

THÈSE



PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences et Environnements

Par **Audrey MAT**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Géochimie et Écotoxicologie

Étude des rythmes biologiques de l'huître *Crassostrea gigas* et de leur perturbation par l'algue toxique *Alexandrium minutum*.



THÈSE

PRÉSENTÉE A



L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences et Environnements

Par **Audrey MAT**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Géochimie et Écotoxicologie

Étude des rythmes biologiques de l'huître *Crassostrea gigas* et de leur perturbation par l'algue toxique *Alexandrium minutum*.

Soutenue le 27 novembre 2012

Après avis de

M Bruno Claustrat, Biologiste Honoraire Hospices Civils de Lyon, INSERM U846

Rapporteur

M Kim Last, Lecturer, The Scottish Association for Marine Science

Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M Antoine Grémare, Professeur, Université Bordeaux 1

Président

M Bruno Claustrat, Biologiste Honoraire Hospices Civils de Lyon, INSERM U846

Rapporteur

M Kim Last, Lecturer, The Scottish Association for Marine Science

Rapporteur

M Philippe Soudant, Directeur de Recherche CNRS, Université de Bretagne Occidentale

Examineur

M Damien Tran, Chargé de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1

Directeur de thèse

M Jean-Charles Massabuau, Directeur de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1

Directeur de thèse

Université Bordeaux 1
UMR EPOC 5805
Equipe Ecotoxicologie Aquatique
Place du Dr B. Peyneau
33120 ARCACHON
France

« Le temps met tout en lumière. »

Thalès

« Le temps est un phénomène de perspective. »

Jean Cocteau

*A mes Parents
et à mes Sœurs*

Remerciements

Il m'a fréquemment semblé, au cours des trois années écoulées, que si la thèse est un travail solitaire, elle est souvent accomplie en équipe. Nombreuses sont les personnes à avoir accompagné ces travaux, et je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance.

Je remercie Messieurs Philippe Bertrand, Antoine Grémare et Frédéric Garabetian qui m'ont accueillie au sein du laboratoire EPOC et de la Station Marine d'Arcachon.

Je tiens à adresser ma sincère reconnaissance à mes deux directeurs de thèse, Damien Tran et Jean-Charles Massabuau. Je vous remercie tout d'abord de m'avoir accordé l'opportunité d'effectuer cette thèse, malgré mon parcours atypique. Je vous remercie également pour la qualité de votre encadrement scientifique ainsi que pour votre disponibilité et le temps que vous avez consacré à mes recherches. Ce travail est le résultat de nos discussions détaillées et passionnées sur les secrets des rythmes de l'huître et les mots adaptés pour les décrire. Cependant, malgré vos efforts, je pense que je continuerai à prononcer le mot huître avec un léger « o »...

Je remercie Bruno Claustrat et Kim Last d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je les remercie également pour les échanges constructifs et les conseils scientifiques prodigués lors des congrès de l'ISC à Vigo et de l'EBRS à Oxford. I thank Bruno Claustrat and Kim Last, which accepted to review this manuscript. I also thank them for the very interesting discussions we had during the ISC and EBRS congress in Vigo and Oxford respectively. Je remercie aussi Bruno Claustrat pour sa relecture détaillée du manuscrit. Je remercie également Antoine Grémare, président du jury, et Philippe Soudant d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Ces travaux n'auraient pu aboutir sans l'aide précieuse et le soutien des personnes avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler.

Un grand, mais alors très grand ! merci à Pierre Ciret, virtuose de l'électronique ! Merci pour votre gentillesse et votre efficacité, quelle que fut la requête... « Pierre, j'ai un ordinateur qui a planté. Pouvez-vous y jeter un œil ? Il se trouve dans la pièce de manip', dans le noir, sur l'étagère au-dessus de l'anneau courant et de ses 300 litres d'eau... Et pour ne pas déranger les animaux on ne peut allumer ni la lumière ni l'écran... » Même là, vous avez fait des miracles !

Un tout grand merci également aux techniciens de l'atelier, Christian et Henri, largement mis à contribution pour la préparation des dispositifs expérimentaux. Vous aussi vous avez fait des prouesses, malgré quelques requêtes saugrenues ! « Pourriez-vous fixer fermement cette résistance rectiligne dans la courbe de l'anneau (plein d'eau toujours), sans utiliser de colle ou autre produit chimique ? » Oui, vous pouviez. Merci aussi pour tous vos coups de mains et de tournevis dans

l'urgence des lancements de manip'. Et, last but not least, merci pour vos frites faites maison et d'avoir su comprendre que je ne pouvais, pour d'évidentes raisons culturelles, y résister.

Je remercie également chaleureusement Hansy Haberkorn. Merci Hansy de m'avoir initiée aux subtilités du phytoplancton et des toxines. Merci aussi de m'avoir transmis les ficelles du métier en matière de culture d'algues. Tu as révélé ma main verte, enfin rouge devrais-je dire en parlant d'*A. minutum*. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions, même à distance. Je n'oublie pas tes qualités humaines, ta gentillesse et ton humour.

Merci également à Jean-Paul Bourdineaud, qui m'a accompagnée pour l'étude des perturbations moléculaires. Merci de m'avoir initiée aux techniques de RT-PCR et RAPD-PCR, et de m'avoir appris à en démêler les résultats.

En matière de « biomol » toujours, je remercie également Patrice Gonzalez et Cerise Daffe qui ont souvent éclairé ma lanterne sur les nombreux mystères que soulevaient inmanquablement les extractions d'ARN et les courbes de PCR. Merci à toi Cerise de m'avoir formée sur les différents appareils. Et je ne peux bien sûr pas, Patrice, ne pas mentionner ton humour, qui a souvent su faire écho au mien. Certains diront que ce n'est pas un compliment, ne les écoute pas !

Je tiens à remercier Michel Le Hénaff et son équipe, qui m'ont accueillie avec beaucoup de gentillesse à l'ENITA et m'ont permis de réaliser mes dosages de toxines paralysantes.

J'adresse mes remerciements à Bruno Etcheverria pour ses apports techniques, ses histoires de banderoles (il reste une part de mystère...mais on ne veut pas tous les détails) et son humour bas(que).

Il est évident qu'on ne peut pas mener une thèse à son terme sans un ordinateur fonctionnel. Merci à Hubert, son vélo, son fanion (le fanion et le vélo n'ont pas fait grand chose) et son humour acéré. Ses origines Benelux auront ajouté à tout ça une couleur locale, enfin pour moi, bien agréable. Merci aussi pour nos régulières discussions sur les arts brasseurs, les vrais, et non ça n'inclut pas la « seize » !

Un très ! chaleureux merci également à Magalie Baudrimont. Merci surtout pour ta sensibilité, tes encouragements et ton soutien. Ces trois années m'ont permis d'apprécier tes précieuses qualités humaines.

Un grand merci à Flo, inimitable, avec sa tendresse brusque et toujours présente pour un coup de main... On aura même terminé de vider l'anneau de courant à la pelle et à l'éponge... Merci aussi pour le temps consacré au nettoyage, ardu, des mes récipients de cultures d'algues... Il y en a eu beaucoup ! Je te remercie pour ton aide.

Merci également à Agnès Massonneau pour les nombreuses recherches bibliographiques, à Denis du Lycée de la mer et Patrick Lassus de l'Ifremer pour les cultures d'algues, à Sabrina Bichon et Line Bourasseau pour les analyses chimiques, à Pierre Polsenaere qui m'a formée aux extractions de chlorophylle a, à Olivier Maire qui m'a prêté un courantomètre pendant plusieurs mois, à Pascal Lebleu et aux marins Francis et Laurent pour leurs coups de pouces, à Christelle qui a essayé de m'apprendre à reconnaître les poissons.

Je remercie également toutes les personnes qui ont pu faciliter mes démarches administratives, ce qui ne fut pas toujours une mince affaire. Je remercie en particulier Sandrine Fernandez et Brigitte Bordes. Merci également à Sandrine M, Cathy et MC.

Je tiens également à remercier l'ensemble des collègues EA de la Station Marine : Agnès, Alexia, Nathalie, Fabien, Régine, Véro, vous avez contribué à rendre le travail agréable ! Merci pour la bonne humeur générale et en particulier la bonne ambiance des repas de midi.

Cette thèse n'aurait indéniablement pas eu la même saveur sans la présence et le soutien de mes collègues étudiants, thésards et docteurs avec lesquels j'ai usé les paillasses du labo.

Je remercie Ika et Seb, qui m'ont accueillie puis passé le flambeau dans le bureau des thésards, Nico, avec qui j'ai en plus partagé de nombreux trajets Bordeaux - Arcachon en voiture, Sophie G et Iris, dont les venues pour analyses biomol contribuaient à la bonne et drôle ambiance, Sophie R et Houssem. Je salue également mes collègues ECOBIOC.

Et puis, bien sûr, la fine équipe... Toujours partants pour un coup tordu (ho le « magnifique » fond d'écran que tu as installé sur mon pc...), un coup de main en manip, un verre après. On a usé les pavés entre la gare et la station, entre le boulanger et la station, les sièges des trains. On a refait le monde, partagés les galères et les joies de la thèse. Merci d'avoir servi d'exutoire parfois, merci pour votre fantaisie souvent. Merci à vous qui avec humour et bienveillance avez fait de ces 3 années de thèse une super expérience humaine.

Je pense bien sûr à Adeline. Sans doute nos origines exotiques étaient elles faites pour s'entendre, notre amitié s'est construite sur deux bases solides : l'écoute et l'humour. Oui, toi aussi tu fais des blagues palourde. Merci aussi Arini pour ton téléphone (Bubble !). Tu as également complété mes manips à ta manière, trouvant la seule prise reliant ma salle de manip du 1^{er} étage à ta salle du rez-de-chaussée... Ho ça disjoncte... Ho, parlons au passé de mes paramètres contrôlés... Malgré cette tentative de sabotage, j'espère que nous avons encore un paquet de situations fantaisistes à vivre au-delà de cette thèse. J'apporterai des cornichons.

Inoubliable Bijoux ! Tellement yummy (mais c'est quoi ce mot... !). Si on fait abstraction du fait que tu ne réponds presque jamais au téléphone, que non tu ne poses pas des lapins mais tu honores tes rdv avec 1h de retard et que tu dis beaucoup non, merci pour tout le reste. Pour ta gentillesse, ta finesse d'esprit, ton univers bien à toi. Oui, je t'ai vu caresser le coin de ton ordi et donner vie à ta tasse écossaise. Tu as su supporter mes bêtises et celles d'Arini (vraiment, on file des thèses à n'importe qui), nous regardant de ton petit air désolé et compatissant, le menton baissé sur la poitrine, le regard au-dessus de tes lunettes. Tu m'as aussi réconfortée quand nécessaire, je te dois une addiction au martini blanc. Merci Huguy !

Et Piwi ! Merci d'avoir sauvé une partie de mes heures de sommeil, en m'emmenant en voiture à Arcachon lors des glorieuses périodes de travaux où les trains ne roulaient qu'à l'aube. Notre amitié a démarré sur des bases très saines pour moi qui ne suis pas du matin. Je garde également un souvenir revigorant de nos sessions glisse. Merci aussi pour tes spécialités bretonnes et le look qui va avec ! Tu fais une jolie bigoudène !

Merci à Amina ! Ton calme est très appréciable dans ce monde de brutes. Merci aussi pour ta gentillesse. Je me souviens entre autre d'un coup de main en biomol quand le nombre d'extractions qu'il me restait à faire à 18h compromettait ma capacité à avoir le dernier train. Bon, j'apprendrai aussi à veiller à ce que tu n'aies pas d'appareil photo sous la main quand je fais des bêtises ! Merci également pour nos échanges, tellement agréables et enrichissants. J'y associe également Dahlia, nous avons eu ensemble des très chouettes discussions sur les caillebotis devant la mer !

Merci également à Lucie, tes blagues sont parfaitement au niveau ! Merci à Mohamedou, Cécile et Vaï pour tous les bons moments, au et hors labo. Ce fut un plaisir de partager votre quotidien et votre bonne humeur ! Merci aussi à Jojo, Yasmina, Christophe et Nacim !

Si le labo a accaparé la plupart de mon temps, je tiens à remercier profondément ceux qui ont accompagné cette thèse, à Bordeaux et en Belgique.

Un tout grand merci aux Bordelais qui m'ont fait découvrir leur ville et la vie girondine. Ces 3 années sont riches de vous et des multiples activités et sorties que nous avons faites ensemble. Merci particulièrement à Valou ! Ton soutien, à coups de poulet curry, sorties à la plage, soirées dvd, surtout pendant ces mois de rédaction, fut très précieux. Merci également de m'avoir approvisionnée en séries tv, je ne sais pas comment j'aurais tenu sans toi. Merci aussi à toi Fouad pour ton éternelle bonne humeur communicative, ce n'est pas un vain mot. Merci aussi d'avoir sacrifié un ciné pour sauver mon pc planté en pleine rédaction, merci pour ton soutien moral, ainsi qu'à Stéphanie, à coup de crumble et fondant au chocolat. Ca marche très bien. Merci également à Alice et Patrick, à Mau et Uriel (on a vu Mickey !), à Manu. Sur poste, en dehors, on a bien rit. Et on a été sérieux aussi,

parfois. Je salue également tous les oranges et beiges avec qui j'ai partagé d'agréables moments, en poste ou formation.

Je remercie tous ceux qui ont fait le déplacement et sont descendus partager quelques jours avec moi, Gaétane et Seb, Céline et Laurent, Mairaine, Cath et Fred, Béné et Bruno. Merci à Giuliana, Da8 et les enfants, votre amitié m'est précieuse. Merci spécial à Astrid, je constate avec plaisir que notre amitié supporte bien nos déménagements et s'épanouit sous de nombreuses latitudes. Merci d'être là, toujours. Merci aussi à ceux qui m'ont suivie, malgré la distance. Je n'oublie pas les agros, c'est toujours un plaisir de vous retrouver quand je remonte, merci de répondre présents avec enthousiasme.

Cette thèse, je la dois aussi à ma famille. Ben, je n'oublie pas que cette aventure a commencé par un we à Paris ! Je tiens à remercier sincèrement et profondément mes parents et mes sœurs, je vous dois beaucoup de ce que je suis aujourd'hui. Vous m'avez toujours assuré un soutien indéfectible, le terme n'est pas usurpé. Merci pour vos encouragements, votre présence, merci de m'avoir supportée quand c'était tendu. Puisqu'il est difficile d'être exhaustive, puisse ce mot, merci, contenir toute ma reconnaissance.

Audrey
Septembre 2012

Table des matières

Liste des abréviations	5
Préambule	7
Chapitre 1 Introduction	9
1. Objectifs du travail	10
2. Définition et caractérisation d'un rythme biologique	13
2.1 Définition	13
2.2 Caractérisation d'un rythme	14
2.3 L'effet masque	14
3. Contexte historique des rythmes biologiques	14
3.1 Les premiers pas de la chronobiologie : apports de la botanique	15
3.2 Influences de la biologie animale	17
3.3 Cold Spring Harbour 1960	21
3.4 Découverte de l'horloge moléculaire	24
3.5 La chronobiologie depuis 1970	25
4. Les rythmes biologiques chez les organismes marins	25
4.1 Le littoral, un biotope très changeant	25
4.2 La chronobiologie chez les organismes marins	27
5. L'huître <i>Crassostrea gigas</i>	30
5.1 Systématique, aquaculture et écologie	30
5.2 Eléments d'anatomie et de biologie	30
6. Les micro-algues toxiques : contexte	33
6.1 Introduction	33
6.2 Les principales phycotoxines	35
6.3 Les phycotoxines dans le milieu marin	36
7. Le genre <i>Alexandrium</i>	37
7.1 Le genre <i>Alexandrium</i>	37
7.2 Notions de morphologie	37
7.3 Répartition géographique	37
7.4 Toxines paralysantes produites par le genre <i>Alexandrium</i>	38
7.5 Cycle biologique	38
Chapitre 2 Matériel et méthodes	40
1. Animaux	41
1.1 Collecte	41
1.2 Stabulation	41
1.3 Acclimatation	41
2. Principes généraux d'expérimentation	41

3. Cultures et apports d'algues	42
3.1 Cultures d'algues	42
3.2 Apports en algues dans les systèmes expérimentaux	42
4. Analyse du comportement par valvométrie HFNI	43
4.1 Le pourcentage d'ouverture horaire	44
4.2 Temps de réponse	44
4.3 Amplitude d'ouverture	44
4.4 Micro-fermetures	44
5. Analyses de biologie moléculaire	44
5.1 Purification des acides ribonucléiques totaux	45
5.2 Synthèse des acides désoxyribonucléiques complémentaires	46
5.3 PCR quantitative en temps réel	46
5.4 Extraction de l'ADN génomique	47
5.5 RAPD-PCR	48
6. Dosage des toxines paralysantes	49
6.1 Broyage des échantillons	49
6.2 Dilution	49
6.3 Test ELISA	49
7. Analyses chronobiologiques	50
7.1 Actogrammes	50
7.2 Recherche et caractérisation d'un rythme	50
Chapitre 3 Un rythme circadien chez <i>C. gigas</i> ?	54
1. Introduction	55
2. Article: Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster <i>Crassostrea gigas</i> .	55
3. Conclusions	67
Chapitre 4 Un rythme circatidal chez <i>C. gigas</i> ?	70
1. Introduction	71
2. Tracking the underlying clock mechanisms responsible for the circatidal behavior in the oyster <i>Crassostrea gigas</i> .	72
2.1 Abstract	73
2.2 Introduction	74
2.3 Material and methods	75
2.4 Results	78
2.5 Discussion	80
2.6 Conclusions	84
Acknowledgments	84
2.7 References	84
3. Conclusions	89

Chapitre 5 Approche de l'horloge moléculaire	92
1. Introduction	93
2. The circadian gene <i>cry</i> oscillates at tidal frequency in oysters: a new clue for marine clocks?	95
2.1 Summary	96
2.2 Introduction	97
2.3 Results	98
2.4 Discussion	100
2.5 Conclusion	103
2.6 Experimental procedures	104
Acknowledgments	108
2.7 References	108
3. Conclusions	114
Chapitre 6 Impacts génétiques et génotoxicité	117
1. Introduction	118
2. Genetic and genotoxic impacts in the oyster <i>Crassostrea gigas</i> exposed to the harmful algae <i>Alexandrium minutum</i>.	119
2.1 Abstract	120
2.2 Introduction	121
2.3 Experimental procedures	122
2.4 Results	126
2.5 Discussion	129
2.6 Conclusions	131
Acknowledgments	131
2.7 References	131
3. Conclusions	136
Chapitre 7 Conclusions générales et perspectives	138
1. Discussion et conclusions générales	139
1.1 Principaux résultats en chronobiologie marine	139
1.2 Du rythme et du bruit	142
1.3 Horloge(s) et évolution : quel scénario ?	143
1.4 Principaux résultats en écotoxicologie aquatique	144
2. Perspectives de recherche	145
2.1 En chronobiologie	145
2.2 En écotoxicologie	147
Références bibliographiques	150

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN _c	ADN complémentaire
ADN _g	ADN génomique
ARN	Acide ribonucléique
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning
Cat	Catalase
CFP	Ciguatera Fish Poisoning
Cox1	Cytochrome-c oxydase 1
Cry / Cgcry	Cryptochrome / cryptochrome chez <i>Crassostrea gigas</i>
DO	Densité optique
DSP	Diarrhetic Shellfish Poisoning
Gpx	Glutathion peroxydase
HFNI	Haute Fréquence Non Invasive
Ilk	Interleukine
Mdr	Multidrug resistance
MT2	Métallothionéine 2
NSP	Neurotoxic Shellfish Poisoning
PACF	Partial Autocorrelation Function
PR	Percent Rhythm
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
PST	Paralytic Shelfish Toxin
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RNAse	Ribonucléase
Sod	Superoxyde dismutase.
STC	Simulated Tidal Cycle
STX	Saxitoxine
TTFL	Transcription-Translation Feedback Loop
ZT	Zeitgeber, Donneur de temps

Préambule

Le temps est multiple. C'est l'*aiôn* et le *chronos* des stoïciens, soit l'abstraction de la durée et le temps concret de ce qui passe. Il est objectif, mesurable et subjectif, ressenti. Le temps est également distance, puisque depuis 1983 le mètre est officiellement défini par la distance parcourue en une fraction de seconde par la lumière dans le vide. Il est tout à la fois continu et discontinu, ubiquiste et insaisissable. La circulation même du temps est paradoxe. Le temps est à la fois vectoriel, irréversible - c'est la flèche du temps de Prigogine - et cyclique.

Cette cyclicité est omniprésente dans la nature. On sait aujourd'hui que le temps est rythme du vivant, à tous les niveaux d'organisation, de l'écosystème au métabolisme. Le temps est rythme pour les animaux, les plantes et les bactéries. Et le temps bat aussi dans les tissus. Même dans les cellules. Même dans une cellule. Pourtant, les prémices du temps en biologie apparaissent seulement au 18^e siècle. Et deviennent une science, la chronobiologie, en 1960. Il apparaît que le temps biologique des organismes provient d'une horloge, interne, qui se synchronise sur l'environnement. Certains paramètres cycliques, comme l'alternance du jour et de la nuit, jouent le rôle de « zeitgebers », « donneur de temps ». En l'absence de ces indices temporels, l'horloge est en libre cours et fonctionne à sa fréquence propre. Dans les années 1970, cette horloge se dessine et s'avère être moléculaire. Des gènes oscillent. On découvre que les rythmes sont partout ou presque.

Si les organismes terrestres, essentiellement soumis au cycle solaire d'alternance jour/nuit, expriment le maintenant célèbre rythme circadien, les rythmes biologiques des organismes marins ont reçu une attention bien moindre. Ils occupent un environnement beaucoup plus complexe, fortement régi par le cycle lunaire des marées, dit tidal, et s'avèrent ardu à étudier. Les scientifiques qui s'y sont intéressés rapportent souvent que, au laboratoire, ces rythmes sont labiles et qu'il n'est pas rare qu'un grand nombre d'individus ne présente même pas de rythme apparent. Lorsque ces organismes manifestent une cyclicité en conditions constantes, le signal est souvent bruité. Pourtant, l'activité cyclique exprimée *in situ* est robuste.

Le présent travail cherchait à répondre à la question suivante : l'étude des rythmes chez un bivalve, de sa gamme de régulation et de ses perturbations peut-elle servir à détecter et évaluer une contamination dans l'environnement marin ? Le modèle d'étude adopté fut l'huître *C. gigas* et le contaminant l'algue toxique *A. minutum*. Nous avons travaillé de manière intégrée, en étudiant tant le comportement valvaire que les mécanismes moléculaires sous-jacents. Il a d'abord fallu déterminer les rythmes de référence chez l'huître, qui étaient totalement inconnus. Nous verrons que nous n'avons pas trouvé d'horloge circatidale mais uniquement une horloge circadienne pouvant osciller à une fréquence circatidale. En démontrant pour la première fois qu'un gène de l'horloge circadienne (*cry*) peut osciller à une fréquence tidale, nous proposerons que l'horloge circadienne puisse à elle seule expliquer les principes fondamentaux des rythmes tidaux et circadiens de l'huître. Les bases chronobiologiques étant posées, nous avons pu exposer les huîtres à des algues toxiques. Nous montrerons qu'*A. minutum* perturbe les rythmes biologiques de *C. gigas* jusqu'au niveau de l'horloge moléculaire. Finalement, une approche écotoxicologique complémentaire a été menée pour éclairer ces résultats. Nous découvrirons qu'*A. minutum* a un impact sur la transcription génique et surtout sur l'ADN.

Chapitre 1

Introduction

1. Objectifs du travail

Les travaux présentés dans ce document visent à répondre à l'interrogation suivante : l'étude in situ ou au laboratoire des rythmes biologiques chez un mollusque bivalve, de leur gamme de régulation et de leurs perturbations peut-elle servir à évaluer la qualité d'un milieu aquatique, c'est-à-dire son état écologique ?

La question étant originale et peu de choses étant connues sur cette facette de la vie des mollusques, notre démarche comprend deux aspects, complémentaires. Pour le premier, il s'agit d'un aspect fondamental en éthologie marine et chronobiologie : comprendre les principes de base qui expliquent le comportement rythmique in situ de l'huître *Crassostrea gigas* en allant jusqu'aux mécanismes opérant au niveau de l'horloge moléculaire. Le second aspect, plus appliqué, concerne l'écotoxicologie. Il vise à évaluer la perturbation de ces rythmes par les algues toxiques, l'agent perturbateur ici utilisé étant l'algue *Alexandrium minutum*.

La chronobiologie est aujourd'hui largement dominée par l'étude des organismes terrestres et des rythmes circadiens. La chronobiologie des organismes marins relève des horloges considérées comme énigmatiques et les rythmes des habitants de la zone côtière, s'ils sont robustes sur le terrain, sont connus pour être particulièrement bruités au laboratoire (Palmer, 1995a). Les analyses proposées le sont au niveau des systèmes et les horloges de ces espèces ne sont pas caractérisées d'un point de vue moléculaire. Pour autant, les questions qu'elle soulève présentent une portée large. En effet, les espèces marines constituent une dimension forte de la biodiversité et de la biomasse sur Terre. Par ailleurs, les premiers organismes de la planète sont apparus dans l'eau et caractériser les horloges biologiques des organismes marins devrait pouvoir permettre d'éclairer d'un nouveau jour l'évolution des espèces.

Parallèlement, l'écotoxicologie est un domaine scientifique apparu dans les années 1970 (Truhaut, 1977) et en pleine expansion ces dernières décennies. Depuis son avènement au 18^e siècle, l'industrialisation n'a cessé de se développer, et l'homme marque toujours davantage la Terre de son empreinte. Les traces de l'anthropisation sont partout, y compris dans les océans, qui constituent généralement le réceptacle final des pollutions terrestres et aquatiques. L'écotoxicologie s'est développée progressivement et prend aujourd'hui plus que jamais tout son sens afin d'évaluer l'impact des contaminants sur les écosystèmes, marins notamment, et leur devenir.

L'écotoxicologie procède de deux façons. D'une part, l'approche toxicologique s'intéresse à la toxicité aiguë, qui considère de fortes doses de polluants létales à court terme. D'autre part, l'écotoxicologie au sens propre travaille à un niveau sub-létal et étudie les polluants à de

faibles concentrations qui, à moyen ou long terme, entraînent des perturbations pour l'organisme et, au-delà, les écosystèmes. Dans les deux cas, toxicologie et écotoxicologie exposent des organismes à un ou plusieurs contaminants, dosent et observent les impacts. A notre connaissance, personne ne s'est toutefois jamais intéressé aux impacts sur les rythmes biologiques des individus. Nous avons donc choisi d'aborder l'écotoxicologie marine sous cet angle nouveau, celui de la chronobiologie. Nous disposons à la Station Marine d'Arcachon du matériel analytique original permettant d'acquérir et d'enregistrer de grandes quantités de données comportementales sur les bivalves sur le long terme. Cet outil s'appelle la valvométrie HFNI (Haute Fréquence Non Invasive). Nous posons l'hypothèse que l'étude des rythmes biologiques et de leurs perturbations pourrait constituer un indicateur précoce et sensible d'une contamination du milieu. Un des avantages de cette démarche réside dans le fait qu'elle est non invasive, l'objet d'étude n'est pas détruit par l'analyse. Une application de notre recherche permettrait d'utiliser sur le terrain l'analyse des perturbations enregistrées pour réaliser en ligne une première étape de diagnostic de qualité du milieu à distance. Nous avons également utilisé des outils de biologie moléculaire pour aborder le fonctionnement de l'horloge interne, en absence et présence de contaminant.

De plus, appliquer la chronobiologie en écotoxicologie présente des intérêts scientifiques au-delà de la notion de perturbation. En effet, la connaissance des rythmes des paramètres métaboliques, physiologiques, moléculaires, etc., permet de déterminer si une valeur observée se situe dans la gamme de régulation en fonction du temps du paramètre étudié ou non et donc d'établir si un xénobiotique entraîne ou non un effet toxique. En outre, la chronoesthésie c'est-à-dire la variation temporelle de la sensibilité d'un organe à une molécule fait également sens en écotoxicologie, comme elle le fait en médecine.

Les deux modèles de ces travaux de thèse sont l'huître *Crassostrea gigas* et la micro-algue toxique *Alexandrium minutum*, deux modèles expérimentaux intéressants à plus d'un titre.

Tout d'abord, l'huître *Crassostrea gigas* est un bivalve filtreur, c'est-à-dire qu'elle respire et s'alimente via l'eau qu'elle filtre entre ses valves. Pour l'écotoxicologiste c'est donc un modèle de choix qui va potentiellement accumuler les contaminants contenus dans le milieu. Chez les filtreurs, on peut également s'attendre à des accumulations éventuellement exacerbées par rapport à d'autres animaux. De plus, l'huître est sessile. Elle est donc pleinement représentative d'un site donné et de la qualité de l'eau dans laquelle elle baigne. D'un point de vue chronobiologique, il y a actuellement très peu d'études portant sur les bivalves. Pour l'huître *C. gigas*, Tran et al. (2011) ont montré que sur le terrain l'activité valvaire est largement dominée par une activité tidale, à laquelle se greffe une composante journalière, plus faible. C'est, à notre connaissance, la seule étude portant sur les rythmes de cette huître, rythmes biologiques qui sont encore à caractériser. Ce modèle biologique promet dès lors des résultats originaux et peut donc potentiellement apporter de nouvelles données scientifiques pour appréhender la chronobiologie des organismes aquatiques. Finalement, *C.*

gigas présente une aire de répartition géographique très large et occupe des écosystèmes variés, ce qui lui confère un intérêt qui dépasse largement les frontières.

Dans ces travaux, nous étudions une contamination par des toxines produites par des micro-algues planctoniques. Les phycotoxines sont des molécules produites de façon naturelle, mais l'augmentation des efflorescences d'algues toxiques ces dernières décennies semble fortement liée entre autre aux activités humaines. L'espèce étudiée, *Alexandrium minutum*, a été observée pour la première fois par Halim en 1960, en Egypte, suite à une marée rouge dans le port d'Alexandrie (Anderson et al., 2012) et s'est, depuis, révélée être présente presque partout à l'échelle globale. Nous avons choisi de considérer *A. minutum* car cette algue est, en France, l'espèce la plus fréquemment responsable des contaminations par des toxines paralysantes. Les concentrations observées peuvent aller de quelques cellules par millilitre à plusieurs dizaines de milliers (donnée REPHY).

La démarche que nous avons suivie pour réaliser ces travaux se veut résolument intégrée : comme évoqué ci-dessus, nous avons travaillé tant au niveau du système pour caractériser les rythmes de référence qu'au niveau moléculaire pour approcher les mécanismes sous-jacents et identifier les gènes à l'origine de ces rythmes. De manière similaire, les perturbations induites par *A. minutum* ont été étudiées à ces deux niveaux d'analyse. Les travaux décrits dans le présent document s'articulent en trois étapes.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les rythmes d'activité valvaire de l'huître dans un état de référence, en absence de contamination. Nous avons étudié le rythme circadien (Chapitre 3), qui domine le comportement des espèces terrestres, et le rythme circatidal (Chapitre 4), majoritairement rapporté pour les espèces marines. Ces expériences, menées au laboratoire sur des animaux isolés de toute perturbation, ont été mises en lumière par rapport au comportement que manifestent les huîtres sur le terrain. Les résultats obtenus, remis en perspective par rapport aux connaissances existant chez l'animal aérien, ont alors permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes moléculaires sous-tendant l'éthologie de l'huître.

Ensuite, ces hypothèses ont été approfondies par l'analyse de l'oscillation de la transcription du gène *cryptochrome* (*Cgcry*) dans le muscle adducteur – l'effecteur de l'activité valvaire - d'huîtres exposées à un cycle tidal de variation de courant. Le gène *cry* est un gène classiquement décrit comme appartenant à l'horloge moléculaire circadienne. Nous avons, encore, comparé les rythmes observés au niveau moléculaire et comportemental. De plus, nous avons étudié les implications d'une exposition à l'algue *A. minutum* sur le rythme des huîtres, tant au niveau éthologique que moléculaire (Chapitre 5).

Enfin, pour compléter notre compréhension de l'effet d'*A. minutum* sur *C. gigas* au niveau moléculaire au-delà de l'horloge biologique, nous avons recherché si elle provoquait un impact sur l'expression de différents gènes clés du métabolisme et avons étudié la génotoxicité potentielle d'*A. minutum* sur l'huître (Chapitre 6).

Tableau 1.1 : Quelques rythmes biologiques, classés par période croissante (adapté d'après Aschoff, 1981 ; Boissin et Canguilhem, 1998 ; Goldbeter, 2010).

Rythmes biologiques	Période
Rythmes neuronaux	0.01 à 10 s
Rythme cardiaque	1 s
Rythme respiratoire	1.5 à 6 s
Oscillations biochimiques	1 à 20 min
Rythmes d'activité	24 h
Rythme ovarien	28 jours
Cycles reproducteur et migratoire	1 an
Cycles chez le lynx, la cigale,...	10 à 17 ans

Ces travaux ont permis d'approfondir l'éthologie et la physiologie de l'huître *C. gigas* et apporté des informations originales sur ses rythmes biologiques. Ces rythmes constituent un élément fondamental pour l'huître, organisme sessile soumis à un environnement changeant en permanence au gré des marées. En outre, cette démarche, innovante en écotoxicologie marine, montre que la chronobiologie est une voie d'analyse qui mérite toute notre attention. Nous avons également pu répondre à la question à l'origine de notre démarche : l'analyse in situ des perturbations des rythmes biologiques peut être un élément d'appréciation de l'état écologique d'un milieu aquatique. L'ensemble des résultats, leur portée et leurs implications, sont rassemblés et mis en perspective au chapitre 7.

2. Définition et caractérisation d'un rythme biologique

2.1 Définition

Un rythme biologique se définit comme la variation périodique d'une grandeur biologique au cours du temps. Cette définition désigne une grande variété de phénomènes rythmiques, couvrant des périodes allant de quelques centièmes de secondes à plusieurs dizaines d'années et se produisant à l'échelle de différents systèmes biologiques, de la cellule à l'écosystème (Tableau 1.1 ; Aschoff, 1981 ; Goldbeter 2010). Les rythmes biologiques sont produits par une horloge interne, moléculaire, qui est synchronisée par des facteurs de l'environnement appelés « zeitgeber » (donneur de temps, en Allemand). En absence de ces zeitgebers, l'horloge est en libre cours ou « free-running » et exprime sa période propre, endogène (Aschoff, 1981 ; Klarsfeld, 2009).

Les rythmes biologiques confèrent un avantage adaptatif aux organismes, leur permettant d'anticiper les changements de leur environnement (Yerushalmi et Green, 2009).

Les rythmes biologiques sont souvent désignés par rapport à leur période. On distingue ainsi les rythmes (Boissin et Canguilhem, 1998) :

- ultradiens : période inférieure à 20 h,
- circadiens : période de 24 ± 4 h,
- infradien : période supérieure à 28 h.

Par ailleurs, quatre rythmes sont couramment nommés « circa- ». Il s'agit de rythmes qui, en conditions naturelles, sont synchronisés par des facteurs environnementaux (Aschoff, 1981) :

- le rythme circatidal, synchronisé par les marées,
- le rythme circadien, synchronisé par l'alternance jour/nuit,
- le rythme circalunaire, synchronisé par les phases de la lune,
- le rythme circannuel, synchronisé par les saisons.

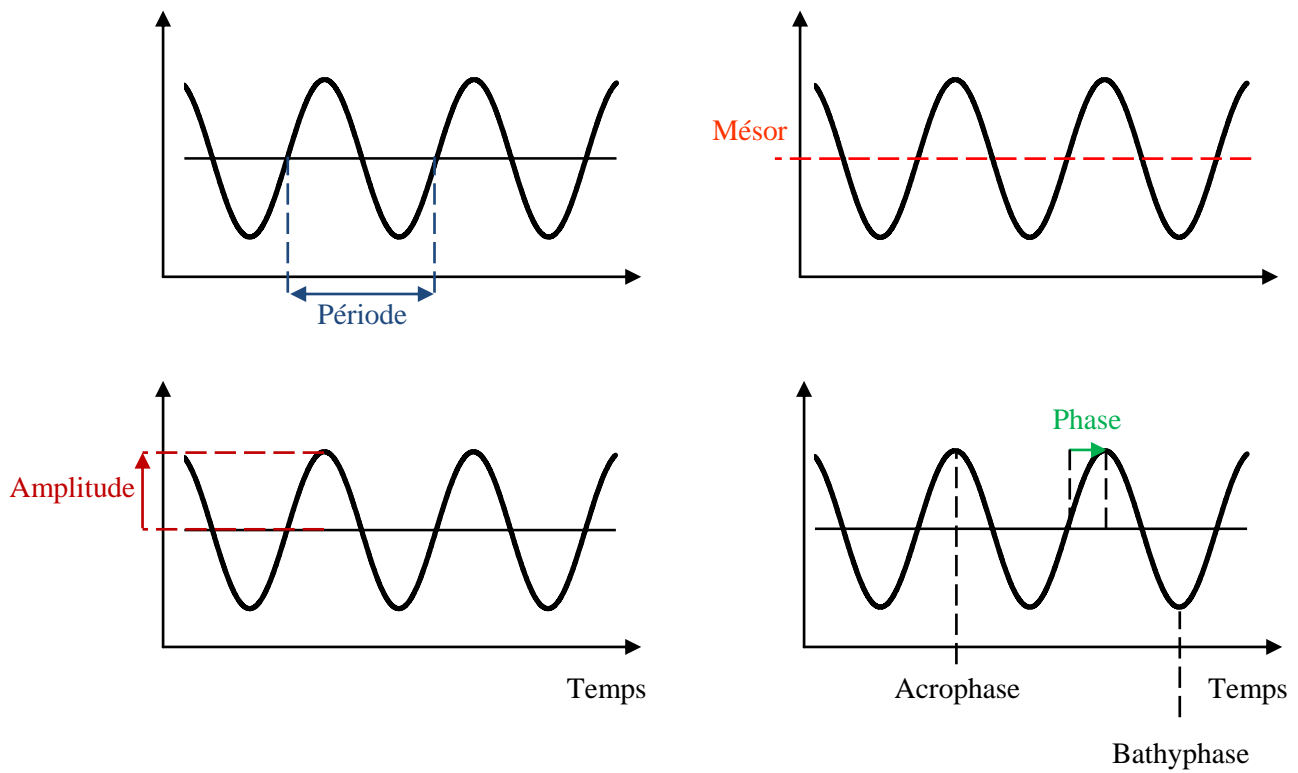


Figure 1.1 : Paramètres permettant de caractériser un rythme.

Lorsqu'ils ne sont plus entraînés par des facteurs de l'environnement, ces rythmes présentent une période proche mais pas égale, notée « circa- », à celle du cycle correspondant.

La chronobiologie, terme introduit en 1962 par Franz Halberg (Cambrioso et Keating, 1983) se définit comme : « l'étude de l'organisation temporelle des êtres vivants, des mécanismes qui la contrôlent et de leurs altérations » (Reinberg et Lewy, 2000).

2.2 Caractérisation d'un rythme

Comme définit ci-dessus, un rythme est donc un phénomène périodique. Il peut être caractérisé par 5 paramètres : la période, le méso, l'acrophase / la bathyphase, l'amplitude et la phase (Figure 1.1 ; Boissin et Canguilhem, 1998).

La période correspond au temps nécessaire pour effectuer un cycle complet. Elle s'exprime en unité de temps. Le méso, dont l'unité est celle du paramètre étudié, désigne le niveau moyen du rythme étudié. L'acrophase correspond à la valeur la plus élevée du rythme étudié et la bathyphase, à l'opposé, à la valeur la plus faible. Elles sont toutes deux localisées sur l'échelle des temps et exprimée dans l'unité correspondante. L'amplitude représente la distance entre le méso et la valeur la plus élevée ou la plus faible du rythme étudié. Elle est exprimée dans l'unité du paramètre analysé. La phase, finalement, localise un point donné de la fonction par rapport à une origine choisie arbitrairement. Il s'agit d'une mesure angulaire, exprimée en radians ou en degrés.

2.3 L'effet masque

Comme précisé ci-dessus, les rythmes biologiques sont endogènes, produits par l'horloge interne de l'organisme, et synchronisés, entraînés, par les facteurs environnementaux. L'effet masque ou « masking » désigne quant à lui ce qui agit sur un rythme par un processus externe à l'organisme, c'est-à-dire en n'entraînant pas l'horloge interne. Ce phénomène peut masquer l'effet de l'horloge moléculaire et complexifier la compréhension des mécanismes sous-jacents. Lorsqu'il considère l'activité d'un animal, Mrosovsky (1999) définit les effets masque positif et négatif respectivement comme une augmentation et une diminution du niveau d'activité du sujet étudié. Enfin, contrairement aux rythmes, l'effet masque n'est pas anticipatif d'un phénomène cyclique, c'est une réaction directe à un stimulus perçu.

3. Contexte historique des rythmes biologiques

Les informations rassemblées ici n'ont pas pour vocation de dresser une liste exhaustive de toutes les mentions des rythmes dans l'Histoire et des découvertes réalisées, mais sont destinées à mettre en exergue les principales étapes qui ont fait de la chronobiologie un

domaine scientifique à part entière. Ces explications sont destinées à comprendre le contexte dans lequel a évolué notre connaissance des rythmes biologiques en général et de la chronobiologie chez les organismes marins en particulier afin de saisir les enjeux du présent travail et les implications des résultats originaux qui y sont décrits.

3.1 Les premiers pas de la chronobiologie : apports de la botanique

Si la notion d'horloge biologique est assez récente, l'homme maîtrise néanmoins assez tôt l'aspect temporel ou cyclique des processus vivants. En effet, il faut des repères pour l'agriculture : semer et récolter doivent être effectués aux moments opportuns afin d'assurer la subsistance. A cette fin, la Rome antique dispose déjà d'un calendrier, certes imparfait, mais qui fournit ces repères temporels et cycliques indispensables. En Occident, les premières références écrites à un rythme biologique remontent au 4^e siècle av. JC. Durant les marches de l'armée d'Alexandre le Grand, le scribe Androsthènes observe et décrit le mouvement journalier (nyctinastie) des feuilles du tamarinier sur l'île de Tylos (Bahreïn), dans le golfe persique (McClung, 2006). Parallèlement, Aristote note que les abeilles sont actives le jour et au repos la nuit, même si on leur présente une bougie (Daan, 2010). L'origine endogène de ces rythmes n'est cependant pas envisagée à l'époque. Ce n'est en effet que 2000 ans plus tard qu'un rythme biologique ne sera plus considéré comme une simple réponse passive à un environnement changeant mais comme une propriété du vivant.

3.1.1 Première expérience montrant un rythme circadien

En 1729, l'astronome français Jean-Jacques d'Ortous de Mairan (1678-1771) rapporte à l'Académie Royale des Sciences de Paris ce qui est considéré comme la première expérience en chronobiologie. Il y décrit que la sensitive, plante héliotrope qui ouvre et oriente ses feuilles vers le soleil le jour et les replie sur elles-mêmes la nuit, poursuit ses mouvements lorsqu'elle est placée en obscurité constante. Il s'agit de la première description d'un rythme circadien. De Mairan suggère également d'inverser expérimentalement le jour et la nuit et d'observer si cela renverse le rythme. Faute de temps, il ne réalise pas cette expérience (Klarsfeld, 2009 ; Roenneberg et Merrow, 2005). Quelques années plus tard, Carl Von Linné (1707-1778) imagine une horloge florale en se basant sur les heures d'ouverture et fermeture des pétales et sépales de différentes espèces végétales et en les organisant dans un parterre circulaire (Klarsfeld, 2009).

3.1.2 La genèse du rythme est indépendant des cycles externes

Ce n'est qu'à la fin des années 1750 que les résultats de de Mairan sont répétés, et ce indépendamment par Henri-Louis Duhamel du Monceau (1700-1782) et Johann Gottfried Zinn (1727-1759). Leurs expériences confirment que le rythme foliaire circadien est

indépendant du cycle d'alternance jour/nuit, et montrent qu'il l'est également des variations de températures (Klarsfeld, 2009 ; Roenneberg et Mellow, 2005).

3.1.3 Le rythme circadien est d'origine endogène

L'histoire de la chronobiologie se poursuit ensuite en 1832 lorsque Augustin-Pyramus de Candolle (1778-1841) publie ses travaux menés sur *Mimosa pudica*. Il confirme les résultats de ses prédécesseurs et montre que la période du rythme foliaire du mimosa en libre cours est de 22 à 23h. De plus, la période s'avère être plus courte en condition de constante illumination qu'en condition d'obscurité permanente. Il observe également que le rythme est inversé lorsque la photopériode et la scotopériode sont interverties. Ces études suggèrent une origine endogène des rythmes biologiques (Klarsfeld, 2009 ; McClung, 2006). En 1857, Julius Von Sachs propose que la période exprimée par des plantes en libre cours soit le reflet de la période propre de l'organisme (Klarsfeld, 2009).

De nouvelles contributions sont ensuite apportées par Wilhelm Pfeffer (1845-1920). Doutant de la validité des précédents résultats, il écarte en 1873 l'idée du caractère endogène des rythmes biologiques. Il met en place des systèmes expérimentaux isolés et contrôlés et travaille sur les mouvements foliaires de *Phaseolus* et *Calendula sp.* Il publie en 1915 plusieurs résultats importants. Tout d'abord, il mesure les périodes en libre cours pour plusieurs espèces, qui diffèrent toutes de 24h. Il montre par ailleurs qu'un éclairage de quelques minutes de plantes maintenues dans l'obscurité provoque un déphasage du rythme dont l'ampleur et la direction varient selon le moment du cycle auquel l'éclairage survient. En outre, il arrive à entrainer expérimentalement le rythme foliaire à une période différente de 24h. Enfin, une observation importante relate que des feuilles dont le mouvement est empêché présentent, lorsque l'entrave est retirée, la position qui aurait été la leur sans cette intervention. Pfeffer revoit sa position initiale sur la nature des rythmes biologiques et appuie l'existence d'un mécanisme horloger élaboré plutôt qu'une simple réponse mécanique à des stimuli environnementaux (Klarsfeld, 2009 ; McClung, 2006). Ces résultats renforcent un des derniers travaux de Charles Darwin (1809-1882) publié en 1880. Le célèbre biologiste soutient un mécanisme interne, et le met en relation avec l'évolution, proposant que les rythmes foliaires assurent une protection contre le gel. Puis, à la fin des années 1920, Anthonia Kleinhoonte révèle que la période propre des plantes est une caractéristique innée. Des plantes expriment en conditions constantes une période différente de 24h, période à laquelle elles n'ont pas été soumises depuis leur germination (Klarsfeld, 2009).

3.1.4 Le rythme est héritable

Toutefois, malgré les résultats acquis jusque-là, les études menées sur les rythmes biologiques au début du 20^e visent à débusquer le « facteur X », facteur qui serait corrélé à l'heure du jour

et qui interviendrait pour donner le rythme aux organismes placés en libre cours. C'est dans cet esprit qu'Erwin Bünning (1906-1990) démarre ses recherches sur les rythmes. Il ne trouvera pas de « facteur X » mais en revanche découvrira dans des travaux publiés en 1932 l'héritabilité de la rythmicité. En effet, il montre chez le haricot que la descendance issue de deux parents présentant une période distincte possède une période intermédiaire à celles des plantes mères (McClung, 2006). L'héritabilité des rythmes sera confirmée par Aschoff (1913-1998) dans les années 1950 : les poulets issus d'œufs maintenus en conditions constantes expriment un rythme circadien normal (Daan, 2010). De même, Sheeba et al. (1999) montrent que le rythme circadien persiste chez la drosophile après 600 générations maintenues en conditions constantes. Ces études indiquent qu'il n'est pas nécessaire qu'un organisme soit soumis à un environnement cyclique pour pouvoir exprimer un rythme biologique.

3.1.5 Le photopériodisme

En 1918, Wightman Garner et Henry Allard étudient des plants de tabac et découvrent que la floraison est intimement liée aux saisons. Ils étendent leurs résultats et mettent en évidence le rôle du photopériodisme chez les plantes, c'est-à-dire l'importance de la durée des périodes de lumière et d'obscurité. Ils distinguent les plantes de jours longs, qui fleurissent lorsque la durée de la période lumineuse dépasse une certaine valeur, et les plantes de jours courts, qui ne se reproduisent que lorsque la durée de la période lumineuse descend sous un certain seuil. Cela suppose que la plante peut se situer dans le cycle saisonnier (Klarsfeld, 2009). L'horloge circadienne, par ailleurs, constitue un élément essentiel pour synchroniser le cycle annuel lié au photopériodisme (Nelson et al., 2000 ; Song et al., 2010).

3.2 Influences de la biologie animale

Si les recherches menées en biologie végétale ont posé les fondements de la chronobiologie, elles sont restées assez marginales jusqu'à ce que la biologie animale s'intéresse au domaine au début du 20^e siècle. L'idée de phénomènes rythmiques chez l'homme était pourtant déjà connue précédemment, mais ne constituait pas en elle-même un domaine d'investigation.

3.2.1 Les rythmes chez l'homme dans l'histoire médicale

Au 5^e siècle, le romain Caelius Aurelianus relate dans son livre *Des maladies aiguës et chroniques* que l'asthme est plus prononcé en hiver qu'au printemps, ainsi que la nuit que le jour (Lemmer, 2009). Ses travaux reprennent aussi ceux de Soranus d'Ephèse (2^e siècle), qu'il traduit du grec au latin, évoquant la cyclicité de certaines affections comme les fièvres ou l'épilepsie (Reinberg et Lewi, 2000).

Ensuite, c'est essentiellement à partir de 17^e siècle que les observations des rythmes physiologiques ou comportementaux s'accumulent. En 1602, le polonais Josephus Struthius (1510-1568) précise dans son ouvrage *Ars Sphygmica seu pulsuum doctrina* que le rythme cardiaque est influencé par le sexe, l'activité, la santé, les saisons, l'âge, soit des facteurs à la fois internes et externes (Lemmer, 2009). Le physiologiste italien Sanctorius Sanctorius (1561-1636) publie en 1664 *De statica medicina*, un ouvrage qui reprend plus de 30 ans de recherches sur le métabolisme. Il travaille sur le poids, la respiration, la température en se pesant à divers moments de la journée pour déterminer les variations des différents paramètres (Lemmer, 2009).

Outre l'observation pure des rythmes, la cause de ceux-ci fait naître quelques réflexions. En 1797, le médecin allemand Christoph Wilhelm Hufeland (1762-1836) déclare dans *L'art de prolonger la vie* que « en raison de la rotation régulière de notre planète il y a une période de 24h transmises à tous les habitants sur Terre (...) et dans toutes les sortes de maladies cette période régulière peut à nouveau être trouvée, et cette période de 24h détermine la merveilleuse synchronisation de toutes nos fonctions corporelles. Cette période peut être appelée l'unité de chronologie de la nature » (Lemmer, 2009). En 1806, le physicien français Jean-Baptiste-Arnaud Murat publie *De l'influence de la nuit sur les maladies, ou Traité des maladies nocturnes*. Dans cet ouvrage, il s'intéresse entre autre au rythme d'alternance veille/sommeil, sans pour autant pointer une origine endogène (Lemmer, 2009). Ensuite, en 1814, le pharmacien français Julien-Joseph Virey (1775-1846) présente sa thèse de doctorat en médecine à Paris, intitulée *Ephémérides de la vie humaine, ou recherche sur la révolution journalière, et la périodicité de ses phénomènes dans la santé et les maladies*. Virey se positionne pour une origine endogène des rythmes biologiques, et fait référence aux résultats de d'Ortous de Mairan pour les séparer des cycles environnementaux : « cette rotation successive de nos fonctions chaque jour (...) n'établit-elle pas une périodicité habituelle et comme innée dans tout le jeu de nos organes ? N'est-ce pas comme (...) une sorte d'horloge vivante, montée par la nature, entraînée par le mouvement rapide du soleil et de notre sphère ». Virey formule aussi la recommandation suivante, qui en fait un des précurseurs de la chronopharmacologie : « Tout médicament n'est pas également indiqué à toute heure ». Par ailleurs, travaillant entre autre sur les rythmes de la mortalité humaine, Virey appuie son argumentation par des observations chiffrées, démarche innovante dans le domaine. Les idées de Virey sont accueillies au mieux avec scepticisme, et plutôt souvent fermement attaquées (Reinberg et Lewi, 2000).

Les mentions rapportées ci-dessus ne sont pas exhaustives, il s'agit des premiers jalons posés dans l'un ou l'autre domaine médical. Ensuite, les études se poursuivent, confirmant d'anciens travaux, les approfondissant, mettant à jour de nouveaux rythmes physiologiques.

La description de ces rythmes est importante, et a permis de poser certaines bases de la médecine moderne. Toutefois, ces cycles physiologiques ne sont pas, à l'époque, liés à la chronobiologie en tant que telle. Ce sont des observations, qui servent souvent le praticien dans l'exercice de la médecine. Il ne s'agit pour autant pas de mettre en évidence un rythme par des protocoles en libre cours ou autre.

3.2.2 L'horloge biologique face au concept d'homéostasie

Le concept d'horloge biologique interne aux organismes tend à rester confiné aux plantes et tarde à s'imposer alors que les éléments clés à sa compréhension ont été observés. Mais parallèlement, la notion de constance du milieu intérieur introduite par Claude Bernard (1813-1878) chez les animaux domine les esprits dès le 19^e siècle. Le physiologiste français distingue le milieu externe, l'environnement dans lequel un organisme vit, et le milieu interne qui le constitue. En outre, il précise que de nombreux animaux tendent à maintenir les paramètres physico-chimiques de leur milieu interne à un niveau relativement constant. C'est le concept d'homéostasie (Campbell et Reece, 2004). Il écrit en ces termes : « La fixité du milieu intérieur est la condition de la vie libre » (Boissin et Canguilhem, 1998). Claude Bernard a une influence très importante chez ses contemporains, et ce concept de « fixité du milieu intérieur » ne facilite pas l'émergence du concept d'une oscillation interne aux organismes. Ces deux notions ne sont pourtant pas incompatibles : l'homéostasie implique l'existence de valeurs de contrôle et non une constance.

3.2.3 Les abeilles, les moustiques et les mouches

Les premières expériences chronobiologiques en zoologie sont effectuées en 1894, sur les arthropodes, puis à partir des années 1920 (McClung, 2006). Mais ce sont surtout des études menées sur les abeilles et les drosophiles qui permettront aux scientifiques d'harmoniser l'ensemble des observations réalisées et de jeter les bases solides de la chronobiologie.

Karl von Frisch (1886-1982) et son étudiante, Ingeborg Beling, observent les abeilles, porteuses d'enseignements intéressants. Dans les années 1920, Beling présente pendant plusieurs jours une coupelle remplie d'eau sucrée à des abeilles pendant un temps limité et à un endroit déterminé. Après quelques jours, les abeilles anticipent la présence de la coupelle et se présentent un peu avant qu'elle ne soit mise en place. Les abeilles maintiennent ce comportement si la coupelle n'est pas présentée ainsi qu'en conditions constantes d'obscurité, température et humidité. Elles possèdent donc une notion du temps et « savent l'heure qu'il est » (Daan, 2010 ; Klarsfeld, 2009).

Colin S. Pittendrigh (1918-1996), lors de ses premiers travaux sur les rythmes du vivant dans les années 1940, observe que les moustiques anophèles présentent une activité minimale à la

mi-journée et une activité maximale en fin de journée. Ensuite, il étudie la drosophile, qui manifeste un rythme d'éclosion des mouches adultes après la métamorphose. En effet, l'éclosion a lieu préférentiellement tôt le matin. Ce rythme se maintient en conditions constantes (Klarsfeld, 2009).

3.2.4 L'orientation des insectes et des oiseaux et l'intuition de Pittendrigh

En 1944-1945, von Frish et son équipe déterminent les modalités selon lesquels les abeilles informent le reste de la ruche de la présence d'une source de nourriture via la « danse » des abeilles qu'ils ont décrite plusieurs années auparavant. Ils avaient montré que la nature du nectar est révélée aux congénères grâce aux odeurs collées au corps de l'abeille. Ensuite, ils découvrent que la distance par rapport à la source est précisée par la vitesse à laquelle la danse est effectuée. La direction, elle, est codée par la direction d'un segment rectiligne tracé pendant la chorégraphie. Ce segment donne la direction par rapport au soleil (Klarsfeld, 2009). Le soleil se déplaçant dans le ciel d'environ 15° par heure au cours de la journée, les abeilles corrigent la direction de leur segment rectiligne en conséquence (Daan, 2010). Il apparaît donc, encore, que les abeilles connaissent l'heure.

Parallèlement, Gustav Kramer (1910-1959) étudie l'orientation des oiseaux migrateurs. Il met en évidence l'orientation des oiseaux pendant leur vol par rapport à la position du soleil, azimuth interprété et corrigé en fonction de l'heure solaire. Les oiseaux n'apprennent pas une position par rapport au soleil mais une direction géographique. Les oiseaux sont donc en mesure de compenser le mouvement du soleil dans le ciel, ce qui implique de connaître l'écoulement du temps (Daan, 2010 ; Kramer, 1957). C'est en assistant à une conférence de Kramer en 1951 ou 1952 que Pittendrigh a l'intuition de lier ces phénomènes de mesure continue du temps décrits chez les oiseaux et les abeilles aux observations rythmiques réalisées jusque-là sur les végétaux et les animaux et d'imaginer l'existence d'une horloge biologique universelle dans le vivant (Pittendrigh, 1993).

3.2.5 La compensation de la température

La vitesse des réactions métaboliques varie généralement d'un facteur 2 à 3 lorsque la température est modifiée de 10°C ($Q_{10} = 2-3$; Dejours, 1981). Or, pour les rythmes biologiques, ce facteur est généralement très légèrement supérieur à 1 (McClung, 2006). La période varie peu avec la température. Cela a longtemps fait obstacle à l'élaboration du concept d'horloge biologique. Ce résultat est interprété, selon les scientifiques, de deux façons opposées. Pour certains, et particulièrement Frank Brown, la faiblesse de ces variations indique que les rythmes sont exogènes et liés à la rotation de la Terre. Pour d'autres, au contraire, ces variations sont considérées comme importantes et la variation de la période avec la température, similaire à tout processus biochimique, signe l'origine endogène des rythmes

(Klarsfeld, 2009). Pittendrigh, en 1952-1953, travaille à nouveau sur le rythme d'éclosion de la drosophile et montre que la période varie peu avec la température au cours d'une expérience ($Q_{10} = 1.02$), mais que si la température est modifiée en cours d'expérience, le rythme est temporairement perturbé. Il considère que si le rythme était exogène, le facteur Q_{10} serait de 1.00. Pittendrigh analyse la faible variation de période d'un point de vue darwinien : c'est là ce qu'on attend d'une horloge. Quel serait l'intérêt d'un mécanisme horloger dont l'heure indiquée dépendrait de la température extérieure ? Les rythmes sont dès lors dits compensés pour la température. C'est, pour le scientifique, tout l'intérêt d'un rythme biologique endogène (Pittendrigh, 1954, 1993). C'est toutefois Bünning qui invente le terme d'horloge biologique.

3.3 Cold Spring Harbour 1960

3.3.1 La naissance de la chronobiologie

En chronobiologie, *Cold Spring Harbor* désigne un congrès tenu en juin 1960 à Long Island (USA) sur les horloges biologiques et organisé par Jürgen Aschoff, Colin Pittendrigh, Erwin Bünning et John Woodland Hastings. Ce n'est pas le premier congrès de chronobiologie - plusieurs congrès internationaux de la « Society for Biological Rhythm » s'étaient déjà tenus depuis 1937 (Cambrioso et Keating, 1983 ; Lemmer, 2009) - mais on considère généralement qu'il signe la naissance de la chronobiologie. L'objectif de ce congrès est d'emblée défini comme étant la question du « mécanisme temporel par lequel les organismes marquent le passage des heures du jour » (Ramji, 2008). Rassemblant 150 scientifiques travaillant sur les rythmes, biologistes et mathématiciens, ce congrès apporte une unité conceptuelle à un domaine jusque-là dispersé en mettant en avant le fait que les rythmes biologiques sont une propriété fondamentale du vivant (Daan, 2010). Par ailleurs, il fournit un contexte analytique pour l'étude des rythmes (Aschoff, 1960).

3.3.2 Le débat exogène-endogène

Les mécanismes sous-tendant les rythmes biologiques - l'horloge moléculaire que l'on connaît aujourd'hui - ne sont pas connus en 1960. La métaphore de l'horloge renvoie à un objet mal identifié, régulièrement qualifié de boîte noire. La question du mécanisme de l'horloge tourne surtout autour de l'origine des rythmes : sont-ils endogènes c'est-à-dire proviennent-ils d'un processus interne aux organismes, ou exogènes, simples réponses aux cycles environnementaux ? Ce sujet n'est pas nouveau mais nourrit un débat conséquent pendant le congrès. Et surtout, ce débat n'est pas anodin. En effet, plusieurs objets sont liés à ce débat (Ramji, 2008) :

- la réponse à cette question définit le domaine d'étude des rythmes biologiques, l'horloge ou la variable temporelle, et ses limites ;

- la légitimité de l'étude des rythmes biologiques dépend en partie de l'issue du débat. En tant que mécanisme endogène, les rythmes du vivant requièrent des études spécialisées, alors qu'un mécanisme exogène en ferait un épiphénomène des cycles environnementaux ;
- de la légitimité de l'étude des rythmes dépend aussi le financement qui sera accordé aux travaux s'y rapportant.

Plusieurs scientifiques animent le débat et prennent position pour l'une ou l'autre thèse. Et le partage est inégal : d'un côté, Frank Brown défend l'idée d'un processus purement exogène, de l'autre, Colin Pittendrigh, Jürgen Aschoff, John Woodland Hastings, Patricia DeCoursey, Franz Halberg et Erwin Bünning entre autres argumentent en faveur d'une horloge biologique interne aux organismes (Klarsfeld, 2009 ; Ramji, 2008).

Certains scientifiques prennent position par rapport à des faits observés. DeCoursey présente ses études sur l'écureuil, et montre des actogrammes d'activité d'animaux en libre cours. Hastings expose ses travaux sur le rythme de bioluminescence chez une algue unicellulaire dinoflagellée, rythme qui reste robuste indépendamment des variations de température. Ces arguments favorisent l'existence d'une horloge endogène. D'autres considèrent la cause entendue depuis plusieurs décennies et en fond un postulat pour expliquer leurs résultats. Puis, entre Brown et Pittendrigh, le débat devient ontologique : qu'est-ce qu'une horloge, quelle est son utilité ? Brown maintient de façon catégorique l'origine exogène des rythmes, conteste l'horloge biologique, réfute les arguments de ses collègues, arguments qu'il juge insuffisants. Il considère que des facteurs géophysiques guident les rythmes : champs magnétique et électrostatique, cycles célestes, etc., et que les expériences ne sont jamais menées en libre cours. Pittendrigh, lui, souligne l'ubiquité des rythmes biologiques, leur manifestations tant dans des systèmes mono- que multicellulaires, soutient leur caractère inné et fondamental (Ramji, 2008). Les approches de Brown et Pittendrigh sont opposées. Le premier soutient que ce n'est pas parce qu'on n'a pas mis à jour de lien entre les signaux extérieurs et les organismes qu'il n'y en a pas. Il prône la mise en évidence du mécanisme réel. Il cherche à débusquer chaque détail dans les relations entre les rythmes qu'il observe et de subtils cycles environnementaux, traque la précision. Dès lors, il élabore pendant de nombreuses années des modèles utilisant entre autre le rayonnement cosmique et le champ magnétique pour expliquer les données qu'il collecte sur différents modèles. Pittendrigh, de son côté, cherche plutôt à dégager l'essentiel et synthétiser les différentes tendances que d'expliquer chaque détail individuellement (Klarsfeld, 2009).

Au terme du congrès, l'origine endogène des rythmes semble entendue et rassemble la grande majorité des chercheurs. Brown et l'hypothèse exogène reçoivent encore une certaine attention en 1964 lors des rencontres au *Feldafing Summer School on Circadian Clocks*

(Allemagne). Cependant, « ses méthodes expérimentales, ses analyses et modèles sont jugés inadéquats ». La question devient alors progressivement marginale, même si elle est néanmoins encore sporadiquement soulevée jusqu'à la fin des années 1980 (Chandrashekar, 1998), entre autre par un article sur les abeilles (Martin et Martin, 1987). Les arguments avancés sont néanmoins à chaque fois fermement réfutés (Brady, 1987).

3.3.3 Approche moléculaire versus approche systémique

Le congrès de *Cold Spring Harbor* voit également l'émergence de deux approches différentes pour étudier les rythmes biologiques : l'approche moléculaire et l'approche systémique. Une troisième approche, plus spécifique, peut aussi être mentionnée, l'approche médicale défendue par Franz Halberg, mais qui se marginalisera rapidement.

Dans les années 1940, l'analyse moléculaire prend son essor en biologie. Pourtant, en 1960, la recherche en chronobiologie s'appuie encore essentiellement sur l'observation au niveau des organismes plutôt que sur l'analyse moléculaire. Lors du congrès, seulement 3 scientifiques présentent un article sur l'étude moléculaire des rythmes. John Woodland Hastings, en particulier, pointe l'importance de la biochimie afin d'établir les mécanismes de l'horloge et ceux, distincts, qui sont contrôlés par l'horloge (Ramji, 2008).

L'approche systémique, en revanche, cherche à comprendre l'organisation des systèmes vivants. Un de ses défenseurs est Colin Pittendrigh aux Etats-Unis et Aschoff en Allemagne. Pittendrigh cherche à prendre du recul par rapport à la quantité de données obtenues sur des organismes très différents, allant « des unicellulaires à la violette africaine et l'homme » (Klarsfeld, 2009) et met en avant les similarités de l'horloge dans des systèmes différents comme la drosophile, les plantes et les souris. Il tente de ne retenir que les informations les plus pertinentes dans les nombreuses observations récoltées, de les standardiser et de construire des modèles applicables à travers les différentes espèces (Ramji, 2008).

Ces deux approches travaillent donc à des niveaux différents, la première s'attelle au microscopique, la seconde au macroscopique. Les scientifiques cherchant à découvrir le mécanisme de l'horloge, une compétition s'engage entre les approches systémique et moléculaire après 1960. Ces deux voies d'analyses obtiennent dans les années 1970 des résultats conséquents : l'approche systémique détecte une structure anatomique, les noyaux suprachiasmatiques, qui s'avère être l'horloge centrale des mammifères (Moore et Eichler, 1972 ; Stephan et Zucker, 1972). L'approche moléculaire découvre les mécanismes moléculaires de l'horloge (Konopka et Benzer, 1971 ; Takahashi, 2004). Si l'approche systémique était dominante en 1960, une évolution s'est progressivement produite et c'est

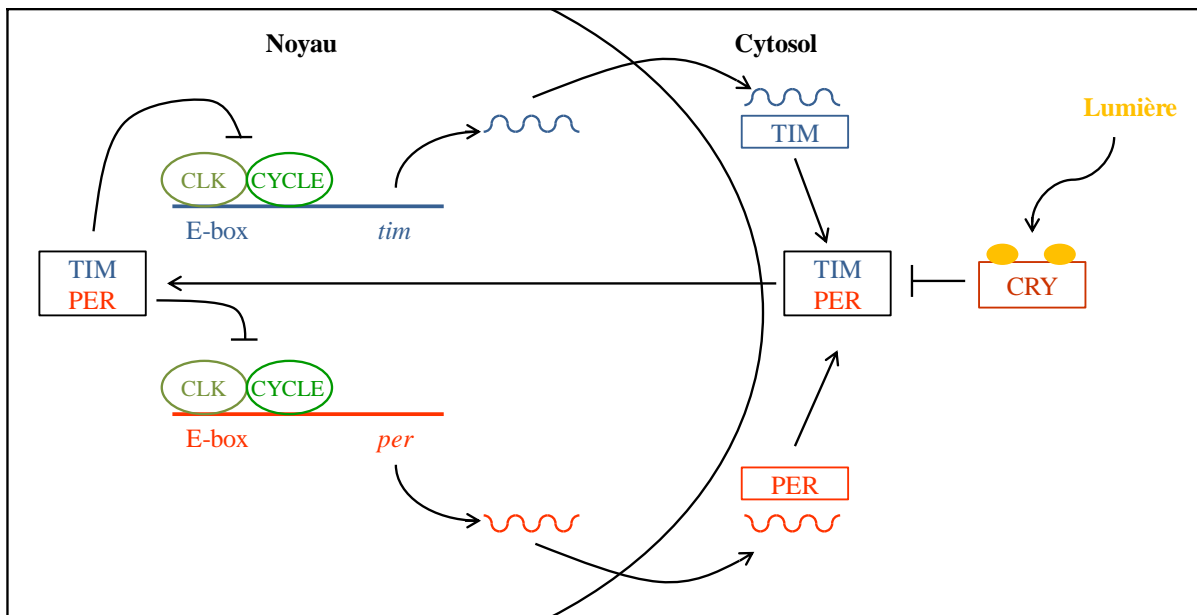


Figure 1.2 : Illustration de la boucle de rétro-contrôle négatif (TTFL) chez la drosophile telle que conceptualisée au début des années 2000. Les gènes *per* et *tim* sont activés de manière coordonnée par l'hétérodimère CLK-CYCLE (clk : clock) qui se lie au niveau de la E-box de leur promoteur respectif. Les gènes *per* et *tim* sont alors transcrits en ARN dans le noyau puis traduits en protéines PER et TIM dans le cytoplasme. Ces protéines forment ensuite un hétérodimère qui entre dans le noyau et inhibe le dimère CLOCK-CYCLE. En outre, la formation de l'hétérodimère PER-TIM est régulée par la protéine CRYPTOCHROME, dont l'action est dépendante de la lumière (adapté d'après Lucas et Foster, 1998 ; Lin et Todo 2005 ; Young et Kay, 2001).

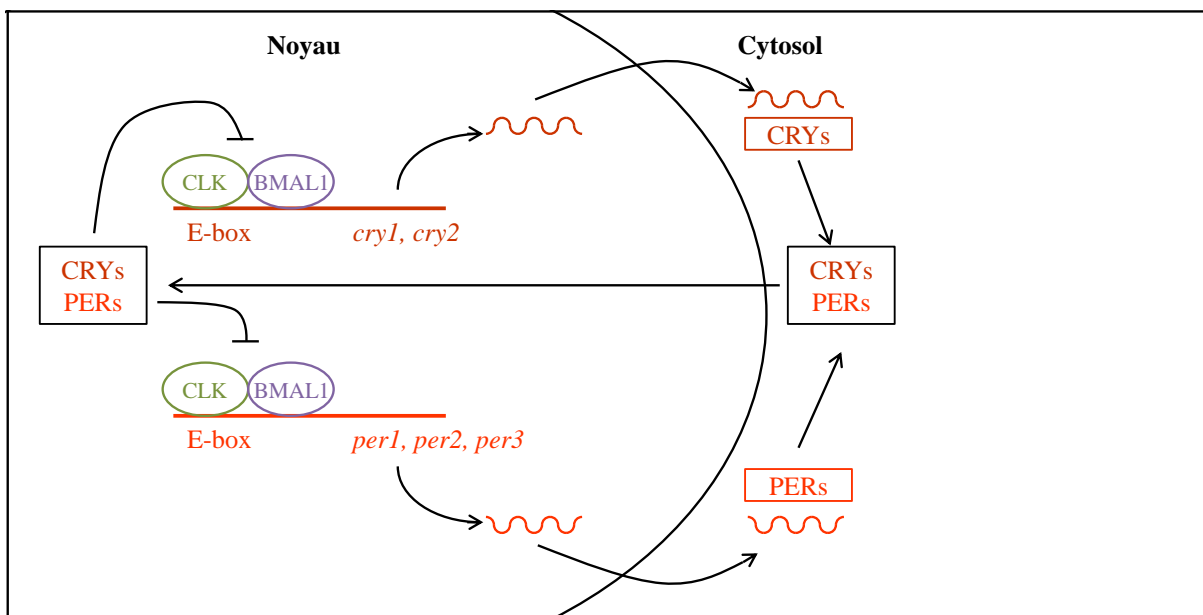


Figure 1.3 : Illustration du modèle TTFL chez les mammifères. Le gène *cry* est un composant de l'horloge interne. CRY forme, à la place de TIM, un hétérodimère avec PER.

aujourd'hui l'approche moléculaire qui règne très largement sur l'étude des rythmes biologiques (Ramji, 2008).

3.4 Découverte de l'horloge moléculaire

L'approche systémique commence à révéler les mécanismes moléculaires de l'horloge dans la deuxième moitié du 20^e siècle. En 1971, Konopka et Benzer découvrent 3 mutants chez *Drosophila melanogaster*. Ces mutations affectent en conditions constantes la période du rythme d'éclosion et du rythme locomoteur des adultes et concernent le même gène (Konopka et Benzer, 1971). Le gène *period* (*per*) vient d'être trouvé. Ensuite, d'autres gènes sont mis au jour par des mutants de l'horloge : les gènes *timeless*, *frequency*, *clock*,... Des phénotypes extrêmes (la mutation provoque une modification de la période de plus de 4h) révèlent les gènes *cycle* et *tau* (Takahashi, 2004). A la fin des années 1990, le gène *cryptochrome* (*cry*) est découvert chez la drosophile. Il s'avère être un photorécepteur intervenant dans l'entraînement de l'horloge moléculaire (Emery et al., 1998). Chez les mammifères, *cry* intervient également dans le photo-entraînement, mais en plus fait partie de l'oscillateur central (Cashmore, 2003). Ces gènes, ou leurs équivalents, ont été trouvés dans grand nombre d'organismes, tant chez les procaryotes que les eucaryotes, incluant notamment des vertébrés (homme, souris, rat, poisson zèbre, xénope, certains oiseaux), la drosophile, le champignon *Neurospora crassa*, la cyanobactérie *Synechococcus elongatus*, les plantes (*Arabidopsis thaliana*), mettant en exergue l'ubiquité des mécanismes moléculaires qui assurent les rythmes biologiques (Dunlap, 1999 ; Hall, 1995)

En 1990, Hardin et al. montrent que chez la drosophile l'oscillation circadienne de la protéine PER est précédée par une oscillation du niveau d'ARN du gène *per*. Ils suggèrent que les rythmes circadiens sont générés par une boucle de rétro-contrôle négatif. Un gène de l'horloge est transcrit en ARN puis traduit en protéine. Ensuite, la protéine entre dans le noyau et inhibe sa transcription. Lorsque les ARN et protéines disparaissent, l'inhibition est levée et le cycle, tournant en 24h environ, redémarre (Hardin et al., 1990). L'horloge moléculaire est ensuite généralisée et modélisée comme une boucle de rétro-contrôle transcription-traduction (Transcription-translation feedback loop, TTFL), comme illustré dans les Figures 1.2 et 1.3.

Avec la découverte de nouveaux gènes et mécanismes chez les mammifères, plantes, champignons, mouches, etc., de nouvelles boucles de rétro-contrôle – positif ou négatif – viennent renforcer le dispositif. Il apparaît aujourd'hui que le mécanisme est encore plus élaboré et repose sur un réseau moléculaire complexe fonctionnant à différents niveaux (Cermakian and Sassone-Corsi, 2000; Reppert, 1998; Roenneberg and Merrow, 2003, 2005; Young and Kay, 2001). L'horloge inclut également des modifications post-transcriptionnelles

et post-traductionnelles : régulation du renouvellement des protéines, phosphorylation de protéines, méthylation, ... (Zhang et Kay, 2010).

3.5 La chronobiologie depuis 1970

Toutes les découvertes citées ont jeté les bases et assuré le développement de la chronobiologie. Depuis, bien sûr, de nombreuses découvertes importantes ont été effectuées : les mécanismes moléculaires ont été affinés ; des études montrent dans différents organismes l'existence d'oscillateurs périphériques ; finalement, l'horloge existe potentiellement dans toutes les cellules. Les rythmes biologiques sont intégrés progressivement à la médecine, la chronotoxicité prend son essor, les études se multiplient sur le travail posté, ... Chaque année apporte sa contribution à la connaissance sur le sujet.

Aujourd'hui, Colin S. Pittendrigh est considéré avec Jürgen Aschoff et Erwin Bünning, comme un des pères fondateurs de la chronobiologie, lui qui n'était pas favorable à ce que l'étude de rythme biologique devienne une discipline à part entière, ce qu'elle est devenue. Contrairement à son collègue Franz Halberg, il défend dans les années 1970-1980 l'idée que les rythmes biologiques doivent plutôt s'intégrer dans tous les domaines scientifiques (Cambrosio et Keating, 1983).

Outre l'impulsion donnée à la chronobiologie en tant que discipline, Franz Halberg est également à l'origine de la chronotoxicologie moderne. Il a en effet travaillé sur l'importance de la prise en compte des rythmes pour estimer entre autre l'effet des médicaments, montrant que leur action peut être forte ou négligeable selon le moment auquel ils sont administrés (Halberg et al., 2003a). Il a également introduit et développé les méthodes statistiques pour l'étude des séries temporelles et de rythmes biologiques, travaillant notamment sur le modèle COSINOR, toujours largement utilisé (Bingham et al., 1982 ; Halberg et al., 2003b ; Nelson et al., 1979).

4. Les rythmes biologiques chez les organismes marins

4.1 Le littoral, un biotope très changeant

Les organismes marins, qui représentent une composante significative de la biodiversité de notre planète, ont reçu une attention bien moindre en chronobiologie que leurs congénères terrestres. Ils occupent pourtant un environnement rythmique particulièrement intéressant par sa complexité. Outre le cycle solaire d'alternance jour/nuit, ils subissent les cycles lunaires de façon conséquente, le plus important étant le cycle des marées dit tidal (Naylor, 2001). A

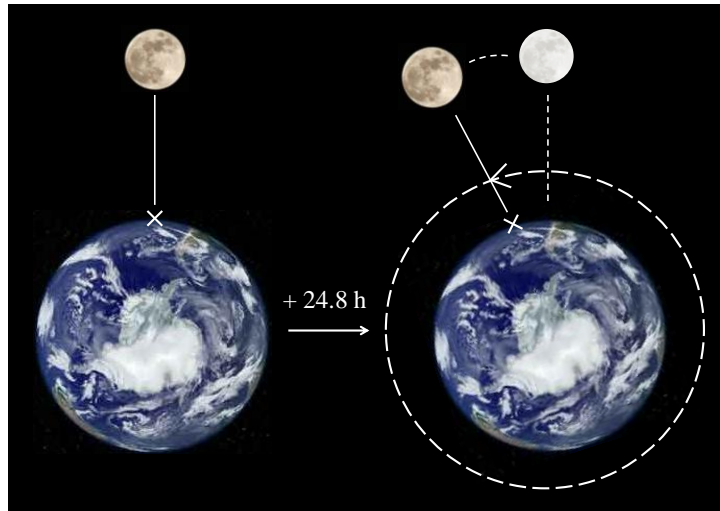


Figure 1.4 : Le jour lunaire résulte des mouvements relatifs de la Terre et de la Lune. La Terre tourne sur son axe et la Lune se déplace autour de la Terre dans la même direction. Un point X sur Terre doit réaliser plus d'une révolution pour être à nouveau dans l'axe de la Lune (adapté d'après Palmer, 1995).

A



B

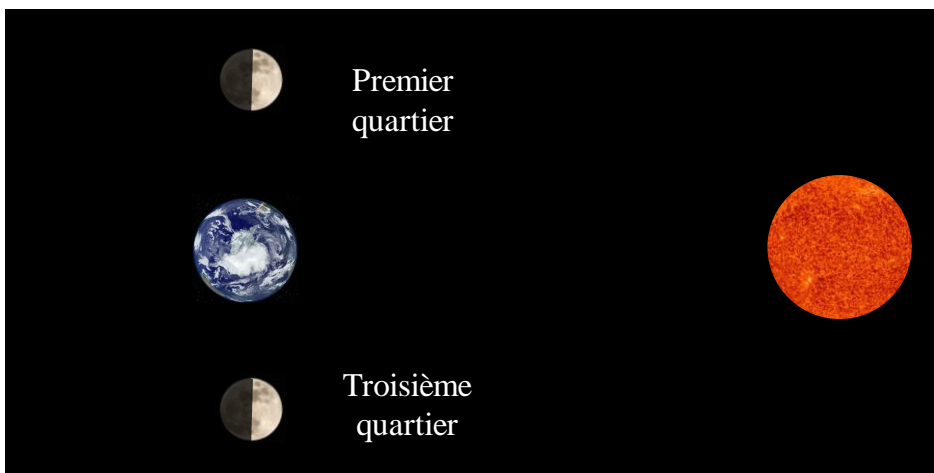


Figure 1.5 : Les marées de vives-eaux (A) et de mortes-eaux (B) se produisent en fonction des positions relatives de la Lune, de la Terre et du Soleil.

chaque marée, ils sont donc confrontés à des modifications drastiques de leur environnement : exposition à l'air puis à l'eau dans le cas extrême des habitants de la zone de balancement des marées, variations de salinité, de courant, de pression, de nourriture, etc.

4.1.1 Les marées

La marée correspond à la variation du niveau de la mer résultant des forces gravitationnelles et centrifuges produites par la lune et le soleil. En termes de forces, ce sont ces astres qui ont les effets les plus importants sur la terre, le soleil en raison de sa masse et la lune en raison de sa proximité (www.shom.fr).

La force centrifuge (ou d'inertie) provient du mouvement orbital autour du centre de gravité de l'ensemble terre-astre. La force d'attraction est due à l'action gravitationnelle exercée par l'astre. C'est la somme de ces forces qui donne en chaque point de la terre la force génératrice de la marée. Il y a donc un déplacement des masses d'eau qui forme une sorte de « bulbe » autour du globe terrestre. La force génératrice des marées est également fonction du temps. En effet, plusieurs cycles sont définis pour les mouvements des trois astres terre, soleil, lune. Il est principalement à noter que (Naylor, 2010) :

- la Terre effectue une rotation complète autour de son axe en 24h par rapport au Soleil.
- la Terre effectue une rotation complète autour de son axe en 24.8h par rapport à la Lune car la Lune est en orbite autour de la Terre (Figure 1.4). Cela définit le jour lunaire.
- l'intervalle de temps entre deux nouvelles lunes est de 29.53 jours, ce qui correspond à un cycle synodique.
- l'intervalle de temps séparant deux périgées de la lune (point de l'orbite elliptique le plus proche de la Terre) est de 27.55 jours et désigne le cycle anomalistique.
- l'orbite de la Lune autour de la Terre ne se passe pas au niveau d'une latitude constante sur Terre, mais cette orbite oscille à un rythme de 27.32 jours, ce qui définit le cycle sidéral.

Le cycle synodique est le principal responsable des marées de vives-eaux et de mortes-eaux dans nos zones cotières. Lorsque la Terre, la Lune et le Soleil sont alignés, ils sont dits en syzygie : les forces gravitationnelles de la Lune et du Soleil s'additionnent et donnent les marées de plus grandes amplitudes dites de vives-eaux. Lorsque le Soleil et la Lune sont positionnés en angle droit par rapport à la Terre, les forces gravitationnelles des deux astres se neutralisent en partie et produisent les marées de plus basses amplitudes ou de mortes-eaux (Figure 1.5).

Le cycle anomalistique se superpose au cycle synodique et induit une inégalité bimensuelle dans les hauteurs d'eau aux marées de vives-eaux.

Le cycle sidéral, lui, est responsable d'une inégalité semi-diurne, c'est-à-dire que les hauteurs d'eau pour une même marée, haute ou basse, ne sont pas égales pour un même jour lunaire (Naylor, 2010).

Quatre types de marées sont définis au niveau du globe (www.shom.fr) :

- la marée semi-diurne : c'est un régime de marée comprenant par jour lunaire deux pleines mers et deux basses mers de hauteurs presque identiques (période de 12.4h). Cette marée domine sur les côtes de l'Océan Atlantique. C'est celle qui berce la façade atlantique française et le bassin d'Arcachon.
- la marée semi-diurne à inégalité diurne : c'est un régime similaire à celui-ci-dessus, mais les hauteurs d'eau aux deux pleines mers ou basses mers peuvent présenter des différences importantes au cours d'une même journée. Cela s'observe surtout dans les Océans Indien et Pacifique.
- la marée mixte : au cours d'une lunaison s'observent des périodes où la marée est semi-diurne et des périodes où la marée est diurne. Ce régime se présente aux Antilles, en Indonésie, en Sibérie, en Alaska.
- la marée diurne : il n'y a qu'une pleine mer et qu'une basse mer par jour lunaire. C'est assez rare et s'observe sur certaines côtes de Sibérie, d'Alaska et d'Asie du sud-est.

4.2 La chronobiologie chez les organismes marins

4.2.1 Une attention tardive et des rythmes bruités

L'attention portée aux rythmes chez les espèces marines est plus tardive que celle accordée aux espèces terrestres. Au 19^e siècle, quelques observations pionnières apparaissent sur la migration verticale du plancton : il y a plus de zooplancton capturé à la surface de la mer de nuit que de jour (Naylor, 2010). Mais ce sont les années 1900 qui fournissent les premières descriptions scientifiques avec les travaux de Bohn (1903), Bohn et Pieron (1906), Gamble et Keeble (1903) et Martin (1907). Ils concernent la migration du vers plat *Convoluta roscoffensis*, qui apparaît sur la plage à marée basse et se retire avant que la marée ne remonte (Naylor, 2010). Ces découvertes alimentent les discussions : ce mouvement a-t-il une origine purement exogène ou les vers possèdent-ils une « mémoire tidale » ? Ce sont bien là déjà des discussions sur l'origine endogène ou exogène des rythmes. La plupart des travaux sur les rythmes des organismes marins a néanmoins lieu dans la seconde moitié du 20^e siècle. Ce sont par ailleurs probablement les crabes qui ont été le plus étudiés dans le domaine.

Les rythmes chez les organismes marins occupant la zone de marée sont réputés être bruités, instables et labiles. De plus, une forte variabilité inter-individuelle est généralement présente dans les données (Neumann, 1981 ; Palmer, 1995a). En conditions constantes, les rythmes

disparaissent souvent rapidement. Par ailleurs, il n'est pas rare que la moitié voire plus de la population soit arythmique, tant en condition d'entraînement que de libre cours. Pour des vers *Nereis virens* maintenus en conditions constantes, Last et al. (2009) précisent que seulement 15% des animaux expriment une période circatidale ou circadienne/circalunidienne. Une des raisons invoquées pour expliquer ces observations repose sur le fait que les marées sont « relativement erratiques » : les périodes de deux marées successives peuvent varier d'une durée allant jusqu'à 3 heures (Palmer, 1995a). Plus la période est calculée sur de longues périodes, plus elle se rapproche de la valeur 12.4h dans le cas de marées semi-diurnes, mais des valeurs ponctuelles s'en écartent régulièrement.

4.2.2 Les horloges, encore hypothétiques, des organismes marins

Les organismes marins étant soumis au cycle solaire et aux différents cycles lunaires décrits en partie ci-dessus, différents rythmes biologiques ont été décrits tant sous entraînement qu'en condition de libre cours : les rythmes circatidal, circadien et circalunidien.

A titre d'exemple, il a été rapporté que le vers *Nereis virens* présente un rythme d'émergence/enfouissement qui peut être circatidal, circadien ou circalunidien selon les conditions d'entraînement ou en libre cours (Last et al., 2009). Chez le crabe *Carcinus meanas*, ce sont à la fois les rythmes circadien et circatidal qui sont mentionnés (Reid et Naylor, 1989 ; Naylor, 2010). Pour le poisson *Takifugu obscurus* est rapporté un rythme circadien de consommation instantanée d'oxygène en condition constante (Kim, 1997). Chez le bivalve *Pinna nobilis*, un cycle journalier d'activité valvaire a été décrit in situ en condition subtidale (Garcia-March et al., 2008), tandis que chez la palourde *Austrovenus stutchburyi* un rythme circatidal d'activité valvaire et d'extension des siphons est analysé (Beentjes et Williams, 1986). Quelles horloges biologiques seraient donc à l'œuvre chez les espèces marines ?

Deux grands courants de pensées dominant pour expliquer les rythmes observés chez les organismes marins. Une troisième hypothèse a également été proposée.

La première hypothèse, défendue par Ernest Naylor et H. M. Webb, est surtout construite par rapport aux observations obtenues sur les crabes. Elle propose l'existence de deux oscillateurs chez les organismes marins : l'un circadien et l'autre circatidal (Fig. 1.6A). Le paramètre observé présenterait un rythme résultant de l'interaction de ces deux mécanismes, intriqués. Les auteurs basent cette hypothèse sur des arguments en faveur d'un vrai rythme circatidal en libre cours, modulé à intervalle circadien (Naylor, 2010 ; Reid et Naylor, 1989 ; Webb, 1976).

A 2 horloges unimodales (Naylor, 1989, 2010)



B 2 horloges unimodales (Palmer, 1995)



C 1 horloge bimodale (Enright, 1976)

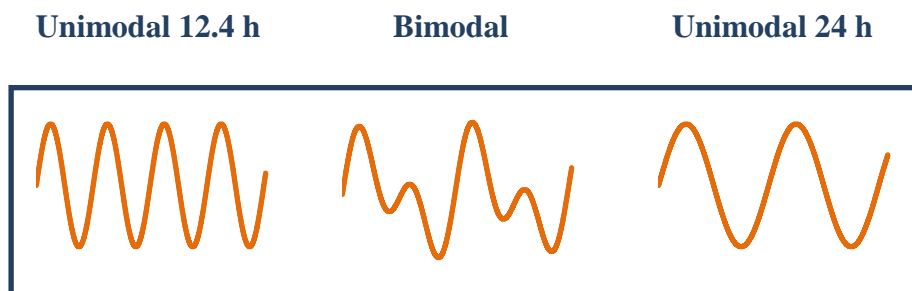


Figure 1.6 : Illustration des théories proposées pour expliquer les rythmes des organismes marins. (A) La théorie de Naylor (Reid et Naylor, 1989 ; Naylor, 2010) suggère l'existence de deux horloges, l'une circatidale, l'autre circadienne. (B) La théorie de Palmer (1995) repose sur deux horloges circalunidiennes couplées en antiphase. (C) L'hypothèse d'Enright (1976) suggère que le rythme tidal soit généré par l'horloge circadienne.

La seconde hypothèse, proposée par John D. Palmer, se base sur le jour lunaire et suggère l'existence de deux horloges circalunidiennes, tournant donc en 24.8h, couplées en anti-phase (Fig. 1.6B). Cette idée expliquerait qu'en libre cours, les pics d'activité circatidaux observés chez certains organismes évoluent de manières différentes, voire que l'un des deux disparaisse temporairement ou de manière permanente (Palmer 1995b, 1997, 2000). Pour Palmer, les horloges circadienne et circalunidienne, difficiles à distinguer car leurs périodes sont proches seraient les mêmes, l'une ayant évolué à partir de l'autre. Il considère en effet que ces deux horloges présentant les mêmes défauts (scission de pics en libre cours, variation de la période propre, etc.), et argumente qu'il est peu probable que les mécanismes de l'évolution aient sélectionné à deux reprises des horloges proches avec des éléments indésirables (Palmer 1990, 1995a). Par ailleurs, il estime difficile de concevoir que la sélection naturelle ait joué un rôle pour sélectionner une horloge possédant une période de 12.4 h alors que les marées sont si « erratiques » (Palmer, 1995a, b). Chaque pic tidal serait donc contrôlé par sa propre horloge, et l'entraînement de cette horloge circalunidienne se produirait par une sensibilité à un élément physique ou chimique imposé par les marées (Palmer, 2000).

Ces deux écoles ont trouvé des défenseurs et des arguments. Toutefois, aucune de ces deux hypothèses n'explique toutes les nuances que peuvent exprimer les organismes marins, et intertidaux en particulier, dans les rythmes biologiques qu'ils affichent.

Finalement, une troisième hypothèse existe, fournie en 1976 par James Thomas Enright. Travaillant sur l'isopode *Excirolana chiltoni*, il observe que le rythme en libre cours est essentiellement circadien mais que la courbe de réponse de phase est bimodale par cycle circadien, avec deux intervalles de temps où la phase peut être avancée et deux autres intervalles où elle peut être reculée par de courts stimuli. Enright suggère que le rythme tidal observé chez *Excirolana* soit en fait produit par une horloge circadienne entraînée à une période tidale. Cette proposition postule donc l'existence d'un seul oscillateur gouvernant les rythmes circadien et circatidal, permettant l'expression de rythmes unimodaux circatidaux et circadiens ainsi que des rythmes bimodaux, intermédiaires, combinant des proportions de rythmes circadiens et circatidaux variables (Fig. 1.6C ; Enright, 1976a, b).

4.2.3 Les défis moléculaires

Jusqu'à présent, l'approche systémique a largement dominé la chronobiologie des organismes marins. Les études fournissent des résultats basés essentiellement sur des analyses de comportement. L'approche moléculaire en est à ses prémices dans le domaine et il n'y a pas, à ce jour, de gène connu du rythme circatidal ou circalunidien. C'est pourtant la biochimie qui devrait permettre de trancher entre les différentes hypothèses proposées pour expliquer les

Tableau 1.2 : Systématique de *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793 (Marteil, 1976).

Embranchement	Mollusque
Classe	Bivalve
Sous-classe	Lamellibranche
Ordre	Filibranche
Sous-ordre	Anisomyaria
Famille	Ostreidae
Genre	Crassostrea
Espèce	<i>gigas</i>

rythmes des organismes intertidaux. C'est ce défi que nous avons abordé dans le chapitre 5 en travaillant sur un des gènes de l'horloge chez *C. gigas*, le gène *cryptochrome*.

5. L'huître *Crassostrea gigas*

5.1 Systématique, aquaculture et écologie

La systématique de *Crassostrea gigas* Thunberg (1793), également appelée huître creuse, huître japonaise ou huître du Pacifique, est présentée dans le Tableau 1.2 (Marteil, 1976). La distribution de ce mollusque bivalve est très large. Initialement originaire d'Asie, où elle était présente dans la mer d'Okhotsk, au Japon et en Corée, l'huître creuse a ensuite été introduite sur la côte ouest des Etats-Unis de l'Alaska à la Californie, en Europe et en Australie (Ruesink et al., 2005 ; Troost, 2010). En France, *C. gigas* a été introduite à titre expérimental à la fin de l'année 1960. Suite à l'épizootie touchant *Crassostrea angulata*, alors cultivée dans les eaux françaises, et qui généra une crise ostréicole grave en 1970-1971, l'huître japonaise devint la base de la production nationale (Bouchet et al., 1997).

L'huître en général, et *C. gigas* en particulier, constitue une ressource économique importante. En 2007, les mollusques bivalves représentaient en volume 26 % de la production aquacole mondiale. En 2009, la production mondiale d'huître a atteint 4.3 millions de tonnes pour une valeur estimée à 3.3 milliards de dollars. *C. gigas* représentait 649 000 tonnes de cette production, pour une valeur d'environ 1 milliard de dollars. Sur ces 649 000 tonnes, l'ostréiculture française en a produites 104 000, 10 000 tonnes environ provenant du Bassin d'Arcachon (www.fao.org).

Crassostrea gigas peuple les écosystèmes marins et estuariens, en zone intertidale ou subtidale. L'espèce est très commune sur les côtes de France métropolitaine. C'est une huître eurytherme et euryhaline, ce qui la rend très plastique par rapport aux biotopes dans lesquels elle peut se développer. En conditions naturelles, l'huître creuse occupe des substrats meubles ou se fixe sur des substrats durs et forme des récifs (Newell, 1964).

5.2 Eléments d'anatomie et de biologie

5.2.1 Anatomie de l'huître

L'huître est constituée d'un corps mou protégé par une coquille bivalve. Les deux valves sont asymétriques : la valve inférieure est concave tandis que la valve supérieure est relativement plate. Elles sont réunies par un ligament au niveau de la charnière, partie étroite de l'huître. Le ligament tend à ouvrir les valves, tandis que le muscle adducteur, décrit ci-après, tend à les

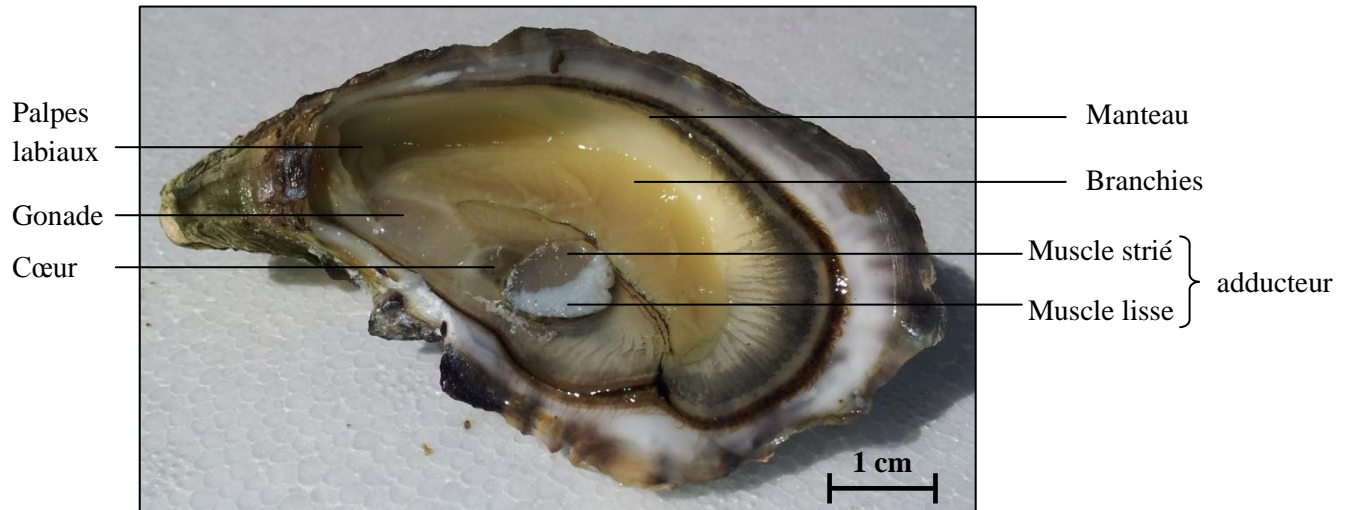


Figure 1.7 : Anatomie de l'huître dans la valve inférieure.

fermer. La coquille est constituée de calcite et d'une matrice organique, la conchyoline (Grizel et al., 2003 ; Marteil, 1976).

Le corps mou, à l'intérieur des valves, est entouré par un manteau qui délimite la cavité palléale. Différents organes peuvent être distingués (Figure 1.7). Les branchies participent à la respiration et à la nutrition. Au nombre de deux, elles se présentent sous forme de deux lames, composées chacune de deux feuillets. Les feuillets sont constitués de filaments parallèles ciliés. La digestion, quant à elle, est assurée par le système digestif, situé à côté du cœur et des branchies. Le système circulatoire de l'huître comprend un cœur, protégé dans la cavité péricardique, ainsi que des artères, artérioles et lacunes qui transportent le liquide sanguin, incolore, l'hémolymphe. Localisé à côté du cœur, le muscle adducteur, ancré sur les deux valves, assure l'activité valvaire de l'huître. Il s'agit du seul muscle « squelettique » de l'animal. Il est formé de deux parties juxtaposées : une structure translucide, le muscle strié, et une structure plus opaque, blanche, le muscle lisse. Le système excréteur, composé d'un rein, est invisible à l'œil nu. Les centres nerveux de l'huître sont restreints à une paire de ganglions cérébroïdes, localisés près des palpes labiaux, et à une paire de ganglions viscéraux, situés près du muscle adducteur. Finalement, l'appareil reproducteur comprend une gonade indifférenciée qui enveloppe la glande digestive (Grizel et al., 2003 ; Marteil, 1976).

5.2.2 Le manteau

Si le premier rôle du manteau est la sécrétion de la coquille et du ligament, il participe également à de nombreuses fonctions physiologiques et mécanismes. Parcouru par de multiples terminaisons nerveuses, il intervient dans la perception sensorielle tactile. Il assure également une partie du stockage des réserves énergétiques et intervient dans la nutrition (Grizel et al., 2003).

5.2.3 Les branchies

Les huîtres sont des organismes filtreurs : elles assurent leur approvisionnement en éléments nutritifs et en oxygène et l'élimination du dioxyde de carbone via l'eau de mer qu'elles filtrent entre leurs valves. Les branchies interviennent dans la respiration mais également dans la nutrition. Les cils branchiaux latéraux génèrent le courant inhalant d'eau de mer. Les huîtres se nourrissent des éléments en suspension dans cette eau (phytoplancton, bactéries, etc.). Par ailleurs, les particules en suspension sont récupérées par les cils latéro-frontaux pour être ensuite retenues par les cils frontaux où elles seront enrobées dans du mucus. Ces particules engluées sont alors dirigées vers les palpes labiaux par le battement de ces cils. Les particules trop abondantes ou volumineuses sont rejetées sous formes de pseudofèces dans la chambre inhalante (Grizel et al., 2003 ; Marteil, 1976).

5.2.4 La digestion

Le système digestif comporte une bouche qui s'ouvre entre deux paires de palpes labiaux, un court œsophage, l'estomac et l'intestin entourés par la glande digestive et l'anus qui débouche dans la cavité palléale. Entre l'estomac et l'intestin se trouve le sac du stylet cristallin. Le stylet, structure longiligne d'un à deux centimètres de long, intervient dans le broyage mécanique et chimique des aliments ainsi que dans l'activité enzymatique. Les fèces produits par la digestion sont expulsés dans le courant exhalant (Grizel et al., 2003 ; Marteil, 1976 ; Morton, 1983).

5.2.5 Le système circulatoire

Les huîtres présentent un système circulatoire semi-ouvert. Le liquide sanguin, incolore, appelé hémolymphe, n'est pas confiné aux vaisseaux mais circule également dans des lacunes et baigne les différents tissus. Le cœur, enfermé dans le péricarde, comprend un ventricule et deux oreillettes. Il propulse l'hémolymphe dans les artères et artéριοles. L'hémolymphe aboutit ensuite dans des lacunes puis le liquide veineux est récupéré par des sinus qui le dirigent vers le rein. L'hémolymphe est alors transportée jusqu'aux branchies pour être ré-oxygénée puis revient au cœur par les veines branchiales afférentes (Grizel et al., 2003 ; Marteil, 1976).

5.2.6 Le muscle adducteur

Le muscle adducteur est l'effecteur du mouvement valvaire. Par ailleurs, comme mentionné précédemment, c'est le seul muscle « squelettique » de l'huître. Il est composé de deux parties bien différenciées. Le muscle strié effectue les contractions rapides et initie la fermeture des valves, alors que le muscle lisse se contracte lentement mais permet l'adduction prolongée de celles-ci par un mécanisme appelé « catch » (Galler, 2008; Galtsoff, 1964; Hoyle, 1964). Le catch permet de maintenir une tension élevée avec une dépense d'énergie faible voire nulle grâce à un mécanisme passif de fixation entre les filaments musculaires. L'étude de ce mécanisme (catch) est toujours un sujet de recherche actif (Galler, 2008).

5.2.7 L'appareil reproducteur

Les huîtres présentent un hermaphrodisme successif protandrique. L'hiver constitue une phase de repos sexuel, avec changement de sexe. Ensuite, la reproduction s'effectue en deux phases : une phase de gamétogenèse chez les adultes sessiles et une phase de vie larvaire après la fécondation dans la colonne d'eau. Le cycle sexuel dépend des facteurs environnementaux, et notamment de la température (Bernard, 2011 ; Dutertre et al., 2010).

La gamétogenèse, c'est-à-dire la multiplication et la maturation des gamètes ou cellules reproductrices, débute sur les côtes françaises à la fin de l'hiver lors du réchauffement printanier et se poursuit jusqu'à l'été. En juillet ou en août, lorsque les conditions sont favorables, se produit la ponte : le rejet des spermatozoïdes et la ponte des ovocytes dans la colonne d'eau. La fécondation est externe. Après émission des gamètes, soit les gonades régressent, soit elles se reconstituent si les conditions le permettent. Après une nouvelle émission des gamètes, le cycle se termine à la fin de l'automne.

La fécondation produit une larve, d'environ 70 µm. La vie larvaire dure ensuite 15 à 25 jours environ sur la façade atlantique. A la fin de la vie larvaire, les huîtres ont une taille d'environ 300 µm. La larve véligère se munit alors d'un pied et nage jusqu'à un support solide pour se fixer. Une fois trouvé, elle rampe jusqu'à choisir un emplacement adéquat. Ensuite, le pied émet le ciment qui lui permettra de se fixer. Après fixation se produisent la métamorphose et le développement des organes de l'adulte. L'huître est alors appelée naissain (Marteil, 1976).

6. Les micro-algues toxiques : contexte

Dans ce travail, nous avons posé l'hypothèse qu'une contamination du milieu devrait pouvoir perturber les rythmes biologiques de l'huître *C. gigas*. Le contaminant que nous avons choisi d'étudier est l'algue toxique *Alexandrium minutum*, productrice de toxines paralysantes. Il existe toutefois différentes algues toxiques, que nous décrivont brièvement dans ce paragraphe.

6.1 Introduction

Le terme micro-algue désigne des organismes microscopiques, unicellulaires, procaryotes ou eucaryotes, photosynthétiques et vivants en suspension dans la colonne d'eau. Ils constituent la base des réseaux trophiques océaniques.

Il arrive, naturellement, que les micro-algues prolifèrent localement de façon très importante, au point de générer des efflorescences ou « blooms » au sein desquelles les concentrations peuvent atteindre plusieurs centaines de milliers de cellules par millilitre. Le phytoplancton représentant une ressource alimentaire pour de nombreux organismes marins, ces efflorescences peuvent être bénéfiques. Toutefois, elles peuvent également s'avérer nuisibles dans certains cas. Trois types d'efflorescences nuisibles sont généralement distingués en fonction des algues qui les produisent (Hallegraeff et al., 2003) :

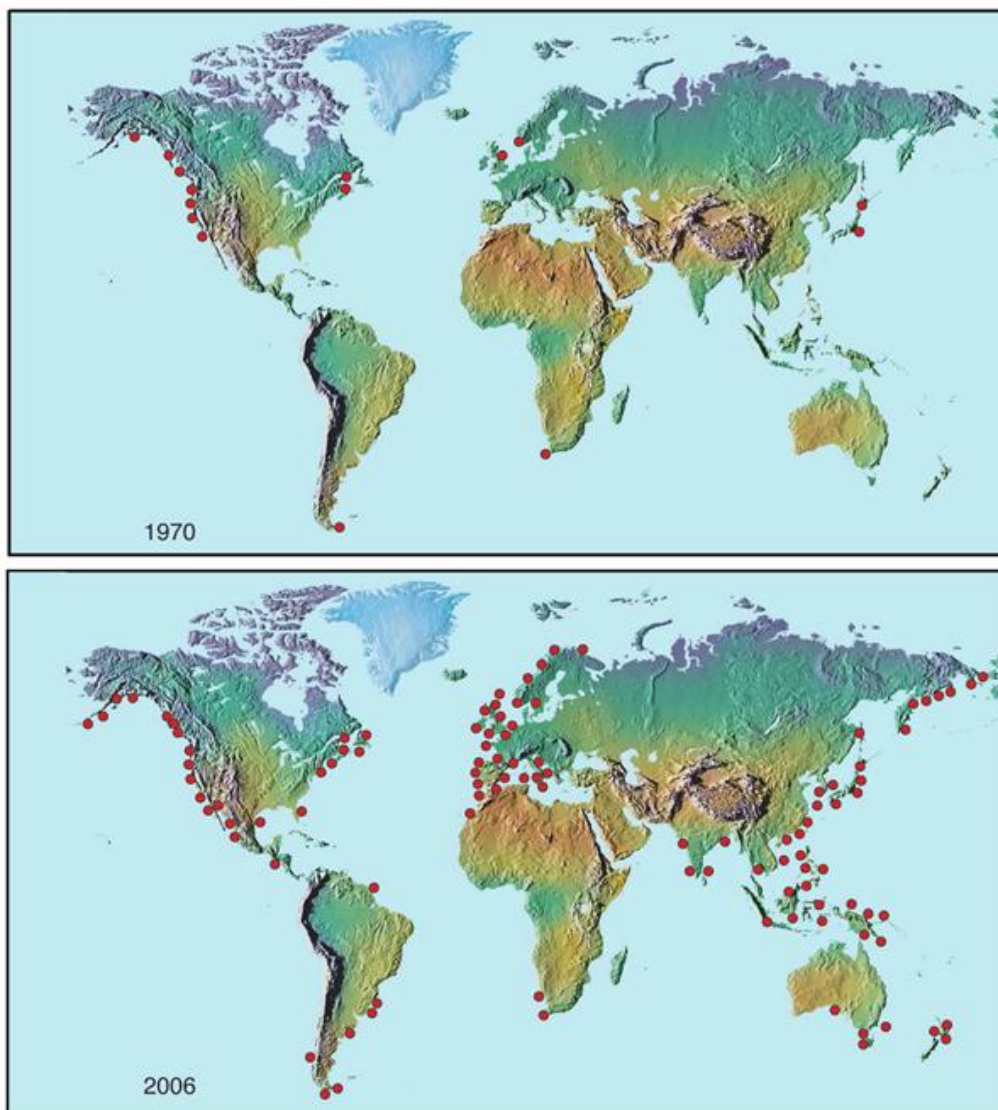


Figure 1.8 : Recensement des efflorescences d'algues toxiques produisant des toxines paralysantes (PSP) en 1972 et 2006 au niveau mondial. (<http://www.whoi.edu>).

- les algues en soi inoffensives mais qui, présentes à haute densité lors d'efflorescences, entraînent des zones d'hypoxie voire d'anoxie délétères pour les organismes tant pélagiques que benthiques.
- les algues nuisibles pour les organismes marins mais non toxiques pour l'être humain. Il s'agit d'algues dont la structure physique peut endommager ou obstruer les tissus des organismes qui les ingèrent.
- les algues produisant des toxines qui affectent non seulement les organismes qui s'en nourrissent mais également la chaîne alimentaire située au-delà de ces organismes et qui présentent des risques pour la santé humaine.

Si des épisodes de toxicité de poissons ou coquillages sont connus depuis l'Antiquité, les efflorescences d'algues toxiques ont eu tendance à augmenter ces dernières décennies, tant au niveau de leur occurrence géographique que de leur durée. Une des principales raisons invoquées est l'activité anthropique : l'enrichissement en éléments nutritifs du milieu marin par les déchets domestiques, industriels et agricoles, le transport d'algues via les eaux de ballast, les importations de cellules ou de kystes d'algues lors desensemencements liés à l'aquaculture, etc. Cependant, des phénomènes naturels comme la circulation des masses d'eau interviennent également dans la survenue de ces efflorescences. Par ailleurs, le nombre accru d'efflorescences d'algues toxiques s'explique aussi par les efforts menés en matière de suivi et de recensement. Certains évènements n'étaient précédemment simplement pas observés (Camacho et al., 2007 ; Heisler et al., 2008 ; Sellner et al., 2003). La Figure 1.8 illustre cette augmentation en comparant les efflorescences d'algues produisant des toxines paralysantes (PSP) recensées en 1972 et 2006.

La connaissance populaire contemporaine des algues toxiques repose le plus souvent sur les alertes sanitaires émises par les agences de santé. Et ces algues toxiques émaillent malheureusement régulièrement l'actualité. Ainsi, en France, le 12 juillet dernier (2012), la préfecture du Finistère (France) émettait une interdiction temporaire de récolte et de ramassage des coquillages en rade de Brest suite à la présence de toxines paralysantes dans les organismes. De même, la préfecture de la Gironde décidait en date du 7 avril 2012 d'interdire temporairement la consommation de coquillages provenant du Banc d'Arguin, à l'entrée du Bassin d'Arcachon, suite cette fois à la détection de dinophysis dans l'eau, une algue produisant des toxines diarrhéiques. Les interdictions peuvent durer quelques jours ou plusieurs semaines. Ces arrêtés préfectoraux sont pris en raison des risques de santé publique que posent les algues toxiques.

Les algues toxiques sont en effet souvent nommées d'après les symptômes qu'elles induisent chez l'homme, sachant qu'il n'y a pas d'antidote. Si une contamination par voie respiratoire ou cutanée par les embruns marins est possible, la vaste majorité des intoxications se produit

par voie alimentaire (Hallegraeff, 2003). Ci-dessous sont présentés les grands groupes d'algues toxiques.

6.2 Les principales phycotoxines

Les toxines diarrhéiques sont ainsi nommées car elles induisent des troubles gastro-intestinaux chez l'humain qui consomme des coquillages contaminés. Si aucun cas mortel n'a jusqu'à présent jamais été rapporté, plusieurs milliers de cas d'intoxication ont été répertoriés ces 40 dernières années (Hallegraeff, 2003). Essentiellement produites par les dinoflagellés *Dinophysis sp.* et *Prorocentrum sp.*, les principales toxines impliquées dans ces incidents sont l'acide okadaïque et ses dérivés (Hallegraeff, 2003 ; Yasumoto et al., 1985 ; Reguera et al., 2012). Les espèces de *Dinophysis* ont été observées dans de nombreuses régions du monde : l'Ouest de l'Europe, la Scandinavie, le Japon, l'Australie, la Nouvelle-Zélande, l'Asie du sud-est, le Chili, le Canada (Hallegraeff, 1993 ; Reguera et al., 2012). La norme européenne pour autoriser la consommation et la vente des mollusques bivalves spécifie que la charge en toxine ne peut excéder $16 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de chair pour l'acide okadaïque (EC No 853/2004, www.eur-lex.europa.eu).

On distingue également les toxines amnésiantes, qui furent brutalement découvertes en 1987 sur l'île du Prince Edouard au Canada : suite à la consommation de moules contaminées, 153 cas d'intoxication aiguë furent rapportés, dont trois décès (Wright et al., 1989). Les toxines amnésiantes provoquent des symptômes gastro-intestinaux et neurologiques. La toxine induisant ces symptômes est l'acide domoïque, un acide aminé neuro-excitant produit par des diatomées du genre *Pseudo-Nitzschia* et par différentes macro-algues rouge, dont *Chondria armata* (Jeffery et al., 2004 ; Lefebvre et Robertson, 2009 ; Wright et al., 1989). Si quelques épisodes de *Pseudo-Nitzschia sp.* ont été mentionnés en Europe, Australie, Nouvelle-Zélande et Japon, la majorité des ces efflorescences reste confinée au Canada et à la côte ouest des Etats-Unis (Hallegraeff, 2003). Les coquillages contenant plus de $20 \mu\text{g}$ d'acide domoïque par g de chair sont considérés comme impropres à la consommation suivant la réglementation européenne (EC No 853/2004).

La ciguatera désigne quant à elle une intoxication alimentaire résultant de la consommation de poissons tropicaux associés aux récifs coralliens. Elle génère des symptômes gastro-intestinaux et des démangeaisons cutanées, une intoxication grave pouvant provoquer des symptômes neurologiques et cardiaques voire la mort. Les symptômes neurologiques peuvent durer plusieurs mois voire années (Dickey et Plakas, 2010 ; Wright, 1995). Le nombre d'intoxications par an se situerait entre 50 000 et 500 000 (Dickey et Plakas, 2010). La source de l'intoxication est la ciguatoxine, produite par le dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus*. La

ciguatera concerne surtout les zones des Océans Indien et Pacifique (Polynésie Française, Australie,...) et les Caraïbes (Hallegraeff et al., 2003).

Il existe également des neurotoxines, qui peuvent exercer leur action via des aérosols et provoquer une irritation des yeux et des voies respiratoires. En cas d'ingestion de coquillages contaminés, les symptômes sont gastro-intestinaux et neurologiques. Aucune intoxication humaine mortelle n'a à ce jour été détectée. Les agents responsables des NSPs sont des dinoflagellés du genre *Karenia*, et les toxines impliquées des brevetoxines. Les NSPs concernent surtout la Floride, le Golfe du Mexique, la Caroline du Nord et la Nouvelle Zélande (Hallegraeff, 2003 ; Plakas et Dickey, 2010).

Finalement, les toxines paralysantes ou PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) sont produites par des algues appartenant aux genres *Alexandrium*, *Gymnodium* et *Pyrodinium*. Les toxines étudiées dans ce travail appartiennent à ce groupe, décrit ci-dessous avec le genre *Alexandrium*.

6.3 Les phycotoxines dans le milieu marin

La problématique des algues toxiques est complexe et vaste. Outre les risques sanitaires, les efflorescences d'algues toxiques induisent des pertes économiques pour la pêche et l'industrie, le tourisme, la santé. Les coûts se chiffrent en millions de dollars (Hoagland et al., 2002 ; Tango et al., 2005).

De plus, les phycotoxines affectent les écosystèmes marins et les organismes qui les occupent. Certaines toxines provoquent des mortalités massives de poissons et mammifères marins (Plakas et Dickey, 2010). Avant un éventuel effet létal, les études menées sur les bivalves indiquent qu'elles présentent aussi des impacts à tous les niveaux de fonctionnement des animaux : le comportement, la physiologie, l'anatomie. Effectivement, chez les bivalves, les toxines PSPs ont été incriminées dans des modifications des contenus en lipides de structure et de réserve de la glande digestive, une augmentation de la production de mucus dans les branchies, des myopathies, une réduction de l'activité des spermatozoïdes (Haberkorn et al., 2010a), des modifications du comportement valvaire (Haberkorn et al., 2011 ; Nagai, 2006 ; Tran et al., 2010), une inhibition de la nutrition (Lassus et al., 1999 ; Navarro et Contreras, 2010 ; Wildish, 1998), une incapacité à s'enfouir dans le sédiment (Bricelj et al., 2005), une paralysie musculaire (Héguaret et al., 2007 ; Galimany et al., 2008), l'apparition de réponses inflammatoires (Galimany et al., 2008 ; Haberkorn et al., 2010a ; Héguaret et al., 2009), une diminution de la survie des larves (Yan et al., 2001). Par ailleurs, si les toxines sont à la base absorbées par les organismes filtreurs et brouteurs, elles s'accumulent également au travers de la chaîne alimentaire.



Figure 1.9 : *Alexandrium minutum* (www.envlit.ifremer.fr)

7. Le genre *Alexandrium*

7.1 Le genre *Alexandrium*

Le genre *Alexandrium*, étudié dans le présent document, appartient aux dinoflagellés, aussi appelés dinophytes. Il rassemble une trentaine d'espèces parmi lesquelles au moins la moitié est connue pour être toxique. Ces algues sont microscopiques, eucaryotes, unicellulaires et biflagellées. Elles sont principalement autotrophes, même si certaines espèces sont capables de mixotrophie ou de phagotrophie (Anderson et al., 2012).

7.2 Notions de morphologie

La cellule d'*Alexandrium* (Fig. 1.9) est protégée par une thèque structurée en plaques de cellulose. Le flagelle transversal, logé dans un sillon équatorial appelé cingulum, permet à la cellule de tourner sur elle-même. Le second flagelle, situé dans un sillon longitudinal appelé sulcus, permet la propulsion de la cellule. Le cingulum sépare la cellule en deux parties : la partie antérieure, appelée épithèque ou épïcône, et la partie postérieure nommée hypothèque ou hypocône. L'apex désigne l'extrémité antérieure de la cellule, l'antapex l'extrémité postérieure (Figure 1.10 ; Nezan et al., 1997). Les caractères morphologiques servant à l'identification des différentes espèces sont la taille de la cellule, la forme, la formation ou non de chaînes, l'ornementation de la thèque, l'organisation des plaques, etc. (Anderson et al., 2012).

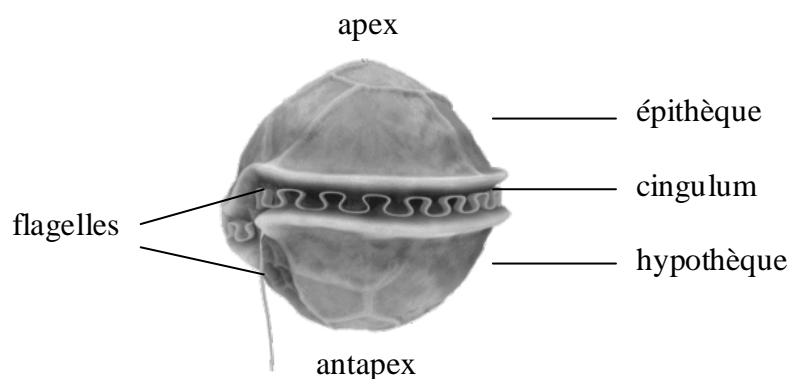


Figure 1.10 : Morphologie d'une cellule du genre *Alexandrium* (www.envlit.ifremer.fr).

7.3 Répartition géographique

Les espèces du genre *Alexandrium* (cf. Fig. 1.8) sont distribuées partout sur la planète, tant dans l'hémisphère nord que l'hémisphère sud, dans les eaux subarctiques, tempérées et

tropicales. Elles occupent généralement les zones côtières, les plateaux ou les pentes continentaux (Anderson et al., 2012).

7.4 Toxines paralysantes produites par le genre *Alexandrium*

Trois familles de phycotoxines différentes sont synthétisées par les espèces du genre *Alexandrium* : la saxitoxine, les spirolides et les goniodomines (Anderson et al., 2012 ; Hu et al., 1995). La principale étant la saxitoxine, $C_{10}H_{17}N_7O_4 \cdot 2HCl$, et ses dérivés. Il s'agit d'une neurotoxine qui bloque les récepteurs des canaux sodium voltage-dépendants et donc la propagation du potentiel d'action dans les fibres nerveuses et musculaires (Narahashi et Moore, 1968). Il a également été montré chez la palourde *Mya arenaria* que la mutation naturelle d'un seul nucléotide dans la séquence codant pour le canal sodium permet une diminution d'un facteur 1000 de l'affinité de la saxitoxine pour le canal (Bricelj et al., 2005).

Les toxines paralysantes PSP peuvent induire des atteintes légères telles que céphalées, troubles gastro-intestinaux, paresthésie de la face et des extrémités des membres. Cependant, les atteintes sévères peuvent mener à une paralysie musculaire et des troubles respiratoires qui peuvent être fatals. L'intoxication se produit en mangeant des coquillages, crustacés ou poissons contaminés (Camacho et al., 2007 ; Etheridge, 2010). Le terme PSP désigne une vingtaine de molécules hydrosolubles, thermostables et stables en milieu acide dont la structure de base est celle de la saxitoxine. Les espèces productrices de PSP ont provoqués des efflorescences en Europe, Amérique, Asie, Australie (cf Fig. 1.8). La norme européenne précise que la contamination ne peut excéder 80 μg de PSP par 100 g de chair pour permettre la consommation des produits aquacoles (Bricelj et Shumway, 1998).

La quantité de toxines et le profil en toxines varient avec les espèces et au sein d'une même espèce, entre les souches, les conditions environnementales ou de culture et la phase de croissance (Anderson et al., 2012 ; Bricelj et Shumway, 1998).

7.5 Cycle biologique

Le cycle biologique d'*Alexandrium sp.* inclut différents stades et états qui, même s'ils sont génétiquement identiques, sont caractérisés par une morphologie, une physiologie et une fonction propres. Les signaux environnementaux ou internes qui indiquent la transition entre les différents états sont assez méconnus (Von Dassow et Montresor, 2011). Par ailleurs, les espèces du genre *Alexandrium* sont capables de deux types de reproduction : une reproduction végétative résultant de la division par mitose d'une cellule végétative et une reproduction dite sexuée résultant de la fusion de deux gamètes (Anderson et al., 2012).

La phase végétative chez *Alexandrium* est haplontique, ce qui signifie que les cellules végétatives, mobiles, sont haploïdes. Les différents états du cycle biologique chez *Alexandrium sp.* sont (Anderson et al., 2012 ; Figueroa et al., 2007) :

- un stade végétatif, mobile et haploïde,
- la formation de kystes asexués pelliculés, généralement en cas de stress,
- des gamètes haploïdes homothalliques, hétérothalliques ou ayant un système d'accouplement complexe,
- un zygote diploïde appelé planozygote qui peut selon les conditions soit donner une cellule végétative par méiose, soit se transformer en
- un kyste de dormance appelé hypnozygote, qui se maintient dans le sédiment.
- Après germination, le kyste de dormance libère une cellule mobile diploïde appelée planoméiocyte, qui se divisera pour donner des cellules végétatives.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

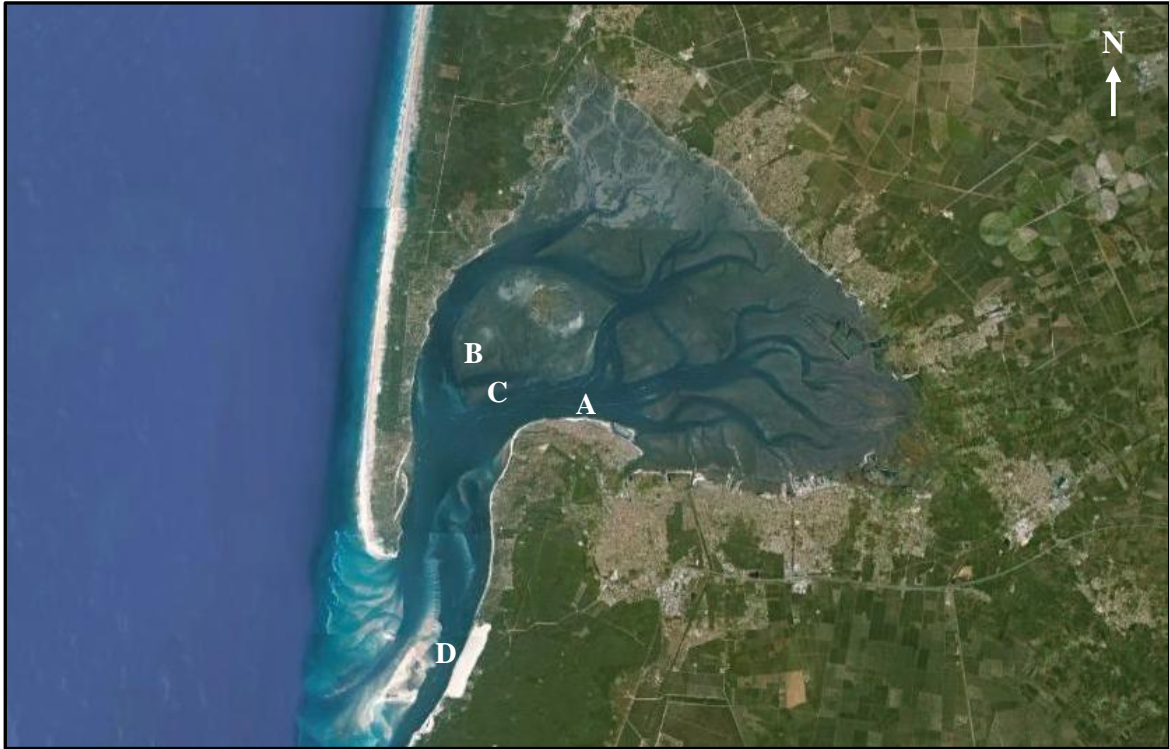


Figure 2.1 : Vue aérienne (Google Earth) du bassin d'Arcachon. Localisation de la Station Marine, face à la jetée d'Eyrac (A), de Courbey (B), du Grand Banc (C) et du Banc d'Arguin (D).

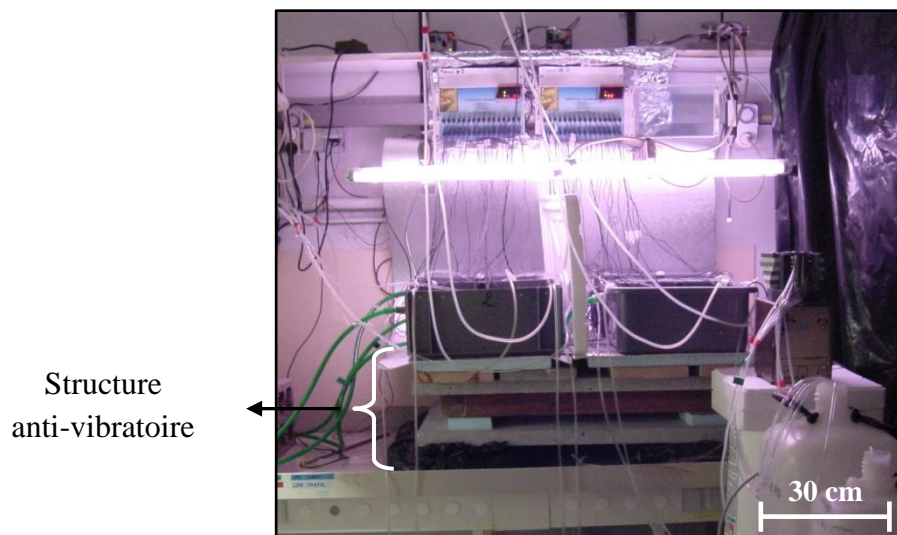


Figure 2.2 : Exemple de structure anti-vibratoire. Les huîtres sont placées dans les bacs gris. La variation des matériaux - sable, béton, polystyrène, bois, béton, plastique - permet de limiter considérablement la transmission de vibrations au dispositif expérimental.

1. Animaux

1.1 Collecte

L'objet d'étude de cette thèse est l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973). Les huîtres utilisées pour les différentes expériences ont été obtenues auprès d'ostréiculteurs locaux et provenaient de 3 sites sur le bassin d'Arcachon : le Grand Banc, Courbey et le Banc d'Arguin. Les expériences de laboratoire ont pris place à la Station Marine d'Arcachon. Les suivis de terrain ont eu lieu en face de celle-ci, à la jetée d'Eyrac (Figure 2.1).

1.2 Stabulation

Avant toute expérimentation, les animaux ont été maintenus en stabulation 1 à 4 semaines au laboratoire. Les huîtres ont été placées dans des bacs circulaires (environ 400 l) alimentés en eau de mer en circuit ouvert. Elles ont été soumises à la photopériode naturelle.

1.3 Acclimatation

Pour chaque expérience, après stabulation, les huîtres sont sorties de l'eau, nettoyées, et mises à sécher pendant une nuit. Le lendemain, elles sont équipées d'électrodes et placées dans les différents dispositifs expérimentaux. Il a été observé que la manipulation des animaux perturbe leur comportement. Une acclimatation de 4 à 7 jours minimum a donc été systématiquement effectuée avant l'acquisition des données expérimentales, acclimatation dont la durée a été suivie et adaptée selon les enregistrements valvaires récupérés chaque jour.

2. Principes généraux d'expérimentation

Les différentes expériences ont été réalisées en conditions contrôlées de température, de chlorophylle a, de pH, de salinité. Les salles de travail ont été rendues hermétiques à la lumière extérieure et la photopériode réalisée via des néons (MASTER TL-D Xtra 36W/865 1SL, Philips, France). Tous les bacs expérimentaux ont été aérés via des bulleurs d'aquarium munis de capacitance pour éliminer les vibrations. En outre, afin d'éviter toute perturbation avec le comportement spontané des animaux, les expériences ont été effectuées sur des dispositifs anti-vibratoires (Figure 2.2).

Pour certaines expériences, le rythme des marées a été simulé au laboratoire. Ces cycles tidaux simulés (STC) ont été effectués dans un anneau en faisant varier la vitesse du courant,

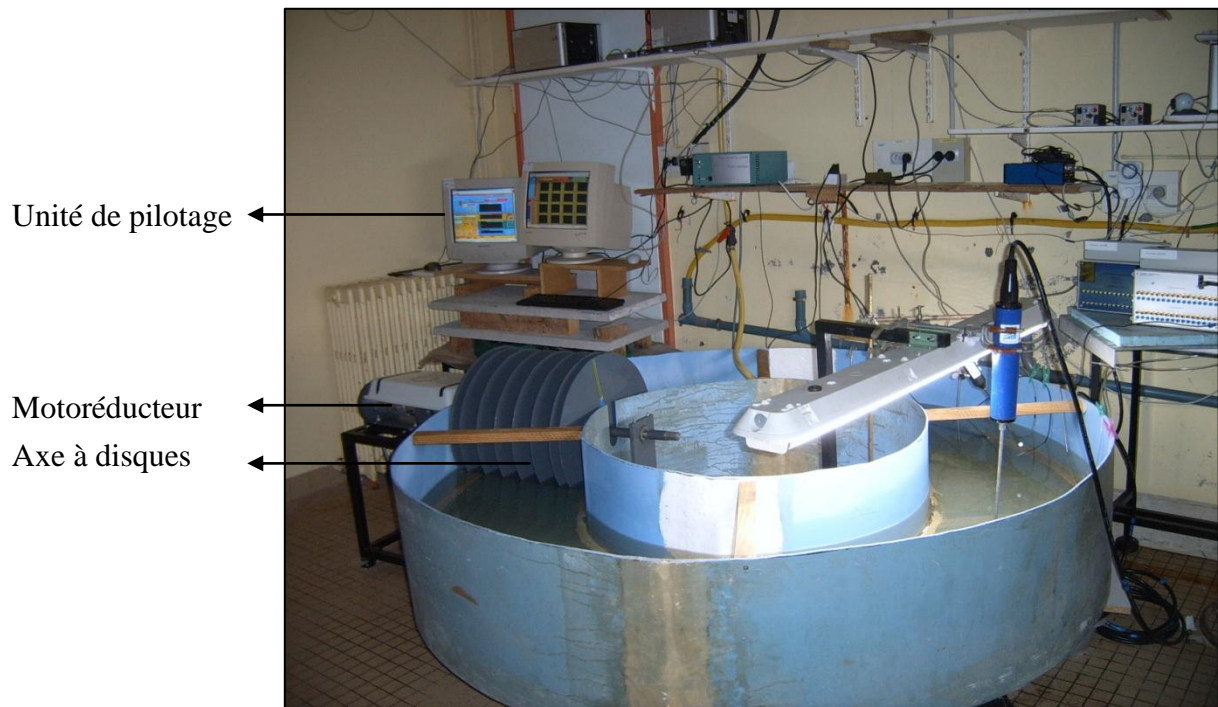


Figure 2.3 : Illustration du dispositif permettant de générer des cycles tidaux simulés (STC). Diamètre extérieur : 2 m ; diamètre intérieur : 1 m.

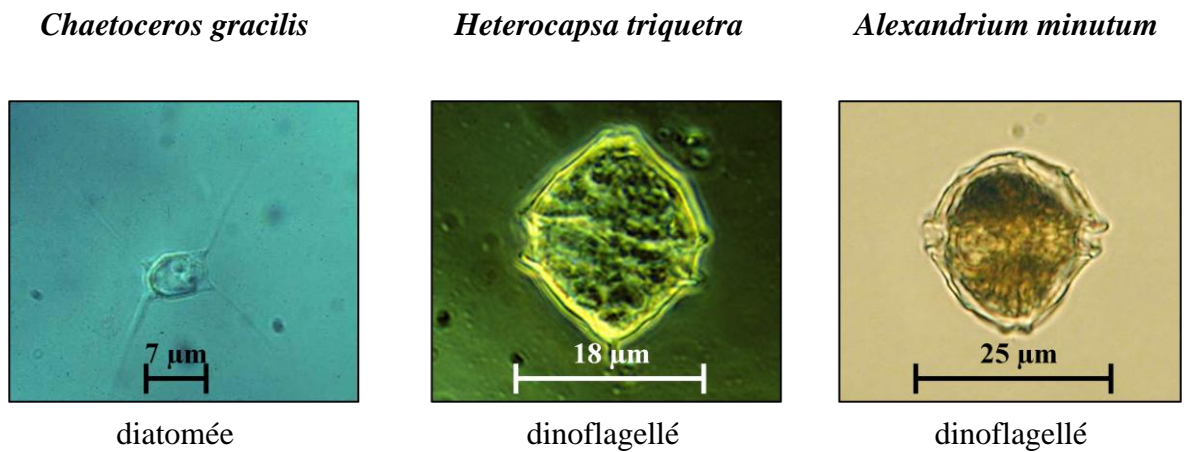


Figure 2.4 : Photos des différentes algues utilisées pour les expérimentations : les algues non toxiques *Chaetoceros gracilis* et *Heterocapsa triquetra* (www.serc.si.edu) et l'algue toxique *Alexandrium minutum* (www.envlit.ifremer.fr).

sans variation de hauteur d'eau. Le courant a été généré à l'aide d'un axe pourvu de disques rotatifs plans entraînant le mouvement de l'eau. Ce système minimise les turbulences. L'axe était entraîné par un motoreducteur (MDP, France) dont la vitesse était réglée par une carte de commande FIRST-DC-1C (MDP, France). Une application logicielle développée au laboratoire sous Labview (National Instruments) par l'électronicien Pierre Ciret permettait de piloter la carte commande. Le courant était généré alternativement dans les sens horaire et anti-horaire avec une progression sinusoïdale (Figure 2.3). La vitesse maximale fut de 20 ou 30 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ selon les expériences, vitesse mesurée 11 cm au dessus du fond à l'aide d'une sonde Nortek Doppler Velocimeter (Nortek AS, Norway). La période entre deux étales, c'est-à-dire vitesse de courant nulle, était de 12.4 h. Ces paramètres sont représentatifs de ce qui est observé sur le terrain. En effet, des vitesses maximales de 60 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ en surface et de 0 à 15 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ au fond ont été rapportées à la jetée d'Eyrac située en face de la Station marine d'Arcachon (Massabuau et Forgue, 1996). De plus, au niveau du fond, la vitesse est nulle à marée montante et varie à marée descendante, présentant donc une période de 12.4 h. Enfin, le nord de l'Océan Atlantique est caractérisé par un régime de marée semi-diurne, c'est-à-dire comprenant deux marées par jour, l'étales se produisant à une période de 12.4 h.

3. Cultures et apports d'algues

3.1 Cultures d'algues

Trois espèces d'algues ont été utilisées dans nos expériences (Figure 2.4) : les algues non toxiques *Heterocapsa triquetra* et *Chaetoceros gracilis*, et l'algue toxique *Alexandrium minutum*. Les huîtres nourries avec des algues non toxiques ont servi de contrôle par rapport aux animaux exposés à *A. minutum*.

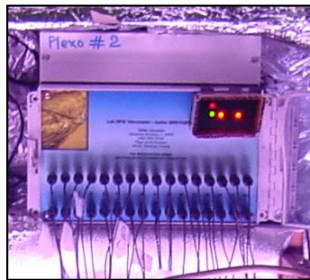
Les dinoflagellés *H. triquetra* (souche HT99PZ) et *A. minutum* (souche AM89BM) ont été gracieusement fournis par le Centre Ifremer de Nantes (44311, France). Pour des contenants allant jusqu'à 3 litres, *H. triquetra* et *A. minutum* ont été cultivés dans de l'eau de mer filtrée (0.22 μm) puis autoclavée. Les cultures en volumes plus importants, de 3 à 80 litres, ont été réalisées avec de l'eau de mer artificielle. Ces micro-algues ont été cultivées dans du milieu f/2 (Guillard, 1975). Les cultures ont été maintenues à $17 \pm 1^\circ\text{C}$ sous une photopériode L:D 14:10. L'algue *Chaetoceros gracilis*, une diatomée, a été fournie par le Lycée de la mer de Gujan-Mestras (33470, France).

3.2 Apports en algues dans les systèmes expérimentaux

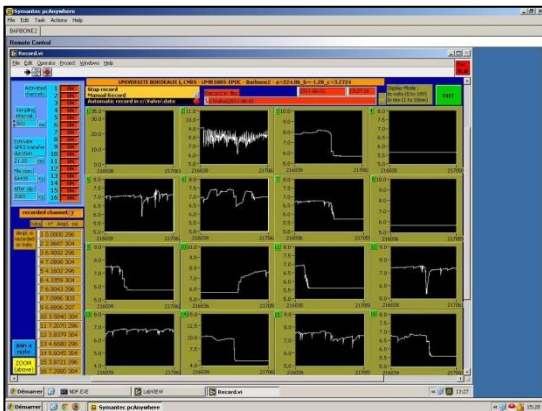
Lors des différentes expériences réalisées, l'objectif a été de maintenir le niveau d'algues constant dans les bacs contenant les huîtres. L'apport permanent d'algues vers les bacs



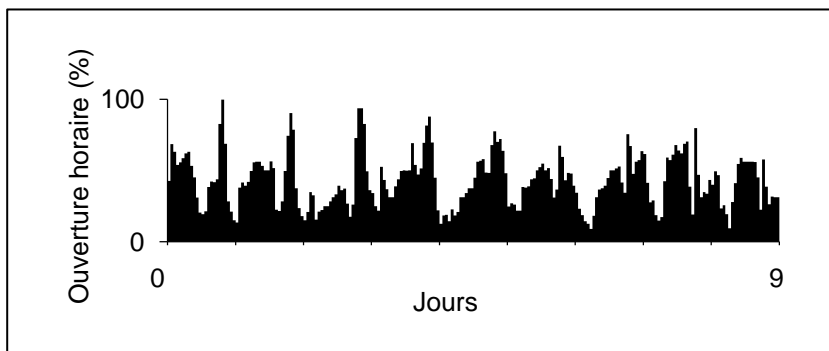
16 huîtres équipées
d'électrodes



Boîtier d'acquisition et
amplification des données



Applications Labview :
affichages des données en temps
réel, stockage et exploitation



Analyses chronobiologiques

Figure 2.5 : Illustration de la chaîne de mesure en valvométrie HFNI. Un valvomètre permet l'enregistrement du comportement de 16 animaux. Les données sont acquises électroniquement, et les signaux traités par ordinateur.

expérimentaux était régulé par pompe péristaltique (Gilson, USA) depuis une nourrice de 10 litres. Le contenant de la nourrice était renouvelé tous les jours.

4. Analyse du comportement par valvométrie HFNI

L'activité valvaire de *Crassostrea gigas*, c'est-à-dire l'activité d'ouverture et de fermeture des valves, a été mesurée par valvométrie Haute Fréquence Non Invasive. Il s'agit d'un outil développé et fabriqué au sein de l'équipe, pour l'expérimentation au laboratoire depuis 1997 et sur le terrain depuis 2006. Ce système a été conçu pour diminuer voire éliminer le stress potentiel généré par le dispositif sur l'animal. Il consiste en 2 électrodes très légères (poids nu de la partie active, 54 mg ; poids enrobés jusqu'à 1 g) collées en vis-à-vis sur les valves du bivalve. Chaque électrode est en fait un solénoïde enrobé d'une résine protectrice, l'une étant émettrice et l'autre réceptrice. La mesure réalisée est une application de la loi de Maxwell :

$$\varepsilon = -N \cdot \frac{\delta\phi_B}{\delta t} \quad (2.1)$$

où ε correspond à la force électromagnétique, N au nombre de tours de la bobine, ϕ_B au flux magnétique (Weber) et t au temps. La distance entre les 2 bobines, et donc l'écartement valvaire, est insensible à la physico-chimie de l'eau et au fouling. Le champ électromagnétique produit entre les 2 électrodes décroît de manière inversement proportionnelle à la distance qui les sépare. Au laboratoire, le signal est transmis à une électronique reliée à un ordinateur permettant l'acquisition, le traitement et l'enregistrement des données. Sur le terrain, les données sont récupérées par une carte communicante et transférées quotidiennement par le réseau de téléphonie mobile sur une station de travail au laboratoire. Les données sont traitées à l'aide d'une application logicielle développée au sein du laboratoire sous Labview (National Instruments). La fréquence d'échantillonnage par individu était de 0.2 Hz au laboratoire et de 0.6 Hz sur le terrain. La chaîne de mesure est illustrée à la Figure 2.5.

Lors de chaque échantillonnage (toutes les 0.1 ou 0.3 s, sur le terrain et au labo respectivement), 3 valeurs sont enregistrées : l'heure, le numéro de l'animal et le voltage correspondant à l'écartement valvaire. Ces données sont traitées par algorithme et permettent d'obtenir, chaque jour et pour chaque huître, le graphe représenté à la Figure 2.6. Le temps est représenté en abscisse, l'écartement valvaire en ordonnée.

Diverses analyses peuvent ensuite être conduites avec cet outil. Lors de ce travail, l'intérêt s'est porté essentiellement sur le pourcentage d'ouverture horaire des animaux. En outre, le temps de réponse, l'amplitude d'ouverture et les micro-fermetures ont été pris en compte.

Ecartement valvaire (mm)

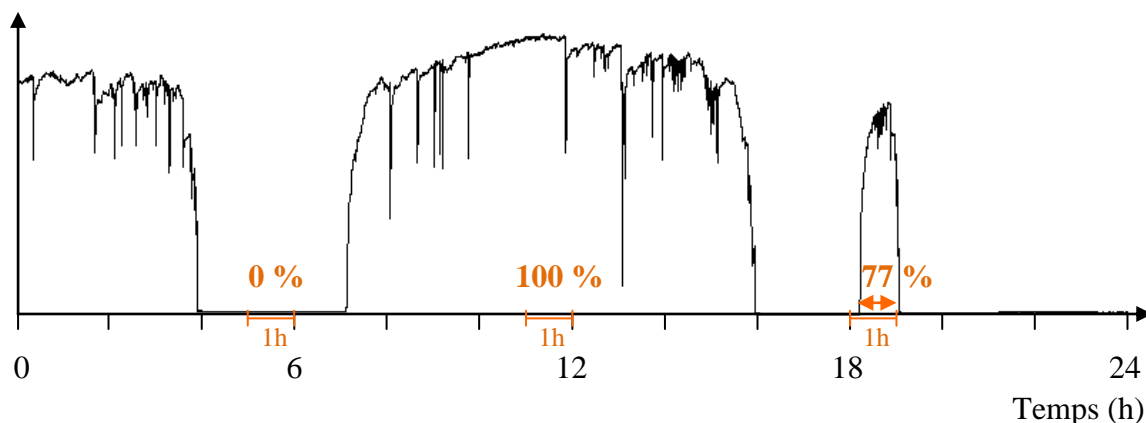


Figure 2.6 : Représentation du pourcentage d'ouverture horaire sur un graphe représentant l'écartement valvaire d'une huître pendant une journée.

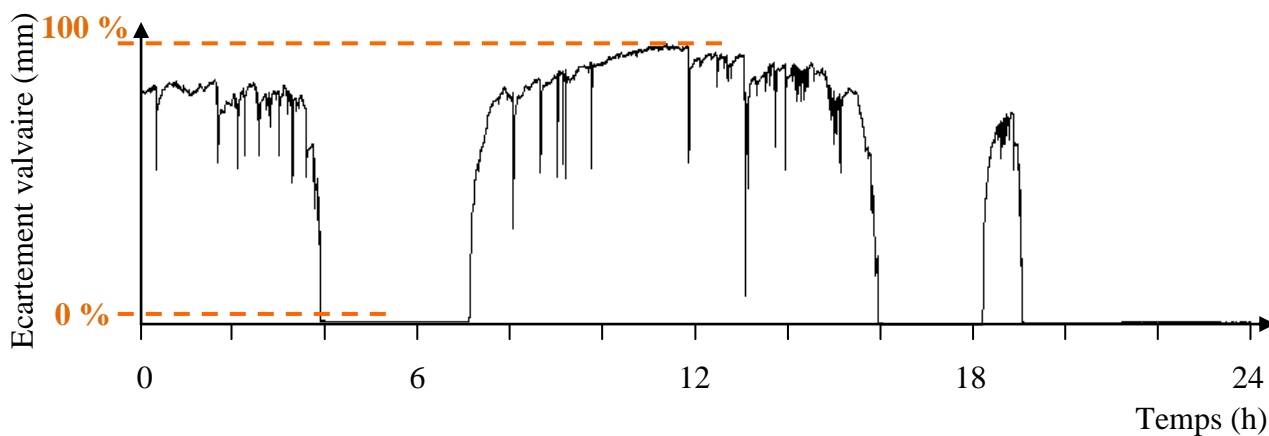


Figure 2.7 : Représentation de l'amplitude d'ouverture (%) valvaire sur un graphe représentant l'écartement valvaire d'une huître pendant une journée.

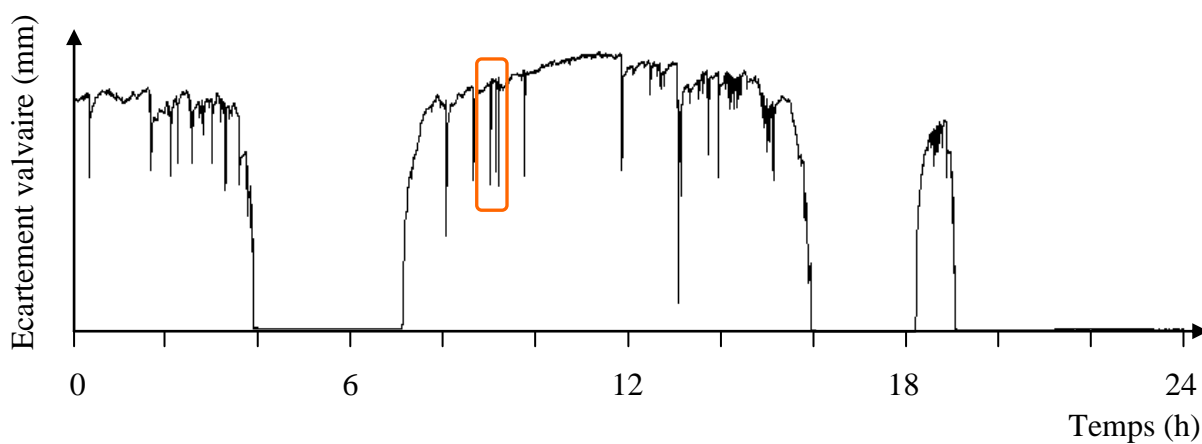


Figure 2.8 : Illustration de micro-fermetures (encadré) des valves.

4.1 Le pourcentage d'ouverture horaire

Le pourcentage d'ouverture horaire est basé sur la mesure du temps que l'animal passe ouvert chaque heure. Si l'huître est continuellement ouverte pendant une heure, le pourcentage d'ouverture horaire est de 100%. Si en revanche elle ne s'ouvre pas du tout pendant une heure, le pourcentage d'ouverture horaire est de 0%. Tous les intermédiaires sont également possibles (Figure 2.6). Cette valeur est déterminée pour chaque heure du jeu de données. Le pourcentage d'ouverture horaire peut également être déterminé au niveau du groupe étudié, en faisant la moyenne des valeurs individuelles. C'est le pourcentage d'ouverture horaire moyen du groupe.

4.2 Temps de réponse

Le temps de réponse est déterminé par le temps qui s'écoule entre l'application d'un zeitgeber auquel l'animal est soumis et l'observation d'une réponse de l'animal. Nous avons observé, typiquement, que lorsqu'elles sont soumises à un cycle d'alternance jour-nuit, les huîtres qui sont fermées s'ouvrent après l'allumage ou l'extinction des feux. Le temps qui s'écoule entre cet événement et l'ouverture des valves d'un animal préalablement fermé peut être mesuré très précisément, à la seconde près, et détermine chaque jour pour chaque animal son temps de réaction.

4.3 Amplitude d'ouverture

L'amplitude d'ouverture se définit en pourcents. Le niveau le plus bas observé pour chaque animal sur la durée de l'expérience définit la valeur 0, tandis que la valeur maximale définit 100 % d'amplitude d'ouverture. A chaque valeur d'écartement valvaire est donc associée une amplitude d'ouverture (Figure 2.7). Ensuite, on peut par exemple déterminer le temps passé par les animaux dans différentes catégories d'amplitudes.

4.4 Micro-fermetures

Les micro-fermetures consistent en des fermetures partielles et rapides des valves (Figure 2.8). Ces mesures sont réalisées sur la dérivée du signal d'écartement valvaire. Ces mouvements peuvent également être dénombrés pour chaque animal.

5. Analyses de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire qui ont été appliquées au cours de cette thèse ont servi d'une part à sonder les bases moléculaires de l'horloge biologique de l'huître *C. gigas* et

d'autre part à déterminer l'impact de l'algue toxique *A. minutum* sur *C. gigas* au niveau de la transcription de gènes sélectionnés et de sa génotoxicité éventuelle.

5.1 Purification des acides ribonucléiques totaux

Lors de l'échantillonnage, les huîtres sont disséquées rapidement et les tissus (environ 40 mg) sont placés dans un tampon contenant des inhibiteurs de ribonucléases (RNA later, Qiagen), conservés une nuit à 4°C puis stockés à -80°C jusqu'à la réalisation des analyses.

L'extraction des acides ribonucléiques (ARN) totaux nécessite l'application de diverses précautions afin, encore, d'éviter toute contamination des échantillons par des RNAses : travailler avec des gants, utiliser des tubes et cônes certifiés « RNAses free » par le fabricant, traiter la paillasse à l'éthanol et « RNase away » (Molecular BioProducts), utiliser de l'eau traitée par du diéthyl pyrocarbonate 0.1% (v/v), décontaminer et autoclaver le matériel réutilisable.

Les ARNs totaux ont été extraits à l'aide du kit « Absolutely RNA extraction » (Stratagen Agilent) suivant le protocole du fabricant, auquel une étape d'extraction au phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1, v:v:v) a été ajoutée. Après décongélation des échantillons sur glace, environ 40 mg de tissus sont placés dans un tube contenant 4.2 µl de β-mercapto-éthanol (qui réduit les ponts disulfures) et 600 µl de tampon de lyse fait essentiellement de thiocyanate de guanidine (qui dénature les protéines et inhibe les RNAses). Le tissu est ensuite broyé soit manuellement à l'aide d'un mortier en polypropylène jusqu'à obtention d'une solution homogène visqueuse, soit à l'aide de billes de broyages (3 par tube) à l'aide de l'agitateur FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA) à 6.0 m·s⁻¹ durant 40 s. Le broyat est alors placé sur une colonne de pré-filtration et centrifugé pendant 5 minutes à température ambiante pour éliminer les principaux débris cellulaires. Ensuite, 600 µl de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1, v:v:v) sont ajoutés à l'éluat afin d'éliminer les protéines hydrophobes et amphiphiles. Les tubes sont vortexés et centrifugés pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant, phase aqueuse contenant les acides nucléiques, est prélevé et un volume d'éthanol 75% glacé y est ajouté afin de favoriser les liaisons ioniques. La solution est vortexée et adsorbée sur une colonne d'affinité ne retenant que les acides nucléiques (ADN et ARN). Puis, les colonnes sont lavées avec 600 µl de solution faiblement concentrée en sels puis séchées. Les ADN adsorbés sur la colonne sont digérés par un mélange constitué de 50 µl de tampon d'activité et 5 µl de DNase I. La réaction est effectuée à 37°C pendant minimum 15 minutes. Deux lavages sont ensuite réalisés, le premier avec une solution fortement concentrée en sels destinée à laver la DNase et les fragments d'ADN, le second avec la solution faiblement concentrée en sels pour rétablir la concentration en sels sur la colonne. Pour chaque lavage, une centrifugation est nécessaire et est effectuée à température ambiante. Après ces lavages, la colonne est séchée via une nouvelle centrifugation, placée dans un tube neuf et certifié sans RNase et incubée avec 30 µl

Table 2.1: Gènes étudiés et séquences nucléotidiques des amorces associées.

Fonction	Gène	Numéro d'accèsion	Séquence 5' - 3'
Grande sous-unité ribosomique	28S	Z29546	AAACACGGACCAAGGAGTCT ^a
			AGGCTGCCTTCACTTTCATT ^b
Neutralisation du stress oxydant	<i>cat</i>	EF687775	AACTACTTCGCTGAGGTG ^a
			GGTCTTGGCTTTGTATGG ^b
	<i>gpx</i>	EF692639	GACCGTGAACCAATGGACATC ^a
			GTTGGATTCGGACACAGATAGGG ^b
	<i>sod</i> (Cu/Zn)	AJ496219	CTCCTGGAACCTGTGACATTG ^a
			GTGCCTCTCGTGATCCTCTGG ^b
Respiration mitochondriale	<i>cox1</i>	NC_001276	TTACGCTTCACGACACT ^a
			AACTACTCGACGTGGT ^b
Horloge circadienne	<i>cry</i>	GQ415324	ATCTACGCTTTGGCTG ^a
			CCTCGTATCTGAGCTGC ^b
Réponse immunitaire	<i>ilk</i>	EF190193	AGCATCAAAGCCATCAC ^a
			ACTCTCACTGGCCTGTA ^b
Détoxification	<i>mdr</i>	EU073425	CACGGCAGTCATGTTC ^a
			TCCTCGGAGTAAGGGT ^b
	<i>mt2</i>	AJ297818	TCCGGATGTGGCTGCAAAGTCAAG ^a
			GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT ^b

^aAmorce sens ; ^b amorce anti-sens. Les amorces pour les gènes *28s*, *sod*, *cat* et *gpx* ont été construites d'après Jo et al. (2008)

de tampon d'éluion chauffé à 60°C afin d'augmenter le rendement de la réaction. Les ARNs purifiés sont récupérés par centrifugation, 1 minute à température ambiante et soit conservés à -80°C soit utilisés directement dans la réaction de rétro-transcription.

5.2 Synthèse des acides désoxyribonucléiques complémentaires

Cette étape, également appelée rétro-transcription, transforme les ARN extraits en acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADN_c), plus stables et utilisés dans l'étape ultérieure de quantification.

La synthèse des ADN_c est réalisée à l'aide du kit « First strand cDNA synthesis » (Stratagen Agilent) selon les instructions du fabricant. Chaque réaction contient 14 µl d'ARN totaux purifiés, 2 µl de tampon d'activité, 0.8 µl de dNTPs (100 mM) et 2 µl d'amorces (1 µl d'oligo dT 0.5 µg·µl⁻¹ + 1 µl d'amorces aléatoires 0.1 µg·µl⁻¹). Les tubes sont incubés pendant 5 minutes à 65°C dans un thermocycleur (Eppendorf) afin de former une molécule d'ARN linéaire. La température est ensuite ramenée à 42°C pour permettre l'hybridation des amorces. Sont alors ajoutés à chaque tube 0.5 µl d'inhibiteurs de RNAses et 1 µl d'enzyme Reverse-Transcriptase. Les solutions sont finalement incubées 1h à 42°C : la rétro-transcription s'opère. Les ADN_c produits sont stockés à -80°C jusqu'à quantification.

5.3 PCR quantitative en temps réel

La réaction en chaîne par polymérase en temps réel, connue sous l'acronyme anglais qPCR, a permis d'une part d'étudier l'expression d'un gène de l'horloge biologique et d'autre part d'évaluer l'impact d'*A. minutum* sur l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydant, le métabolisme mitochondrial, l'horloge biologique, l'immunité, la détoxification. Ces gènes sont repris dans le tableau 2.1. Ces deux expériences différentes ont été effectuées avec des protocoles différents, sur deux appareils distincts. Ces protocoles sont détaillés ci-après.

5.3.1 Protocole pour Stratagen Mx3000p

Ce protocole utilise un appareil Stratagen Mx3000p et s'effectue à l'aide d'un kit « Brilliant III Ultra Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagen Agilent).

Un mélange d'amorces est préparé, contenant les amorces sens et anti-sens à une concentration finale de 2 µM. Les amorces utilisées ont été établies avec le logiciel LightCycler Probe design (version 1.0, Roche) et sont présentées dans le tableau 2.1. Le volume est complété avec de l'eau ultra pure autoclavée. Un mélange réactionnel est également préparé, contenant par échantillon 10 µl de Tp 2x Brilliant III (constitué de tampon d'activité, dNTPs, enzyme *Taq* polymérase, Sybr Green, MgCl₂) et 7 µl d'eau ultra pure autoclavée. Dans chaque puits de la plaque de mesure sont déposés 17 µl de mélange réactionnel, 2 µl du mélange d'amorce et 1 µl d'ADN_c. La plaque est alors couverte et centrifugée pendant 20 s,

puis la qPCR est réalisée. Le programme thermique appliqué comprend une étape initiale de chauffage de 10 min à 95°C destinée à activer l'enzyme, suivie par 40 cycles d'amplification. Chaque cycle comprend 30 s à 95°C (dénaturation de l'ADN), 30 s à 58°C (hybridation des amorces) et 30 s à 72°C (élongation par la *Taq* polymérase). La spécificité de la réaction est contrôlée via les courbes de dissociation : le niveau de fluorescence du Sybr Green est mesuré pendant un chauffage progressif des produits de PCR de 60 à 95°C. Chaque produit de PCR possède une température de fusion (T_m) qui lui est propre et qui est déterminée par sa composition en bases G et C. Lorsque les 2 brins d'ADN formés se séparent, l'appareil enregistre une perte de fluorescence du Sybr Green et détermine le T_m .

Pour chaque échantillon, le nombre de copies d'ADN_c des gènes d'intérêt est quantifié relativement au nombre de copies du gène *28S* via la méthode $2^{\Delta Ct}$ modifiée d'après Livak et Schmittgen (2001) :

$$\text{expression relative}_{\text{gène étudié}} = 2^{(Ct_{28S} - Ct_{\text{gène étudié}})} \quad (2.2)$$

où Ct désigne le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour entrer en phase exponentielle lors de la PCR.

5.3.2 Protocole pour LightCycler (Roche)

Le protocole est réalisé avec du DNA intercalating dye SybrGreen I (Stratagen Agilent) sur un appareil LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). Chaque réaction est réalisée dans un capillaire contenant un volume réactionnel de 20 µl constitué de 2 µl du mélange du couple d'amorces à 3 µM pour chaque amorce (Tableau 2.1), 2 µl de la solution d'ADN_c et 16 µl de mélange réactionnel. Le mélange réactionnel contient 1 µL de tampon 1b activé (tampon d'activité, Sybr Green, nucléotides, *Taq* polymérase), 3.2 µl de MgCl₂ et 11.8 µl d'eau ultra pure autoclavée. Le programme thermique inclut une étape initiale d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 min. S'ensuivent 50 cycles d'amplification incluant chacun 5 s à 95°C (dénaturation de l'ADN), 5 s à 60°C (hybridation des amorces) et 20 s à 72°C (élongation par la *Taq* polymérase). Comme pour le protocole précédent, la spécificité de la réaction est également contrôlée par obtention d'une courbe de dissociation. L'expression des gènes d'intérêt est normalisée par rapport au gène *28S* et quantifiée par la méthode $2^{\Delta Ct}$.

5.4 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique (ADN_g) a été extrait afin de déterminer si *A. minutum* provoque des atteintes génotoxiques chez *C. gigas*. Cette analyse est effectuée par RAPD-PCR sur des tissus de branchie.

Lors de l'échantillonnage, environ 100 mg de tissus ont été prélevés et conservés à -80°C jusqu'à extraction et analyse. L'extraction de l'ADN_g a été effectuée à l'aide du « DNA Extraction kit » (Stratagen Agilent). Les tissus sont coupés au scalpel en petits morceaux pour

optimiser l'extraction. A chaque échantillon sont ajoutés 7 ml de tampon d'extraction (solution 2) et 3.1 μl d'enzyme pronase destinée à dégrader le tissu et libérer les acides nucléiques. La digestion des tissus se fait pendant toute une nuit, à 37°C, avec agitation douce des tubes. Les échantillons sont ensuite refroidis sur glace pendant 10 minutes. Sont alors ajoutés 2.5 ml de solution 3 afin de précipiter les protéines. Les échantillons sont à nouveau incubés sur glace durant 5 minutes, puis centrifugés pendant 15 minutes à 2000g et à 4°C. Le surnageant, qui contient tous les acides nucléiques, est transféré dans un tube de 50 ml. Sont ajoutés 14 μl de RNase. Les tubes sont incubés pendant 5 minutes à 37°C. Puis, 14 ml d'éthanol absolu sont placés dans chaque tube pour précipiter l'ADN : les tubes sont délicatement retournés jusqu'à obtention d'un précipité blanc. L'ADN est alors prélevé, rincé à l'éthanol 70% et remis en suspension dans 500 μl de tampon 10mM Tris 0.1 mM EDTA. La dissolution est réalisée pendant 1 heure à 37°C. Ensuite, dans chaque échantillon, la concentration d'ADN_g est mesurée par spectrométrie, à 260 nm via la relation :

$$1 \text{ DO} = 50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \quad (2.3)$$

Où DO correspond à la densité optique. Les échantillons sont dilués dans du Tris EDTA pour obtenir une concentration finale de 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Les échantillons sont alors conservés à -80°C jusqu'à analyse par RAPD-PCR.

5.5 RAPD-PCR

La Random Amplified Polymorphic DNA - PCR est destinée à mettre en évidence des modifications de l'ADN génomique. Cette PCR s'effectue de manière similaire aux qPCR décrites ci-dessus. Elle a été réalisée à l'aide d'un LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) de manière similaire au protocole décrit ci-dessus (5.3.2 Protocole pour LightCycler (Roche)). La RAPD-PCR utilise des amorces aléatoires. Les oligonucléotides suivants, décrit dans Cambier et al. (2010), ont été employés : OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3') et OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3'). La RAPD-PCR s'opère dans un capillaire contenant un volume réactionnel de 20 μl constitué de 2 μl d'amorce OPB7 ou OPB11 à 6 μM , 2 μl de la solution d'ADN_g soit 16 ng et 16 μl de mélange réactionnel. Le profil thermique consiste en une étape de chauffage de 10 min à 95°C, suivie par 50 cycles d'amplification à 95°C pendant 5 s, 50°C pendant 5 s et 72°C pendant 20 s. Afin de détecter des effets particulièrement fins, le profil peut être modifié en remplaçant l'étape à 50°C par une étape à 60°C pendant 5 s. Le nombre de sites d'hybridation n de chaque amorce est alors calculé relativement au nombre de sites d'hybridation du gène 28S :

$$n = 2^{(CT_{28S} - CT_{OPB} + 1)} \quad (2.4)$$

Par ailleurs, les courbes des températures de fusion sont analysées à l'aide du logiciel LightCycler 3.5 (Roche). Pour chaque réaction, les températures de fusion des différents

produits de PCR sont répertoriées dans un tableau couvrant 12 intervalles de température allant de 74 à 92°C. Cet intervalle permet de couvrir tous les T_m obtenus lors de l'analyse. La fréquence d'occurrence de produits de PCR dans chaque intervalle est alors comparée entre les animaux contrôles et ceux exposés à *A. minutum*.

6. Dosage des toxines paralysantes

Les toxines produites par *Alexandrium minutum* sont rassemblées sous la dénomination anglaise de Paralytic Shellfish Poisoning (PSPs) ou Paralytic Shellfish Toxins (PSTs). Ces appellations désignent une vingtaine de molécules dont la structure moléculaire de base est celle de la saxitoxine (STX). Les tissus concernés furent disséqués, pesés et stockés à -80°C dans 1 ml d'acide chlorhydrique 0.1 mol·l⁻¹ jusqu'à la réalisation des analyses. Le dosage des toxines a été effectué à l'aide d'un test ELISA (Abraxis) conformément aux instructions du fabricant.

6.1 Broyage des échantillons

Les échantillons sont décongelés et broyés sur glace jusqu'à obtention d'une solution homogène. Le broyeur est nettoyé entre chaque échantillon. Les échantillons sont ensuite soit conservés à -80°C soit dilués.

6.2 Dilution

Les échantillons sont centrifugés à 4°C et 3500g pendant 10 minutes. La dilution est effectuée avec la solution ad hoc fournie dans le kit ELISA (Abraxis). Le facteur de dilution est adapté au tissu dosé, généralement de 100 à 1000. Ce facteur est toutefois corrigé si nécessaire, suite aux résultats de l'analyse, et peut aller de 20 pour le muscle jusqu'à 8000 pour la glande digestive.

6.3 Test ELISA

Le kit ELISA (Abraxis), stocké à 4°C, est ramené à température ambiante. Les standards sont homogénéisés à l'aide d'un vortex. Les standards et échantillons sont alors ajoutés, en duplicatas, dans les puits correspondants. Sont ensuite ajoutés successivement, à l'aide d'une pipette multicanaux, 50 µl de la solution d'enzyme conjuguée et 50 µl de la solution d'anticorps. La plaque est agitée 30 secondes puis incubée à température ambiante pendant 30 minutes. Les puits sont vidés de leur contenu et lavés à 4 reprises avec une solution de lavage. Sont alors ajoutés 100 µl de la solution substrat. La plaque est à nouveau homogénéisée pendant 30 secondes et incubée pendant 30 minutes, toujours à température ambiante. Un

terme est alors mis à la réaction avec l'ajout de 100 µl de solution stop dans chaque puits. Puis l'absorbance est lue à 450 nm. La concentration dans chaque échantillon est obtenue à partir de la courbe de calibration construite sur base des solutions standards. A ce stade, les toxines sont dosées en PSPs. Pour convertir les valeurs mesurées en équivalents STX, la formule suivante est appliquée :

$$[\text{eq. STX}] = [\text{PSPs}] \cdot 4 \cdot 0.75 + [\text{PSPs}] \cdot 50 \cdot 0.25 \quad (2.5)$$

Cette formule prend en compte les toxines produites par la souche *A. minutum* AM89BM utilisée dans nos expériences et majoritairement accumulées par *C. gigas* (Guéguen et al., 2008) et l'affinité du test ELISA pour ces dernières. En effet, les gonyotoxines (GTX) 2 et 3 représentent environ 75% des toxines accumulées par *C. gigas* et l'affinité du test pour ces toxines est d'environ 25%, donnant les facteurs 4 et 0.75 appliqués dans la formule. En outre, les sulfo GTX 1 et 2 constituent environ les 25% restant des toxines accumulées par *C. gigas* et le test a une affinité de 2% pour ces toxines, donnant donc les facteurs 50 et 0.25 appliqués ici.

7. Analyses chronobiologiques

7.1 Actogrammes

Les actogrammes ont été établis à l'aide du logiciel Chronos-Fit 1.06 (www.ma.uniheidel). Chaque ligne représente l'activité de deux jours consécutifs. Pour chaque jour, l'activité moyenne est calculée. Ensuite, les valeurs d'activité supérieures à la valeur moyenne de la journée sont dessinées en noir et les valeurs d'activités inférieures à la valeur moyenne sont représentées en blanc.

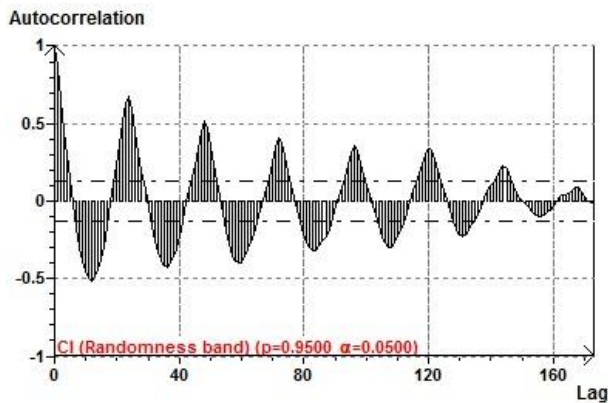
7.2 Recherche et caractérisation d'un rythme

La recherche et caractérisation d'un rythme dans les données expérimentales a été réalisée d'après le modèle Cosinor, avec le logiciel Times Series Analysis Seriel Cosinor 6.3 (<http://www.euroestech.com>). Détecter un rythme implique de respecter différentes étapes : vérifier la qualité des données, déterminer la périodicité éventuellement présente et enfin modéliser le rythme potentiel (Gouthière et al., 2005a, 2005b ; Gouthière et Mauvieux, 2004).

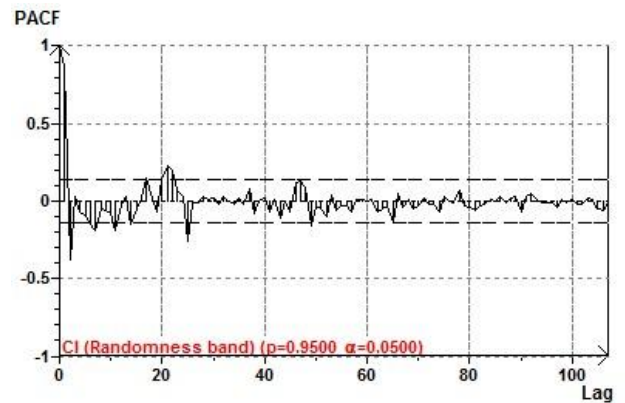
7.2.1 Qualité des données expérimentales

Un exemple de chaque tests est présenté à la Figure 2.9, pour des données moyennes d'ouverture horaire de 15 huîtres exposées à un régime L:D 12:12 pendant 9 jours. Le diagramme d'autocorrélation permet tout d'abord de s'assurer de l'absence de répartition

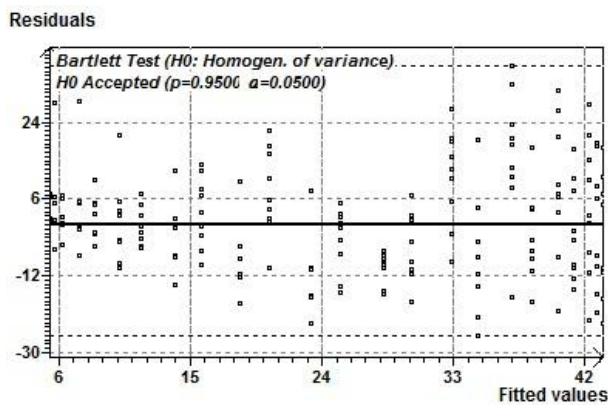
A



B



C



D

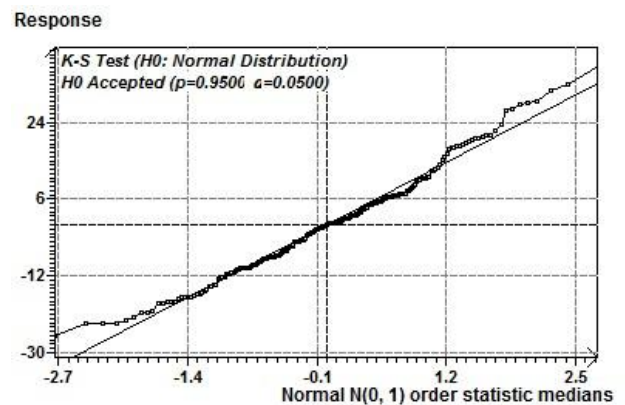


Figure 2.9 : Etapes de vérification de la qualité des données pour des valeurs moyennes d'ouverture horaire de 15 huîtres soumises à un régime L:D 12:12. Le graphe d'auto-corrélation (A) permet de s'assurer de la répartition non-aléatoire des données. Le graphe de la fonction d'auto-corrélation partielle (B) permet, quant à lui, de contrôler l'absence de phénomène stationnaire. L'homogénéité des variances (C) et la normalité des résidus sont vérifiées (D).

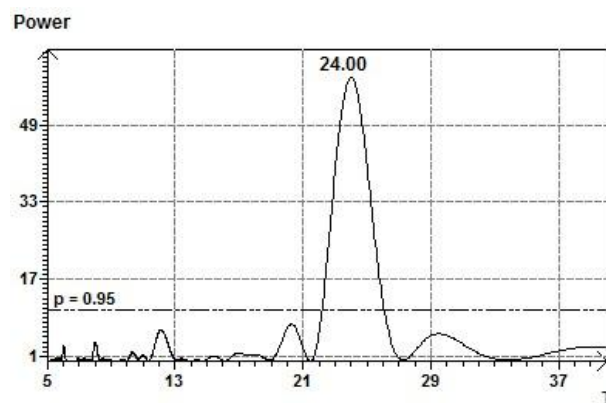


Figure 2.10 : Périodogramme de Lomb et Scargle.

aléatoire des données. Ensuite, le graphe de la fonction d'auto-corrélation partielle (PACF) permet de vérifier l'absence de phénomène stationnaire (Box et al., 1994). Ces tests valident ou non l'observation d'un réel phénomène biologique. Par ailleurs, deux autres tests permettent d'approfondir la qualité des données. L'homogénéité des variances est souhaitable. Elle s'observe via le graphe d'homogénéité des variances, complété par un test de Bartlett ($p < 0.05$). Ce test a majoritairement été observé dans les données présentées. Par ailleurs, une répartition normale des données est également souhaitable. Elle se vérifie graphiquement et statistiquement, à l'aide d'un test de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). La normalité des données a été largement observée pour les données de population et vérifiée de manière plus variable pour les valeurs individuelles.

7.2.2 Détermination de la période par analyse spectrale

La périodicité éventuellement présente dans le jeu de données s'étudie par analyse spectrale. Il est conseillé d'appliquer différentes méthodes. Le résultat est d'autant plus proche de la valeur réelle lorsque des méthodes fonctionnant sur des principes différents fournissent la même valeur. Les méthodes ici utilisées pour déterminer la période dans les différentes expériences sont : le périodogramme de Lomb et Scargle (Scargle, 1982 ; Figure 2.10), le spectre elliptique inverse basé sur la surface de l'ellipse de confiance (Bingham et al., 1982 ; Nelson et al., 1979), le spectre autospectral et l'autopériodogramme de Jenkins et Watts (Jenkins et Watts, 1968) et le périodogramme de Fourier. Les différentes analyses ont toujours, pour les données traitées dans ce travail, fourni un résultat similaire à la première décimale près. Le périodogramme de Lomb et Scargle présente l'avantage de fournir un seuil de probabilité ($p = 0.05$) à partir duquel on distingue une période du bruit présent dans les données. Le spectre elliptique inverse, lui, donne un intervalle de confiance sur la détermination de la période.

7.2.3 Modélisation Cosinor

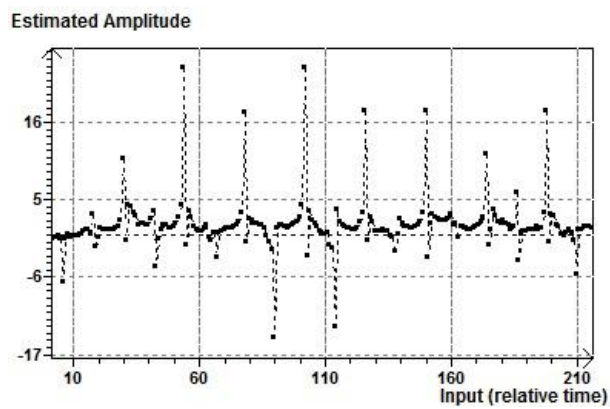
Lorsqu'une période significative est déterminée et la qualité des données est attestée, la rythmicité présente dans les données est alors modélisée par le modèle Cosinor, qui se base sur des fonctions cosinus calculées par régression (Nelson et al., 1979 ; Bingham et al., 1982). L'équation du modèle s'écrit :

$$Y(t) = A \cdot \cos(2\pi t/\tau + \varphi) + M + \epsilon(t) \quad (2.6)$$

où : A correspond à l'amplitude, τ à la période, φ à la phase, M au mésor et ϵ à un terme d'erreur relative (Gouthière et Mauvieux, 2004).

Afin de valider l'existence d'un rythme, deux tests effectués par le modèle doivent être vérifiés : le test de l'ellipse (Bingham et al., 1982 ; Nelson et al., 1979) doit être rejeté et la probabilité que l'amplitude soit nulle doit être inférieure à 0.05. L'ellipse est une

A



B

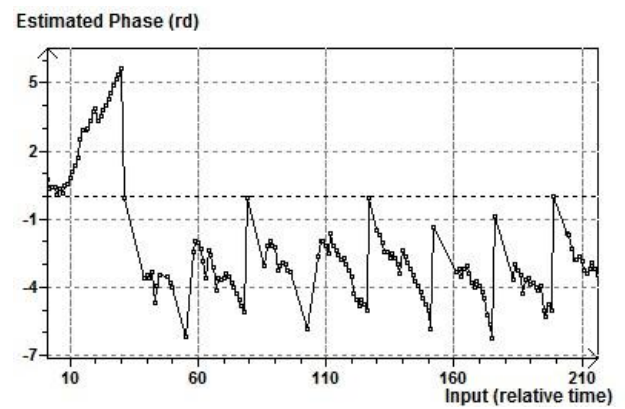


Figure 2.11 : Spectres de démodulation complexe en amplitude (A) et e phase (B). Si l'amplitude apparaît relativement constante en fonction du temps, ce n'est pas le cas de la phase, qui augmente et diminue régulièrement.

représentation géométrique d'un rythme. Les axes de l'ellipse permettent de caractériser le modèle. Pour que le test soit valide, l'ellipse ne doit pas entourer l'origine. Le test de l'ellipse considère l'hypothèse que l'amplitude du modèle calculé soit nulle, à une probabilité donnée. L'origine est également localisée géométriquement. Ces deux tests doivent confirmer l'existence d'un rythme.

Les caractéristiques du rythme étudié sont déterminées : acrophase, méso et phase. Par ailleurs, le percent rhythm (PR) est calculé : il définit le pourcentage de l'activité étudiée qui est expliqué par le modèle. La validité de l'ajustement du modèle est finalement vérifiée sur les résidus : distribution normale des résidus (Chi-carré et test de Kolmogorov-Smirnov), moyenne nulle de la somme des résidus (test de comparaison de moyennes) et indépendance des résidus (Q-test). La vérification ou non de ces tests ne remet pas en cause l'existence d'un rythme mais vérifie l'adéquation du modèle.

Par ailleurs, comme indiqué dans l'équation 2.5, le modèle Cosinor considère que l'amplitude et la phase ne sont pas fonction du temps. Cela peut être vérifié via les spectres de démodulation complexe (Granger et Hatanaka, 1964). Les données présentées dans ce travail ont généralement montré une amplitude constante dans le temps, mais ce n'était le plus souvent pas le cas pour la phase, comme illustré à la Figure 2.11. Cela a déjà été mentionné pour des rythmes biologiques. Un modèle calculant une phase fonction du temps $\varphi(t)$ serait plus proches des données. Toutefois, cet aspect ne remet pas l'existence d'un rythme en question.

7.2.4 Recherches de périodes secondaires

La méthodologie Cosinor peut être mono ou pluri-périodique. En effet, les périodes secondaires peuvent être recherchées et déterminées dans les jeux de données en réinjectant les résidus à une période déterminée et une probabilité choisie (ici $p = 0.05$). Les étapes réalisées sont ensuite les mêmes que ceux décrits ci-dessus. Le modèle s'écrit alors :

$$Y(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot \cos\left(\frac{2\pi t}{\tau_i} + \varphi_i\right) + M_i + \epsilon_i(t) \quad (2.7)$$

où n correspond au nombre de périodes du modèle.

Les organismes aquatiques sont réputés pour présenter des rythmes fortement bruités et des horloges peu précises. Il n'est également pas rare d'observer une absence de rythme pour la moitié voire plus de la population étudiée. Ceci se révèle particulièrement vrai en condition de libre cours, lorsque les animaux ne sont soumis à aucun entraînement. (Last et al., 2009 ; Palmer, 1995a). Les études rassemblées dans le présent document ont montré que *Crassostrea gigas* n'échappe pas à cette règle. Si en conditions d'entraînement les huîtres ont montré des rythmes assez nets, ce n'était pas le cas en l'absence de zeitgeber. Dès lors, les analyses chronobiologiques pour ces conditions expérimentales ont été poussées jusqu'à l'étude des

quatre premières périodes significatives pour chaque animal. Si certains animaux ont pu afficher davantage ou moins de périodes, quatre périodes significatives représentent ce qui a été majoritairement observé.

Chapitre 3

Un rythme circadien chez *C. gigas* ?

1. Introduction

Si de manière générale les rythmes biologiques des organismes marins ont bénéficié d'une attention bien moindre que ceux des espèces terrestres ou d'eau douce, la chronobiologie des bivalves est particulièrement peu abordée. Par ailleurs, si quelques études rapportent des corrélations entre certains paramètres étudiés (la croissance, la présence de stylet cristallin, etc.) et les cycles tidaux ou journaliers, on retrouve peu d'études de chronobiologie *stricto sensu*, incluant la recherche de périodes par analyse spectrale et l'analyse statistique des séries de données. On retrouve principalement parmi ces études chronobiologiques la recherche des rythmes de la grande nacre *Pinna nobilis* in situ (Garcia-March et al., 2008), de la moule *Mytilus edulis* en libre cours (Ameyaw-Akumfi et Naylor, 1987), de la coque *Chione stutchburyi* (Beentjes et Williams, 1986 ; Williams et al., 1993 ; Williams et Pilditch, 1997) et des palourdes *Saxidomus purpuratus* (Kim et al., 2003) et *Ruditapes philippinarum* (Kim et al., 1999) au laboratoire. Ces études sont généralement fort descriptives et reposent parfois sur un faible nombre d'animaux. Spécifiquement, les rythmes de l'huître *Crassostrea gigas* n'ont à ce jour pas été recherchés et caractérisés. Sur le terrain, Tran et al. (2011) ont rapporté l'existence d'un cycle tidal d'activité valvaire chez des huîtres étudiées en condition subtidale, c'est-à-dire immergées en permanence : les animaux présentent deux périodes principales de fermeture des valves par jour lunaire, correspondant aux étales de marées basses. Ce cycle tidal est modulé par les cycles lunaires synodique et anomalistique : les durées d'ouverture valvaire les plus élevées correspondent aux amplitudes de marées les plus importantes. Enfin, ces auteurs ont précisé qu'un cycle basé sur l'alternance jour/nuit, plus faible, se superpose à ce cycle tidal.

L'objectif de ce chapitre est de répondre à la question suivante : le rythme circadien - c'est-à-dire généré par une horloge endogène circadienne - qui domine chez les organismes terrestres et d'eau douce existe-t-il chez l'huître *Crassostrea gigas* ? Et, dans l'affirmative, comment se caractérise-t-il ? Quelle est la robustesse de l'oscillateur sous-jacent, s'il existe ? Ces interrogations ont été abordées en étudiant les huîtres au laboratoire et en les soumettant à différents régimes d'entraînement lumineux et de libre cours. De plus, les données obtenues expérimentalement ont été comparées à celles recueillies pendant un an sur des huîtres étudiées sur le terrain.

2. Article: Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*.

Evidence for a Plastic Dual Circadian Rhythm in the Oyster *Crassostrea gigas*

Audrey M. Mat,¹ Jean-Charles Massabuau,^{1,2} Pierre Ciret,^{1,2} and Damien Tran^{1,2}

¹Université Bordeaux and ²Centre National de la Recherche Scientifique, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux, Unité Mixte de Recherche, Arcachon, France

Although a significant body of literature has been devoted to the chronobiology of aquatic animals, how biological rhythms function in molluscan bivalves has been poorly studied. The first objective of this study was to determine whether an endogenous circadian rhythm does exist in the oyster, *Crassostrea gigas*. The second objective was to characterize it in terms of robustness. To answer these questions, the valve activity of 15 oysters was continuously recorded for 2 mo in the laboratory under different entrainment and free-running regimes using a high-frequency noninvasive valvometer. The present work demonstrates the presence of a circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. First, oysters were entrained by 12 L:12 D conditions. Then, free-running conditions (D:D and L:L) indicated that the most frequently observed period ranged from 20 to 28 h, the circadian range. That endogenous circadian rhythm was characterized as weak. Indeed, the period (τ) of the individual animals exhibited high plasticity in D:D and L:L, and the animals immediately followed a 4-h phase advance or delay. Additionally, *C. gigas* appeared as a dual organism: all oysters were nocturnal at the beginning of the laboratory experiment (January), whereas they were diurnal at the end (March). That shift was progressive. Comparison with a full-year in situ record showed the same behavioral duality as observed in the laboratory: the animals were nocturnal in autumn–winter and diurnal in spring–summer. The significant advantage of a plastic and dual circadian rhythm in terms of adaptability in a highly changing environment is discussed. (Author correspondence: d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr)

Keywords: Biological rhythm, Bivalve, Clock, Diel, Dualism, Oyster, Weak oscillator

INTRODUCTION

Biological rhythms have been widely described in prokaryotes and eukaryotes, plants, and animals and seem to be ubiquitous across taxa. Indeed, living clocks constitute a fundamental property of life, from the gene to the ecosystem level, governing all behavioral, metabolic, and physiological functions of organisms (Bell-Pedersen et al., 2005; Dunlap, 1999; Hall, 1995; Panda et al., 2002). These rhythms, innate and endogenous, are entrained by external signals called zeitgebers (time givers). They are generally considered as adaptive, conferring to the organisms significant advantage, i.e., ability to anticipate changes in their environment and to adapt themselves to these oscillating variations (Ouyang et al., 1998; Pittendrigh, 1993; Yerushalmi & Green, 2009).

Although most chronobiology literature has considered terrestrial organisms, mainly governed by circadian rhythms, a significant amount of literature has been devoted to biological rhythms in marine organisms

(for reviews see Naylor, 2010; Palmer, 1995). Indeed, a major interest in coastal zones is that they constitute highly complex biotopes, influenced by both solar and lunar cycles. Under the influence of various environmental oscillators, biological clocks in marine animals have often been reported as labile (Last et al., 2009; Naylor, 2010; Palmer, 1995). For many decades, different hypotheses have been put forward to explain the endogenous rhythms described in marine organisms (Kim et al., 2003). One hypothesis is the existence of two coupled, but separate, clocks—a circadian one and a circatidal one, each being unimodal (Naylor, 2010; Webb, 1976). The second hypothesis, given by Enright (1976), suggests that a single bimodal oscillator governs both circadian and circatidal rhythmicities. The third, and last, explanation envisions the presence of two unimodal clocks, both circalunidian, coupled in antiphase (Palmer, 1995, 1997).

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is a marine bivalve of great economic importance that has successfully adapted to various biotopes around the world. Although

Submitted February 27, 2012, Returned for revision March 31, 2012, Accepted May 14, 2012

Address correspondence to Damien Tran, Université Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France. Tel.: +33(0)5 56 22 39 37; Email: d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr

many aspects of its biology have been studied, its chronobiology remains largely unknown. A first insight was given by Tran et al. (2011), who indicated that oyster activity rhythms in situ are driven by a complex association of solar cycles and different lunar cycles. The behavior of permanently immersed oysters was shown to be primarily driven by the tidal cycle. Specifically, the tidal driver appeared modeled by synodic and anomalous moon cycles: increased valve opening durations were associated with highest amplitude tides, whereas decreased valve opening durations were related with lowest ones. Importantly, under these natural in situ conditions, light appeared to be a significant zeitgeber of the oyster's biological rhythm, but its power was clearly weak in comparison with the tidal zeitgeber. This raised a series of questions that we address in the present work performed under simplified, but well-controlled, laboratory conditions, during which we specifically manipulated the light regime. In addition to an expected endogenous circatidal rhythm, does a circadian rhythm exist for the species *Crassostrea gigas*? If one does, how is it characterized? Is it a labile or robust clock? Are the animals diurnal or nocturnal? The study was carried out for 2 mo (January–March 2010) in the laboratory in Arcachon, France, by continuously monitoring oyster valve activity using high-frequency noninvasive techniques. Different entrained and free-running conditions were tested to characterize the putative existence of a potential circadian rhythm. The diurnal/nocturnal aspect of the behavior experimentally studied in the laboratory was then compared with a full-year record of field behavior.

MATERIALS AND METHODS

General and Experimental Conditions

All research detailed in this study complied with French law and was conducted in accordance with international ethical standards outlined in Portaluppi et al. (2010). The experiment was carried out in Arcachon, France (at the Marine Station) for 66 d, from January to March 2010, on 15 oysters (73 ± 1 mm shell length; 31 ± 1 g total fresh weight [shell + flesh]; 2 yrs old) *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). The animals were collected at Le Grand Banc in the bay of Arcachon. The animals were acclimated for 1 mo in the laboratory, under 12 L:12 D, in the absence of tidal cycle, in running sea water.

Experimental Setup

During the entire experiment, the animals were isolated from external vibrations using an antivibrating bench and an isolated blind room to minimize any external influences on their spontaneous behavior. Experiments were performed in a 10.5-L tank ($.35 \times .25 \times .12$ m), continuously supplied with seawater (flow = 660 mL/min) of constant composition ($17.0^\circ\text{C} \pm .2^\circ\text{C}$; chlorophyll a = $.10 \pm .07$ $\mu\text{g/L}$, mean \pm SD; pH = $8.0 \pm .1$, mean \pm SE). Two tanks in series ($.45$ and $.2$ m³), with different retention

times, were used to homogenize seawater pumped from the bay. Chlorophyll a and temperature were automatically measured every 5 min, with a 10 AU-005 Fluorimeter (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA) and electronic thermometer; pH value was measured daily with a R301 pH meter (Consort, Belgium).

Experimental Protocol

Seven series (lasting 8–10 d), based on different photoperiods, were performed: reference 12 L:12 D (10 d, light from 06:00 to 18:00 h Greenwich Mean Time [GMT]; series 1); D:D (10 d; series 2); reference 12 L:1 2D (10 d, light from 06:00 to 18:00 h GMT; series 3); 12 L:12 D with a phase advance (8 d, light from 02:00 to 14:00 h GMT; series 4); reference 12 L:12 D (9 d, light from 06:00 to 18:00 h GMT; series 5); L:L (10 d; series 6), ending with reference 12 L:12 D (9 d, light from 06:00 to 18:00 h GMT; series 7). L:D photoperiods in the laboratory matched those in the wild at the times of the experiments. Irradiance (photosynthetically active radiation, PAR) measured with the PAR (Biospherical Instruments, San Diego, CA, USA) was $19 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at water level during photophase (neon light MASTER TL-D Xtra 36W/865 1SL; Philips, Suresnes, France) and $1 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ during scotophase.

Field Study

Field data were collected from 14 *C. gigas* oysters (87 ± 3 mm shell length) collected in the Bay of Arcachon and placed in an oyster bag attached to a concrete slab under Eyrac Pier (Bay of Arcachon). The oysters were permanently immersed. The animals were introduced in situ on December 6, 2006, and data were collected during the entire year of 2007 ($n = 365$ d). Experimental details are given in Tran et al. (2011).

Crassostrea gigas Behavior Measurements

The valve activity of the studied oysters was measured using a high-frequency noninvasive (HFNI) valvometer. It consists of lightweight electromagnets (.1 g) glued on both valves of each animal, with the electrodes linked by flexible wires to a laboratory or field valvometer. The measure is an application of Maxwell's law:

$$\epsilon = -N \cdot \frac{\partial \Phi_B}{\partial t}$$

where ϵ is the electromotive force (volts), N the number of turns in the coil, $\partial \Phi_B$ the magnetic flow (Webber), and t the time. For more details, see Tran et al. (2003) and Chambon et al. (2007). Sampling frequency for each individual was .2 Hz in the laboratory and .6 Hz in the field. Data were processed using Labview (National Instrument, Austin, TX, USA).

The laboratory study focused on the endpoints of mean hourly opening of each individual and of the group. Each hour, we considered the time oysters spent with their valves open. If an oyster was open for the

entire hour, the mean hourly opening was 100%. If the animal never opened its valves during an hour, it was 0%. All the intermediary stages in between did exist. To characterize the diurnal or nocturnal behavior in situ throughout the year, each day we calculated the difference in opening duration between the photophase and scotophase (www.imcce.fr).

Data Analysis

Double-plotted actograms (each line representing 2 d) were produced with Chronos-Fit 1.06 (Zuther et al., 2009). Activity levels >24-h average are represented by a black section, whereas levels <24-h average are represented by a white section. Chronobiological analyses were carried out using the software Time Series Analysis Serial Cosinor 6.3. Several steps were performed to first verify the quality of the data, then to determine the periodicity of the behavior of the oysters, if any, and finally model the potential rhythm. (Gouthière & Mauvieux, 2004; Gouthière et al., 2005a, 2005b).

Quality of the Data Set

First, we controlled for the absence of randomness in our data set using the autocorrelation diagram and then for the absence of a stationarity using a partial autocorrelation function (PACF) calculation (Box et al., 1994). These checks indicated a real biological or physical phenomenon.

Search for Periodicity

As suggested by Gouthière and Mauvieux (2004) and Gouthière et al. (2005a, 2005b), different methods were used to determine the period (τ) in our equally spaced data: Lomb and Scargle periodogram (Scargle, 1982), elliptic inverse spectral plot based on the surface of the confidence ellipse (Bingham et al., 1982; Nelson et al., 1979), autoperiodogram and autospectral plot of Jenkins and Watts (1968), and Fourier periodogram. Importantly, the different methods always gave identical periods to the first decimal. A period was accepted when shown to be significant by the Lomb and Scargle periodogram (spectral peak crossing the $p \geq .95$ line corresponding to $\alpha \leq .05$). The confidence interval of τ was determined by the method of Halberg (1969).

Modeling and Statistical Validation

Rhythmicity was then described and characterized with the cosinor model, which uses a cosine function calculated by regression to approximate the time-series data (Bingham et al., 1982; Nelson et al., 1979). The model for a given period is written as: $Y(t) = A \cdot \cos(2\pi t/\tau + \phi) + M + \epsilon(t)$, where A is the amplitude (one-half the peak-trough variation), ϕ the acrophase (peak time), τ the period, M the MESOR (time series mean), and ϵ the relative error (Gouthière & Mauvieux, 2004; Gouthière et al., 2005a). It is necessary to check that the amplitude and phase remain constant over time, which was done using complex demodulation amplitude and phase plots (Granger & Hatanaka, 1964). Most of the time, the

amplitude remained constant over time, but the phase did not, indicating complex phenomena that were not controlled. This has previously been mentioned for biological data (Gouthière & Mauvieux, 2004; Gouthière et al., 2005a, 2005b). Two tests were absolutely essential to validate the calculated model and existence of a rhythm: the elliptic test (Bingham et al., 1982) and probability of the null amplitude ($A = 0$) hypothesis must be rejected at $p < .05$. These tests were always validated when we mention a rhythm. Two chronobiometric parameters were evaluated: the percent rhythm, i.e., percentage of the cyclic behavior explained by the model, and percent error. For one given period (τ) and at a chosen probability ($p = .05$), secondary periodicities were investigated by replacing the current data set by the residuals of the cosinor calculated. Results are presented as mean ± 1 SEM. For all statistical tests, significance was considered to be reached at $p = .05$.

RESULTS

Existence of a Circadian Rhythm in *Crassostrea gigas*

Figure 1 presents the full data set obtained for each oyster (15 oysters) during the seven experimental conditions. The records are organized by eye. The record in the upper left part of the figure exhibits highest apparent order, and records shown at the bottom are less ordered. Such a presentation underlines the fact that many animals exhibited clearly cyclic valve activity under entrained 12 L:12 D conditions. Under free-running conditions of L:L and D:D (series 2 and 6, respectively), a pattern appeared, more obviously for some oysters (e.g., oysters 1 to 5) than others (e.g., oysters 11 to 15). This analysis is the first sign suggesting the existence of an underlying circadian clock. Furthermore, residual rhythms appears even under the L:D regime. These actograms also reveal strong variability among individual oysters, which appears more important than the variability within individuals.

Tracking down the potential existence of a circadian clock requires a deeper analysis, as depicted in Figure 2, which presents calculations conducted for the whole oyster pool. From left to right, it shows the mean hourly behavior as a function of experimental day (d 1 to d 8–10; Figure 2A); mean daily behavior for the corresponding experimental series and its cosinor model curve (Figure 2B); corresponding Lomb and Scargle periodogram (Figure 2C); and distributions of the first significant period for the individuals (Figure 2D). The spectral analysis shown in Figure 2C reveals a circadian τ of between 23.6 and 24.1 h for the group as a whole during the L:D series. Chronobiological models (Figure 2B) indicate that this rhythm explained from 49% to 63% of the pattern of the studied group under 12 L:12 D conditions. The same analysis was also conducted for each individual. For all series, it is worth noting all animals showed a significant period: 100% of the animals were rhythmic under L:D conditions. As

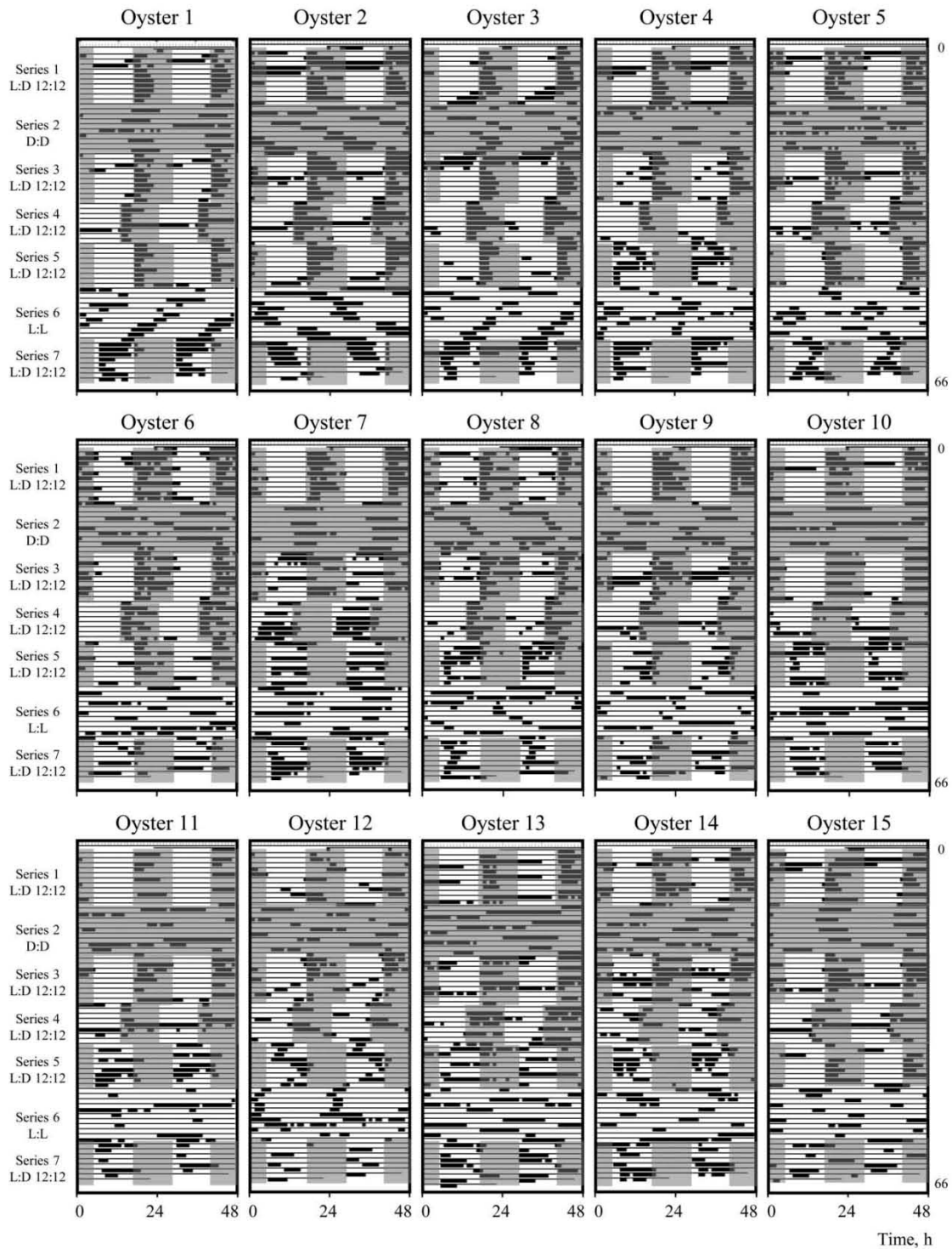


FIGURE 1. Individual actograms of valve activity in the oyster *Crassostrea gigas* based on the mean hourly opening (15 oysters, 7 temporal series, 66 d); 48 h on each line, starting at 02:00 h. Scotophase is indicated by gray rectangles. Organization of records was fitted by eye. The record exhibiting the highest apparent order was placed in the upper left, and the apparently less ordered records placed on the bottom.

indicated in Figure 2D, 100% of the animals presented a circadian rhythm in series 1. In series 3, 73% were circadian and 27% infradian (6.7% having a τ of 48.1 h and

6.7% presenting a τ of 70.3 h, periods close to harmonics of 24 h). In series 4, 73% were again circadian (6.7% with a τ of 49.2 h). In series 5, 93% of the oysters showed a

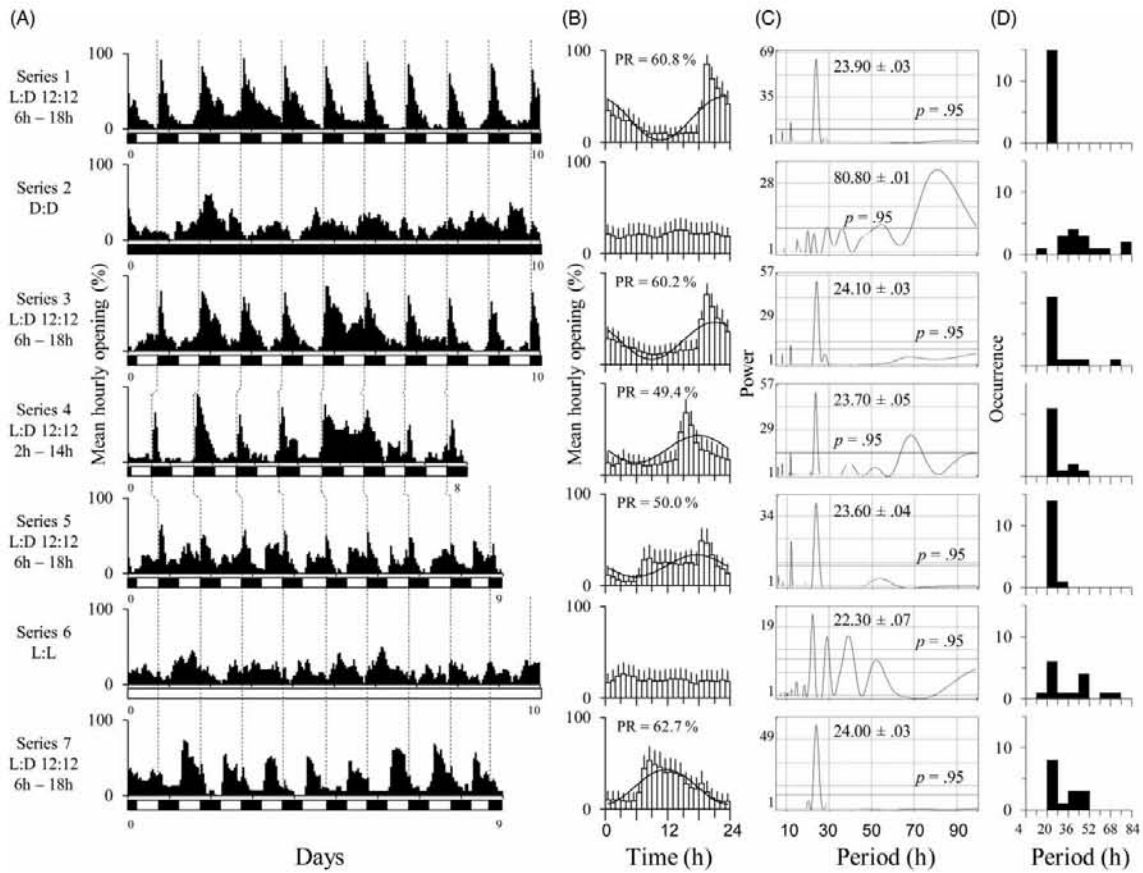


FIGURE 2. Chronobiological analysis in the oyster *C. gigas* at the group level. (A) Mean hourly opening (%) of the group ($n = 15$ oysters) for each series. (B) Mean daily behavior for each series (mean hourly opening \pm SEM) and its cosinor model curve (and percent rhythm [PR]). (C) The period of the population (\pm SD) is determined by spectral analysis for each series (Lomb and Scargle periodogram). (D) Distribution of each first period for the individuals ($n = 15$ oysters).

circadian rhythm (7% being infradian), and in series 7, 53% of the individuals displayed a circadian rhythm and 47% an infradian one (with 20% being close to a τ of 48 h, their periods being 44.1, 46.0, and 50.2 h, respectively). A phase advance was applied between series 3 and 4 (+4 h) and a phase delay between series 4 and 5 (-4 h). As shown at the individual and group levels in Figures 1 and 2A and B, oysters rapidly shifted to the new scheduled photoperiod, indicating that the observable rhythm of circadian activity could easily be manipulated.

At the group level under free-running conditions (D:D and L:L; series 2 and 6, respectively), no circadian rhythm was observed, neither in the raw data (Figure 2A) nor in the mean daily behavior and chronobiological model (Figure 2B). Even if a circadian period was detected by spectral analysis (Figure 2C, series 6), under L:L conditions no significant rhythm was detected. There was variability, as expected, in the distribution of the first significant period among the individual animals (Figure 2D). Notwithstanding, 100% of the studied oysters remained rhythmic under L:L and D:D conditions. Under L:L conditions, three modes

appeared more frequently, around 24, 48, and 72 h. Moreover, no circatidal period was observed in any free-running oyster. The mean hourly openings were $20.3\% \pm 9.8\%$ in D:D and $18.8\% \pm 9.4\%$ in L:L. There was no statistical difference between these two conditions ($p = .309$, t test).

Does a circadian rhythm exist then? To address this question, it was necessary to delve deeper into the details of the data. The first four significant periods for each individual were consequently taken into account in the free-running conditions of both D:D and L:L. The distribution of these periods is displayed in Figure 3, which extends the results presented in Figure 2. Both graphs clearly indicate that in D:D, as in L:L, the most frequently observed τ fell between 20 and 28 h, the circadian range. Furthermore, this figure indicates that there was similar variability in the expressed τ under both D:D and L:L conditions. Note that among these four first significant periods, we observed in our whole data set (107 significant periods) only two periods in the circatidal range (10.4–14.4 h) in D:D and only one in L:L. Based on the above data, one must, therefore, conclude that a

circadian rhythm of valve activity does exist in the oyster *C. gigas*. Further, the fact that this rhythm immediately follows a phase shift suggests the existence of a weak circadian oscillator.

Existence of a Dual Circadian Rhythm

Importantly, comparison of series 1 with 7 in Figure 2 shows that oysters under 12 L:12 D conditions were nocturnal in series 1 and diurnal in series 7, 2 mo later. This raised the question about the progressive or abrupt

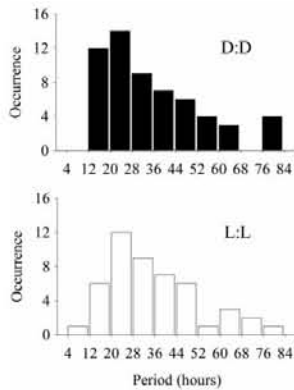


FIGURE 3. Free-running studies in the oyster *C. gigas* (same data as in Figure 2). Cumulative distribution of the first four significant periods in D:D and L:L (n=15 oysters). The most frequently observed period (τ) in both conditions lies in the circadian range of 20–28 h.

character of that change. To obtain more insight into this, we examined the transitory events. In series 5 (12 L:12 D), although the circadian profile shown in Figure 2A looks less obvious in comparison with all reference series (1, 3, and 7), chronobiological analyses showed a statistically significant circadian τ of $23.60 \pm .04$ h (Figure 2C), with high percent rhythm of the cosinor model. We extended the analysis in Figure 4. Two subgroups were distinguished according to the time the animals spent open during the day and night. An oyster was considered diurnal if mean hourly opening_{day} > mean hourly opening_{night} + 10%. The opposite calculation was used to determine which animals were nocturnal. For series 5, 8 oysters out of 15 presented diurnal behavior, whereas 6 oysters showed nocturnal activity and 1 oyster mixed behavior. The analysis shown in Figure 2 was then applied to these three subgroups. Clearly, the mean hourly opening (%) of the whole group, characterized by a circadian τ of 23.6 h (Figure 4A), consisted in fact of two superimposed circadian rhythms (compare Figure 4B and C, both with $\tau = 23.8$ h). In Figure 4B, oysters typically exhibit a diurnal pattern (compare with Figure 2, series 1), whereas in Figure 4C the pattern is nocturnal (compare with Figure 2, series 7). Finally, note the mean opening time did not differ among the subgroups: $22.6\% \pm 6.5\%$ for diurnal, $19.4\% \pm 6.6\%$ for nocturnal, and $18.7\% \pm 2.9\%$ for mixed oysters.

To go further, Figure 5A presents the progressive change in the mean hourly opening during photophase

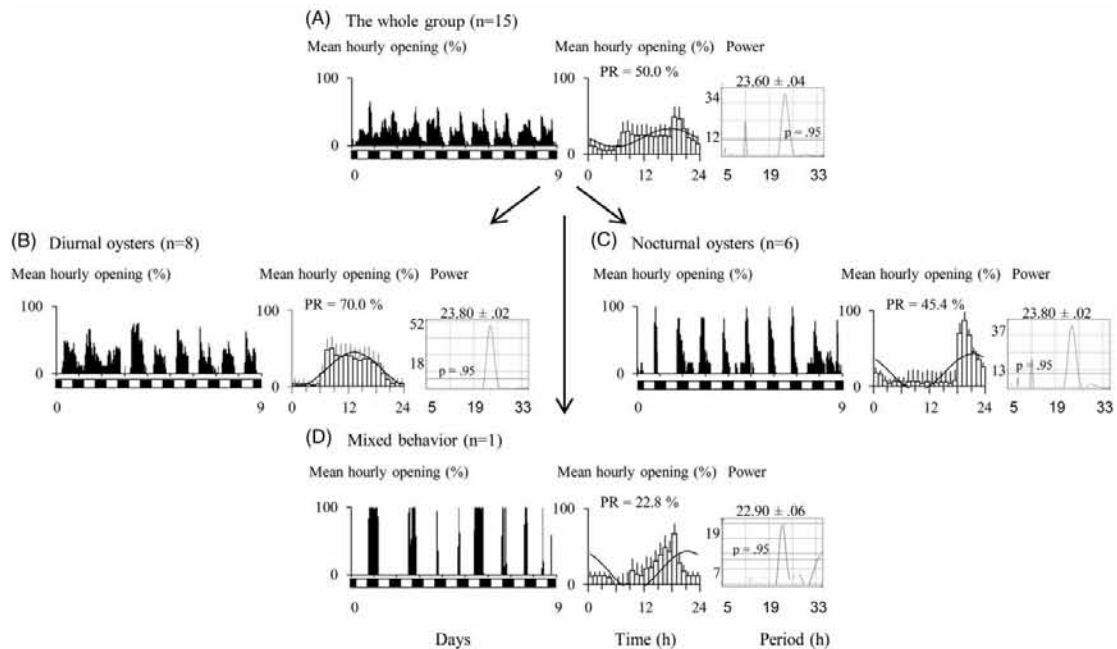


FIGURE 4. Subanalysis of series 5 (12 L:12 D) from Figure 2, late February to early March. (A) Whole group, (B) diurnal oysters, (C) nocturnal oysters, and (D) single oyster with mixed behavior. In each panel, from left to right: mean hourly opening (%) of the group; mean daily behavior (mean hourly opening \pm SEM) with its cosinor model curve (and percent rhythm [PR]); period (\pm SD) determined by spectral analysis (Lomb and Scargle periodogram).

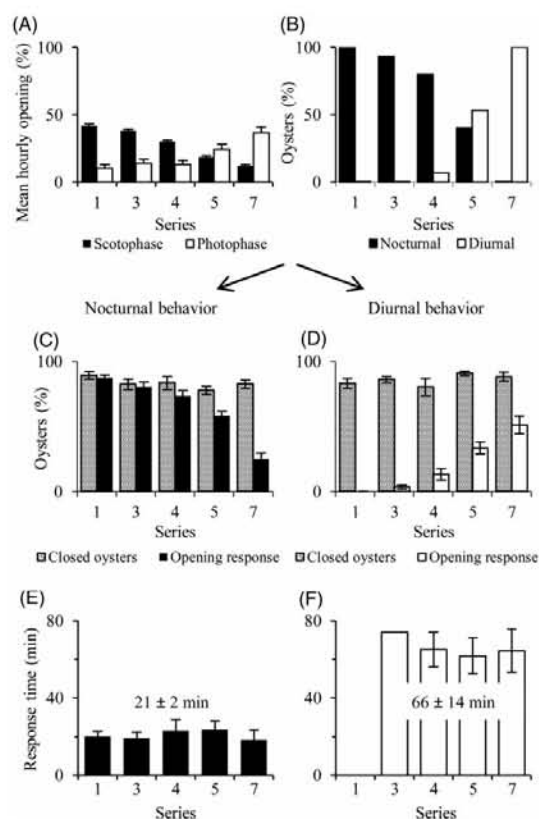


FIGURE 5. Progressive switch from nocturnal to diurnal circadian rhythm. The analysis focuses on L:D series exposed in Figure 2. (A) Mean hourly opening (%) of the group ($n=15$) during photophase and scotophase for each 12 L:12 D series. (B) Number of oysters presenting a diurnal or a nocturnal behavior for each series; an oyster was considered as diurnal if mean hourly opening_{day} > mean hourly opening_{night} + 10 %. Oysters (%) opening their valves at (C) lights-off and (D) at lights-on. Mean reaction time (min) per series: Inserts in (E) and (F): mean time responses. For series 1, 3, 4, 5, and 7, respectively, $n = 10, 10, 8, 9,$ and 9 d.

and scotophase throughout the five different 12 L:12 D series exposed in Figure 2. Although the total opening duration remained stable for all L:D series (21–26%), the majority of the opening activity moved progressively from scotophase to photophase. Figure 5B indicates that 100% of the oysters were nocturnal in series 1, but became 100% diurnal in series 7. This change of pattern is illustrated again by the progressive change of reactivity to lights-off and lights-on exhibited by all animals. Indeed, Figure 5C and D show that, independent of the series, the percentage of closed animals before the light switch remained constant, but the percentage of responses to lights-off decreased with time (from 88% to 25%), whereas the percentage response to lights-on increased (from 0% to 51%). Moreover, it is worth noting that the response time remained constant throughout the experimental series. It was 21 ± 2 min after lights-off (Figure 5E) and 66 ± 14 min after lights-on (Figure 5F).

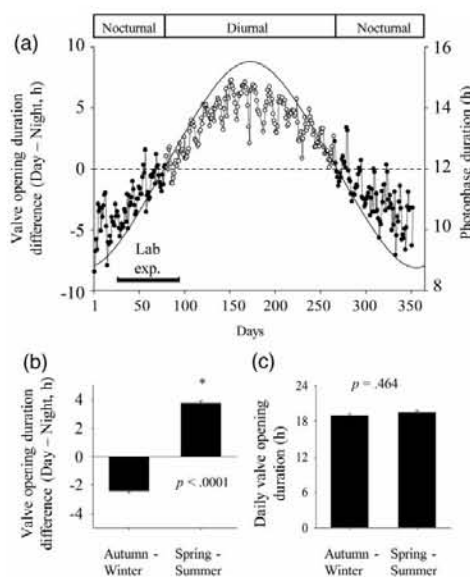


FIGURE 6. Day and night field behavior of valve opening in the oyster *Crassostrea gigas*. (A) Change of valve opening duration difference (day – night, h) in the Bay of Arcachon (France) during the entire year of 2007. Lab exp. = laboratory experiment. (B) Valve opening duration difference for the contrasted periods autumn-winter and spring-summer. (C) Comparison of the daily valve opening duration between autumn-winter and spring-summer. *C. gigas* is dual in the Bay of Arcachon.

Is this dual behavior an artifact of our experimental protocol or is it a natural feature? To test this hypothesis, we searched for the same behavior in a full-year record of oysters from the Bay of Arcachon, France (2007; Tran et al., 2011). As shown in Figure 6A, a similar dual behavior, in relation to the photoperiod, was exhibited by oysters in their natural environment. Although the daily valve opening duration did not differ between autumn-winter (scotophase > photophase) and spring-summer (photophase > scotophase; Figure 6B), oysters presented diurnal behavior in spring and summer and nocturnal behavior in autumn and winter (Figure 6C). The behavioral change was clearly progressive, and the distribution of data points compared with the photophase duration shows that the switches in the Bay of Arcachon were close to the spring and autumn equinoxes. Consequently, both the data obtained in the laboratory and in the field demonstrate the dual behavior of the circadian rhythm in the oyster *C. gigas*.

DISCUSSION

Existence of a Circadian Rhythm in *Crassostrea gigas*

The objective of this study was to determine if a circadian rhythm exists in the oyster *Crassostrea gigas* and to derive more insight into its characteristics. Indeed, Tran et al. (2011), following a 1-yr continuous valve-activity record in the Bay of Arcachon (North Atlantic Ocean, Western Europe), reported weak in situ expression of a daily rhythm compared with a strong circatidal component

in oysters. Here, we searched for the existence of a circadian clock in *C. gigas* under simplified, but well-controlled, laboratory conditions of different L:D regimes and without a tidal component (no current, no hydrostatic change). Our work clearly shows the existence of an endogenous, weak and dual, circadian clock in *C. gigas*. We did not observe any experimental support for the existence of an endogenous circatidal rhythm. These conclusions are based on four observations. First, under the 12 L:12 D entrainment regimes, both the group and the individuals exhibited clear cyclic valve activity, presenting a daily pattern (τ between 23.6 and 24.1 h). Second, the behavior under free-running conditions, considering the first four significant periods of individuals, showed that most periods were circadian, demonstrating that this characteristic is endogenous. Third, high variability among the period of the individual oysters, similar in D:D and in L:L, was observed. Fourth, the circadian rhythm was easily entrained: the animals immediately followed a 4-h phase advance and delay (Figures 1 and 2, series 3, 4, and 5).

Even if tidal rhythms have been widely reported as the major rhythm, circadian rhythms have also been mentioned in marine organisms. The reported observations are listed and summarized below in this paragraph. The worm *Nereis virens* expressed burrow emergence activity that could be either circatidal, circadian, or circalunidian, depending on entrainment conditions (Last et al., 2009). Together with a circatidal one, circadian rhythmicity has been described in the locomotor activity of the crab *Carcinus meanas* (Naylor, 2010; Reid & Naylor, 1989). The tropical labrid fish *Halichoeres chrysus* showed a daily locomotor activity rhythm in the laboratory, both under entrainment and free-running conditions (Gerkema et al., 2000). The fish *Takifugu obscurus* (8 to 12 mo of age) exhibited a circadian rhythm of instantaneous rise of oxygen consumption in constant darkness (Kim et al., 1997).

Although the above literature is scarce, the chronobiological literature for bivalves is even more scarce. It is mostly descriptive and/or based on a relatively small number of observations in terms of time series or number of individuals and, to our knowledge, no chronobiological study has been previously published on *C. gigas*. Bivalve reports include the following. The gaping activity of the Mediterranean molluscan bivalve *Pinna nobilis* exhibited both apparent circadian and circalunar cycles in situ, under permanent subtidal conditions (Garcia-March et al., 2008). Under laboratory conditions, valve activity of unfed immersed *Mytilus edulis* was found to display a weak circadian pattern in L:L (Ameyaw-Akumfi & Naylor, 1987). Robson et al. (2010) did refer to a daily cycle in animals exposed to natural light without tides. Wilson et al. (2005) reported nocturnal activity in gaping frequency in mussels transferred from laboratory to field conditions. Thus, to our knowledge, the present work is the first to demonstrate the

existence of a circadian rhythm of valve activity in a molluscan bivalve.

A weak circadian oscillator. Gwinner and Brandstätter (2001), working on bird rhythms, summarized the general principles of oscillatory theory for a weak oscillator. Specifically, reduced degree of self-sustainment of an oscillator implies (i) increased range of entrainment in the synchronized state, which also presents decreased resynchronization time after a zeitgeber phase shift; and (ii) damped or less stable rhythmicity under constant conditions (Aschoff, 1981; Klotter, 1960). Moreover, applying a phase shift in the L:D cycle and counting the number of transient cycles before resynchronization is currently used to evaluate the strength of the endogenous control of circadian rhythms (Aschoff, 1960). An example of the link between the ability of an organism to shift its phase and strong endogenous control of a rhythm is well known by travelers who cross several time zones rapidly. They experience a transient desynchrony between their endogenous circadian rhythm and their new environment. On average, in humans the resynchronization process requires ~ 1 d per time zone traversed (Haimov & Arendt, 1999; Kunz & Herrmann, 2000). Again, in aquatic animals, relatively few data are available, but the situation appears quite different. The only available data were obtained in fish. Specifically, it is known that the sea bass is able to shift immediately after a 12-h reversal of the LD cycle, indicating a rather weak circadian oscillator (Sánchez-Vázquez et al., 1995a). In the present work on oysters, a forward or backward shift of 4 h was immediately followed by the animals, without any transient desynchrony (Figure 2, series 3, 4, 5). We suggest that this constitutes major support for the hypothesis of a weak endogenous clock in *C. gigas*, as the number of transient cycles before resynchronization is zero. Is the absence of transient cycles before resynchronization a masking effect? This is unlikely, as there is no statistical difference in valve opening duration in D:D and L:L, whereas positive and negative masking effects are known to respectively enhance and decrease activity (Mrosovsky, 1999). A second indication favoring the weak oscillator hypothesis in *C. gigas* is the large distribution of τ under free-running conditions. As stated by Aschoff (1960), the accuracy of a circadian clock is measured by how precisely the clock keeps a circadian period under free-running conditions. The data shown in Figure 3 indicate that although a circadian range dominates, the distribution spread in τ ranges from 4 to 84 h in free-running conditions (D:D and L:L). Finally, actograms also point out the strong variability among individual oysters, which is another argument favoring the existence of a weak oscillator in *C. gigas*. Some individuals display strong rhythmic behavior, whereas others present very weak or even absent patterns of rhythmic behavior. For the latter, the oscillator may be exceptionally weak and their behavior might be mainly exogenously driven.

In terms of the ecologically relevant advantages of a weak oscillator, it is worth noting that the oyster *C. gigas* is a species found worldwide. Initially present in the Okhotsk sea, in Japan and Korea, it has been introduced to the North American Pacific coast from South Alaska to California, to Europe, and to Australia (Ruesink et al., 2005; Troost, 2010). A weak endogenous oscillator would certainly give plasticity to the oyster *C. gigas*, partly explaining its worldwide success and adaptability to various environments. Finally, this whole set of conclusions about the weakness of the oscillator is in agreement with Palmer (1995) and Naylor (2010), who considered tides to be less regular than day/night alternations in terms of period, tide amplitude, geographical location, and weather situations. Palmer (1995) proposed the selection pressure on the clock of marine organisms might, therefore, have been much less towards the acquisition of an accurate clock.

Existence of a Dual Circadian Rhythm

In the present work, we surprisingly observed that oysters were all nocturnal at the beginning of the laboratory experiment in January, but diurnal by the end of it in March, with a different activity pattern during each period. The shift was not abrupt, but progressive from series 1 to 7 (Figures 2, 4, and 5). A comparison with field data (Figure 6) revealed that the phenomenon does exist in situ, the animals being nocturnal in autumn and winter and diurnal in spring and summer. This, again, is a new and original observation in mollusk bivalves.

Is it only typical of C. gigas or is it part of a more general pattern? To our knowledge, only a few examples of either diurnal or nocturnal bivalves are alluded to in the literature, but without clear-cut evidence. *Pinna nobilis* has been reported to be diurnal, closing its valves at night (García-March et al., 2008). This is also the case for the giant clam *Hippopus hippopus* (Schwartzmann et al., 2011). The blue mussel *Mytilus edulis* is the opposite; it has been reported to be nocturnal (Robson et al., 2010; Wilson et al., 2005). The situation is better documented in fishes. Activity patterns include either strict diurnality or nocturnality or switches between these two behaviors, and the behaviors are often qualified as plastic (Reebs, 2002). Specifically, Sánchez-Vázquez et al. (1995a) reported a dual pattern of feeding activity in sea bass in the laboratory, with coexisting diurnal and nocturnal fish. The authors mentioned that flexibility of the circadian system is required to have this plasticity in phasing. This plasticity is even stronger in the goldfish *Carassius auratus*, whereas some fish appeared strictly diurnal or nocturnal in the laboratory, some night-active animals displayed day feeding and vice versa (Sánchez-Vázquez et al., 1996).

In fish, the main reasons for a switch are explained in terms of food availability, photoperiod, temperature, predation risk, and light intensity (Bolliet et al., 2001; Eriksson, 1973, 1978; Fraser et al., 1995; Reebs, 2002; Sánchez-Vázquez et al., 1995b, 1997). In oysters, only a series of

hypotheses can be proposed to explain the presently observed dual behavior. The Atlantic Ocean is characterized by semidiurnal tides, which means that two tides occur per day. Furthermore, variations in tidal height follow an annual cycle: in spring and summer daytime high tides are higher than nighttime ones, whereas in autumn and winter the opposite is true. However, in Arcachon, (i) differences in water height between the two high tides are small, ranging from 0% to 10% at Eyrac Pier; and (ii) the tidal pattern reverses on a regular basis. Thus, it seems very unlikely that this cycle could explain the statistical behavior patterns exhibited by oysters in the present work. An alternative explanation is that oysters are sessile filter-feeders that feed mainly on phytoplankton. In temperate regions, phytoplankton exhibit a seasonal cycle. After the winter period of lowest plankton abundance, spring is generally characterized by high abundance and by algal blooms. Blooms occur in summer and autumn as well (Cloern, 1996; Glé et al., 2010). Spring is also the beginning of the multiplication and maturation of gametes in oysters (Enriquez-Diaz et al., 2009; Marteil, 1976), and these annual changes are associated with annual change in metabolic demand (Tran et al., 2008). A strict maintenance of nocturnality, for example, would be counterproductive in terms of feeding purposes during the warm season. So, we suggest a link between dualism in *C. gigas*, food availability, gametogenesis, and metabolic demand. In oysters, the adaptive value of dualism could be a response to changes in energy needs at the circannual level.

Figure 6 shows that in *C. gigas* in the Bay of Arcachon, switches happened at the time of the spring and autumn equinoxes, when day and night are nearly the same length. It is remarkable to note that, both in the laboratory and in the field, the switches were nearly synchronous, even though in the laboratory the animals were disconnected from field conditions for 2 mo, exposed to a consistent 12 L:12 D regimen, except under free-running conditions. This suggests potential internal origin for this annual rhythm, as under laboratory conditions an ecologically relevant zeitgeber, if any, was unavailable. Thus, we may have observed the circannual clock operating in free-running conditions.

CONCLUSION

The present work demonstrates that a circadian rhythm exists in the oyster *C. gigas*, although an apparent circatidal rhythm dominates in the field (Tran et al., 2011). The rhythm is driven by a weak oscillator, allowing plastic behavior and dualism. Specifically, a circatidal rhythm in free-running conditions was not observed. This raises the question about the existence of a circatidal clock and gives new insights into the hypotheses previously proposed to account for biological rhythms in marine organisms (Enright, 1976; Naylor, 2010; Palmer, 1995, 2000; Webb, 1976; Williams, 1998).

Declaration of Interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

This work was supported by a ministerial scholarship to A.M. and the projects EC2CO-Cytrix and OSQUAR, Région Aquitaine.

REFERENCES

- Ameyaw-Akumfi C, Naylor E. (1987). Temporal patterns of shell-gape in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 95:237-242.
- Aschoff J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25:11-28.
- Aschoff J. (1981). *Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms*. Volume 4. New York: Plenum, 563.
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6:544-556.
- Bingham C, Arbogast B, Cornélissen G, Lee J-K, Halberg F. (1982). Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9:397-439.
- Bolliet V, Aranda A, Boujard T. (2001). Demand-feeding rhythm in rainbow trout and European catfish: synchronization by photoperiod and food availability. *Physiol. Behav.* 73:625-633.
- Box GEP, Jenkins GM, Reinsel GC. (1994). *Time series analysis: forecasting and control*. 3rd ed. New York: Prentice Hall, 598.
- Chambon C, Legeay A, Durrieu G, Gonzalez P, Ciret P, Massabuau J-C. (2007). Influence of the parasite worm *Polydora* sp. on the behavior of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. *Mar. Biol.* 152:329-338.
- Cloern JE. (1996). Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: a review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Rev. Geophys.* 34:127-168.
- Dunlap JC. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96:271-290.
- Enriquez-Diaz M, Pouvreau S, Chavez-Villalba J, Le Pennec M. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquacult. Int.* 17:491-506.
- Enright J. (1976). Resetting a tidal clock: a phase-response curve for *Excirolana*. In DeCoursey DJ (ed.). *Biological rhythms in the marine environment*. Columbia, SC: University of South Carolina Press, 103-114.
- Eriksson L-O. (1973). Spring inversion of the diel rhythm of locomotor activity in young sea-going brown trout, *Salmo trutta trutta* L., and atlantic salmo, *Salmo salar* L. *Aquilo Ser. Zool.* 14:68-79.
- Eriksson, L-O. (1978). Nocturnalism versus diurnalism; dualism within fish individuals. In Thorpe JE (ed.). *Rhythmic activity of fishes*. New York: Academic Press, 69-89.
- Fraser NHC, Metcalfe NB, Heggnes J, Thorpe JE. (1995). Low summer temperature cause juvenile Atlantic salmon to become nocturnal. *Can. J. Zool.* 73:446-451.
- García-March JR, Solsona MA, García-Carrascosa AM. (2008). Shell gaping behaviour of *Pinna nobilis* L., 1758: circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Mar. Biol.* 153:689-698.
- Gerkema MP, Videler JJ, de Wiljes J, van Lavieren H, Gerritsen H, Karel M. (2000). Photic entrainment of circadian activity patterns in the tropical labrid fish *Halichoeres chrysus*. *Chronobiol. Int.* 17:613-622.
- Glé C, Del Amo Y, Sautour B, Laborde P, Chardy P. (2008). Variability of nutrients and phytoplankton primary production in a shallow macrotidal coastal ecosystem (Arcachon Bay, France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76:642-656.
- Gouthière L, Mauvieux B. (2004). Étapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers, modélisation. XXXVème Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie, Université de Saint Etienne, France du 10 au 12 Juin 2003. *Quelques aspects sur la Chronobiologie*. Presses Universitaires de Saint Etienne 2004, 10.
- Gouthière L, Claustrat B, Brun J, Mauvieux B. (2005a). Complementary methodological steps in the analysis of rhythms: search of periods, modelling. Examples of plasma melatonin and temperature curves. *Pathol. Biol.* 53:285-289.
- Gouthière L, Mauvieux B, Davenne D, Waterhouse J. (2005b). Complementary methodology in the analysis of rhythmic data, using examples from a complex situation, the rhythmicity of temperature in night shift workers. *Biol. Rhythm Res.* 36:177-193.
- Granger CWJ, Hatanaka M. (1964). Spectral analysis of economic time series. Princeton, NJ: Princeton University Press, 299.
- Gwinner E, Brandstätter R. (2001). Complex bird clocks. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356:1801-1810.
- Haimov I, Arendt J. (1999). The prevention and treatment of jet lag. *Sleep Med. Rev.* 3:229-240.
- Halberg F. (1969). Chronobiology. *Annu Rev. Physiol.* 31:675-725.
- Hall JC. (1995). Trippings along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends Neurosci.* 18:230-240.
- Jenkins GM, Watts DG. (1968). *Spectral analysis and its applications*. San Francisco: Holden Day, 525.
- Kim WS, Kim JM, Yi SK, Huh HT. (1997). Endogenous circadian rhythm in the river puffer fish *Takifugu obscurus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 153:293-298.
- Kim WS, Huh, HT, Je JG, Han KN. (2003). Evidence of two-clock control of endogenous rhythm in the Washington clam, *Saxidomus purpuratus*. *Mar. Biol.* 142:305-309.
- Klotter K. (1960). General properties of oscillating systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25:185-187.
- Kunz D, Herrmann WM. (2000). Sleep-wake cycle, sleep-related disturbances, and sleep disorders: a chronobiological approach. *Comp. Psychiatry* 41:104-115.
- Last KS, Bailhache T, Kramer C, Kyriacou CP, Rosato E, Olive PJW. (2009). Tidal, daily, and lunar-day activity cycles in the marine Polychaete *Nereis virens*. *Chronobiol. Int.* 26:167-183.
- Marteil L. (1976). Shellfish culture in France. Part 2. Oyster and mussel biology. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit.* 40:149-346.
- Mrosovsky N. (1999). Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiol. Int.* 16:415-429.
- Naylor E. (2010). *Chronobiology of marine organisms*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 242.
- Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halber F. (1979). Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 6:305-323.
- Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:8660-8664.
- Palmer JD. (1995). *The biological rhythms and clocks of intertidal animals*. New York: Oxford University Press, 217.
- Palmer JD. (1997). Duelling hypotheses: circatidal versus circalunidian battle basics. *Chronobiol. Int.* 14:337-346.
- Palmer JD. (2000). The clocks controlling the tide-associated rhythms of intertidal animals. *BioEssays* 22:32-37.
- Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417:329-335.
- Pittendrigh CS. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55:17-54.
- Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y. (2010). Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol. Int.* 25:1911-1929.
- Rees SG. (2002). Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 12:349-371.
- Robson AA, Garcia de Leaniz C, Wilson RP, Halsey LG. (2010). Effect of anthropogenic feeding regimes on activity rhythms of laboratory mussels exposed to natural light. *Hydrobiologia* 655:197-204.

- Ruesink JL, Lenihan HS, Trimble AC, Heiman KW, Micheli F, Byers JE, Kay MC. (2005). Introduction of non-native oysters: ecosystem effects and restoration implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:643–89.
- Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S. (1995a). Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. *J. Biol. Rhythm* 10:256–266.
- Sánchez-Vázquez FJ, Zamora S, Madrid JA. (1995b). Light-dark and food restriction cycles in sea bass: effect of conflicting zeitgebers on demand-feeding rhythms. *Physiol. Behav.* 58: 705–714.
- Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Iigo M, Tabata M. (1996). Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol. Behav.* 60:665–674.
- Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Tabata M. (1997). Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J. Comp. Physiol. A* 181:121–132.
- Scargle JD. (1982). Studies in astronomical time series analysis. II. Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. *Astrophys. J.* 263:835–853.
- Schwartzmann C, Durrieu G, Sow M, Ciret P, Lazareth CE, Massabuau JC. (2011). In situ giant clam growth rate behavior in relation to temperature: a one-year coupled study of high-frequency noninvasive valvometry and sclerochronology. *Limnol. Oceanogr.* 56:1940–1951.
- Tran D, Ciret P, Ciutat A, Durrieu G, Massabuau, J-C. (2003). Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:116–122.
- Tran D, Massabuau JC, Vercelli C. (2008). Influence of sex and spawning status on oxygen consumption and blood oxygenation status in oysters *Crassostrea gigas* cultured in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Aquaculture* 277:58–65.
- Tran D, Nadau A, Durrieu G, Ciret P, Parisot JP, Massabuau J-C. (2011). Field chronobiology of a molluscan bivalve: how the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 28:307–317.
- Troost K. (2010). Causes and effects of a highly successful marine invasion: case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *J. Sea Res.* 64:145–165.
- Webb HM. (1976). Interactions of daily and tidal rhythms. In DeCoursey DJ (ed.). *Biological rhythms in the marine environment*. Columbia, SC: University of South Carolina Press, 129–135.
- Williams BG. (1998). The lack of circadian timing in two intertidal invertebrates and its significance in the circatidal/circalunidian debate. *Chronobiol. Int.* 15:205–218.
- Wilson R, Reuter P, Wahl M. (2005). Muscling in on mussels: new insights into bivalve behaviour using vertebrate remote-sensing technology. *Mar. Biol.* 147:1165–1172.
- Yerushalmi S, Green RM. (2009). Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecol. Lett.* 12:970–981.

3. Conclusions

L'expérience élaborée ici a permis de mettre en évidence l'existence d'un rythme circadien chez l'huître *C. gigas*. En effet, ces bivalves expriment un rythme journalier d'activité valvaire lorsqu'ils sont exposés à un régime lumineux L:D 12:12. Et, surtout, la période propre la plus fréquemment exprimée par les huîtres en conditions de libre cours, tant en obscurité constante qu'en lumière constante, se trouve dans l'intervalle 20-28h, soit l'intervalle circadien. Ce rythme circadien endogène apparaît toutefois être faible. Les animaux affichent effectivement une forte variabilité inter-individuelle en conditions constantes, et s'adaptent immédiatement, *i.e.* dès la première période, à un décalage de la photopériode de plus ou moins quatre heures en condition d'entraînement.

La robustesse d'un système désigne la persistance de la fonctionnalité de ce système malgré la survenue de perturbations internes ou environnementales (Bagheri et al., 2007 ; Stelling et al., 2004). Dans le cas d'une horloge, cela désigne sa capacité à maintenir une oscillation avec une période précise (Hogenesch et Herzog, 2011). L'entraînement désigne, lui, la synchronisation de l'horloge endogène à un rythme environnemental, résultant en une relation ou phase stable entre ces deux rythmes (Hastings, 2001). L'étude des propriétés générales des systèmes oscillants précise que la gamme d'entraînement du système en est une propriété intrinsèque, intimement et inversement liée à son degré de persistance. Plus l'oscillateur présente un degré de persistance élevé, plus sa gamme d'entraînement est faible (Klotter, 1960). Chez *C. gigas*, le rythme circadien persiste peu en conditions de libre cours, désignant donc une horloge sous-jacente faible mais possédant une large gamme d'entraînement. Cette horloge peut donc être qualifiée de plastique. Cette caractéristique nous apparaît écologiquement avantageuse pour l'huître, qui présente une aire de répartition large incluant l'Asie, l'Amérique du Nord, l'Europe et l'Australie. Un oscillateur faible permettrait de s'adapter aux conditions propres présentées par ces différents biotopes.

Le protocole expérimental mis en œuvre a également fourni des informations éthologiques inattendues : les huîtres présentent un comportement dual. Cela signifie qu'elles peuvent passer d'un comportement diurne à un comportement nocturne et vice versa. Les animaux étudiés au laboratoire étaient nocturnes en janvier - février, réagissant à l'extinction de la lumière et ouvrant leurs valves la nuit sans réagir à l'allumage de la lumière, et diurnes fin mars, réagissant cette fois à l'allumage de la lumière et ouvrant leurs coquilles le jour sans réagir à l'extinction. Le changement de comportement fut progressif à l'échelle de la population. Le temps de réponse était par ailleurs plus court pour une réaction à l'extinction qu'à l'allumage de la lumière. Si le système mis en place au laboratoire était artificiel,

fonctionnant en absence ou présence d'éclairage, la quantité de lumière est restée constante durant les phases photique et d'obscurité pendant toute la durée de l'expérience. Le système n'a donc pas varié. Cette modification de comportement provient donc de l'animal, dont l'état physiologique a évolué, et non du système expérimental, qui a uniquement permis de mettre en évidence un mécanisme.

La comparaison avec le comportement exprimé par les huîtres sur le terrain s'avère particulièrement intéressante. Les données enregistrées pendant un an montrent que les animaux sont plutôt nocturnes en automne et en hiver, ouvrant davantage leurs valves la nuit, et plutôt diurnes au printemps et en été, ouvrant davantage leurs coquilles le jour. Les modifications de comportement se produisent aux équinoxes. Nous ne pensons pas qu'il s'agisse d'un processus passif, lié à la durée du jour et de la nuit. En effet, si la nuit est plus courte que le jour en été, les huîtres ne sont pas ouvertes pendant toute la nuit et ont donc la possibilité de s'ouvrir davantage. L'inverse est également vrai en hiver. Par ailleurs, le changement de type de réponse au laboratoire, à l'allumage ou à l'extinction, souligne des modifications physiologiques sous-jacentes qui restent à étudier.

Ce comportement dual, avec un passage du diurnalisme au nocturnalisme, a été documenté chez les poissons (Erikson, 1978 ; Reeb, 2002 ; Sanchez-Vazquez et al., 1995a, 1995b, 1996) et associé à une notion de plasticité comportementale. Chez les mollusques gastéropodes, un rythme d'activité circannuel a été décrit pour l'escargot *Helix aspersa* en conditions constantes de photopériode (L :D 12 :12) telles que celles de nos conditions expérimentales. Les animaux sont surtout actifs d'avril à octobre et hibernent l'hiver (Bailey, 1981). Plutôt qu'un phénomène passif, nous proposons que ce rythme annuel chez *C. gigas* soit lié à la photopériode et résulte d'un compromis pour l'animal. Le cycle de reproduction de l'huître démarre effectivement par une phase de gamétogenèse lors du réchauffement printanier, gamétogenèse qui se poursuit jusqu'à l'été (Marteil, 1976). Parallèlement, des changements de demande métabolique sont associés au cycle reproducteur (Tran et al., 2008). L'été, la phase photique étant plus longue et la photosynthèse plus importante, être diurne permettrait à l'huître de se nourrir plus efficacement et de répondre à des besoins énergétiques plus importants. L'hiver, en revanche, il y a moins de nourriture. Le bénéfice résultant d'une ouverture de jour pour s'alimenter pourrait ne pas être suffisant par rapport aux inconvénients que cela entraîne, l'exposition aux ultraviolets par exemple. Il serait donc plus intéressant pour l'huître d'être nocturne, afin d'assurer la meilleure allocation des dépenses énergétiques dans le bilan prise de nourriture/dépense d'énergie. Le premier rôle attribué à l'horloge circadienne primitive est effectivement la protection contre les ultraviolets (Pittendrigh, 1993). Et l'horloge circadienne s'avère être un élément essentiel à la synchronisation du cycle annuel lié au photopériodisme (Song et al., 2010). Nous suggérons donc une relation entre le rythme dual, la disponibilité en nourriture, l'exposition aux UV, la gamétogenèse et les besoins métaboliques chez *C. gigas*.

Enfin, contrairement aux résultats rapportés par Tran et al. (2011) mentionnant un cycle tidal fort chez *C. gigas* in situ, les observations réalisées ici au laboratoire en conditions constantes n'ont pas permis d'appuyer l'existence d'un rythme circatidal endogène chez *C. gigas*. Ce rythme existe-t-il pour l'huître ? Cette question est abordée dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Un rythme circatidal chez *C. gigas* ?

1. Introduction

Le littoral est soumis à de multiples cycles environnementaux. Outre l'alternance jour/nuit, ce biotope subit également l'influence de plusieurs cycles lunaires, le cycle tidal occupant une place prépondérante (Tessmar-Raible et al., 2011). Il n'est dès lors pas étonnant que des rythmes circatidaux, ayant une période de 12.4 heures dans les zones de marée semi-diurne, et des cycles circalunidiens, de période 24.8 h, aient été largement décrits chez les espèces marines occupant la zone côtière (Naylor, 2010 ; Palmer, 1995a). Deux théories dominant largement la chronobiologie marine pour expliquer la genèse des rythmes de ces organismes (Wilcockson et Zhang, 2008). La première suggère l'existence de deux oscillateurs distincts, l'un circatidal et l'autre circadien. Le rythme observé proviendrait de la résultante de ces deux mécanismes (Naylor, 2010). La seconde hypothèse propose un système oscillant basé sur deux horloges circalunidiennes couplées en anti-phase. Chaque pic tidal serait ainsi contrôlé par sa propre horloge. Les horloges circadienne et circalunidienne étant proches et présentant des similitudes de fonctionnement, l'une aurait évolué à partir de l'autre (Palmer, 1995a).

Dans le chapitre 3, nous avons étudié et mis en évidence un rythme circadien d'activité valvaire chez l'huître *Crassostrea gigas*. Ce rythme a été caractérisé comme faible et dual. Cependant, les conditions de libre cours qui y ont été appliquées n'ont pas permis de mettre en évidence de rythme circatidal, alors que ce rythme est dominant sur le terrain (Tran et al., 2011). L'objet de ce chapitre considère donc la façon dont les huîtres répondent à l'influence des marées. Existe-t-il un rythme circatidal chez ces bivalves ? Si oui, comment se combine-t-il avec le rythme circadien ? Si non, qu'est-ce qui peut potentiellement générer le cycle tidal de comportement rapporté pour l'huître in situ ? Afin de répondre à ces questions, nous avons étudié le comportement d'huîtres tant au laboratoire que sur le terrain. Un groupe d'animaux a été exclusivement maintenu au laboratoire et soumis à différentes conditions d'entraînement et de libre cours. Les conditions d'entraînement consistaient en différentes combinaisons d'entraînement lumineux et / ou d'entraînement tidal. Pour l'entraînement tidal, nous avons utilisé la variation de vitesse du courant comme zeitgeber, sans variation de hauteur d'eau, créant un cycle tidal simulé (STC). En parallèle, un autre groupe d'huîtres a été étudié d'abord sur le terrain puis ramené au laboratoire pour être suivi en libre cours. Finalement, les entraînements d'un rythme de période circadienne par du courant et d'un rythme de période tidale par la lumière ont été testés pour évaluer la gamme d'entraînement potentielle de *C. gigas* en fonction des zeitgebers choisis.

2. Tracking the underlying clock mechanisms responsible for the circatidal behavior in the oyster *Crassostrea gigas*.

Audrey M. Mat¹, Jean-Charles Massabuau^{1,2}, Pierre Ciret^{1,2} and Damien Tran^{1,2*}.

¹Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France.

²CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France.

* to whom correspondence should be addressed.

Email: d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33(0)5 56 22 39 37

2.1 Abstract

Background: Valve activity rhythm of the oyster *Crassostrea gigas* is mainly driven by tides in the field, but in the lab only the presence of a circadian clock has been demonstrated. In this work we studied the mechanisms underlying the circatidal rhythm in *C. gigas* in an attempt to reconcile lab and field observations.

Methodology/Principal Findings: To address this question, the behavior of 36 oysters was studied using a High Frequency Non Invasive valvometer (i) during a 2.5 month period in the lab under different entrainment or free-running regimes and (ii) in the field. The results confirm the existence of a circadian clock in the oyster *C. gigas* and strongly suggest the absence of circatidal clock. This statement is based on two sets of results. First, under entrainment regimes (L:D 12:12 and simulated tidal cycles, STC), oysters exhibited both circadian and circatidal cycles. Second, the endogenous rhythm under free-running condition appeared to be circadian, both at group and individual levels. No experimental evidence could be found for the existence of an endogenous circatidal rhythm, even in animals rapidly transferred from the field where they expressed a clear tidal cycle. Moreover, a circatidal activity could be entrained by a light zeitgeber (L:D 6:6; no tidal zeitgeber). On the contrary, a circadian rhythm could be entrained by cyclic changes of water current i.e. a tidal zeitgeber. The contribution of these results to the debate concerning oscillators in marine organisms is discussed.

Conclusions/Significance: Our results suggest two possible hypotheses to explain tidal behavior in the oyster *C. gigas*: an exogenous hypothesis where tidal cues mask the circadian rhythm, driving a tidal activity, or an endogenous hypothesis where the circadian clock is sensitive to tidal zeitgebers allowing it to run at tidal frequency.

Keywords: tidal, marine bivalve, circadian clock, masking, endogenous oscillator, exogenous

2.2 Introduction

While the day and night alternation is the major driver for biological rhythms in terrestrial organisms [1], rhythmic behavior of marine organisms has been reported to be also strongly linked to tides, lunar and semilunar cycles [2,3]. In numerous marine organisms, different components of tides have been reported to be tidal synchronizers [4]. These tidal cues are: salinity, temperature, hydrostatic pressure, water depth cycles, cycles of immersion and exposure to air, turbulence cycles which simulate wave action and food pulses [5-12].

Three main hypotheses have been put forth to explain circatidal rhythms [13]. The first is that marine organisms possess two separate internal clocks, a circadian and a circatidal, each unimodal [14,15]. The second suggests the existence of two independent circalunidian unimodal clocks, coupled in antiphase [16,17]. The third, given by Enright [18], suggests that a single bimodal clock governs both circadian and circatidal rhythmicities.

In the pacific oyster *Crassostrea gigas*, Tran et al. [19] studied a one year continuous valve-activity record in the Bay of Arcachon (France) and reported that rhythmic behavior was strongly related to a complex association of solar and lunar cycles. The valve activity of these animals, permanently kept in subtidal conditions, was shown to be principally driven by the tidal cycle. Interestingly, the light:dark cycle appeared as a significant synchronizer although its power was noticeably weak compared to the tides. In a previous study, Mat et al. [20] manipulated solely L:D regimes under laboratory conditions and showed the existence of a circadian rhythm in *Crassostrea gigas*, sustained by a weak and plastic clock. No evidence of a circatidal rhythm was observed. How can one reconcile the observation of circatidal activity in the field and its absence in the laboratory under free-running conditions?

We address that question in the present study, performed under simplified but well controlled conditions in the lab. Specifically, we recorded the valve activity of *C. gigas* while we manipulated light:dark regimes and simulated tidal cycles to track the potential existence of a circatidal rhythm and characterize the corresponding endogenous oscillator. The present data confirm the presence of a weak circadian clock and strongly suggest the absence of a circatidal oscillator. We propose two hypotheses to explain tidal patterns in the absence of a circatidal clock in the oyster *C. gigas*: either a masking effect of tidal cues or a circadian clock running at tidal frequency.

2.3 Material and methods

General conditions

The experiment was conducted on 36 Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793; 49 ± 1 g fresh weight + shell; 85 ± 1 mm shell length; mean \pm SE) from the Bay of Arcachon, France. Analyses were performed in the Marine Station of Arcachon, from February through April 2011 on 31 oysters and in the Bay of Arcachon (Eyrac pier, in front of the Marine Station) on 5 oysters from late February through mid-March 2011.

In the laboratory, animals were exposed in a 350 L flume (external diameter, 2 m; internal diameter, 1 m; depth, 0.15 m) to varying photoperiods (irradiance $26 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ during the photophase and $1 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ during the scotophase, Biospherical Instruments Inc. San Diego CA USA ; neon light MASTER TL-D Xtra 36W/865 1SL, Philips, France) with or without a water current regime mimicking natural tidal cycles. The flume was isolated from external vibrations using anti-vibrating structures and placed in an isolated blind room to minimize external disturbances that could interfere with the spontaneous behavior of the animals. Water was air-equilibrated using aquarium bubblers. Oysters were continuously provided with seawater (flow = $700 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) of stable composition ($18,5 \pm 1,1$ °C; $[\text{chl}a] = 0,19 \pm 0,13 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; mean \pm SD; pH = $8,0 \pm 0,1$; salinity $30,7 \pm 0,3$ ‰; mean \pm SE). Chlorophyll a and temperature were automatically measured every 5 min, with a 10 AU-005 Fluorimeter (Turner Designs, Sunnyvale California) and an electronic thermometer respectively. pH and salinity were regularly measured by hand with a R301 pH controller (Consort, Belgium) and a Cond 330I conductivity probe (WTW, Germany).

In the field, analyses were run on a group of oysters maintained under Eyrac pier, in front of the Marine Station, with the technology described in Tran et al. [19].

All research presented here complied with French laws and was performed in conformity with institutional guidelines.

Tidal entrainment

We tested water current as a potential zeitgeber for tidal entrainment, without variation of water level. Water current was generated in a flume by a multiple plate axis entrained by a motoreductor (MDP, France). The speed was regulated with a numerical card FIRST-DC-1C (MDP, France) controlled by Labview (National Instrument). Water current oscillated at a constant water level alternatively in clockwise and counterclockwise directions following a sinusoidal curve. This generated simulated tidal cycles (STC). The period of slack water is detailed for each condition. For example, STC 12.4 means that in that condition slack water occurs every 12.4 h. Maximum water velocity was $\pm 30 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ measured 12 cm above the bottom (Nortek Doppler Velocimeter, Nortek AS, Norway). These values are representative of periods and speeds occurring *in situ*: the North Atlantic Ocean is characterized by semi-

diurnal tide cycles (12.4 h) and a maximum water current of $60 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ has been reported at the surface and $0 - 15 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ on the bottom at Eyrac pier in front of the Marine Station of Arcachon [21].

Acclimation conditions and experimental periods for the different groups

The 36 oysters were divided in 3 groups. Group L, for Laboratory acclimated, was composed of 16 animals brought to the lab in early January, kept for 1 month in running sea water (L:D 12:12; no tidal cycle i.e. STC 0), equipped with activity electrodes and then permanently maintained in the flume described above from February to late April. Group F, for Field acclimated, was composed of 15 animals belonging to the same initial batch as group L. They were equipped with activity electrodes, brought back to the field from 22 February to 17 March (24 days in a permanently immersed oyster bag bound to a concrete slab under Eyrac Pier, 150 m in front of the laboratory), rapidly transferred into the experimental flume on 17 March (1st day of free-running condition, D:D + STC 0) and then studied next to group L from 17 March to late April. The total transfer time from field to lab was 2 h before recording started. The last group, Field 2011, was composed of 5 animals, chronically equipped with activity electrodes since June 2010 and studied since that time in the field. They were located 1 - 2 m from group F under the Eyrac pier. Their activity was specifically analyzed from 22 February to 17 March 2011 to provide a statistically representative insight into the field behavior and rhythms of group F during its field acclimation period.

Experimental conditions

The experimental protocol consisted of 6 different series, each characterized by a specific photoperiod, with or without simulated tidal cycles at two different periods: L:D 12:12 + STC 12.4 (series 1, 10 days); D:D + STC 12.4 (series 2, 10 days); L:D 12:12 + STC 12.4 (series 3, 9 days); free-running D:D + STC 0 (series 4L and 4F, 15 days); L:D 6:6 + STC 0 (series 5L and 5F, 7 days) and D:D + STC 24 (series 6L and 6F, 9 days).

***Crassostrea gigas* behavior measurement**

Valve activity of the oysters was measured using HFNI (High Frequency – Non Invasive) valvometry which allows oysters to freely move their valves without experimental constraint [22]. Lightweight electromagnets (0.1 g) are glued on each valve of each animal. These electrodes are connected by flexible wires to a lab or field valvometer. The measure is an application of Maxwell's law:

$$\mathcal{E} = -N \cdot \frac{\partial \phi_B}{\partial t}$$

Where \mathcal{E} is the electromotive force (volts), N the number of turns in the coil, $\partial \phi_B$ the magnetic flow (Webber) and t the time. Detailed basic principles are developed in Tran et al.

[22] and Chambon et al. [23]. The sampling frequency of each individual was 0.2 Hz in the lab and 0.6 Hz in the field. Data were processed using Labview (National Instrument).

The lab study focused on the endpoints of mean hourly opening of each individual and of the group, that is the time oysters spent open each hour. Mean hourly opening is 100 % for an oyster open all the time during one hour. It is 0% for an animal which never opens its valves during one hour. All possible intermediary stages exist.

Data analysis

Chronobiological analyses were performed using the software Time Series Analysis Serial Cosinor 6.3. Several different steps were performed: first to verify the quality of the data, second to determine the periodicity of oyster behavior, if any, and finally to model the potential rhythm [24-26].

Quality of the data set. The absence of randomness in the data set was controlled using the autocorrelation diagram and the absence of a stationary character was checked by a Partial Autocorrelation Function (PACF) calculation [27]. These checks indicated a real biological or physical phenomenon.

Search for periodicity. As suggested by Gouthière & Mauvieux [24] and Gouthière et al. [25,26], different methods were used to determine the period in the equispaced data: the Lomb and Scargle periodogram [28], the elliptic inverse spectral plot based on the surface of the confidence ellipse [29,30], the autoperiodogram and autospectral plot of Jenkins and Watts [31] and the Fourier periodogram. Importantly, these different methods always gave identical periods at the first decimal. To be accepted, a period needed to be significant with the Lomb and Scargle periodogram ($p = 0.95$). The confidence interval of the given period was specified by the method of Halberg [32].

Modeling and statistical validation. The rhythmicity was then modeled with the Cosinor model, which uses a cosine function calculated by regression [29,30]. For a given period, the model is written as: $Y(t) = A \cdot \cos(2\pi t/\tau + \varphi) + M + \epsilon(t)$ where A is the amplitude, φ the acrophase, τ the period, M the mesor and ϵ the relative error [24,25]. Complex demodulation amplitude and phase plots [33] were constructed to check that amplitude and phase remained constant over time. In general, the data presented an amplitude constant in time, but not a phase. This result shows that there are still complex phenomena that we cannot control, as has already been reported for other biological data [24-26]. Two key tests were absolutely crucial to validate the model calculated and the existence of a rhythm: the elliptic test [29] must be rejected and the probability for the null amplitude hypothesis must be lower than 0.05. When we mention a rhythm it implies that these 2 tests have been fulfilled. Two chronobiometric parameters were evaluated: the percent rhythm – which is the percentage of the cyclic behavior explained by the model – and the percent error.

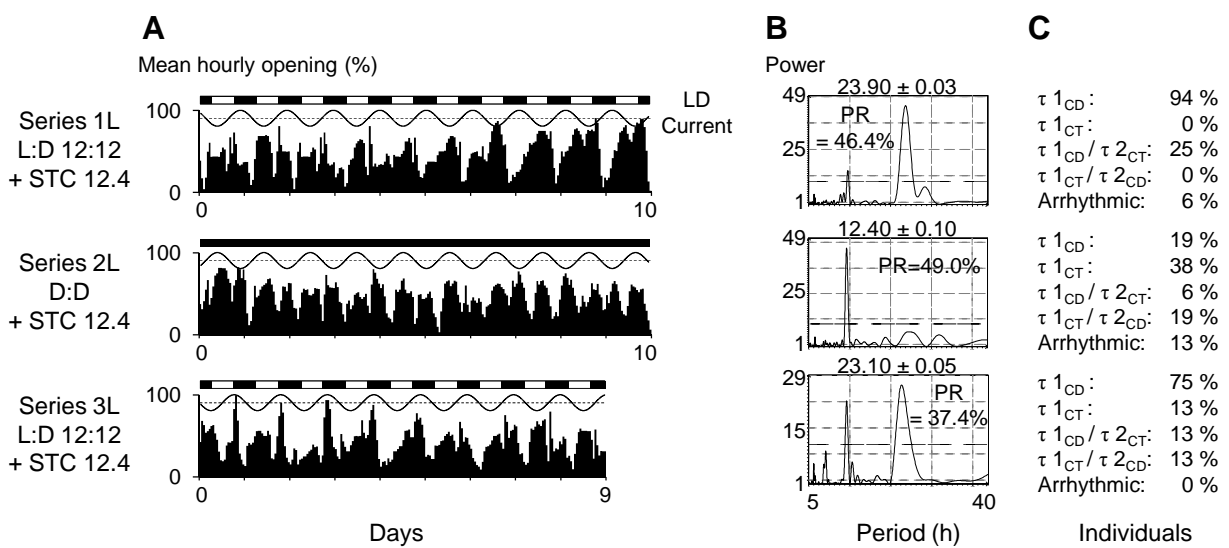


Figure 1: Oysters expressed circatidal and circadian cycles under entrainment. (A) Mean hourly opening (%) of a group of 16 oysters *C. gigas* under L:D and simulated tidal cycles, STC. Black and white rectangles represent the photoperiod and the sinusoidal curve the STC. (B) The period τ of the group (\pm sd) is determined by spectral analysis (Lomb and Scargle periodogram; dashed line for p -value at 0.05). Insert, the Percent Rhythm (PR) of the Cosinor model. (C) Characterization of individual periods τ (CD: circadian, CT: circatidal).

Rhythms of different periods might be superimposed in the studied data. To be consistent, these peaks have to be considered. For one given period and at a chosen probability ($p = 0.05$), secondary periodicities were explored by replacing the current data set by the residues of the Cosinor calculated. Then, the analytical protocol is again applied: quality of data, search for periodicity, modeling. If under entrainment regime studying 2 periods is generally sufficient, analyses for free-running conditions require deeper investigations. Indeed, lability and variability are characteristic in marine organisms [16]. In free-running, we considered, if existing, the first four significant periods of each individual, i.e. for each animal we had from 0 to 4 significant periods.

Results are presented as means \pm 1SE. For all statistical tests, significance was considered to be reached at $p < 0.05$.

2.4 Results

Analyses during entrainment regimes conducted on oysters acclimated under lab conditions – group L – are presented in Fig. 1. From left to right, the figure shows the mean hourly opening as a function of time (Fig. 1A) with the experimental regime on top (L:D or D:D and STC values), the corresponding periodogram of Lomb and Scargle (Fig. 1B) and the characterization of first and second periods of all individuals (Fig. 1C ; τ , period ; CD, circadian; CT, circatidal). This figure shows that under entrainment regimes in the lab, both circadian and circatidal cycles were expressed. However, under conditions including L:D 12:12 + STC 12.4 (series 1 and 3), the circadian rhythm dominated. Indeed, the periodograms reveal a period of 23.9 and 23.1 h in series 1 and 3 respectively (Fig. 1B) and percent rhythms indicate that the circadian pattern explained 46 and 37 % of the behavior expressed by the oysters in each of these periods, respectively. Spectral analyses were also conducted for each individual (Fig. 1C). For the condition L:D 12:12 + STC 12.4, the figure shows the coexistence of circadian and circatidal cycles in entrained oysters. In series 1, 94 % of the 16 animals expressed a primary circadian period; 25% expressed a primary circadian period with a secondary circatidal period. No oyster presented a primary period in the circatidal range (10.4 – 14.4 h). In series 3, 75 and 13% of the animals exhibited a primary period which was circadian or circatidal respectively and 13 % presented a first circadian period plus a second circatidal one. Importantly, when oysters exhibited a first circatidal period, they also exhibited a second circadian period. We next studied the specific impact of tidal currents. In oysters exposed to a water current regime mimicking in situ tidal cycles (series 2: D:D + STC 12.4), the tidal period became largely dominant. As indicated by the periodogram analysis (Fig. 1B), the period of the group was effectively 12.4 h, with a percent rhythm of 49%. Interestingly, spectral analyses on individuals (Fig. 1C) show that 38 % of the oysters expressed a first circatidal cycle, while 19 % still remained circadian. Secondary circadian and circatidal periods did again occur. Note finally that during these 3 series in which a permanently cyclic

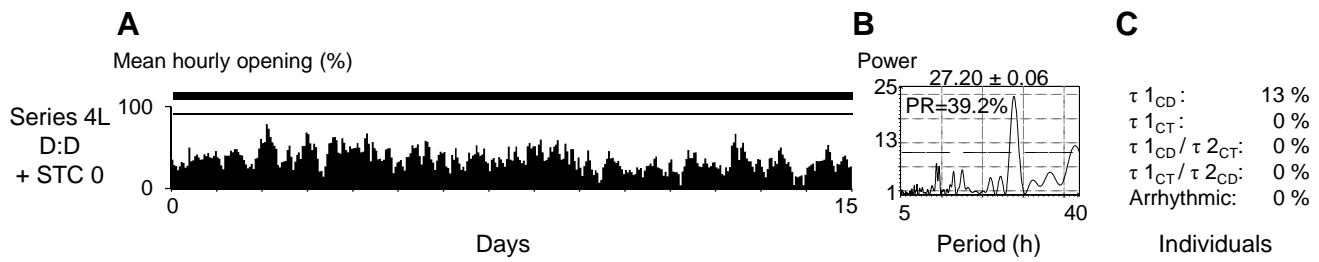


Figure 2: Only circadian rhythm is expressed at group and individual levels under free-running condition. (A) Mean hourly opening (%) of the group of 16 oysters *C. gigas* under free-running condition. From top to bottom, the thick black line stands for the D:D condition and the thin black line below for STC 0 (no simulated tidal cycles). (B) The period τ of the group (\pm sd) is determined by spectral analysis (Lomb and Scargle periodogram; dashed line for p -value at 0.05). Insert, the Percent Rhythm (PR) of the Cosinor model. (C) Characterization of individual periods τ (CD: circadian, CT: circatidal).

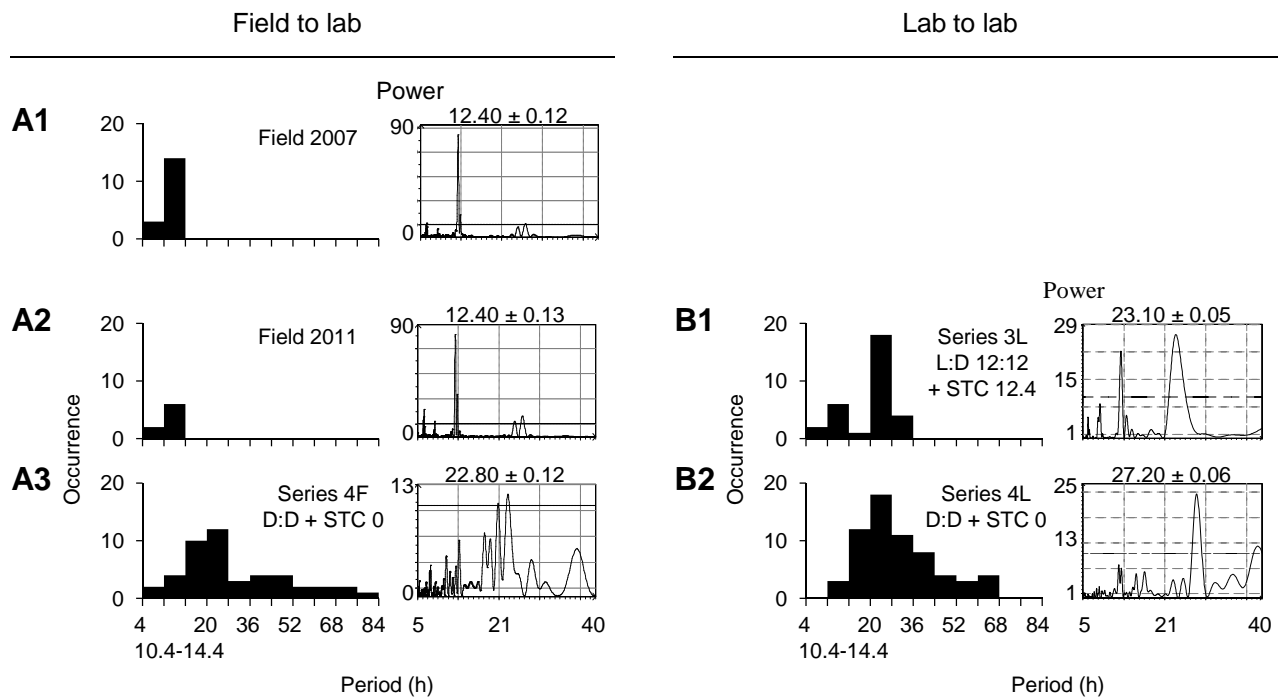


Figure 3: Free-running oysters express circadian rhythm whatever previous patterns, circatidal one (field) or circadian one (lab). Cumulative distribution of the 4 first significant periods (individual level) and periodograms of Lomb and Scargle (group level; dashed line for p -value at 0.05). (A) From field to lab; (A1) in 2007 (Eyrac, 22/02-17/03/2007, $n = 16$ oysters); (A2) during the acclimation period in the field in 2011 (Eyrac, 22/02-17/03/2011, $n = 5$ oysters); (A3) under free-running condition (series 4F, from field to lab, $n = 15$ oysters). (B) In the lab ($n = 16$ oysters); (B1) under the previous entrainment regime (series 3L, L:D + STC 12.4); (B2) under free-running condition (series 4L).

water current regime was imposed, the mean hourly opening duration was 48 ± 12 %, 48 ± 12 % and 43 ± 12 % for series 1, 2 and 3, independent of the light regime ($p > 0.05$).

In order to get more insights into the potential underlying oscillator, a free-running condition was then imposed (D:D + STC 0). Figure 2 presents again from left to right, the mean hourly opening as a function of time (15 days, Fig. 2A), the corresponding periodogram of Lomb and Scargle (Fig. 2B) and the characterization of first and second periods of all individuals (Fig. 2C). Importantly, oysters that were in the lab for 8 weeks expressed a circadian rhythm in free-running condition. The period for the group was 27.20 ± 0.06 h (percent rhythm, PR = 39%). At the individual level, 13 % of the oysters expressed a first period in the circadian range, while none presented a circatidal one and none were arrhythmic. This was the first observation to suggest a circadian clock in *C. gigas*. Note that 87 % exhibited a 1st period which was neither circadian nor circatidal. This is associated to a high variability in *C. gigas* with periods ranging from 4 to 84h as already observed in Mat et al [20], some of these periods matching circadian harmonics. To deepen our investigations, we analyzed the first four significant periods of each individual (see Fig. 3). Finally note that under this free-running condition (D:D + STC 0), the mean hourly opening duration was 27 ± 11 %, with a significant difference when compared to series 1, 2 and 3 (43-48 %, $p < 0.001$).

In the field, oysters have been reported to mainly express a circatidal cycle [19]. To further test the endogenous character of that circatidal rhythmicity, we studied oysters in the field and directly after transfer from field to free-running conditions (D:D + STC 0) in the laboratory. Fig. 3A1 first shows the reference distribution of the first four individual periods that were occurring in the Tran et al. report ([19]; field data, $n = 15$ oysters) during the same months as in the present field acclimation period (22/02 – 17/03/2007 and 22/02 – 17/03/2011). Clearly, the cycle was tidal in the field, with no circadian component at all. The spectral analysis reveals a period of 12.40 ± 0.12 h at the group level (Fig. 3A1). This field rhythmicity observed in 2007 is confirmed in Fig. 3A2 which presents field data for the same period in 2011 ($n = 5$, Field 2011). The rhythm was again clearly circatidal, as demonstrated at both individual and group levels. Figure 3A3 presents the rhythm exhibited by the group of 15 *C. gigas* (that were next to the group Field 2011 described in Fig. 3A2), studied immediately after the transfer from field to free-running lab conditions (series 4F, D:D + STC 0, 15 days of exposure). It is worth noting that the most frequently observed period fell between 20-28 h, the circadian range. At the group level, the spectral analysis indicated a significant period of 22.80 ± 0.12 h although the rhythm was not significant using the Cosinor model. Note that an analysis performed on data from the 4 first days following the transfer already revealed the expression of a circadian rhythm (data not shown). Fig. 3B1 and B2 show the comparison with data from Figs. 1 and 2; that is oysters held in the lab for 7 weeks under entrainment (series 3L: L:D 12:12 + STC 12.4) and then exposed to free-running condition (series 4L: D:D + STC 0; Fig. 3B2). Fig. 3B1 reiterates that under entrainment, oysters kept in the lab

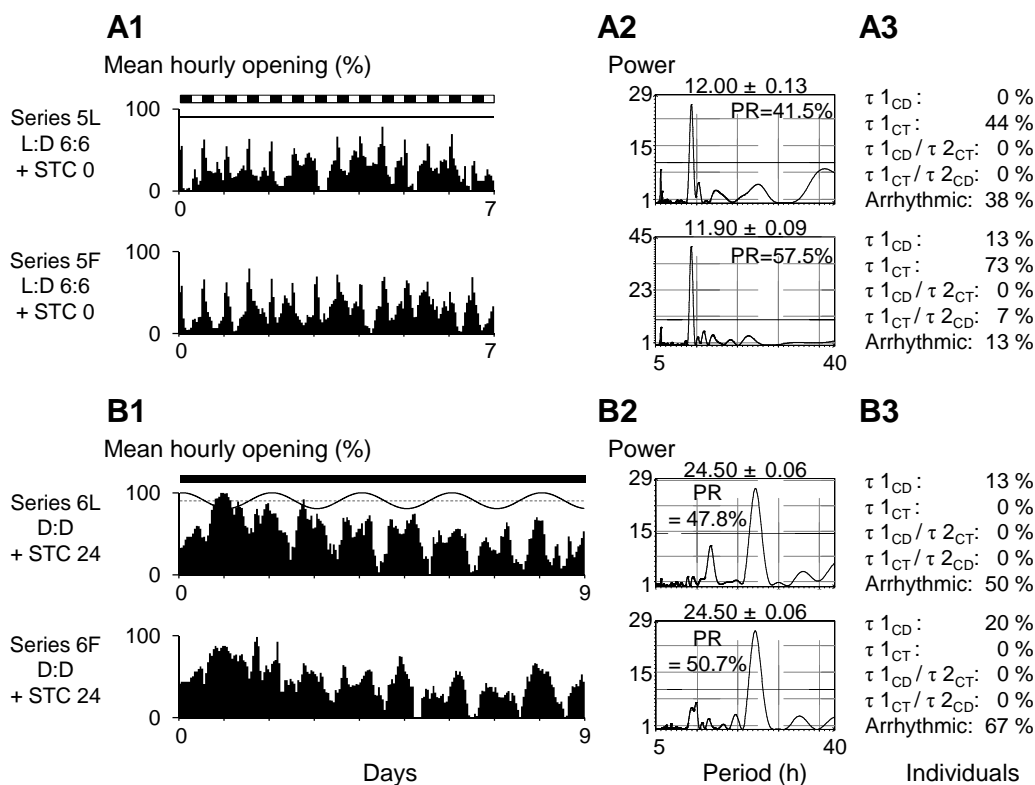


Figure 4: Entrainment of circatidal rhythm by light dark regime (A) and circadian rhythm by STC (B). In series 5, L:D regime is applied with a period of 12 h. In series 6, STC (simulated tidal cycles) is applied with a period of 24 h. (A1, B1) Mean hourly opening (%) of 2 groups of oysters either kept in the lab (L; n = 16) or transferred from field to lab (F; n = 15) under entrainment regimes. Black and white rectangles represent the photoperiod and the curve the STC. (A2, B2) The period τ of the group (\pm sd) is determined by spectral analysis (Lomb and Scargle periodogram; dashed line for p-value at 0.05). The Percent Rhythm (PR) of the Cosinor model is given. (A3, B3) Characterization of individual periods τ (CD: circadian, CT: circatidal).

express both circadian and circatidal rhythmicities. Then, Fig. 3B2 demonstrates that in free-running individuals, the most frequently observed period is circadian. Note that the distributions exhibit the same variability among individual periods in Figs. 3A3 and B2 (field to lab and lab to lab). Finally, based on the analysis of these 31 animals that expressed 109 periods (first four significant periods per individual, Figs. 3A3 and B2) only 7 periods fell in the range 10.4 – 14.4 h. Six of these were secondary, tertiary or quaternary periods and could be harmonics.

Is it possible to entrain a circatidal cycle with light and a circadian one with STC in oysters? To answer these questions, the two oyster groups above (L and F) were first exposed to a L:D 6:6 + STC 0 regime (Fig. 4, series 5) and second to a D:D + STC 24 regime (Fig. 4, series 6). The L:D 6:6 regime was chosen for technical reasons as it is close enough to a tidal pattern. Figures 4A1, 2 and 3 show that a circatidal cycle can indeed be entrained with a L:D regime, at periods of 12 and 11.9 h for the L and F groups respectively. In the L group, 44 % exhibited a first period in the circatidal range compared with 73 % in the F group. In the F group, 13 % of the oysters presented a first period which was circadian. Now, Figure 4B1, 2 and 3 show that oysters can present a circadian cycle under D:D conditions while entrained by STC 24. Both the L and F groups overall presented a period of 24.5 h; additionally, 13 and 20 % of individuals expressed a first circadian period without any animal expressing a circatidal period. The mean opening duration was stable in each series: in series 5, it was 29 ± 11 % and 31 ± 12 % for groups L and F respectively ($p = 0.274$); in series 6 it was 44 ± 12 % and 50 ± 13 % for groups L and F respectively ($p = 0.056$). Note that free-running (series 4L) and L:D 6:6 + STC 0 (series 5L) conditions were not different ($p = 0.471$) while there was a significant difference ($p < 0.001$) between free-running and D:D + STC 24 conditions (series 6L).

2.5 Discussion

The objective of this work was to get more insight into endogenous oscillator(s) in the oyster *Crassostrea gigas*. Our starting point was that Tran et al. [19], analyzing oyster behavior for the entire year of 2007 in the Bay of Arcachon (North Atlantic Ocean, France), reported that, *in situ*, permanently immersed oysters expressed a strong tidal cycle of valve activity with a weak daily rhythm. In contrast, in the lab, Mat et al. [20] manipulated L:D regimes (without any water current) and demonstrated the existence of a circadian clock in *C. gigas*. In the present study, we intended to analyze the mechanism underlying the expression of the circatidal activity expressed in the field. Our work confirms the existence of a circadian clock in *C. gigas* and clearly suggests the absence of circatidal clock. Indeed, under entrainment regimes (L:D 12:12 + STC 12.4 h; Fig. 1), both circadian and tidal cycles were expressed while under free-running condition, the endogenous rhythm was circadian (Figs. 2 and 3). This conclusion is reinforced by two observations. First, the exclusive expression of a

circadian rhythm in free-running oysters following a transfer from the field - where they were exclusively expressing a circatidal activity - was immediate or nearly immediate. Second, a circatidal cycle can be entrained by a L:D regime (L:D 6:6 + STC 0, Fig. 4A) and a circadian one by STC (D:D + STC 24, Fig. 4B).

This study confirms the existence of an endogenous circadian rhythm in C. gigas. In free-running condition, the average group period in the lab is 27.2 h. And when considering the first four significant periods of individuals, the most frequently observed period fell between 20-28h. Remarkably, the distributions were similar independent of (i) the previous entrainment conditions imposed either in the lab or in the field, and (ii) the previously expressed patterns, a circadian and circatidal rhythm in the lab or a circatidal one in the field. Note also that these distributions are similar to those presented in Mat et al. [20], which showed a high variability among individual periods, ranging from 4 to 84 h. That variability underlines the weakness of the clock, as previously reported for marine invertebrates [16]. Thus the above data set strongly supports the hypothesis of a weak and plastic circadian oscillator in *C. gigas*, extending the previous conclusions by Mat et al. [20].

Circatidal rhythm alone and circatidal plus circadian rhythmicity were reported in marine organisms. In marine bivalves, there are only a few reports on chronobiology. To our knowledge, for tidal rhythmicity, one can cite the clam *Austrovenus stutchburyi*, which in the lab exhibited a tidal pattern when exposed to tidal pulses of algae; this was reported to be driven by a low persistent internal mechanism [12]. Also, the cockle *Chione stutchburyi*, which under constant laboratory conditions was reported to express endogenous circatidal rhythmicity in shell gaping and siphon extension [34]. In addition, numerous works have reported correlations between various physiological functions and tidal rhythmicity. One can mention shell growth *in situ* in the subtidal clam *Ruditapes philippinarum* [35] and in the intertidal oyster *C. gigas* [36]. The digestive style of *C. gigas* also undergoes a series of synchronized changes related to the tidal cycle [37]. Finally, valve aperture in the blue mussel *Mytilus edulis* presented, in the field, a strong correlation with tidal changes in the concentration of chlorophyll a [38]. Circatidal rhythmicity is also a common feature in other marine organisms such as arthropods [7,39,40] annelids [41] and fishes [42].

The common occurrence of circatidal and circadian rhythms has also often been mentioned. In free-running condition (D:D, no tidal cue), the oxygen consumption rate of the clam *Ruditapes philippinarum*, after acclimation in the lab (L:D), was reported to express a circadian rhythm during the first few days and then a circatidal rhythm [43]. On the contrary, freshly collected Washington clams, *Saxidomus purpuratus*, in free-running condition (D:D) followed a period of 12.4 h for the first 7 days and then one of 25.4 h [13]. The burrow emergence activity of the worm *Nereis virens* was reported to be either circatidal, circadian or circalunidian depending on the entrainment lab conditions [41]. Freshly captured crabs,

Liocarcinus holsatus, were reported to express in the lab a free-running locomotor activity rhythm (D:D) which was circatidal when animals came from an intertidal zone and rather circadian when they originated from a sublittoral zone. After entrainment by tidal pressure cycles, they expressed both circatidal and circadian rhythmicities. A different species, *L. depurator*, a subtidal crab under the same experimental conditions, exhibited solely a circadian periodicity [5]. Finally, the crab *C. maenas* expresses both circadian and circatidal locomotor activity rhythms in summer when it occupies the intertidal zone whereas it reverts mainly to circadian rhythmicity in winter when it mainly lives in subtidal conditions [15].

What about the underlying mechanisms for an apparent tidal rhythmicity in Crassostrea gigas? Two strategies can be considered to explain tidal rhythmicity in oysters in the field: an exogenous (masking) and an endogenous (clock) pathway.

A first explanation would be that the tidal rhythmicity is purely exogenous. Tides, therefore, would have a masking effect on the circadian clock. Importantly, positive and negative masking are by definition an increase or decrease in activity, respectively [44]. Indeed, oysters in free-running and L:D + STC 0 conditions presented, in both cases, a lower activity in comparison to oysters exposed to a cyclic water current (STC 12.4 and 24). The hypothesis of exogenous circatidal rhythmicity has been mentioned in the literature. The first report is probably that in barnacles, cirral beating was reported to have no endogenous tidal rhythmicity [45]. The authors noted that as sessile animals, barnacles never miss tidal stimuli. Consequently, they suggested that an exogenous rhythm would be the simplest mechanism to control behavior. Extending on that work, Rodriguez and Naylor [46] suggested that, contrary to motile species, there would be little adaptive advantage for intertidal sessile species to develop anticipatory rhythmic behavior linked to the rise and fall of tides, as these organisms are structurally adapted to withstand air exposure at low tide. But to our knowledge, de la Iglesia et al. [47] were the first and are the only ones to talk about a masking effect of tides on the circadian rhythm in marine organisms. Based on lab experiments and field observations, they suggested that the plugging-burrow rhythm in crabs *Uca uruguayensis* is under endogenous circadian control, whereas its synchronization with the tidal cycle is exogenous.

A second explanation would be that the tidal rhythmicity is under endogenous control. In marine organisms, three main hypotheses exist to explain the endogenous control of tidal rhythmicity.

Naylor [15,48] suggested a first hypothesis: separate circatidal and circadian oscillators evolved in response to different selection pressures. In the present work, we show that *C. gigas* does not exhibit a free-running circatidal rhythm independent of the previous entrainment conditions (either field or lab). It is therefore unlikely that a damped or unexpressed tidal clock could have been missed in *C. gigas*.

In the late eighties, a second hypothesis was proposed, the circalunidian hypothesis [49]. It suggested that there are no endogenous tidal rhythms but that tide-associated displays result

from two separate lunidian clocks ($\tau = 24.8$ h) strongly coupled in antiphase. This postulate was first built to explain how two tidal activity-peaks could act independently of one another in free-running condition [16,50,51]. That theory was supported by different works, among them studies on the clam *Chione stutchburyi* and the crab *Macrophthalmus hirtipes* [52,53]. Palmer, considering that circadian and circalunidian clocks are the same, suggested that one of these clocks evolved from the other. This evolution would have required no real change in period but only a change in sensitivity to various zeitgebers [17,51]. Nevertheless, it raises important questions. If there are two separate circalunidian clocks, there is a need for two lunidian zeitgebers. What are they? Very little is said on entrainment. Palmer recognized that this aspect is still “an obstacle” and “an enigma”. He speculated that the “entrainer for the lunidian clock would instead be sensitive to the physical and chemical changes imposed by tidal inundation cycles” [17]. But how could two lunidian clocks be sensitive to tidal cues half the time and in antiphase? Similarly, the Morning and Evening oscillator model described in terrestrial organisms [54] could potentially generate tidal cycles. But this raises the same difficulties for entrainment as Palmer’s hypothesis. Furthermore, while studying circadian rhythm in *C. gigas*, it appeared that oysters presented either a “morning” or “evening” peak but not both [20].

With regard to oysters and in agreement with Palmer [16,17], we suggest that circatidal and circadian rhythmicities are controlled by the same oscillator in *Crassostrea gigas*. Indeed, following Enright [18], a third hypothesis to explain oyster rhythmicity is the existence of a bimodal oscillator. There would be a single clock, that could go from circadian unimodal rhythm to circatidal unimodal rhythm with bimodal intermediaries in between (circadian and circatidal modes). As suggested for the plaice *Pleuronectes platessa* [55] and for the isopod *Exciorolana chiltoni* [56], we propose that the circatidal rhythm in *C. gigas* could be “a tidally-synchronized circadian activity rhythm”. The clock would be circadian in nature and it could be entrained by tides. Such a circadian plastic clock, able to run at 12.4 h, is sufficient to fully explain the patterns observed in *C. gigas*. To support this idea we show that L:D 6:6 cycles are able to entrain in the circatidal range and that water current cycles can synchronize a circadian rhythm (Fig. 4). This indicates that the circadian clock can run at tidal frequency and can be entrained by a tidal cue. Palmer [17,50], in two review papers, argued that L:D cycles can not entrain tidal rhythms; this obviously does not apply to the oyster *C. gigas* as shown in Fig. 4A.

A close link between circatidal and circadian rhythms has been mentioned by various authors. Barnwell [57] showed that *Uca sp.* crabs kept in L:D could express tidal activity pattern. Inversely, Last et al. [41] reported that the worm *Nereis virens* can express a circadian activity rhythm although entrained only by a tidal driver (called a “cross-modal entrainment”). In our experiments, a similar observation was made: 19 % of the animals exhibited a circadian period under D:D + STC 12.4 and 13% under L:D 6:6 + STC 0. Oysters with a first circadian period and a second one circatidal and vice-versa appeared regularly under various

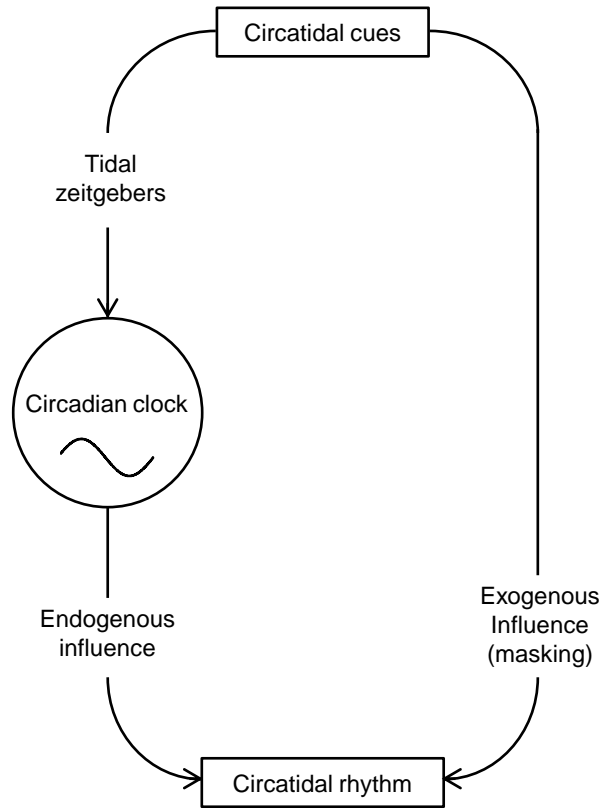


Figure 5: Two hypotheses could explain circatidal behavior in the oyster *C. gigas*. Left: a circadian clock can be entrained by tidal zeitgeber(s). Right: a circadian rhythm can be masked by exogenous tidal influences. Adapted from [44,62].

entrainment conditions. Studying semi-terrestrial crabs *Sesarma pictum* in the lab, Saigusa [58] reported that the tidal cycle of larval release could be phase-shifted by L:D cycles. More generally, Saigusa and Oishi [59], working on diverse invertebrates in the field, stated that the tidal rhythm is only a variation of the day / night rhythm. Akiyama [60], working on the crustacean *Dimorphostylis asiatica*, observed a change in the free-running period from circa 12 h to circa 24 h after 10 days in constant conditions. Akiyama later proposed [6] that *D. asiatica* had acquired tidal synchrony on the base of the circadian oscillator(s) which it originally possessed. Finally, in the intertidal bivalve *Mytilus californianus*, more than 40% of the transcriptome in gills shows a rhythmic gene expression. While few followed a circatidal rhythmicity, a large majority of them followed a circadian pattern, both in the field and in the lab. Clock genes (cryptochrome) were also said to vary with a 24 h period [61]. Thus, there is a large data set that tips the scales towards a circadian oscillator which might be entrained at a tidal periodicity.

2.6 Conclusions

The present work confirms the existence of an endogenous circadian rhythm in the oyster *C. gigas*. The study suggests two leads to explain the dominant tidal cycle reported for the oyster *in situ* [19]. This is summarized in Fig. 5. The tidal valve activity could either result from an exogenous influence (masking) or it could be generated by the sensitivity of the endogenous circadian clock to a tidal zeitgeber. That circadian clock would be plastic and would present a broad range of entrainment, matching both tidal and daily rhythmicities. Investigation into possible fluctuations in the expression of clock genes could give insights into that question and favor one of the two hypotheses.

Acknowledgments

This work was supported by a ministerial scholarship to A.M. and the projects EC2CO-Cytrix and OSQUAR, Région Aquitaine.

2.7 References

1. Hastings JW. (2001). Keeping in tune with time: entrainments of circadian rhythms. In: Lebert M and Häder DP. Photomovement. ESP Review Series, (D.-P, Häder and B. Jori, series editors) Berlin. Pp 960.
2. Naylor E. (2001). Marine animal behaviour in relation to lunar phase. *Earth Moon Planets* 85-86: 291-302.
3. Tessmar-Raible K, Raible F, Arboleda E. (2011). Another place, another timer: Marine species and the rhythms of life. *Bioessays* 33:165-172.

4. Koukkari WL, Sothorn RB. (2006). Introducing biological rhythms: a primer on the temporal organization of life, with implications for health, society, reproduction and the natural environment. Springer, New York. Pp 655.
5. Abello P, Reid DG, Naylor E. (1991). Comparative locomotors activity patterns in the portunid crab *Liocarcinus holsatus* and *L. depurator*. J Mar Biol Assoc UK 71: 1-10.
6. Akiyama T. (1997). Tidal adaptation of a circadian clock controlling a crustacean swimming behavior. Zool Sci 14: 901-906.
7. Chabot CC, Skinner SJ, Watson III WH. (2008). Rhythms of locomotion expressed by *Limulus polyphemus*, the American horseshoe crab: I. Synchronization by artificial tides. Biol Bull 215: 34-45.
8. Klapow LA. (1972). Natural and artificial rephasing of a tidal rhythm. J Comp Physiol 79: 233-258.
9. Taylor AC, Naylor E. (1977). Entrainment of the locomotor rhythm of *Carcinus* by cycles of salinity change. J Mar Biol Assoc UK 57: 273-277.
10. Warman CG, Naylor E. (1995). Evidence for multiple, cue-specific circatidal clocks in the shore crab *Carcinus maenas*. J Exp Mar Biol Ecol 189: 93-101.
11. Williams BG, Naylor E. (1969). Synchronization of the locomotor tidal rhythm of *Carcinus*. J Exp Biol 51: 715-725.
12. Williams BG, Pilditch CA. (1997). The entrainment of persistent tidal rhythmicity in a filter-feeding bivalve, using cycles of food availability. J Biol Rhythms 12: 173-181.
13. Kim WS, Huh, HT, Je JG, Han KN. (2003). Evidence of two-clock control of endogenous rhythm in the Washington clam, *Saxidomus purpuratus*. Mar Biol 142:305-309.
14. Webb HM. (1976). Interactions of daily and tidal rhythms. In: DeCoursey DJ (ed). Biological rhythms in the marine environment. Columbia: University of South Carolina Press, pp 129-135.
15. Naylor E. (2010). Chronobiology of marine organisms. Cambridge University Press, Cambridge, UK pp 242.
16. Palmer JD. (1995a). The biological rhythms and clocks of intertidal animals. Oxford Univ. Press, New York pp 217.
17. Palmer JD. (2000). The clocks controlling the tide-associated rhythms of intertidal animals. BioEssays 22:32-37.
18. Enright JT. (1976a). Resetting a tidal clock: a phase-response curve for *Excirolana*. In: DeCoursey DJ (ed). Biological rhythms in the marine environment. Columbia: University of South Carolina Press, pp. 103-114.
19. Tran D, Nadau A, Durrieu G, Ciret P, Parisot JP, et al. (2011). Field chronobiology of a molluscan bivalve : how the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. Chronobiol Int 28:307-317.
20. Mat AM, Massabuau J-C, Ciret P, Tran D. (2012). Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. Chronobiol Int In press.
21. Massabuau J-C, Forgue J. (1996). A field versus laboratory study of blood oxygen status in normoxic crabs at different temperatures. Can J Zool 74: 423-430.

22. Tran D, Ciret P, Ciutat A, Durrieu G, Massabuau, J-C. (2003). Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ Toxicol Chem* 22:116–122.
23. Chambon C, Legeay A, Durrieu G, Gonzalez P, Ciret P, et al. (2007). Influence of the parasite worm *Polydora sp.* on the behavior of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. *Mar Biol* 152: 329-338.
24. Gouthière L, Mauvieux B. (2004). Étapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers, modélisation. XXXVème Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie, Université de Saint Etienne, France du 10 au 12 Juin 2003. Quelques aspects sur la Chronobiologie. Presses Universitaires de Saint Etienne 2004. Pp 10.
25. Gouthière L, Claustrat B, Brun J, Mauvieux B. (2005a). Complementary methodological steps in the analysis of rhythms: search of periods, modelling. Examples of plasma melatonin and temperature curves. *Pathol Biol* 53:285-289.
26. Gouthière L, Mauvieux B, Davenne D, Waterhouse J. (2005b). Complementary methodology in the analysis of rhythmic data, using examples from a complex situation, the rhythmicity of temperature in night shift workers. *Biol Rhythm Res* 36:177-193.
27. Box GEP, Jenkins GM, Reinsel GC. (1994). *Time Series Analysis: Forecasting and Control*. Third edition. New York: Prentice Hall pp 598.
28. Scargle JD. (1982). Studies in astronomical time series analysis. II. Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. *Astrophys J* 263: 835–853.
29. Bingham C, Arbogast B, Cornélissen G, Lee J-K, Halberg F. (1982). Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9:397-439.
30. Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halber F. (1979). Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 6:305-323.
31. Jenkins GM, Watts DG. (1968). *Spectral Analysis and its Applications*. San Francisco: Holden Day pp 525.
32. Halberg F. (1969). Chronobiology. *Annu Rev Physiol* 31: 675-725.
33. Granger CWJ, Hatanaka M. (1964). *Spectral analysis of economic time series*. Princeton, NJ: Princeton University Press. Pp 299
34. Beentjes MP, Williams BG. (1986). Endogenous circatidal rhythmicity in the New Zealand cockle *Chione stutchburyi* (Bivalvia, Veneridae). *Mar Behav Physiol* 12: 171-180.
35. Poulain C, Lorrain A, Flye-Sainte-Marie J, Amice E, Morize E, et al. (2011). An environmentally induced tidal periodicity of microgrowth increment formation in subtidal populations of the clam *Ruditapes philippinarum*. *J Exp Mar Biol Ecol* 397: 58-64.
36. Higuera-Ruiz R, Elorza J. (2009). Biometric, microstructural, and high-resolution trace element studies in *Crassostrea gigas* of Cantabria (Bay of Biscay, Spain): anthropogenic and seasonal influences. *Estuar Coast Shelf* 82: 201-213.
37. Morton BS. (1977). The tidal rhythm of feeding and digestion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Exp Mar Biol Ecol* 26: 135-151.

38. Saurel C, Gascoigne JC, Palmer MR, Kaiser MJ. (2007). In situ mussel feeding behavior in relation to multiple environmental factors: regulation through food concentration and tidal conditions. *Limnol Oceanogr* 52: 1919–1929.
39. Al-Adhub AHY, Naylor E. (1975). Emergence rhythms and tidal migrations in the brown shrimp *Crangon crangon* (L.). *J Mar Biol Assoc UK*. 55: 801-810.
40. Mehta TS, Lewis RD. (2000). Quantitative tests of a dual circalunidian clock model for tidal rhythmicity in the sand beach isopod *Cirolana cookii*. *Chronobiol Int* 17: 29-41.
41. Last KS, Bailhache T, Kramer C, Kyriacou CP, Rosato E, et al. (2009). Tidal, daily, and lunar-day activity cycles in the marine Polychaete *Nereis virens*. *Chronobiol Int* 26:167-183.
42. Gibson RN. (1992). Tidally-synchronized behaviour in marine fishes. In: M.A. Ali (Ed.), *Rhythms in fishes*, Plenum Press, London pp 63-82.
43. Kim WS, Huh, HT, Lee JH, Rumohr H, Koh CH. (1999). Endogenous circatidal rhythm in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Mar Biol* 134: 107-112.
44. Mrosovsky N. (1999). Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiol Int* 16:415-429.
45. Southward AJ, Crisp DJ. (1965). Activity rhythms of barnacles in relation to respiration and feeding. *J Mar Biol Assoc UK* 45: 161-185.
46. Rodriguez G, Naylor E. (1972). Behavioural rhythms in littoral prawns. *J Mar Biol Assoc UK* 52: 81-95.
47. De la Iglesia HO, Rodriguez EM, Dezi RE. (1994). Burrow plugging in the crab *Uca uruguayensis* and its synchronization with photoperiod and tides. *Physiol Behav* 55: 913-919.
48. Reid DG, Naylor E. (1989). Are there separate circatidal and circadian clocks in the shore crab *Carcinus maenas*? *Mar Ecol Prog Ser* 52: 1-6.
49. Palmer JD. (1990). The rhythmic lives of crabs. *Bioscience* 40: 352-358.
50. Palmer JD. (1995b). Review of the dual-clock control of tidal rhythms and the hypothesis that the same clock governs both circatidal and circadian rhythms. *Chronobiol Int* 12: 299-310.
51. Palmer JD. (1997). Dueling hypotheses: circatidal versus circalunidian battle basics. *Chronobiol Int* 14: 337-346.
52. Williams BG, Palmer JD, Hutchinson DN. (1992). Comparative studies of tidal rhythms XIII Is a clam clock similar to those of other intertidal animals? *Mar Behav Physiol* 24: 1-14.
53. Williams BG. (1998). The lack of circadian timing in two intertidal invertebrates and its significance in the circatidal/circalunidian debate. *Chronobiol Int* 15: 205-218.
54. Sheeba V, Kaneko M, Sharma VK, Holmes TC. (2008). The drosophila circadian pacemaker circuit: pas de deux or tarantella? *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43: 37-61.
55. Gibson RN. (1973). Tidal and circadian activity rhythms in juvenile plaice, *Pleuronectes platessa*. *Mar Biol* 22: 379-386.

56. Enright JT. (1976b). Plasticity in an Isopod's clockworks: shaking shapes form and affects phase and frequency. *J Comp Physiol* 107: 13-37.
57. Barnwell FH. (1966). Daily and tidal patterns of activity in individual fiddler crab (genus *Uca*) from the Woods Hole region. *Biol Bull.* 130: 1-17.
58. Saigusa M. (1992). Phase shift of a tidal rhythm by light-dark cycles in the semi-terrestrial crab *Sesarma pictum*. *Biol Bull* 182: 257-264.
59. Saigusa M, Oishi K. (2000). Emergence rhythms of subtidal small invertebrates in the subtropical sea: nocturnal patterns and variety in the synchrony with tidal and lunar cycles. *Zool Sci* 17: 241-251.
60. Akiyama T. (1995). Circatidal swimming activity rhythm in a subtidal cumacean *Dimorphostylis asiatica* (Crustacea). *Mar Biol* 123: 251-255.
61. Connor KM, Gracey AY. (2011). Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *P Natl Acad Sci USA.* 108: 16110-16115.
62. Redfern P, Minors D, Waterhouse J. (1994). Circadian rhythms, jet lag, and chronobiotics : an overview. *Chronobiol Int* 11: 253-265.

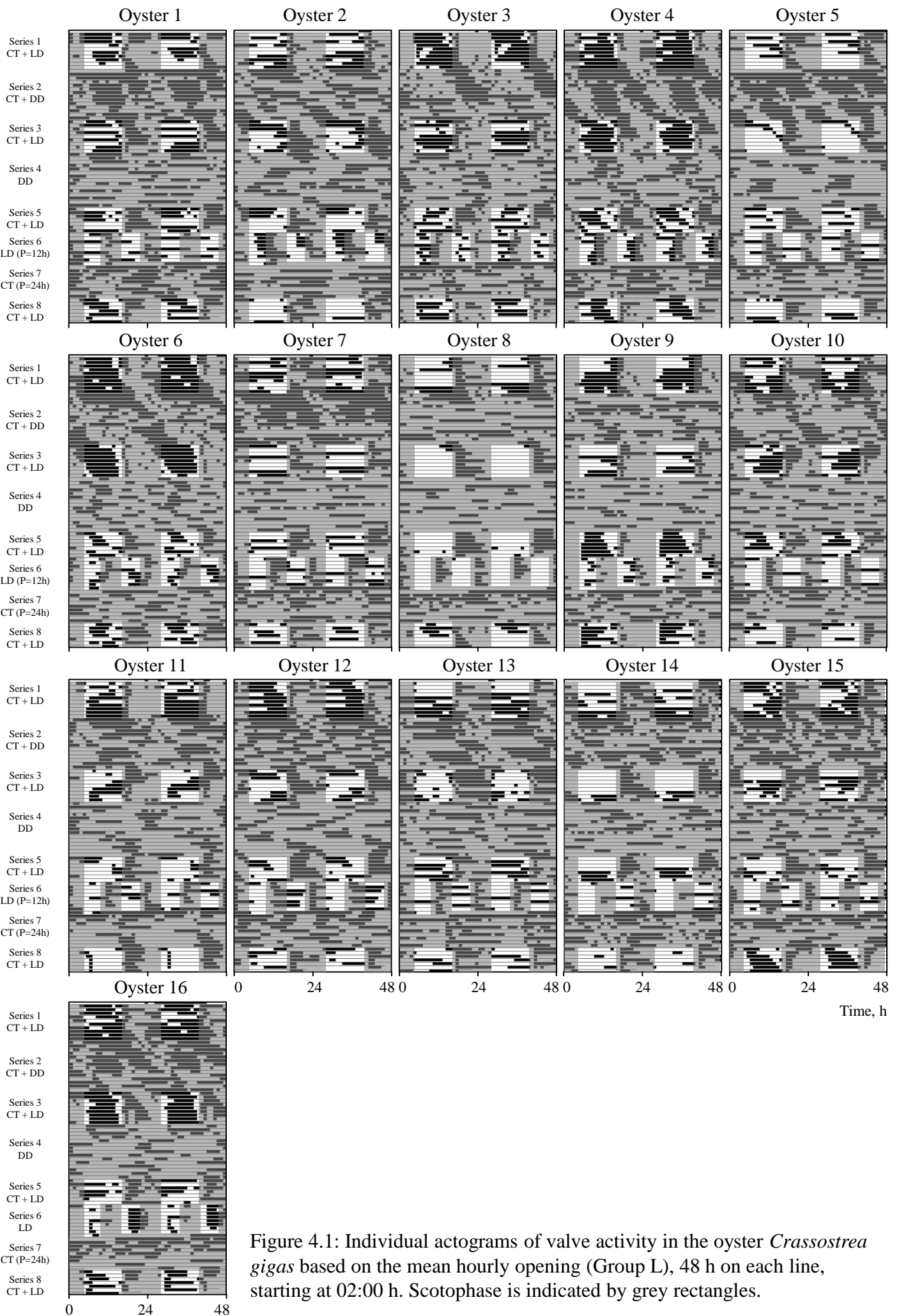


Figure 4.1: Individual actograms of valve activity in the oyster *Crassostrea gigas* based on the mean hourly opening (Group L), 48 h on each line, starting at 02:00 h. Scotophase is indicated by grey rectangles.

3. Conclusions

Pour compléter les données expérimentales présentées dans l'article qui fait le corps de ce chapitre, l'ensemble des données individuelles obtenues lors de cette expérience est présenté sous forme d'actogrammes dans les figures 4.1 (Groupe L, Lab to Lab, n = 16 huîtres) et 4.2 (Groupe F, Field to Lab, n = 15 huîtres). Les séries 5 et 8 présentées dans ces actogrammes sont des séries de référence qui ont produit les mêmes résultats que les séries de référence précédentes (1 et 3) et n'ont pas été présentées dans l'article par souci de concision. Les séries 5 et 6 de l'article correspondent donc aux séries 6 et 7 sur les actogrammes.

Ces résultats confirment tout d'abord l'existence d'un rythme circadien chez l'huître *C. gigas* et renforcent l'idée déjà émise dans le chapitre 3, à savoir l'absence d'un rythme circatidal endogène. En effet, si les huîtres expriment à la fois un rythme circadien et un rythme tidal lorsqu'elles sont soumises à un entrainement lumineux et à des cycles tidaux simulés, seul un rythme circadien apparaît en conditions d'obscurité constante et de courant nul. Cette observation vaut tant pour les analyses de groupe que pour les analyses individuelles et se vérifie même pour des animaux rapidement transférés du terrain, où ils exprimaient un rythme tidal, vers le laboratoire en conditions constantes. Nous avons également pu entraîner un rythme circadien avec des variations de courant de 24h, et un rythme tidal avec des variations de photopériode de 12h, montrant ainsi une gamme d'entraînement étendue puisque le zeitgeber lumineux peut entraîner un rythme tidal et qu'un zeitgeber de la marée peut entraîner un rythme journalier.

Se pourrait-il qu'il existe une horloge circatidale chez l'huître que nous n'aurions pas mise en évidence avec notre dispositif expérimental ? Le courant pourrait en effet ne pas être un zeitgeber de l'oscillateur circatidal, d'autres paramètres physiques et chimiques permettant de synchroniser l'horloge. A moins que nos conditions de free-running n'aient empêché l'expression d'une telle horloge, il nous semble peu probable qu'il s'agisse d'un artéfact expérimental. En effet, les huîtres transférées directement du terrain, où elles exprimaient un rythme tidal, vers le laboratoire ont affiché le même comportement en libre cours que leurs congénères acclimatés au laboratoire, à savoir un rythme circadien, et ce dès leur mise en place. Par ailleurs, des études préliminaires menées au laboratoire n'ont apporté aucun résultat concluant sur l'entraînement d'un rythme tidal chez *C. gigas* par un cycle de variation de pression (Polsenaere, 2007), un paramètre connu pour agir comme zeitgeber chez d'autres organismes (Warman et Naylor, 1995).

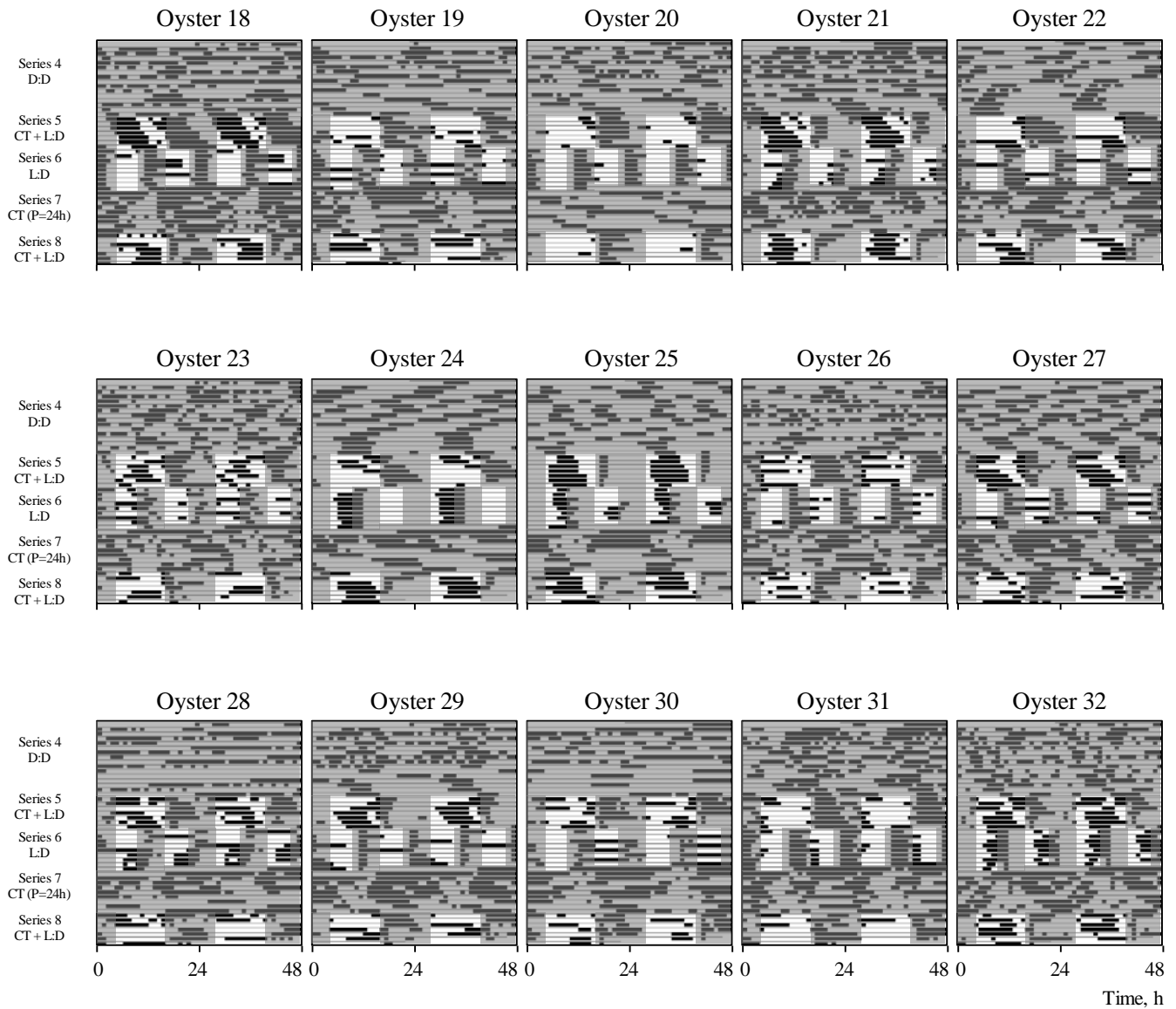


Figure 4.2: Individual actograms of valve activity in the oyster *Crassostrea gigas* based on the mean hourly opening (Group L), 48 h on each line, starting at 02:00 h. Scotophase is indicated by grey rectangles.

Les résultats semblent aller à l'encontre des théories proposées par Naylor et Palmer pour expliquer les rythmes des organismes marins de la zone côtière. Naylor soutient l'existence de deux horloges internes, l'une circadienne l'autre circatidale (Naylor, 2010), or nous n'avons pas pu mettre en évidence un rythme circatidal en conditions de libre cours. Palmer, lui, propose l'existence de deux horloges circalunidiennes couplées en antiphase (Palmer, 1995a). Si les méthodes d'analyse ne permettent pas de discriminer avec une précision suffisante les horloges circadienne et circalunidienne, nos résultats ne mettent pas en évidence deux oscillateurs circalunidiens agissant distinctement. Surtout, cette théorie pose question au niveau de l'entraînement. Si on suppose deux horloges circalunidiennes différentes, ces oscillateurs doivent être entraînés par des zeitgebers circalunidiens. Quels sont-ils ? Cela nécessiterait également que chaque oscillateur ne soit sensible au même zeitgeber qu'une fois sur deux, puisque la période lunidienne est de 24.8 alors que le rythme tidal est de 12.4 h en zone de marée semi-diurne. Palmer lui-même reconnaissait que l'entraînement était l'obstacle à élucider pour cette théorie, suggérant que l'horloge circalunidienne soit sensible aux modifications physico-chimiques imposées par les marées (Palmer, 2000).

Sur la base de nos résultats, nous proposons deux autres hypothèses pour expliquer l'activité tidale chez *C. gigas* sur le terrain.

La première hypothèse est que le rythme pourrait être d'origine exogène, les marées ayant alors un effet masque, c'est-à-dire ne passant pas par l'horloge moléculaire, sur le rythme circadien. Les effets masque positif et négatif se définissent respectivement comme une augmentation et une diminution du niveau d'activité de l'animal (Mrosovsky, 1999). Et en effet, nous observons que l'activité valvaire est plus faible lorsque les bivalves sont laissés en libre cours ou soumis à un cycle d'entraînement lumineux sans courant que lorsque les huîtres sont soumises à un cycle de courant. Il a déjà été proposé que le rythme tidal soit simplement exogène chez des espèces intertidales sessiles. Ces organismes subissant nécessairement le balancement des marées, il a été suggéré qu'ils n'auraient que peu d'avantage à pouvoir anticiper le cycle tidal (Rodriguez et Naylor, 1972 ; Southward et Crisp, 1965). Toutefois, à notre connaissance, la seule mention d'un « effet masque des marées sur le rythme circadien » a été formulée pour le crabe *Uca uruguayensis* (de la Iglesia et al., 1994). A ce jour, ce mécanisme reste théorique chez l'animal marin et aucune démonstration formelle n'a été apportée.

La seconde hypothèse que nous proposons est que le rythme tidal exprimé par *C. gigas* sur le terrain soit produit par l'horloge circadienne. Les deux rythmes seraient produits par un seul oscillateur, faible, circadien par nature mais qui, selon l'entraînement auquel il serait soumis, pourrait produire un rythme unimodal tidal ou un rythme unimodal journalier, avec tous les intermédiaires bimodaux possibles selon le poids de chaque zeitgeber. Cette hypothèse rejoint la proposition d'Enright (1976a, b), qui avait envisagé chez *Excirolana chiltoni* un rythme tidal endogène généré par l'horloge circadienne, horloge qui pourrait être synchronisée par les

marées. Cette formulation avait été proposée suite à l'observation d'une courbe de réponse de phase bimodale par intervalle circadien chez cet isopode. Cela signifie qu'il y a deux portions du cycle circadien durant lesquelles l'application d'un stimulus, ici la simulation des vagues par agitation, induit une avance de phase, et deux portions du cycle pendant lesquelles le stimulus provoque un retard de phase. Pourtant, le rythme endogène d'*Excirolana*, exprimé en libre cours, est circadien. Par ailleurs, les deux pics tidaux n'étaient pas entraînés séparément. Pour Enright, cette courbe bimodale n'était adaptative que dans le cadre d'une synchronisation tidale semi-diurne d'un rythme circadien, chaque marée pouvant resynchroniser l'horloge endogène.

Est-il possible de favoriser l'une de ces hypothèses, l'hypothèse d'un rythme exogène ou celle d'une horloge circadienne pouvant être entraînée par les marées ? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons, dans le chapitre 5, abordé le problème au niveau de l'horloge moléculaire, en suivant l'expression d'un des gènes de cette horloge.

Chapitre 5

Approche de l'horloge moléculaire

1. Introduction

Les chapitres 3 et 4 nous ont permis de caractériser le comportement de l’huître *C. gigas*. Nous avons effectivement pu mettre en évidence un rythme circadien d’activité valvaire, tandis qu’aucune observation ne supporte l’existence d’un rythme tidal endogène. Nous avons donc formulé l’hypothèse que l’activité tidale exprimée par *C. gigas* in situ est soit d’origine exogène, par effet masque, soit d’origine endogène c’est-à-dire provenant de l’horloge circadienne oscillant à une fréquence tidale. Ces propositions vont à l’encontre de la théorie de Naylor et Webb (Naylor, 2010 ; Webb, 1976) et de celle de Palmer (1995a, b, 2000), mais à ce jour aucun gène tidal ou lunidien n’a jamais été mis en évidence.

L’une des deux hypothèses rappelées ci-dessus peut-elle être favorisée ? Afin d’affiner notre compréhension du mécanisme de l’horloge de l’huître, nous étudions dans ce chapitre les mécanismes moléculaires sous-tendant l’activité valvaire de *C. gigas*. A ce jour, les gènes de l’horloge sont particulièrement méconnus chez les bivalves, bien que le génome de *C. gigas* vienne tout juste d’être publié (Zhang et al., 2012, publié dans *Nature* le 19/09/2012). Les seuls gènes qui étaient référencés jusqu’à présent étaient le gène *period* chez la palourde *Ruditapes philippinarum* (Ruphibase, ruditapes2_c508) et le gène *cryptochrome* chez la moule *Mytilus californianus* (Connor et Gracey, 2011) et l’huître *C. gigas* (*Cgcry*, numéro d’accession GQ415324). Nous avons donc étudié la transcription de ce gène *Cgcry* chez l’huître dans différentes conditions expérimentales. Ce gène code pour des CRYPTOCHROMES, des flavoprotéines photoréceptrices structurellement similaires aux photolyases mais qui ne possèdent pas cette activité de réparation du matériel génétique (Lin et Shalitin, 2003). Initialement découvertes chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Ahmad et Cashmore, 1998), les protéines CRY sont aujourd’hui connues pour assurer une grande variété de fonctions tant chez les procaryotes que les eucaryotes (Lin et Todo, 2005). Chez les plantes, ces protéines sont connues pour leur absorption de la lumière bleue et du rayonnement UVA et interviennent dans la croissance, le développement, la photosynthèse, la floraison, la réponse au stress, etc. (Chaves et al., 2011). Les cryptochromes seraient également sensibles au champ magnétique et seraient impliqués dans la géolocalisation chez les oiseaux et les insectes (Gegear et al., 2010 ; Ritz et al., 2000). C’est encore CRY qui pourrait synchroniser les frais massifs chez les coraux (Levy et al., 2007). Outre ces divers rôles assurés par la protéine CRY, ce qui nous intéresse plus particulièrement pour ce travail est le fait que *cry* est un gène bien connu pour son rôle dans l’horloge circadienne dans de nombreux phyla. Son rôle varie cependant avec les organismes. Chez les insectes, *cry* intervient dans le photo-entraînement et la synchronisation de l’horloge centrale tandis que

chez les mammifères *cry* constitue également un composant de l’oscillateur central (Cashmore, 2003 ; Van Gelder, 2002).

Une première étude menée au laboratoire a montré que l’expression de *Cgcry* a un profil circadien dans les branchies d’huîtres soumises à un entraînement lumineux L :D 12 :12 (D. Tran, communication personnelle). Afin d’étudier le mécanisme de l’horloge moléculaire de *C. gigas*, nous avons soumis des huîtres à un cycle de marée simulé par des variations de courant, en obscurité constante. Nous avons ensuite mesuré la transcription du gène *cryptochrome* dans les deux composantes du muscle adducteur, le muscle lisse et le muscle strié, en parallèle de l’activité rythmique valvaire. Le muscle adducteur constitue en effet le seul muscle « squelettique » de *C. gigas*, et c’est ce muscle qui produit l’ouverture et la fermeture des valves (Hoyle, 1964). Nous avons ensuite soumis les bivalves à l’algue toxique *Alexandrium minutum* pour approfondir le rôle de *cryptochrome* chez *C. gigas*. Cette algue produit la saxitoxine (STX), un analogue de la tétrodotoxine (TTX) connue pour altérer l’horloge circadienne (Welsh et al., 1995 ; Yamaguchi et al., 2003).

2. The clock gene *cry* oscillates at tidal frequency in oysters: a new clue for marine clocks?

Running title: Tidal oscillation of *Cgcry* in oysters

Audrey M. Mat¹, Jean-Charles Massabuau^{1,2}, Pierre Ciret^{1,2} and Damien Tran^{1,2*}.

¹Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France.

²CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France.

* to whom correspondence should be addressed.

Email: d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33(0)5 56 22 39 37

2.1 Summary

Background

Marine organisms inhabit a complex environment, subjected to both the daily solar cycle and tides. The mechanisms underlying circatidal rhythms remain an open question and although different hypotheses have been proposed, no molecular basis has been found to support any of them.

Results

The oyster *Crassostrea gigas* was studied in the lab under constant darkness and simulated tidal cycles of water current. In an attempt to manipulate circatidal rhythm, two feeding regimes were applied: one with the non-toxic algae *Heterocapsa triquetra* and one with the saxitoxin-producing algae *Alexandrium minutum*. We analyzed valve activity rhythms and measured transcription of the clock gene cryptochrome (*Cgcry*) in the two different components of the adductor muscle, striated and nonstriated. We found (i) that *Cgcry* oscillated at circatidal frequency in the striated muscle when oysters exhibited a circatidal behavior and (ii) that exposure to saxitoxin-producing *A. minutum* impaired the circatidal rhythm and disrupted the circatidal oscillation of *Cgcry* transcription.

Conclusions

This is the first evidence of a circadian clock gene running at tidal frequency and the first molecular evidence to support one of the hypotheses explaining circatidal rhythm in marine animals. If this is further confirmed, it would show that the plastic circadian clock in oysters is sufficient to generate circatidal rhythmicity without any putative circatidal clock.

Keywords: circatidal rhythm; circadian clock gene; cryptochrome; saxitoxin; marine clocks; oyster; *Crassostrea gigas*

Highlights

- A circadian clock gene can oscillate at tidal frequency in oysters
- A circadian clock would be sufficient to generate a circatidal rhythm
- Saxitoxin-producing algae disrupt *Cgcry* oscillation in the adductor muscle
- Saxitoxin-producing algae impair the biological rhythm in oysters with a dose-response

2.2 Introduction

The daily behavior and physiology of terrestrial organisms is mainly driven by the solar cycle and the rotation of the Earth. In contrast, marine organisms occupying coastal areas inhabit a very complex biotope, submitted to the solar cycle but also to tides, semilunar and lunar cycles [1,2]. It has been shown that intertidal organisms develop physiological strategies to adapt to the intertidal environment [3]. Nevertheless, up till now, studies on clocks of marine species mainly relied on behavioral analyses. For many decades, three main hypotheses have been proposed to explain rhythms exhibited by marine organisms. The first suggests that they possess two separate unimodal clocks, a circadian and a circatidal [4,5]. The second rejects the existence of an endogenous tidal rhythm and advocates the existence of two independent unimodal clocks, both circalunidian (period $\tau = 24.8$ h), running in antiphase [6,7]. The third, given by Enright [8], proposes that a single bimodal clock governs both circadian and circatidal rhythmicities. Importantly, to date there is no molecular basis for either a circatidal or circalunidian clock. To our knowledge, only Connor and Gracey [9] reported that in gills of the intertidal bivalve *Mytilus californianus* more than 40% of the transcriptome exhibited rhythmic gene expression: about 35% circadian (including a clock gene, *cryptochrome*) and 5% circatidal.

Based on lab and field studies, Mat et al. [10] previously showed the existence of a weak circadian clock in the oyster *Crassostrea gigas* while no circatidal clock could be observed. Therefore, how can tidal rhythm, observed in the field [11], be generated in oysters? We designed the present experiment to focus on analysis of the gene *Cgcry*, a well described circadian clock gene, in an attempt to understand molecular mechanisms of tidal rhythmicity in oyster *C. gigas*. Specifically, we induced tidal behavior in the oyster *C. gigas* under lab conditions and tracked the oscillations of this gene.

C. gigas possesses only one skeletal muscle, the adductor muscle; it has a striated and a nonstriated component. Based on the hypothesis that in oysters, as in other phyla [12], *Cgcry* is either a circadian clock gene and/or a photoreceptor, we focused the analysis of *Cgcry* on these two components of the muscle as they are the only effectors of valve behavior. The striated, translucent, muscle initiates valve closing and performs rapid contractions; whereas the nonstriated, opaque, muscle is slowly-contracting and is used to maintain long-term adduction of the valves through the well-known “catch-mechanism” [13-15].

To reinforce this experimental approach we took advantage of the presence of saxitoxin (STX), an analog of tetrodotoxin (TTX), present in some toxic algae and ingested by oysters during harmful algal blooms. TTX is a marine guanidium toxin which has been reported to reset the circadian clock in rat suprachiasmatic nucleus [16], impair the input and output of the clock without impairing the clock itself in rats [17] or to suppress clock genes in neurons [18]. STX and TTX are paralytic neurotoxins which induce a reversible block of ion transport by the sodium channel in nerve fibers [19,20]. STX is produced by, among others, several

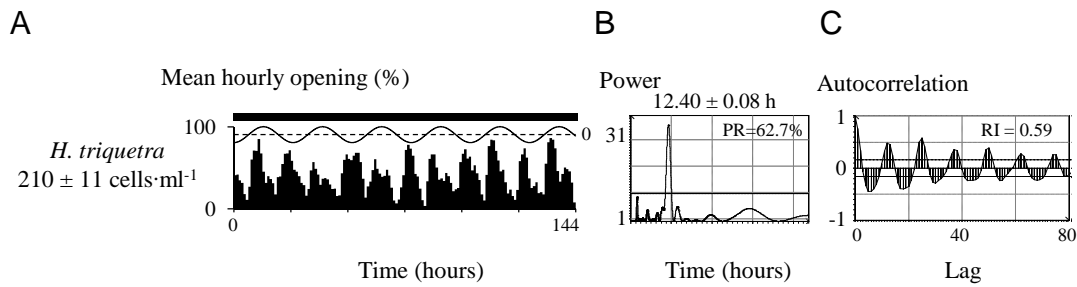


Figure 1: Oysters submitted to simulated tidal cycles of current (STC) present a tidal rhythm of valve-activity. (A) Mean hourly opening duration (%) of the group (n=15 oysters) fed on the non-harmful algae *Heterocapsa triquetra*. The black rectangle represents the absence of photoperiod (D:D) and the curve the STC. (B) The period τ of the group (\pm sd) is determined by spectral analysis (Lomb and Scargle periodogram; dotted line for p-value = 0.05). The Percent Rhythm (PR) of the model is given. (C) The autocorrelation graph attests to the absence of randomness; RI, rhythm index.

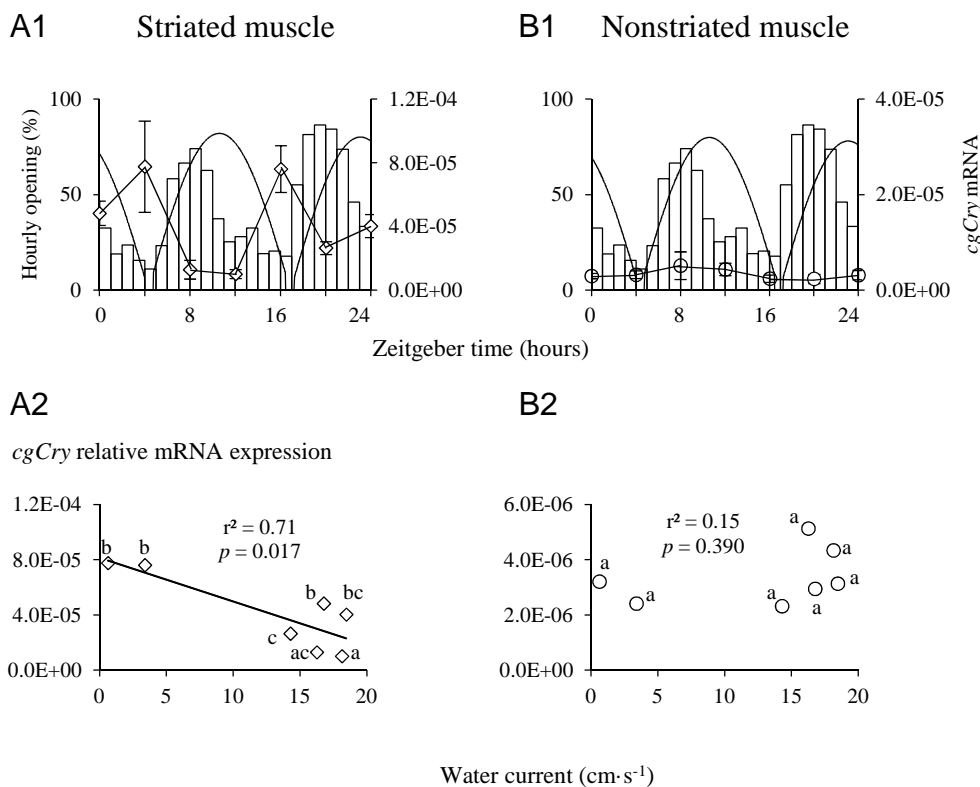


Figure 2: The gene *Cgcry* oscillates at tidal frequency in the striated muscle of *C. gigas*. (A1, B1) Mean hourly opening duration (open bar chart, n = 15 oysters) and mean (\pm SE) expression of the gene *Cgcry* during a 24-hour cycle in striated (\diamond , A1) and nonstriated muscle (\circ , B1) of oysters fed on the non-harmful algae *H. triquetra*. The superimposed continuous curve represents the simulated tidal cycle, STC (absolute value). Correlation between water current and mean expression of *Cgcry* (error bars not shown for clarity) in striated (A2) and nonstriated muscle (B2). Statistical difference at p = 0.05 for (A2, B2). *Cgcry* analyses in striated muscle: n = 4 oysters for zeitgeber time 20; 5 for times 0, 8, 12, 24 and 6 for times 4 and 16. Nonstriated muscle: n = 5 for zeitgeber times 0, 8, 12, 16, 20 and 6 for time 4. Letters (a, b and c) represent non-statistically different values.

Alexandrium species. These harmful dinoflagellates have caused many Paralytic Shellfish Poison(PSP)-related events in coastal areas around the world from the USA to Asia and Europe [21]. Being filter-feeders, bivalves are known to accumulate PSP by feeding on PSP-producing algae [19]. Specifically, we intended to learn if by exposing oysters exhibiting a circatidal rhythm of valve activity to STX at ecologically relevant concentrations, it was possible to disrupt the expression of the gene *Cgcry* with or without disruption of circatidal rhythmicity.

The present study was performed in the lab under D:D condition and simulated tidal current. We analyzed valve activity rhythms and measured transcription of the gene *cryptochrome* (*Cgcry*) in the two different components of adductor muscle. We found (i) that *Cgcry* oscillated at circatidal frequency in the striated muscle of oysters exhibiting a circatidal behavior and (ii) that exposure to STX-producing *A. minutum* impaired the circatidal rhythm and disrupted the circatidal oscillation of *Cgcry* transcription. The present results therefore indicate that the circadian clock in *C. gigas* could also run at a tidal frequency. We discuss how these results show the clocks of marine organisms in a new light and provide new insights into the evolution of biological clocks in general.

2.3 Results

The expression of *Cgcry* oscillates at a tidal frequency in the striated muscle of oysters.

Fig. 1 presents the valve behavior of oysters under an entrainment regime (D:D + STC) and fed on the non-harmful algae *H. triquetra* (210 ± 11 cells·ml⁻¹) from t_0 h to t_{144} h. From left to right, the figure shows the mean hourly opening of the group as a function of time (Fig. 1A) with the experimental regime on top (D:D and STC curve), the corresponding periodogram of Lomb and Scargle (Fig. 1B) and the autocorrelation plot (Fig. 1C). It indicates that under circatidal entrainment oysters exhibited a circatidal rhythm of valve activity. The spectral analysis reveals that the behavior oscillated at a period of 12.4 h (Figs. 1A, B). The percent rhythm (PR) shows that the Cosinor model explained 62.7 % of the valve activity exhibited by the oysters (Fig. 1B). The autocorrelation plot attests that data are not random, which is necessary to confirm the existence of a biological rhythm (Fig. 1C). The rhythm index is 0.59. In order to get more insight into the molecular mechanisms underlying this circatidal rhythm, expression of the gene *Cgcry* was screened during a 24 h cycle in striated and nonstriated muscle (from t_{114} h to t_{138} h). Figs. 2A1 and B1 (for striated and nonstriated muscle, respectively) show the mean hourly opening of the group of oysters equipped with valve-activity electrodes together with the cyclic change of simulated tidal current (STC) in absolute value and the expression of the gene *Cgcry*. Note first that animals were closed in the absence of current. Then, they opened their valves as the water velocity increased. Remarkably, under

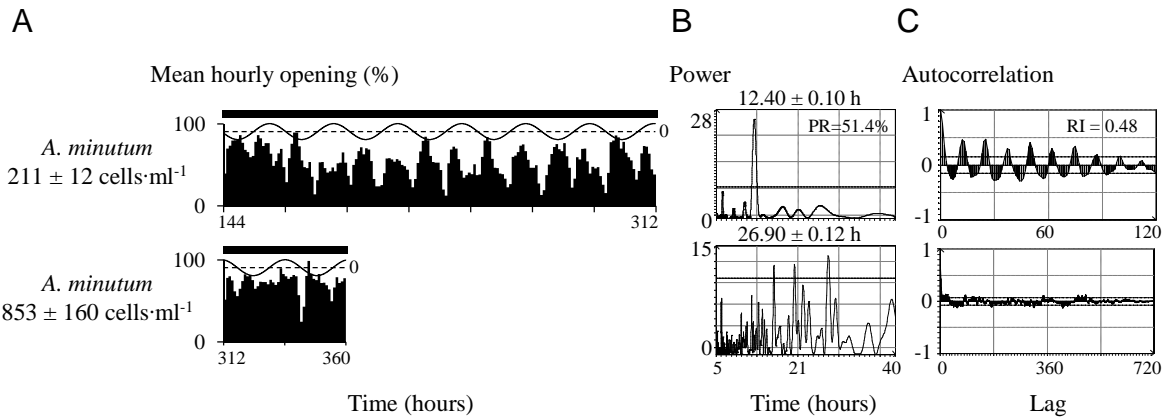


Figure 3: Exposure to saxitoxin-producing algae *Alexandrium minutum* impairs the valve-activity rhythm in oysters. (A) Mean hourly opening duration (%) of the group (n = 15 oysters). The black rectangle represents the absence of photoperiod (D:D) and the curve the simulated tidal cycle of current, STC. (B) The period τ of the group (\pm sd) is determined by spectral analysis for each condition (Lomb and Scargle periodogram; dotted line for p -value = 0.05). The Percent Rhythm (PR) of the Cosinor model is given. (C) The autocorrelation graph shows presence or absence of randomness; RI, rhythm index.

<i>H. t.</i> (cells·ml ⁻¹)	210	0	0
<i>A. m.</i> (cells·ml ⁻¹)	0	211	853

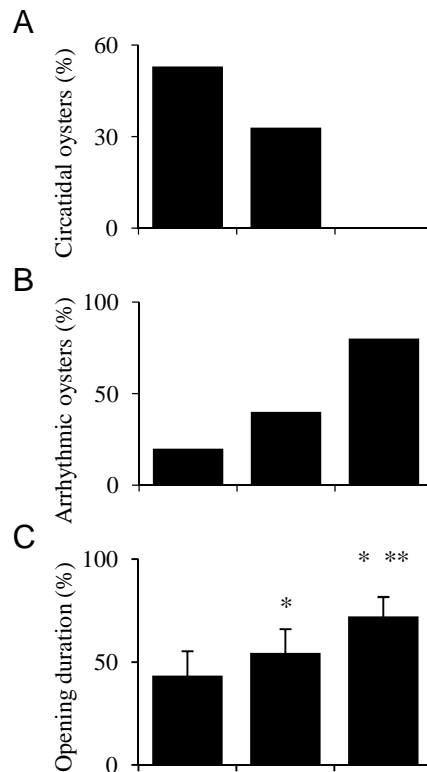


Figure 4: Dose-response relationship as a function of concentration of saxitoxin-producing *A. minutum* (n = 15 oysters). (A) Percentage of oysters exhibiting a primary circatidal period, (B) percentage of arrhythmic oysters and (C) mean (\pm SE) opening duration under the 3 different algal exposures (*H. t.*: *Heterocapsa triquetra*; *A. m.*: *Alexandrium minutum*). * statistically different from the condition *H.t.* 210 cells·ml⁻¹, *A.m.* 0 cells·ml⁻¹; ** statistically different from the condition *H.t.* 0 cells·ml⁻¹, *A.m.* 211 cells·ml⁻¹; p -value = 0.05.

these D:D conditions, *Cgcr*y expression oscillated at circatidal frequency in the striated muscle, in antiphase with the STC oscillation (Fig. 2A1). Furthermore the increased *Cgcr*y expression anticipated the increased valve opening and Fig 2A2 shows that *Cgcr*y expression was increased at decreased water currents. On the contrary, there was no oscillation of *Cgcr*y expression in nonstriated muscle (Figs 2B1, B2). Note finally that there was a factor 4.3 between the base levels of *Cgcr*y expression in both muscles, *Cgcr*y being statistically less expressed in the nonstriated muscle ($p = 0.019$).

The toxic algae *Alexandrium minutum* disturbs both the expression of *Cgcr*y and the circatidal behavior of oysters, with a dose-effect.

Oysters were then fed on the toxic algae *Alexandrium minutum* (close in terms of size and shape to the non-harmful *H. triquetra*) to track the potential impact of saxitoxin on their rhythm, both at behavioral and genetic levels. Fig. 3 shows their behavior under D:D regime and entrainment by STC at two environmentally relevant bloom concentrations, first 211 ± 12 cells·ml⁻¹ ($t_{144\text{ h}} - t_{312\text{ h}}$) and then 853 ± 160 cells·ml⁻¹ ($t_{312\text{ h}} - t_{360\text{ h}}$). From left to right, the figure presents for both conditions the mean hourly opening of the group as a function of time (Fig. 3A) with the experimental regime shown on top (D:D and STC curve), the corresponding periodogram of Lomb and Scargle (Fig. 3B) and the autocorrelation plot (Fig. 3C). When oysters were exposed to *A. minutum* at 211 ± 12 cells·ml⁻¹, spectral analysis indicates that the group presented a tidal period, 12.4 h (Fig. 3B). Nevertheless, the percent rhythm decreased from 62.7 % under the *H. triquetra* condition (Fig. 1B) to 51.4 %. The autocorrelation plot still attests to the existence of the rhythm (Fig. 3C) although the rhythm index also decreased from 0.59 (Fig. 1C) to 0.48. When *A. minutum* exposure was 853 ± 160 cells·ml⁻¹, the periodogram appeared very noisy. One statistical period, at 26.9 h and out of the circatidal range, did still exist at the group level (Fig. 3B). Moreover, the autocorrelation attests that data were random (Fig. 3C) which signals the absence of any real biological rhythm.

Fig. 4 is a global analysis which summarizes and reinforces the above data set. It indicates that the percentage of oysters expressing a circatidal period decreased when they were fed on *A. minutum*, following a dose-effect relationship: 53, 33 and 0 % of animals exhibited a circatidal period as the concentration of saxitoxin-producing *A. minutum* increased (Fig. 4A). Inversely, Fig. 4B shows that as the circatidal rhythmicity vanished, the percentage of arrhythmic animals increased from 20 to 40 to 80 %. Finally, Fig. 4C shows that the mean opening duration of the oysters increased when they were fed on *A. minutum*, again with a dose-effect. Oysters were opened 44, 55 and 72 % of the time as the *A. minutum* concentration increased ($p < 0.05$).

In parallel to disruption of the behavioral rhythm, we wanted to see if the expression of *Cgcr*y was modified under moderate *A. minutum* contamination, i.e. 211 ± 12 cells·ml⁻¹. We focused

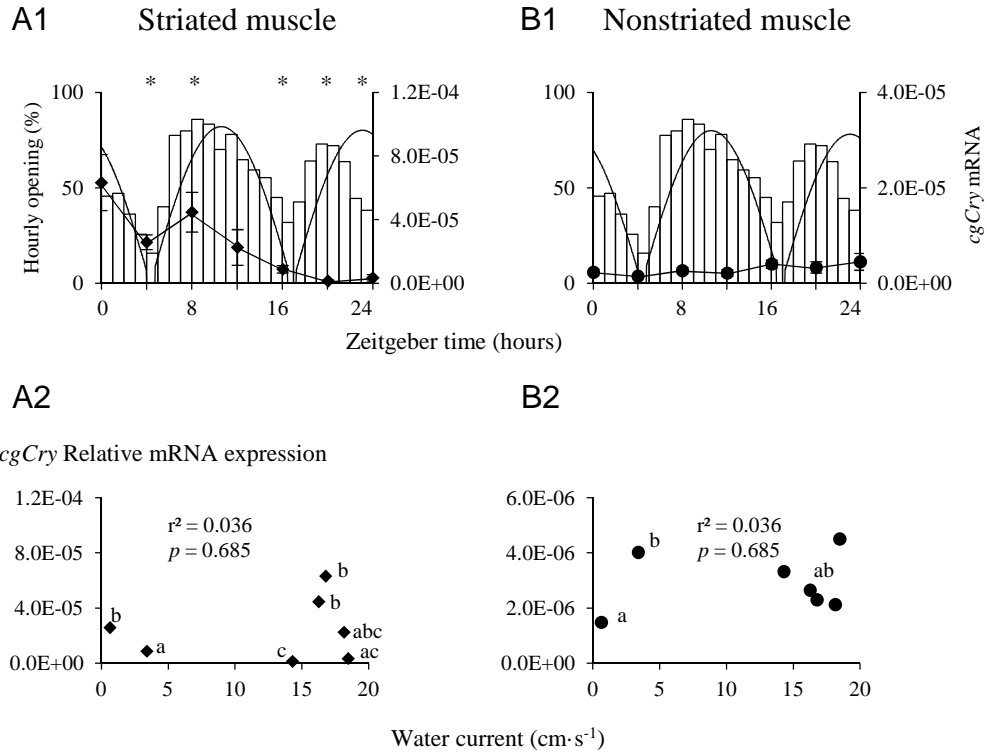


Figure 5: Saxitoxin-producing algae *A. minutum* disrupt *Cgcry* oscillation in striated muscle of *C. gigas* at 211 ± 12 cells·ml⁻¹. (A1, B1) Mean hourly opening (open bar chart, $n = 15$ oysters) and mean (\pm SE) expression of the gene *Cgcry* in striated (♦, A1) and nonstriated (●, B1) muscle during a 24-hour cycle. The superimposed continuous curve represents the simulated tidal cycle, STC (absolute value). Correlation between the expression of *Cgcry* and water current in striated (A2) and nonstriated (B2) muscle. * indicates *Cgcry* levels statistically different compared to the condition *H. triquetra* at 210 ± 11 cells·ml⁻¹, at the same zeitgeber time shown in Fig. 2A1 (p -value = 0.05). *Cgcry* analyses in striated muscle: $n = 5$ oysters for zeitgeber times 12, 16, 20, 24 and 6 for times 0, 4, 8. Nonstriated muscle: $n = 4$ for zeitgeber time 24, 5 for times 8 and 16 and 6 for times 0, 4, 12 and 20. Letters (a, b and c) represent non statistically different values. See Figure S1 for STX dosages.

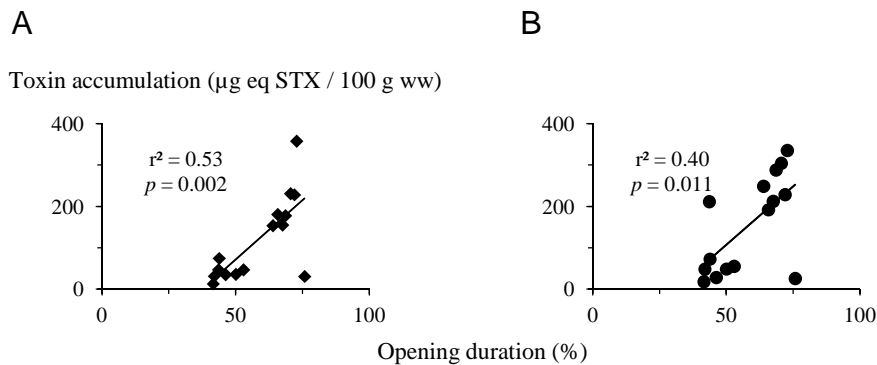


Figure S1: Correlation between STX accumulation in striated (A) and nonstriated (B) muscle and mean opening duration after *A. minutum* exposure. Sampling time, t_{360h} . $n = 15$ oysters. STX data quantify accumulation rates at the individual level and illustrate inter-individual variability. Relationship with mean opening duration allows a comparison with previous reports on the same species of oyster and with the same *A. minutum* strain [49].

on the last day of exposure ($t_{288\text{ h}} - t_{312\text{ h}}$; Fig. 5). Fig. 5A1 and 5B1 present the mean hourly opening of the group, the expression of the gene *Cgcry* in the striated (A1) and nonstriated (B1) muscles and the cyclic change of tidal current in absolute value. Remarkably, *Cgcry* expression decreased and did not oscillate under *A. minutum* exposure. All values at zeitgeber times 4, 8, 16, 20 and 24 were statistically different from those without *A. minutum* (compare Fig. 5A1 and 2A1). In nonstriated muscle, the absence of cyclic expression remained and its low level did not statistically change (compare Fig. 5B1 and 2B1). In striated muscle, in the later part of the 24h period *Cgcry* expression reached the base levels seen in nonstriated muscle ($p = 0.950$). Thus, in the presence of STX there is no longer any correlation between STC and *Cgcry* expression in either type of muscle (Fig. 5A2, B2). Furthermore, STX was quantified in both muscle types after exposure to $853 \pm 160 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ (at $t_{360\text{ h}}$) *A. minutum* (Fig. S1). Accumulation in striated and nonstriated muscles were, respectively 120 ± 27 and $155 \pm 31 \text{ eq. STX}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ (statistically different, $p = 0.026$; no STX present in control oysters).

2.4 Discussion

In permanently immersed oysters, *C. gigas*, valve activity is mainly driven by tidal activity, although no tidal clock has ever been detected [10,11]. The present objective was (i) to track the mechanism underlying the circatidal rhythm at molecular and behavioral levels and (ii) to evaluate the impact of algal-produced saxitoxin (a chemical analog of tetrodotoxin) on this rhythmicity. Our work first shows that under the entrainment regime (D:D + STC) in the laboratory, oysters expressed a tidal valve-activity rhythm and that the gene *Cgcry* oscillated at tidal frequency in striated adductor muscle (Figs. 1, 2). Second, the results indicate that STX disturbed both the rhythmic behavior of oysters and the striated muscle expression of *Cgcry* following a dose-response relationship (Figs 3 - 5).

The circadian clock gene cryptochrome, *Cgcry*, oscillates following a tidal period in the striated adductor muscle of oysters expressing a tidal rhythm of valve activity.

Cryptochromes are flavin- and pterin-containing proteins belonging to the cryptochrome / photolyase family. This protein is found in several phyla in prokaryotes and eukaryotes, where it plays numerous roles [22]. In plants, cryptochromes are well-known blue light / UVA photoreceptors, involved in growth, development, photosynthesis, stress response, etc [23]. In the reef-building coral *Acropora millepora*, it has been reported that cryptochromes could also mediate mass spawning events by entraining the coral clock to the lunar phase [24]. Studies on birds and flies also report that cryptochromes could act as magnetoreceptors for geomagnetic orientation, functioning on a radical-pair mechanism [25]. Since the mid-nineties, the important role of cryptochromes in the circadian clock has become apparent.

Circadian rhythms are generated by the transcriptional regulation of clock genes (*per*, *tim*, *clock*, *cycle/bmall*, ...) via autoregulatory feedback loops. The role of cryptochromes varies among organisms. In insects, cryptochromes are active in the photoentrainment of the central circadian clock but are not a part of the clock, whereas in mammals they are also an actual part of the central clock [26-29].

The present results suggest a new role for cryptochromes: the circadian gene appears to take part in the tidal rhythmicity in the oyster *Crassostrea gigas*. Remarkably, *Cgcry*, well-known as a photoreceptor gene, oscillated in oysters held in constant darkness and submitted to simulated tidal cycles. That *cry* may function in a light-independent pathway was reported in studies on magnetism mentioned before. It has also been reported in *Drosophila*, where *cry* could be a light-independent clock component of peripheral oscillators [30].

What could be the role of *Cgcry* in oyster muscle? Are CgCRY proteins involved in tide perception and the entrainment process, or are they a core component of the clock in the striated adductor muscle? If *Cgcry* is involved in tide perception, since the sole parameter that was cycling in this experiment was water current, one possibility is that *Cgcry* is part of the mechanoreception pathway allowing transduction to the clock. If it is a core component of the clock, it demonstrates that a circadian gene can oscillate at tidal frequency in oysters. But whatever its role, synchronizer or oscillator, these data provide the hypothesis that the circatidal rhythm in oysters could be generated by a circadian clock, as previously suggested by Enright [8]. This hypothesis would explain why no tidal and/or lunidian gene has ever been found [31].

In terms of evolution, it would be a simple explanation that has the advantage of avoiding the hypothesis of two separate oscillators, circadian plus circatidal [4] or two circalunidian clocks working in antiphase [6].

The circadian clock, the primitive clock?

The presence of tidal-oscillatory cryptochrome in oysters is remarkable in the evolutionary perspective. Circadian clocks are described in prokaryotes and eukaryotes, yet there is a debate about whether they have arisen independently or if there is a common ancestral clock [32]. As marine organisms are anterior to their terrestrial fellows, the question has been raised whether circadian oscillators could have evolved from tidal clocks [31]. Our findings suggest that they could be no tidal clock. Indeed, the oyster story tells us that tidal rhythm could have been generated by the circadian clock since the origin. This would be supported by the study of Tauber et al. [33] who proposed that the circadian clock period could have evolved in parallel to the day length, from 4 h, 1.9 Ga ago, to the present 24 h. That would require a weak and plastic circadian clock as we see in *C. gigas* today [10].

Rhythmic and non-rhythmic *cryptochrome* in adductor muscles

C. gigas possesses one skeletal muscle, the adductor muscle, composed of two physiologically distinct but contiguous parts, the striated and nonstriated muscles. The striated muscle initiates the closure and serves to perform rapid closing movements whereas the nonstriated muscle maintains the valve closure [14,15].

Interestingly, *Cgcry* oscillates in striated muscle but not in nonstriated, and its basal expression is also higher in striated muscle. It reaches its maximum concentration two hours before opening occurs to anticipate CgCRY protein synthesis. A simple hypothesis to explain such a difference of *Cgcry* expression in both muscles is that the striated muscle initiates the movement and the nonstriated muscle follows it. In this view, a rhythm only present in the striated component would be sufficient to ensure the rhythm in the whole muscle.

Saxitoxin disrupts the biological rhythm in oysters at relevant environmental concentrations

What insights on the molecular clock do oysters fed on STX-containing *A. minutum* provide? In striated muscle, *A. minutum*-fed oysters show *Cgcry* expression which was deeply disturbed and rhythmic valve activity which progressively vanished. Clearly, STX contamination disrupts the clock. At $\approx 200 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$, the percentage of rhythmic oysters decreased compared to individuals fed on *H. triquetra*, but a rhythm was still present at the group level; at $\approx 850 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ the rhythm was fully lost at both individual and group levels. As discussed earlier, this could be expected as the closely related TTX is a well-known clock disrupter.

Is *Cgcry* part of the entrainment pathway and/or a core component of the clock?

If *Cgcry* is only a synchronizer and not an essential part of the core clock in oysters, its disruption would lead only to a desynchronization of the tidal rhythmicity. The rhythm would persist. If *Cgcry* is in the central core, and eventually also part of the synchronizer, its disruption would lead to a disappearance of the rhythm. Here, at the lowest *A. minutum* concentration ($200 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$), valve-activity rhythm was weaker although still present, both at population and individual levels, whereas *Cgcry* oscillations stopped. At higher algal concentration ($850 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$), a full disruption of valve rhythmicity was observed, both at individual and group levels (Figs. 3A and 4). Thus, this full set of observations suggests that *Cgcry* would be a core constituent of the clock and not simply a synchronizer.

The molecular clock is an autoregulatory transcription-translation feedback loop essential to generate rhythmicity. It is known to be based on complex and multilayered networks and to include post-transcriptional and post-translational changes like phosphorylation and

methylation [12,34-37]. Thus, *Cgcry* would be a component of the clock in oysters, working in a network with other genes and regulated by multiple feedback loops which could compensate, at least transiently, for its dysfunction. Still, as there is a loss of rhythmicity at the individual level without it (Fig. 4), *Cgcry* appears important for the robustness of the clock.

Environmental relevance and implications for environmental concerns.

Alexandrium are dinoflagellates of worldwide distribution. Several species of that genus are harmful algae which have caused many Paralytic Shellfish Poison (PSP)-related events in coastal areas around the world from the USA to Asia and Europe [21]. Even in low concentration, they constitute a well-known risk for public health and cause losses for aquaculture and industry [38]. Blooms of *A. minutum* are more and more recurrent and algal concentrations in such a bloom can surpass 100 000 cells·ml⁻¹ [39,40]. All filter-feeders are potentially exposed to PSP toxins and several species, including *C. gigas*, are known to accumulate PSPs by feeding on PSP-producing algae [19]. Exposure to *Alexandrium sp.* has been reported to impact several bivalve organs (digestive gland, gills, adductor muscle, gonad) and therefore numerous functions such as feeding-activity, digestion, reproduction, larval survival, defense mechanisms [41-47]. *C. gigas* valve activity is also affected by *Alexandrium minutum*, resulting in increased opening duration and decreased valve amplitude [48,49]. *Alexandrium sp.* have also been reported to impact *Crassostrea* adductor muscle through myopathy and reversible paralysis [42,50]. The data presented here show that harmful algae can also deeply alter biological rhythms and as such can be classified as chronotoxic. In this regard, the long term contamination by these algal toxins could represent a significant decrease of fitness for filter feeders and an underestimated ecological problem in the marine environment.

2.5 Conclusion

This work is the first to show that a circadian clock gene can oscillate at circatidal frequency. This finding suggests that the circadian clock could generate tidal rhythmicity under tidal entrainment in the oyster. Until now, the two mostly often reported hypotheses explaining tidal rhythmicity in marine organisms both relied on two clocks: a circadian plus a circatidal one [4] or two circalunidian clocks working in antiphase [6]. The present hypothesis, originally suggested by Enright [8], requires only one clock to explain both circadian and circatidal rhythms: the existence of a weak circadian clock. In terms of evolution, the lack of an endogenous tidal clock would feed the debate on a primitive circadian clock.

2.6 Experimental procedures

General conditions

The experiment was performed at the Marine Station in Arcachon (France) in May - June 2011 on 99 Pacific oysters *Crassostrea gigas* originating from Arcachon Bay (70 ± 3 g fresh weight + shell; 70 ± 1 mm shell length; mean \pm SE). Animals were acclimated in the lab in running seawater for one week (natural light:dark cycles, no tides). Bivalves were then exposed in a 280 L flume (external diameter: 2 m; internal diameter: 1 m; depth: 0.12 m) in constant darkness (irradiance $1 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Biospherical Instruments Inc., USA) with a water current regime mimicking natural tidal cycles. The flume was isolated from external vibrations using anti-vibrating structures and placed in an isolated blind room to minimize external disturbances that could interfere with the spontaneous behavior of the oysters. Water was air-equilibrated using aquarium bubblers. Oysters were held in seawater of stable composition ($17.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7.9 \pm 0.1$; salinity $34.9 \pm 0.2 \text{‰}$; mean \pm SD). Temperature was automatically measured every 5 minutes with an electronic thermometer. Regularly, pH and salinity were manually measured with an R301 pH controller (Consort, Belgium) and a Cond 330 I conductivity probe (WTW, Germany).

All research presented here complied with French laws and was performed in conformity with institutional guidelines.

Simulated tidal cycle (STC)

Tidal entrainment was achieved with changes of water current at constant water level. Water current was generated in the flume using a multiple plate axis entrained by a motoreductor (MDP, France). A numerical card FIRST-DC-1C (MDP, France) regulated the velocity. The card was controlled by Labview (National Instrument). Water current oscillated alternatively in clockwise and counterclockwise directions following a sinusoidal curve to generate simulated tidal cycles. Maximum water velocity was $20 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ measured 11 cm above the bottom (Nortek Doppler Velocimeter, Nortek AS, Norway). These values are representative of speeds occurring *in situ* in the Bay of Arcachon: a maximum water velocity of $60 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ at the surface and of $0 - 15 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ at the bottom have been reported at Eyrac pier in front of the Marine Station of Arcachon [51]. The period of slack water was 12.4 h as the North Atlantic Ocean is characterized by semi-diurnal tide cycles, with slack water occurring at that period.

Algal culture

The non-toxic algal *Heterocapsa triquetra* (strain HT99PZ) and the saxitoxin-producing algal *Alexandrium minutum* (strain AM89BM) cultures were grown in f/2 medium [52] using artificial seawater. They were maintained at $17 \pm 1^\circ\text{C}$, under a light:dark regime 14:10. Both

species are dinoflagellates with similar morphology and size. The toxicity of *A. minutum* was assessed using an ELISA assay (Abraxis, USA): 0.45 ng·ml⁻¹ eq. STX were produced by 1000 cells·ml⁻¹.

Experimental protocol

Of the 99 oysters studied, 15 were equipped with electrodes to record their valve behavior during the entire experiment and then were sampled at the end to measure toxin accumulation. The 84 other oysters were sampled for *Cgcry* expression under *H. triquetra* and *A. minutum* exposure.

The two exposures were performed in serial order. Oysters were first exposed to the non-harmful algae *H. triquetra* for 144 hours, i.e. from $t_{0\text{ h}}$ to $t_{144\text{ h}}$, which corresponds to ≈ 12 tidal cycles. The flume was supplied with *H. triquetra* at a concentration of 10 000 cells·ml⁻¹ and a flow of 5 ml·min⁻¹ (peristaltic Gilson pump, USA) to maintain a stable concentration of 210 ± 11 cells·ml⁻¹ in flume water. Cell concentration was measured by a counter, Coulter Z2 (Beckman Coulter Inc., USA). For reference *Cgcry* expression in striated and nonstriated muscles, 42 oysters were sampled from $t_{114\text{ h}}$ to $t_{138\text{ h}}$: 6 every 4 hours for 24 hours. Tissues (approx. 80 mg) were kept in RNA later (Qiagen) at 4°C overnight and then placed at -80°C until genetic analyses.

Animals were then exposed to the toxic algae *A. minutum* for the next 168 hours, from $t_{144\text{ h}}$ to $t_{312\text{ h}}$, which corresponds to ≈ 14 tidal cycles. The flume was supplied with *A. minutum* at a concentration of 10 000 cells·ml⁻¹ and a flow of 5 ml·min⁻¹ to keep a stable concentration of 211 ± 12 cells·ml⁻¹ in flume water. This represents an environmentally relevant bloom condition. Forty two oysters were again sampled, 6 every 4 hours for 24 hours, from $t_{288\text{ h}}$ to $t_{312\text{ h}}$, to evaluate *Cgcry* expression in muscles of STX-exposed oysters.

Finally, the remaining oysters (that is the 15 animals equipped with electrodes) were exposed for 48 hours (≈ 4 tidal cycles), from $t_{312\text{ h}}$ to $t_{360\text{ h}}$, to *A. minutum* at a concentration of 853 ± 160 cells·ml⁻¹ in flume water. The flume was supplied with algae at 40 000 cells·ml⁻¹ at a flow of 6 ml·min⁻¹. At the end of the experiment, $t_{360\text{ h}}$, all oysters were sampled to measure the saxitoxin they had accumulated. Tissues (50-200 mg) were weighted, placed in 1 ml 0.1 mol·l⁻¹ HCL and stored at -80°C until used.

Crassostrea gigas behavior measurement

The valve activity of 15 oysters was studied using a laboratory made HFNI (High Frequency - Non Invasive) valvometer. Lightweight electromagnets (0.1 g), connected by flexible wires to an electronic box, were glued on each valve of each animal. The measure is an application of Maxwell’s law:

$$\varepsilon = -N \cdot \frac{\partial \phi_B}{\partial t}$$

Where \mathcal{E} is the electromotive force (volts), N the number of turns in the coil, Φ_B the magnetic flow (Weber) and t the time. Detailed basic principles are developed in Tran et al. [53] and Chambon et al. [54]. The sampling frequency for each individual was 0.2. Data were processed using Labview (National Instrument).

This study focused on the endpoints of mean hourly opening duration of each individual and of the group. This corresponds to the percentage of time oysters spend open each hour. Mean hourly opening is 100 % for an oyster open all the time during one hour. It is 0% for an animal which never opens its valves during one hour. All possible intermediary stages exist.

Data analysis

Chronobiological analyses were performed using the software Time Series Analysis Seriel Cosinor 6.3. The following steps were performed: first verification of the quality of the data, second determination of the periodicity of oyster behavior if any, and finally modeling of the potential rhythm [55-57].

Quality of the data set. The absence of randomness in the data set was controlled using the autocorrelation diagram and the absence of a stationary character was checked by a Partial Autocorrelation Function (PACF) calculation [58]. These controls indicated a real biological or physical phenomenon.

Search for periodicity. As suggested by Gouthière and Mauvieux [55] and Gouthière et al. [56,57], different methods were carried out to determine the period in the equispaced data: the Lomb and Scargle periodogram [59], the elliptic inverse spectral plot based on the surface of the confidence ellipse [60,61], the autoperiodogram and autospectral plot of Jenkins and Watts [62] and the Fourier periodogram. Importantly, these different methods always gave identical periods at the first decimal. To be accepted, a period had to be statistic with the Lomb and Scargle periodogram ($p = 0.95$). The confidence interval of the given period was specified by the method of Halberg [63].

Modeling and statistical validation. The rhythmicity was then modeled with the Cosinor model, which uses a cosine function calculated by regression [60,61]. For a given period, the model is written as: $Y(t) = A \cdot \cos(2\pi t/\tau + \varphi) + M + \epsilon(t)$ where A is the amplitude, φ the acrophase, τ the period, M the mesor and ϵ the relative error [55,56]. Two key tests were required to validate the model calculated and the existence of a rhythm: the elliptic test [60] must be rejected and the probability of the null amplitude hypothesis must be lower than 0.05. When we mention a rhythm it implies that these 2 tests have been fulfilled. The percent rhythm (PR) was evaluated as the percentage of the cyclic behavior explained by the model. Moreover, the strength of the rhythm was calculated by the rhythm index (RI) according to Dowse et al. [64]. It is the ratio between the 3rd and 1st peaks in the autocorrelation plot. For one given period and at a chosen probability ($p = 0.05$), secondary periodicities were explored by replacing the current data set by the residues of the calculated Cosinor.

Results are presented as means \pm 1 SE. For all statistical tests, significance was considered to be reached at $p = 0.05$.

Saxitoxin dosages

Saxitoxin was measured in nonstriated and striated muscle of the 15 oysters equipped with electrodes using a direct competitive ELISA assay (Abraxis, Novakits France) following the manufacturer’s instructions. Briefly, samples were crushed on ice then centrifuged at 4°C and 3500xg for 10 min. Samples were diluted to 1/20 or 1/100 depending on the sample and were added along with standards (50 μ l) in duplicates to the wells of the ELISA microtiter plate coated with a secondary sheep anti-rabbit antibody. Then 50 μ l of the saxitoxin-horseradish peroxidase (saxitoxin-HRP) conjugate solution and of the primary antibody solution (rabbit anti-saxitoxin) were added successively. The plates were incubated at room temperature for 30 min. Next, strips were washed four times using 300 μ l of washing solution. Then, 100 μ l of substrate solution was added to the wells and plates were incubated for 30 minutes at room temperature. Stop solution (100 μ l) was added to the wells and absorbance was read at 450 nm. Tissue concentration of saxitoxin and its derivatives were expressed in STX equivalents (eq. STX) according to toxin profiles for *C. gigas* and *A. minutum*, strain AM89BM [65].

Accumulation in striated and nonstriated muscles were compared with a paired test (Wilcoxon Signed Rank Test, $p=0.05$).

Total RNA extraction and reverse transcription of RNAs

Total RNA was extracted from approx. 80 mg of tissue using the “Absolutely RNA extraction” kit (Stratagen, Agilent) according to the manufacturer’s instructions. First-strand cDNA was then synthesized from RNA using the “First strand cDNA synthesis” kit (Stratagen, Agilent) according to the manufacturer’s instructions. Furthermore, we added a step of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) extraction to eliminate the maximum of lipids and proteins before loading the homogenate on the RNA-binding column. The cDNA mixture was stored at -80 °C until dosage in a real-time PCR reaction.

Real-time quantitative PCR

Real time PCR reactions were performed using a Stratagen apparatus and a “Brilliant III Ultra Fast SYBR Green QPCR Master Mix” kit (Stratagen Agilent) according to manufacturer’s instructions. The thermal program consisted of one warming step of 10 min at 95°C followed by 40 amplification cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30s and 72°C for 30 s. Reaction specificity was controlled using dissociation curves which were obtained by following the Sybr Green fluorescence level during a progressive heating of the PCR products from 60 to 95°C.

Each well contained 17 μ l of reaction mix including the Sybr Green, 1 μ l of cDNA and 2 μ l

Table 1: Nucleotide sequences of specific primer pairs used in the present study.

Gene	Function	Accession number	Sequence 5'-3'
28S	Large ribosomal subunit	Z29546	AAACACGGACCAAGGAGTCT ^a
			AGGCTGCCTTCACTTTCATT ^b
<i>cgCry</i>	Cryptochrome, clock gene	GQ415324	ATCTACGCTTTGGCTG ^a
			CCTCGTATCTGAGCTGC ^b

^aForward primer ; ^b reverse primer.

of the gene specific primer pair at a final concentration of 2 μ M for each primer. The primer pairs employed for the reaction are specified in Table 1. Relative quantification of the mRNA expression level of the gene *Cgcry* was normalized according to the mRNA expression level of the gene *28S*. Relative mRNA expression of *Cgcry* was determined by calculating $2^{\Delta Ct}$ where $\Delta Ct = Ct(28S) - Ct(\text{gene})$ where Ct is the cycle threshold from which the amplification enters in the exponential phase.

Acknowledgments

This work was supported by a ministerial scholarship to A.M., the project EC2CO-Cytrix (coordination INSU-CNRS) and OSQUAR (Région Aquitaine). Authors thank IFREMER (Lab Phycotoxines, F-44311 Nantes, France) and especially P. Lassus for furnishing *Alexandrium minutum* (strain AM89BM). Authors also thank P. Gonzalez and G. Daffe from the platform of Molecular Biology (UMR 5805) for their help in genetic analyses and K. Flynn for English corrections.

2.7 References

1. Pittendrigh, C.S. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 17-54.
2. Tessmar-Raible, K., Raible, F., Arboleda, E. (2011). Another place, another timer: marine species and the rhythms of life. *Bioessays.* 33, 165-172.
3. Gracey, A.Y., Chaney, M.L., Boomhower, J.P., Tyburczy, W.R., Connor, K., Somero, G.N. (2008). Rhythms of gene expression in a fluctuating intertidal environment. *Curr. Biol.* 18, 1501-1507.
4. Naylor, E. (2010). *Chronobiology of marine organisms.* (Cambridge University Press, Cambridge, UK), pp 242.
5. Webb, H.M. (1976). Interactions of daily and tidal rhythms. In *Biological rhythms in the marine environment*, D.J. DeCoursey, ed. (Columbia: University of South Carolina Press), pp 129-135.
6. Palmer, J.D. (1995). *The biological rhythms and clocks of intertidal animals.* (Oxford Univ. Press, New York), pp 217.
7. Palmer, J.D. (2000). The clocks controlling the tide-associated rhythms of intertidal animals. *BioEssays.* 22,32-37.
8. Enright, J.T. (1976). Resetting a tidal clock: a phase-response curve for *Excirolana*. In *Biological rhythms in the marine environment*, D.J. DeCoursey, ed. (Columbia: University of South Carolina Press), pp. 103-114.

9. Connor, K.M., Gracey, A.Y. (2011). Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *108*, 16110-16115.
10. Mat, A.M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D. (2012). Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiol. Int.* *29*: 857-867.
11. Tran, D., Nadau, A., Durrieu, G., Ciret, P., Parisot, J.P, et al. (2011). Field chronobiology of a molluscan bivalve : how the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiol. Int.* *28*:307-317.
12. Zhang, E.E., Kay, S.A. (2010). Clocks not winding down: unravelling circadian networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 764-776.
13. Galler, S. (2008). Molecular basis of the catch state in molluscan smooth muscles: a catchy challenge. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* *29*, 73-99.
14. Galtsoff, P.S. (1964). The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bull. Fish. Wildl. Serv. U. S.* *64*, 1-480
15. Hoyle, G. (1964). Muscle and neuromuscular physiology. In *Physiology of Mollusca Volume 1*, K.M. Wilbur, C.M. Yonge, eds. (New York and London: Academic Press), pp 313-351.
16. Noguchi, T., Watanabe, K. (2005). Tetrodotoxin resets the clock. *Eur. J. Neurosci.* *21*, 3361-3367.
17. Schwartz, W.J., Gross, R.A., Morton, M.T. (1987). The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *84*, 1694-1698.
18. Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., Okamura, H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* *302*, 1408-1412.
19. Bricelj, V.M., Shumway, S.E. (1998). Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science* *6*, 315-383.
20. Narahashi, T., Moore, J.W. (1968). Neuroactive agents and nerve membrane conductances. *J. Gen. Physiol.* *51*, 93-101.
21. Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (2003). *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Monographs on Oceanographic Methodology. (UNESCO, Paris, 11S), pp 793.
22. Lin, C., Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biology.* *6*, 220.1-220.9
23. Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.O., van der Horst, G.T.J., Batschauer, A., Ahmad, M. (2011). The cryptochromes : blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* *62*, 335-364.

24. Levy, O., Appelbaum, L., Leggat, W., Gothlif, Y., Hayward, D.C., Miller, D.J., Hoegh-Guldberg, O. (2007). Light-responsive cryptochromes from a simple multicellular animal, the coral *Acropora millepora*. *Science* 318, 467-470.
25. Maeda, K., Robinson, A.J., Henbest, K.B., Hogben, H.J., Biskup, T., Ahmad, M., Schleicher, E., Weber, S., Timmel, C.R., Hore, P.J. (2012). Magnetically sensitive light-induced reactions in cryptochrome are consistent with its proposed role as a magnetoreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109, 4774-4779.
26. Cashmore, A.R. (2003). Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell* 114, 537-543.
27. Lucas, R.J., Foster, R.G. (1999). Circadian clocks: a cry in the dark? *Curr. Biol.* 9, R825-R828.
28. Panda, S., Hogenesch, J.B., Kay, S.A. (2002). Circadian rhythms from flies to humans. *Nature* 417, 329-335.
29. Emery, P., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C., Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*. 95, 669-679.
30. Krishnan, B., Levine, J.D., Lynch, M.K.S., Dowse, H.B., Funes, P., Hall, J.C., Hardin, P.E., Dryer, S.E. (2001). A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature* 411, 313-317.
31. Wilcockson, D., Zhang, L. (2008). Circatidal clocks. *Curr. Biol.* 18, R753-755.
32. Young, M.W., Kay, S.A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.* 2, 702-715.
33. Tauber, E., Last, K.S., Olive, P.J.W., Kyriacou, C.P. (2004). Clock gene evolution and functional divergence. *J. Biol. Rhythms* 19, 445-458.
34. Cermakian, N., Sassone-Corsi, P. (2000). Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 59-67.
35. Roenneberg, T., Mrosovsky, M. (2003). The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr. Biol.* 13, R198-R207.
36. Roenneberg, T., Mrosovsky, M. (2005). Circadian clocks - the fall and rise of physiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 965-971.
37. Mrosovsky, M., Roenneberg, T. (2007). Circadian clock: time for a phase shift of ideas? *Curr. Biol.* 17, R636-R638.
38. Hoagland, P., Anderson, D.M., Kaoru, Y., White, A.W. (2002). The economic effects of harmful algal blooms in the United States: estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries* 25, 819-837.
39. Bravo, I., Vila, M., Maso, M., Figueroa, R.I., Ramilo, I. (2008). *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* blooms in the Mediterranean Sea: toward the identification of ecological niches. *Harmful Algae* 7, 515-522.

40. Pitcher, G.C., Cembella, A.D., Joyce, L.B., Larsen, J., Probyn, T.A., Ruiz Sebastian, C. (2007). The dinoflagellate *Alexandrium minutum* in Cape Town harbour (South Africa): bloom characteristics, phylogenetic analysis and toxin composition. *Harmful Algae* 6, 823-836.
41. Galimany, E., Sunila, I., Hégaret, H., Ramon, M., Wikfors, G.H. (2008). Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae* 7, 702-711.
42. Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Moal, J., Suquet, M., Guéguen, M., Sunila, I., Soudant, P. (2010a). Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 9, 427-439.
43. Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Guéguen, M., Moal, J., Palacios, E., Lassus, P., Soudant, P. (2010b). Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicol.* 97, 96-108.
44. Lassus, P., Bardouil, M., Beliaeff, B., Masselin, P., Naviner, M., Truquet, P. (1999). Effect of a continuous supply of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim on the feeding behavior of the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res.* 18, 211-216.
45. Navarro, J.M., Contreras, A.M. (2010). An integrative response by *Mytilus chilensis* to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Mar. Biol.* 157, 1967-1974.
46. Wildish, D., Lassus, P., Martin, J., Saulnier, A., Bardouil, M. (1998). Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* sp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 11, 35-43.
47. Yan, T., Zhou, M., Fu, M., Wang, Y., Yu, R., Li, J. (2001). Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop, *Chlamys farreri*, associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Toxicon.* 39, 1239-1244.
48. Haberkorn, H., Tran, D., Massabuau, J.C., Ciret, P., Savar, V., Soudant, P. (2011). Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1191-1197.
49. Tran, D., Haberkorn, H., Soudant, P., Ciret, P., Massabuau, J.C. (2010). Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture* 298, 338-345.
50. Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Lambert, C., Shumway, S.E., Bérard, J.B., Lassus, P. (2007). Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* 152, 441-447.

51. Massabuau, J.C., Forgue, J. (1996). A field versus laboratory study of blood oxygen status in normoxic crabs at different temperatures. *Can. J. Zool.* *74*, 423-430.
52. Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine invertebrates animals*, W.L. Smith and M.H. Chanley, eds (Plenum Press: New York), pp 29-60.
53. Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., Massabuau, J.C. (2003). Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* *22*, 116–122.
54. Chambon, C., Legeay, A., Durrieu, G., Gonzalez, P., Ciret, P., Massabuau, J.C. (2007). Influence of the parasite worm *Polydora sp.* on the behavior of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. *Mar. Biol.* *152*, 329-338.
55. Gouthière L, Mauvieux B. (2004). Étapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers, modélisation. XXXVème Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie, Université de Saint Etienne, France du 10 au 12 Juin 2003. Quelques aspects sur la Chronobiologie. (Presses Universitaires de Saint Etienne 2004), pp 10.
56. Gouthière, L., Claustrat, B., Brun, J., Mauvieux, B. (2005a). Complementary methodological steps in the analysis of rhythms: search of periods, modelling. Examples of plasma melatonin and temperature curves. *Pathol. Biol.* *53*, 285-289.
57. Gouthière, L., Mauvieux, B., Davenne, D., Waterhouse, J. (2005b). Complementary methodology in the analysis of rhythmic data, using examples from a complex situation, the rhythmicity of temperature in night shift workers. *Biol. Rhythm Res.* *36*, 177-193.
58. Box, G.E.P., Jenkins, G.M., Reinsel, G.C. (1994). *Time series analysis: forecasting and control*. 3rd ed. (New York: Prentice Hall), pp 598.
59. Scargle, J.D. (1982). Studies in astronomical time series analysis. II. Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. *Astrophys. J.* *263*, 835–853.
60. Bingham, C., Arbogast, B., Cornélissen, G., Lee, J.K., Halberg, F. (1982). Inferential statistical methods for estimating and comparing Cosinor parameters. *Chronobiologia* *9*, 397-439.
61. Nelson, W., Tong, Y.L., Lee, J.K., Halber, F. (1979). Methods for Cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* *6*, 305-323.
62. Jenkins, G.M., Watts, D.G. (1968). *Spectral analysis and its applications*. (San Francisco: Holden Day), pp 525.
63. Halberg, F. (1969). Chronobiology. *Annu Rev Physiol.* *31*, 675-725.
64. Dowse, H.B., Ringo, J.M., Power, J., Johnson, E., Kinney, K., White, L. (1995). A congenital heart defect in *Drosophila* caused by an action potential mutation. *J. Neurogenet.* *10*, 153-168.

65. Guéguen, M., Bardouil, M., Baron, R., Lassus, P., Truquet, P., Massardier, J., Amzil, Z. (2008). Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat. Living Resour.* 21, 13-20.

3. Conclusions

Jusqu’à présent, en ce qui concerne l’horloge moléculaire chez les organismes marins, seule une oscillation circadienne de *cry* avait été rapportée dans les branchies chez la moule *Mytilus californianus* soumise à des cycles de marée naturels ou simulés (Connor et Gracey, 2011). L’expérience présentée dans ce chapitre indique, pour la première fois, qu’un gène de l’horloge circadienne peut fonctionner à une fréquence tidale. En effet, nos observations montrent que la transcription du gène *cryptochrome* oscille à une fréquence tidale dans le muscle strié d’huîtres soumises à un cycle de marée simulé en condition d’obscurité constante et exprimant un rythme tidal d’activité valvaire. La transcription précède le rythme d’activité valvaire d’environ deux heures, ce qui souligne le rôle de l’horloge destinée à anticiper les changements de l’environnement. Par ailleurs, il s’avère que la saxitoxine perturbe à la fois le rythme tidal d’activité valvaire de l’huître et l’oscillation de la transcription de *Cgcry* dans le muscle strié, en présentant un effet dose.

Ces résultats favorisent donc pleinement l’hypothèse selon laquelle l’activité tidale de l’huître serait générée de façon endogène par l’horloge circadienne, synchronisée par les marées. Cette proposition va à l’encontre des théories dominant la chronobiologie marine (Naylor, 2010 ; Palmer, 1995a) mais permettrait d’expliquer qu’aucun gène tidal ou lunidien n’ait été trouvé jusqu’à présent. C’est en revanche la première démonstration expérimentale de l’hypothèse proposée par Enright (1976a, b) d’un oscillateur circadien pouvant fonctionner à une fréquence tidale, d’après ses travaux chez *Excirolana chiltoni*.

En outre, ces observations obtenues en conditions d’obscurité constante attribuent un rôle nouveau à cryptochrome. Ce rôle est toutefois à affiner : cette protéine CgCRY fait-elle partie de l’entraînement de l’horloge de l’huître, et/ou constitue-t-elle un composant même de l’oscillateur ? Si *Cgcry* n’intervient que dans l’entraînement de l’horloge sans appartenir à l’horloge centrale, la perturbation de son oscillation ne devrait pas entraîner la perte du rythme mais uniquement sa désynchronisation par rapport au zeitgeber. Or, l’algue *A. minutum* induit à la fois l’altération de la transcription de *Cgcry* dans le muscle et une perte de rythmicité au niveau de l’activité valvaire, perte de rythmicité qui croît avec la concentration en algue toxique. Ce rôle dans l’entraînement tidal de l’oscillateur circadien semble donc peu probable. En ce qui concerne un rôle au cœur même de l’horloge, la perte de rythmicité lorsque les huîtres sont exposées à *A. minutum* n’est pas totale à la concentration la plus faible. Toutefois, des travaux récents menés sur des fibroblastes de rats indiquent que la cyclicité des cryptochromes n’est pas indispensable au fonctionnement de l’horloge (Fan et al., 2007), contrairement à ce qui apparaissait jusque-là. De nouvelles pistes sont donc envisagées pour compléter le mécanisme de l’horloge (Morrow et Roenneberg, 2007), une

horloge aujourd'hui décrite au niveau moléculaire comme un réseau complexe incluant de nombreuses interactions (Zhang et Kay, 2010). *Cgcry* pourrait donc être un composant essentiel à l'horloge, mais fonctionnant dans un réseau capable au moins transitoirement de compenser un dysfonctionnement. De nouvelles investigations seront nécessaires pour éclairer ces aspects.

Par ailleurs, en ce qui concerne l'évolution des espèces, les données obtenues dans ce travail apportent de nouvelles informations et alimentent le débat concernant l'évolution des horloges biologiques entre les organismes marins et terrestres. En effet, les organismes marins ayant d'un point de vue évolutif précédés les espèces terrestres, la question a été posée de savoir si l'horloge circadienne pourrait avoir évolué de l'horloge circatidale (Wilcockson et Zhang, 2008). Si l'absence d'une horloge circatidale venait à être confirmée, ou simplement la possibilité pour une horloge circadienne d'osciller à une fréquence tidale, cela laisserait la place à de nouvelles investigations sur l'évolution des mécanismes temporels du vivant. L'évolution des rythmes biologiques a pu se faire uniquement à partir d'une horloge circadienne plastique.

Finalement, l'expérience décrite dans le présent chapitre souligne l'impact de l'algue toxique *A. minutum*, qui produit la saxitoxine, sur le rythme de *C. gigas*. Il s'agit d'un résultat totalement original en toxicologie aquatique, qui ouvre de nouvelles voies d'analyse dans le domaine. Il s'agit aussi d'une perturbation importante pour les organismes qui la subissent. On considère généralement que les rythmes biologiques confèrent un avantage adaptatif, permettant aux organismes d'anticiper les changements de leur environnement et d'organiser leur physiologie et leur comportement afin qu'ils se produisent au meilleur moment (Edery et al., 2000). Les rythmes servent également à séparer des processus différents afin qu'ils n'interagissent pas entre eux et à optimiser le métabolisme et les dépenses énergétiques (Rutter et al., 2002). Une perturbation de ces rythmes représente donc une perte de « fitness ». Si l'horloge ne fonctionne pas, c'est l'ensemble du métabolisme lié à l'horloge qui peut être impacté. Par ailleurs, ces résultats suscitent diverses réflexions sur cet impact d'*A. minutum* sur le rythme de l'huître. Les concentrations appliquées ici, 200 à 850 cellules / ml, sont des concentrations modérées d'un point de vue environnemental en cas d'efflorescence. Quelle est la durée de l'impact sur les rythmes ? Si les bivalves accumulent les toxines PSP dans leurs tissus, ils peuvent également se détoxifier, avec des cinétiques variables selon les espèces (Bricelj et Shumway, 1998). Y a-t-il donc un impact à moyen ou long terme d'une efflorescence d'algues toxiques in situ ? Que se passe-t-il en cas d'exposition chronique ou d'expositions revenant à fréquence trop élevée ? L'horloge circadienne intervenant également dans les rythmes saisonniers, l'impact sur l'organisme varie-t-il selon le mois durant lequel il se produit ? Enfin, cet impact d'*A. minutum* sur *C. gigas* au niveau moléculaire, sur

l’expression de *Cgry*, constitue un résultat original. Est-ce là la seule altération qu’il produit sur l’huître à cette échelle ? Cette dernière question fait l’objet du prochain chapitre.

Chapitre 6

Impacts génétiques et génotoxicité

1. Introduction

Les travaux présentés jusqu'ici ont permis de caractériser les rythmes biologiques de référence de l'huître *C. gigas* (Chapitres 3 et 4) et d'approcher les mécanismes moléculaires sous-jacents. Par ailleurs, nous avons montré que l'algue toxique *A. minutum* a un impact sur le rythme biologique de l'huître creuse, tant au niveau comportemental que moléculaire (Chapitre 5). Nous étendons dans ce chapitre l'étude des perturbations qu'*A. minutum* peut avoir sur *C. gigas* à l'échelle moléculaire.

Chez les bivalves, de nombreux impacts ont été attribués aux toxines PSPs et aux algues qui les produisent : des modifications des contenus lipidiques dans la glande digestive, une augmentation de la production de mucus dans les branchies, des myopathies (Haberkorn et al., 2010a), des modifications du comportement valvaire (Haberkorn et al., 2011 ; Nagai, 2006 ; Tran et al., 2010), une inhibition de la nutrition (Lassus et al., 1999 ; Navarro et Contreras, 2010 ; Wildish, 1998), une paralysie musculaire (Galimany et al., 2008 ; Héguaret et al., 2007) accompagnée d'une incapacité à s'enfouir dans le sédiment (Bricelj et al., 2005), l'apparition de réponses inflammatoires (Galimany et al., 2008 ; Haberkorn et al., 2010a ; Héguaret et al., 2009), une diminution de l'activité des spermatozoïdes (Haberkorn et al., 2010a) et de la survie des larves (Yan et al., 2001). De nombreuses fonctions sont donc altérées. Pourtant, les modifications éventuellement induites au niveau moléculaire ne sont à notre connaissance pas connues actuellement. Nous avons néanmoins vu au chapitre 5 que l'expression du gène *Cgcry* est modifiée chez des huîtres exposées à *A. minutum*. Le présent chapitre vise donc à élargir nos connaissances sur les perturbations causées par *A. minutum* au niveau moléculaire. Outre celle du gène *Cgcry*, cette micro-algue perturbe-t-elle la transcription d'autres gènes, sélectionnés et étudiés en raison de leur appartenance à quelques voies métaboliques particulièrement importantes ? Par ailleurs, un impact génotoxique se superpose-t-il à cet impact génétique ? La génotoxicité des algues toxiques dans des conditions environnementales est encore une question en suspens. En ce qui concerne les PSPs, seule une étude portant sur le poisson *Diplodus sargus* mentionne une augmentation des déformations au niveau du noyau d'érythrocytes après injection intra-cœlomique de PSPs produites par l'algue *Gymnodinium catenatum* (Reis Costa et al., 2012). Il n'y a pas de donnée connue pour les bivalves.

Afin de répondre à ces questions, nous avons acclimaté et nourri des huîtres avec l'algue non-toxique *Chaetoceros gracilis*. Ensuite, pendant 48 h, une partie des animaux a été exposée à *A. minutum* dans des conditions imitant une efflorescence d'algues. Des analyses génétiques et génotoxiques ont été réalisées sur l'ensemble des huîtres.

2. Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*.

Audrey M. Mat¹, Hansy Haberkorn^{1,2}, Jean-Paul Bourdineaud¹, Jean-Charles Massabuau^{1,2}
and Damien Tran^{1,2} *.

¹Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France.

²CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France.

* to whom correspondence should be addressed.

Email: d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33(0)5 56 22 39 37

2.1 Abstract

Behavioral, genetic and genotoxic impacts of the paralytic shellfish poisons-producing algae *Alexandrium minutum* on the oyster *Crassostrea gigas* have been assessed on 31 animals using valvometry, RT-PCR and RAPD-PCR. After acclimation period, exposition was performed at environmental relevant dose, during 48 hours, mimicking an algal bloom ($\approx 1600 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$). Control oysters were fed with *Chaetoceros gracilis* at a concentration of $\approx 2500 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$. First, results indicate that *A. minutum* disturbed oyster behavior, as reported in the literature: animals exhibited reduced valve-opening amplitude and increased micro-closure activity. Second, RT-PCR shows that gene transcription levels were modified under *A. minutum* exposure. A repression of genes involved in the oxidative metabolism, the mitochondrial metabolism, the endogenous clock, immunity and detoxification processes was observed. Third, oysters fed on *A. minutum* exhibited DNA impacts, both quantitative and qualitative. Indeed, both the PCR product profile and the number of hybridization sites for the RAPD probe OPB7 were modified. These original data indicate for the first time molecular effects of the toxic algae *A. minutum* in the oyster *C. gigas*.

Keywords: bivalve; saxitoxin; PSP; Harmful Algae Bloom HAB; gene expression

2.2 Introduction

World's oceans present huge biodiversity. Among their inhabitants, planktonic microalgae occupy marine waters where they can proliferate and reach up to millions of cells per liter. Such proliferations are called algal blooms. If proliferation of most species is beneficial as they serve as food for many organisms, others produce toxins and are therefore harmful for shellfish, fish and humans (Hallegraeff et al., 2003). The genus *Alexandrium* designates dinoflagellates of global distribution, and about half of the species of that genus are harmful algae. *Alexandrium spp.* are particularly known for the numerous Paralytic Shellfish Poisons (PSPs) related events they caused in coastal areas in the world. Among them, *Alexandrium minutum* has been observed in various regions like Europe, the west coast of the USA, Asia, Australia and New Zealand (Anderson et al., 2012; Bricelj and Shumway, 1998; Hallegraeff et al., 2003). PSPs toxins refer to about 20 structurally related derivatives which basic molecular structure is that of saxitoxin (STX), a neurotoxin that induces a reversible block of ion transport by the sodium channel in nerve fibres (Bricelj and Shumway, 1998; Narahashi and Moore, 1968).

Being sessile, bivalve mollusks are filter-feeders. They are known to accumulate PSPs while feeding on PSPs-producing microalgae (Bricelj and Shumway, 1998). Toxins may also be transferred through the trophic web. PSP events represent therefore a risk for public health (there is no antidote against STX), but also for marine ecosystems and fisheries resources (Hoagland et al., 2002). In bivalves, the digestive gland is the main storage organ for PSPs (Guéguen et al., 2008 ; Lassus et al., 1992, 1997 ; Li et al., 2005).

The oyster *Crassostrea gigas* is an important resource in aquaculture. Many studies considered the impacts of *A. minutum* on bivalves, which are numerous. Haberkorn et al. (2010a) reported pathological changes in oysters *C. gigas* exposed to *A. minutum*. They mentioned an inflammatory response in the digestive gland, higher mucus production in gills and myopathies in the adductor muscle. Additionally, spermatozoa produced by *A. minutum* exposed oysters have been reported to be less active (less motile and lower ATP content) than those produced by *I. galbana* exposed oysters. *A. minutum* was also mentioned to induce tissue degradation, with modification of lipid content in the digestive gland (Haberkorn et al., 2010a, 2010b). An inflammatory response has also been reported in mussels *Mytilus edulis* fed on *A. fundyense* (Galimany et al., 2008). Impacts on reproduction have been described in the scallop *Chlamys farreri* as well, in which *A. tamarense* was reported to induce decreased egg hatching success and survival of the larvae (Yan et al., 2001). At behavioral level, valve activity modifications have been reported in *C. gigas* upon *A. minutum* exposure (Tran et al., 2010; Haberkorn et al., 2011). Besides, oysters *C. gigas* and mussels *Mytilus chilensis* exposed to *Alexandrium* species were reported to present inhibition of feeding activity, of shell-valve activity, clearance, filtration and biodeposition rates (Lassus et al., 1999; Navarro et Contreras, 2010; Wildish et al., 1998). Additionally, paralysis of the adductor muscle has

been mentioned for oysters *Crassostrea virginica* and mussels *Mytilus edulis* exposed to *Alexandrium fundyense* (Galimany et al., 2008; Héguaret et al., 2007). In the clam *Mya arenaria*, burrowing incapacitation has been attributed to muscle paralysis caused by PSPs as well (Bricelj et al, 2005).

The objectives of the present study was to determine whether *A. minutum* impacts the oyster *C. gigas* at molecular level, either through potential modification in the transcription of selected genes or through genotoxic effect. To address this question, we exposed control oysters to the non toxic species *Chaetoceros gracilis* (2466 ± 427 cells·ml⁻¹) and others to *Alexandrium minutum* (1609 ± 295 cells·ml⁻¹).

2.3 Experimental procedures

General conditions

The experiment was performed on 31 Pacific oysters *Crassostrea gigas* (28 ± 1 g fresh weight including shells; 70 ± 1 mm shell length; mean \pm SE) from the Bay of Arcachon, France. Analyses were conducted at the Marine Station in Arcachon in May 2010. Oysters were acclimated for 10 days in the laboratory in running seawater at 100 ml·min⁻¹ and under alternation of light and dark periods of 12 h each.

Oysters were isolated from external vibrations using an anti-vibrating bench and the experiment was conducted in an isolated blind room to minimize any external influences on animals' behavior. Oysters were placed in four 10.5 L tanks (0.35 x 0.25 x 0.12 m), with 7 or 8 oysters in each tank. Each tank was continuously supplied with seawater and algae at a total flow of 100 ml·min⁻¹. Seawater was of constant composition with a salinity of 32.0 ± 0.1 ‰ (mean \pm SE), a constant temperature of 18.1 ± 1.0 °C (mean \pm SD) and a pH of 7.9 ± 0.02 (mean \pm SE). Upstream, two tanks in series (45 and 0.2 m³), with different retention times, were used to homogenize seawater pumped from the bay. Temperature was automatically measured every 5 minutes with an electronic thermometer. The pH value and salinity were measured daily with a R301 pH meter (Consort, Belgium) and a Cond 330 I conductivity probe respectively (WTW, Germany). Water was air-equilibrated with aquarium bubblers.

Algal culture

The non-toxic algae *Chaetoceros gracilis* and the saxitoxin-producing algae *Alexandrium minutum* (strain AM89BM) cultures were grown in f/2 medium (Guillard, 1975) using artificial seawater. Cultures were maintained at 17 ± 1 °C, under alternation of light and dark periods of 14 and 10 h, respectively.

Experimental conditions

First, all oysters (4 tanks) were exposed to the non harmful algae *Chaetoceros gracilis* for 7 days at a concentration of $1755 \pm 358 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tanks were supplied with *C. gracilis* at $100 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ and a concentration of $20\,000 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$. Cell concentration was measured by a Beckman Coulter Z2 (Beckman Coulter Inc., USA). Afterwards, 2 tanks remained exposed to *C. gracilis* at a concentration of $2466 \pm 427 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ and supplied at $100 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ and a concentration of $20\,000 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$. Oysters in the 2 other tanks were exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum* at a concentration of $1609 \pm 295 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$. These 2 tanks were supplied with algae at $100 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ and a concentration of $2\,000 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$. Concentration in tanks was kept stable.

At the end of the experiment, contaminated oysters were sampled to measure the Paralytic Shellfish Poisons (PSPs) they accumulated in the digestive gland. The gland (50-200 mg) was weighted, placed in 1 ml HCL $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and stored at -80°C for PSPs assay. Gills (approx. 50 mg) were sampled, kept in RNA later (Qiagen) and placed at -80°C for transcriptional analysis. Additionally, about 100 mg of gills were also separately stored at -80°C for RAPD analysis.

Crassostrea gigas behavior measurement

Valve activity of oysters was studied using HFNI (High Frequency – Non Invasive) valvometer. Lightweight electromagnets (0.1 g) were glued on each valves of each animal. These electrodes are connected by flexible wires to a lab or field valvometer. The measure is an application of Maxwell's law:

$$\varepsilon = -N \cdot \frac{\partial \Phi_B}{\partial t}$$

Where ε is the electromotive force (volts), N the number of turns in the coil, Φ_B the magnetic flow (Webber) and t the time. Detailed basic principles are developed in Tran et al. (2003) and Chambon et al. (2007). The sampling frequency on each individual was 0.2 Hz. Data were processed using Labview (National Instrument).

Paralytic Shellfish Poisons dosages

PSPs were measured in the digestive gland using a direct competitive ELISA assay (Abraxis, Novakits, France) following manufacturer's instructions. Samples were crushed on ice and then centrifuged at 4°C and $3500 \times g$ for 10 min. Afterwards, they were diluted to 1/250 or 1/1000 depending on the sample. Standard solutions and samples were added in duplicates (50 μl) into wells of an ELISA microtiter plate coated with a secondary sheep anti-rabbit antibody. Then, successively 50 μl of the saxitoxin-horseradish peroxidase (saxitoxin-HRP) conjugate solution and of the primary antibody solution (rabbit anti-saxitoxin) were added.

Table 1: Nucleotide sequences of specific primer pairs used in the present study.

Gene	Function of the encoded protein	Accession number	Sequence 5'-3'
<i>28S</i>	28S RNA making part of the large ribosomal subunit	Z29546	AAACACGGACCAAGGAGTCT ^a AGGCTGCCTTCACTTTCATT ^b
<i>cat</i>	Catalase, involved in the neutralization of the oxidative stress	EF687775	AACTACTCGCTGAGGTG ^a GGTCTTGGCTTTGTATGG ^b
<i>cox1</i>	Cytocrome <i>c</i> oxidase subunit 1, involved in the mitochondrial respiration	NC_001276	TTACGCTTCACGACACT ^a AACTACTCGACGTGGT ^b
<i>Cgcr1</i>	Cryptochrome, involved in the circadian clock	GQ415324	ATCTACGCTTTGGCTG ^a CCTCGTATCTGAGCTGC ^b
<i>gpx</i>	Glutathione peroxidase, involved in the neutralization of the oxidative stress	EF692639	GACCGTGGAAACCAATGGACATC ^a GTTGGATTTCGGACACAGATAGGG ^b
<i>ilk</i>	Interleukin 17, involved in the immune response	EF190193	AGCATCAAAGCCATCAC ^a ACTCTCACTGGCCTGTGA ^b
<i>mdr</i>	Multidrug resistance protein, involved in the detoxification process	EU073425	CACGGCAGTCATGTTC ^a TCCTCGGAGTAAGGGT ^b
<i>mt2</i>	Metallothionein, involved in zinc and copper homeostasis and in the general stress response	AJ297818	TCCGGATGTGGCTGCAAAGTCAAG ^a GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT ^b
<i>sod(Cu/Zn)</i>	Cytoplasmic superoxide dismutase, involved in the neutralization of the oxidative stress	AJ496219	CTCCTGGAACACCTGTGACATTG ^a GTGCTCTCGTGATCCTCTGG ^b

^aForward primer ; ^b reverse primer. Primers for *28S*, *sod*, *cat* and *gpx* genes were designed according to Jo et al. (2008)

Plates were incubated for 30 min at room temperature and washed four times using 300 µl of washing solution. Afterwards, 100 µl of substrate solution, containing tetramethylbenzidine, were added in each well and plates were incubated for 30 minutes at room temperature. Finally, a stop solution (100 µl), containing sulfuric acid, was added to the wells and absorbance was read at 450 nm. The intensity of the blue colour is inversely proportional to the concentration of the PSPs present in the sample since the sample's PSPs enters in competition with the saxitoxin-HRP conjugate for binding to the primary antibody. The conversion between PSPs and STX equivalents (eq. STX) was done using the following formula:

$$[\text{eq. STX}] = [\text{PSPs}] \cdot 4 \cdot 0.75 + [\text{PSPs}] \cdot 50 \cdot 0.25$$

where concentrations are expressed in µg·100 g⁻¹ wet weight. The different factors included in the formula come from the different toxin derivatives produced by *A. minutum* and accumulated in oysters. The factors 4 and 0.75 result from the fact that the primary antibody cross-reacts at 25% with gonyotoxins (GTX) 2 and 3 while they represent about 75% of the toxin profile in oysters. The factors 50 and 0.25 result from the fact that the primary antibody cross-reacts at 2% with sulfo GTX 1 and 2 at 2% while they represent about 25% of the toxin profile in oysters (Guéguen et al., 2008).

Total RNA extraction and reverse transcription of RNAs

Total RNA was extracted from approximately 40 mg of tissue using the “Absolutely RNA extraction” kit (Stratagen, Agilent) according to manufacturer's instructions. First-strand cDNA was then synthesized from RNA using the “AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis” kit (Stratagen, Agilent) according to manufacturer's instructions. Furthermore, we added a step of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) extraction to eliminate the maximum of lipids and proteins before loading the homogenate on the RNA-binding column. The cDNA was then stored at -80 °C until real-time PCR reaction.

Real-time quantitative PCR

Real time PCR reactions were performed using the LightCycler apparatus (Roche) and cDNA amplification was monitored using the DNA intercalating dye SybrGreen I (Stratagen, Agilent). Each 20 µl reaction contained 2 µl of cDNA, 2 µl of the gene specific primer pair (final concentration 3 µM for each) and 16 µl of PCR mix. The expression of the following selected genes was addressed: *cat*, *cox1*, *Cgcry*, *gpx*, *ilk*, *mdr mt2* and *sod*. Primer pairs used to determine gene expression are listed in Table 1. The PCR mix consisted of 11.8 µl of PCR grade water, 3.2 µl of 25mM MgCl₂ and 1 µl of Roche solution including the polymerase, dNTPs and the SybrGreen fluorescent dye. The thermal program consisted of one warming step of 10 min at 95°C followed by 50 amplification cycles at 95°C for 5 s, 60°C for 5s and 72°C for 20 s. Reaction specificity was controlled using dissociation curves. Dissociation

curves were obtained by following the Sybr Green fluorescence level during a progressive heating of the PCR products from 60 to 95°C. Relative quantification of each gene expression level was normalized to the 28S ribosomal RNA gene expression and determined by calculating $2^{\Delta Ct}$ where $\Delta Ct = Ct(28S) - Ct(\text{gene})$ where Ct is the cycle threshold from which the amplification enters in the exponential phase. The 28S gene was a stable reference. The mean Ct \pm SEM for control and exposed oysters were not different, 5.8 ± 0.2 and 5.2 ± 0.3 respectively ($p=0.059$). The differential expression of a gene was calculated as the ratio of its relative expression, in exposed condition to that in the control condition.

Genotoxicity assessment

Genotoxicity was studied using the modified Random Amplification of Polymorphic DNA method described in Cambier et al. (2010). Combined with PCR, this method permits the detection of DNA modifications at low contamination levels.

DNA isolation was realized with a DNA extraction kit (Stratagen, Agilent) following manufacturer's instructions. DNA was kept in 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA buffer and diluted to a concentration of $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

RAPD reactions were performed with a LightCycler apparatus (Roche) using the following decamer oligonucleotides described in Cambier et al. (2010): OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3') and OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3'). Each capillary reaction was loaded to 20 μl with 2 μl of genomic DNA, 2 μl of the gene specific primer pair (final concentration 6 μM) and 16 μl of PCR mix. The thermal program consisted of one warming step of 10 min at 95°C followed by 50 amplification cycles at 95°C for 5 s, 50°C for 5s and 72°C for 30 s. In order to detect finer genotoxic effects, a second thermal program was applied, consisting of one warming step of 10 min at 95°C followed by 50 amplification cycles at 95°C for 5 s, 60°C for 5s and 72°C for 30 s.

The threshold cycle obtained with the 28S ribosomal RNA gene probes, Ct(28S), is just indicating $2 \times N_{28S}$ hybridization events per genome unit, where N_{28S} stands for the total number of 28S ribosomal RNA gene copies per diploid genome (two PCR probes on each of 28S locus). Therefore, the total number of hybridization sites per genome unit of a RAPD probe is $2^{[Ct(28S) - Ct(\text{probe}) + 1]} \times N_{28S}$, where Ct(probe) is the threshold cycle value of a PCR performed with a single RAPD probe (either OPB7 or OPB11). Since we are ignoring N_{28S} in the *C. gigas* species, we can only access to the relative number of hybridization sites which is equal to the total number of hybridization sites divided by N_{28S} , that is $2^{[Ct(28S) - Ct(\text{probe}) + 1]}$. Melting temperature curve analysis was performed using the LightCycler software 3.5 (Roche). For each RAPD-PCR reaction, the melting temperature T_m obtained for each PCR peak was listed in a table covering 12 temperature intervals ranging from 74°C to 92°C. The frequency of occurrence of melting peaks for each interval was compared between controls and exposed oysters.

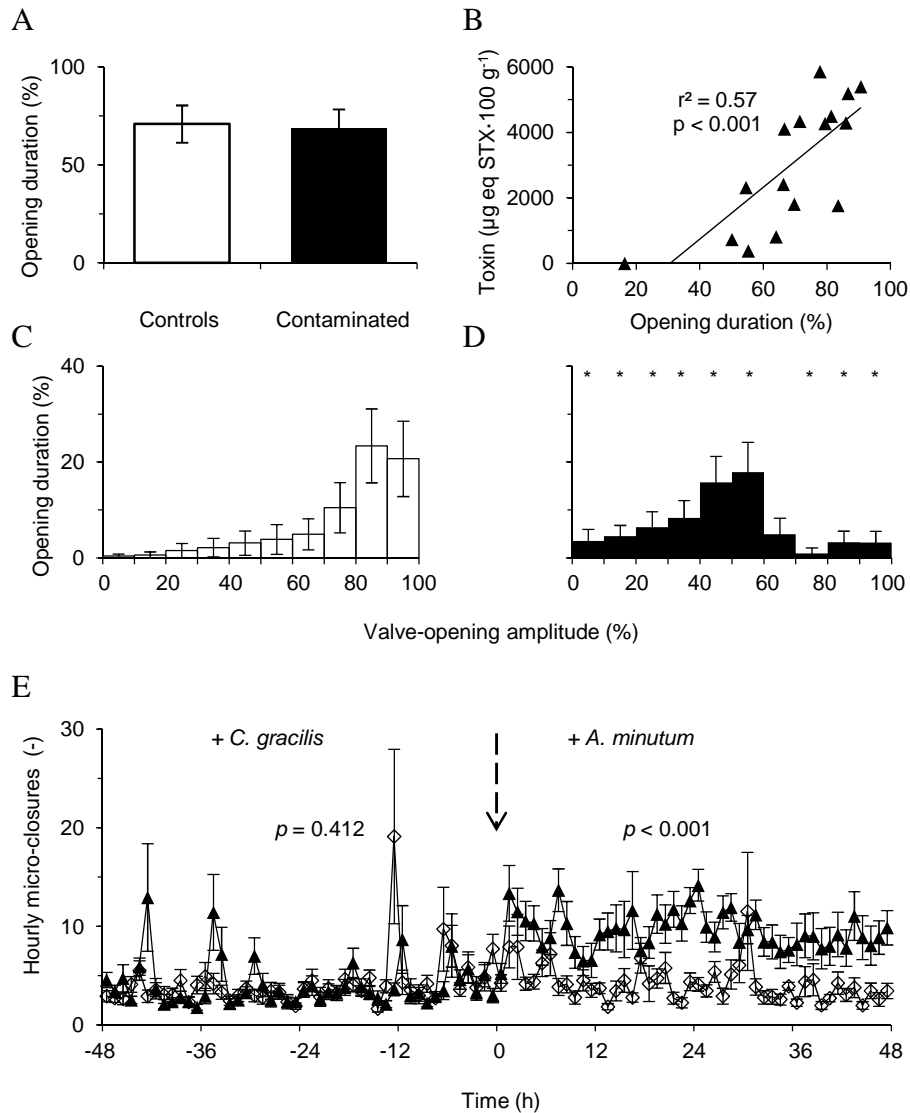


Figure 1: Behavioral analyses. (A) Mean opening duration (%) \pm SEM in *C. gigas* exposed to the non toxic algae *Chaetoceros gracilis* ($n = 15$) and the harmful algae *Alexandrium minutum* ($n = 16$). (B) Correlation between the mean opening duration and the toxin accumulation in oysters exposed to *A. minutum*. (C) Distribution of valve-opening amplitude according to the opening duration \pm SEM (10 classes from 0 to 100 %) in oysters fed for 48 h with *C. gracilis* ($n = 15$) and (D) *A. minutum* ($n = 16$). (E) Hourly micro-closures \pm SEM of oysters for 48 h before exposure to *A. minutum* and for 48 h after contamination. Symbols \diamond and \blacktriangle stand for control and contaminated animals, respectively. * Statistic difference compared to control oysters (p -value = 0.05).

Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm 1 SE. Differences between variables were investigated using the t-test after checking assumptions (normality of data and equal variance tests). When assumptions were not validated, the non-parametric Mann-Whitney rank sum test was applied.

For all statistical results, a probability of $p = 0.05$ was considered significant. Analyses were realized under SigmaStat (Version 3.5, Systat, Chicago, USA).

2.4 Results

Behavioral analyses and toxin accumulation

Behavioral analyses are presented in Fig. 1 and were conducted on control and contaminated oysters for the 48 hours before and during the *A. minutum* exposure. Fig. 1A indicates that the mean opening duration was not different in *A. minutum* exposed oysters compared to controls, being respectively 68.7 ± 9.6 and $70.9 \pm 9.5\%$. As indicated in Fig. 1B, the toxin content in the digestive gland at the end of the experiment was correlated to the opening duration in contaminated oysters during the exposure to *A. minutum*. The more the opening duration was, the more toxins were accumulated. One oyster, which was opened 17 % of time during the exposure period, had a toxin content, if any, below the detection limit. The toxin content for exposed oysters was $3013 \pm 503 \mu\text{g eq. STX} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ of digestive gland wet weight. No PSPs were detected in digestive glands of control oysters. Figs. 1C and 1D represent the distribution of valve-opening amplitude in control and *A. minutum* exposed oysters respectively during the 48 hours of exposure. The valve-opening amplitude is the distance between the shelves in %, ranging from 0 % when valves are closed to 100 % for the maximum measured distance between the valves for each oyster. Fig. 1C shows that control oysters spent 23.4 ± 7.7 and $20.7 \pm 7.9\%$ of time in the 80-90% and 90-100% amplitude ranges respectively. Fig. 1D indicates that amplitude was reduced in oysters exposed to *A. minutum*: they spent respectively 3.3 ± 2.3 and $3.2 \pm 2.4\%$ of time in the 80-90% and 90-100% amplitude ranges. These exposed oysters spent 15.8 ± 5.4 and $17.9 \pm 6.2\%$ of time in the 40-50 and 50-60 % amplitude ranges. Finally, Fig. 1E shows the number of hourly valve micro-closures in control and *A. minutum* exposed oysters, which are partial and rapid closures followed by a re-opening of the valves. During the acclimation period, during which all animals were fed on *C. gracilis*, there was no difference between the two groups of oysters ($p = 0.412$). During the exposure period, however, *A. minutum* exposed oysters presented significantly more micro-closures than control oysters ($p < 0.001$).

Table 3: Significant differential gene expressions in gills of oysters ($n = 16$) exposed to *Alexandrium minutum* at a concentration of $1609 \pm 295 \text{ c}\cdot\text{ml}^{-1}$ for 48 hours as compared to control oysters ($n = 15$) exposed to *Chaetoceros gracilis*.

Function	Gene	
Oxidative stress	<i>cat</i>	0.4
	<i>gpx</i>	0.5
	<i>sod (Cu/Zn)</i>	/
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	0.4
Cryptochrome, clock gene	<i>Cgcry</i>	0.6
Immunity	<i>ilk</i>	0.1
Detoxification process	<i>mdr</i>	0.5
	<i>mt2</i>	/

Gene transcription levels

Basal gene expression levels of control oysters, fed with *Chaetoceros gracilis* at a concentration of 2466 ± 427 cells·ml⁻¹, are presented in Table 2. Genes *gpx* and *sod* are expressed at a similar basal level, whereas *cat* is 3.5 fold less expressed. For genes involved in detoxification processes, *mdr* is 440 fold less expressed than *mt2*, which was expected since *mdr* gene is encoding a plasmic membrane transporter.

Table 2: Comparative basal relative expression for the selected genes in gills of control oysters ($n = 15$), fed with *Chaetoceros gracilis* at a concentration of 2466 ± 427 cells·ml⁻¹. The 28S ribosomal RNA gene was the reference.

Function	Gene	Relative expression
Oxidative stress	<i>cat</i>	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-4}$
	<i>gpx</i>	$(5.1 \pm 1.2) \times 10^{-4}$
	<i>sod (Cu/Zn)</i>	$(4.4 \pm 1.3) \times 10^{-4}$
Mitochondrial respiration	<i>cox1</i>	$(2.4 \pm 0.5) \times 10^{-2}$
Cryptochrome, clock gene	<i>Cgcry</i>	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^{-5}$
Immunity	<i>ilk</i>	$(3.3 \pm 0.7) \times 10^{-5}$
Detoxification process	<i>mdr</i>	$(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-5}$
General stress response	<i>mt2</i>	$(4.4 \pm 0.7) \times 10^{-3}$

After the 48h of *A. minutum* exposure, the transcription pattern of the selected genes was evaluated in gills in control and exposed oysters (Tables 3). The differential expression levels were calculated by comparing the gene expressions of control and exposed oysters. Table 3 summarizes the induction and repression factors for these selected genes. Transcription of genes involved in the oxidative metabolism indicates that the genes *cat* and *gpx*, respectively encoding for the catalase and glutathione peroxidase, were down-regulated, whereas there was no statistic difference for the gene *sod*, encoding for the superoxide dismutase. The gene *cox1*, which encodes for the cytochrome *c* oxidase, is part of the respiratory chain in mitochondria.

Table 4: Quantification of genotoxic effects triggered by *Alexandrium minutum* on oyster DNA.

Probes and hybridization temperature	Relative hybridization sites of RAPD probes ^a	
	Control	Contaminated
OPB7, 50°C	$1,1.10^{-2} \pm 0,2.10^{-2}$	$1,2.10^{-2} \pm 0,2.10^{-2}$
OPB11, 50°C	$6,8.10^{-4} \pm 1,4.10^{-4}$	$8,2.10^{-4} \pm 2,2.10^{-4}$
OPB7, 60°C	$2,9.10^{-6} \pm 1,4.10^{-6}$	$0,2.10^{-6} \pm 0,1.10^{-6}$ *

^a To access the total number of probes' hybridization sites, the indicated values must be multiplied by N_{28S}, the number of 28S RNA genes in the genome, which is unknown yet.

* Statistically significant difference compared to controls

Table 5: Frequencies of appearance, according to the temperature intervals (°C) to which their T_m belong, of the RAPD-PCR products for control oysters (n = 15) and oysters exposed to *Alexandrium minutum* (n = 16).

Temperature interval	Probes and hybridization temperatures					
	OPB7, 50°C		OPB11, 50°C		OPB7, 60°C	
	Control	Contaminated	Control	Contaminated	Control	Contaminated
[74-78[0.00	0.07	0.14	0.27	0.21	0.20
[78-80[0.29	0.80 *	0.00	0.07	0.57	0.80
[80-81[0.14	0.13	0.21	0.47	0.00	0.20
[81-82 [0.29	0.47	0.64	0.47	0.07	0.13
[82-83[0.00	0.07	0.07	0.07	0.36	0.40
[83-84[0.21	0.40	0.50	0.53	0.00	0.13
[84-85[0.57	0.53	0.00	0.00	0.07	0.13
[85-86[0.00	0.13	0.07	0.00	0.00	0.47 *
[86-87[0.00	0.07	0.07	0.13	0.07	0.00
[87-88[0.14	0.13	0.00	0.00	0.36	0.53
[88-89[0.71	0.87	0.00	0.00	0.00	0.00
[89-92[0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

* Statistically significant difference compared to controls (p < 0.05).

That gene was down-regulated in *A. minutum*-exposed oysters. Cryptochromes are proteins involved in the circadian clock. The *Cgcry* gene also appeared down-regulated in contaminated oysters. The same observation was made for the *ilk* gene encoding for the immune protein interleukin. Finally, considering genes involved in detoxification processes, Table 3 indicates that the gene *mdr* encoding for multidrug resistance proteins, involved in xenobiotics detoxification, was down-regulated whereas the expression of the *mt2* gene, encoding for metallothioneins and involved in metal chelation, did not vary between control and exposed oysters.

Genotoxic analyses

Quantitative RAPD-PCR were performed on genomic DNA from respectively 15 control and 16 *A. minutum*-exposed oysters. Working on 15 or 16 individuals permits to overcome the inter-individual genetic polymorphism and to observe effects only due to different conditions. During amplification, OPB7 hybridizations were run at 2 different temperatures, 50 and 60°C. The second temperature, 60°C, allowed more specific hybridizations, yet less numerous. Table 4 presents the genotoxicity results. The RAPD-PCR technique allows the relative quantification of the number of hybridization sites of the random primer compared to the number of hybridization sites of the gene 28S per genome, calculated as $2^{(CT_{28S} - CT_{probe} + 1)}$. The results show, for OPB7 probe at 60°C, a 15-fold decrease in the number of hybridization sites of the primer in the genomic DNA of *A. minutum* exposed oysters compared to controls. Furthermore, melting temperature (T_m) curves obtained from each RAPD-PCR were analyzed. PCR products acquired with OPB7 and OPB11 were reported according to their T_m . Afterwards, the frequency of appearance of PCR products in each of the 12 temperature intervals was reported, as presented in Table 5. Statistic variation of PCR products frequencies in a temperature interval between control and contaminated oysters indicates PCR products with different T_m , which means that these products present different nucleotides composition. This implies the loss or the creation of hybridization sites. This is a complementary approach to the quantitative method described above, based on a qualitative evaluation of the potential genotoxicity. As indicated in Table 5, the probe OPB11 did not permit to discriminate control and *A. minutum* exposed oysters, but highlighted the inter-individual genetic polymorphism. On the contrary, OPB7 discriminated control and contaminated animals and unmasked a genotoxic effect of the harmful algae *Alexandrium minutum* in the oyster *C. gigas*. Indeed, the frequency of PCR products which T_m belonged to the [78-80°C] and [85-86°C] intervals increased significantly as compared to the control, for hybridization temperatures of 50 and 60°C respectively.

2.5 Discussion

The objectives of the present study was to determine if the harmful algae *Alexandrium minutum*, known to induce various adverse effects in bivalves, (i) does also impact the gene expression levels and (ii) is genotoxic in *Crassostrea gigas* at environmentally relevant concentrations. The present results shows indeed that *A. minutum* affects gene transcription of genes involved in the oxidative metabolism, the mitochondrial metabolism, the endogenous clock, immunity and detoxification processes (Table 3). There was a general down-regulation of these genes. Furthermore, RAPD-PCR techniques brought to light a genotoxic impact of *A. minutum* on the genomic DNA of exposed oysters, impact that is both quantitative and qualitative (Table 4 and 5).

Behavioral analyses and toxin accumulation

Contaminated oysters were exposed to *Alexandrium minutum* at a concentration of ≈ 1600 cells·ml⁻¹. This is an environmentally relevant concentration. Indeed, blooms of *A. minutum* have been reported in the literature with concentrations ranging from a few hundred cells·ml⁻¹ up to 140 000 cells·ml⁻¹ (Bravo et al, 2008; Pitcher et al, 2007). It has previously been reported an increased opening duration in oysters exposed to *A. minutum* at approximately 3500 cells·ml⁻¹ (Tran et al., 2010). The present data show no difference in opening duration between control and contaminated oysters. As already described for oysters exposed to *A. minutum* at 1250, 2500 and 5000 cells·ml⁻¹, we found that at individual level the toxin accumulation is favored by the duration of valve opening (Haber Korn et al., 2011). Behavioral modifications here observed in contaminated oysters, such as increased valve micro-closures and decreased valve opening amplitude, where also reported in *A. minutum*-exposed bivalves (Haber Korn et al., 2011; Tran et al., 2010). This confirms previous results and indicates that the present study takes place in a context similar to what has already been observed.

Gene transcription levels

While many studies did already considered the effect of *A. minutum* on bivalves, to our knowledge none considered the impact of the algae on gene transcription. Data presented here strongly suggest that *A. minutum* induces a weakening of *C. gigas* by down-regulating genes involved in key metabolic pathways such as oxidative stress, mitochondrial metabolism, endogenous clock, immunity and detoxification processes.

Genes involved in the oxidative metabolism such as *cat* and *gpx* were repressed by *A. minutum* exposure, which could render oysters more vulnerable to oxidative damages. The decreased expression of the *coxI* gene illustrates a toxic impact of *A. minutum* on oyster mitochondria and a potential impact on the energetic metabolism of the animal.

The gene *Cgcry* was also repressed. This protein is present in several phyla in prokaryotes and

eukaryotes, where it plays numerous roles (Lin and Todo, 2005). Since the nineties, cryptochrome is known to be part of the circadian clock (Cashmore, 2003; Lucas and Foster, 1999) and thus is a key partner in the monitoring of biological rhythms. Biological rhythms are a fundamental property of life, tightly linked to metabolism and allowing organisms to anticipate and adapt to their changing environment. Generated by an endogenous molecular clock, they are synchronized by environmental factors. Resonance between the endogenous clock and the oscillating environment is considered as adaptive and increases fitness (Bass, 2011; Ouyang et al., 1998; Yerushalmi and Green, 2009). The down-regulation observed here might thus disrupt biological rhythms in oysters and accordingly alter their metabolism and function. Indeed, biological rhythms permit to separate processes that may not interact and optimize metabolism and energetic expenses (Rutter et al., 2002).

Exposure to PSP-producing microalgae can trigger an inflammatory process in bivalves. This has been described for *C. gigas* exposed to *A. minutum* (Haberkorn et al., 2010a), for mussels *M. edulis* exposed to *A. fundyense* (Galimany et al., 2008), and for clams *Ruditapes philippinarum* exposed to *Prorocentrum minimum* (Hégaret et al., 2009). At the transcriptional level, the *ilk* transcript levels increased in hemocytes of *C. gigas* oysters injected with bacteria, consistent with its immune function (Roberts et al., 2008). We would have expected an up-regulation of the *ilk* gene in response to *A. minutum*, however the reverse was observed. Therefore, instead of a gene expression pattern illustrating or compatible with an adaptive response, the observed repression of several genes among those selected suggests an incapacity of the animals to mount an appropriate response against the toxic algae. It might also be that, at $\approx 1600 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$, the oyster regulation capacity is overpassed. A dose-response and a kinetic analyses would enlarge our understanding of the phenomenon. Nevertheless, the 10-fold repression of *ilk* observed here might well render the oysters more prone to a pathogenic organism challenge.

Multidrug resistance (MDR) proteins are part of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, which perform the active efflux of xenobiotics and endogenous metabolites. To date, detoxification mechanisms of PSP toxins in bivalves are unknown. Nevertheless, it has been shown that accumulated toxins undergo biotransformation in *C. gigas* including epimerization and decarbamylation (Guéguen et al., 2008), yielding metabolites that could be substrate of the MDR transporters. However, the present data indicate a repression of *mdr*. Similarly, a repression of MDR-related gene expressions in mussels containing the STX has been reported (Buratti et al., 2011). Repression of this kind of detoxification devices might make oysters more vulnerable, not only to STX or its metabolites, but also to other toxic compounds. Again, analyzing kinetic and dose-response relationship appear necessary to deepen our understanding of molecular processes.

Table 6: A brief literature survey of recent reported genotoxic impacts of phycotoxins.

Toxin	Organism / organ	Concentration	Administration mode	Observations	Reference
Domoic acid	The fish <i>Oreochromis niloticus</i> , erythrocytes	1, 5 and 10 µg/g bw	Intracoelomic injection	Increased frequencies of micronuclei, nuclear abnormalities and DNA damages	Cavas et Könen, 2008
Domoic acid	Mussel <i>Mytilus edulis</i> , digestive gland	1, 10, 100 and 500 ng/g bw	Intramuscular injection	DNA fragmentation	Dizer et al., 2001
Brevetoxin	Jurkat T lymphocyte E6-1 cells	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁴ M	In vitro	DNA damages (increased average tail moments in the Comet Assay)	Murrel et Gibson, 2009
Brevetoxin	Rat, liver cells	45 µg/kg bw	Intratracheal exposure	DNA breaks	Leighfield et al., 2009
Brevetoxin	Human lymphocytes	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁸ M	In vitro	DNA breaks	Sayer et al., 2005
Brevetoxin	Chinese hamster ovary cells CHO-K1-BH4	10 ⁻⁷ M	In vitro	Chromosomic aberrations	Sayer et al., 2006
Okadaic acid	Human CaCo-2, human DOK, rat C6 and human HepG2 cell lines	10 and 50 nM	In vitro	DNA lesions in HepG2	Souad-Mensi et al., 2008
Okadaic acid	Human leukocytes, HepG2 cells, SHSY5Y cells	50 – 1000 nM	In vitro	DNA breaks	Valdiglesias et al., 2010, 2011
Okadaic acid	Human CaCo-2 cells	5 – 60 nM	In vitro	Increased micronucleated, multinucleated and mitotic cells	Le Hégarat et al., 2006
Okadaic acid	Mouse, colon	435, 525 and 610 µg/kg bw	Oral gavage	Increased micronucleated and mitotic cells at 525 µg/kg	Le Hégarat et al., 2006
Okadaic acid	Mussel <i>Perna perna</i> , haemocytes	0.3 µg diluted in 10µl water/ethanol	Added in water near animal's siphons	Increased frequency of micronuclei	Carvalho Pinto-Silva et al., 2003
Okadaic acid	Mussel <i>Perna perna</i> , haemocytes	200 – 10 000 cells/animal, twice a day, 2 days	Mussels fed with the OA-producing <i>Prorocentrum lima</i>	Increased micronuclei frequency at 200 and 1000 cells and nuclear lesions at 10 000 cells	Carvalho Pinto-Silva et al., 2005
PSPs	The fish <i>Diplodus sargus</i> , erythrocytes	1.60 µg STXeq/kg bw	Intracoelomic injection	Increased frequencies of nuclear abnormalities	Reis Costa et al., 2012
PSPs	Oyster <i>C. gigas</i>	1600 cells/ml	<i>A. minutum</i>	DNA damages	This study

* bw: body weight

Genotoxic analyses

As underlined by Cambier et al. (2010), nucleotide substitution in damaged DNA can remove or create probe hybridization sites, which will be reflected in the relative quantification. Furthermore, when the RAPD-PCR doesn't highlight any difference between control and *A. minutum* exposed oysters, it doesn't exclude any genotoxic impact as created sites could compensate lost ones. Indeed, using the OPB7 probe at a hybridization temperature of 50°C, no difference in terms of probe's hybridization sites number appeared between control and contaminated oysters, whereas the PCR product melting profile was modified.

In sharp contrast to what have been mostly published in the literature (Table 6), we found a genotoxic impact on animals exposed under environmental realistic conditions, using toxin-producing algae and mimicking a bloom instead of injecting or spreading in the medium the pure toxin. For the first time a genotoxic impact of *A. minutum* is unraveled.

2.6 Conclusions

The objectives of the present study was to determine if the harmful algae *Alexandrium minutum*, known to induce various adverse effects in bivalves, (i) does also impact the gene expression levels and (ii) is genotoxic in *Crassostrea gigas* at environmentally relevant concentrations. The present results shows indeed that *A. minutum* affects gene transcription of genes involved in the oxidative metabolism, the mitochondrial metabolism, the endogenous clock, immunity and detoxification processes. There was a general down-regulation of these genes. Furthermore, RAPD-PCR techniques brought to light a genotoxic impact of *A. minutum* on the genomic DNA of exposed oysters, impact that is both quantitative and qualitative.

Acknowledgments

This work was supported by a ministerial scholarship to A.M. and and the projects EC2CO-Cytrix and OSQUAR, Région Aquitaine. The authors tanks Bruno Etcheverria for technical support.

2.7 References

1. Anderson DM, Alpermann TJ, Cembella AD, Collos Y, Masseret E, Montresor M. 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14: 10-35.
2. Bass J. 2011. On time metabolism. *Nature* 480: 466-467.

3. Bravo I, Vila M, Maso M, Figueroa RI, Ramilo I. 2008. *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* blooms in the Mediterranean Sea: toward the identification of ecological niches. *Harmful Algae* 7: 515-522.
4. Bricej VM, Shumway SE. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science* 6: 315-383.
5. Bricej VM, Connell L, Konoki K, MacQuarrie SP, Scheuer T, Catterall WA, Trainer VL. 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* 434: 763-767.
6. Buratti S, Franzellitti S, Poletti R, Ceredi A, Montanari G, Capuzzo A, Fabbri E. 2011. Bioaccumulation of algal toxins and changes in physiological parameters in mediterranean mussels from the North Adriatic Sea (Italy). *Environ Toxicol Jun* 21 doi: 10.1002/tox
7. Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Bourdineaud JP. 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotox Environ Safe* 73: 312-319.
8. Carvalho Pinto-Silva CR, Ferreira JF, Costa RHR, Belli Filho P, Creppy EE, Matias WG. 2003. Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. *Toxicon*. 41: 93-97.
9. Carvalho Pinto-Silva CR, Creppy EE, Matias WG. 2005. Micronucleus test in mussels *Perna perna* fed with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Arch Toxicol*. 79: 422-426.
10. Cashmore AR. 2003. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell* 114: 537-543.
11. Cavas T, Könen S. 2008. *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Tox*. 90: 154-159.
12. Chambon C, Legeay A, Durrieu G, Gonzalez P, Ciret P, Massabuau JC. 2007. Influence of the parasite worm *Polydora sp.* on the behavior of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. *Mar Biol* 152: 329-338.
13. Chou HN, Chen YM, Chen CY. 2004. Variety of PSP toxins in four culture strains of *Alexandrium minutum* collected from southern Taiwan. *Toxicon* 43: 337-340.
14. Dizer H, Fischer B, Harabawy ASA, Hennion M-C, Hansen P-D. 2001. Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Tox*. 55: 149-156.
15. Galimany E, Sunila I, Hégaret H, Ramon M, Wikfors GH. 2008. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae* 7: 702-711.
16. Guéguen M, Bardouil M, Baron R, Lassus P, Truquet P, Massardier J, Amzil Z. 2008. Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum*

- with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat Living Resour* 21: 13-20.
17. Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Moal J, Suquet M, Guéguen M, Sunila I, Soudant P. 2010a. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 9: 427-439.
 18. Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Guéguen M, Moal J, Palacios E, Lassus P, Soudant P. 2010b. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 97: 96-108.
 19. Haberkorn H, Tran D, Massabuau JC, Ciret P, Savar V, Soudant P. 2011. Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. *Mar Pollut Bull* 62: 1191-1197.
 20. Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD. 2003. Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology. (UNESCO, Paris, 11S).
 21. Hégaret H, Wikfors GH, Soudant P, Lambert C, Shumway SE, Bérard JB, Lassus P. 2007. Toxic dinoXagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Mar Biol* 152: 441-447.
 22. Hégaret H, da Silva PM, Sunila I, Shumway SE, Dixon MS, Alix J, Wikfors GH, Soudant P. 2009. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *J Exp Mar Biol Ecol* 371: 112-120.
 23. Hégaret H, Mirella da Silva P, Wikfors GH, Haberkorn H, Shumway SE, Soudant P. 2011. In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve mollusks. *Cell Biol Toxicol* 27: 249-266.
 24. Hoagland P, Anderson DM, Kaoru Y, White AW. 2002. The economic effects of harmful algal blooms in the United States: estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries* 25: 819-837.
 25. Jo P, Choi YK, Choi CY. 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp Biochem Phys C* 147: 460-469.
 26. Lassus P, Bardouil M, Ledoux M, Murail I, Bohec M, Truquet P, Frémy JM, Rohmer V. 1992. Paralytic phycotoxin uptake by scallops (*Pecten maximus*). *Aquat Living Resour* 5: 319-324.
 27. Lassus P, Bardouil M, Beliaeff B, Masselin P, Naviner M, Truquet P. 1999. Effect of a continuous supply of a toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim on the feeding behavior of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res* 18: 211-216.
 28. Lassus P, Amzil Z, Baron R, Séchet V, Barillé L, Abadie E, Bardouil M, Sibat M, Truquet P, Bérard JB, Gueguen M. 2007. Modelling the accumulation of PSP toxins in

- Thau Lagoon oysters (*Crassostrea gigas*) from trials using mixed cultures of *Alexandrium catenella* and *Thalassiosira weissflogii*. *Aquat Living Resour* 20: 59-67.
29. Le Hégarat L, Jacquin A-G, Bazin E, Fessard V. 2006. Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid, in human Caco-2 cells and in mice gut cells. *Environ Toxicol*. 21: 55-64.
 30. Leighfield TA, Muha N, Ramsdell JS. 2009. Brevetoxin B is a clastogen in rats, but lacks mutagenic potential in the SP-98/100 Ames test. *Toxicol*. 54: 851-856.
 31. Li AMY, Yu PKN, Hsieh DPH, Wang WX, Wu RSS, Lam PKS. 2005. Uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in the green-lipped mussel, *Perna viridis*: a dynamic model. *Environ Toxicol* 24: 129-135.
 32. Lin C, Todo T. 2005. The cryptochromes. *Genome Biology* 6: 220.1-220.9
 33. Lucas RJ, Foster RG. 1999. Circadian clocks: a cry in the dark? *Curr Biol* 9: R825-R828.
 34. Murrel RN, Gibson JE. 2009. Brevetoxins 2, 3, 6 and 9 show variability in potency and cause significant induction of DANN damage and apoptosis in Jurkat E6-1 cells. *Arch Toxicol*. 83: 1009-1019.
 35. Narahashi T, Moore JW. 1968. Neuroactive agents and nerve membrane conductances. *J Gen Physiol* 51: 93-101.
 36. Navarro JM, Contreras AM. 2010. An integrative response by *Mytilus chilensis* to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Mar Biol* 157: 1967-1974.
 37. Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH. 1998. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8660-8664.
 38. Pitcher GC, Cembella AD, Joyce LB, Larsen J, Probyn TA, Ruiz Sebastian C. 2007. The dinoflagellate *Alexandrium minutum* in Cape Town harbour (South Africa): bloom characteristics, phylogenetic analysis and toxin composition. *Harmful Algae* 6: 823-836.
 39. Reis Costa P, Pereira P, Guilherme S, Barata M, Nicolau L, Santos MA, Pacheco M, Pousao-Ferreira P. 2012. Biotransformation modulation and genotoxicity in white seabream upon exposure to paralytic shellfish toxins produced by *Gymnodinium catenatum*. *Aquat Toxicol*. 106-107: 42-47.
 40. Roberts S, Gueguen Y, de Lorgeril J, Goetz F. 2008. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Dev Comp Immunol* 32: 1099-1104.
 41. Sayer A, Hu Q, Bourdelais AJ, Baden DG, Gibson JE. 2005. The effect of brevetoxin on brevetoxin-induced DANN damage in human lymphocytes. *Arch Toxicol*. 79: 683-688.
 42. Sayer AN, Hu Q, Bourdelais AJ, Baden DG, Gibson JE. 2006. The inhibition of CHO-K1-BH4 cell proliferation and induction of chromosomal aberrations by brevetoxins in vitro. *Food Chem Toxicol*. 44: 1082-1091.
 43. Souid-Mensi G, Moukha S, Mobio TA, Maaroufi K, Creppy EE. 2008. The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicol*. 51: 1338-1344.

44. Tran D, Ciret P, Ciutat A, Durrieu G, Massabuau JC. 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ Toxicol Chem* 22: 116–122.
45. Tran D, Haberkorn H, Soudant P, Ciret P, Massabuau JC. 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture* 298: 338-345.
46. Valdighesias V, Mendez J, Pasaro E, Cemeli E, Anderson D, Laffon B. 2010. Assessment of okadaic acid effects on cytotoxicity, DNA damage and DNA repair in human cells. *Mutat Res.* 689: 74-79.
47. Valdighesias V, Laffon B, Pasaro E, Cemeli E, Anderson D, Mendez J. 2011. Induction of oxidative DANN damage by the marine toxin okadaic acid depends on human cell type. *Toxicol.* 57: 882-888.
48. Wildish D, Lassus P, Martin J, Saulnier A, Bardouil M. 1998. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* sp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 11: 35-43.
49. Yan T, Zhou M, Fu M, Wang Y, Yu R, Li J. 2001. Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop, *Chlamys farreri*, associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Toxicol* 39: 1239-1244.
50. Yerushalmi S, Green RM. 2009. Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecol Lett* 12: 970-981.

3. Conclusions

Les résultats présentés dans ce chapitre indiquent que nous nous trouvons dans des conditions similaires à celles déjà rapportées dans la littérature : au-delà de l'altération des rythmes biologiques, l'algue *A. minutum* perturbe le comportement valvaire de l'huître de façon reproductible. En effet, les animaux présentent une amplitude d'ouverture réduite et une augmentation du nombre de micro-fermetures. Nous apportons également des résultats totalement originaux, à un niveau d'exposition à *A. minutum* représentatif des efflorescences se produisant sur le terrain ($\approx 1600 \text{ cellules}\cdot\text{ml}^{-1}$). Au niveau moléculaire, *A. minutum* induit une répression de gènes impliqués dans la neutralisation du stress oxydatif, la respiration mitochondriale, la réponse immunitaire, l'horloge biologique et la détoxification. Ces observations suggèrent un affaiblissement du bivalve. Outre cet impact génétique, il s'avère également qu'une exposition à *A. minutum* endommage l'ADN.

Les observations réalisées suggèrent un affaiblissement de l'huître par l'algue *A. minutum* à un niveau d'exposition à l'algue modéré. En effet, au lieu d'observer un type d'expression génique traduisant une réponse adaptative de l'animal, la répression de plusieurs gènes parmi ceux étudiés laisse penser à une incapacité de l'huître à développer une réponse appropriée vis-à-vis de l'algue toxique à la concentration étudiée. Cette vulnérabilité du bivalve constitue un problème en soi mais peut aussi représenter un défi supplémentaire en cas de contamination multistress, par d'autres xénobiotiques ou des pathogènes. Par ailleurs, ces observations soulèvent plusieurs questions. Les capacités de régulation de l'huître sont-elles dépassées au niveau d'exposition appliqué ? Que se passe-t-il à des concentrations d'algues plus faibles ? A partir de quelle concentration la physiologie de l'huître est-elle affectée ? Ces résultats montrent que les impacts des toxines paralysantes sur les organismes marins, et en particulier les filtreurs, sont plus larges qu'entrevu jusqu'à présent.

Un résultat particulièrement original réside dans l'impact génotoxique d'*A. minutum* sur *C. gigas* dans des conditions simulant une efflorescence réaliste d'un point de vue environnemental. Les études qui ont montré un effet génotoxique de différentes phycotoxines - brevetoxine, acide okadaïque, acide domoïque, PSPs – sont dans la très grande majorité des cas réalisées soit en injectant la toxine à l'animal étudié, soit *in vitro*. A notre connaissance, seule une expérience a été réalisée en apportant la toxine via une algue toxique. Cette étude a été conduite sur la moule *Perna perna* nourrie par l'algue productrice de toxines diarrhéiques *Prorocentrum lima*. Cependant, la concentration n'était pas maintenue dans les bacs mais les algues étaient fournies deux fois par jour, à une concentration définie en cellules par animal (Carvalho Pinto-Silva et al., 2005), ce qui n'est pas particulièrement représentatif des

efflorescences d'algues se produisant in situ. Les présents résultats constituent donc non seulement la première mise en évidence chez un bivalve d'un impact sur l'ADN d'une algue productrice de PSPs, mais en plus ce résultat est obtenu en simulant les efflorescences telles qu'elle se produisant sur le terrain.

Ce chapitre étend donc nos connaissances sur l'impact fort que l'algue *A. minutum* provoque chez l'huître *C. gigas*. De manière précoce, au niveau systémique, l'activité valvaire est perturbée, ainsi que le rythme qui l'anime. A l'échelle moléculaire, l'ADN est physiquement atteint et la transcription de différents gènes est réduite. Ces résultats, originaux en écotoxicologie aquatique, appuient l'importance de la prise en compte des algues toxiques par rapport à la santé des écosystèmes qu'elles contaminent. L'exposition à *Alexandrium minutum* est réputée pour ne pas tuer les huîtres et la problématique des algues toxiques, dans le monde ostréicole comme dans celui des gestionnaires, est essentiellement tournée vers les aspects économiques et de santé humaine liés à l'interdiction de vente de produits contaminés par ces algues. Nos résultats montrent des impacts déjà excessivement forts à la concentration étudiée. Ils suggèrent également des impacts à des concentrations bien plus faibles. Les huîtres deviennent de nos jours de plus en plus fragiles à travers le monde, et ce chapitre montre sans ambiguïté que les algues toxiques participent à cette fragilisation.

Chapitre 7

Conclusions générales et perspectives

1. Discussion et conclusions générales

Initialement, notre démarche reposait sur la question suivante : l'étude des rythmes chez les organismes marins, de leur gamme de régulation et de leur perturbation, peut-elle servir à étudier une contamination du milieu par les algues toxiques ? Les résultats obtenus ont permis d'étendre nos connaissances bien au-delà de cette interrogation d'origine.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont apporté des résultats originaux, tant en chronobiologie de l'huître *C. gigas* et des organismes marins qu'en écotoxicologie. En effet, les rythmes biologiques des espèces littorales présentent toujours de très nombreuses inconnues pour la plupart des espèces. Et, en particulier, les connaissances sur la chronobiologie des bivalves et de l'huître creuse demeuraient jusqu'ici très peu développées. Les expériences décrites dans ce manuscrit permettent maintenant d'appréhender le mécanisme de l'horloge de *C. gigas*. Par ailleurs, l'étude de la perturbation des rythmes est une approche nouvelle en écotoxicologie, qui offre des perspectives particulièrement intéressantes pour des études tant au laboratoire que sur le terrain. Finalement, les résultats obtenus au niveau moléculaire sur des huîtres exposées à l'algue *Alexandrium minutum* apportent un éclairage nouveau, qui complète les effets déjà mis en évidence par cette algue toxique sur les bivalves.

1.1 Principaux résultats en chronobiologie marine

L'ensemble de nos résultats suggère fortement que seule une horloge circadienne, faible et duale, existe chez l'huître *Crassostrea gigas*. Nous n'avons aucun argument en faveur de l'existence d'une horloge circatidale bien que, sur le terrain, une activité valvaire tidale soit principalement exprimée. Cette proposition est fondée sur deux observations majeures : l'analyse du comportement en libre cours et le suivi temporel de l'expression du gène *Cgcry* dans le muscle adducteur de l'huître, gène connu pour son rôle dans l'horloge circadienne.

Bien que l'huître soit présente en zone intertidale et en zone subtidale, seul un rythme circadien endogène, faible et dual, est manifesté au laboratoire par *C. gigas*. En condition d'entraînement, ce bivalve présente une activité cyclique circadienne. Et en condition de libre cours, la période la plus fréquemment observée appartient à l'intervalle 20-28h, défini comme l'intervalle circadien (Boissin et Canguilhem, 1998). Ce rythme endogène est toutefois faible. En effet, nous observons en conditions constantes une forte variabilité inter-individuelle, témoignant d'un oscillateur moléculaire peu robuste (Hogenesch et Herzog, 2011). En outre, les huîtres s'adaptent rapidement à une avance ou un retard de phase de 4h de l'entraînement lumineux. Ceci indique que l'oscillateur est fortement entrainable et très sensible au zeitgeber

lumineux. Un effet masque peut toutefois être écarté : les niveaux d'activités valvaires ne sont pas différents en conditions d'obscurité constante et d'illumination constante, alors qu'un effet masque est réputé pour provoquer une augmentation ou une réduction de cette activité (Chapitre 3 ; Mrosovsky, 1999).

Quel peut être l'intérêt d'un oscillateur faible chez *C. gigas* ? Un oscillateur endogène faible apporte une plasticité plus importante, permettant à l'organisme de s'adapter à des environnements variés. Les biotopes marins côtiers sont en plus soumis à deux cycles majeurs en interaction que sont le cycle d'alternance jour/nuit et le cycle tidal. La plasticité que nous rapportons pourrait donc partiellement expliquer l'adaptation réussie de l'huître sur une large aire de répartition géographique. Les bivalves sont en effet des animaux très anciens, existant depuis plus de 400 millions d'années (Babin, 1993), les premiers fossiles d'huîtres datant de 200 millions d'années. Une horloge biologique interne faible nous apparaît comme un avantage écologique pour une espèce telle que *C. gigas*, qui soit a permis à l'huître d'arriver jusqu'à nous, soit reflète ce qu'était une horloge de mollusque bivalve à l'origine.

Le rythme biologique de *C. gigas* peut également être qualifié de dual (nocturne à l'automne et en hiver, diurne au printemps et en été), ce qui est peut être un autre aspect de sa plasticité. Effectivement, les bivalves étudiés au laboratoire dans le chapitre 3 présentaient un comportement nocturne au début de l'expérience, en Janvier, et un comportement diurne à la fin du dispositif, fin Mars. Le changement de comportement s'est effectué progressivement au cours de la période d'expérimentation. Cette observation semble être une caractéristique de l'huître : ce même changement de comportement a été observé sur des animaux analysés pendant une année complète sur le terrain. Les huîtres sont plutôt nocturnes à l'automne et en hiver, et plutôt diurnes au printemps et en été, le passage d'un comportement à l'autre s'effectuant aux équinoxes.

S'il n'y a pratiquement pas d'information sur le caractère nocturne ou diurne des bivalves, ce phénomène de dualisme de comportement a été documenté chez les poissons (Reebs, 2002 ; Sánchez-Vázquez et al., 1995a, 1996). Pour l'huître, nous formulons l'hypothèse que ce dualisme pourrait avoir une valeur adaptative et constituer une réponse aux variations des besoins énergétiques de l'animal à une échelle annuelle. En effet, les bivalves sont des organismes filtreurs qui se nourrissent principalement de phytoplancton. Or, ce phytoplancton présente un cycle annuel d'abondance en régions tempérées, les concentrations les plus faibles étant atteintes en hiver tandis que des efflorescences se produisent au printemps essentiellement, ainsi qu'en été et en automne dans une moindre mesure (Cloern, 1996 ; Glé et al., 2010). Parallèlement, le cycle de reproduction de l'huître comprend une phase de gamétogenèse qui démarre avec le réchauffement printanier et qui s'étend jusqu'à l'été (Marteil, 1976). Des changements de demande métabolique sont associés à ces changements annuels (Tran et al., 2008). Nous suggérons donc qu'il y ait un lien, chez *C. gigas*, entre le rythme dual, la disponibilité en nourriture, la gamétogenèse et les besoins métaboliques. Nous posons l'hypothèse qu'au printemps et en été, dans le Bassin d'Arcachon où nous avons fait

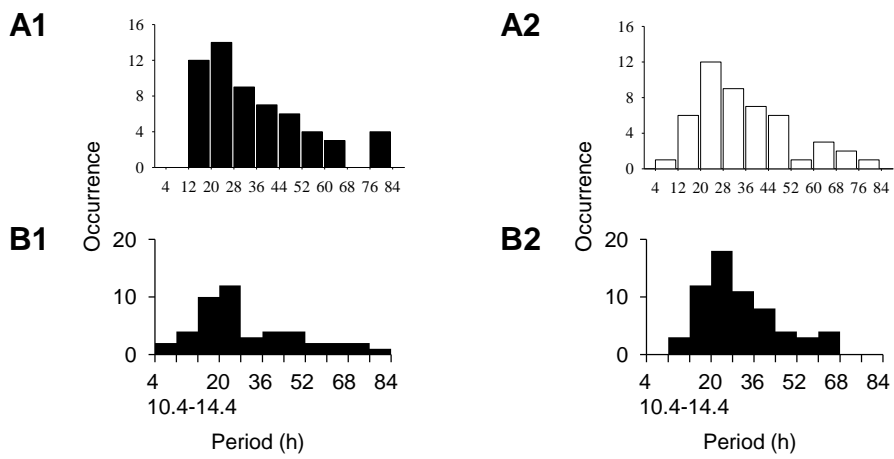


Figure 7.1 : Distribution cumulée des 4 premières périodes significatives exprimées par *C. gigas* en conditions constantes lors de nos 2 expériences de mise en évidence de rythmes. (A1) et (A2) En D:D et L:L, sans courant (STC 0), n = 15 huîtres, 10 jours pour chaque condition. (B1) En D:D et sans courant, n = 15 huîtres, 15 jours. (B2) En D:D et sans courant, n = 16 huîtres, 15 jours. La période la plus fréquemment observée appartient à chaque fois à l'intervalle circadien, 20-28h. Les graphes (A1) et (A2) sont ceux présentés au Chapitre 3, Fig. 3. Les graphes (B1) et (B2) au Chapitre 4, Fig 3.

l'expérimentation de terrain, l'effet de la photosynthèse est maximal et que le maximum journalier a lieu pendant la phase diurne comme cela a été montré dans d'autres écosystèmes (Torréton et al., 2010). Être diurne à cette période permettrait à l'huître de se nourrir plus efficacement et de répondre à des besoins énergétiques plus importants. L'hiver, en revanche, il y a moins de nourriture. Le bénéfice résultant d'une ouverture de jour pour s'alimenter pourrait ne pas être suffisant par rapport aux inconvénients que cela entraîne, l'exposition aux ultraviolets par exemple. Il serait alors plus intéressant pour l'huître d'être nocturne.

Si en conditions d'entraînement - par la lumière et par des cycles de marées simulés - les huîtres présentaient à la fois un rythme tidal et circadien d'activité valvaire, un rythme circatidal endogène n'a pas pu être mis en évidence en conditions de libre cours. Cette observation vaut tant pour des huîtres manipulées au laboratoire depuis plusieurs semaines que pour des animaux transférés rapidement du terrain, où ils exprimaient un rythme tidal, vers la salle d'expérimentation. *C. gigas* montrait toujours un rythme circadien faible tel que décrit ci-dessus (Chapitre 4). Il est à noter que pour les différentes expériences réalisées et les différents groupes d'huîtres utilisés, la distribution des périodes exprimées en conditions constantes a présenté à chaque fois un profil similaire (Figure 7.1). En outre, un rythme de période tidale a pu être entraîné par un zeitgeber lumineux et inversement un rythme de période circadienne a pu être entraîné par des cycles de marée simulés, soulignant là encore la forte plasticité de l'horloge en termes de gamme d'entraînement.

Dans un premier temps (Chapitre 4), nous avons proposé deux hypothèses pour expliquer l'activité tidale exprimée par *C. gigas* sur le terrain : une hypothèse exogène, les marées exerçant un effet masque sur le rythme circadien ; et une hypothèse endogène selon laquelle l'activité tidale proviendrait de l'horloge circadienne oscillant à une fréquence tidale (Chapitre 4). Cette dernière proposition correspond à ce qui avait été suggérée par Enright (1976a, b) pour l'isopode *Excirrolana chiltoni*. Ces deux hypothèses diffèrent des théories qui dominent actuellement en chronobiologie des organismes marins. La théorie de Naylor défend l'existence de deux oscillateurs distincts, l'un circatidal et l'autre circadien (Naylor, 2010). Nos observations ne permettent pas de supporter cette idée. Palmer (1995a, 2000), de son côté, suggère l'existence de deux horloges circalunidiennes, couplées en anti-phase, pour expliquer les rythmes des organismes intertidaux. Cette théorie n'explique toutefois pas comment l'entraînement par des zeitgebers lunidiens - lesquels ? - pourrait se produire. Par ailleurs, aucune preuve moléculaire ne permet jusqu'à présent de supporter l'une ou l'autre de ces deux théories.

Des analyses moléculaires ont été menées afin de départager nos deux hypothèses. Nous avons observés que le gène circadien *Cgcry* oscille à une fréquence tidale dans le muscle adducteur strié d'huîtres soumises à des cycles de marée simulés en obscurité constante et exprimant un rythme tidal d'activité valvaire. L'oscillation tidale de la

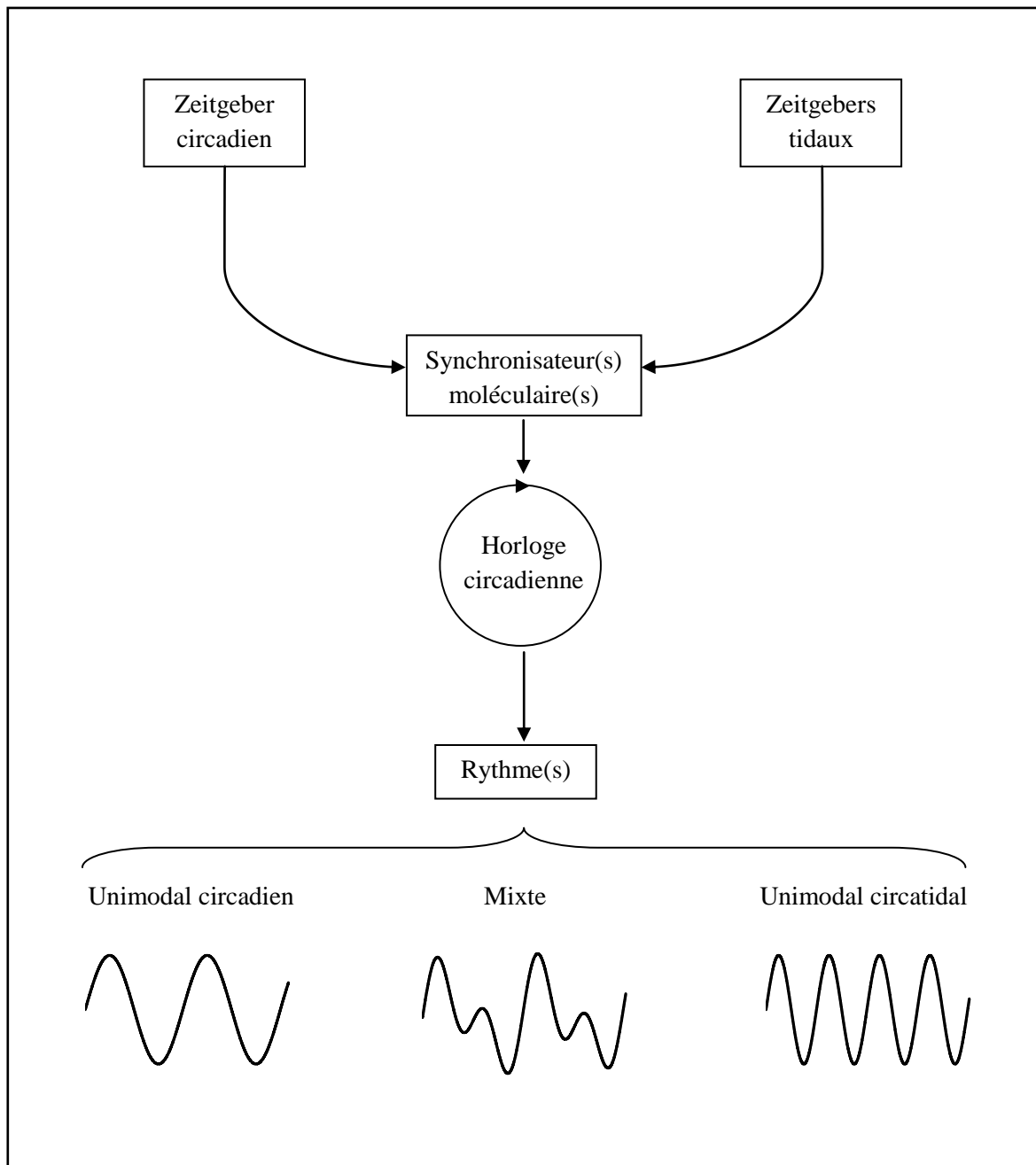


Figure 7.2 : Représentation hypothétique de l'horloge circadienne chez *Crassostrea gigas*.

transcription de *cry*, un gène bien connu pour son rôle dans l'horloge circadienne, constitue un résultat particulièrement fort et permet de faire pencher la balance en faveur de l'hypothèse endogène d'une horloge circadienne générant l'activité tidale. Cela mérite toutefois de plus amples investigations : le rôle de *Cgcry* dans l'horloge de l'huître, d'entraînement et/ou de composant central de l'oscillateur, doit encore être éclairci. En travaillant sur les deux parties du muscle adducteur, le muscle strié et le muscle lisse, nous avons observé que la rythmicité n'était pas présente dans ce dernier. Le niveau d'expression de *cry* était également plus élevé dans le muscle strié que dans le muscle lisse (Chapitre 5). Nous formulons l'hypothèse que ceci pourrait résulter des fonctionnements et rôles propres de ces deux parties du muscle adducteur de l'huître : le muscle strié initie les mouvements des valves et effectue les contractions rapides, tandis que le muscle lisse intervient ensuite et sert à maintenir les coquilles fermées par un mécanisme de « catch », peu coûteux en énergie (Galler, 2008 ; Hoyle, 1964). Le gène est donc présent dans le muscle lisse mais serait peu exprimé et non oscillant car le muscle lisse serait physiologiquement lié à l'action du muscle strié.

A la Figure 7.2, nous proposons un schéma qui permettrait d'expliquer la génération du rythme chez *Crassostrea gigas*. L'horloge serait une horloge circadienne, et serait sensible à la fois au zeitgeber lumineux et à des zeitgebers tidaux. Le signal d'entrée de l'horloge serait modulé selon le niveau de chacun de ces synchroniseurs. CgCRY pourrait-il être cette entrée ? Et/ou est-il au cœur même de l'oscillateur ? Le rythme exprimé par l'horloge pourrait aller d'un rythme unimodal tidal à un rythme unimodal circadien, tous les intermédiaires bimodaux étant possibles.

1.2 Du rythme et du bruit

Sur le terrain, le rythme de *C. gigas* est robuste (Tran et al., 2011). Mais au laboratoire, si les analyses spectrales révèlent des rythmes circadiens et/ou tidaux sans ambiguïté en conditions d'entraînement, les huîtres placées en conditions de libre cours peuvent manifester un rythme a priori bruité, très bruité même, voire pour certaines paraître arythmiques. Il a souvent été mentionné que les rythmes chez les organismes marins soumis aux marées ne possèdent pas la persistance et la précision qui caractérisent généralement les rythmes circadiens des animaux aériens (Naylor, 2010 ; Neumann, 1981 ; Palmer, 1995a). Ils sont fréquemment labiles, s'amenuisent rapidement en conditions constantes.

Nous obtenons, lorsqu'on analyse seulement la première période, 13 % d'huîtres ayant une période circadienne en libre cours (Chapitre 4). Doit-on qualifier *C. gigas* d'arythmique ? Nous pensons que la réponse est non. Nous n'avons eu que très peu d'animaux arythmiques, même si les périodes statistiques ne correspondaient pas toujours à celles des cycles environnementaux. En outre, de manière systématique pour l'ensemble des expériences

réalisées, la période la plus fréquemment observée en libre cours appartient à l'intervalle circadien, 20-28h (Fig. 7.1). Par ailleurs, cette observation est cohérente avec la littérature rappelée ci-dessus et similaire à celle de 15 % d'animaux rythmiques en libre cours rapportée pour le vers *Nereis virens* (Last et al., 2009). De plus, le fait que 13 % des animaux expriment une première période circadienne montre que ce rythme existe biologiquement. Mais, surtout, l'observation d'une oscillation du gène *Cgcry* appuie très clairement l'existence d'une horloge moléculaire. Un argument particulièrement fort réside également dans le génome de l'huître *Crassostrea gigas*, dont l'ensemble des séquences vient d'être publié, et qui contient les gènes de l'horloge circadienne (Zhang et al. 2012). L'hypothèse d'une horloge circadienne fonctionnelle est donc aujourd'hui tout à fait réaliste puisque ses composants sont présents et que nous avons rapporté l'oscillation de *Cgcry*.

Chez *C. gigas*, l'hypothèse d'une horloge circadienne pouvant être entraînée à une fréquence tidale est cohérente avec l'existence de ces fortes variations inter-individuelles observées en libre cours et avec la grande plasticité de l'oscillateur circadien qui apparaît peu robuste. En effet, l'étude des propriétés générales des systèmes oscillants a permis de souligner que la gamme d'entraînement est une propriété du système, intimement et inversement liée à son degré de persistance. Plus l'oscillateur présente un degré de persistance élevé, plus sa gamme d'entraînement est faible (Klotter, 1960). Comme souligné précédemment, une horloge circadienne pouvant être entraînée à une fréquence tidale - c'est-à-dire ayant une large gamme d'entraînement - présenterait un avantage adaptatif pour l'huître. Les analyses moléculaires présentées au Chapitre 5 permettent à ce stade de supporter cette hypothèse.

1.3 Horloge(s) et évolution : quel scénario ?

Comme précisé précédemment, les horloges biologiques présenteraient un avantage adaptatif (Emerson et al., 2008 ; Ouyang et al., 1998 ; Yerushalmi et Green, 2009). L'évolution de l'horloge circadienne, qui existe tant chez les procaryotes que les eucaryotes, est une question de plus en plus étudiée, en comparant entre autre les séquences d'un même gène chez différentes espèces (Kyriacou et al., 2008). Chez les cyanobactéries, le gène de l'horloge *kaiC* pourrait avoir approximativement 3 milliards d'années. A l'époque, il n'aurait pas fait partie d'un mécanisme horloger mais aurait joué un rôle au niveau de l'ADN. Il a été toutefois proposé que, chez les cyanobactéries, la possession d'une horloge fonctionnelle vers 2.5 milliards d'années leur aurait conféré une optimisation temporelle des processus intracellulaires lors du passage d'un environnement réducteur à un environnement oxydant (Dvornik et al., 2003). Pittendrigh (1981) considérait que les organismes primitifs possédaient probablement une organisation temporelle d'origine exogène, liée simplement aux variations de lumières et de température et que l'origine des rythmes circadiens provenait du bénéfice pour des cellules vivant plus de 24h de posséder une organisation endogène. Echapper à la

lumière, et donc aux effets délétères des UV, aurait joué un rôle major dans l'évolution de l'organisation circadienne, constituant une pression de sélection (Pittendrigh, 1965, 1993). L'avantage d'un système entraîné est de pouvoir anticiper un changement, par rapport à un système dirigé de manière exogène par un cycle environnemental. L'oscillateur endogène pourrait être bâti sur base des boucles de rétro-contrôle qui existaient dans les cellules primitives (Roenneberg et Marrow, 2002). Tauber et al. (2004) précisent également que l'évolution de la durée de rotation de la Terre, qui aurait pu être aussi basse que 4h il y a 1.9 milliards d'années, a influencé l'évolution de l'horloge primitive.

L'idée que les horloges actuellement connues chez les procaryotes et les eucaryotes aient évolué à partir d'un ancêtre commun ou séparément n'est pas tranchée (Young et Kay, 2001). La question de savoir si l'horloge circadienne a évolué d'une horloge circatidale potentielle a également été posée (Wilcockson et Zhang, 2008). Si l'hypothèse que nous proposons d'une horloge circadienne plastique pouvant tourner à une fréquence tidale chez l'huître se vérifie, cela apporterait des éléments nouveaux à ce débat évolutif. L'horloge circadienne chez l'animal aérien pourrait avoir évolué à partir d'une horloge circadienne déjà présente chez l'animal marin.

1.4 Principaux résultats en écotoxicologie aquatique

Nous avons pu montrer que tant le rythme tidal d'activité valvaire que l'oscillation tidale moléculaire de *Cgcr* sont perturbés lorsque les huîtres sont exposées à une efflorescence modérée d'algues toxiques *Alexandrium minutum* (210 cellules / ml). A une concentration un peu plus élevée, 850 cellules/ml, le rythme disparaît complètement au niveau du comportement (Chapitre 5). Cette observation, originale, est particulièrement importante en toxicologie de l'environnement : tant les huîtres que l'algue *A. minutum* affichent une distribution géographique globale. On considère que les rythmes biologiques confèrent un avantage adaptatif aux organismes, leur permettant d'anticiper les changements de leur environnement (Yerushalmi et Green, 2009). Il est donc évident que la perturbation de ces rythmes ne peut que fragiliser les espèces qui les subissent.

Au-delà de l'atteinte au niveau des rythmes biologiques, nos résultats confirment qu'*A. minutum* modifie profondément le comportement valvaire de l'huître : les animaux affichent une amplitude d'ouverture valvaire réduite et une augmentation des micro-fermetures (fermetures rapides et partielles des valves). Ces observations sont similaires à celles déjà rapportées (Haberkorn et al., 2011; Tran et al., 2010). Nous observons également que les toxines accumulées par les individus sont positivement corrélées à leur durée d'ouverture valvaire, comme noté par Haberkorn et al. (2011). Toutefois, la saxitoxine étant une toxine paralysante, on ne peut déterminer si c'est une augmentation de l'ouverture valvaire qui

entraîne une accumulation accrue de toxines ou si à l'inverse c'est l'accumulation de toxines qui induit une plus grande durée d'ouverture des valves (Haberkorn et al., 2011).

Au-delà de l'éthologie, *A. minutum* provoque, à une concentration de 1600 cellules / ml, des impacts supplémentaires au niveau moléculaire chez *C. gigas*. Nous avons en effet montré une sous-expression de gènes impliqués dans différentes voies métaboliques : la lutte contre le stress oxydant (*cat*, *gpx*), la respiration mitochondriale (*cox1*), l'immunité (*ilk*), la détoxification (*mdr*). En outre, *A. minutum* induit des modifications de l'ADN chez l'huître, tant qualitatives que quantitatives : les mutations de nucléotides et/ou les cassures de l'ADN sont accrues. Les résultats ne permettent pas de déterminer si cette génotoxicité de l'algue toxique résulte d'une action directe des phycotoxines produites ou si elle provient indirectement d'un affaiblissement général de l'huître par *A. minutum*. Toutefois, cette observation originale indique un impact génotoxique dans des conditions représentatives d'une efflorescence d'algues toxiques.

L'exposition à *Alexandrium minutum* est réputée pour ne pas tuer les huîtres et la problématique des algues toxiques est largement orientée vers les questions économiques et de santé humaine. En effet, l'interdiction de vente des coquillages est prononcée lorsque ces produits sont contaminés par des algues toxiques. Nos résultats montrent des impacts conséquents chez *C. gigas* aux concentrations étudiées. Ils suggèrent naturellement des impacts à des concentrations bien plus faibles. Les huîtres deviennent de nos jours de plus en plus fragiles à travers le monde. Nos travaux, s'ajoutant aux multiples études déjà publiées dans ce domaine riche, apportent des informations nouvelles sur les mécanismes par lesquels les algues toxiques participent à cette fragilisation.

2. Perspectives de recherche

Si nous avons pu répondre aux questions posées à l'origine de ce travail, les résultats obtenus suscitent finalement encore davantage d'interrogations, ouvrent de nombreuses pistes de réflexions et permettent d'envisager des perspectives d'applications tant en chronobiologie qu'en toxicologie aquatique.

2.1 En chronobiologie

Affiner notre compréhension de l'horloge de l'huître implique de s'intéresser (1) aux zeitgebers et aux signaux qu'ils transmettent à l'horloge, (2) à l'horloge moléculaire en elle-même et (3) aux rythmes exprimés par l'organisme.

Zeitgebers et synchronisateurs moléculaires de l'horloge. Nous avons testé comme zeitgeber les variations cycliques de courant sans variations de hauteur d'eau, simulant des cycles tidaux. Toutefois, de nombreux éléments peuvent jouer le rôle de synchronisateurs, éléments qu'il serait enrichissant de tester : la disponibilité en nourriture, la pression, la salinité, les cycles d'immersion / exposition à l'air, etc. Par ailleurs, nous avons vu que l'huître peut être entraînée par la lumière. Comment la perçoit-elle ? Ce point est à élucider. Une piste est l'existence de photorécepteurs sur les siphons de certains mollusques lamellibranches et d'yeux sur le bord du manteau de certains pectens (Kennedy, 1960).

Le mécanisme moléculaire de l'horloge. Il serait particulièrement pertinent d'investiguer le rôle que CgCRY joue chez l'huître : cette protéine fait-elle partie de l'entraînement de l'horloge ou en constitue-t-elle un élément essentiel ? Afin de répondre à cette question, il serait approprié d'analyser le rythme chez des animaux dont le gène serait rendu inactif. En outre, comment se comporte *Cgcry* lorsque les conditions d'entraînement comprennent à la fois les marées et la lumière ? Qu'en est-il en conditions constantes ? *Cgcry* oscille-t-il toujours et, si oui, à quelle fréquence ? Quelle est l'oscillation du gène lorsque l'huître est soumise à un entraînement lumineux ?

Outre *cryptochrome*, intégrer dans ces travaux les gènes connus de l'horloge circadienne, et dont les séquences viennent tout juste d'être publiées (Zhang et al. 2012), permettrait d'élargir notre compréhension de l'horloge moléculaire. Est-ce que ces différents gènes oscillent et, si oui, avec quelle période ? Quelles sont les boucles de rétro-contrôle ? Y a-t-il des gènes propres à l'horloge de l'huître ?

De manière générale, l'étude des mécanismes moléculaires de l'horloge biologique s'avère particulièrement nécessaire chez les organismes marins pour compléter les analyses comportementales réalisées jusqu'à présent. En effet, comme souligné dans les discussions de différents chapitres, les théories proposées pour expliquer la chronobiologie des espèces marines se basent sur des rythmes observés à l'échelle systémique mais ne sont appuyées par aucune preuve génétique. Il serait donc pertinent d'étendre l'étude des mécanismes moléculaires sous-tendant les horloges à d'autres organismes marins (bivalves, crustacés, etc.).

Par ailleurs, les analyses moléculaires que nous avons réalisées portaient sur le muscle adducteur de l'huître. Existe-t-il un oscillateur central chez *C. gigas* ? Le système nerveux de cet animal comprend deux paires de ganglions, les ganglions cérébroïdes et viscéraux. Comment se comportent les gènes de l'horloge dans ces ganglions ? Et dans d'autres tissus ? Quelles seraient les conséquences de lésions des ganglions sur les rythmes de l'huître ? La neuroanatomie pourrait clarifier l'existence d'une horloge centrale chez *C. gigas*. Par ailleurs, certains agents sérotoninergiques et dopaminergiques peuvent bloquer l'horloge. Or, ces médiateurs, la sérotonine et la dopamine, sont présents chez *Crassostrea virginica* au niveau

des cellules ciliées latérales des branchies (Martin et al., 2008). La pharmacologie constitue donc également une voie d'investigation pour caractériser l'horloge.

Les rythmes de l'huître. Quels sont les rythmes exprimés par les huîtres dans des environnements différents de ceux étudiés ici (régime de marée semi-diurne) ? Un site de choix serait l'étang de Thau, une vaste lagune languedocienne qui communique avec la Méditerranée, soumise à des marées de très faible amplitude (quelques centimètres). Quel est le rythme d'activité valvaire de *C. gigas* dans cet étang ? De plus, dans l'Atlantique par exemple, quel(s) est/sont le(s) rythme(s) exprimé(s) par *C. gigas* sur des points amphidromiques (points où le marnage est nul) ? Dans le bassin d'Arcachon, nous pourrions également soustraire les animaux à l'influence du marnage en les plaçant sous une bouée flottante. Quel(s) serai(en)t, à nouveau, le(s) rythme(s) affichés par ces huîtres ? Comment se comporte *C. gigas* lorsqu'elle est soumise à un régime de marée diurne ou mixte ? C'est dans ces conditions que nous pourrions étudier toute l'intérêt de la plasticité de l'horloge que nous avons mise en évidence.

Il est évidemment également essentiel de suivre les progrès effectués ces dernières années dans l'analyse moléculaire de l'horloge, ainsi que ceux à venir. En effet, si jusqu'à présent la transcription de gènes de l'horloge est apparue indispensable au fonctionnement du mécanisme oscillant, de récentes études soulignent l'importance des mécanismes post-transcriptionnels et métaboliques dans le maintien du système horloger, indépendamment de la transcription (voir Hastings et al., 2008 ; Mehra et al., 2009 ; Merrow et al., 2006 ; O'Neill et Reddy, 2011 ; O'Neill et al., 2011 ; Tomita et al., 2005). Récemment, il a été rapporté que des cycles métaboliques circadiens basés sur des oscillations redox pourraient constituer un oscillateur cytoplasmique complémentaire au modèle TTFL (Wang et al., 2012). Le modèle d'une boucle rétro-active de transcription et de translation (modèle TTFL) continue donc d'évoluer, et les résultats obtenus ici seront à remettre en perspectives avec les travaux qui viennent enrichir notre compréhension de l'horloge biologique.

2.2 En écotoxicologie

Les pistes de recherches en écotoxicologie qu'ouvre ce manuscrit sont de deux types : l'utilisation de la perturbation des rythmes comme indicateur d'une contamination d'une part, et la notion de rythme en tant que telle dans l'approche écotoxicologique classique.

La perturbation des rythmes au niveau expérimental. Si nous avons montré que le rythme tidal de l'huître est perturbé par *A. minutum*, qu'en est-il du rythme circadien ? De même que l'étude des rythmes biologiques pourrait être étendue à d'autres organismes marins, l'étude de leur perturbation pourrait être élargie à d'autres bivalves, d'autres algues toxiques voire même

d'autres contaminants (métalliques, organiques, ...). Est-ce qu'en outre, pour une même espèce, on peut obtenir une empreinte spécifique selon le contaminant appliqué ?

De plus, l'outil valvométrique pourrait aussi être utilisé pour déterminer la dynamique de la contamination d'*A. minutum* chez *C. gigas* : en combien de temps le comportement est-il perturbé ? Obtient-on la même durée pour l'amplitude d'ouverture, les micro-fermetures et le rythme biologique ? De manière similaire, la valvométrie pourrait être utilisée pour déterminer, pour différentes espèces de bivalves (coque, palourde, moule, huître, ...), le temps nécessaire aux animaux pour qu'ils retrouvent leur état de référence lors des manipulations en laboratoire.

En outre, si les efflorescences d'algues toxiques durent généralement quelques heures voire quelques jours, on peut s'interroger sur l'impact d'expositions chroniques à une ou plusieurs phycotoxines. Quel est l'impact sur un bivalve d'une contamination répétée, même faible, par une ou plusieurs algues toxiques ?

La présence d'un rythme perturbé chez l'animal laisse de surcroît supposer qu'il peut exister une influence sur la contamination de l'organisme par d'autres polluants ou parasites. L'animal est-il rendu plus sensible à une contamination ou une infestation lorsque son rythme est perturbé ? Dans le cas particulier d'*A. minutum*, les huîtres étant en outre généralement plus ouvertes, on peut supposer qu'elles puissent accumuler davantage de contaminants autres que la toxine incriminée.

La perturbation des rythmes pour la surveillance du milieu. Une finalité appliquée est envisageable grâce à la valvométrie de terrain pour la biodétection de contaminants en ligne et à distance. Cela nécessite de pouvoir détecter des signaux spécifiques au sein d'une espèce pour différents xénobiotiques, ou de travailler avec des espèces différentes présentant des comportements propres en présence de ces contaminants. Dans ce contexte, il serait utile de définir les limites basses de contamination pour l'observation d'une perturbation d'un rythme au niveau comportemental. La même démarche peut être appliquée pour la perturbation du mécanisme moléculaire.

Les rythmes en écotoxicologie classique. La chronobiologie peut également servir à étudier chez les organismes les gammes de régulation temporelle de référence des paramètres physiologiques qui servent classiquement en écotoxicologie. Cette connaissance permettrait d'affiner les observations faites en écotoxicologie et d'améliorer l'évaluation du risque.

Finalement, si la chronotoxicité se développe considérablement en médecine actuellement, ce concept pourrait de la même manière être appliqué en environnement : l'impact d'une contamination ou d'un stress varie-t-il selon le stade du cycle (marées ou lumière) dans lequel l'organisme se trouve ? C'est la notion de chronoesthésie, qui indique que l'effet toxique d'un composé dépend aussi des cycles de l'organisme et pas uniquement du potentiel toxique

intrinsèque du xénobiotique. La réflexion à ce sujet pourrait s'avérer bénéfique dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique.

Références bibliographiques

A

- Abello P, Reid DG, Naylor E. (1991). Comparative locomotors activity patterns in the portunid crab *Liocarcinus holsatus* and *L. depurator*. *J Mar Biol Assoc UK*. 71 : 1-10.
- Ahmad M, Cashmore AR. (1998). Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant. Mol. Biol.* 30 : 851-861.
- Akiyama T. (1995). Circatidal swimming activity rhythm in a subtidal cumacean *Dimorphostylis asiatica* (Crustacea). *Mar Biol.* 123 : 251-255.
- Akiyama T. (1997). Tidal adaptation of a circadian clock controlling a crustacean swimming behavior. *Zool Sci.* 14 : 901-906.
- Al-Adhub AHY, Naylor E. (1975). Emergences rhythms and tidal migrations in the brown shrimp *Crangon crangon* (L.). *J Mar Biol Assoc UK*. 55 : 801-810.
- Anderson DM, Alpermann TJ, Cembella AD, Collos Y, Masseret E, Montresor M. (2012). The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae.* 14 : 10-35.
- Ameyaw-Akumfi C , Naylor E. (1987). Temporal patterns of shell-gape in *Mytilus edulis*. *Mar Biol.* 95 : 237-242.
- Aschoff J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 25 : 11-28.
- Aschoff J. (1981). Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms. Volume 4. New York: Plenum. Pp 563.

B

- Babin C. (1993). La repartition géographique des mollusques bivalves du Paléozoïque (Cambrien à Dévonien) : une revue. *Paleogeography, Paleoclimatology, & paleoecology.* 100 : 7-20.
- Bagheri N, Stelling J, Doyle III FJ. (2004). Quantitative performance metric for robustness in circadian rhythms. *Bioinformatics.* 23 : 358-364.
- Bailey SER. (1981). Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *J Comp Physiol.* 142 : 89-94.
- Barnwell FH. (1966). Daily and tidal patterns of activity in individual fiddler crab (genus *Uca*) from the Woods Hole region. *Biol Bull.* 130 : 1-17.
- Bass J. (2011). On time metabolism. *Nature.* 480 : 466-467.

- Beentjes MP, Williams BG. (1986). Endogenous circatidal rhythmicity in the New Zealand cockle *Chione stutchburyi* (Bivalvia, Veneridae). *Mar Behav Physiol.* 12 : 171-180.
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet.* 6 : 544-556.
- Bernard I. (2011). Ecologie de la reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises. Vers une explication de la variabilité du captage. Thèse en Océanologie biologique et environnement marin. Université de La Rochelle. Juin 2011.
- Bingham C, Arbogast B, Cornélissen G, Lee J-K, Halberg F. (1982). Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia.* 9 : 397-439.
- Boissin J, Canguilhem B. (1998). Les rythmes du vivant origine et contrôle des rythmes biologiques. Nathan Université: Méchain. CNRS Editions: Paris. Pp 320.
- Bolliet V, Aranda A, Boujard T. (2001). Demand-feeding rhythm in rainbow trout and European catfish: synchronization by photoperiod and food availability. *Physiol Behav.* 73 : 625-633.
- Bouchet JM, Deltreil JP, Manaud F, Maurer D, Trut G. (1997). Etude intégrée du Bassin d'Arcachon. Tome 5. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00081/19254/>
- Box GEP, Jenkins GM, Reinsel GC. (1994). Time series analysis: forecasting and control. 3rd ed. New York: Prentice Hall. Pp 598.
- Brady J. (1987). Circadian rhythms – endogenous or exogenous ? *J. Comp. Physiol. A.* 161: 711-714.
- Bravo I, Vila M, Maso M, Figueroa RI, Ramilo I. (2008). *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* blooms in the Mediterranean Sea: toward the identification of ecological niches. *Harmful Algae.* 7 : 515-522.
- Bricelj VM, Shumway SE. (1998). Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs : occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science.* 6 : 315-383.
- Bricelj VM, Connell L, Konoki K, MacQuarrie SP, Scheuer T, Catterall WA, Trainer VL. (2005). Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature.* 434 : 763-767.
- Buratti S, Franzellitti S, Poletti R, Ceredi A, Montanari G, Capuzzo A, Fabbri E. (2011). Bioaccumulation of algal toxins and changes in physiological parameters in mediterranean mussels from the North Adriatic Sea (Italy). *Environ Toxicol.* doi: 10.1002/tox

C

- Camacho FG, Gallardo Rodriguez J, Sanchez Miron A, Ceron Garcia MC, Belarbi EH, Chisti Y, Molina Grima E. (2007). Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances*. 25: 176-194.
- Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Bourdineaud JP. (2010). Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotox Environ Saf*. 73: 312-319.
- Cambrioso A, Keating P. (1983). The disciplinary stake: the case of chronobiology. *Social Studies of Science*. 13 : 323-353.
- Campell NA, Reece, JB. (2004). Biologie. De Boeck Université : Bruxelles. Pp 1364.
- Carvalho Pinto-Silva CR, Ferreira JF, Costa RHR, Belli Filho P, Creppy EE, Matias WG. (2003). Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. *Toxicon*. 41 : 93-97.
- Carvalho Pinto-Silva CR, Creppy EE, Matias WG. (2005). Micronucleus test in mussels *Perna perna* fed with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Arch Toxicol*. 79 : 422-426.
- Cashmore AR. (2003). Cryptochromes : enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell*. 114 : 537-543.
- Cavas T, Könen S. (2008). *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquat Toxicol*. 90 : 154-159.
- Cermakian N, Sassone-Corsi P. (2000). Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 1 : 59-67.
- Chabot CC, Skinner SJ, Watson III WH. (2008). Rhythms of locomotion expressed by *Limulus polyphemus*, the American horseshoe crab: I. Synchronization by artificial tides. *Biol Bull*. 215 : 34-45.
- Chambon C, Legeay A, Durrieu G, Gonzalez P, Ciret P, Massabuau J-C. (2007). Influence of the parasite worm *Polydora sp.* on the behavior of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. *Mar Biol*. 152 : 329-338.
- Chandrashekar MK. (1998). Biological rhythms research : a personal account. *J. Biosci*. 23: 545-555.
- Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen LO, van der Horst GTJ, Batschauer A, Ahmad M. (2011). The cryptochromes : blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol*. 62 : 335-364.
- Chou HN, Chen YM, Chen CY. (2004). Variety of PSP toxins in four culture strains of *Alexandrium minutum* collected from southern Taiwan. *Toxicon*. 43 : 337-340.
- Cloern JE. (1996). Phytoplankton bloom dynamics in coastal Ecosystems: a review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Rev Geophys*. 34 : 127-168.

Connor KM, Gracey AY. (2011). Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *P Natl Acad Sci USA*. 108 : 16110-16115.

D

Daan S. (2010). Chapter 1 : A history of chronobiological concepts. In: U. Albrecht (ed). The Circadian Clock, Series: Protein Reviews, 12. Pp 300.

De la Iglesia HO, Rodriguez EM, Dezi RE. (1994). Burrow plugging in the crab *Uca uruguayensis* and its synchronization with photoperiod and tides. *Physiol Behav*. 55 : 913-919.

Dejours P. (1981). Principles of Comparative Respiratory Physiology. Elsevier: Amsterdam, New York, Oxford. Pp. 265.

Dickey RW, Plakas SM. (2010). Ciguatera: a public health perspective. *Toxicol*. 56 : 123-136.

Dizer H, Fischer B, Harabawy ASA, Hennion M-C, Hansen P-D. (2001). Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol*. 55 : 149-156.

Dowse HB, Ringo JM, Power J, Johnson E, Kinney K, White L. (1995). A congenital heart defect in *Drosophila* caused by an action potential mutation. *J. Neurogenet*. 10 : 153-168.

Dunlap JC. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 96 : 271-290.

Dutertre M, Beninger PG, Barillé L, Papin M, Haure J. (2010). Rising temperatures, reproduction and recruitment of an invasive oyster, *Crassostrea gigas*, on the French Atlantic coast. *Marine Environmental Research*. 69 : 1-9.

Dvornyk V, Vinogradova O, Nevo E. (2003). Origin and evolution of circadian clock genes in prokaryotes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 100 : 2495-2500.

E

Edey I. (2000). Circadian rhythms in a nutshell. *Physiol Genomics*. 3 : 59-74.

Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbach M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*. 95 : 669-679.

Emerson KJ, Bradshaw WE, Holzapfel CM. (2008). Concordance of the circadian clock with the environment is necessary to maximize fitness in natural populations. *Evolution*. 62 : 979-983.

Enriquez-Diaz M, Pouvreau S, Chavez-Villalba J, Le Pennec M. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquacult Int*. 17 : 491-506.

- Enright JT. (1976a). Resetting a tidal clock: a phase-response curve for *Excirolana*. In: DeCoursey DJ (ed). *Biological rhythms in the marine environment*. Columbia: University of South Carolina Press. Pp 103-114.
- Enright JT. (1976b). Plasticity in an Isopod's clockworks: shaking shapes form and affects phase and frequency. *J. Comp. Physiol.* 107: 13-37.
- Eriksson L-O. (1973). Spring inversion of the diel rhythm of locomotor activity in young sea-going brown trout, *Salmo trutta trutta L.*, and atlantic salmo, *Salmo salar L.* *Aquilo Ser Zool.* 14 : 68-79.
- Eriksson, L.-O. (1978). Nocturnalism versus diurnalism; dualism within fish individuals. In: Thorpe JE (ed). *Rhythmic activity of fishes*. New York: Academic Press. Pp 69-89.
- Etheridge SM. (2010). Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives. *Toxicon.* 56 : 108-122.

F

- Fan Y, Hida A, Anderson DA, Izumo M, Johnson CH. (2007). Cycling of cryptochrome proteins is not necessary for circadian-clock function in mammalian fibroblasts. *Curr Biol.* 17 : 1091-1100.
- Fraser NHC, Metcalfe NB, Heggenes J, Thorpe JE. (1995). Low summer temperature cause juvenile Atlantic salmon to become nocturnal. *Can J Zool.* 73 : 446-451.

G

- Galimany E, Sunila I, Hégaret H, Ramon M, Wikfors GH. (2008). Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae.* 7 : 702-711.
- Galler S. (2008). Molecular basis of the catch state in molluscan smooth muscles: a catchy challenge. *J Muscle Cell Res Motil.* 29 : 73-99.
- Galtsoff PS. (1964). The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bull Fish Wildl Serv US.* 64 : 1-480
- García-March JR, Solsona MA, García-Carrascosa AM. (2008). Shell gaping behaviour of *Pinna nobilis L.*, 1758: circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Mar Biol.* 153 : 689-698.
- Gegear RJ, Foley LE, Casselman A, Reppert SM. (2010). Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. *Nature.* 463 : 804-808.

- Gerkema MP, Videler JJ, de Wiljes J, van Lavieren H, Gerritsen H, Karel M. (2000). Photic entrainment of circadian activity patterns in the tropical labrid fish *Halichoeres chrysus*. *Chronobiol Int.* 17 : 613-622.
- Gibson RN. (1973). Tidal and circadian activity rhythms in juvenile plaice, *Pleuronectes platessa*. *Mar Biol.* 22 : 379-386.
- Gibson RN. (1992). Tidally-synchronized behaviour in marine fishes. In: M.A. Ali (Ed.), *Rhythms in fishes*, Plenum Press, London. Pp 63-82.
- Gle C, Del Amo Y, Sautour B, Laborde P, Chardy P. (2008). Variability of nutrients and phytoplankton primary production in a shallow macrotidal coastal ecosystem (Arcachon Bay, France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 76 : 642-656.
- Goldbeter A. (2010). La vie oscillatoire au cœur des rythmes du vivant. Odile Jacob : Paris. Pp 367.
- Gouthière L, Mauvieux B. (2004). Étapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers, modélisation. XXXVème Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie, Université de Saint Etienne, France du 10 au 12 Juin 2003. Quelques aspects sur la Chronobiologie. Presses Universitaires de Saint Etienne 2004. Pp 10.
- Gouthière L, Claustrat B, Brun J, Mauvieux B. (2005a). Complementary methodological steps in the analysis of rhythms: search of periods, modelling. Examples of plasma melatonin and temperature curves. *Pathol. Biol.* 53 : 285-289.
- Gouthière L, Mauvieux B, Davenne D, Waterhouse J. (2005b). Complementary methodology in the analysis of rhythmic data, using examples from a complex situation, the rhythmicity of temperature in night shift workers. *Biol Rhythm Res.* 36 : 177-193.
- Gracey AY, Chaney ML, Boomhower JP, Tyburczy WR, Connor K, Somero GN. (2008). Rhythms of gene expression in a fluctuating intertidal environment. *Curr. Biol.* 18 : 1501-1507.
- Granger CWJ, Hatanaka M. (1964). Spectral analysis of economic time series. Princeton, NJ: Princeton University Press. Pp 299.
- Grizel H, Auffret M, Barillé L, Besnard-Cochennec N, Blanc F, Boucaud-Camou E, Chollet B, Henry M, Jabbour-Zahab R, Le Pennec M et al. (2003). An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Plouzané, France : Editions Ifremer. Pp 201.
- Guéguen M, Bardouil M, Baron R, Lassus P, Truquet P, Massardier J, Amzil Z. (2008). Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat Living Resour.* 21: 13-20.
- Guillard RRL. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith WL and Chanley MH (Eds.). Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA. Pp 29-60.

Gwinner E, Brandstätter R. (2001). Complex bird clocks. *Phil Trans R Soc Lond.* 356 : 1801-1810.

H

Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Moal J, Suquet M, Guéguen M, Sunila I, Soudant P. (2010a). Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae.* 9 : 427-439.

Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Guéguen M, Moal J, Palacios E, Lassus P, Soudant P. (2010b). Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 97 : 96-108.

Haberkorn H, Tran D, Massabuau JC, Ciret P, Savar V, Soudant P. (2011). Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. *Mar Pollut Bull.* 62 : 1191-1197.

Haimov I, Arendt J. (1999). The prevention and treatment of jet lag. *Sleep Med Rev.* 3:229-240.

Halberg F. (1969). Chronobiology. *Annu Rev Physiol.* 31: 675-725.

Halberg F, Cornélissen G, Spector NH, Sonkowsky RP, Otsuka K, Baciú I, Hriscu M, Schwartzkopff O, Bakken EE. (2003a). Stress/strain/life revisited. Quantification by blood pressure chronomics: benetensive, transtensive or maletensive chrono-vasculo-neuro-immuno-modulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 57 : 136s-163s.

Halberg F, Cornélissen G, Katinas G, Syutkina EV, Sothorn RB, Zaslavskaya R, Halberg F, Watanabe Y, Schwartzkopff O, Otsuka K et al. (2003b). Transdisciplinary unifying implications of circadian findings in the 1950s. *Journal of circadian rhythms.* 1,2: doi 10.1186/1740-3391-1-2

Hall JC. (1995). Trippings along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends Neurosci.* 18 : 230-240.

Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD. (2003). Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on Oceanographic Methodology. UNESCO : Paris, 11S. Pp 793.

Hardin, PE, Hall, JC, Rosbach, M. (1990). Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature.* 343: 536-540.

Hastings JW. (2001). Keeping in tune with time: entrainments of circadian rhythms. In: Lebert M and Häder DP. *Photomovement.* ESP Review Series, (D.-P, Häder and B. Jori, series editors) Berlin. Pp 960.

- Hastings MH, Maywood ES, O'Neill JS. (2008). Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms. *Curr Biol.* 18 : R805-R815.
- Hégaret H, Wikfors GH, Soudant P, Lambert C, Shumway SE, Bérard JB, Lassus P. (2007). Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* 152 : 441-447.
- Hégaret H, da Silva PM, Sunila I, Shumway SE, Dixon MS, Alix J, Wikfors GH, Soudant P. (2009). Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *J Exp Mar Biol Ecol.* 371 : 112-120.
- Hégaret H, Mirella da Silva P, Wikfors GH, Haberkorn H, Shumway SE, Soudant P. (2011). In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve mollusks. *Cell Biol Toxicol.* 27 : 249-266.
- Heisler J, Glibert PM, Burkholder JM, Anderson DM, Cochlan W, Dennison WC, Dortch Q, Gobler CJ, Heil CA, Humphries E, et al. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae.* 8 : 3-13.
- Higuera-Ruiz R, Elorza J. (2009). Biometric, microstructural, and high-resolution trace element studies in *Crassostrea gigas* of Cantabria (Bay of Biscay, Spain): anthropogenic and seasonal influences. *Estuar Coast Shelf.* 82 : 201-213.
- Hoagland P, Anderson DM, Kaoru Y, White AW. (2002). The economic effects of harmful algal blooms in the United States: estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries.* 25 : 819-837.
- Hogenesch JB, Herzog ED. (2011). Intracellular and intercellular processes determine robustness of the circadian clock. *FEBS Letters.* 585 : 1427-1434.
- Hoyle G. (1964). Muscle and neuromuscular physiology. In : Wilbur KM, Yonge CM (Eds). *Physiology of Mollusca Volume I*. New York and London: Academic Press. Pp 313-351.
- Hu T, Curtis JM, Oshima Y, Quilliam MA, Walter JA, Watson-Wright W, Wright JLC. (1995). Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications.* 20 : 2159–2161.

J

- Jeffery B, Barlow T, Moizer K, Paul S, Boyle C. (2004). Amnesic shellfish poison. *Food and Chemical Toxicology.* 42 : 545-557.
- Jenkins GM, Watts DG. (1968). Spectral analysis and its applications. San Francisco: Holden Day. Pp 525.
- Jo PG, Choi YK, Choi CY. (2008). Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp Biochem Phys C.* 147 : 460-469.

K

- Kennedy D. (1960). Neural photoreception in a lamellibranch mollusk. *J Gen Physiol.* 44 : 277-299.
- Kim WS, Kim JM, Yi SK, Huh HT. (1997). Endogenous circadian rhythm in the river puffer fish *Takifugu obscurus*. *Mar Ecol Prog Ser.* 153 : 293-298.
- Kim WS, Huh, HT, Lee JH, Rumohr H, Koh CH. (1999). Endogenous circatidal rhythm in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Mar Biol.* 134 : 107-112.
- Kim WS, Huh, HT, Je JG, Han KN. (2003). Evidence of two-clock control of endogenous rhythm in the Washington clam, *Saxidomus purpuratus*. *Mar Biol.* 142 : 305-309.
- Klapow LA. (1972). Natural and artificial rephasing of a tidal rhythm. *J Comp Physiol.* 79 : 233-258.
- Klarsfeld A. (2009). Les horloges du vivant comment elles rythment nos jours et nos nuits. Odile Jacob : Paris. Pp 317.
- Klotter K. (1960). General properties of oscillating systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 25 : 185-187.
- Konopka RJ, Benzer S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68 : 2112-2116.
- Koukkari WL, Sothorn RB. (2006). Introducing biological rhythms: a primer on the temporal organization of life, with implications for health, society, reproduction and the natural environment. Springer, New York. Pp 655.
- Kramer G. (1957). Experiments on bird orientation and their interpretation. *Ibis.* 99 : 196-227.
- Krishnan B, Levine JD, Lynch MKS, Dowse HB, Funes P, Hall JC, Hardin PE, Dryer SE (2001). A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature.* 411 : 313-317.
- Kunz D, Herrmann WM. (2000). Sleep-wake cycle, sleep-related disturbances, and sleep disorders: a chronobiological approach. *Comprehensive Psychiat.* 41 : 104-115.
- Kyriacou CP, Peixoto AA, Sandrelli F, Costa R, Tauber E. (2008). Clines in clock genes: fine-tuning circadian rhythms to the environment. *Trends Genet.* 24 : 124-132.

L

- Lassus P, Bardouil M, Ledoux M, Murail I, Bohec M, Truquet P, Frémy JM, Rohmer V. (1992). Paralytic phycotoxin uptake by scallops (*Pecten maximus*). *Aquat Living Resour.* 5 : 319-324.
- Lassus P, Bardouil M, Beliaeff B, Masselin P, Naviner M, Truquet P. (1999). Effect of a continuous supply of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim on the feeding

- behavior of the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J Shellfish Res.* 18 : 211-216.
- Lassus P, Amzil Z, Baron R, Séchet V, Barillé L, Abadie E, Bardouil M, Sibat M, Truquet P, Bérard JB, Gueguen M. (2007) Modelling the accumulation of PSP toxins in Thau Lagoon oysters (*Crassostrea gigas*) from trials using mixed cultures of *Alexandrium catenella* and *Thalassiosira weissflogii*. *Aquat Living Resour.* 20: 59-67.
- Last KS, Bailhache T, Kramer C, Kyriacou CP, Rosato E, Olive PJW. (2009). Tidal, daily, and lunar-day activity cycles in the marine Polychaete *Nereis virens*. *Chronobiol Int.* 26 : 167-183.
- Lefebvre KA, Robertson A. (2009). Domoic acid and human exposure risks: a review. *Toxicon.* 56 : 1-13.
- Le Hégarat L, Jacquin A-G, Bazin E, Fessard V. (2006). Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid, in human Caco-2 cells and in mice gut cells. *Environ Toxicol.* 21 : 55-64.
- Leighfield TA, Muha N, Ramsdell JS. (2009). Brevetoxin B is a clastogen in rats, but lacks mutagenic potential in the SP-98/100 Ames test. *Toxicon.* 54 : 851-856.
- Lemmer B. (2009). Discoveries of rhythms in human biological functions: a historical review. *Chronobiol. Int.* 26 : 1019-1068.
- Levy O, Appelbaum L, Leggat W, Gothlif Y, Hayward DC, Miller DJ, Hoegh-Guldberg O. (2007). Light-responsive cryptochromes from a simple multicellular animal, the coral *Acropora millepora*. *Science.* 318 : 467-470.
- Li AMY, Yu PKN, Hsieh DPH, Wang WX, Wu RSS, Lam PKS. (2005). Uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in the green-lipped mussel, *Perna viridis*: a dynamic model. *Environ Toxicol.* 24: 129-135.
- Lin C, Shalitin D. (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 : 469-496.
- Lin C, Todo T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biology.* 6 : 220.1-220.9
- Livak KJ, Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- Δ CT method. *Methods.* 25 : 402-408.
- Lucas RJ, Foster RG. (1999). Circadian clocks: a cry in the dark? *Curr. Biol.* 9 : R825-R828.

M

- Maeda K, Robinson AJ, Henbest KB, Hogben HJ, Biskup T, Ahmad M, Schleicher E, Weber S, Timmel CR, Hore PJ. (2012). Magnetically sensitive light-induced reactions in cryptochrome are consistent with its proposed role as a magnetoreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109 : 4774-4779.
- Marteil L. (1976). Shellfish culture in France. Part 2. Oyster and mussel biology. *Rev Trav Inst Peches Marit.* 40 : 149-346.

- Martin H, Martin U. (1987). Transfer of a time-signal isochronous with local time in translocation experiments to the geographical longitude. *J. Comp. Physiol. A.* 160 : 3-9.
- Martin K, Huggins T, King C, Carroll MA, Catapane EJ. (2008). The neurotoxic effects of manganese on the dopaminergic innervations of the gill of the bivalve mollusk, *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 148 : 152-159.
- Mat AM, Massabuau JC, Ciret P, Tran D. (2012). Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiol Int.* 29 : 857-867.
- Massabuau JC, Forgue J. (1996). A field versus laboratory study of blood oxygen status in normoxic crabs at different temperatures. *Can J Zool.* 74 : 423-430.
- McClung CR. (2006). Plant circadian rhythms. *The Plant Cell.* 18 : 792-803.
- Mehra A, Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC. (2009). Post-translational modifications in circadian rhythms. *Trends Biochem Sci.* 34 : 483-490.
- Mehta TS, Lewis RD. (2000). Quantitative tests of a dual circalunidian clock model for tidal rhythmicity in the sand beach isopod *Cirolana cookii*. *Chronobiol Int.* 17 : 29-41.
- Merrow M, Mazzotta G, Chen Z, Roenneberg T. (2006). The right place at the right time: regulation of daily timing by phosphorylation. *Gene Dev.* 20 : 2629-2633.
- Merrow M, Roenneberg T. (2007). Circadian clock: time for a phase shift of ideas? *Curr Biol.* 17 : R636-R638.
- Moore RY, Eichler VB. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42 : 201-206.
- Morton BS. (1977). The tidal rhythm of feeding and digestion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Exp Mar Biol Ecol.* 26 : 135-151.
- Morton BS. (1983). Feeding and digestion in Bivalvia. In: *The Mollusca, Volume 5, Physiology (2)*. Saleuddin ASM and Wilbur KM (eds). Academic Press. Pp. 65-147.
- Mrosovsky N. (1999). Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiol Int.* 16 : 415-429.
- Murrel RN, Gibson JE. (2009). Brevetoxins 2, 3, 6 and 9 show variability in potency and cause significant induction of DANN damage and apoptosis in Jurkat E6-1 cells. *Arch Toxicol.* 83 : 1009-1019.

N

- Nagai K, Honjo T, Go J, Yamashita H, Oh SJ. (2006). Detecting the shellfish killer *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) by measuring bivalve valve activity with a Hall element sensor. *Aquaculture.* 255 : 395-401.
- Narahashi T, Moore JW. (1968). Neuroactive agents and nerve membrane conductances. *J Gen Physiol.* 51 : 93-101.

- Navarro JM, Contreras AM. (2010). An integrative response by *Mytilus chilensis* to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Mar. Biol.* 157 : 1967-1974.
- Naylor E. (2001). Marine animal behaviour in relation to lunar phase. *Earth Moon Planets.* 85-86 : 291-302.
- Naylor E. (2010). Chronobiology of marine organisms. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Pp 242.
- Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halber F. (1979). Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia.* 6 : 305-323.
- Nelson DC, Lasswell J, Rogg LE, Cohen MA, Bartel B. (2000). *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell.* 101 : 331-340.
- Neumann D. (1981). Tidal and lunar rhythms. In: Aschoff J (ed). *Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms.* Volume 4. New York: Plenum. Pp 351-380.
- Newell GE. (1964). Physiological aspects of the ecology of intertidal molluscs. In : Wilbur KM, Yonge CM (Eds). *Physiology of Mollusca Volume 1.* New York and London: Academic Press. Pp 59-81.
- Nezan E, Piclet G, Grossel H. (1997). Guide pratique à l'usage des analystes du Réseau National de Surveillance du phytoplancton. Ifremer.
<http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/790/>
- Noguchi T, Watanabe . (2005). Tetrodotoxin resets the clock. *Eur. J. Neurosci.* 21 : 3361-3367.

O

- O'Neill JS, Reddy AB. (2011). Circadian clocks in human red blood cells. *Nature.* 469 : 498-503.
- O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, Troein C, Corellou F, Bouget FY, Reddy AB, Millar AJ. (2011). Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature.* 469 : 554-558.
- Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 95 : 8660-8664.

P

- Palmer JD. (1990). The rhythmic lives of crabs. *Bioscience.* 40 : 352-358.
- Palmer JD. (1995a). The biological rhythms and clocks of intertidal animals. New York: Oxford University Press. Pp 217.

- Palmer JD. (1995b). Review of the dual-clock control of tidal rhythms and the hypothesis that the same clock governs both circatidal and circadian rhythms. *Chronobiol. Int.* 12 : 299-310.
- Palmer JD. (1997). Duelling hypotheses: circatidal versus circalunidian battle basics. *Chronobiol Int.* 14 : 337-346.
- Palmer JD. (2000). The clocks controlling the tide-associated rhythms of intertidal animals. *BioEssays.* 22 : 32-37.
- Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature.* 417: 329-335.
- Pitcher GC, Cembella AD, Joyce LB, Larsen J, Probyn TA, Ruiz Sebastian C. (2007). The dinoflagellate *Alexandrium minutum* in Cape Town harbour (South Africa): bloom characteristics, phylogenetic analysis and toxin composition. *Harmful Algae.* 6 : 823-836.
- Pittendrigh CS. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA.* 40 : 1018-1029.
- Pittendrigh CS. (1965). Biological clocks The functions, ancient and modern, of circadian oscillations. In: *Science and the Sixties*. Proc. Cloudcraft Symposium Air Force Office of Scientific Research. 1965 : 96-111.
- Pittendrigh CS. (1981). Circadian systems: general perspective. In: Aschoff J (ed). *Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms. Volume 4*. New York: Plenum. Pp 57-80.
- Pittendrigh CS. (1993). Temporal organization: reflections of a darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol.* 55 : 17-54.
- Plakas SM, Dickey RW. (2010). Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish. *Toxicon.* 56 : 137-149.
- Pierre Polsenaere. (2007). Rapport M2 Recherche Systèmes Ecologiques. Analyse du comportement valvaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en fonction du rythme tidal: Étude en laboratoire et sur le terrain.
- Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y. (2010). Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol Int.* 25 : 1911-1929.
- Poulain C, Lorrain A, Flye-Sainte-Marie J, Amice E, Morize E, Paulet YM. (2011). An environmentally induced tidal periodicity of microgrowth increment formation in subtidal populations of the clam *Ruditapes philippinarum*. *J Exp Mar Biol Ecol.* 397 : 58-64.

R

- Ramji N. (2008). Probing biology's fourth dimension : chronobiology in America, 1960-2007. Thesis in History and Science, The Department of the History of Science, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, March 2008. Pp 120.

- Redfern P, Minors D, Waterhouse J. (1994). Circadian rhythms, jet lag, and chronobiotics : an overview. *Chronobiol Int.* 11 : 253-265.
- Reebs SG. (2002). Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. *Rev Fish Biol Fisher.* 12 : 349-371.
- Reid DG, Naylor E. (1989). Are there separate circatidal and circadian clocks in the shore crab *Carcinus maenas*? *Mar Ecol Prog Ser.* 52 : 1-6.
- Reinberg AE, Lewy H. (2000). Julien Joseph Virey et la naissance de la chronobiologie. *Vesalius.* VI : 90-99.
- Reis Costa P, Pereira P, Guilherme S, Barata M, Nicolau L, Santos MA, Pacheco M, Pousao-Ferreira P. (2012). Biotransformation modulation and genotoxicity in white seabream upon exposure to paralytic shellfish toxins produced by *Gymnodinium catenatum*. *Aquat Toxicol.* 106-107 : 42-47.
- Reguera B, Velo-Suarez L, Raine R, Park MG. (2012). Harmful *Dinophysis* species : a review. *Harmful Algae.* 14 : 87-106.
- Reppert SM. (1998). A clockwork explosion ! *Neuron.* 21 : 1-4.
- Ritz T, Adem S, Schulten K. (2000). A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophysical Journal.* 78 : 707-718.
- Roberts S, Gueguen Y, de Lorgeril J, Goetz F. (2008). Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Dev Comp Immunol.* 32 : 1099-1104.
- Robson AA, Garcia de Leaniz C, Wilson RP, Halsey LG. (2010). Effect of anthropogenic feeding regimes on activity rhythms of laboratory mussels exposed to natural light. *Hydrobiologia.* 655 : 197-204.
- Rodriguez G, Naylor E. (1972). Behavioural rhythms in littoral prawns. *J Mar Biol Assoc UK.* 52 : 81-95.
- Roenneberg T, Merrow M. (2002). Life before the clock: modeling circadian evolution. *J Biol Rhythms.* 17 : 495-505.
- Roenneberg T, Merrow M. (2003). The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr. Biol.* 13 : R198-R207.
- Roenneberg T, Marrow M. (2005). Circadian clocks – The fall and rise of physiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 : 965-971.
- Ruesink JL, Lenihan HS, Trimble AC, Heiman KW, Micheli F, Byers JE, Kay MC. (2005). Introduction of non-native oysters: ecosystem effects and restoration implications. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 36 : 643-89.
- Rutter J, Reick M, McKnight SL. (2002). Metabolism and the control of circadian rhythms. *Annu. Rev. Biochem.* 71 : 307-331.

S

- Saigusa M. (1992). Phase shift of a tidal rhythm by light-dark cycles in the semi-terrestrial crab *Sesarma pictum*. *Biol Bull.* 182 : 257-264.
- Saigusa M, Oishi K. (2000). Emergence rhythms of subtidal small invertebrates in the subtropical sea: nocturnal patterns and variety in the synchrony with tidal and lunar cycles. *Zool Sci.* 17: 241-251.
- Sánchez-Vázquez FJ, Zamora S, Madrid JA. (1995a). Light-dark and food restriction cycles in sea bass: Effect of conflicting zeitgebers on demand-feeding rhythms. *Physiol Behav.* 58 : 705-714.
- Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S. (1995b). Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. *J Biol Rhythm.* 10 : 256-266.
- Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Iigo M, Tabata M. (1996). Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol Behav.* 60 : 665-674.
- Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Tabata M. (1997). Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J Comp Physiol A.* 181 : 121-132.
- Saurel C, Gascoigne JC, Palmer MR, Kaiser MJ. (2007). In situ mussel feeding behavior in relation to multiple environmental factors: regulation through food concentration and tidal conditions. *Limnol Oceanogr.* 52 : 1919–1929.
- Sayer A, Hu Q, Bourdelais AJ, Baden DG, Gibson JE. (2005). The effect of brevetoxin on brevetoxin-induced DANN damage in human lymphocytes. *Arch Toxicol.* 79 : 683-688.
- Sayer AN, Hu Q, Bourdelais AJ, Baden DG, Gibson JE. (2006). The inhibition of CHO-K1-BH4 cell proliferation and induction of chromosomal aberrations by brevetoxins in vitro. *Food Chem Toxicol.* 44 : 1082-1091.
- Scargle JD. (1982). Studies in astronomical time series analysis. II. Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. *Astrophys J.* 263 : 835-853.
- Schwartz WJ, Gross RA, Morton MT. (1987). The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 1694-1698.
- Schwartzmann C, Durrieu G, Sow M, Ciret P, Lazareth CE, Massabuau JC. (2011). In situ giant clam growth rate behavior in relation to temperature: A one-year coupled study of high-frequency noninvasive valvometry and sclerochronology. *Limnol Oceanogr.* 56: 1940-1951.
- Sellner KG, Doucette GJ, Kirkpatrick GJ. (2003). Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30 : 383-406.

- Sheeba V, Sharma VK, Chandrashekar MK, Joshi A. (1999). Persistence of eclosion rhythm in *Drosophila melanogaster* after 600 generations in an aperiodic environment. *Naturwissenschaften*. 86 : 448-449.
- Sheeba V, Kaneko M, Sharma VK, Holmes TC. (2008). The drosophila circadian pacemaker circuit: pas de deux or tarantella? *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 43 : 37-61.
- Song YH, Ito S, Imaizumi T. (2010). Similarities in the circadian clock and photoperiodism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 13 : 594-603.
- Soud-Mensi G, Moukha S, Mobio TA, Maaroufi K, Creppy EE. (2008). The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicol*. 51 : 1338-1344.
- Southward AJ, Crisp DJ. (1965). Activity rhythms of barnacles in relation to respiration and feeding. *J Mar Biol Assoc UK*. 45 : 161-185.
- Stelling J, sauer U, Szallasi Z, Doyle III FJ, Doyle J. (2004). Robustness of cellular functions. *Cell*. 118 : 675-685.
- Stephan FK, Zucker I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 69 : 1583-1586.

T

- Takahashi JS. (2004). Finding new clock components: past and future. *J. Biol. Rhythms*. 19 : 339-347.
- Tango PJ, Magnien R, Butler W, Lockett C, Luckenbach M, Lacouture R, Poukish C. Impacts and potential effects due to *Prorocentrum minimum* blooms in Chesapeake Bay. *Harmful Algae*. 4 : 525-531.
- Tauber E, Last KS, Olive PJW, Kyriacou CP. (2004). Clock gene evolution and functional divergence. *J Biol Rhythms*. 19 : 445-458.
- Taylor AC, Naylor E. (1977). Entrainment of the locomotor rhythm of *Carcinus* by cycles of salinity change. *J Mar Biol Assoc UK*. 57 : 273-277.
- Tessmar-Raible K, Raible F, Arboleda E. (2011). Another place, another timer: Marine species and the rhythms of life. *Bioessays*. 33 :165-172.
- Time Series Analysis Serial Cosinor 6.3. <http://www.euroestech.net>
- Tomita J, Nakajima M, Kondo T, Iwasaki H. (2005). No transcription-translation feedback in circadian rhythm of kaiC phosphorylation. *Science*. 307 : 251-254.
- Torréton JP, Rochelle-Newall E, Pringault O, Jacquet S, Faure V, Briand E. (2010). Variability of primary and bacterial production in a coral reef lagoon (New Caledonia). *Marine Pollution Bulletin*. 61: 335-348.

- Tran D, Ciret P, Ciutat A, Durrieu G, Massabuau, J-C. (2003). Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ Toxicol Chem.* 22 : 116-122.
- Tran D, Massabuau JC, Vercelli C. (2008). Influence of sex and spawning status on oxygen consumption and blood oxygenation status in oysters *Crassostrea gigas* cultured in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Aquaculture.* 277 : 58-65.
- Tran D, Haberkorn H, Soudant P, Ciret P, Massabuau JC. (2010). Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture.* 298 : 338-345.
- Tran D, Nadau A, Durrieu G, Ciret P, Parisot JP, Massabuau J-C. (2011). Field chronobiology of a molluscan bivalve : how the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiol Int.* 28 : 307-317.
- Troost K. (2010). Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *J Sea Res.* 64 : 145-165.
- Truhaut R. (1977). Ecotoxicology : Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 1:151-173.

V

- Valdiglesias V, Mendez J, Pasaro E, Cemeli E, Anderson D, Laffon B. (2010). Assessment of okadaic acid effects on cytotoxicity, DANN damage and DANN repair in human cells. *Mutat Res.* 689 : 74-79.
- Valdiglesias V, Laffon B, Pasaro E, Cemeli E, Anderson D, Mendez J. (2011). Induction of oxidative DANN damage by the marine toxin okadaic acid depends on human cell type. *Toxicol.* 57 : 882-888.
- Van Gelder RN. (2002). Tales from the Crypt(ochromes). *J. Biol. Rhythms.* 17 : 110-120.
- Von Dassow P, Montresor M. (2011). Unveiling the mysteries of phytoplankton life cycles: patterns and opportunities behind complexity. *J Plankton Res.* 33 : 3-12.

W

- Wang TA, Yu YV, Govindaiah G, Ye X, Artinian L, Coleman TP, Sweedler JV, Cox CL, Gillette MU. (2012). Circadian rhythm of redox state regulates excitability in suprachiasmatic nucleus neurons. *Science.* 337 : 839-842.
- Warman CG, Naylor E. (1995). Evidence for multiple, cue-specific circatidal clocks in the shore crab *Carcinus maenas*. *J Exp Mar Biol Ecol.* 189 : 93-101.

- Webb HM. (1976). Interactions of daily and tidal rhythms. In: DeCoursey DJ (ed). *Biological rhythms in the marine environment*. Columbia: University of South Carolina Press. Pp 129-135.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*. 14 : 697-706.
- Wilcockson D, Zhang L. (2008). Circatidal clocks. *Curr. Biol*. 18 : R753-755.
- Wildish D, Lassus P, Martin J, Saulnier A, Bardouil M. (1998). Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* sp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 11 : 35-43.
- Williams BG, Naylor E. (1969). Synchronization of the locomotor tidal rhythm of *Carcinus*. *J Exp Biol*. 51 : 715-725.
- Williams BG, Palmer JD, Hutchinson DN. (1993). Comparative studies of tidal rhythms XIII Is a clam clock similar to those of other intertidal animals? *Mar Behav Physiol*. 24 : 1-14.
- Williams BG, Pilditch CA. (1997). The entrainment of persistent tidal rhythmicity in a filter-feeding bivalve, using cycles of food availability. *J Biol Rhythms*. 12 : 173-181.
- Williams BG. (1998). The lack of circadian timing in two intertidal invertebrates and its significance in the circatidal/circalunidian debate. *Chronobiol Int*. 15 : 205-218.
- Wilson R, Reuter P, Wahl M. (2005). Muscling in on mussels: new insights into bivalve behaviour using vertebrate remote-sensing technology. *Mar Biol*. 147 : 1165-1172.
- Wright JLC, Boyd RK, De Freitas ASW, Falk M, Foxall RA, Jamieson WD, Laycock MV, McCulloch AW, McInnes AG, Odense P, et al. (1989). Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can J Chem*. 67 : 481-490.
- Wright JLC. (1995). Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. *Food Research International*. 28 : 347-358.

Y

- Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*. 302 : 1408-1412.
- Yan T, Zhou M, Fu M, Wang Y, Yu R, Li J. (2001). Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop, *Chlamys farreri*, associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Toxicon*. 39 : 1239-1244.
- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto GK, Clardy J. (1985). Diarrhetic Shellfish toxins. *Tetrahedron*. 41 : 1019-1025.

Yerushalmi S, Green RM. (2009). Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecol Lett.* 12 : 970-981.

Young MW, Kay SA. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.* 2 : 702-715.

Z

Zhang EE, Kay SA. (2010). Clocks not winding down: unravelling circadian networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 : 764-776.

Zhang G, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, Yang P, Zhang L, Wang X, Qi H et al. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature.* 11413: doi:10.1038

Zuther P, Gorbey S, Lemmer B. Chronos-Fit 1.06, <http://www.ma.uniheidel>

Résumé

Les rythmes biologiques constituent une propriété fondamentale de la vie, permettant aux organismes d'appréhender leur environnement et d'en anticiper les changements. Ces rythmes possèdent une double origine : une horloge moléculaire génère ces rythmes, qui sont ensuite synchronisés par des facteurs environnementaux. Si les organismes terrestres sont essentiellement soumis au rythme d'alternance jour/nuit, les espèces marines côtières et estuariennes occupent un biotope plus changeant encore : ils sont en effet également confrontés au rythme des marées. Pourtant, leurs rythmes biologiques sont à ce jour encore mal connus et les mécanismes moléculaires de(s) l'horloge(s) sous-jacente(s) ne sont pas caractérisés. Parallèlement, les efflorescences d'algues toxiques, en constante augmentation depuis 1970, constituent un problème écologique majeur, tant local qu'international. Les objectifs du présent travail consistaient à caractériser les rythmes de référence de l'huître *Crassostrea gigas* et d'en déterminer l'origine (moléculaire, zeitgebers). Il s'agissait ensuite d'étudier les perturbations potentielles de ces rythmes par l'algue toxique *Alexandrium minutum*, qui produit des toxines paralytiques et est régulièrement présente dans de nombreuses mers du globe. Les travaux réalisés ont permis de mettre en évidence l'existence d'un rythme d'activité valvaire circadien, faible et dual, et n'a pas permis de supporter l'hypothèse de l'existence d'une horloge circatidale. Nous avons formulé l'hypothèse que, chez *C. gigas*, le rythme tidal est soit d'origine exogène, soit produit par l'horloge circadienne synchronisée par les marées. Les analyses moléculaires réalisées sur le gène circadien *cryptochrome* dans le muscle adducteur - effecteur du mouvement des valves - ont montré que ce gène oscille à une fréquence tidale dans le muscle strié, favorisant notre seconde hypothèse. Par ailleurs, au-delà des gènes de l'horloge, l'algue *A. minutum* réprime l'expression de gènes impliqués dans différentes voies métaboliques importantes : la lutte contre le stress oxydant (*cat*, *gpx*), la respiration mitochondriale (*cox1*), l'immunité (*ilk*), la détoxification (*mdr*). Finalement nos analyses ont permis de mettre en évidence un impact génotoxique d'*A. minutum* chez *C. gigas*.

Mots clés : *Crassostrea gigas*, rythme biologique, horloge biologique, horloge circadienne, horloge circatidal, algues toxiques, *Alexandrium minutum*, saxitoxine, cryptochrome, génotoxicité.

Analysis of biological rhythms in the oyster *Crassostrea gigas* and of potential rhythm disruption by the harmful algae *Alexandrium minutum*.

Biological rhythms constitute a fundamental property of life, allowing organisms to anticipate and adapt to their changing environment. These rhythms present a double origin: they are generated by a molecular clock and synchronized by environmental cues. Whereas terrestrial organisms are mainly subjected to day/night alternation, coastal and estuarine marine species inhabit an even more cycling biotope. They are indeed also submitted to tides. Nevertheless, biological rhythms in marine species are still unrecognized and molecular mechanisms of the underlying oscillator(s) are to date not determined. At the same time, toxic algae blooms are increasing since the 1970s and represent a major ecological concern, both at local and international levels. An objective of the present work was the characterization of biological rhythms in the oyster *Crassostrea gigas* and of their origin (molecular mechanism, zeitgebers). Furthermore, the work was designed to study the potential disruption of these rhythms by the toxic algal of worldwide distribution *Alexandrium minutum*, which produces paralytic toxins. The present results show the existence of a weak and dual circadian rhythm of valve activity in the oyster, and do not provide evidence for the existence of any circatidal clock. We suggested that, in the oyster *C. gigas*, the tidal rhythm could either be generated exogenously or endogenously by the tidally-synchronized circadian clock. Molecular analyses performed on the circadian gene *cryptochrome* in the adductor muscle of oyster, the effector of valve movements, revealed that *CgCRY* oscillates at tidal frequency in the striated muscle. This result supports our second hypothesis. Furthermore, *A. minutum* represses the expression of genes involved in key metabolic pathways: struggle against oxidative stress (*cat*, *gpx*), mitochondrial respiration (*cox1*), immunity (*ilk*), detoxication (*mdr*). Moreover, *A. minutum* impacts *C. gigas* at DNA level, being thus genotoxic.

Keywords: *Crassostrea gigas*, biological rhythm, biological clock, circadian rhythm, circatidal rhythm, harmful algae, *Alexandrium minutum*, saxitoxin, cryptochrome, genotoxicity