de pouvoir détecter et quantifier la présence des trois sous-unités. À partir des séquences en acides nucléiques à notre disposition, nous avons pu estimer les séquences protéiques associées. Ces séquences protéiques des sous-unités de l'AMPK ont permis de valider la cross-réactivité d'anticorps hétérologues par homologie de leurs épitopes avec la séquence des protéines de l'huître (réalisée par le fabricant Cell Signaling Technology). Dans le cas où le pourcentage de cross-réactivité n'était pas 100 %, les masses moléculaires des signaux obtenus par utilisation d'anticorps hétérologues sur les tissus d'huîtres ont pu être comparées aux masses moléculaires estimées à partir des séquences protéiques. Si la masse observée était semblable à la masse attendue et qu'un seul signal fort était détecté, la cross-réactivité était ainsi validée.

Au niveau de la sous-unité α , deux anticorps donnent un signal à environ 62 kDa : un ciblant la sous-unité α entière et un autre ciblant la phosphorylation en Thr172 de la sous-unité α . La sous-unité α entière a été détectée dans les principaux organes et ne montre pas de différence tissu-spécifique au cours d'un stade de repos sexuel (stade 0). Une variation au niveau de la quantité de phosphorylation de la Thr172 a été observée dans la gonade chez *C. gigas*. Deux autres anticorps ont permis de détecter un signal à environ 45 kDa ciblant les sous-unités α tronquées. À cause de leur taille très proche, les deux sous-unités α tronquées n'ont pas pu être différenciées par Western blot. Les isoformes α tronquées sont exprimées de façon tissu-spécifique, se trouvant fortement exprimées dans le muscle lisse et le muscle strié.

Malgré de fortes homologies de 65 % et 41 % respectivement avec les sous-unités β et γ de l'AMPK humaine, aucun anticorps hétérologue n'a pu être validé pour ces sous-unités. Afin de quantifier les quantités de ces sous-unités, une validation d'autres anticorps hétérologues, ou la création d'anticorps homologues à l'aide des séquences en acides nucléiques, sont envisageables. Néanmoins, le dosage de la phosphorylation du résidu Thr172 ayant été montré comme témoin de l'activité du trimère AMPK, les dosages de la quantité de la sous-unité α et du niveau de phosphorylation en Thr172 demeurent essentiels par rapport aux dosages des sous-unités β et γ .

II.2. Structure du trimère

L'architecture moléculaire précise du trimère AMPK a été définie à partir des orthologues présents dans les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae* (Amodeo et al., 2007; Townley and Shapiro, 2007). Ces premières études de modélisation ont confirmé les observations concernant les interactions possibles entre les différentes sous-unités de l'AMPK. Ces études ont aussi permis de définir de manière précise la façon dont se lient les molécules d'ATP et d'AMP au niveau de la sous-unité γ . Au niveau des sous-unités AMPK de l'huître creuse, plusieurs différences au niveau de résidus de phosphorylation et de domaines structuraux ont été observées par rapport aux sous-unités décrites chez les autres espèces. Ainsi plusieurs résidus de phosphorylation de la sous-unité β n'ont pas été décrits et deux isoformes de la sous-unité α sont tronquées dans le domaine kinase. Les deux isoformes des sous-unités α tronquées ont conservé leur domaine C-terminal permettant la liaison aux autres sous-unités mais ont perdu une grande partie du domaine kinase. Cette perte représente une masse moléculaire d'environ 15 kDa soit environ 24 % de la masse moléculaire de la sous-unité α entière. Même si leurs présences ont été observées au niveau des ARN messagers et des protéines dans plusieurs organes, la stabilité du trimère pourrait être affectée par cette perte de masse. Le doute subsistant quant à la nature observée de la protéine détectée à 45 kDa par Western blot est en cours d'investigation grâce à une approche d'immunoprécipitation, couplée à une analyse de spectrométrie de masse (cf. Premier chapitre : Caractérisation des sous-unités α de l'AMPK chez *Crassostrea gigas* et régulation au cours de l'hypoxie ; partie II.1.). Afin d'étudier si les sous-unités α tronquées ont gardé leurs capacités de liaison aux autres sous-unités β et γ , une production de protéines recombinantes à partir des clones contenant les séquences nucléotidiques des variants α est envisagée. Les ADN complémentaires seront sous-clonés dans un vecteur d'expression, puis transfectés en bactéries compétentes pour tenter de produire les protéines recombinantes. Des études biochimiques d'interaction de type « pull-down assay » entre ces protéines recombinantes et les sous-unités β et γ pourraient être envisagées. De plus, une étude de l'architecture par cristallographie des trimères de l'AMPK chez *C. gigas* permettrait de comprendre les liaisons entre elles et le possible rôle physiologique des sous-unités α tronquées. Le rôle des troncations issues d'épissage alternatif n'a été que très peu étudié chez les kinases. Une hypothèse du rôle des sous-unités α tronquées au cours de l'hypoxie dans le muscle lisse a été soulevée : ces formes tronquées de la sous-unité α exerceraient une compétition pour la liaison aux sous-unités régulatrices β et γ . Cette compétition permettrait aux sous-unités α tronquées d'agir en tant que régulateur transdominant négatif de la fonction exercée par la kinase entière. Un phénomène similaire a été récemment démontré *in vivo* avec l'implication d'une protéine tronquée au niveau

de son domaine kinase comme étant un régulateur transdominant négatif de la protéine entière (Noy et al., 2012).

La recherche d'isoformes dans la première version du génome publiée en octobre 2012 a permis de caractériser la présence d'une seule isoforme de chacune des sous-unités composant le trimère AMPK. Il n'est cependant pas à exclure la présence d'autres isoformes. Chez de nombreuses espèces où l'AMPK a été caractérisée, les gènes codants pour les sous-unités de l'AMPK sont polymorphes. En règle générale, ces espèces possèdent au moins deux isoformes entières de la sous-unité α et de la sous-unité β et trois isoformes de la sous-unité γ . La première version du génome de *C. gigas* a permis de caractériser un génome très polymorphe et riche en séquences répétées (Zhang et al., 2012a). Dans les premières versions publiées de génomes, de nombreux contigs subsistent et certains assemblages de régions peuvent être incorrects (Chain et al., 2009; Zhang et al., 2012b). La création de nouvelles versions améliorées du génome de *C. gigas* ainsi que l'apport d'analyses de protéomique pour l'annotation génomique, domaine en plein essor appelé « protéogénomique » (Jaffe et al., 2004; Shevchenko et al., 1996), permettra d'améliorer la qualité de l'assemblage et potentiellement d'observer la présence d'autres isoformes des sous-unités de l'AMPK chez *C. gigas*. Si d'autres isoformes venaient à être découvertes, des études plus approfondies seraient nécessaires, en particulier pour définir leurs localisations et leurs rôles dans la gestion de l'énergie chez *C. gigas*.

II.3. Estimation de l'activité de l'AMPK

L'assemblage trimérique et la présence du résidu Thr172 sur la sous-unité α sont tous les deux essentiels à l'activité et à la stabilité de l'AMPK (Carling, 2004; Dyck et al., 1996; Stein et al., 2000). Chez *C. gigas*, les trois sous-unités composant l'AMPK existent. De plus, des analyses *in silico* ont caractérisé les conservations des domaines spécifiques de ces protéines tels que le résidu Thr172 de la sous-unité α et les domaines de liaison entre les sous-unités. En utilisant plusieurs conditions connues pour moduler l'activité de l'AMPK, nous avons réussi à quantifier une activité de cette kinase chez l'huître creuse.

Plusieurs méthodes plus ou moins directes d'estimation de l'activité AMPK existent. La quantification de l'activité en ciblant la phosphorylation du résidu Thr172 permet d'estimer de façon indirecte une activité totale de cette kinase en s'affranchissant du potentiel polymorphisme des sous-unités α . C'est principalement pour cette raison que nous avons choisi cette technique afin d'estimer l'activité totale AMPK chez l'huître creuse (cf. « Deuxième chapitre : « Régulation sexe-spécifique de l'AMPK », partie II.2). Au cours de ce doctorat, une mesure directe de l'activité AMPK a aussi été développée. Cette mesure consiste en l'estimation de l'incorporation d'un groupement phosphore radioactif (^{32}P) sur un motif peptidique spécifique

(SAMS). Cette technique s'est avérée opérationnelle sur le témoin positif « cerveau de rat » mais a montré des biais sur les échantillons d'huîtres. En effet, une répétabilité moyenne probablement due à des niveaux faibles de radioactivité a été observée dans les tissus de l'huître en comparaison au cerveau de rat. Ces faibles niveaux pourraient simplement provenir d'un manque d'adaptabilité du protocole aux tissus de l'huître, protocole qu'il faudrait donc améliorer. Il n'est pas à exclure que ces faibles signaux pourraient aussi traduire une faible activité d'AMPK dans les tissus de l'huître par rapport aux modèles vertébrés ayant fait l'objet d'investigation. Cette idée, suggère un fonctionnement potentiellement différent chez l'huître par rapport à ce qui est connu chez les vertébrés.

III. Implication de l'AMPK dans la gestion de l'énergie

La kinase AMPK est une enzyme qui permet de maintenir l'homéostasie énergétique, d'une part en stimulant les voies productrices d'ATP et d'autre part en inhibant les voies consommatrices d'ATP (Hardie and Hawley, 2001; Hardie et al., 2006; Kahn et al., 2005). Ces caractéristiques font que cette kinase agit comme un véritable chef d'orchestre de la gestion de l'énergie en étant impliquée dans de nombreuses voies métaboliques. En utilisant plusieurs conditions connues pour moduler l'activité de l'AMPK, telles que l'hypoxie, le jeûne et l'injection du composé pharmacologique AICAR, nous avons étudié la réponse de cette kinase et sa voie de signalisation chez l'huître creuse. Au cours de ces modulations, des recherches de modifications physiologiques ont été réalisées afin de de cerner le rôle d'AMPK chez l'huître creuse.

III.1. Rôle des sous-unités α tronquées

Au cours d'une expérience de conditionnement à l'hypoxie, dès les premières heures d'exposition, nous avons pu caractériser dans le muscle lisse une augmentation significative des sous-unités α tronquées par rapport aux témoins placés en normoxie. En comparaison aux témoins, la sous-unité α entière, n'a quant à elle pas montré de changement significatif, tout au long du conditionnement hypoxique.

La caractérisation et la mise en évidence d'une régulation de ces sous-unités tronquées n'ont jamais été décrites lors d'études sur l'AMPK chez les autres modèles. Ces sous-unités α tronquées ont été surtout caractérisées dans les tissus musculaires de l'huître laissant suggérer que leur existence et leur fonction seraient liés à la fonction musculaire. Chez les muscles de vertébrés exposés à des conditions d'exercice intense induisant une hypoxie, le métabolisme aérobie commence à être modulé au bout de quelques minutes (Sahlin and Katz, 1989; Spriet, 1992). Il est envisageable chez l'huître que ces formes tronquées puissent permettre au muscle

lisse de mieux résister à l'hypoxie, en gardant un métabolisme aérobie le plus longtemps possible, comme en témoigne l'activité citrate synthase observée maintenue à son niveau basal pendant les 6 h d'hypoxie. Ainsi, grâce au maintien de ce métabolisme aérobie, le muscle lisse exercerait sa fonction de fermeture « endurante » des valves observée lors de stress. De plus, ces troncations nous laissent penser que ces sous-unités pourraient avoir une autre fonction que celle décrite pour la sous-unité α entière. Une étude récente a prouvé que la troncation dans le domaine kinase de la caséine kinase permettait à cette protéine d'agir en tant que régulateur transdominant négatif de la fonction exercée par la caséine kinase entière (Noy et al., 2012). Dans le muscle lisse d'huître, l'accumulation des sous-unités α tronquées suggère l'idée que ces protéines pourraient exercer un rôle de modulation ou de transdomination négative de la sous-unité α entière. Enfin, cette augmentation des sous-unités α tronquées dans le muscle lisse au cours de l'hypoxie a été corrélée positivement avec une augmentation significative de la quantité de l'AKT. Dans les tissus musculaires d'invertébrés, plusieurs liens directs entre les voies de signalisation AMPK et AKT ont été mis en évidence, permettant une conservation de l'énergie ainsi qu'une survie cellulaire au cours de stress hypoxiques (Chopra et al., 2011; Kovacic et al., 2003; Stenslokken et al., 2008). Ainsi, une régulation négative de l'AKT sur l'activité AMPK a pu être démontrée dans le cœur de la souris (Kovacic et al., 2003). Les résultats obtenus chez *C. gigas* suggèrent une relation similaire dans le muscle lisse exposé à une courte période d'hypoxie. L'augmentation de la quantité totale d'AKT permettrait d'augmenter la quantité de sous-unités α tronquées qui jouerait un rôle de régulation négative de la fonction AMPK. D'autres investigations sont clairement nécessaires pour répondre à l'utilité physiologique de ces troncations. Par exemple, la liaison des sous-unités α tronquées avec les sous unités β et γ pourrait être étudiée *in vitro* à l'aide des protéines recombinantes ou grâce à des expériences d'ARN interférents ciblant spécifiquement chacune des isoformes de la sous-unité α pour appréhender leur rôle physiologique respectif. Une mesure de l'activité AMPK mise en relation avec les quantités des sous-unités α tronquées permettrait d'étudier l'impact de ces troncations sur l'activité AMPK.

III.2. Phosphorylation du résidu Thr172 de la sous-unité α

En milieu naturel au cours d'un cycle de gamétogenèse, les niveaux de phosphorylation de la Thr172 de la sous-unité α observés dans la gonade restent constants et élevés. Seul le stade de maturité (stade 3) chez les femelles montre une extinction quasi totale du signal de phosphorylation. La gonade d'huître est un organe qui se renouvelle à chaque événement de reproduction, mobilisant donc énormément d'énergie pour créer les structures gonadiques et les gamètes. Cette étude laisse à penser que dans cet organe, l'activité AMPK semble être fortement

stimulée, permettant d'apporter suffisamment d'énergie disponible tout au long de la gamétogenèse.

La maturation finale des ovocytes se caractérise par l'accumulation dans le cytoplasme d'importantes réserves sous forme de lipides, protéines et ARN messagers. Ce processus de mise en réserve, appelé vitellogenèse, est fortement anabolique et serait donc incompatible avec une activation de l'AMPK. Ainsi, une baisse de la quantité de phosphorylation observée à ce stade chez les femelles pourrait être expliquée par la transition d'un processus catabolique de multiplication cellulaire à un processus anabolique de mise en réserve. Ce changement radical de processus énergétique pourrait avoir des répercussions physiologiques fortes en particulier au niveau de la gestion du stress oxydant à ce moment de la gamétogenèse. En effet, des relations étroites existent entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la reproduction (Alonso-Alvarez et al., 2004; Beguel et al., 2013; Salmon et al., 2001). Il a été démontré que l'activité AMPK pouvait être stimulée par les ERO (Higaki et al., 2008; Jensen et al., 2008) et que l'AMPK pouvait à son tour exercer un contrôle sur les réactions d'oxydo-réduction et les ERO (Wang et al., 2012). De plus, la transition entre les processus cataboliques et anaboliques est régulée principalement par les ERO et les espèces réactives de l'azote (ERN) produits lors de stress ou de signaux d'activation (Alfadda and Sallam, 2012; Droge, 2006). Toutes ces données nous amènent à penser que le signal AMPK et les ERO jouent chez l'huître un rôle majeur dans la régulation du métabolisme au moment de la maturation de l'ovocyte principalement au moment de la fin des méioses (stade 2). Ainsi, tout facteur qui activerait AMPK ou modifierait la production ou la détoxification des ERO pourrait avoir un impact sur le processus de maturation de l'ovocyte. Le lien exact entre AMPK et ERO à ce stade de la gamétogenèse reste à étudier. L'utilisation lors de la vitellogenèse de pro-oxydants permettant d'activer les ERO permettrait d'étudier l'impact de ces composés sur l'activité de l'AMPK et plus globalement sur la qualité de la mise en réserves chez les ovocytes.

III.3. Étude fonctionnelle par la privation de nourriture et l'AICAR

Afin de limiter les facteurs exogènes influençant l'activité de l'AMPK, nous avons réalisé un conditionnement contrôlé pour les paramètres température et nourriture. Ces deux facteurs sont connus pour moduler grandement la physiologie des huîtres, notamment au niveau de la gamétogenèse. Tout au long de cette expérience, la température a été fixée à une valeur qui stimule fortement la gamétogenèse de l'huître (19°C). La nourriture, connue pour influencer l'effort de reproduction et la qualité des gamètes, a été adaptée en deux conditions : une

condition optimale favorisant la gamétogenèse et à contrario une condition minimale (le jeûn). Couplée à ce conditionnement, nous avons testé une stimulation par injection du composé pharmacologique AICAR. À ma connaissance, cette étude est la première étude fonctionnelle d'une voie de signalisation par injection *in vivo* d'un composé pharmacologique chez l'huître creuse.

Au cours de cette expérimentation, deux changements physiologiques majeurs ont été observés. Tout d'abord, chez les huîtres placées à jeun, un phénomène de mortalité a été corrélé de façon dépendante à la dose injectée d'AICAR. Chez les huîtres nourries, une augmentation significative dans les concentrations en ATP, ADP et AMP liées à l'injection d'AICAR. Les premiers résultats analysés montrent que l'injection d'AICAR n'a pas permis d'observer un changement significatif du niveau de phosphorylation du résidu Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK. Ainsi aucune modification phénotypique observée n'a donc pu être reliée ni à l'activité AMPK, ni aux niveaux d'ARN messagers des sous-unités de l'AMPK.

Dans la mesure où le ratio AMP:ATP a été modifié, nous pouvons penser qu'AICAR a tout de même produit des conditions favorables à l'activation d'AMPK. Cependant l'état de phosphorylation du résidu Thr172 n'a pas été modifié 24 h après l'injection. Ceci soulève la question de la cinétique d'activation de la phosphorylation d'AMPK après injection d'AICAR chez l'huître. Il est probable que l'effet d'AICAR sur la phosphorylation en Thr172 soit court et que 24 h après l'injection, il ne soit plus possible de l'observer. Le protocole d'injection a été adapté d'expériences d'injections d'ARN interférents menées chez l'huître (Fabioux et al., 2009). Les limites principales de cette méthode résident dans le manque de reproductibilité des injections d'une huître à l'autre. De plus, comme rapportées lors d'injections d'ARN interférents, une excrétion après injection et une faible pénétration du composé sont envisageables (Shim and Kwon, 2010). Il est aussi possible que l'AICAR n'ait pas les mêmes effets chez *C. gigas* par rapport aux espèces modèles chez lesquelles il a été utilisé. La présence dans le génome de deux isoformes de l'adénosine kinase (numéros GenBank : EKC31015 et EKC26322), responsables de la transformation de l'AICAR en ZMP (Vincent et al., 1996), laisse penser que la transformation de l'AICAR en ZMP est réalisable dans cette espèce. La diffusion et le devenir de l'AICAR au sein de l'huître creuse n'ont pas encore été étudiés. Une cinétique de phosphorylation de la Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK sur un temps court (de 0 à 24 h) après une injection ponctuelle d'AICAR permettrait de valider son efficacité sur la signalisation AMPK chez l'huître. Ainsi, l'AICAR pourrait par exemple être marqué par radioactivité (Allegra et al., 1987; Atkins et al., 1982; Mauser et al., 1985), afin de pouvoir suivre sa diffusion et mesurer son temps de rétention dans l'huître creuse. Il serait aussi possible de vérifier l'efficacité des injections d'AICAR en mesurant la concentration en ZMP par HPLC (Corton et

al., 1995). Enfin, une étude *in vitro* sur des cultures cellulaires d'huîtres ou de bivalves marins serait une piste intéressante pour mieux comprendre la modulation de l'AMPK par des composés exogènes tels qu'AICAR. Des études *in vitro* sur des lignées cellulaires permettraient d'estimer l'effet de l'AMPK à court terme et ainsi mieux cribler les principales cibles chez *C. gigas*. Cependant, aucune lignée cellulaire stable n'a pu être développée chez les bivalves, seuls des primo-cultures de plusieurs tissus pendant 14 jours sont possibles (Quinn et al., 2009).

Cette première étude *in vivo* d'une activation artificielle de l'AMPK tend à démontrer que l'activation chronique d'AMPK par l'AICAR ne perturberait pas les processus de gamétogenèse mâle ou femelle, les gamètes se développent et peuvent aller jusqu'à la maturité sans aucune modification détectée par rapport aux huîtres témoins.

Afin de tester si l'AMPK module en qualité et/ou en quantité les phénotypes liés à la reproduction, plusieurs approches pourraient être envisagées : une inhibition au niveau de la protéine par ARN interférents ciblant une ou plusieurs sous-unités de l'AMPK ou une inhibition de la phosphorylation du résidu Thr172 par un agent pharmacologique. Chez la souris mâle, le « knock-out » du gène codant pour la sous-unité α n'a pas perturbé la gamétogenèse. En revanche, cette inhibition a perturbé la qualité des spermatozoïdes produits et donc la fertilité (Tartarin et al., 2012). Une étude sur la qualité des gamètes produits suite à cette stimulation pourrait permettre de savoir si l'injection par AICAR a amélioré la qualité des gamètes en particulier la qualité des réserves produites, la motilité des spermatozoïdes et le succès de fécondation. Les études de ces paramètres sont développées au sein du laboratoire de physiologie de invertébrés de l'Ifremer (Corporeau et al., 2012; Suquet et al., 2010).

La rupture de la vésicule germinative (GVBD) est une étape clé de la maturation ovocytaire permettant la reprise de la méiose. Au niveau de ce mécanisme particulièrement conservé, les effets de l'AMPK peuvent varier selon les espèces. Chez *C. gigas*, l'émission dans l'eau de mer, puis la fécondation, déclenchent successivement la reprise de la méiose et la rupture de la vésicule germinative (Leclerc et al., 2000). Au cours de nos études, nous avons constaté que les niveaux de phosphorylation du résidu Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK, témoin indirect de l'activité de cette kinase, se trouvent en faible quantité dans la gonade des femelles matures (stade 3) placées en milieu naturel et en milieu contrôlé. Cette observation, tend à prouver que, contrairement au ver *Cerebratulus sp.*, une activation de l'AMPK n'est pas nécessaire pour le maintien de l'intégrité de l'ovocyte. De plus, l'injection d'AICAR réalisée 24 h avant dissection chez des huîtres femelles de stade 3 n'a pas permis d'observer de différence de structure dans les ovocytes, en particulier au niveau de la rupture de la vésicule germinative. Il est possible que l'AMPK, comme chez plusieurs autres espèces, ait un effet sur la GVBD plus tard lors de l'émission du gamète. Vu la complexité des mécanismes impliqués de

déclenchement de la GVBD, il est possible que des effets synergiques soient en jeu pour cette étape. Des études, sur les ovocytes femelles au niveau du déclenchement de la GVBD, stimulées par des agonistes de l'AMPK, permettraient d'approfondir le potentiel rôle de la disruption de la phosphorylation du résidu Thr172 observée chez les ovocytes matures femelles de *C. gigas*.

Il a été démontré que l'AICAR pourrait avoir des effets sur d'autres cibles que l'AMPK, principalement sur des enzymes régulant l'AMP et les phosphorylations oxydatives de la mitochondrie (Guigas et al., 2007; Longnus et al., 2003; Shang and Lehrman, 2004; Vincent et al., 1992; Vincent et al., 1991). Ces régulations peuvent expliquer l'augmentation des niveaux d'adénylates observée après injection de l'AICAR à la dose 500 mg/kg. L'utilisation d'autres activateurs plus spécifiques de l'AMPK permettrait d'un côté de comparer si les effets observés lors des injections par l'AICAR se confirment et d'un autre côté possiblement de permettre une activation plus longue de l'activité AMPK. De plus, une stimulation de l'activité de l'AMPK par l'AICAR a été décrite comme augmentant les capacités de production d'ATP en stimulant la biogenèse mitochondriale. Il serait intéressant de mettre en évidence cet effet par l'étude du niveau d'expression de gènes traduisant une activité mitochondriale telle que les gènes codants les enzymes du cycle du citrate et de l'oxydation des acides gras (Winder et al., 2000). D'autres indicateurs non moléculaires pourraient aussi être utilisés pour estimer l'activité mitochondriale telle que le dosage de l'activité de la citrate synthase ou le dosage de la consommation d'oxygène (Garcia-Esquivel et al., 2002; Ramirez et al., 1999).

Des études sur les échantillons du premier temps de prélèvement, correspondant à 10 jours de conditionnement, permettront de tester si l'injection d'AICAR a induit des modifications physiologiques sur le système AMPK et plus largement sur des phénotypes reproductifs tels que la cinétique de gamétogenèse.

VI. Perspectives

VI.1. Études de protéomique à haut débit

L'acquisition récente de nombreuses données génomiques chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* a permis d'étudier des gènes impliqués dans sa physiologie. Des marqueurs moléculaires de résistance aux mortalités estivales (Fleury and Huvet, 2011; Rosa et al., 2012), de réponse à l'hypoxie (Sussarellu et al., 2010), à la salinité (Zhao et al., 2012), à la température (Cho and Jeong, 2012), et du développement gonadique mâle et femelle (Dheilly et al., 2012) ont été identifiés par puces à ADN et séquençage à haut débit. La récente publication des séquences du génome de *C. gigas*, confirme que cette espèce possédait un génome riche et complexe avec un polymorphisme génétique important et de nombreuses séquences répétées (Zhang et al.,

2012a). La parution des séquences du génome fait entrer pleinement *C. gigas* dans l'ère de la génomique et ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de cet organisme atypique non élevé au rang d'espèce modèle par la communauté scientifique.

Ainsi, la disponibilité de la totalité des séquences génomiques, couplée aux avancées des méthodes d'identification des protéines à haut débit, permet d'envisager des études de protéomique et de phosphoprotéomique chez cette espèce. Une première étude du protéome et du phosphoprotéome par spectrométrie de masse dans les gonades femelles de stade 3 (maturité) a ainsi été débutée au cours de ce doctorat. Ces études, toujours en cours d'analyses, ont été réalisées au sein de l'Australian Proteome Analysis Facility (APAF) et du Marine and Freshwater Biology Laboratory, tous les deux situés dans le campus de la Macquarie University de Sydney en Australie. Ce travail devrait permettre d'apporter des informations importantes quant à la nature des protéines présentes et spécifiquement régulées par phosphorylation au stade de la maturation chez les femelles. Ces données pourront être comparées avec les données génomiques générées lors de l'étude du développement gonadique par microarray (Dheilly et al., 2012). Ces comparaisons permettront de confirmer aux niveaux protéiques (protéines totales et phosphoprotéines) les profils observés au niveau génomique ou de dégager de nouveaux candidats impliqués lors de la maturation chez les femelles. Dans le futur, une comparaison des protéines phosphorylées présentes dans deux conditions où l'activité AMPK est fortement différente, comme dans les gonades femelles de stade 2 et de stade 3, permettrait de décrypter la voie de signalisation chez *C. gigas*.

VI.2. Étude de l'énergie au niveau central chez *C. gigas*

Les trois sous-unités de l'AMPK ont été caractérisées dans tous les tissus de *C. gigas*. Ainsi, dans les ganglions viscéraux, l'existence des trois sous-unités de l'AMPK au niveau des ARN messagers ainsi que l'existence de la protéine de sous-unité α ont été caractérisées. Les ganglions cérébroïdes, trop petits ou non localisés lors des dissections, n'ont pas été prélevés et n'ont donc pas été examinés. La présence des sous-unités de l'AMPK dans les ganglions viscéraux laisse penser que le système AMPK exercerait une régulation de l'énergie au niveau central aussi chez l'huître creuse. Chez plusieurs espèces de vertébrés, la présence de l'AMPK dans les tissus du système nerveux central et en particulier dans les zones impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire a permis de montrer que l'AMPK intègre les signaux anorexigènes et orexigènes afin de réguler la prise alimentaire, la dépense énergétique et le poids corporel. Le système nerveux de l'huître creuse est relativement simple et peu décrit dans la littérature. Il ne possède pas de centre de contrôle principal et est principalement constitué de ganglions. Deux ganglions viscéraux fusionnés sont situés à la jonction du muscle strié et du

muscle lisse au niveau muscle adducteur et deux ganglions cérébroïdes localisés à la jointure des palpes labiaux. D'un point de vue fonctionnel, l'utilisation des techniques d'immunohistochimie a permis de dresser une ébauche de cartographie des ganglions cérébroïdes chez la moule *Mytilus edulis* (Kellner-Cousin et al., 1994a; Kellner-Cousin et al., 1994b; Mathieu et al., 1988). Une première caractérisation du système nerveux de l'huître creuse a été réalisée récemment sur des huîtres juvéniles (naissain, environ 6mm). Plusieurs anticorps (anticorps anti-FMRF et anti- α -tubuline) connus pour leur capacité à marquer les structures nerveuses chez plusieurs espèces d'invertébrés ont permis de commencer à décrire l'organisation générale du système nerveux chez *Crassostrea gigas* (Epelboin, 2012).

Ainsi, la présence des sous-unités de l'AMPK et la taille plus importante des ganglions viscéraux par rapport aux ganglions cérébroïdes laissent à penser que la régulation centrale de l'énergie chez *C. gigas* passerait par les ganglions viscéraux. Une comparaison de la régulation centrale au niveau de ces tissus par rapport à la régulation périphérique de la kinase AMPK pourrait être envisagée pour ce modèle. En effet, l'huître creuse présente de nombreux avantages au niveau de la facilité à disséquer spécifiquement les tissus ainsi que pour la réalisation de comparaisons physiologiques entre les sexes et les étapes de gamétogenèse par exemple.

VI.3. Recherche de l'AMPK chez d'autres bivalves marins

Étant donné que pratiquement toutes les réactions nécessitant de l'énergie dans la cellule utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP, il n'est pas surprenant que la kinase AMPK soit impliquée dans un large éventail de voies biochimiques et soit retrouvée conservée chez un grand nombre d'organismes vivants. En raison de la grande diversité des voies dans lesquelles l'AMPK est impliquée, il est peut-être inévitable que dans certains cas des conflits apparents et des paradoxes surgissent. Ces conflits et paradoxes proviennent en grande partie de la compréhension incomplète de la biologie (Carling et al., 2012). L'accumulation de données provenant de différents modèles biologiques, d'expérimentations en milieux contrôlés (*in silico*, *in vivo*, *in vitro*) et d'études fonctionnelles est importante pour comprendre le rôle de l'AMPK.

Ainsi, les invertébrés marins et plus particulièrement les mollusques sont adaptés à de nombreux changements environnementaux et présentent des stratégies de reproduction produisant un grand nombre de gamètes. Cette stratégie est appelée type « r » selon la classification des écologistes MacArthur et Wilson (MacArthur and Wilson, 1967). Ces stratégies de reproduction présentent des caractéristiques physiologiques différentes de celles des organismes vertébrés où l'AMPK a été étudiée.

L'huître creuse *C. gigas* adulte a été décrite comme pouvant vivre jusqu'à 40 ans en milieu tempéré. Plus une huître se situe dans des latitudes élevées, plus elle aura tendance à vivre

longtemps (Pauley et al., 1988). Dans la couche euphotique, la température de l'eau de mer varie en fonction de la quantité de rayonnement solaire reçue qui est principalement fonction de la latitude (Talley et al., 2011). D'une manière générale, plus les espèces seraient situées à des hautes latitudes plus elles seraient exposées à des eaux présentant des températures relativement froides. Le bivalve *Arctica islandica*, a une aire de répartition située dans les mers froides au niveau des hautes latitudes de l'hémisphère Nord (Weinberg, 1995). Ce bivalve, caractérisé par sclérochronologie comme pouvant vivre plusieurs centaines d'années est devenu une espèce modèle pour l'étude des processus de sénescence (Abele et al., 2008). Une forte relation entre la survie exceptionnelle, la température et la résistance aux stress oxydatifs a été démontrée chez *A. islandica* (Ungvari et al., 2011). De plus, il a été démontré que chez les bivalves, la production d'ERO serait positivement corrélée à l'augmentation de la température (Abele et al., 2002; Ulrich and Marsh, 2009). Dans ce contexte, l'étude de la kinase AMPK serait intéressante car des relations ont été supposées ou démontrées entre cette kinase et les processus de vieillissement (Salminen and Kaarniranta, 2012; Salminen et al., 2011), les ERO (Higaki et al., 2008; Toyoda et al., 2004; Wang et al., 2012) et les températures (Frederich et al., 2009). Des études sur des bivalves présentant des niveaux de longévité, de résistance oxydative et des températures d'habitat différents permettront ainsi de mieux d'appréhender le fonctionnement de l'AMPK et des acteurs impliqués dans cette voie de signalisation énergétique.

Bibliographie

- Abele, D., Heise, K., Portner, H. O. and Puntarulo, S.** (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *Journal of Evolutionary Biology* **205**, 1831-1841.
- Abele, D., Strahl, J., Brey, T. and Philipp, E. E.** (2008). Imperceptible senescence: ageing in the ocean quahog *Arctica islandica*. *Free radical research* **42**, 474-480.
- Acosta-Martinez, M., Horton, T. and Levine, J. E.** (2007). Estrogen receptors in neuropeptide Y neurons: at the crossroads of feeding and reproduction. *Trends in endocrinology and metabolism* **18**, 48-50.
- Adam, R. D.** (2000). The *Giardia lamblia* genome. *International journal for parasitology* **30**, 475-484.
- Adams, J., Chen, Z. P., Van Denderen, B. J., Morton, C. J., Parker, M. W., Witters, L. A., Stapleton, D. and Kemp, B. E.** (2004). Intrasteric control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein science* **13**, 155-165.
- Ahn, J., Lee, H., Kim, S., Park, J. and Ha, T.** (2008). The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **373**, 545-549.
- Alfadda, A. A. and Sallam, R. M.** (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**, 936486.
- Allegra, C. J., Hoang, K., Yeh, G. C., Drake, J. C. and Baram, J.** (1987). Evidence for direct inhibition of de novo purine synthesis in human MCF-7 breast cells as a principal mode of metabolic inhibition by methotrexate. *The Journal of biological chemistry* **262**, 13520-13526.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Gaillard, M., Prost, J., Faivre, B. and Sorci, G.** (2004). An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *The American naturalist* **164**, 651-659.
- Amodeo, G. A., Rudolph, M. J. and Tong, L.** (2007). Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature* **449**, 492-495.
- Anderson, K. A., Means, R. L., Huang, Q. H., Kemp, B. E., Goldstein, E. G., Selbert, M. A., Edelman, A. M., Fremeau, R. T. and Means, A. R.** (1998). Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *The Journal of biological chemistry* **273**, 31880-31889.
- Anderson, L. and Seilhamer, J.** (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **18**, 533-537.
- Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C. R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S. R., Carling, D. and Small, C. J.** (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *The Journal of biological chemistry* **279**, 12005-12008.
- Andrews, Z. B., Liu, Z.-W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., Tschop, M. H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G. I. et al.** (2008). UCP2 mediates ghrelin/s action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* **454**, 846-851.
- Anthonsen, M. W., Ronnstrand, L., Wernstedt, C., Degerman, E. and Holm, C.** (1998). Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties *in vitro*. *The Journal of biological chemistry* **273**, 215-221.

- Apfeld, J., O'Connor, G., McDonagh, T., DiStefano, P. S. and Curtis, R.** (2004). The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes & development* **18**, 3004-3009.
- Arad, M., Benson, D. W., Perez-Atayde, A. R., McKenna, W. J., Sparks, E. A., Kanter, R. J., McGarry, K., Seidman, J. G. and Seidman, C. E.** (2002). Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation* **109**, 357-362.
- Assifi, M. M., Suchankova, G., Constant, S., Prentki, M., Saha, A. K. and Ruderman, N. B.** (2005). AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **289**, 794-800.
- Atkins, C. A., Ritchie, A., Rowe, P. B., Mccairns, E. and Sauer, D.** (1982). De novo Purine Synthesis in Nitrogen-Fixing Nodules of Cowpea (*Vigna-Unguiculata* [L] Walp) and Soybean (*Glycine-Max* [L] Merr). *Plant Physiology* **70**, 55-60.
- Ayasolla, K. R., Singh, A. K. and Singh, I.** (2005). 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) attenuates the expression of LPS- and Abeta peptide-induced inflammatory mediators in astroglia. *Journal of neuroinflammation* **2**, 21.
- Baas, A. F., Boudeau, J., Sapkota, G. P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N. A., Alessi, D. R. and Clevers, H. C.** (2003). Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *Embo Journal* **22**, 3062-3072.
- Babinet, C.** (1993). Parental genome imprinting. *Annales de genétique* **36**, 63-69.
- Barazzoni, R., Bosutti, A., Stebel, M., Cattin, M. R., Roder, E., Visintin, L., Cattin, L., Biolo, G., Zanetti, M. and Guarnieri, G.** (2005). Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **288**, 228-235.
- Barthel, A., Schmoll, D., Kruger, K. D., Roth, R. A. and Joost, H. G.** (2002). Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase. *Endocrinology* **143**, 3183-3186.
- Bartrons, M., Ortega, E., Obach, M., Calvo, M. N., Navarro-Sabate, A. and Bartrons, R.** (2004). Activation of AMP-dependent protein kinase by hypoxia and hypothermia in the liver of frog *Rana perezi*. *Cryobiology* **49**, 190-194.
- Bateman, A.** (1997). The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 12-13.
- Bateman, A. J.** (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* **2**, 349-368.
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K. et al.** (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**, 337-342.
- Beale, E. G.** (2008). 5'-AMP-activated protein kinase signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Biology and Medicine* **233**, 12-20.
- Beg, Z. H., Allmann, D. W. and Gibson, D. M.** (1973). Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **54**, 1362-1369.
- Beguel, J. P., Huvet, A., Quillien, V., Lambert, C. and Fabioux, C.** (2013). Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its

reproductive investment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*.

Belfrage, P., Fredriksson, G., Strålfors, P. and Tornqvist, H. (1984). Adipose tissue lipases. In *Lipases*, eds. B. Borgström and H. L. Brockman), pp. 365-416. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV.

Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H. and Seino, S. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* **13**, 198-208.

Bergonzelli, G. E., Pralong, F. P., Glauser, M., Cavadas, C., Grouzmann, E. and Gaillard, R. C. (2001). Interplay between galanin and leptin in the hypothalamic control of feeding via corticotropin-releasing hormone and neuropeptide Y. *Diabetes* **50**, 2666-2672.

Beri, R. K., Marley, A. E., See, C. G., Sopwith, W. F., Aguan, K., Carling, D., Scott, J. and Carey, F. (1994). Molecular cloning, expression and chromosomal localisation of human AMP-activated protein kinase. *FEBS Letters* **356**, 117-121.

Berthelin, C., Kellner, K. and Mathieu, M. (2000a). Histological Characterization and Glucose Incorporation into Glycogen of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Storage Cells. *Marine biotechnology* **2**, 136-145.

Berthelin, C. H., Kellner, K. and Mathieu, M. (2000b). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative biochemistry and physiology Part B: Biochemistry and molecular biology* **125**, 359-369.

Berthelin, C. H., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M. and Kellner, K. (2001). Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Invertebrate Reproduction & Development* **40**, 79-86.

Bessone, S., Vidal, F., Le Bouc, Y., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M. T. and Darmon, M. (1999). EMK protein kinase-null mice: Dwarfism and hypofertility associated with alterations in the somatotrope and prolactin pathways. *Developmental Biology* **214**, 87-101.

Bevan, P. (2001). Insulin signalling. *Journal of cell science* **114**, 1429-1430.

Bieri, M., Mobbs, J. I., Koay, A., Louey, G., Mok, Y. F., Hatters, D. M., Park, J. T., Park, K. H., Neumann, D., Stapleton, D. et al. (2012). AMP-activated protein kinase beta-subunit requires internal motion for optimal carbohydrate binding. *Biophysical journal* **102**, 305-314.

Bigot, L. (2012). Caractérisation de voies impliquées dans la régulation neuroendocrine du métabolisme énergétique et de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Thèse de doctorat Université de Caen Basse-Normandie*, 230.

Bigot, L., Zatylny-Gaudin, C., Rodet, F., Bernay, B., Boudry, P. and Favrel, P. (2012). Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peptides* **34**, 303-310.

Bilodeau-Goeseels, S. (2008). Review: The regulation of meiotic maturation in bovine oocytes. *Canadian Journal of Animal Science* **88**, 343-349.

Bilodeau-Goeseels, S. (2011). Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development* **78**, 734-743.

- Bilodeau-Goeseels, S., Sasseville, M., Guillemette, C. and Richard, F. J.** (2007). Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Molecular reproduction and development* **74**, 1021-1034.
- Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, J., Kerr, B., Salmon, A., Ostman-Smith, I. and Watkins, H.** (2001). Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Human molecular genetics* **10**, 1215-1220.
- Boudeau, J., Baas, A. F., Deak, M., Morrice, N. A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A. R., Clevers, H. C. and Alessi, D. R.** (2003). MO25 alpha/beta interact with STRAD alpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *Embo Journal* **22**, 5102-5114.
- Boudeau, J., Scott, J. W., Resta, N., Deak, M., Kieloch, A., Komander, D., Hardie, D. G., Prescott, A. R., van Aalten, D. M. and Alessi, D. R.** (2004). Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. *Journal of cell science* **117**, 6365-6375.
- Bouly, J. P., Gissot, L., Lessard, P., Kreis, M. and Thomas, M.** (1999). *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINalpha1, an SNF1-like protein kinase. *Plant journal* **18**, 541-550.
- Bright, N. J., Thornton, C. and Carling, D.** (2009). The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases. *Acta Physiologica* **196**, 15-26.
- Browne, G. J., Finn, S. G. and Proud, C. G.** (2004). Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *The Journal of biological chemistry* **279**, 12220-12231.
- Browne, G. J. and Proud, C. G.** (2004). A novel mTOR-regulated phosphorylation site in elongation factor 2 kinase modulates the activity of the kinase and its binding to calmodulin. *Molecular and cellular biology* **24**, 2986-2997.
- Buschmann, A. H., Lopez, D. A. and Medina, A.** (1996). A review of the environmental effects and alternative production strategies of marine aquaculture in Chile. *Aquacultural Engineering* **15**, 397-421.
- Carattino, M. D., Edinger, R. S., Grieser, H. J., Wise, R., Neumann, D., Schlattner, U., Johnson, J. P., Kleyman, T. R. and Hallows, K. R.** (2005). Epithelial sodium channel inhibition by AMP-activated protein kinase in oocytes and polarized renal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **280**, 17608-17616.
- Carling, D.** (2004). The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences* **29**, 18-24.
- Carling, D., Clarke, P. R., Zammit, V. A. and Hardie, D. G.** (1989). Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *European journal of biochemistry / FEBS* **186**, 129-136.
- Carling, D. and Hardie, D. G.** (1989). The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochimica et biophysica acta* **1012**, 81-86.
- Carling, D., Thornton, C., Woods, A. and Sanders, M. J.** (2012). AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? *The Biochemical Journal* **445**, 11-27.

Carling, D., Zammit, V. A. and Hardie, D. G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters* **223**, 217-222.

Carlson, C. A. and Kim, K. H. (1973). Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **248**, 378-380.

Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Current opinion in microbiology* **2**, 202-207.

Celenza, J. L. and Carlson, M. (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* **233**, 1175-1180.

Chain, P. S., Grafham, D. V., Fulton, R. S., Fitzgerald, M. G., Hostetler, J., Muzny, D., Ali, J., Birren, B., Bruce, D. C., Buhay, C. et al. (2009). Genomics. Genome project standards in a new era of sequencing. *Science* **326**, 236-237.

Chau-Van, C., Gamba, M., Salvi, R., Gaillard, R. C. and Pralong, F. P. (2007). Metformin inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated kinase activation and prevents increases in neuropeptide Y expression in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology* **148**, 507-511.

Chavez-Villalba, J., Cochard, J. C., Le Pennec, M., Barret, J., Enriquez-Diaz, M. and Caceres-Martinez, C. (2003). Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* **22**, 721-731.

Chavez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamizeza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J. C. and Le Pennec, M. (2002). Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* **214**, 115-130.

Chen, G. A., Gharib, T. G., Huang, C. C., Taylor, J. M. G., Misek, D. E., Kardia, S. L. R., Giordano, T. J., Iannettoni, M. D., Orringer, M. B., Hanash, S. M. et al. (2002). Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**, 304-313.

Chen, J. and Downs, S. M. (2008). AMP-activated protein kinase is involved in hormone-induced mouse oocyte meiotic maturation *in vitro*. *Developmental Biology* **313**, 47-57.

Chen, Z., Heierhorst, J., Mann, R. J., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Witters, L. A., Lynch, G. S., Kemp, B. E. and Stapleton, D. (1999). Expression of the AMP-activated protein kinase beta1 and beta2 subunits in skeletal muscle. *FEBS Letters* **460**, 343-348.

Cheng, X. B., Wen, J. P., Yang, J., Yang, Y., Ning, G. and Li, X. Y. (2011). GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Endocrine* **39**, 6-12.

Cheung, P. C., Salt, I. P., Davies, S. P., Hardie, D. G. and Carling, D. (2000). Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *The Biochemical Journal* **346 Pt 3**, 659-669.

Chew, K. (1990). Global bivalve shellfish introductions. *World aquaculture* **21**, 9-22.

Cho, E. S. and Jeong, H. D. (2012). Effect of environmental impact to molecular expression of heat-shock protein (HSP70) in oyster *Crassostrea gigas* from Gamak bay, Korea. *Journal of environmental biology* **33**, 609-615.

- Choi, S. L., Kim, S. J., Lee, K. T., Kim, J., Mu, J., Birnbaum, M. J., Soo Kim, S. and Ha, J.** (2001). The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **287**, 92-97.
- Chopra, I., Li, H. F., Wang, H. and Webster, K. A.** (2011). Phosphorylation of the insulin receptor by AMP-activated protein kinase (AMPK) promotes ligand-independent activation of the insulin signalling pathway in rodent muscle. *Diabetologia* **55**, 783-794.
- Christ-Crain, M., Kola, B., Lolli, F., Fekete, C., Seboek, D., Wittmann, G., Feltrin, D., Igreja, S. C., Ajodha, S., Harvey-White, J. et al.** (2008). AMP-activated protein kinase mediates glucocorticoid-induced metabolic changes: a novel mechanism in Cushing's syndrome. *FASEB journal* **22**, 1672-1683.
- Christians, E. S.** (2003). When the mother further impacts the destiny of her offspring: maternal effect mutations. *Medecine sciences* **19**, 459-464.
- Clark, H., Carling, D. and Saggerson, D.** (2004). Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**, 2215-2224.
- Codd, E. E., Shu, A. Y. and Walker, R. F.** (1989). Binding of a growth hormone releasing hexapeptide to specific hypothalamic and pituitary binding sites. *Neuropharmacology* **28**, 1139-1144.
- Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R. et al.** (2006). Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell metabolism* **3**, 403-416.
- Corporeau, C., Groisillier, A., Jeudy, A., Barbeyron, T., Fleury, E., Fabioux, C., Czjzek, M. and Huvet, A.** (2011). A functional study of transforming growth factor-beta from the gonad of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine biotechnology* **13**, 971-980.
- Corporeau, C., Vanderplancke, G., Boulais, M., Suquet, M., Quere, C., Boudry, P., Huvet, A. and Madec, S.** (2012). Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics*.
- Corradetti, M. N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R. A. and Guan, K. L.** (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes & development* **18**, 1533-1538.
- Corton, J. M., Gillespie, J. G. and Hardie, D. G.** (1994). Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Current biology* **4**, 315-324.
- Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A. and Hardie, D. G.** (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *European journal of biochemistry / FEBS* **229**, 558-565.
- Costanzo-Garvey, D. L., Pfluger, P. T., Dougherty, M. K., Stock, J. L., Boehm, M., Chaika, O., Fernandez, M. R., Fisher, K., Kortum, R. L., Hong, E. G. et al.** (2009). KSR2 Is an Essential Regulator of AMP Kinase, Energy Expenditure, and Insulin Sensitivity. *Cell metabolism* **10**, 366-378.
- Coyral-Castel, S., Tosca, L., Ferreira, G., Jeanpierre, E., Rame, C., Lomet, D., Caraty, A., Monget, P., Chabrolle, C. and Dupont, J.** (2008). The effect of AMP-activated kinase activation on gonadotrophin-releasing hormone secretion in GT1-7 cells and its potential role in hypothalamic regulation of the oestrous cyclicity in rats. *Journal of neuroendocrinology* **20**, 335-346.

Crute, B. E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B. E. and Witters, L. A. (1998). Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **273**, 35347-35354.

Culloty, S. C. and Mulcahy, M. F. (1992). An evaluation of anesthetics for *Ostrea edulis* (L). *Aquaculture* **107**, 249-252.

da Silva Xavier, G., Leclerc, I., Salt, I. P., Doiron, B., Hardie, D. G., Kahn, A. and Rutter, G. A. (2000). Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4023-4028.

Dale, S., Wilson, W. A., Edelman, A. M. and Hardie, D. G. (1995). Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Letters* **361**, 191-195.

Davies, S. P., Carling, D. and Hardie, D. G. (1989). Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *European journal of biochemistry / FEBS* **186**, 123-128.

Davies, S. P., Hawley, S. A., Woods, A., Carling, D., Haystead, T. A. and Hardie, D. G. (1994). Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *European journal of biochemistry / FEBS* **223**, 351-357.

Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T. and Hardie, D. G. (1995). 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Letters* **377**, 421-425.

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

de Lange, P., Farina, P., Moreno, M., Ragni, M., Lombardi, A., Silvestri, E., Burrone, L., Lanni, A. and Goglia, F. (2006). Sequential changes in the signal transduction responses of skeletal muscle following food deprivation. *FASEB journal* **20**, 2579-2581.

de Llera, A. H., Martin-Hidalgo, D., Gil, M. C., Garcia-Marin, L. J. and Bragado, M. J. (2012). AMP-Activated Kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. *PLoS One* **7**.

DeFronzo, R. A. and Goodman, A. M. (1995). Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *The New England journal of medicine* **333**, 541-459.

Degroot, R. P., Ballou, L. M. and Sassonecorsi, P. (1994). Positive Regulation of the Camp-Responsive Activator Crem by the P70 S6 Kinase - an Alternative Route to Mitogen-Induced Gene-Expression. *Cell* **79**, 81-91.

Deslous-Paoli, J. M. and Héral, M. (1988). Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquatic Living Resources* **1**, 239-259.

Deslous-Paoli, J. M., Zanette, Y., Héral, M., Massé, H. and Garnier, J. (1982). Amélioration de la forme et de la qualité de l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans les claires de Marennes-Oléron. *Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes* **45**, 181-194.

- Dheilly, N., Lelong, C., Huvet, A., Kellner, K., Dubos, M. P., Riviere, G., Boudry, P. and Favrel, P.** (2012). Gametogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. *PLoS One* **7**, 36353.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Marcheselli, V. L., Bazan, N. G. and Tasker, J. G.** (2005). Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology* **146**, 4292-4301.
- Dickson, S. L., Leng, G. and Robinson, I. C. A. F.** (1993). Systemic administration of growth hormone-releasing peptide activates hypothalamic arcuate neurons. *Neuroscience* **53**, 303-306.
- Dinamani, P.** (1971). Occurrence of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Northland, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **5**, 352-357.
- Djouder, N., Tuerk, R. D., Suter, M., Salvioni, P., Thali, R. F., Scholz, R., Vaahromeri, K., Auchli, Y., Rechsteiner, H., Brunisholz, R. A. et al.** (2010). PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis. *Embo Journal* **29**, 469-481.
- Don, L.** (1998). Does Bateman's principle apply to broadcast-spawning organisms? egg traits influence *in situ* fertilization rates among congeneric Sea Urchins. *Evolution* **52**, 1043-1056.
- Downs, S. M. and Chen, J.** (2006). Induction of meiotic maturation in mouse oocytes by adenosine analogs. *Molecular reproduction and development* **73**, 1159-1168.
- Downs, S. M., Hudson, E. R. and Hardie, D. G.** (2002). A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. *Developmental Biology* **245**, 200-212.
- Droge, W.** (2006). Redox regulation in anabolic and catabolic processes. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **9**, 190-195.
- Dungan, H. M., Clifton, D. K. and Steiner, R. A.** (2006). Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* **147**, 1154-1158.
- Dyck, J. R., Gao, G., Widmer, J., Stapleton, D., Fernandez, C. S., Kemp, B. E. and Witters, L. A.** (1996). Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic beta and gamma subunits. *The Journal of biological chemistry* **271**, 17798-17803.
- El-Mir, M. Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Averet, N., Rigoulet, M. and Leverve, X.** (2000). Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *The Journal of biological chemistry* **275**, 223-228.
- Elliott, A. and Bennett, P. M.** (1982). Structure of the thick filaments in molluscan adductor muscle. *Society of General Physiologists series* **37**, 11-28.
- Enriquez-Diaz, M. R.** (2004). Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. In *Thèse de doctorat Université de Bretagne Occidentale*.
- Epelboin, Y.** (2012). Régulation neuroendocrine des évènements précoces de la gamétogenèse chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : caractérisation structurale et protéomique du système neuroendocrine.

Evangelou, A., Jindal, S. K., Brown, T. J. and Letarte, M. (2000). Down-regulation of transforming growth factor beta receptors by androgen in ovarian cancer cells. *Cancer research* **60**, 929-935.

Fabioux, C. (2004). Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas*: Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. In *Thèse de doctorat Université de Bretagne Occidentale*, pp. 210.

Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P. and Huvet, A. (2009). *In vivo* RNA interference in oyster-vasa silencing inhibits germ cell development. *FEBS journal* **276**, 2566-2573.

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

Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.-Y., Minguant, C. and Le Pennec, M. (2004). Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **320**, 592-598.

Fahie-Wilson, M. and Halsall, D. (2008). Polyethylene glycol precipitation: proceed with care. *Annals of Clinical Biochemistry* **45**, 233-235.

Farese, R. V. (2001). Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. *Experimental Biology and Medicine* **226**, 283-295.

Fatemi, S. A., Mehrabani-Yeganeh, H., Nejati-Javaremi, A. and Niknafs, S. (2012). Association of neuropeptide Y and gonadotrophin-releasing hormone receptor gene SNPs with breeding value for growth and egg production traits in Mazandaran native chickens. *Genetics and molecular research* **11**, 2539-2547.

Ferri, N. (2011). AMP-activated protein kinase and the control of smooth muscle cell hyperproliferation in vascular disease. *Vascular pharmacology*.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

Fleming, T. P., Velazquez, M. A., Eckert, J. J., Lucas, E. S. and Watkins, A. J. (2011). Nutrition of females during the peri-conceptual period and effects on foetal programming and health of offspring. *Animal reproduction science* **130**, 193-197.

Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P. and Huvet, A. (2008). Characterization of a gonad-specific transforming growth factor- β superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene* **410**, 187-196.

Fleury, E. and Huvet, A. (2011). Microarray analysis highlights immune response of Pacific oysters as a determinant of resistance to summer mortality. *Marine biotechnology*.

Fleury, E., Huvet, A., Lelong, C., de Lorgeril, J., Boulo, V., Gueguen, Y., Bachere, E., Tanguy, A., Moraga, D., Fabioux, C. et al. (2009). Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* **10**, 341.

Foretz, M., Ancellin, N., Andreelli, F., Saintillan, Y., Grondin, P., Kahn, A., Thorens, B., Vaulont, S. and Viollet, B. (2005). Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* **54**, 1331-1339.

- Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L. and Viollet, B.** (2006). Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases. *Medecine sciences* **22**, 381-388.
- Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdain, P. and Mathieu, M.** (2008). Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue & cell* **40**, 251-260.
- Franco, A., Jouaux, A., Mathieu, M., Sourdain, P., Lelong, C., Kellner, K. and 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 and Tissue Research* **340**, 201-210.
- Frederich, M., O'Rourke, M. R., Furey, N. B. and Jost, J. A.** (2009). AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, *Cancer irroratus*: an early indicator of temperature stress. *Journal of Evolutionary Biology* **212**, 722-730.
- Fryer, L. G., Foufelle, F., Barnes, K., Baldwin, S. A., Woods, A. and Carling, D.** (2002a). Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *The Biochemical Journal* **363**, 167-174.
- Fryer, L. G., Parbu-Patel, A. and Carling, D.** (2002b). The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* **277**, 25226-25232.
- Fryer, L. G. D., Parbu-Patel, A. and Carling, D.** (2002c). Protein kinase inhibitors block the stimulation of the AMP-activated protein kinase by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside. *FEBS Letters* **531**, 189-192.
- Fujiya, M.** (1970). Oyster farming in Japan. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* **20**, 464-479.
- Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J. B., Edwards, Y., Pilch, P. F., Bell, G. I. and Seino, S.** (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *The Journal of biological chemistry* **264**, 7776-7779.
- Furuhashi, T., Schwarzinger, C., Miksik, I., Smrz, M. and Beran, A.** (2009). Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis. *Comparative biochemistry and physiology Part B: Biochemistry and molecular biology* **154**, 351-371.
- Gadalla, A. E., Pearson, T., Currie, A. J., Dale, N., Hawley, S. A., Sheehan, M., Hirst, W., Michel, A. D., Randall, A., Hardie, D. G. et al.** (2004). AICA riboside both activates AMP-activated protein kinase and competes with adenosine for the nucleoside transporter in the CA1 region of the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry* **88**, 1272-1282.
- Galardo, M. N., Riera, M. F., Pellizzari, E. H., Sobarzo, C., Scarcelli, R., Denduchis, B., Lustig, L., Cigorruga, S. B. and Meroni, S. B.** (2010). Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. *Molecular and cellular endocrinology* **330**, 49-58.
- Galil, B.** (2000). A Sea Under Siege – Alien Species in the Mediterranean. *Biological Invasions* **2**, 177-186.
- Galtsoff, P. S.** (1964). The American Oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin.). *Fishery Bulletin* **64**, 480.
- Gao, G., Widmer, J., Stapleton, D., Teh, T., Cox, T., Kemp, B. E. and Witters, L. A.** (1995). Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase are members of the SNF1 protein kinase family. *Biochimica et biophysica acta* **1266**, 73-82.

- Gao, S., Kinzig, K. P., Aja, S., Scott, K. A., Keung, W., Kelly, S., Strynadka, K., Chohann, S., Smith, W. W., Tamashiro, K. L. et al.** (2007). Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 17358-17363.
- Garcia-Esquivel, Z., Bricelj, V. M. and Felbeck, H.** (2002). Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology* **133**, 63-77.
- Garton, A. J., Campbell, D. G., Carling, D., Hardie, D. G., Colbran, R. J. and Yeaman, S. J.** (1989). Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *European journal of biochemistry / FEBS* **179**, 249-254.
- Gauthier, M. S., Miyoshi, H., Souza, S. C., Cacicedo, J. M., Saha, A. K., Greenberg, A. S. and Ruderman, N. B.** (2008). AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *The Journal of biological chemistry* **283**, 16514-16524.
- Gehring, M., Bubb, K. L. and Henikoff, S.** (2009). Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science* **324**, 1447-1451.
- Gehring, M., Choi, Y. and Fischer, R. L.** (2004). Imprinting and seed development. *Plant Cell* **16 Suppl**, 203-213.
- Gissot, L., Polge, C., Bouly, J. P., Lemaitre, T., Kreis, M. and Thomas, M.** (2004). AKIN beta 3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic beta-subunits. *Plant Molecular Biology* **56**, 747-759.
- Gissot, L., Polge, C., Jossier, M., Girin, T., Bouly, J. P., Kreis, M. and Thomas, M.** (2006). AKIN beta gamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiology* **142**, 931-944.
- Gomez-Garcia, I., Oyenarte, I. and Martinez-Cruz, L. A.** (2010). The crystal structure of protein MJ1225 from *Methanocaldococcus jannaschii* shows strong conservation of key structural features seen in the eukaryal gamma-AMPK. *Journal of Molecular Biology* **399**, 53-70.
- Gonzalez, A. A., Kumar, R., Mulligan, J. D., Davis, A. J., Weindruch, R. and Saupe, K. W.** (2004). Metabolic adaptations to fasting and chronic caloric restriction in heart, muscle, and liver do not include changes in AMPK activity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **287**, 1032-1037.
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K. and Gerstein, M.** (2003). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome biology* **4**, 117.
- Gricourt, L., Bonnet, G., Boujard, D., Mathieu, M. and Kellner, K.** (2003). Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *General and Comparative Endocrinology* **134**, 44-56.
- Grieshaber, M. K., Hardewig, I., Kreutzer, U. and Portner, H. O.** (1994). Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **125**, 43-147.
- Grizel, H.** (1996a). Quelques exemples d'introductions et de transferts de mollusques. *Revue scientifique et technique - Office international des épizooties* **15**, 401-408.

- Grizel, H.** (1996b). Some examples of the introduction and transfer of mollusc populations. *Revue scientifique et technique - office international des épizooties* **15**, 401-408.
- Grizel, H. and Héral, M.** (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du conseil international pour l'exploration de la mer* **47**, 403.
- Gruzman, A., Shamni, O., Ben Yakir, M., Sandovski, D., Elgart, A., Alpert, E., Cohen, G., Hoffman, A., Katzhendler, Y., Cerasi, E. et al.** (2008). Novel D-xylose derivatives stimulate muscle glucose uptake by activating AMP-activated protein kinase alpha. *Journal of medicinal chemistry* **51**, 8096-8108.
- Guigas, B., Taleux, N., Foretz, M., Detaille, D., Andreelli, F., Viollet, B. and Hue, L.** (2007). AMP-activated protein kinase-independent inhibition of hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation by AICA riboside. *The Biochemical Journal* **404**, 499-507.
- Guo, X. M., Hedgecock, D., Hershberger, W. K., Cooper, K. and Allen, S. K.** (1998). Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* **52**, 394-402.
- Guo, Y., Xiao, P., Lei, S., Deng, F., Xiao, G. G., Liu, Y., Chen, X., Li, L., Wu, S., Chen, Y. et al.** (2008). How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **40**, 426-436.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. and Shaw, R. J.** (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* **30**, 214-226.
- Ha, J., Daniel, S., Broyles, S. S. and Kim, K. H.** (1994). Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *The Journal of biological chemistry* **269**, 22162-22168.
- Hadari, Y. R., Tzahar, E., Nadiv, O., Rothenberg, P., Roberts, C. T., Jr., LeRoith, D., Yarden, Y. and Zick, Y.** (1992). Insulin and insulinomimetic agents induce activation of phosphatidylinositol 3'-kinase upon its association with pp185 (IRS-1) in intact rat livers. *The Journal of biological chemistry* **267**, 17483-17486.
- Hamano, K., Awaji, M. and Usuki, H.** (2005). cDNA structure of an insulin-related peptide in the Pacific oyster and seasonal changes in the gene expression. *The Journal of endocrinology* **187**, 55-67.
- Han, S. M., Namkoong, C., Jang, P. G., Park, I. S., Hong, S. W., Katakami, H., Chun, S., Kim, S. W., Park, J. Y., Lee, K. U. et al.** (2005). Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia* **48**, 2170-2178.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. and Hunter, T.** (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
- Hardie, D. G.** (2004). The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *Journal of cell science* **117**, 5479-5487.
- Hardie, D. G.** (2008). AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *International journal of obesity* **32 Suppl 4**, 7-12.
- Hardie, D. G.** (2011). Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *The American journal of clinical nutrition* **93**, 891-896.
- Hardie, D. G., Carling, D. and Carlson, M.** (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annual review of biochemistry* **67**, 821-855.

Hardie, D. G. and Hawley, S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* **23**, 1112-1119.

Hardie, D. G., Hawley, S. A. and Scott, J. W. (2006). AMP-activated protein kinase - Development of the energy sensor concept. *The Journal of physiology* **574**, 7-15.

Hardie, D. G., Salt, I. P., Hawley, S. A. and Davies, S. P. (1999). AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *The Biochemical Journal* **338 (Pt 3)**, 717-722.

Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R. and Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of biology* **2**, 28.

Hawley, S. A., Davison, M., Woods, A., Davies, S. P., Beri, R. K., Carling, D. and Hardie, D. G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **271**, 27879-27887.

Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G. and Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism* **2**, 9-19.

Hayashi, T., Hirshman, M. F., Kurth, E. J., Winder, W. W. and Goodyear, L. J. (1998). Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* **47**, 1369-1373.

Henin, N., Vincent, M. F., Gruber, H. E. and Van den Berghe, G. (1995). Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB journal* **9**, 541-546.

Héral, M., Deslous-Paoli, J. M. and Prou, J. (1986). Influence du climat sur le recrutement et sur la production d'huîtres cultivées (*C. angulata* et *C. gigas*) dans le Bassin de Marennes-Oléron. *Haliotis* **15**, 193-207.

Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F. M., Favrel, P. and Cunningham, C. (2005). Structural and functional evidences for a type 1 TGF-beta sensu stricto receptor in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggest conserved molecular mechanisms controlling mesodermal patterning across bilateria. *Mechanisms of development* **122**, 695-705.

Herpin, A., Lelong, C. and Favrel, P. (2004). Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Developmental and Comparative Immunology* **28**, 461-485.

Herzig, S., Long, F., Jhala, U. S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P. et al. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 179-183.

Higaki, Y., Mikami, T., Fujii, N., Hirshman, M. F., Koyama, K., Seino, T., Tanaka, K. and Goodyear, L. J. (2008). Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **294**, 889-897.

Holmes, B. F., Kurth-Kraczek, E. J. and Winder, W. W. (1999). Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *Journal of applied physiology* **87**, 1990-1995.

- Holmes, B. F., Sparling, D. P., Olson, A. L., Winder, W. W. and Dohm, G. L.** (2005). Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **289**, 1071-1076.
- Hong, Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W. and Leff, T.** (2003). AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *The Journal of biological chemistry* **278**, 27495-27501.
- Hopkins, T. A., Dyck, J. R. and Lopaschuk, G. D.** (2003). AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochemical Society Transactions* **31**, 207-212.
- Horman, S., Browne, G., Krause, U., Patel, J., Vertommen, D., Bertrand, L., Lavoigne, A., Hue, L., Proud, C. and Rider, M.** (2002). Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Current biology* **12**, 1419-1423.
- Huang, S. L., Yu, R. T., Gong, J., Feng, Y., Dai, Y. L., Hu, F., Hu, Y. H., Tao, Y. D. and Leng, Y.** (2012). Arctigenin, a natural compound, activates AMP-activated protein kinase via inhibition of mitochondria complex I and ameliorates metabolic disorders in ob/ob mice. *Diabetologia* **55**, 1469-14681.
- Hudson, E. R., Pan, D. A., James, J., Lucocq, J. M., Hawley, S. A., Green, K. A., Baba, O., Terashima, T. and Hardie, D. G.** (2003). A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Current biology* **13**, 861-866.
- Hutber, C. A., Hardie, D. G. and Winder, W. W.** (1997). Electrical stimulation inactivates muscle acetyl-CoA carboxylase and increases AMP-activated protein kinase. *The American journal of physiology* **272**, 262-266.
- Hutchinson, D. S., Chernogubova, E., Dallner, O. S., Cannon, B. and Bengtsson, T.** (2005). Beta-adrenoceptors, but not alpha-adrenoceptors, stimulate AMP-activated protein kinase in brown adipocytes independently of uncoupling protein-1. *Diabetologia* **48**, 2386-2395.
- Huvet, A., Daniel, J. Y., Quere, C., Dubois, S., Prudence, M., Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Samain, J. F. and Moal, J.** (2003). Tissue expression of two alpha-amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture* **228**, 321-333.
- Huvet, A., Fleury, E., Corporeau, C., Quillien, V., Daniel, J.-Y., Riviere, G., Boudry, P. and Fabioux, C.** (2012). *In vivo* RNA interference of a gonad-specific transforming growth factor- β in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology* **14**, 402-410.
- Hwang, J. T., Kim, S. H., Lee, M. S., Yang, H. J., Kim, M. J., Kim, H. S., Ha, J., Kim, M. S. and Kwon, D. Y.** (2007). Anti-obesity effects of ginsenoside Rh2 are associated with the activation of AMPK signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **364**, 1002-1008.
- Hwang, J. T., Park, I. J., Shin, J. I., Lee, Y. K., Lee, S. K., Baik, H. W., Ha, J. and Park, O. J.** (2005). Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 694-699.
- Hwang, S. L., Yang, B. K., Lee, J. Y., Kim, J. H., Kim, B. D., Suh, K. H., Kim, D. Y., Kim, M. S., Song, H., Park, B. S. et al.** (2008). Isodihydrocapsiate stimulates plasma glucose uptake by activation of AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **371**, 289-293.

- Ignoul, S. and Eggermont, J.** (2005). CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *American journal of physiology. Cell physiology* **289**, 1369-1378.
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T. and Guan, K. L.** (2003a). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development* **17**, 1829-1834.
- Inoki, K., Zhu, T. and Guan, K. L.** (2003b). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590.
- Iseli, T. J., Walter, M., van Denderen, B. J., Katsis, F., Witters, L. A., Kemp, B. E., Michell, B. J. and Stapleton, D.** (2005). AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *The Journal of biological chemistry* **280**, 13395-13400.
- Izant, J. G. and Weintraub, H.** (1984). Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* **36**, 1007-1015.
- Jacobus, W. E.** (1985). Theoretical support for the heart phosphocreatine energy transport shuttle based on the intracellular diffusion limited mobility of ADP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **133**, 1035-1041.
- Jaffe, J. D., Berg, H. C. and Church, G. M.** (2004). Proteogenomic mapping as a complementary method to perform genome annotation. *Proteomics* **4**, 59-77.
- Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J. and Spiegelman, B. M.** (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12017-12022.
- Jaleel, M., McBride, A., Lizcano, J. M., Deak, M., Toth, R., Morrice, N. A. and Alessi, D. R.** (2005). Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate. *FEBS Letters* **579**, 1417-1423.
- James, D. E., Strube, M. and Mueckler, M.** (1989). Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* **338**, 83-87.
- Jensen, T. E., Schjerling, P., Viollet, B., Wojtaszewski, J. F. P. and Richter, E. A.** (2008). AMPK α 1 activation is required for stimulation of glucose uptake by twitch contraction, but not by H₂O₂, in mouse skeletal muscle. *PLoS One* **3**, 2102.
- Jiang, R. and Carlson, M.** (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Molecular and cellular biology* **17**, 2099-2106.
- Jorgensen, S. B., Jensen, T. E. and Richter, E. A.** (2007). Role of AMPK in skeletal muscle gene adaptation in relation to exercise. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* **32**, 904-911.
- Jost, J. A., Podolski, S. M. and Frederich, M.** (2012). Enhancing thermal tolerance by eliminating the pejus range: a comparative study with three decapod crustaceans. *Marine Ecology-Progress Series* **444**, 263-274.
- Jouaux, A.** (2010). Gestion de l'allocation d'énergie à la croissance ou à la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: implication d'une régulation par les insulino-like. In *Thèse de doctorat Université de Caen Basse-Normandie.*, pp. 270.
- Jouaux, A., Franco, A., Heude-Berthelin, C., Sourdaine, P., Blin, J. L., Mathieu, M. and Kellner, K.** (2011). Identification of Ras, Pten and p70S6K homologs in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and diet control of insulin pathway. *General and Comparative Endocrinology* **176**, 28-38.

Ju, J. S., Smith, J. L., Oppelt, P. J. and Fisher, J. S. (2005). Creatine feeding increases GLUT4 expression in rat skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **288**, 347-352.

Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism* **1**, 15-25.

Kamath, R. S. and Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-321.

Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H. and Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* **50**, 2438-2443.

Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P. et al. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **414**, 450-453.

Katkansky, S. C. and Sparks, A. K. (1966). Seasonal sexual pattern in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Washington State. *Fisheries Resources* **2**, 80-89.

Kaushik, V. K., Young, M. E., Dean, D. J., Kurowski, T. G., Saha, A. K. and Ruderman, N. B. (2001). Regulation of fatty acid oxidation and glucose metabolism in rat soleus muscle: effects of AICAR. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **281**, 335-340.

Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T. and Uyeda, K. (2002). Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **277**, 3829-2835.

Kaynard, A. H., Pau, K. Y., Hess, D. L. and Spies, H. G. (1990). Third-ventricular infusion of neuropeptide Y suppresses luteinizing hormone secretion in ovariectomized rhesus macaques. *Endocrinology* **127**, 2437-2444.

Kellner-Cousin, K., Boulo, V., Lacroix, I., Mialhe, E. and Mathieu, M. (1994a). Use of monoclonal-antibodies for identification of growth-controlling neuropeptides in the Mussel *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*

109, 689-698.

Kellner-Cousin, K., Mialhe, E. and Mathieu, M. (1994b). Identification of insulin-like peptides in cerebral ganglia neurosecretory-cells of the Mussel *Mytilus edulis*. *Tissue & Cell* **26**, 891-899.

Kelly, M., Keller, C., Avilucea, P. R., Keller, P., Luo, Z., Xiang, X., Giralt, M., Hidalgo, J., Saha, A. K., Pedersen, B. K. et al. (2004). AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **320**, 449-454.

Kemp, B. E. (2004). Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *Journal of clinical investigation* **113**, 182-184.

Kemp, B. E., Mitchelhill, K. I., Stapleton, D., Michell, B. J., Chen, Z.-P. and Witters, L. A. (1999). Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 22-25.

Kemp, B. E., Stapleton, D., Campbell, D. J., Chen, Z. P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J. J., Katsis, F., van Denderen, B. et al. (2003). AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochemical Society Transactions* **31**, 162-168.

Kennedy, V. S. (1996). The ecological role of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, with remarks on disease. *Journal of Shellfish Research* **15**, 177-183.

Khorram, O., Pau, K. Y. and Spies, H. G. (1987). Bimodal effects of neuropeptide Y on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone in conscious rabbits. *Neuroendocrinology* **45**, 290-297.

Kim, E. K., Miller, I., Aja, S., Landree, L. E., Pinn, M., McFadden, J., Kuhajda, F. P., Moran, T. H. and Ronnett, G. V. (2004). C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **279**, 19970-19976.

Kim, J., Yoon, M. Y., Choi, S. L., Kang, I., Kim, S. S., Kim, Y. S., Choi, Y. K. and Ha, J. (2001). Effects of stimulation of AMP-activated protein kinase on insulin-like growth factor 1- and epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* **276**, 19102-19110.

Kimball, S. R., Siegfried, B. A. and Jefferson, L. S. (2004). Glucagon represses signaling through the mammalian target of rapamycin in rat liver by activating AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **279**, 54103-54109.

King, N. P., Lee, T. M., Sawaya, M. R., Cascio, D. and Yeates, T. O. (2008). Structures and functional implications of an AMP-binding cystathionine beta-synthase domain protein from a hyperthermophilic archaeon. *Journal of Molecular Biology* **380**, 181-192.

Kirwan, J. P. and del Aguila, L. F. (2003). Insulin signalling, exercise and cellular integrity. *Biochemical Society Transactions* **31**, 1281-1285.

Knowles, J. R. (1980). Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. *Annual review of biochemistry* **49**, 877-919.

Koay, A., Rimmer, K. A., Mertens, H. D., Gooley, P. R. and Stapleton, D. (2007). Oligosaccharide recognition and binding to the carbohydrate binding module of AMP-activated protein kinase. *FEBS Letters* **581**, 5055-5059.

Koay, A., Woodcroft, B., Petrie, E. J., Yue, H., Emanuelle, S., Bieri, M., Bailey, M. F., Hargreaves, M., Park, J. T., Park, K. H. et al. (2010). AMPK beta subunits display isoform specific affinities for carbohydrates. *FEBS Letters* **584**, 3499-3503.

Kohno, D., Sone, H., Minokoshi, Y. and Yada, T. (2008). Ghrelin raises $[Ca^{2+}]_i$ via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **366**, 388-392.

Kola, B. (2008). Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. *Journal of neuroendocrinology* **20**, 942-951.

Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., Harvey-White, J., Liposits, Z., Kunos, G., Grossman, A. B. et al. (2008). The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One* **3**, 1797.

Kola, B., Hubina, E., Tucci, S. A., Kirkham, T. C., Garcia, E. A., Mitchell, S. E., Williams, L. M., Hawley, S. A., Hardie, D. G., Grossman, A. B. et al. (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **280**, 25196-25201.

- Kollara, A. and Brown, T. J.** (2010). Variable expression of nuclear receptor coactivator 4 (NcoA4) during mouse embryonic development. *The journal of histochemistry and cytochemistry* **58**, 595-609.
- Koo, S. H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Srean, R. A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P. et al.** (2005). The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* **437**, 1109-1111.
- Kovacic, S., Soltys, C. L. M., Barr, A. J., Shiojima, I., Walsh, K. and Dyck, J. R. B.** (2003). Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *The Journal of biological chemistry* **278**, 39422-39427.
- Kraemer, F. B. and Shen, W. J.** (2002). Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di)-acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *Journal of Lipids Research* **43**, 1585-1594.
- Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T. et al.** (2007). Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell metabolism* **6**, 55-68.
- Kudo, N., Barr, A. J., Barr, R. L., Desai, S. and Lopaschuk, G. D.** (1995). High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of biological chemistry* **270**, 17513-17520.
- Lafore, J.** (2008). Analyse spatio-temporelle de l'expression du gène codant pour le récepteur du neuropeptide Y, identifié pour son différentiel d'expression entre des lignées d'huîtres Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale, pp. 24. Paris: Université Pierre et Marie Curie.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Landree, L. E., Hanlon, A. L., Strong, D. W., Rumbaugh, G., Miller, I. M., Thupari, J. N., Connolly, E. C., Haganir, R. L., Richardson, C., Witters, L. A. et al.** (2004). C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. *The Journal of biological chemistry* **279**, 3817-3827.
- Lang, T., Yu, L., Tu, Q., Jiang, J., Chen, Z., Xin, Y., Liu, G. and Zhao, S.** (2000). Molecular cloning, genomic organization, and mapping of PRKAG2, a heart abundant gamma2 subunit of 5'-AMP-activated protein kinase, to human chromosome 7q36. *Genomics* **70**, 258-263.
- Lango-Reynoso, F.** (1999). Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Thèse de doctorat Université de Bretagne Occidentale*, 139.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., Cochard, J. C. and Le Pennec, M.** (2000). Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* **190**, 183-199.
- Laplanche, M. and Sabatini, David M.** (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* **149**, 274-293.
- Larade, K. and Storey, K. B.** (2007). Arrest of transcription following anoxic exposure in a marine mollusc. *Molecular and cellular biochemistry* **303**, 243-249.
- LaRue, B. L. and Padilla, P. A.** (2011). Environmental and genetic preconditioning for long-term anoxia responses requires AMPK in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **6**, 16790.

Lawlor, D. A., Relton, C., Sattar, N. and Nelson, S. M. (2012). Maternal adiposity-a determinant of perinatal and offspring outcomes? *Nature reviews. Endocrinology*.

Le Curieux-Belfond, O., Moslemi, S., Mathieu, M. and Seralini, G. E. (2001). Androgen metabolism in oyster *Crassostrea gigas*: evidence for 17 beta-HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **78**, 359-366.

Le Moullac, G., Fleury, P. G., Le Coz, J. R., Moal, J. and Samain, J. F. (2007). Effect of sediment nearness on the metabolic enzyme activity and energy state of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* **20**, 279-286.

Leckie, M. P., Porter, S. E., Tieber, V. L. and Dietzler, D. N. (1981). Regulation of the basal and cyclic AMP-stimulated rates of glycogen synthesis in *Escherichia coli* by an intermediate of purine biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **99**, 1433-1442.

Leclerc, C., Guerrier, P. and Moreau, M. (2000). Role of dihydropyridine-sensitive calcium channels in meiosis and fertilization in the bivalve molluscs *Ruditapes philippinarum* and *Crassostrea gigas*. *Biology of the Cell* **92**, 285-299.

Leclerc, I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaultont, S., Kahn, A. and Viollet, B. (2001). Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **50**, 1515-1521.

Lee, J. H., Moon, M. H., Jeong, J. K., Park, Y. G., Lee, Y. J., Seol, J. W. and Park, S. Y. (2012). Sulforaphane induced adipolysis via hormone sensitive lipase activation, regulated by AMPK signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

Lee, Y. S., Kim, W. S., Kim, K. H., Yoon, M. J., Cho, H. J., Shen, Y., Ye, J. M., Lee, C. H., Oh, W. K., Kim, C. T. et al. (2006). Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes* **55**, 2256-2264.

Lefebvre, D. L., Bai, Y. H., Shahmolky, N., Sharma, M., Poon, R., Drucker, D. J. and Rosen, C. F. (2001). Identification and characterization of a novel sucrose-non-fermenting protein kinase/AMP-activated protein kinase-related protein kinase, SNARK. *The Biochemical Journal* **355**, 297-305.

Leff, T. (2003). AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochemical Society Transactions* **31**, 224-227.

Lelong, C., Badariotti, F., Le Quere, H., Rodet, F., Dubos, M. P. and Favrel, P. (2007). Cg-TGF-beta, a TGF-beta/activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Developmental and Comparative Immunology* **31**, 30-38.

Lelong, C., Mathieu, M. and Favrel, P. (2000). Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor-beta superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 3986-3993.

Lent, C. M. (1968). Air-Gaping by the Ribbed Mussel, *Modiolus demissus* (Dillwyn): Effects and Adaptive Significance. *Biological Bulletin* **134**, 60-73.

Li, Q., Osada, M. and Mori, K. (2000). Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Science* **66**, 502-508.

Lian, Z., Li, Y., Gao, J., Qu, K., Li, J., Hao, L., Wu, S. and Zhu, H. (2011). A novel AMPK activator, WS070117, improves lipid metabolism discords in hamsters and HepG2 cells. *Lipids in health and disease* **10**, 67.

- Lin, H.** (1997). The tao of stem cells in the germline. *Annual Review of Genetics* **31**, 455-491.
- Liu, G., Grifman, M., Macdonald, J., Moller, P., Wong-Staal, F. and Li, Q. X.** (2007). Isoginkgetin enhances adiponectin secretion from differentiated adiposarcoma cells via a novel pathway involving AMP-activated protein kinase. *The Journal of endocrinology* **194**, 569-578.
- Liu, L., Cash, T. P., Jones, R. G., Keith, B., Thompson, C. B. and Simon, M. C.** (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Molecular cell* **21**, 521-531.
- Liu, Y., Cao, Y., Zhang, W., Bergmeier, S., Qian, Y., Akbar, H., Colvin, R., Ding, J., Tong, L., Wu, S. et al.** (2012). A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Molecular cancer therapeutics* **11**, 1672-1682.
- Lizcano, J. M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Hawley, S. A., Udd, L., Makela, T. P., Hardie, D. G. et al.** (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *Embo Journal* **23**, 833-843.
- Lochhead, P. A., Salt, I. P., Walker, K. S., Hardie, D. G. and Sutherland, C.** (2000). 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* **49**, 896-903.
- Lohmann, K.** (1929). Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* **17**, 624-625.
- Longnus, S. L., Wambolt, R. B., Parsons, H. L., Brownsey, R. W. and Allard, M. F.** (2003). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **284**, 936-944.
- Lopez, J. M.** (2008). Is ZMP the toxic metabolite in Lesch-Nyhan disease? *Medical hypotheses* **71**, 657-663.
- Lopez, M., Lage, R., Saha, A. K., Perez-Tilve, D., Vazquez, M. J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S., Tovar, S., Raghay, K., Rodriguez-Cuenca, S. et al.** (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell metabolism* **7**, 389-399.
- Lopez, M., Varela, L., Vazquez, M. J., Rodriguez-Cuenca, S., Gonzalez, C. R., Velagapudi, V. R., Morgan, D. A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R. et al.** (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nature medicine* **16**, 1001-1008.
- Luiken, J. J., Coort, S. L., Willems, J., Coumans, W. A., Bonen, A., van der Vusse, G. J. and Glatz, J. F.** (2003). Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* **52**, 1627-1634.
- Lund, S., Holman, G. D., Schmitz, O. and Pedersen, O.** (1995). Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5817-5821.

Luukko, K., Ylikorkala, A., Tiainen, M. and Makela, T. P. (1999). Expression of LKB1 and PTEN tumor suppressor genes during mouse embryonic development. *Mechanisms of development* **83**, 187-190.

MacArthur, R. and Wilson, E. (1967). The theory of island biogeography: Princeton University Press.

Magnuson, B., Ekim, B. and Fingar, D. C. (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *The Biochemical Journal* **441**, 1-21.

Mann, R., Burreson, E. and Baker, P. (1991). The decline of the Virginia oyster fishery in Chesapeake Bay: considerations for introduction of non-endemic species, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Shellfish Research* **10**, 379-388.

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912.

Markiewicz, W., Jaroszewski, J. J., Bossowska, A. and Majewski, M. (2003). NPY: its occurrence and relevance in the female reproductive system. *Folia histochemica et cytobiologica* **41**, 183-192.

Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D. and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current biology* **10**, 1247-1255.

Martinez de Morentin, P. B., Whittle, A. J., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A. and Lopez, M. (2012). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **61**, 807-817.

Martoja, R. and Martoja-Pierson, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris: Masson.

Matejkova, O., Mustard, K. J., Sponarova, J., Flachs, P., Rossmeisl, M., Miksik, I., Thomason-Hughes, M., Grahame Hardie, D. and Kopecky, J. (2004). Possible involvement of AMP-activated protein kinase in obesity resistance induced by respiratory uncoupling in white fat. *FEBS Letters* **569**, 245-248.

Mathieu, M., Lenoir, F. and Robbins, I. (1988). A gonial mitosis-stimulating factor in cerebral ganglia and hemolymph of the marine Mussel *Mytilus edulis*. *General and Comparative Endocrinology* **72**, 257-263.

Mathieu, M. and Lubet, P. (1993). Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves - a brief review. *Invertebrate Reproduction & Development* **23**, 123-129.

Matsumoto, T., Nakamura, A. M., Mori, K., Akiyama, I., Hirose, H. and Takahashi, Y. (2007). Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *General and Comparative Endocrinology* **151**, 195-201.

Matsumoto, T., Nakamura, A. M., Mori, K. and Kayano, T. (2003). Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zoological science* **20**, 37-42.

Matsumoto, T., Osada, M., Osawa, Y. and Mori, K. (1997). Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative biochemistry and physiology Part B: Biochemistry and molecular biology* **118**, 811-817.

- Mauser, M., Hoffmeister, H. M., Nienaber, C. and Schaper, W.** (1985). Influence of ribose, adenosine, and "AICAR" on the rate of myocardial adenosine triphosphate synthesis during reperfusion after coronary artery occlusion in the dog. *Circulation research* **56**, 220-230.
- Mayes, M. A., Laforest, M. F., Guillemette, C., Gilchrist, R. B. and Richard, F. J.** (2007). Adenosine 5'-monophosphate kinase-activated protein kinase (PRKA) activators delay meiotic resumption in porcine oocytes. *Biology of Reproduction* **76**, 589-597.
- McBride, A., Ghilagaber, S., Nikolaev, A. and Hardie, D. G.** (2009). The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell metabolism* **9**, 23-34.
- McBride, A. and Hardie, D. G.** (2009). AMP-activated protein kinase - A sensor of glycogen as well as AMP and ATP? *Acta Physiologica* **196**, 99 -113.
- McCrimmon, R. J., Fan, X., Ding, Y., Zhu, W., Jacob, R. J. and Sherwin, R. S.** (2004). Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus. *Diabetes* **53**, 1953-1958.
- McDonald, J. K., Lumpkin, M. D. and DePaolo, L. V.** (1989). Neuropeptide-Y suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized rats: possible site of action. *Endocrinology* **125**, 186-191.
- McLeod, H. L., Cassidy, J., Powrie, R. H., Priest, D. G., Zorbas, M. A., Synold, T. W., Shibata, S., Spicer, D., Bissett, D., Pithavala, Y. K. et al.** (2000). Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the glycinamide ribonucleotide formyltransferase inhibitor AG2034. *Clinical cancer research* **6**, 2677-2684.
- Mechoulam, R. and Gaoni, Y.** (1965). Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* **21**, 1223-1229.
- Merrill, G. F., Kurth, E. J., Hardie, D. G. and Winder, W. W.** (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *The American journal of physiology* **273**, 1107-1112.
- Merrill, G. F., Kurth, E. J., Rasmussen, B. B. and Winder, W. W.** (1998). Influence of malonyl-CoA and palmitate concentration on rate of palmitate oxidation in rat muscle. *Journal of applied physiology* **85**, 1909-1914.
- Michell, B. J., Stapleton, D., Mitchelhill, K. I., House, C. M., Katsis, F., Witters, L. A. and Kemp, B. E.** (1996). Isoform-specific purification and substrate specificity of the 5'-AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **271**, 28445-28450.
- Mihaylova, M. M. and Shaw, R. J.** (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature cell biology* **13**, 1016-1023.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y. B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M. J. et al.** (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428**, 569-574.
- Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., Carling, D. and Kahn, B. B.** (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415**, 339-343.
- Miossec, L., Le Deuff, R.-M. and Gouletquer, P.** (2009). Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Cooperative Research Report* **299**, 1-46.

Miranda-Saavedra, D., Stark, M. J., Packer, J. C., Vivares, C. P., Doerig, C. and Barton, G. J. (2007). The complement of protein kinases of the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi* in relation to those of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Genomics* **8**, 309.

Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., House, C. M., Stapleton, D., Dyck, J., Gamble, J., Ullrich, C., Witters, L. A. and Kemp, B. E. (1997). Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase beta1 subunit. *The Journal of biological chemistry* **272**, 24475-24479.

Mitchelhill, K. I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., Witters, L. A. and Kemp, B. E. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **269**, 2361-2364.

Momcilovic, M., Hong, S. P. and Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase *in vitro*. *The Journal of biological chemistry* **281**, 25336-25343.

Monk, M. (1988). Genomic imprinting. *Genes & development* **2**, 921-925.

Morris, B. J. (1989). Neuronal localisation of neuropeptide Y gene expression in rat brain. *Journal of comparative neurology* **290**, 358-368.

Motoshima, H., Goldstein, B. J., Igata, M. and Araki, E. (2006). AMPK and cell proliferation - AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *The Journal of physiology* **574**, 63-71.

Mulligan, J. D., Gonzalez, A. A., Stewart, A. M., Carey, H. V. and Saupe, K. W. (2007). Upregulation of AMPK during cold exposure occurs via distinct mechanisms in brown and white adipose tissue of the mouse. *The Journal of physiology* **580**, 677-684.

Munday, M. R. and Hardie, D. G. (1984). Isolation of three cyclic-AMP-independent acetyl-CoA carboxylase kinases from lactating rat mammary gland and characterization of their effects on enzyme activity. *European journal of biochemistry / FEBS* **141**, 617-627.

Muoio, D. M., Seefeld, K., Witters, L. A. and Coleman, R. A. (1999). AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *The Biochemical Journal* **338** (Pt 3), 783-791.

Musi, N. and Goodyear, L. J. (2003). AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta physiologica Scandinavica* **178**, 337-345.

Nagalingam, A., Arbiser, J. L., Bonner, M. Y., Saxena, N. K. and Sharma, D. (2012). Honokiol activates AMP-activated protein kinase in breast cancer cells via an LKB1-dependent pathway and inhibits breast carcinogenesis. *Breast cancer research* **14**, 35.

Naimi, A., Martinez, A. S., Specq, M. L., Mrac, A., Diss, B., Mathieu, M. and Sourdaine, P. (2009). Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology* **152**, 189-196.

Nakano, M., Hamada, T., Hayashi, T., Yonemitsu, S., Miyamoto, L., Toyoda, T., Tanaka, S., Masuzaki, H., Ebihara, K., Ogawa, Y. et al. (2006). alpha2 isoform-specific activation of 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose at a physiological level activates glucose transport and increases glucose transporter 4 in mouse skeletal muscle. *Metabolism* **55**, 300-208.

- Namkoong, C., Kim, M. S., Jang, P. G., Han, S. M., Park, H. S., Koh, E. H., Lee, W. J., Kim, J. Y., Park, I. S., Park, J. Y. et al.** (2005). Enhanced hypothalamic AMP-activated protein kinase activity contributes to hyperphagia in diabetic rats. *Diabetes* **54**, 63-68.
- Narbonne, P. and Roy, R.** (2006). Inhibition of germline proliferation during *C. elegans* dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling. *Development* **133**, 611-619.
- Nascimento, I. A.** (1991). *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *C. brasiliiana* (Lamarck) in South and Central America. *Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture (Menzel)*, 125-134.
- Newell, R. C.** (1979). Biology of Intertidal Animals. *Marine Ecological Surveys Ltd*, 781.
- Normand, J.** (2009). Déterminismes génétiques de l'allocation à la reproduction chez les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) triploïdes. In *Thèse de doctorat Université de La Rochelle*, pp. 232.
- Noy, P., Sawasdichai, A., Jayaraman, P. S. and Gaston, K.** (2012). Protein kinase CK2 inactivates PRH/Hhex using multiple mechanisms to de-repress VEGF-signalling genes and promote cell survival. *Nucleic acids research*.
- Oh, S., Kim, S. J., Hwang, J. H., Lee, H. Y., Ryu, M. J., Park, J., Jo, Y. S., Kim, Y. K., Lee, C. H., Kweon, K. R. et al.** (2010). Antidiabetic and antiobesity effects of Ampkinone (6f), a novel small molecule activator of AMP-activated protein kinase. *Journal of medicinal chemistry* **53**, 7405-7413.
- Orensanz, J. M., Schwindt, E., Pastorino, G., Bortolus, A., Casas, G., Darrigran, G., Elías, R., López Gappa, J. J., Obenat, S., Pascual, M. et al.** (2002). No longer the pristine confines of the world ocean: A survey of exotic marine species in the Southwestern Atlantic. *Biological Invasions* **4**, 115-143.
- Orlenko, A. N.** (1994). The Acclimatization of Giant Oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia, Mytiliformes, Crassostreidae) and the Principal Stages of Its Introduction in the Black Sea. *Zoologicheskyy Zhurnal* **73**, 51-54.
- Osanai, K. and Kyojuka, K.** (1985). Induction of geminal vesicle breakdown and re-Initiation of meiosis in oyster oocytes. *Zoological Science* **2**, 942-942.
- Owen, M. R., Doran, E. and Halestrap, A. P.** (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical Journal* **348**, 607-614.
- Pain, V. M.** (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *European journal of biochemistry / FEBS* **236**, 747-771.
- Palanivel, R. and Sweeney, G.** (2005). Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin. *FEBS Letters* **579**, 5049-5054.
- Pan, W., Yang, H., Cao, C., Song, X., Wallin, B., Kivlin, R., Lu, S., Hu, G., Di, W. and Wan, Y.** (2008). AMPK mediates curcumin-induced cell death in CaOV3 ovarian cancer cells. *Oncology reports* **20**, 1553-1559.
- Pang, T., Zhang, Z. S., Gu, M., Qiu, B. Y., Yu, L. F., Cao, P. R., Shao, W., Su, M. B., Li, J. Y., Nan, F. J. et al.** (2008). Small molecule antagonizes autoinhibition and activates AMP-activated protein kinase in cells. *The Journal of biological chemistry* **283**, 16051-16060.
- Park, S. H., Gammon, S. R., Knippers, J. D., Paulsen, S. R., Rubink, D. S. and Winder, W. W.** (2002). Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *Journal of applied physiology* **92**, 2475-2482.

Parker, G. A. (1982). Why are there so many tiny sperm - Sperm competition and the maintenance of 2 Sexes. *Journal of Theoretical Biology* **96**, 281-294.

Pauley, G. B., Van Der Raay, B. and Troutt, D. (1988). Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) - Pacific oyster. *United States Fish Wildlife Service. Biological Report* **82**, 28.

Philp, L. K., Muhlhausler, B. S., Janovska, A., Wittert, G. A., Duffield, J. A. and McMillen, I. C. (2008). Maternal overnutrition suppresses the phosphorylation of 5'-AMP-activated protein kinase in liver, but not skeletal muscle, in the fetal and neonatal sheep. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **295**, 1982-1990.

Pinz, I., Perry, D. J. and Frederich, M. (2005). Activation of 5'-AMP activated protein kinase during anaerobiosis in the rock crab, *Cancer irroratus*. *Bulletin of the Mount Desert Island Biological Laboratory* **44**, 31-32.

Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B. J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S. C., Jennings, I. G., Campbell, D. J., Witters, L. A., Parker, M. W. et al. (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Current biology* **13**, 867-871.

Polge, C. and Thomas, M. (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends in plant science* **12**, 20-28.

Ponticos, M., Lu, Q. L., Morgan, J. E., Hardie, D. G., Partridge, T. A. and Carling, D. (1998). Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *Embo Journal* **17**, 1688-1699.

Priebe, A., Tan, L., Wahl, H., Kueck, A., He, G., Kwok, R., Opipari, A. and Liu, J. R. (2011). Glucose deprivation activates AMPK and induces cell death through modulation of Akt in ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology* **122**, 389-395.

Quayle, D. B. (1969). Pacific oyster culture in British Columbia. Ottawa, Canada: Fisheries Research Board of Canada.

Quinn, B., Costello, M. J., Dorange, G., Wilson, J. G. and Mothersill, C. (2009). Development of an *in vitro* culture method for cells and tissues from the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Cytotechnology* **59**, 121-134.

Rafrafi, S. and Uglow, R. F. (2009). Nitrogenous compounds changes in emersed oysters: *Crassostrea gigas*. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **81**, 210-214.

Ramamurthy, S. and Ronnett, G. (2012). AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and Energy-Sensing in the Brain. *Experimental neurobiology* **21**, 52-60.

Ramirez, M. E. V., Le Pennec, M., Dorange, G., Devauchelle, N. and Nonnotte, G. (1999). Assessment of female gamete quality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction & Development* **36**, 73-78.

Ramnanan, C. J., McMullen, D. C., Groom, A. G. and Storey, K. B. (2010). The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. *Molecular and cellular biochemistry* **335**, 91-105.

Ratchford, A., Esguerra, C. and Moley, K. (2007). Decreased expression of LKB1, an AMPK regulator, in oocytes of diabetic mice. *Biology of Reproduction*, 169-169.

Rebora, K., Laloo, B. and Daignan-Fornier, B. (2005). Revisiting purine-histidine cross-pathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: A central role for a small molecule. *Genetics* **170**, 61-70.

- Renard, J. P., Barra, J. and Babinet, C.** (1988). Action of the paternal genome at the beginning of embryonic development. *Reproduction, nutrition, development* **28**, 1541-1554.
- Rider, M. H., Hussain, N., Dilworth, S. M. and Storey, K. B.** (2009). Phosphorylation of translation factors in response to anoxia in turtles, *Trachemys scripta elegans*: role of the AMP-activated protein kinase and target of rapamycin signalling pathways. *Molecular and cellular biochemistry* **332**, 207-213.
- Riera, M. F., Regueira, M., Galardo, M. N., Pellizzari, E. H., Meroni, S. B. and Cigorruga, S. B.** (2012). Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **302**, 914-923.
- Robbins, I., Lenoir, F. and Mathieu, M.** (1990). A putative neuroendocrine factor that stimulates glycogen mobilization in isolated glycogen cells from the marine mussel *Mytilus edulis*. *General and Comparative Endocrinology* **79**, 123-129.
- Robbins, I., Lenoir, F. and Mathieu, M.** (1991). Neuroendocrine Factors Affecting the Glycogen-Metabolism of Purified *Mytilus-Edulis* Glycogen Cells - Partial Characterization of the Putative Glycogen Mobilization Hormone Demonstration of a Factor That Stimulates Glycogen-Synthesis. *General and Comparative Endocrinology* **82**, 45-52.
- Robinson, T. B., Griffiths, C. L., Tonin, A., Bloomer, P. and Hare, M. P.** (2005). Naturalized populations of oysters, *Crassostrea gigas* along the South African coast: Distribution, abundance and population structure. *Journal of Shellfish Research* **24**, 443-450.
- Roland, A. V. and Moenter, S. M.** (2011a). Glucosensing by GnRH neurons: inhibition by androgens and involvement of AMP-activated protein kinase. *Molecular endocrinology* **25**, 847-858.
- Roland, A. V. and Moenter, S. M.** (2011b). Regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by glucose. *Trends in endocrinology and metabolism* **22**, 443-449.
- Romano, A., Guéant-Rodriguez, R.-M., Viola, M., Gaeta, F., Caruso, C. and Guéant, J.-L.** (2005). Cross-reactivity among drugs: clinical problems. *Toxicology* **209**, 169-179.
- Ropelle, E. R., Pauli, J. R., Cintra, D. E., Frederico, M. J., de Pinho, R. A., Velloso, L. A. and De Souza, C. T.** (2009). Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *The Journal of physiology* **587**, 2069-2076.
- Rosa, R. D., de Lorgetil, J., Tailliez, P., Bruno, R., Piquemal, D. and Bachere, E.** (2012). A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. *BMC Genomics* **13**, 252.
- Rothbart, S. B., Racanelli, A. C. and Moran, R. G.** (2010). Pemetrexed indirectly activates the metabolic kinase AMPK in human carcinomas. *Cancer research* **70**, 10299-10309.
- Ruas, J. L., White, J. P., Rao, R. R., Kleiner, S., Brannan, K. T., Harrison, B. C., Greene, N. P., Wu, J., Estall, J. L., Irving, B. A. et al.** (2012). A PGC-1alpha Isoform Induced by Resistance Training Regulates Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell* **151**, 1319-31.
- Ruderman, N. B., Saha, A. K., Vavvas, D. and Witters, L. A.** (1999). Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *The American journal of physiology* **276**, 1-18.
- Russell, R. R., 3rd, Bergeron, R., Shulman, G. I. and Young, L. H.** (1999). Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *The American journal of physiology* **277**, 643-649.

- Saha, A. K., Schwarsin, A. J., Roduit, R., Masse, F., Kaushik, V., Tornheim, K., Prentki, M. and Ruderman, N. B.** (2000). Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta -D-ribofuranoside. *The Journal of biological chemistry* **275**, 24279-24283.
- Sahlin, K. and Katz, A.** (1989). Hypoxaemia increases the accumulation of inosine monophosphate (IMP) in human skeletal muscle during submaximal exercise. *Acta physiologica Scandinavica* **136**, 199-203.
- Sakamoto, K., Goransson, O., Hardie, D. G. and Alessi, D. R.** (2004). Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **287**, 310-317.
- Saks, V. A., Kuznetsov, A. V., Kupriyanov, V. V., Miceli, M. V. and Jacobus, W. E.** (1985). Creatine kinase of rat heart mitochondria. The demonstration of functional coupling to oxidative phosphorylation in an inner membrane-matrix preparation. *The Journal of biological chemistry* **260**, 7757-7764.
- Salminen, A. and Kaarniranta, K.** (2012). AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Research Reviews* **11**, 230-241.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Soininen, H. and Hiltunen, M.** (2011). AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **118**, 460-474.
- Salmon, A. B., Marx, D. B. and Harshman, L. G.** (2001). A cost of reproduction in *Drosophila melanogaster*: stress susceptibility. *Evolution* **55**, 1600-1608.
- Salt, I., Celler, J. W., Hawley, S. A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D. and Hardie, D. G.** (1998a). AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *The Biochemical Journal* **334 (Part 1)**, 177-187.
- Salt, I. P., Johnson, G., Ashcroft, S. J. and Hardie, D. G.** (1998b). AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. *The Biochemical Journal* **335 (Pt 3)**, 533-539.
- Sanchez, A. M., Candau, R. B., Csibi, A., Pagano, A. F., Raibon, A. and Bernardi, H.** (2012). The role of AMP-activated protein kinase in the coordination of skeletal muscle turnover and energy homeostasis. *American journal of physiology. Cell physiology* **303**, 475-485.
- Sasson, R., Dearth, R. K., White, R. S., Chappell, P. E. and Mellon, P. L.** (2006). Orexin A induces GnRH gene expression and secretion from GT1-7 hypothalamic GnRH neurons. *Neuroendocrinology* **84**, 353-363.
- Schaeffer, H. J. and Weber, M. J.** (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology* **19**, 2435-2444.
- Schmidt, M. C. and McCartney, R. R.** (2000). beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *Embo Journal* **19**, 4936-4493.
- Schneider, J. E.** (2004). Energy balance and reproduction. *Physiology & behavior* **81**, 289-317.
- Scott, J. W.** (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *Journal of clinical investigation* **113**, 274-284.

- Seo, S., Ju, S., Chung, H., Lee, D. and Park, S.** (2008). Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *Endocrine journal* **55**, 867-874.
- Shafee, M. S. and Sabatie, M. R.** (1986). Growth and Mortality of Pacific Oysters in Oualidia Lagoon (Morocco). *Aquaculture* **53**, 201-214.
- Shang, J. and Lehrman, M. A.** (2004). Activation of glycogen phosphorylase with 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR). Assessment of glycogen as a precursor of mannosyl residues in glycoconjugates. *The Journal of biological chemistry* **279**, 12076-12080.
- Shaw, R. J., Bardeesy, N., Manning, B. D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R. A. and Cantley, L. C.** (2004a). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**, 91-99.
- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A. and Cantley, L. C.** (2004b). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3329-3335.
- Shaw, R. J., Lamia, K. A., Vasquez, D., Koo, S. H., Bardeesy, N., Depinho, R. A., Montminy, M. and Cantley, L. C.** (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* **310**, 1642-1646.
- Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Boucherie, H. and Mann, M.** (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14440-14445.
- Shibata, R., Ouchi, N., Ito, M., Kihara, S., Shiojima, I., Pimentel, D. R., Kumada, M., Sato, K., Schiekofer, S., Ohashi, K. et al.** (2004). Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nature medicine* **10**, 1384-1389.
- Shim, M. S. and Kwon, Y. J.** (2010). Efficient and targeted delivery of siRNA *in vivo*. *FEBS journal* **277**, 4814-4827.
- Shimizu, H., Arima, H., Watanabe, M., Goto, M., Banno, R., Sato, I., Ozaki, N., Nagasaki, H. and Oiso, Y.** (2008). Glucocorticoids increase neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling in the arcuate nucleus of rats. *Endocrinology* **149**, 4544-4553.
- Sim, A. T. and Hardie, D. G.** (1988). The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Letters* **233**, 294-298.
- Skrobuk, P., von Kraemer, S., Semenova, M. M., Zitting, A. and Koistinen, H. A.** (2012). Acute exposure to resveratrol inhibits AMPK activity in human skeletal muscle cells. *Diabetologia*.
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G. and Sukhotin, A. A.** (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research* **79**, 1-15.
- Song, Y. P., Suquet, M., Queau, I. and Lebrun, L.** (2009). Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Aquaculture* **287**, 311-314.
- Spriet, L. L.** (1992). Anaerobic metabolism in human skeletal muscle during short-term, intense activity. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **70**, 157-165.

Srivastava, R. A., Pinkosky, S. L., Filippov, S., Hanselman, J. C., Cramer, C. T. and Newton, R. S. (2012). AMP-activated protein kinase: An emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases. *Journal of Lipids Research*

Stapleton, D., Gao, G., Michell, B. J., Widmer, J., Mitchelhill, K., Teh, T., House, C. M., Witters, L. A. and Kemp, B. E. (1994). Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **269**, 29343-29346.

Stapleton, D., Mitchelhill, K. I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B. J., Teh, T., House, C. M., Fernandez, C. S., Cox, T., Witters, L. A. et al. (1996). Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *The Journal of biological chemistry* **271**, 611-614.

Steele, S. and Mulcahy, M. F. (1999). Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in Southern Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **79**, 673-686.

Stein, S. C., Woods, A., Jones, N. A., Davison, M. D. and Carling, D. (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *The Biochemical Journal* **345 (Part 3)**, 437-443.

Steinberg, G. R. and Kemp, B. E. (2009). AMPK in health and disease. *Physiological reviews* **89**, 1025-1078.

Steinberg, G. R., Watt, M. J., Fam, B. C., Proietto, J., Andrikopoulos, S., Allen, A. M., Febbraio, M. A. and Kemp, B. E. (2006). Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. *Endocrinology* **147**, 3906-3914.

Stenslokken, K. O., Ellefsen, S., Stecyk, J. A., Dahl, M. B., Nilsson, G. E. and Vaage, J. (2008). Differential regulation of AMP-activated kinase and AKT kinase in response to oxygen availability in crucian carp (*Carassius carassius*). *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **295**, 1803-1814.

Storey, K. B. (1993). Molecular mechanisms of metabolic arrest in molluscs. In *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. CRC press, 253-269.

Storey, K. B. and Storey, J. M. (1990). Metabolic-rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Quarterly Review of Biology* **65**, 145-174.

Streftaris, N., Zenetos, A. and Papathanassiou, E. (2005). Globalisation in marine ecosystems: The story of non-indigenous marine species across European seas. *Oceanography and Marine Biology - an Annual Review* **43**, 419-453.

Stricker, S. A. (1999). Comparative Biology of Calcium Signaling during Fertilization and Egg Activation in Animals. *Developmental Biology* **211**, 157-176.

Stricker, S. A. (2011). Potential upstream regulators and downstream targets of AMP-activated kinase signaling during oocyte maturation in a marine worm. *Reproduction* **142**, 29-39.

Stricker, S. A. (2012). Inhibition of germinal vesicle breakdown by antioxidants and the roles of signaling pathways related to nitric oxide and cGMP during meiotic resumption in oocytes of a marine worm. *Reproduction* **143**, 261-270.

Stricker, S. A., Escalona, J. R., Abernathy, S. and Marquardt, A. (2010a). Pharmacological analyses of protein kinases regulating egg maturation in marine nemertean worms: a review and comparison with Mammalian eggs. *Marine drugs* **8**, 2417-2434.

- Stricker, S. A., Swiderek, L. and Nguyen, T.** (2010b). Stimulators of AMP-activated kinase (AMPK) inhibit seawater- but not cAMP-induced oocyte maturation in a marine worm: Implications for interactions between cAMP and AMPK signaling. *Molecular reproduction and development* **77**, 497-510.
- Sturtevant, A. H.** (1923). Inheritance of Direction of Coiling in *Limnaea*. *Science* **58**, 269-270.
- Sullivan, J. E., Brocklehurst, K. J., Marley, A. E., Carey, F., Carling, D. and Beri, R. K.** (1994). Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Letters* **353**, 33-36.
- Sung, J. Y., Woo, C. H., Kang, Y. J., Lee, K. Y. and Choi, H. C.** (2011). AMPK induces vascular smooth muscle cell senescence via LKB1 dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **413**, 143-148.
- Suquet, M., de Kermoisan, G., Araya, R. G., Queau, I., Lebrun, L., Le Souchu, P. and Mingant, C.** (2009). Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* **22**, 29-34.
- Suquet, M., Labbe, C., Brizard, R., Donval, A., Le Coz, J. R., Quere, C. and 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.
- Surani, M. A.** (1991). Influence of genome imprinting on gene expression, phenotypic variations and development. *Human reproduction* **6**, 45-51.
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E. and Moraga, D.** (2010). Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Marine genomics* **3**, 133-143.
- Talley, L. D., Pickard, G. L., Emery, W. J. and Swift, J. H.** (2011). Chapter 14 - Global Circulation and Water Properties. In *Descriptive Physical Oceanography (Sixth Edition)*, pp. 473-511. Boston: Academic Press.
- Tanaka, T., Masuzaki, H., Yasue, S., Ebihara, K., Shiuchi, T., Ishii, T., Arai, N., Hirata, M., Yamamoto, H., Hayashi, T. et al.** (2007). Central melanocortin signaling restores skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* **5**, 395-402.
- Tanwar, P. S., Kaneko-Tarui, T., Zhang, L. and Teixeira, J. M.** (2012). Altered LKB1/AMPK/TSC1/TSC2/mTOR signaling causes disruption of Sertoli cell polarity and spermatogenesis. *Human molecular genetics* **21**, 4394-4405.
- Tartarin, P., Guibert, E., Toure, A., Ouiste, C., Leclerc, J., Sanz, N., Briere, S., Dacheux, J.-L., Delaleu, B., McNeilly, J. R. et al.** (2012). Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology* **153**, 3468-3481.
- Taylor, E. C.** (1993). Design and synthesis of inhibitors of folate-dependent enzymes as antitumor agents. *Advances in experimental medicine and biology* **338**, 387-408.
- Thelander, M., Olsson, T. and Ronne, H.** (2004). Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *Embo Journal* **23**, 1900-1910.
- Thomson, J. M.** (1952). The Acclimatization and Growth of the Pacific Oyster (*Gryphaea gigas*) in Australia. *Marine and Freshwater Research* **3**, 64-73.
- Thomson, J. M.** (1959). The Naturalization of the Pacific Oyster in Australia. *Marine and Freshwater Research* **10**, 144-149.

Thornton, C., Snowden, M. A. and Carling, D. (1998). Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* **273**, 12443-12450.

Thunberg, C. P. (1793). Tekning och Beskrifning på en stor Ostronsort ifrån Japan. In *Kongliga Vetenskaps Akademiens Nya Handlingar*, vol. 14, pp. 140-142.

Tomas, E., Tsao, T. S., Saha, A. K., Murrey, H. E., Zhang Cc, C., Itani, S. I., Lodish, H. F. and Ruderman, N. B. (2002). Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16309-16313.

Tosca, L., Chabrolle, C., Uzbekova, S. and Dupont, J. (2007a). Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biology of Reproduction* **76**, 368-378.

Tosca, L., Crochet, S., Ferre, P., Fougelle, F., Tesseraud, S. and Dupont, J. (2006a). AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *The Journal of endocrinology* **190**, 85-97.

Tosca, L., Froment, P., Rame, C., McNeilly, J. R., McNeilly, A. S., Maillard, V. and Dupont, J. (2011). Metformin decreases GnRH- and activin-induced gonadotropin secretion in rat pituitary cells: potential involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA). *Biology of Reproduction* **84**, 351-362.

Tosca, L., Froment, P., Solnais, P., Ferre, P., Fougelle, F. and Dupont, J. (2005). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* **146**, 4500-4513.

Tosca, L., Solnais, P., Ferre, P., Fougelle, F. and Dupont, J. (2006b). Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. *Biology of Reproduction* **75**, 342-351.

Tosca, L., Uzbekova, S., Chabrolle, C. and Dupont, J. (2007b). Possible role of 5'AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction* **77**, 452-465.

Towler, M. C., Fogarty, S., Hawley, S. A., Pan, D. A., Martin, D. M., Morrice, N. A., McCarthy, A., Galardo, M. N., Meroni, S. B., Cigorruga, S. B. et al. (2008). A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *The Biochemical Journal* **416**, 1-14.

Towler, M. C. and Hardie, D. G. (2007). AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circulation research* **100**, 328-341.

Townley, R. and Shapiro, L. (2007). Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science* **315**, 1726-1729.

Toyoda, T., Hayashi, T., Miyamoto, L., Yonemitsu, S., Nakano, M., Tanaka, S., Ebihara, K., Masuzaki, H., Hosoda, K., Inoue, G. et al. (2004). Possible involvement of the alpha1 isoform of 5'AMP-activated protein kinase in oxidative stress-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **287**, 166-173.

Tran, D., Boudou, A. and Massabuau, J. C. (2000). Mechanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne De Zoologie* **78**, 2027-2036.

- Trevaan, J. W.** (1927). The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **100**, 483-514.
- Trumble, G. E., Smith, M. A. and Winder, W. W.** (1995). Purification and characterization of rat skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. *European journal of biochemistry / FEBS* **231**, 192-198.
- Tsao, T. S., Li, J., Chang, K. S., Stenbit, A. E., Galuska, D., Anderson, J. E., Zierath, J. R., McCarter, R. J. and Charron, M. J.** (2001). Metabolic adaptations in skeletal muscle overexpressing GLUT4: effects on muscle and physical activity. *FASEB journal* **15**, 958-969.
- Turnley, A. M., Stapleton, D., Mann, R. J., Witters, L. A., Kemp, B. E. and Bartlett, P. F.** (1999). Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *Journal of neurochemistry* **72**, 1707-1716.
- Ulrich, P. N. and Marsh, A. G.** (2009). Thermal sensitivity of mitochondrial respiration efficiency and protein phosphorylation in the clam *Mercenaria mercenaria*. *Marine biotechnology* **11**, 608-618.
- Ungvari, Z., Ridgway, I., Philipp, E. E., Campbell, C. M., McQuary, P., Chow, T., Coelho, M., Didier, E. S., Gelino, S., Holmbeck, M. A. et al.** (2011). Extreme longevity is associated with increased resistance to oxidative stress in *Arctica islandica*, the longest-living non-colonial animal. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **66**, 741-750.
- Van Den Berghe, G. H. and Gruber, H. E.** (1993). method for lowering blood lipid levels. WO: Genshia pharmaceuticals, Incorporation.
- van der Veer, H. W., Cardoso, J. F. M. F. and van der Meer, J.** (2006). The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. *Journal of Sea Research* **56**, 107-124.
- Venter, J. C. Adams, M. D. Myers, E. W. Li, P. W. Mural, R. J. Sutton, G. G. Smith, H. O. Yandell, M. Evans, C. A. Holt, R. A. et al.** (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Viana, R., Towler, M. C., Pan, D. A., Carling, D., Viollet, B., Hardie, D. G. and Sanz, P.** (2007). A conserved sequence immediately N-terminal to the Bateman domains in AMP-activated protein kinase gamma subunits is required for the interaction with the beta subunits. *The Journal of biological chemistry* **282**, 16117-16125.
- Villen, J., Beausoleil, S. A., Gerber, S. A. and Gygi, S. P.** (2007). Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1488-1493.
- Vincent, M. F., Bontemps, F. and Van den Berghe, G.** (1992). Inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in isolated rat hepatocytes. *The Biochemical Journal* **281 (Pt 1)**, 267-272.
- Vincent, M. F., Bontemps, F. and Van den Berghe, G.** (1996). Substrate cycling between 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside and its monophosphate in isolated rat hepatocytes. *Biochemical pharmacology* **52**, 999-1006.
- Vincent, M. F., Marangos, P. J., Gruber, H. E. and Van den Berghe, G.** (1991). Inhibition by AICA riboside of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* **40**, 1259-1266.
- Vingtdeux, V., Chandakkar, P., Zhao, H., Davies, P. and Marambaud, P.** (2011). Small-molecule activators of AMP-activated protein kinase (AMPK), RSVA314 and RSVA405, inhibit adipogenesis. *Molecular medicine* **17**, 1022-1030.

Viollet, B., Andreelli, F., Jorgensen, S. B., Perrin, C., Geloën, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Bennoun, M. et al. (2003). The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *Journal of clinical investigation* **111**, 91-98.

Viollet, B., Horman, S., Leclerc, J., Lantier, L., Foretz, M., Billaud, M., Giri, S. and Andreelli, F. (2010). AMPK inhibition in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **45**, 276-295.

Volante, M., Allia, E., Gugliotta, P., Funaro, A., Broglio, F., Deghenghi, R., Muccioli, G., Ghigo, E. and Papotti, M. (2002). Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **87**, 1300-1308.

Wang, A., Liu, M., Liu, X., Dong, L. Q., Glickman, R. D., Slaga, T. J., Zhou, Z. and Liu, F. (2011). Up-regulation of adiponectin by resveratrol: the essential roles of the Akt/FOXO1 and AMP-activated protein kinase signaling pathways and DsbA-L. *The Journal of biological chemistry* **286**, 60-66.

Wang, H., Liu, F., Millette, C. F. and Kilpatrick, D. L. (2002a). Expression of a novel, sterol-insensitive form of sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) in male germ cells suggests important cell- and stage-specific functions for SREBP targets during spermatogenesis. *Molecular and cellular biology* **22**, 8478-8490.

Wang, S., Song, P. and Zou, M. H. (2012). AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. *Clinical science* **122**, 555-573.

Wang, W., Fan, J., Yang, X., Furer-Galban, S., Lopez de Silanes, I., von Kobbe, C., Guo, J., Georas, S. N., Fougelle, F., Hardie, D. G. et al. (2002b). AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Molecular and cellular biology* **22**, 3425-3436.

Warden, S. M., Richardson, C., O'Donnell, J., Jr., Stapleton, D., Kemp, B. E. and Witters, L. A. (2001). Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *The Biochemical Journal* **354**, 275-283.

Weinberg, J. (1995). Ocean quahog. In *Status of the fishery resources off the northeastern United States for 1994*, (ed. N. F. S. C. Conservation and utilization division), pp. 121-122: NOAA technical memorandum.

Wen, J. P., Liu, C., Bi, W. K., Hu, Y. T., Chen, Q., Huang, H., Liang, J. X., Li, L. T., Lin, L. X. and Chen, G. (2012). Adiponectin inhibits KISS1 gene transcription through AMPK and specificity protein-1 in the hypothalamic GT1-7 neurons. *The Journal of endocrinology* **214**, 177-189.

Whitman, M., Kaplan, D. R., Schaffhausen, B., Cantley, L. and Roberts, T. M. (1985). Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* **315**, 239-242.

Whyte, J. N. C., Englar, J. R. and Carswell, B. L. (1990). Biochemical-Composition and Energy Reserves in *Crassostrea gigas* Exposed to Different Levels of Nutrition. *Aquaculture* **90**, 157-172.

Winder, W. W. and Hardie, D. G. (1996). Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *The American journal of physiology* **270**, 299-304.

Winder, W. W. and Hardie, D. G. (1999). AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *The American journal of physiology* **277**, 1-10.

- Winder, W. W., Holmes, B. F., Rubink, D. S., Jensen, E. B., Chen, M. and Holloszy, J. O.** (2000). Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *Journal of applied physiology* **88**, 2219-2226.
- Winder, W. W., Wilson, H. A., Hardie, D. G., Rasmussen, B. B., Hutber, C. A., Call, G. B., Clayton, R. D., Conley, L. M., Yoon, S. and Zhou, B.** (1997). Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. *Journal of applied physiology* **82**, 219-225.
- Witters, L. A., Gao, G., Kemp, B. E. and Quistorff, B.** (1994). Hepatic 5'-AMP-activated protein kinase: zonal distribution and relationship to acetyl-CoA carboxylase activity in varying nutritional states. *Archives of biochemistry and biophysics* **308**, 413-419.
- Witters, L. A., Nordlund, A. C. and Marshall, L.** (1991). Regulation of intracellular acetyl-CoA carboxylase by ATP depletors mimics the action of the 5'-AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **181**, 1486-1492.
- Wojcik-Gladysz, A. and Polkowska, J.** (2006). Neuropeptide Y--a neuromodulatory link between nutrition and reproduction at the central nervous system level. *Reproductive biology* **6 Suppl 2**, 21-28.
- Wojtaszewski, J. F., Mourtzakis, M., Hillig, T., Saltin, B. and Pilegaard, H.** (2002). Dissociation of AMPK activity and ACCbeta phosphorylation in human muscle during prolonged exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **298**, 309-316.
- Wojtaszewski, J. F., Nielsen, P., Hansen, B. F., Richter, E. A. and Kiens, B.** (2000). Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *The Journal of physiology* **528** 221-226.
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D.** (2003a). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology* **13**, 2004-2008.
- Woods, A., Salt, I., Scott, J., Hardie, D. G. and Carling, D.** (1996). The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity *in vitro*. *FEBS Letters* **397**, 347-351.
- Woods, A., Vertommen, D., Neumann, D., Turk, R., Bayliss, J., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D. and Rider, M. H.** (2003b). Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* **278**, 28434-28442.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K. et al.** (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine* **8**, 1288-1295.
- Yamnik, R. L., Digilova, A., Davis, D. C., Brodt, Z. N., Murphy, C. J. and Holz, M. K.** (2009). S6 Kinase 1 Regulates Estrogen Receptor alpha in Control of Breast Cancer Cell Proliferation. *The Journal of biological chemistry* **284**, 6361-6369.
- Yan, G. R., Yin, X. F., Xiao, C. L., Tan, Z. L., Xu, S. H. and He, Q. Y.** (2011). Identification of novel signaling components in genistein-regulated signaling pathways by quantitative phosphoproteomics. *Journal of Proteomics*.
- Yeh, S. and Chang, C.** (1996). Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5517-5521.

Yook, K., Harris, T. W., Bieri, T., Cabunoc, A., Chan, J., Chen, W. J., Davis, P., de la Cruz, N., Duong, A., Fang, R. et al. (2012). WormBase 2012: more genomes, more data, new website. *Nucleic acids research* **40**, 735-741.

Yoon, H., Oh, Y. T., Lee, J. Y., Choi, J. H., Lee, J. H., Baik, H. H., Kim, S. S., Choe, W., Yoon, K. S., Ha, J. et al. (2008). Activation of AMP-activated protein kinase by kainic acid mediates brain-derived neurotrophic factor expression through a NF-kappaB dependent mechanism in C6 glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **371**, 495-500.

Yoshida, E. N., Benkel, B. F., Fong, Y. and Hickey, D. A. (1999). Sequence and phylogenetic analysis of the SNF4/AMPK gamma subunit gene from *Drosophila melanogaster*. *Genome* **42**, 1077-1087.

Yu, X., McCorkle, S., Wang, M., Lee, Y., Li, J., Saha, A. K., Unger, R. H. and Ruderman, N. B. (2004). Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia* **47**, 2012-2021.

Yuan, L., Ziegler, R. and Hamann, A. (2002). Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by metformin in cultured hepatocytes. *Chinese medical journal* **115**, 1843-1848.

Yusa, Y. (2007). Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca - an overview. *American Malacological Bulletin* **23**, 89-98.

Zang, M., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Zuccollo, A., Hou, X., Jiang, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J. and Cohen, R. A. (2006). Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* **55**, 2180-2191.

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H. et al. (2012a). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**, 49-54.

Zhang, X., Davenport, K. W., Gu, W., Daligault, H. E., Munk, A. C., Tashima, H., Reitenga, K., Green, L. D. and Han, C. S. (2012b). Improving genome assemblies by sequencing PCR products with PacBio. *Biotechniques* **53**, 61-62.

Zhao, X., Yu, H., Kong, L. and Li, Q. (2012). Transcriptomic responses to salinity stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* **7**, 46244.

Zhou, G. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of clinical investigation* **108**, 1167-1174.

Zhu, M. J., Ford, S. P., Nathanielsz, P. W. and Du, M. (2004). Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biology of Reproduction* **71**, 1968-1973.

Zhu, M. J., Han, B., Tong, J., Ma, C., Kimzey, J. M., Underwood, K. R., Xiao, Y., Hess, B. W., Ford, S. P., Nathanielsz, P. W. et al. (2008). AMP-activated protein kinase signalling pathways are down regulated and skeletal muscle development impaired in fetuses of obese, over-nourished sheep. *The Journal of physiology* **586**, 2651-2664.

Zhu, X. J., Feng, C. Z., Dai, Z. M., Zhang, R. C. and Yang, W. J. (2007). AMPK alpha subunit gene characterization in *Artemia* and expression during development and in response to stress. *Stress* **10**, 53-63.

Zong, H., Ren, J. M., Young, L. H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M. J. and Shulman, G. I. (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15983-15987.

Abstract

The objective of this thesis was to characterize elements implicated in the energy pathway of the AMP-activated protein kinase of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The characterization of the elements was performed in the scope of understanding their involvement in energy management, particularly in response to physiological conditions requiring energy, as reproduction or environmental stress, such as hypoxia or fasting.

At genomic level, the three subunits of AMPK trimer and several elements involved in AMPK signaling pathway and in carbohydrate and lipid metabolism, supposedly under AMPK control, were described. Additionally, at proteomic level, several heterologous antibodies targeting AMPK α subunit isoforms and threonine 172 phosphorylation site of AMPK α subunit, indirect witness of AMPK activity, were assayed. Two truncated α subunits in the kinase domain were characterized essentially in muscles, suggesting their involvement in muscle function. During a hypoxic stress, a significant increase of truncated α subunits protein amount was observed in smooth muscle. These results suggest that, for a period of at least 6 h, these truncated subunits are necessary for the maintenance of aerobic metabolism in smooth muscle of *C. gigas*, allowing it to fulfill its static closing valves. We suggested that *in vivo* accumulation of truncated AMPK α could serve as modulator or as transdominant negative regulator of the full-length AMPK α activity. In the gonad, AMPK appeared to be activated through the process of gametogenesis, in order to support the catabolic processes of gametes creation. During the anabolic phase, when oocyte reserves were created, a signal disruption was observed. Finally, during controlled experiment, a physiological approach by food deprivation and a pharmacological approach using AICAR injections were performed to modulate AMPK signal. This analysis showed that neither fasting nor AICAR induced an increase of AMPK phosphorylation, as expected. Although, several changes related to AICAR injection were observed in oysters physiology, such as the change of the AMP:ATP ratio in fed oysters and a AICAR dose-related mortality in fasting oysters. AMPK characterization in *C. gigas* opens new perspectives demanding extensive functional studies to establish the key role of AMPK in energy management, as demonstrated in vertebrates' species, in order to understand the oyster's energy metabolism.

Keywords: *Crassostrea gigas*, AMP-activated protein kinase, hypoxia, reproduction, energetic pathways.

Résumé

L'objectif de cette thèse était de caractériser les éléments appartenant à la voie de signalisation énergétique AMP-activated protein kinase chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* afin de comprendre son implication dans la gestion de l'énergie, en particulier en réponse à des conditions physiologiques qui sollicitent de l'énergie telles que la reproduction, ou à des stress environnementaux comme l'hypoxie ou le jeûne.

Au niveau génomique, les trois sous-unités constitutives du trimère AMPK ainsi que plusieurs éléments impliqués dans cette voie de signalisation et dans les métabolismes glucidiques et lipidiques, potentiellement cibles de l'AMPK, ont été décrits. Au niveau protéique, plusieurs anticorps hétérologues ciblant les isoformes de la sous-unité α et la phosphorylation du résidu thréonine 172 de la sous-unité α , témoin indirect de l'activité AMPK, ont été utilisés. Deux sous-unités α tronquées dans le domaine kinase ont été caractérisées principalement dans les tissus musculaires suggérant leurs implications dans la fonction musculaire. Au cours d'un stress hypoxique, une augmentation significative des quantités de sous-unités α tronquées a été observée dans le muscle lisse. Ce résultat suggère que pendant une durée d'au moins 6 h, ces protéines tronquées sont nécessaires au maintien du métabolisme aérobie dans le muscle lisse, lui permettant ainsi de remplir son rôle de fermeture statique des valves. Nous avons suggéré une hypothèse indiquant que l'accumulation *in vivo* de ces sous-unités α tronquées pourrait exercer un rôle de modulation ou de transdomination négative de l'activité de la sous-unité α entière. Dans la gonade, nous avons observé une activation de l'AMPK tout au long du processus de gamétogénèse afin de supporter les processus cataboliques de création de gamètes. Une diminution de cette activation a été observée lors du stade anabolique de mise en réserve des ovocytes. Enfin, lors d'un conditionnement en milieu contrôlé, une approche physiologique par privation de nourriture et une approche pharmacologique par injection d'AICAR ont été réalisées pour provoquer une modulation de l'AMPK. Les analyses ont montré que ni le jeûne ni l'AICAR n'ont induit une augmentation de la phosphorylation de la sous-unité α . Cependant, plusieurs changements liés à l'injection de l'AICAR ont été observés sur la physiologie de l'huître : la modification du rapport AMP:ATP chez les huîtres nourries en comparaison aux huîtres à jeun, et une mortalité dépendante de la dose injectée d'AICAR chez les huîtres mises à jeun. La caractérisation de l'AMPK chez *C. gigas* ouvre de nombreuses perspectives exigeant des études fonctionnelles poussées afin de démontrer le rôle pivot de cette kinase dans la gestion de l'énergie, comme démontré chez de nombreuses espèces de vertébrés, et ainsi décrypter le métabolisme énergétique de l'huître.

Mots clés : *Crassostrea gigas*, AMP-activated protein kinase, hypoxie, reproduction, voie énergétique.