



HAL
open science

Chronobiologie moléculaire et comportementale des huîtres *Crassostrea gigas* diploïdes et triploïdes exposées à l'algue toxique *Alexandrium minutum*

Laura Payton

► **To cite this version:**

Laura Payton. Chronobiologie moléculaire et comportementale des huîtres *Crassostrea gigas* diploïdes et triploïdes exposées à l'algue toxique *Alexandrium minutum*. Interactions entre organismes. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0613 . tel-01579783

HAL Id: tel-01579783

<https://theses.hal.science/tel-01579783>

Submitted on 31 Aug 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

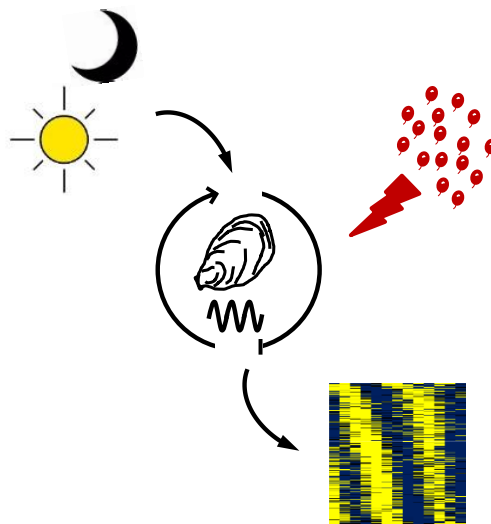
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENT
SPÉCIALITÉ : GÉOCHIMIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

Par Laura PAYTON

**Chronobiologie moléculaire et comportementale
des huîtres *Crassostrea gigas* diploïdes et triploïdes
exposées à l'algue toxique *Alexandrium minutum*.**

Sous la direction de : Damien TRAN et Jean-Charles MASSABUAU



THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENT
SPÉCIALITÉ : GÉOCHIMIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

Par Laura PAYTON

**Chronobiologie moléculaire et comportementale
des huîtres *Crassostrea gigas* diploïdes et triploïdes
exposées à l'algue toxique *Alexandrium minutum*.**

Sous la direction de :

Damien TRAN et Jean-Charles MASSABUAU

Soutenue le 15 Juin 2017

Membres du jury :

M. de MONTAUDOUIN, Xavier
Mme FALCIATORE, Angela
M. BUSTAMANTE, Paco
Mme HEGARET, Hélène
Mme HOEDE, Claire

Professeur, Université de Bordeaux
Directrice de recherche, CNRS UPMC
Professeur, Université de la Rochelle
Chargée de recherche, CNRS, UBO
Ingénieure, INRA Toulouse

Président
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice

Remerciements

Je remercie Antoine Grémare, Thierry Corrège, Magalie Baudrimont et Frédéric Garabetian pour leur accueil au sein du laboratoire EPOC et de la station Marine d'Arcachon.

Merci à Jean-Charles Massabuau, Patrice Gonzalez, et tous les membres de l'équipe Ecotoxicologie Aquatique de m'avoir accueillie au sein de l'équipe.

Je remercie très sincèrement Angela Falciatore et Paco Bustamante d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également Xavier de Montaudouin, Hélène Hégaret et Claire Hoede d'avoir accepté d'évaluer de cette thèse.

Je tiens à adresser ma sincère reconnaissance à mes deux directeurs de thèse, Damien Tran et Jean-Charles Massabuau pour m'avoir accordé l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci beaucoup pour votre soutien et votre disponibilité qui m'ont permis de réaliser ce travail de recherche dans de bonnes conditions.

Jean-Charles, merci pour votre aide, vos conseils et pour votre implication notamment lors de la mise en place des suivis du comportement des huîtres sur le terrain.

Damien, un très grand merci. Merci de m'avoir fait découvrir le travail de recherche et la chronobiologie. Merci de m'avoir permis de réaliser toutes ces belles expériences. Merci pour la qualité de ton encadrement scientifique, ton temps, ta disponibilité, ta patience, ton soutien et ta gentillesse.

Un grand merci également à Mickael Perrigault. Merci de m'avoir formé avec patience à la biologie moléculaire et à la bactériologie. Merci pour ton temps, ta volonté à toute épreuve et ta gentillesse.

J'ai eu beaucoup de chance et je vous remercie pour ce beau travail d'équipe. Merci pour les manips, où on s'est tous remonté les manches (remplir les nourrices d'eau de mer artificielle, se fouler la cheville, centrifuger des cultures bactériennes à pas d'heures, faire et refaire des gels, remonter des poches, souder et dé-souder des électrodes tous les deux mois.. et j'en passe !). Merci aussi pour la qualité des échanges scientifiques, les corrections, les discussions... Merci de m'avoir formé avec patience.

Merci beaucoup à Jean-Paul Bourdineaud pour le temps qu'il a accordé à des discussions constructives, merci pour sa gentillesse et les connaissances qu'il m'a apportées.

Merci beaucoup également à Mohamedou Sow d'avoir mis la main à la pâte quand cela était nécessaire et pour sa collaboration précieuse dans la découverte des outils nécessaires à l'analyse chronobiologique du transcriptome ainsi que dans l'analyse du comportement de nos chères huîtres.

Merci à Pierre Ciret pour son savoir-faire en valvométrie, son aide dans la mise en place des valvomètres, ses conseils avisés et sa gentillesse.

Merci beaucoup à Anjara Marcel pour sa collaboration précieuse pendant la manip interférence. Je te souhaite une belle continuation !

Merci à Bruno pour l'initiation et les coups de mains pour les cultures d'algues.

Merci à Cerise et Patrice pour le travail sur la plateforme de biologie moléculaire. Merci beaucoup à Fabien et Anthony pour leur aide et conseils sur le séquençage du transcriptome et le traitement bio-statistique des données.

Merci également aux plongeurs de la station Marine d'Arcachon pour l'aide dans la mise en place des valvomètres. Merci aux secrétaires de la station Marine, Emilie, Sandrine et Marie-Claude.

Un grand merci à tous les membres de l'ANR ACCUTOX pour les échanges au cours des réunions. Particulièrement, je tiens à remercier Philippe Soudant, Hélène Hégaret, Caroline Fabioux, Arnaud Huvet. Merci à Pierre Boudry pour les discussions sur les huîtres triploïdes. Merci Arnaud et Caro pour vos conseils sur l'interférence. Merci également à Floriane Bouillot, Malwenn Lassudrie, Justine Castrec, Marc Lelong (merci pour le coup de main dans la dissection des huîtres en plein été !), Audrey Mat, Emilien Pousse, pour les échanges et discussions.

Merci Caroline, Arnaud, Hélène et Floriane d'avoir peu dormi et survécu dans la bonne humeur aux prélèvements toutes les 4 heures pendant deux jours !

Je tiens à remercier Stéphane Pouvreau et les techniciens de la station marine d'Argenton pour leur collaboration dans l'étude du comportement valvaire des huîtres en Rade de Brest, dans ce joli lieu de la pointe du château.

Je remercie Olivier Bouchez et Adeline Chaubet de la plateforme génomique de Toulouse pour le temps qu'ils m'ont accordé et leur compréhension. Merci pour ce beau séquençage du transcriptome de C. gigas !

Un grand merci à Claire Hoede qui m'a initié avec patience au traitement bio-informatique et bio-statistique du séquençage ! Merci pour cette collaboration très constructive et pour le temps passé sur ce travail. Merci également à l'ensemble de ses collègues de m'avoir accueillie très gentiment quelques jours.

Merci à Katherine Flynn pour les remarques et corrections de l'anglais.

Merci beaucoup à mes collègues de bureau ! Mickaël et Fanny, pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Et aussi Maria (vive Lisbonne !) et ses cours d'anglais (et son imitation parfaite du prof), et Lucie qui m'a très gentiment accueillie à mon arrivée en thèse. Merci beaucoup. Je vous souhaite beaucoup de bonheur à tous.

Merci aussi à Mohcine et Alison pour leur sympathie.

Fanny, je te remercie pour ton soutien inconditionnel et ta grande gentillesse. Merci aussi pour toutes tes très grandes qualités. Et bravo pour ce beau travail. Tu peux être très fière de toi.

Un grand merci à Florence Daniel, pour son aide et sa bienveillance au quotidien. Merci pour tes histoires le midi, et l'apport en vitamines ces dernières semaines...

Merci beaucoup Alyssa d'être venue égayer notre quotidien le temps de ton stage de M2 !

Je souhaite également une bonne continuation à mes anciens collègues du master EXCE et aux autres stagiaires et thésards que j'ai rencontrés.

Enfin, merci à mes amis et ma famille.

Emila, Fanny, Chloé, Mélanie, merci pour votre soutien, votre amitié, et les rigolades.

Linette je pense bien fort à toi et merci pour tout.

Lulu, l'huître qui frétille (comme l'huile), la correction de la thèse, ton aide et les soirées à l'appart.. Un immense merci ! Et vive l'animation socio-culturelle et l'éducation populaire !

Et surtout bravo à toutes. Que l'épanouissement continue !

Bravo aussi à Raphaël et ses projets. Et Hélène je pense à toi aussi.

Un merci à mes copines Marine, Hélène et Anatolie !

Un immense merci à ma sœur, Elsa, pour son grand soutien, sa sagesse, et sa gentillesse. Bravo pour tout ton travail. La Grange a beaucoup de chance de vous avoir trouvés. Je pense aussi bien fort à Violette (on va lui faire goûter les huîtres bientôt !) et à Gérald !

Un grand merci à mon frère Steven. Et bravo de t'être lancé dans l'aventure de « sea front » dans notre contrée prénatale..

Un grand merci à mes parents. Merci à ma mère pour son soutien et tous ses bons petits plats. Merci à mon père pour son soutien et son aide.

Pensées aussi bien sûr pour Maria, Anna, Guillaume et Henri. Merci pour tout, et très belle continuation dans vos projets !

Sommaire

Préambule.....	5
Chapitre I : Introduction.....	9
1. Objectifs de l'étude	10
2. L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	14
2.1. Répartition et aquaculture	14
2.2. Systématique et écologie.....	14
2.3. Anatomie et biologie	15
2.4. L'huître triploïde	17
3. Les micro-algues toxiques.....	18
3.1. Phénomènes d'efflorescences	18
3.2. Principales phycotoxines.....	20
3.3. Les micro-algues du genre <i>Alexandrium</i>	21
4. Impacts du genre <i>Alexandrium</i> sur les bivalves marins	25
4.1. Bioaccumulation des PSP.....	25
4.2. Impacts physiologiques du genre <i>Alexandrium</i> sur les bivalves marins.....	27
4.3. Impact d' <i>Alexandrium minutum</i> sur le comportement de l'huître <i>C. gigas</i>	28
5. Les rythmes biologiques.....	29
5.1. Bref historique.....	29
5.2. Caractéristiques des rythmes biologiques	31
5.3. Le rythme circadien.....	33
5.4. Le rythme circannuel.....	38
6. Les rythmes biologiques chez les organismes marins.....	40
6.1. Rappel sur les cycles astraux influençant l'environnement marin	40
6.2. Les rythmes observés chez les invertébrés marins.....	41
6.3. Etudes moléculaires de la rythmicité chez les invertébrés marins	43
6.4. Les rythmes biologiques chez <i>Crassostrea gigas</i>	47
7. Lien entre rythmes biologiques et contamination	50
7.1. Études des interactions entre rythmes biologiques et xénobiotiques	50
7.2. Perturbation des rythmes biologiques par <i>Alexandrium minutum</i>	52
Chapitre II : Matériels et méthodes	55
1. Huîtres et micro-algues	56
1.1. Les huîtres creuse <i>Crassostrea gigas</i>	56

1.2. Micro-algues.....	57
2. Conditions générales d'expérimentation.....	58
2.1. Dispositif expérimental.....	58
2.2. Apports en eau de mer et micro-algues.....	59
2.3. Prélèvement des organismes.....	59
3. Dosage des toxines paralysantes (PSP).....	60
3.1. Principe du test ELISA.....	60
3.2. Protocole.....	61
4. Étude du comportement par valvométrie HFNI.....	61
4.1. Principe de la valvométrie HFNI.....	61
4.2. Traitement des données HFNI.....	63
5. Expression des gènes de l'horloge.....	66
5.1. Prélèvement et conditionnement des échantillons.....	66
5.2. Extraction des ARN totaux.....	66
5.3. Retro-transcription.....	67
5.4. PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).....	68
5.5. Calcul de l'expression relative.....	69
6. Séquençage haut débit du transcriptome.....	70
6.1. Prélèvement et conditionnement des échantillons.....	70
6.2. Préparation des échantillons.....	70
6.3. Séquençage.....	70
6.4. Traitement bio-informatique.....	71
6.5. Traitement bio-statique pour l'analyse des expressions différentielles.....	72
6.6. L'analyse des fonctions biologiques.....	73
7. Analyses chronobiologiques.....	74
7.1. Analyse statistique des données comportementales.....	74
7.2. Analyse bio-statistique des données de transcriptomique.....	75
8. Interférence par ARN.....	77
8.1. Principe de l'interférence.....	77
8.2. Principe de la stratégie du cheval de Troie.....	78
8.3. Production d'ARN double brin par des bactéries transformées.....	79
8.4. Protocole d'administration.....	82
8.5. Discrimination entre les ARNm <i>Clock</i> endogène et les ARN double brin <i>Clock</i> introduits dans les tissus de l'huître.....	84

Chapitre III : Étude <i>in situ</i> des rythmes des huîtres <i>C. gigas</i> diploïdes et triploïdes. Effet de la ploïdie sur le comportement saisonnier.....	85
1. Préambule.....	86
2. Article: How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, <i>Crassostrea gigas</i>	88
3. Conclusion.....	114
Chapitre IV : Interférence du gène <i>Clock</i> par la stratégie du cheval de Troie pour l'étude de l'implication de l'horloge circadienne dans les processus de bioaccumulation des phycotoxines PSP.....	117
1. Préambule.....	118
2. Article: Trojan horse strategy for non-invasive interference of <i>Clock</i> gene in the oyster <i>Crassostrea gigas</i>	120
3. Conclusion.....	142
Chapitre V : Transcriptome cyclique de <i>Crassostrea gigas</i> . Impact d'une exposition à <i>Alexandrium minutum</i>	145
1. Préambule.....	146
2. Article : Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster <i>Crassostrea gigas</i> by the harmful algae <i>Alexandrium minutum</i>	148
Suppléments d'information	174
3. Conclusion.....	186
Chapitre VI : Conclusions générales et perspectives	191
1. Discussion et conclusions générales.....	192
1.1. Apport des résultats en chronobiologie des huîtres diploïdes et triploïdes	192
1.2. Apport des résultats sur la contamination des huîtres par <i>A. minutum</i>	198
1.3. Développement de l'interférence par la stratégie du cheval de Troie.....	201
2. Perspectives de recherches	202
2.1. En chronobiologie des huîtres <i>C. gigas</i>	202
2.2. Sur l'étude de la contamination des huîtres par <i>A. minutum</i>	204
Références bibliographiques	207
Annexes.....	235
Liste des articles scientifiques.....	236
Implication dans des projets de recherche.....	236
Collaborations pendant le travail de thèse.....	237
Présentations orales et posters.....	237
Activités complémentaires au travail de recherche pendant la thèse	238

Préambule

Ce travail de recherche se situe dans un contexte d'augmentation des phénomènes d'efflorescences de micro-algues toxiques dans les zones littorales marines, favorisée par les activités anthropiques. Ces phénomènes, dits *Harmful Algal Blooms* (HAB) en anglais, ont des impacts importants sur les écosystèmes marins, provoquant la dégradation des habitats et des effets délétères, voire mortels, sur les organismes, ainsi que sur les activités socio-économiques telles que la pêche, l'aquaculture et le tourisme. La France est affectée notamment par des efflorescences toxiques de dinoflagellés du genre *Dinophysis*, producteurs de toxines diarrhéiques, et *Alexandrium*, producteurs de toxines paralysantes (dites PSP, pour *Paralytic Shellfish Poisoning*), ainsi que de diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*, productrices de toxines amnésiantes (dites ASP, pour *Amnesic Shellfish Poisoning*). Ces phénomènes sont très surveillés en raison du risque sanitaire d'intoxication par ces phycotoxines, notamment via la consommation d'organismes contaminés (FAO and WHO 2016). Les mollusques bivalves marins, tels que les huîtres, moules, palourdes, coques ou coquilles Saint-Jacques, sont les plus susceptibles d'accumuler des phycotoxines lors de phénomènes d'efflorescences de par leur activité de filtration du phytoplancton, à la base de leur alimentation. Parmi les bivalves vecteurs de contamination, l'huître creuse *Crassostrea gigas* tient une place majeure dans la perte économique engendrée en cas de fermeture de commercialisation, la France étant le premier producteur d'huître à l'échelle européenne et le 4^e à l'échelle mondiale. De plus, cette espèce est présente dans les écosystèmes côtiers selon une large distribution géographique, à l'état cultivé et sauvage (espèce invasive), et constitue donc un modèle clé pour l'étude de l'impact écotoxicologique des efflorescences toxiques sur les organismes marins.

Les dinoflagellés producteurs de PSPs du genre *Alexandrium* ont une répartition mondiale. En France, des efflorescences d'*Alexandrium minutum* sont observées depuis la fin des années 1980 et leurs intensités augmentent ces dernières années. En 2012, en rade Brest, *A. minutum* a atteint des concentrations de plus de 40 000 cellules.mL⁻¹ dans la colonne d'eau. Les concentrations maximales de PSP accumulées dans la chair des coquillages pouvaient atteindre 10 fois le seuil sanitaire (0,8 mg d'équivalent STX par kilogramme de poids frais), entraînant la fermeture de leur commercialisation (Chapelle et al. 2015). Des événements d'efflorescences dans la rade de Brest ont été observés chaque été à la suite de cet épisode. Par ailleurs, lors de l'évaluation du niveau de contamination par les PSP, de très fortes variations inter-individuelles d'accumulation des toxines sont observées chez les huîtres creuses *C. gigas*, pouvant atteindre un facteur de 1 à 80 entre les individus, suggérant une différence de sensibilité (Haber Korn et al. 2011). Des variabilités d'accumulation ont également été montrées entre les huîtres diploïdes et les huîtres triploïdes (qui possèdent trois jeux de chaque chromosome au lieu de deux). Pendant la période de reproduction, ces dernières accumuleraient 2 à 3 fois plus de phycotoxines PSP que les huîtres diploïdes (Haber Korn et al. 2010a; Guéguen et al. 2012). Une hypothèse avancée pour expliquer cette différence était les modifications physiologiques que leur confère la triploïdie: une croissance plus importante et une réduction de la gamétogénèse. Face à la répétition des efflorescences d'algues toxiques, il devient alors essentiel d'améliorer la compréhension du déterminisme de l'accumulation des toxines par les huîtres ainsi que les impacts de ces toxines sur la physiologie des bivalves. Dans ce contexte, un projet ANR (Agence Nationale de la

Recherche) ACCUTOX (2013-2017) intitulé « De la caractérisation des déterminants de l'accumulation des toxines paralysantes (PSP) chez l'huître (*C. gigas*) au risque sanitaire dans son contexte sociétal. » est en cours de réalisation. C'est dans cette problématique scientifique que s'inscrit ma thèse.

Forte variabilité de bioaccumulation des toxines PST chez les huîtres.

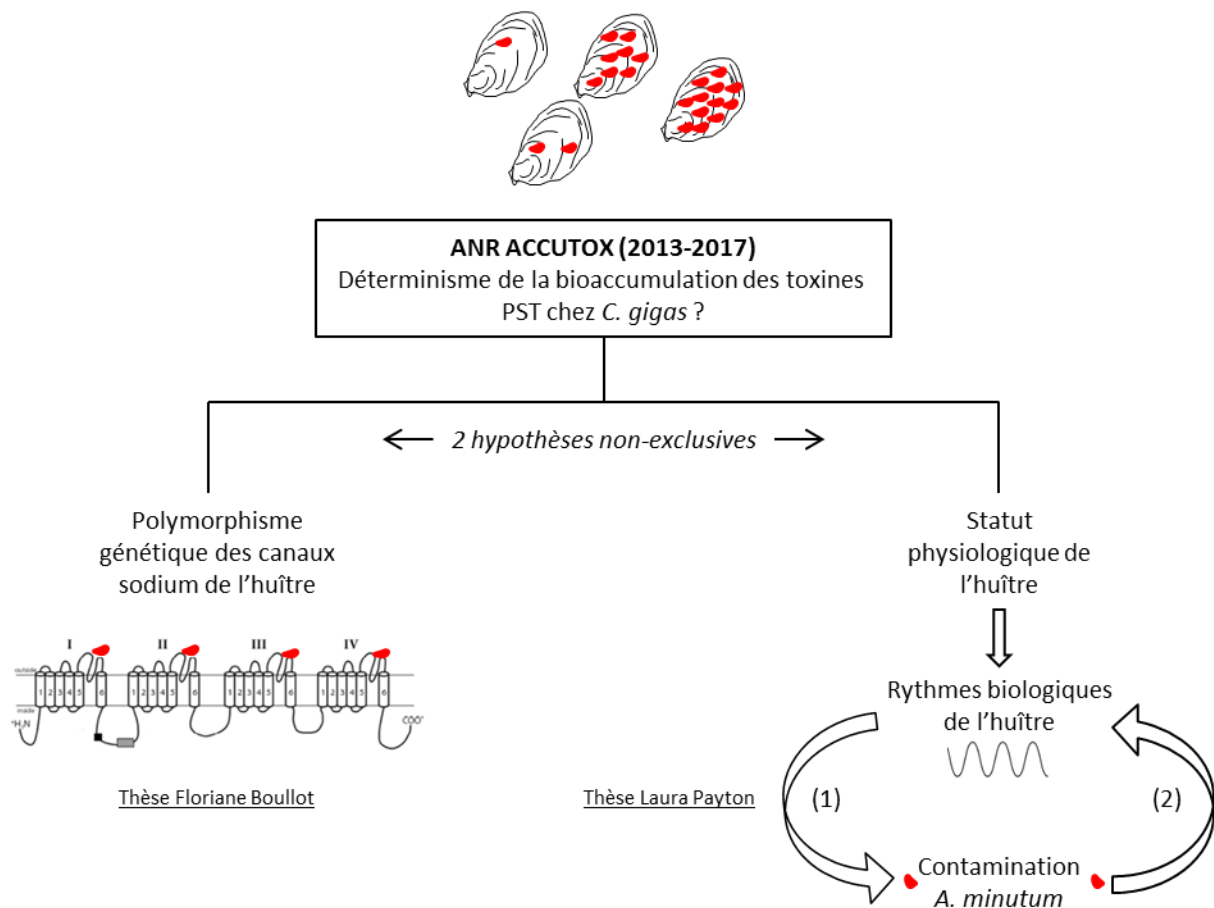


Figure 1. Problématique d'étude de l'ANR ACCUTOX. Deux hypothèses non-exclusives sont posées pour comprendre le déterminisme de l'accumulation des toxines paralysantes (PSP) chez l'huître *C. gigas*. La première, est le polymorphisme génétique des canaux sodium de l'huître, la deuxième, est le statut physiologique de l'huître. Dans ma thèse, cette deuxième hypothèse est abordée via le prisme des rythmes biologiques. L'hypothèse posée est que les rythmes biologiques sont (1) impliqués dans la bioaccumulation des toxines PSP par la régulation temporelle des fonctions physiologiques, et (2) eux-mêmes impactés à leur tour par la toxicité d'*A. minutum*.

L'ANR ACCUTOX vise à caractériser le déterminisme de l'accumulation des toxines PSP chez l'huître creuse *C. gigas* lors de phénomènes d'efflorescences d'*A. minutum*. Deux hypothèses non-exclusives sont posées (Figure 1). La première hypothèse propose que les variabilités d'accumulation de toxines entre les huîtres s'expliquent par une variabilité de sensibilité des huîtres aux toxines PSP, liée au polymorphisme des canaux sodium voltage-

dépendant, cibles des toxines paralysantes (thèse de Floriane Boullot, 2017). En effet, il a été montré chez la mye *Mya arenaria* que des individus résistants aux toxines PSP bioaccumulent jusqu'à 4 fois plus de toxines que les individus sensibles, et que cette résistance est associée à une mutation unique dans le gène codant pour les canaux sodium voltage-dépendants (Bricelj et al. 2005). La deuxième hypothèse propose que les variabilités d'accumulation des toxines s'expliquent par le statut physiologique des huîtres. Les huîtres triploïdes peuvent alors servir de support d'étude, de par leur statut physiologique modifié. C'est dans cette deuxième hypothèse que s'intègre ma thèse. Dans mon travail, j'aborde la problématique du statut physiologique via le prisme des rythmes biologiques des huîtres diploïdes et triploïdes. D'une part, je pose l'hypothèse que par leur action en amont des fonctions physiologiques, par le contrôle de leur temporalité, les rythmes biologiques des huîtres sont impliqués dans les processus de bioaccumulation des toxines PSP. D'autre part, l'hypothèse est qu'en contrepartie, les rythmes biologiques des huîtres sont eux-mêmes impactés par la toxicité des algues *Alexandrium minutum*.

Chapitre I

Introduction

1. Objectifs de l'étude

L'objectif de ce travail de recherche est de comprendre les interactions entre les rythmes biologiques des huîtres *Crassostrea gigas*, notamment en fonction de leur ploïdie, et la contamination de ces organismes marins par les phycotoxines PSP lors d'efflorescences aux algues *Alexandrium minutum*. Cette approche originale consiste à prendre en compte l'organisation temporelle des organismes dans le diagnostic écotoxicologique. La notion de temps, trop souvent minimisée, est pourtant cruciale à la survie et à l'équilibre d'un système biologique, de la cellule à l'écosystème. L'organisation temporelle d'un organisme par exemple, lui permet d'harmoniser l'ensemble de ses fonctions physiologiques, en évitant que deux fonctions contradictoires n'aient lieu au même moment. Se situer dans le temps permet également d'être en harmonie avec son écosystème, en accordant la temporalité de ses fonctions physiologiques avec les variations environnementales cycliques de son environnement, en termes de contraintes et de disponibilités des ressources énergétiques. Nous savons aujourd'hui que les organismes vivants possèdent une autonomie dans la mesure du temps. Ils créent leur propre temps, un temps biologique (Boissin and Canguilhem 1998). Plutôt que d'être passifs, ils donnent un sens aux signaux environnementaux qu'ils reçoivent périodiquement, et sont capables de les anticiper.

Comment imaginer alors que le temps astronomique, ainsi que le temps biologique propre à chaque organisme, ne soient pas cruciaux dans les processus de contamination ? En effet, a priori, il semblerait logique que les cinétiques et les intensités de contamination soient directement liées à l'état physiologique dans lesquels se trouvent les animaux en fonction de leurs rythmes biologiques internes. De même, à l'inverse, l'évaluation de la toxicité des contaminants sur les rythmes biologiques des organismes nous semble être cruciale. La perturbation de ces mécanismes de synchronisation des organismes avec leurs environnements représente un risque majeur pour l'intégrité de l'individu. La perte de l'harmonie de l'organisme avec son environnement peut mener à un risque écologique sous-estimé.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité de précédents travaux menés par l'équipe (équipe Ecotoxicologie Aquatique, axe 2 : Rythmes, perturbations et conséquences). Au lancement de cette approche entre chronobiologie et écotoxicologie chez les mollusques bivalves, rien n'était connu sur la chronobiologie de l'huître *C. gigas*. En effet les recherches sur les rythmes biologiques sont largement dominées par l'étude des organismes terrestres. Les rythmes biologiques chez les organismes marins reflètent la complexité de leur environnement, et sont connus pour être particulièrement bruités au laboratoire (Naylor 2010). La caractérisation moléculaire des mécanismes horlogers chez ces organismes aquatiques débute à peine. La recherche menée par l'équipe avance donc sur deux fronts simultanément: (i) la caractérisation des rythmes biologiques chez l'huître *C. gigas* en tant qu'espèce modèle de bivalve marin d'une part, (ii) l'étude de leur perturbation par la micro-algue *Alexandrium*

minutum d'autre part. Ces recherches sont menées par des approches intégrées, de l'expression génétique au comportement des huîtres.

Des premiers résultats avaient montré sur une année d'étude du comportement valvaire par valvométrie HFNI *in situ* que la durée d'ouverture valvaire d'huîtres *C. gigas* diploïdes placées en conditions subtidales présentait plusieurs rythmicités : tidale (cycle des marées), semi-lunaires (cycle synodique et anomalistique), et nyctémérale (Tran et al. 2011). La ponte des huîtres, qui suit quant à elle un rythme annuel, est synchronisée par une concordance de cycles annuels, lunaires, tidaux, et journaliers (Bernard et al. 2016). En parallèle, des études récentes au laboratoire avaient montré que la synchronisation entre l'huître *C. gigas* et son environnement dépend (d'au moins) un mécanisme horloger endogène. En absence de stimuli environnementaux (condition de « libre-court »), ce mécanisme endogène a une oscillation propre circadienne d'environ 24 heures (Mat et al. 2012; Perrigault and Tran 2017a). Par ailleurs, les travaux de thèse de Audrey Mat (2012) ont montré que cette horloge circadienne est plastique, labile et duale (*i.e.* nocturne l'automne-hiver et diurne printemps-été), et semblerait également être entrainable par les zeitgebers de la marée (Mat 2012; Mat et al. 2014, 2016). En condition d'alternance de jour et de nuit, un rythme nyctéméral avait été observé dans l'expression d'une dizaine de gènes, ainsi que dans la physiologie digestive et le comportement de *C. gigas* (Tran et al. 2015).

Le premier effet chronotoxique d'une algue toxique (*A. minutum*) sur le rythme nyctéméral de *C. gigas* a été observé récemment (Tran et al. 2015). La cyclicité journalière de l'expression du gène *Cryptochrome 1*, impliqué dans la synchronisation de l'horloge circadienne, de même que celle de gènes impliqués dans l'élimination des xénobiotiques, la réparation du stress oxydant, le métabolisme oxydatif et l'immunité disparaît suite à une exposition à *A. minutum* en condition réaliste d'exposition. Il en est de même pour la fonction digestive et le comportement valvaire de l'huître (Tran et al. 2015). Cet effet chronotoxique est aussi montré sur le rythme tidal de l'huître (Mat et al. 2016). Ces premiers résultats originaux ont montré l'effet perturbateur des algues toxiques sur la temporalité de certaines fonctions physiologiques et demandent à être suivis plus avant. Par contre, l'effet des rythmes biologiques sur les processus de bioaccumulation des phycotoxines n'a en revanche jamais été étudié jusqu'alors.

Dans ce travail de thèse, deux approches complémentaires sont appliquées pour aller plus loin dans la compréhension des rythmes biologiques des huîtres et dans leurs implications et/ou perturbations lors d'efflorescences d'algues *A. minutum*. Le premier objectif est d'évaluer l'implication des rythmes biologiques dans les processus de bioaccumulation de toxines PSP (Figure I 1A), le deuxième objectif est d'approfondir les connaissances sur l'impact des toxines PSP sur les rythmes biologiques des huîtres (Figure I 1B).

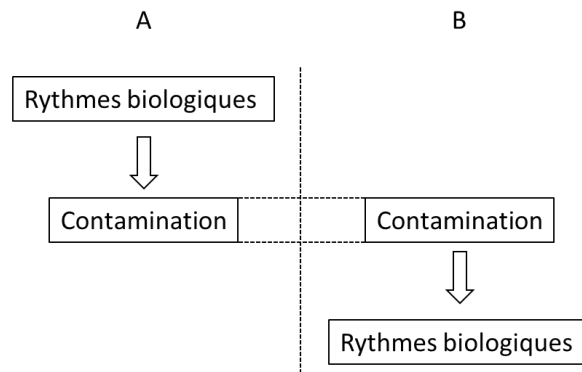


Figure I 1. Deux types d’approches complémentaires sont appliqués dans ce travail de thèse. A. Étude de l’implication des rythmes biologiques de *C. gigas* dans les processus de contamination des PSP (Chapitre III et IV). B. Étude de l’impact des toxines PSP sur les rythmes biologiques de l’huître *C. gigas* (Chapitre V).

Pour la première approche, la comparaison des huîtres diploïdes et triploïdes a servi de sujet d’étude pour évaluer l’implication des rythmes biologiques dans le déterminisme d’accumulation de toxines PSP. En effet, j’é mets l’hypothèse que la différence de ploïdie pourrait modifier les rythmes biologiques des huîtres et être à l’origine des différences d’accumulation de toxines PSP entre les huîtres diploïdes et triploïdes (Haber Korn et al. 2010a; Guéguen et al. 2012). Pour la deuxième approche, je pose l’hypothèse que *A. minutum* perturbe en profondeur, au niveau de l’expression génétique, la machinerie horlogère, tant au niveau de l’horloge elle-même qu’au niveau de l’expression des gènes sous son contrôle qui constituent l’ensemble du transcriptome cyclique de *C. gigas*.

Les travaux décrits dans ce document s’articulent en trois parties.

Dans un premier temps, j’ai voulu étudier si le comportement des huîtres diploïdes et triploïdes *in situ* présente des différences de synchronisation avec l’environnement en fonction de la ploïdie des huîtres. Je me suis particulièrement intéressée à la synchronisation du comportement par l’évolution annuelle de la photopériode, jusqu’alors méconnu chez l’huître creuse *C. gigas*, diploïde comme triploïde. Grâce à un suivi par valvométrie HFNI, le comportement d’huîtres diploïdes et triploïdes placées en conditions naturelles subtidales a été enregistré à haute fréquence et de manière non invasive pendant une année entière. J’ai alors analysé l’effet de l’évolution annuelle de la photopériode chez les deux types d’huîtres sur : la durée et l’amplitude d’ouverture valvaire, les rythmicités journalières, tidales et lunaires, la croissance, et les évènements de pontes. Cette étude est présentée dans le Chapitre III et fait l’objet d’un article soumis au journal *Plos One*. Le titre est “How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*”.

Dans un deuxième temps, j’ai testé expérimentalement l’implication de l’horloge circadienne des huîtres diploïdes et triploïdes dans la bioaccumulation des toxines PSP. Pour cela, nous avons développé une approche originale non invasive de l’interférence par ARN pour court-circuiter temporairement l’horloge circadienne des huîtres, par l’interférence du gène *Clock*, un élément clé de cette horloge. Cette étude a deux objectifs. Le premier objectif est de

valider l'efficacité de la méthode non invasive d'interférence par ARN, appelée approche du cheval de Troie, par la mesure du niveau d'expression du gène cible *Clock*, ainsi que celui de l'ensemble des gènes de l'horloge circadienne impactés en conséquence. Le deuxième objectif est d'évaluer si l'altération de l'horloge circadienne des huîtres modifie le niveau d'accumulation des toxines PSP lors d'une exposition à *A. minutum*. Cette étude est présentée dans le Chapitre IV et fait l'objet d'un article accepté dans le journal *Marine Biotechnology*. Le titre est "Trojan horse strategy for non-invasive interference of *Clock* gene in the oyster *Crassostrea gigas*".

Enfin, dans un dernier chapitre, pour aller plus loin dans la compréhension de l'horloge circadienne et du rythme nyctéméral de *C. gigas*, et surtout dans l'impact d'*A. minutum* sur les rythmes, j'ai réalisé le premier transcriptome cyclique de l'huître *C. gigas*. J'ai étudié l'expression temporelle de l'ensemble des transcrits des huîtres exposées ou non à *A. minutum*. Cette étude s'est faite par une approche de séquençage haut-débit (NGS) de l'ensemble du transcriptome (RNAseq) exprimé dans les branchies. Cette étude sur la perturbation d'un transcriptome cyclique par un contaminant aquatique, tel les algues toxiques est aussi une première chez un invertébré marin. Ce travail est présenté dans le Chapitre V et fait l'objet d'un article accepté dans *Scientific Reports*. Le titre est "Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum*".

Ce travail de recherche est introduit par une synthèse bibliographique des connaissances sur le sujet d'étude (Chapitre I) et la présentation du matériel et des méthodes utilisés dans ce travail (Chapitre II). Enfin, en conclusion générale, ce mémoire est conclu (Chapitre VI) par une synthèse de l'ensemble des travaux, ainsi que par des perspectives de recherches qui en découlent.

2. L'huître creuse *Crassostrea gigas*

2.1. Répartition et aquaculture

Crassostrea gigas est native des régions tempérées du Nord-Ouest de l'Océan Pacifique et de la mer du Japon (Japon et en Corée). L'espèce a été introduite par l'homme sur différentes zones côtières de par le monde à des fins d'aquaculture ou par accident. Cette espèce qui s'est très bien adaptée à différents écosystèmes, est souvent considérée comme invasive. On la trouve sur la côte Pacifique américaine, du sud de l'Alaska à la Californie, en Europe, et en Australie, en Nouvelle-Zélande et en Afrique du Sud (Ruesink et al. 2005; Troost 2010). Au-delà de la production commerciale, des populations sauvages sont aujourd'hui de plus en plus établies dans de nombreux endroits du monde, engendrant parfois de potentiels effets néfastes sur des espèces natives de par la modification des habitats et écosystèmes (Herbert et al. 2016).

En France, les importations de *Crassostrea gigas* débutent en 1971, suite à la disparition de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (elle-même importée à la fin du 19^{ème} siècle), décimée par une maladie virale. L'implantation sur les côtes françaises est là aussi une réussite et *Crassostrea gigas* devient la base de la production nationale d'huîtres (Grizel and Héral 1991).

Les huîtres *C. gigas* dominent la production de bivalves en aquaculture dans de nombreuses régions du monde. Sa production au niveau mondial est d'environ 626 000 tonnes en 2014 (FAO 2016a). De son côté, la France est le plus gros producteur d'huîtres creuses d'Europe, et le 4^{ème} mondial, avec environ 120 000 tonnes produites par an.

2.2. Systématique et écologie

L'huître *Crassostrea gigas* Thunberg (1793), aussi appelée huître creuse, huître japonaise ou huître du Pacifique, est un mollusque bivalve de l'ordre des Filibranchia et de la famille des Ostreidae (Table I 1.). Les bivalves sont des animaux très anciens, existants depuis plus de 400 millions d'années (Babin 1993, 1995), les premiers fossiles d'huîtres datant de 200 millions d'années.

Crassostrea gigas est un organisme filtreur qui se nourrit principalement de phytoplancton. Il évolue dans les écosystèmes marins et estuariens. Les juvéniles et adultes sont benthiques, ils se fixent sur des substrats meubles ou durs en zones intertidales ou subtidales. Les embryons et larves véligères sont planctoniques jusqu'à leur fixation (recrutement larvaire).

Table I 1. 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	gigas

2.3. Anatomie et biologie

L'huître creuse est constituée d'un corps mou et de deux coquilles. Les deux coquilles sont asymétriques, articulées autour d'une charnière où un ligament les réunit. Plusieurs organes composent le corps mou (Figure I 2).

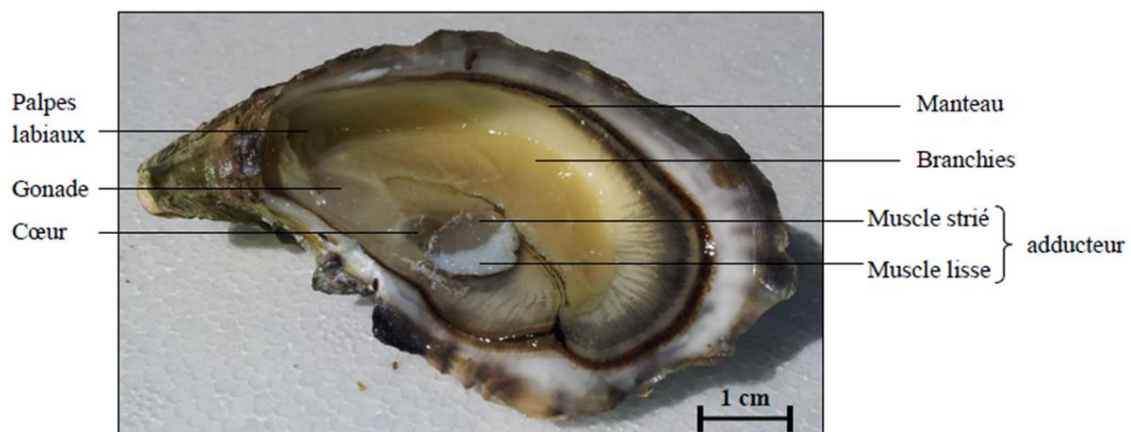


Figure I 2. Anatomie de l'huître *Crassostrea gigas*. Photo du corps mou dans la valve gauche (photo d'Audrey Mat, 2012).

Le manteau est constitué de deux lobes soudés dorsalement près de la bouche. Il est à l'interface entre les valves et le reste du corps mou, définissant la cavité palléale. Son premier rôle est la sécrétion de la coquille et du ligament. Parcouru par de nombreuses terminaisons nerveuses, il intervient également dans la perception sensorielle tactile et chimique.

Les branchies se présentent sous forme de deux lames composées chacune de deux lamelles constituées de filaments ciliés. Elles assurent la double fonction de respiration et d'approvisionnement en éléments nutritifs, à partir de l'eau de mer filtrée entre leurs valves. Les cils branchiaux latéraux génèrent le courant inhalant d'eau de mer. Les cils latéraux-frontaux puis les cils frontaux récupèrent et enrobent de mucus les particules alimentaires,

puis les acheminent vers les palpes labiaux qui eux même les dirigent vers la bouche. Les particules trop abondantes ou volumineuses sont rejetées sous forme de pseudofèces dans la chambre inhalante. À l'inverse, les particules de taille trop petites ne sont pas retenues par les cils latéraux frontaux et n'arriveront pas jusqu'à la bouche. Le taux de rétention maximal est observé pour des cellules phytoplanctoniques de taille minimale de 4-5 μm (Dupuy et al. 2000). Les deux paires de palpes labiaux entourent la bouche qui donne sur le système digestif: un court œsophage, l'estomac et l'intestin entourés par la glande digestive, et l'anus, qui débouche dans la cavité palléale. Dans l'estomac, le stylet cristallin constitue une structure longiligne d'un à deux centimètres qui intervient dans la digestion mécanique et enzymatique des aliments. Il se dissout pour libérer les enzymes digestives au moment de l'arrivée du bol alimentaire et se reconstitue entre les épisodes digestifs (Morton 1977). Les fèces produites par la digestion sont expulsés dans le courant exhalant.

Le cœur, composé d'un ventricule et de deux oreillettes, est protégé par la cavité péricardique. Il assure la circulation de l'hémolymphe (liquide sanguin incolore) dans un système semi-ouvert. Les artères et les artérioles mènent à des lacunes au niveau des tissus. L'hémolymphe veineuse est récupérée par des sinus qui le dirigent vers le rein. Elle est alors transportée jusqu'aux branchies pour être oxygénée puis revient au cœur par les veines branchiales afférentes.

Le système nerveux central de l'huître est composé de ganglions viscéraux qui se trouvent au niveau du muscle et de ganglions cérébraux, à la base des palpes labiaux. Un système nerveux périphérique innerve également les tissus, tels que les branchies et le manteau.

Le muscle adducteur fait une jonction entre les deux coquilles. Il est l'effecteur du mouvement valvaire. Il est composé de deux parties bien différenciées. Le muscle lisse se contracte lentement et permet la fermeture des valves prolongée et efficace par un mécanisme de « catch », caractérisé par une très faible dépense en énergie (Galler 2008). Le muscle strié, lui, effectue des contractions rapides et initie la fermeture des valves.

La gonade est le lieu de développement des gamètes de l'huître. Cet organe n'est pas permanent. Il se régénère annuellement autour de la glande digestive lors du processus de gamétogénèse, et régresse après l'émission des gamètes. La gonade devient indiscernable pendant la période de repos sexuel. L'huître creuse est hermaphrodite protandre de type alternatif irrégulier. Elle est généralement mâle la première année, puis les changements de sexe alternent ensuite de façon irrégulière chez un même individu (Guo et al. 1998). Une faible proportion d'individus hermaphrodites, produisant à la fois des ovocytes et des spermatozoïdes, est généralement trouvée dans les populations. Le déterminisme du sexe chez *C. gigas* est encore mal connu (Guo et al. 1998). Le cycle saisonnier de la reproduction de *C. gigas* est caractérisé par l'initiation de la gamétogénèse qui a lieu pendant l'hiver, suivit de la croissance et la maturation des gamètes qui se déroulent pendant le printemps et le début de l'été (Lango-Reynoso et al. 1999; Fabioux et al. 2005). La ponte, ou expulsion des gamètes dans la colonne d'eau, a lieu de façon synchronisée pendant l'été si les conditions environnementales sont favorables. Un ou plusieurs évènements de pontes peuvent avoir lieu

pendant l'été. L'automne est caractérisé par la dégénérescence des tissus gonadiques et le repos sexuel.

La fécondation qui se fait dans la colonne d'eau donne lieu à des larves d'environ 70 µm. La vie larvaire dure ensuite 15 à 25 jours environ sur la façade atlantique. À 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 (recrutement). 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)

2.4. L'huître triploïde

Chez les mollusques d'aquaculture, la triploïdisation est la méthode de transformation génétique qui a été la plus développée à ce jour (Piferrer et al. 2009). La triploïdie, qui caractérise des organismes possédant 3 jeux de chaque chromosome au lieu des 2 classiquement observés, apparaît de façon spontanée dans des populations sauvages et cultivées, mais à de très faibles proportions. Cette triploïdie peut aussi être induite pour des raisons commerciales. Chez l'huître *C. gigas*, les organismes triploïdes sont commercialisés en France depuis les années 1990. Elle se distingue par une gamétogenèse réduite ainsi qu'une croissance plus rapide (Nell 2002a). Ainsi, l'huître triploïde permet une augmentation des performances d'élevage grâce à une commercialisation plus rapide, et une amélioration de la valeur commerciale des huîtres, de par leur aspect plus constant au cours des saisons. En effet, les huîtres diploïdes présentent un aspect laiteux lors de la période estivale lié à la maturation des gamètes qui est peu apprécié par certains consommateurs.

La méthode de production de naissains triploïdes la plus appliquée de nos jours par les écloséries privées est le croisement de géniteurs mâles tétraploïdes (possédant 4 jeux de chromosomes) et de femelles diploïdes (Guo et al. 1996) (Figure I 3). L'obtention des lignées tétraploïdes s'effectue en induisant la rétention d'un globule polaire (par traitements cytobloquants) lors du croisement d'individus triploïdes avec des individus diploïdes (Guo and Allen Jr 1994; McCombie et al. 2005).

Les huîtres triploïdes ont une morphologie globalement identique aux diploïdes. Leur croissance plus rapide serait liée à une réallocation de l'énergie normalement utilisée pour la gamétogénèse (Hawkins et al. 2000; Normand et al. 2008). Cet avantage s'exprime différemment selon les populations d'huîtres et les conditions d'élevage : alors que le taux de croissance des huîtres creuses triploïdes est seulement légèrement supérieur à celui des huîtres diploïdes en Tasmanie (Nell 2002), il est en moyenne quatre fois plus important en Californie (Allen et Downing, 1986). De la même façon, si les organismes triploïdes sont généralement considérés comme stériles, une gamétogénèse plus ou moins partielle, quantitativement et qualitativement, peut être observée, variable selon les lots, les conditions et les individus (Shpigel et al. 1992; Nell 2002b; Normand et al. 2008, 2009; Jouaux et al. 2010). La triploïdie chez l'huître creuse *C. gigas* peut également entraîner des modifications d'autres paramètres

physiologiques tels que les paramètres immunitaires ou le métabolisme lipidique (Allen and Downing 1986; Nell 2002b; Duchemin et al. 2007; Haberkorn et al. 2010a).

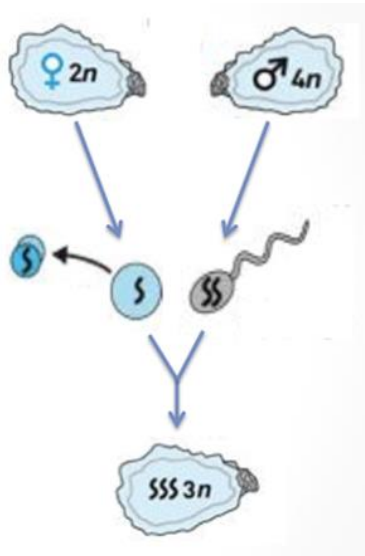


Figure I 3. Principe de la méthode de production des organismes triploïdes (3n), par croisement de génitrices femelles diploïdes (2n) et de géniteurs mâles tétraploïdes (4n) (schéma Ifremer).

Les mécanismes moléculaires expliquant les variations phénotypiques observés chez les organismes triploïdes restent globalement inconnus. L'augmentation du matériel génétique peut entraîner une augmentation de l'hétérozygotie et du potentiel de réarrangements du génome, menant à de nouvelles formes de régulation de l'expression génétique et à des modifications du niveau d'expression des gènes (Hawkins et al. 2000; Osborn et al. 2003; Riddle et al. 2006; Birchler et al. 2007).

3. Les micro-algues toxiques

Le terme micro-algue désigne des organismes microscopiques, unicellulaires, procaryotes ou eucaryotes, photosynthétiques et vivants en suspension dans la colonne d'eau. Principalement composés des dinoflagellés et des diatomées, ces organismes sont à la base des réseaux trophiques. Dans ce travail, nous nous focalisons sur les micro-algues océaniques.

3.1. Phénomènes d'efflorescences

Les phénomènes d'efflorescences, ou « *blooms* » en anglais, sont des événements de proliférations intenses de micro-algues, jusqu'à plusieurs centaines de milliers de cellules par litre, pouvant créer des phénomènes d'eau rouges, brunes, ou vertes, selon les pigments

qu'elles contiennent (Figure I 4). Si la prolifération des micro-algues est profitable pour beaucoup d'espèces qui s'en nourrissent, les phénomènes d'efflorescence peuvent dans certains cas avoir des effets délétères sur l'environnement et la santé humaine (Hallegraeff 1993; Evangelista et al. 2008; FAO and WHO 2016). Ils ont également des impacts socio-économiques importants, soit en rendant des espèces cultivées et/ou pêchées impropres à la consommation, soit en causant d'importantes mortalités chez les organismes marins destinés à la commercialisation, mais aussi par les impacts négatifs sur les activités touristiques et de loisirs (Hoagland and Scatasta 2006; Larkin and Adams 2007).



Figure I 4. « Marée rouge » liée à l'efflorescence du dinoflagellé *Noctiluca scintillans*, à La Jolla (Californie) à l'automne 1995 (photo de Peter Franks, Scripps Institution of Oceanography).

Lors d'efflorescences d'algues, même non toxiques, la sédimentation des cellules algales en fin de bloom et leur décomposition par des bactéries, peuvent entraîner des zones d'hypoxie (déplétion en oxygène) voire d'anoxie, délétères pour les organismes tant pélagiques que benthiques (Anderson et al. 2002; Møller and Riisgård 2007). D'autre part, les efflorescences de certaines algues possédant des structures physiques particulières (notamment les structures en silice de certaines diatomées) peuvent entraîner des effets délétères chez les organismes marins qui les ingèrent, par l'endommagement des tissus, sans pour autant être toxiques pour les maillons trophiques supérieurs (Kent et al. 1995). Enfin, environ 2 % des espèces de micro-algues connues (soit 60 à 80 espèces) sont productrices de toxines. Les phénomènes d'efflorescences de ces algues toxiques entraînent l'intoxication, aux effets sub-létaux à létaux, de nombreuses espèces qui s'en nourrissent (Hallegraeff 1993; Anderson 1995; Evangelista et al. 2008). De façon indirecte, le nombre d'espèces impactées est augmenté par la propagation de la contamination toxique le long de la chaîne trophique. Des cas d'intoxication aiguës lors d'efflorescences d'algues productrices de toxines ont souvent été observés, provoquant la mort de coquillages, poissons, mais aussi d'autres organismes tels que des mammifères ou oiseaux marins (Coulson et al. 1968; Anderson 1995; Scholin et al. 2000). De façon additionnelle à la production de toxines, certaines espèces d'algues efflorescentes produisent des composés extracellulaires, bioactifs, qui ont également des effets délétères pour les organismes environnants. Ces composés extracellulaires seraient

impliqués dans des phénomènes de compétitions face à des concurrents (autres micro-algues, en compétition pour l'exploitation des ressources) mais aussi dans des phénomènes de réduction de la prédation. Ils sont encore peu caractérisés, tant par leur composition chimique que par leurs toxicité sur les espèces animales (Ma et al. 2009).

Chez l'homme, la voie majoritaire d'intoxication est alimentaire, de par la consommation d'espèces ayant accumulées des toxines. Néanmoins, les phénomènes d'efflorescences d'algues toxiques peuvent également entraîner des contaminations par voies respiratoire et cutanée, de par la présence de toxines en quantité importante dans les aérosols collectés en bord de mer (Grastilleur et al.; Armengaud et al. 2011).

Les efflorescences d'algues toxiques sont des phénomènes naturels, résultants d'une interaction de facteurs, pouvant varier d'une espèce d'algue à l'autre. Cependant, ces phénomènes apparaissent en augmentation ces dernières décennies, par leur fréquence, et par leur distribution géographique (Hallegraeff 1993; Van Dolah 2000; Evangelista et al. 2008). Les causes de cette augmentation sont nombreuses, et comprennent aussi l'augmentation des efforts menés en matière de suivis et sur le nombre de programmes de recherche sur ce sujet. Cependant, une des principales raisons invoquée est l'activité anthropique, principalement par l'enrichissement en éléments nutritifs du milieu côtier marin par les déchets domestiques, industriels et agricoles, et le réchauffement climatique global, créant un environnement favorable au développement des efflorescences d'algues toxiques. De plus, l'activité humaine participe à l'augmentation de la distribution géographique de certaines espèces toxiques non indigènes, par le transport d'algues toxiques via les eaux de ballast des bateaux, ou par les importations de cellules ou de kystes d'algues lors des transports ou transplantations de coquillages (Anderson et al. 2002; Masó and Garcés 2006).

3.2. Principales phycotoxines

Les toxines produites par les micro-algues pouvant être accumulées par des mollusques bivalves sont des molécules de 200 à 900 Da, qui peuvent être classées essentiellement en 5 groupes en fonction de leur structure chimique : la saxitoxine (STX), l'acide okadaïque (OA), l'acide domoïque (DA), la brevétoxine (BTX) et l'azaspiracide (AZA) (FAO and WHO 2016).

Ces phycotoxines sont dénommées en fonction des symptômes humains qui découlent de leur ingestion:

- les toxines paralysantes (dites PSP, de l'anglais *Paralytic Shellfish Poisoning*), comprennent le groupe de la saxitoxine et de ses analogues (STX);
- les toxines diarrhéiques (dites DSP, de l'anglais *Diarrhetic Shellfish Poisoning*), comprennent l'acide okadaïque et ses analogues (OA), et les azaspiracides (AZA);
- les toxines amnésiques (dites ASP, de l'anglais *Amnesic Shellfish Poisoning*), comprennent le groupe de l'acide domoïque et ses analogues (DA);
- les toxines neurotoxiques (dites NSP, de l'anglais *Neurotoxic Shellfish Poisoning*), comprennent le groupe des brevétoxines (BTX).

On compte aussi une famille de phycotoxines contaminant les poissons coralliens : les toxines ciguatériques (dites CFP, de l'anglais *Ciguatera Fish Poisoning*), qui provoque la maladie appelée Ciguatera.

En France métropolitaine, les familles régulièrement observées appartiennent aux trois familles des toxines DSP, PSP, et ASP (http://envlit.ifremer.fr/infos/rephy_info_toxines).

3.3. Les micro-algues du genre *Alexandrium*

3.3.1. Description, morphologie et cycle de vie

Le genre *Alexandrium* rassemble une trentaine d'espèces parmi lesquelles au moins la moitié est connue pour être toxique. Il décrit des algues microscopiques, eucaryotes et unicellulaires, principalement autotrophes, et appartenant à la classe des dinophycées (ou dinoflagellés). Les dinoflagellés ont des formes variées, ils possèdent en général 2 flagelles, orientés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. Ces flagelles leur permettent de petits déplacements dans l'eau : le flagelle transversal permet à la cellule de tourner sur elle-même, le second flagelle, longitudinal permet la propulsion de la cellule.

L'espèce étudiée dans cette thèse, *Alexandrium minutum* est de forme arrondie et de taille entre 17 et 29 μm (Figure I 5). Elle possède une coque appelée thèque formée de plaques et de 2 sillons où se trouvent les flagelles (Nezan et al. 1997). La reconnaissance de l'espèce se fait en observant la taille de la cellule, la forme et l'organisation des plaques, l'ornementation de la thèque, la formation ou non de chaînes (Anderson et al. 2012). Sur les côtes françaises on identifie plusieurs formes pour la même espèce appelées morphotypes.



Figure I 5. Morphologie d'une cellule du genre *Alexandrium* (www.envlit.ifremer.fr)

Au printemps et en été, *Alexandrium* se multiplie dans l'eau, c'est la phase de croissance végétative (reproduction asexuée). Les cellules d'*Alexandrium minutum* sont des cellules haploïdes (un seul jeu de chromosomes). C'est pendant cette phase que peuvent apparaître les phénomènes d'efflorescences. Pendant cette phase pélagique, des kystes temporaires peuvent

se former et se transformer à nouveau en cellules. Puis, certaines cellules se transforment en gamètes (cellules reproductrices) et fusionnent pour former un planozygote (2n chromosomes). Ce planozygote se transforme en kyste qui sédimente. C'est une forme de résistance permettant de passer l'hiver par enfouissement dans le sédiment. Au printemps, les kystes retrouvent les conditions adéquates, germent, chaque kyste diploïde se divise en 2 nouvelles cellules mobiles haploïdes (www.envlit.ifremer.fr). Les signaux environnementaux ou internes qui indiquent la transition entre les différents états sont assez méconnus (Von Dassow et Montresor, 2011). De plus, les formes kystiques de résistance peuvent persister plusieurs années dans le sédiment avant de germer à nouveau (Klouch et al. 2016).

3.3.2. Toxines paralysantes (PSP) produites par *Alexandrium*

Trois familles différentes de phycotoxines sont produites par les micro-algues du genre *Alexandrium*: la saxitoxine, les spirolides, et les goniodomines (Anderson et al. 2002). Les principales sont les toxines du groupe de la saxitoxine (STX), classées parmi les toxines paralysantes (PSP). En effet, les toxines du groupe STX sont des neurotoxines qui bloquent les récepteurs des canaux sodium voltage-dépendants et donc la propagation du potentiel d'action dans les fibres nerveuses et musculaires (Narahashi and Moore 1968).

Le groupe de la saxitoxine, quant à lui, est majoritairement produit par des dinoflagellés du genre *Alexandrium* (*A. minutum*, mais aussi *A. tamarensis*, *A. catenella*, *A. fraterculus*, *A. fundyense* et *A. cohorticula*). D'autres dinoflagellés tels que *Pyrodinium bahamense* et *Gymnodinium catenatum* sont également producteurs de STX, de même que certaines cyanobactéries (Wiese et al. 2010).

Plus de 50 analogues de la STX ont été identifiés, ayant en commun une structure tétrahydropurine (Dell'Aversano et al. 2008; Wiese et al. 2010). Ils sont séparés en analogues carbamoyl (STX, neoSTX et gonyautoxines (GTX) 1 à 4), en analogues N-sulphocarbamoyl (gonyautoxines 5 et 6, toxines C 1 à 4) et en analogues décarbamoyl (dcSTX, dcNeoSTX et dcGTX 1 à 4) (Figure I 6). La toxicité pour l'Homme est connue pour 18 composés environ, et peut varier d'un analogue à l'autre. Ces toxines sont solubles dans l'eau et résistent à des traitements de température de plus de 100 °C (Sato and Kodama 2008). Des conditions acides et basiques conduisent à différentes transformations (notamment le clivage de certains groupements), et entraînent la conversion d'un groupe d'analogues à un autre, pouvant parfois entraîner une augmentation de la toxicité (Hall and Reichardt 1984).

Les toxines du groupe STX bloquent les canaux sodium voltage-dépendants et donc la propagation du potentiel d'action dans les fibres nerveuses et musculaires (Narahashi and Moore 1968). Les symptômes humains d'une intoxication aux PSP peuvent se limiter à des céphalées, troubles gastro-intestinaux et paresthésie de la face et des extrémités, mais également entraîner des atteintes plus sévères telles que des paralysies musculaires et troubles respiratoires, qui peuvent être fatals (Etheridge 2010). Les normes relatives à la consommation et la vente des coquillages (CODEX STAN 292-2008, rev.2015 (FAO and WHO 2016) ; CE Régulation No. 854/2004) spécifient que la charge en toxine ne peut excéder 0,8 mg d'équivalent STX par kilogramme de chair.

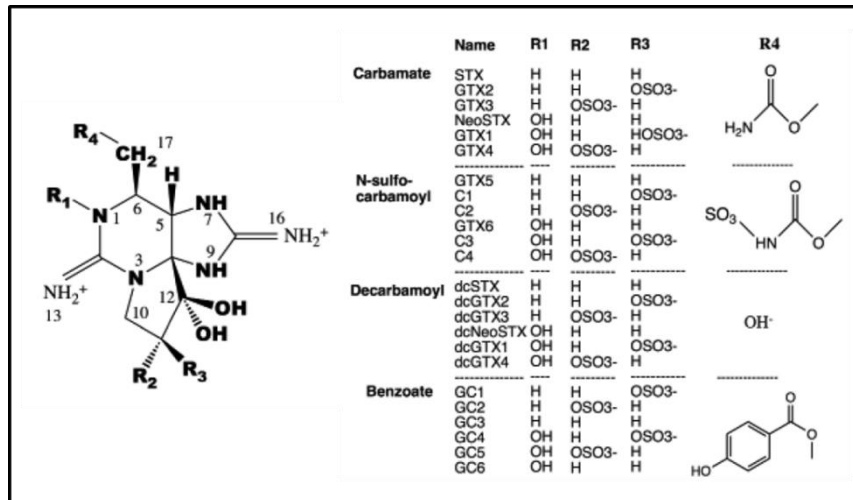


Figure I 6. Saxitoxine et ses analogues le plus couramment détectés (FAO and WHO, 2016).

3.3.3. Composés extracellulaires

Les micro-algues *Alexandrium* sont également connues pour libérer, indépendamment de leur production de PSP, des composés extracellulaires. Ces composés peuvent être toxiques pour les organismes environnants (phytoplancton, mollusques bivalves, poissons) (Arzul et al. 1999; Tillmann et al. 2007; Ford et al. 2008; Ma et al. 2009; Lelong et al. 2011; Flores et al. 2012; Borcier et al. 2017). Cependant, la nature chimique de ces composés extracellulaires est aujourd'hui encore inconnue. Des études portent sur la caractérisation, et des pistes concernant des composés de types protéiques (Emura et al. 2004; Flores et al. 2012), des espèces réactives de l'oxygène (Flores et al. 2012), des composés à base de polysaccharides (Yamasaki et al. 2008) ou des composés amphiphiles (Ma et al. 2009) sont proposées.

3.3.4. Les efflorescences des micro-algues *Alexandrium*

Les espèces du genre *Alexandrium* 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 continentales (Anderson et al. 2002). Les événements d'efflorescences productrices de PSP, dont le genre *Alexandrium* est un représentant majoritaire, sont parmi les plus répandus et les plus à même à entraîner la contamination des bivalves (Huss 2002). Les efflorescences d'algues produisant des toxines paralysantes (PSP) sont représentatives de l'augmentation générale des phénomènes d'efflorescences d'algues toxiques abordée précédemment, comme illustré Figure I 7.

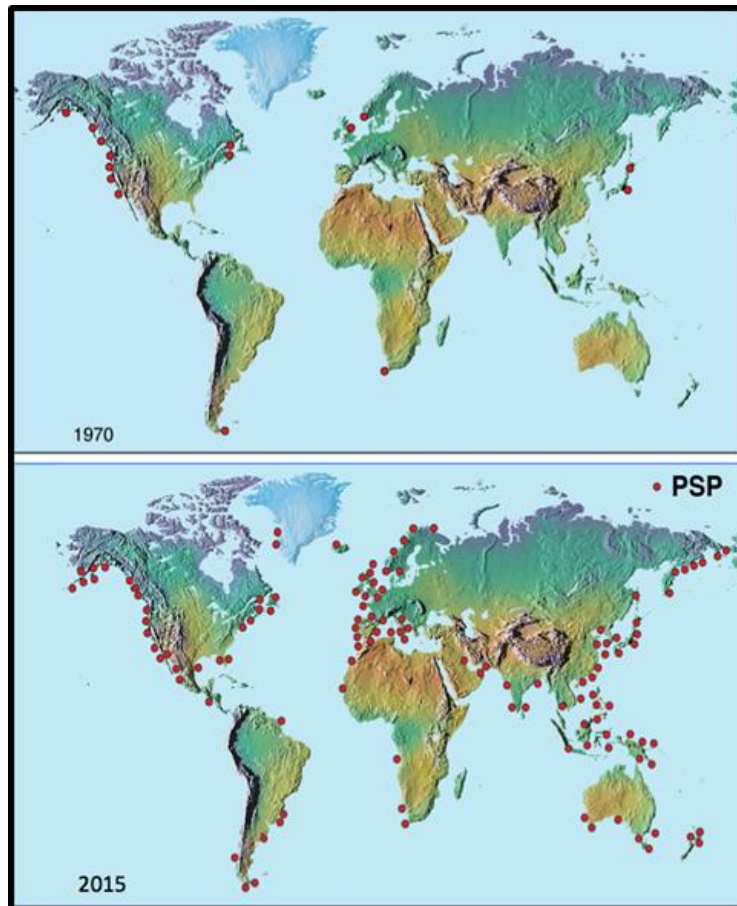


Figure I 7. Recensement des efflorescences d'algues toxiques produisant des toxines paralysantes (PSP) en 1970 et 2015 au niveau mondial. (<http://www.whoi.edu>).

En France, les efflorescences de micro-algues toxiques créent depuis plusieurs dizaines d'années sur les côtes françaises des crises écologiques, sanitaires et économiques. Des événements d'efflorescences d'algues productrices de PSP sont recensés depuis 1988, et entraînent régulièrement la bioaccumulation de toxines dans les bivalves commercialisés. Les premiers ont lieu en Bretagne, et sont liés à l'algue *Alexandrium minutum*, formant alors des eaux brun-rouges (Lassus et al. 2004). Plus tard, ils sont aussi observés à l'étang de Thau (Hérault), cette fois liés à l'algue *Alexandrium catenella* (Lassus et al. 2007). En juillet 2012, une efflorescence d'une ampleur record a touché la rade de Brest (Chapelle et al. 2015). Les concentrations en algues *Alexandrium minutum* ont atteint des valeurs de $41\,740 \text{ cell.mL}^{-1}$. Les données du réseau REPHY (Ifremer) de cette année-là sont présentées Figure I 8. Cet épisode a entraîné une forte toxicité des coquillages et conduit en rade de Brest à la fermeture de leur vente. Les concentrations maximales accumulées dans la chair des coquillages pouvaient atteindre 10 fois le seuil sanitaire de $0.8 \text{ mg eq. STX.kg}^{-1}$. Cet événement a été suivi par de nouvelles efflorescences entraînant la toxicité des coquillages en 2013, 2014 et 2015.

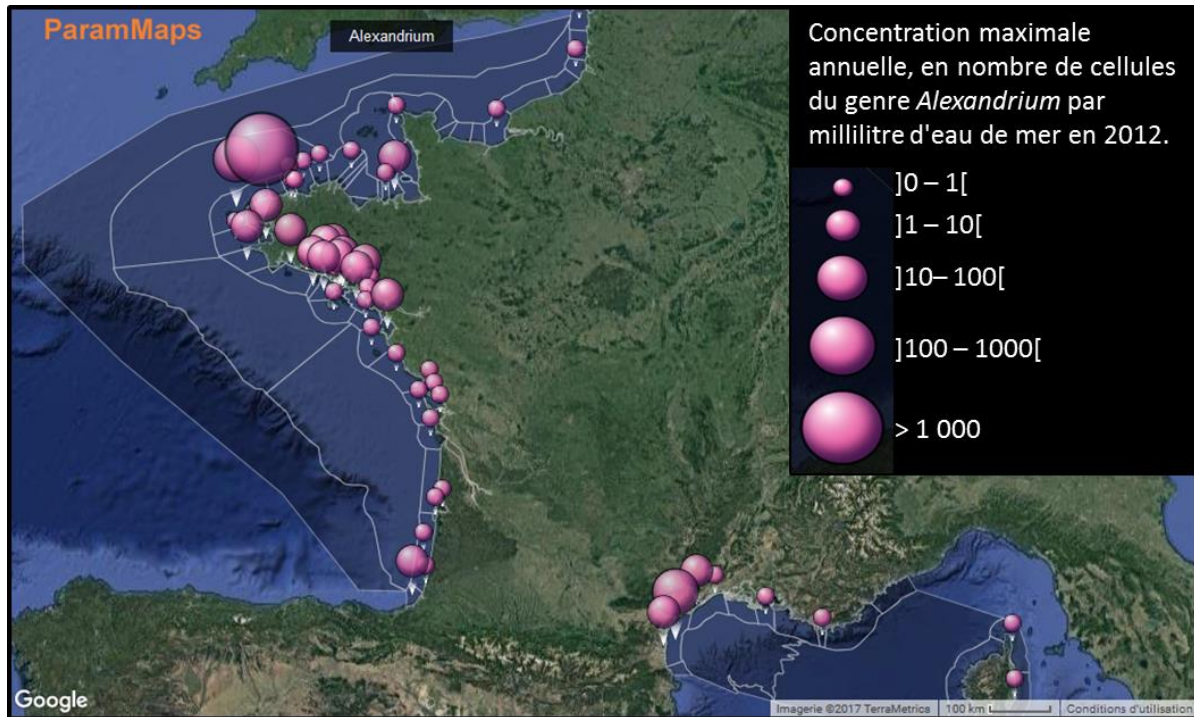


Figure I 8. Suivi du réseau d'observation REPHY concernant les concentrations de microalgues du genre *Alexandrium* dans l'eau du littoral français métropolitain en 2012 (<http://envlit.ifremer.fr>).

4. Impacts du genre *Alexandrium* sur les bivalves marins

4.1. Bioaccumulation des PSP

Pendant les efflorescences d'algues toxiques, les organismes filtreurs tels que les mollusques bivalves peuvent accumuler de fortes quantités de toxines (Bricelj and Shumway 1998).

Des expériences en laboratoire d'exposition à l'algue *A. minutum* ont montré de très fortes variabilités d'accumulation de PSP chez l'huître diploïde *C. gigas*, pouvant atteindre un facteur 80 entre deux individus (Haberkorn et al. 2011). Dans cette étude, un accroissement de l'accumulation de toxines était corrélé à une augmentation de la durée d'ouverture valvaire. Cette observation rejoint une des hypothèses proposées par (Bricelj and Shumway 1998), sur l'implication du comportement alimentaire dans les variations interindividuelles de bioaccumulation de toxines. Cependant, il n'y avait aucune corrélation entre la durée d'ouverture des valves de ces individus pendant la phase d'acclimatation et leur future bioaccumulation, laissant également suggérer dans ce cas présent une différence intrinsèque de sensibilité entre les individus (les individus les plus sensibles diminueraient leur durée d'ouverture et accumuleraient moins) et / ou un effet des PSP sur la durée d'ouverture. En effet, il a été montré chez la mye *Mya arenaria* que lors d'une exposition à une algue du genre *Alexandrium*, des individus résistants aux toxines PSP bioaccumulent jusqu'à 4 fois plus de

toxines que les individus sensibles (Bricelj et al. 2005). La résistance des individus *Mya arenaria* est associée à une mutation unique dans le gène codant pour les canaux sodium voltage dépendants, au niveau du site de fixation de la STX, dans le domaine II de la sous-unité α , et concerne des populations régulièrement exposées à des efflorescences d'algues toxiques. La relation potentielle entre bioaccumulation de PSP et les canaux sodium voltage dépendant chez l'huître *C. gigas* a été testée. L'analyse du polymorphisme génétique du canal sodium voltage-dépendant identifié chez *C. gigas*, appelé CgNav1, a révélé que les sites de fixation (10 acides aminés) des PSP étaient strictement monomorphiques, c'est-à-dire qu'aucune différence n'est observée d'un individu à l'autre au niveau de ces sites de fixation (Boullot et al. 2017). De plus, la variabilité d'accumulation des PSP n'apparaît pas non plus être corrélée avec les niveaux d'expression des différents variants d'épissage de ce canal, CgNav1 A, B et C, identifiés chez l'huître (Figure I 9). L'hypothèse de formes différentes de CgNav1 pour expliquer les différences interindividuelles de bioaccumulation est alors réfutée. En revanche, ces travaux ont montré que les sites de fixation des PSP des différents variant de CgNav1 possèdent un acide aminé Q, qui pourrait conférer à ces canaux une certaine résistance à la STX (Boullot et al. 2017).

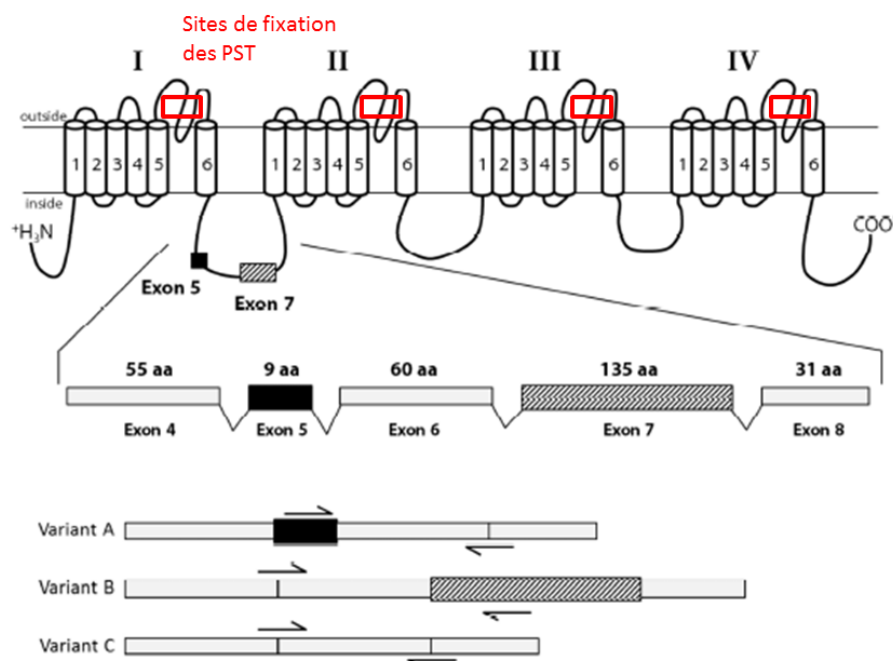


Figure I 9. Représentation de la sous-unité α du canal sodium voltage dépendant Nav1 de l'huître *C. gigas*. Les sites de fixation des PSP ne présentent pas de polymorphisme génétique. Trois variant d'épissage A, B et C de CgNav1 sont identifiés. Ils se distinguent par la présence ou l'absence des exons 5 et 7, qui sont localisés hors de la zone de fixation des PSP (Boullot et al. 2017).

Indépendamment de la variabilité interindividuelle, des différences de bioaccumulation entre huîtres diploïdes et triploïdes ont également été observées expérimentalement (Haberkorn et al. 2010a; Guéguen et al. 2012). Pendant la phase de maturation sexuelle, en juin, les triploïdes avaient accumulé deux à trois fois plus de PSP dans leur glande digestive que les

huîtres diploïdes. Ces différences n'étaient plus observées lorsque l'exposition avait lieu pendant la phase de repos sexuel en novembre, laissant suggérer que l'accumulation de toxines serait influencée par la proportion d'énergie allouée à la reproduction (plutôt qu'à d'autres fonctions métaboliques) (Haberkorn et al. 2010a; Guéguen et al. 2012). En revanche, le dosage de toxines bioaccumulées dans les tissus d'huîtres triploïdes exposées en condition naturelle (*in situ*) à une efflorescence d'algues *A. minutum* n'a montré aucune corrélation entre le profil (qualitatif et quantitatif) de gamétogénèse des individus et leur bioaccumulation de toxines PSP, ainsi qu'entre le sexe des individus et leur bioaccumulation (Hermabessiere et al. 2016). Ce résultat suggère que chez les huîtres triploïdes, l'accumulation des PSP ne serait alors pas influencée par l'allocation de l'énergie dévolue à la reproduction.

Des paramètres écophysiologiques tels que la respiration, la filtration, l'assimilation, la détoxification, ou des rythmes biologiques sont suggérés pour expliquer les variabilités d'accumulation de toxines PSP chez les huîtres (Hermabessiere et al. 2016; Boullot et al. 2017).

4.2. Impacts physiologiques du genre *Alexandrium* sur les bivalves marins

L'exposition des bivalves marins aux algues toxiques *Alexandrium* est associée à de nombreux effets toxiques, impactant une large gamme de fonctions physiologiques.

Une exposition de *Crassostrea virginica* ou *Mytilus edulis* à *Alexandrium fundyense* (productrice de PSP) entraîne une paralysie du son muscle adducteur, ce qui corrobore avec l'affinité préalablement abordé des PSP sur les canaux sodium voltage dépendant (Hégaret et al. 2007b; Galimany et al. 2008a). L'exposition de *Mya arenaria* à une efflorescence entraîne une incapacité à s'enfouir dans le sédiment (Bricelj et al. 2005). De plus, (Boullot et al. 2017)) montrent que des mécanismes de régulation de l'expression des canaux sodium voltage-dépendant semblent être activés par le blocage de ces mêmes canaux lors de l'accumulation des toxines PSP.

L'exposition de bivalves à *Alexandrium* affecte les tissus des organismes tels que les branchies, la glande digestive, ou le muscle. Le système immunitaire primaire des bivalves, basé sur les hémocytes circulant dans l'hémolymphe, peut être impacté par l'exposition à des algues du genre *Alexandrium* (Hégaret et al. 2007b; Galimany et al. 2008a; Ford et al. 2008; Hégaret et al. 2011; Mello et al. 2013). Dans l'hémolymphe, la concentration totale d'hémocytes, l'activité de la phénoloxidase et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) augmentent avec l'augmentation de PSP accumulées chez *C. gigas* (Haberkorn et al. 2010a). De nombreuses réactions inflammatoires ont été observées au niveau de la glande digestive et des branchies d'huîtres ou de moules exposées à différentes espèces d'*Alexandrium*, notamment associées à la dégranulation, la diapédèse et la migration des hémocytes (Galimany et al. 2008b; Haberkorn et al. 2010a). Chez l'huître *C. gigas* exposée à *A. minutum*, ces mécanismes inflammatoires sont associés à une augmentation de la production de mucus par les branchies, signe d'une irritation. De plus, une altération des fibres musculaires du muscle adducteur est observée (Haberkorn et al. 2010a). Une

diminution des lipides structurelles (phospholipides) est également observée, pouvant être liée à une perturbation de leur synthèse ou à des phénomènes de peroxydations lipidiques, liés à des phénomènes d'inflammation et de stress oxydant (Haber Korn et al. 2010a). Une production excessive de ROS chez *C. gigas* lors d'une exposition à *Alexandrium minutum* est également suggérée par la modification du niveau d'expression d'enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydant (Mat et al. 2013; Fabioux et al. 2015). Des modifications du niveau d'expression de gènes impliqués dans l'immunité ou les mécanismes de détoxication sont également observées (Mat et al. 2013; Tran et al. 2015; Fabioux et al. 2015). (Mat et al. 2013) ont mis en évidence un impact génotoxique d'*A. minutum* sur l'huître *C. gigas*. Enfin, il a été montré que les spermatozoïdes d'huîtres exposées à *A. minutum* sont moins mobiles, possèdent un statut énergétique réduit et présentent une morphologie différente, au niveau cellulaire et sub-cellulaire, pouvant avoir des conséquences sur le succès de reproduction (Haber Korn et al. 2010a). Chez le pétoncle *Chlamys farreri*, une exposition à *Alexandrium tamarense* provoque une diminution de la survie larvaire (Yan et al. 2001). Par ailleurs, l'exposition à des algues du genre *Alexandrium* peut également perturber la réponse à des infections parasitaires (Lassudrie et al. 2015).

Pour finir, il faut noter que des travaux récents étudient des effets d'*Alexandrium* qui ne seraient pas dues aux toxines PSP mais à des composés extra-cellulaires produits par ces micro-algues. Des atteintes tissulaires, une diminution du système sensitif, ou des atteintes des fonctions immunitaires par les composés extra-cellulaires ont été mis en évidence sur des bivalves marins (Ford et al. 2008; Borcier et al. 2017).

4.3. Impact d'*Alexandrium minutum* sur le comportement de l'huître *C. gigas*.

Une réponse comportementale caractéristique est observée dès les premières minutes chez des huîtres *C. gigas* lors d'expositions à *Alexandrium minutum* au laboratoire. Un comportement caractérisé par une augmentation de la durée d'ouverture, une diminution de l'amplitude d'ouverture, et une augmentation du nombre de micro-fermetures valvaires est observé (Tran et al. 2010, 2015; Haber Korn et al. 2011; Mat et al. 2013). De plus, il a été montré que la variation de ces paramètres est corrélée avec le niveau d'accumulation de PSP dans la glande digestive (Haber Korn et al. 2011; Mat et al. 2013; Tran et al. 2015). Un retour à un profil comportemental normal est observé 4 à 5 jours après la fin d'expositions d'environ 7 jours (Tran et al. 2010). Ces changements de comportement valvaire peuvent être expliqués par une réponse directe au contact entre les micro-algues (ou leurs composés extracellulaires) et les tissus externes de l'huître, et/ou à l'ingestion des toxines PSP.

5. Les rythmes biologiques

On appelle rythme biologique la variation cyclique d'une grandeur biologique quelconque au cours du temps (Aschoff 1981; Boissin and Canguilhem 1998). Les rythmes biologiques sont présents dans tout le monde vivant étudié. La vie s'est adaptée aux mouvements répétés des astres, constants depuis des millions d'années et les utilisent pour la synchronisation à de nombreux niveaux, de la cellule à l'écosystème. Selon les espèces, le comportement, la reproduction, la physiologie ou même des cycles de divisions cellulaires sont reliés aux cycles environnementaux avec différentes périodes, entraînant une multitude de rythmes biologiques.

5.1. Bref historique

Les rythmes biologiques sont décrits depuis l'Antiquité. Les premiers naturalistes, à commencer par Aristote, insistent sur l'apparition régulière de phénomènes comme la reproduction, la floraison, l'hibernation, la migration, en accord avec les saisons. En Occident, la première description d'un rythme biologique reviendrait à Androsthène, en 325 avant J.-C. (Kayser and Heusner 1967). Durant les marches de l'armée d'Alexandre le Grand, il observe et décrit le mouvement journalier des feuilles du tamarinier, sur l'île de Tylos (Bahreïn), dans le golfe persique. Mais ces rapports du vivant au temps astronomique ont longtemps été perçus comme un asservissement au milieu qui imposait sa loi aux organismes.

Le problème de l'origine des rythmes n'est perçu sous un jour différent qu'à la fin du XVIII^e siècle. En 1729, l'astronome français J.-J. d'Ortous de Mairan 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 qui ouvre et oriente ses feuilles vers le soleil le jour et les replie sur elles-même la nuit, poursuit ses mouvements lorsqu'elle est placée en obscurité constante. Il conclura : « *La Sensitive sent donc le Soleil sans le voir en aucune manière* ». En 1832, A. Pyrame de Candolle poursuit les travaux de J.-J. d'Ortous de Mairan. Il observe notamment la première inversion d'un rythme biologique. Après quelques jours « sans règle fixe », le mouvement des feuilles de la Sensitive s'inversent lorsque la photopériode et la scotopériode sont interverties. Suite à ces travaux, de nombreux chercheurs vont s'intéresser à la tendance inhérente des plantes à montrer des mouvements périodiques. On voit ainsi au milieu du XVIII^e siècle et surtout au milieu du XIX^e, s'ébaucher une véritable science des rythmes biologiques (Boissin et Canguilhem 1998).

Si les recherches menées en biologie végétale ont posé les fondements de la chronobiologie et semblent bien prouver, à posteriori, l'origine endogène du rythme biologique circadien, elles sont restées assez marginales jusqu'à ce que la biologie animale s'intéresse au domaine au début du XX^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. En 1935, le biologiste allemand E. Bünning démontra que la période en libre cours du rythme circadien des plantes était héritée génétiquement, en croisant des parents de périodes endogènes différentes. L'héritabilité des rythmes sera confirmée par un biologiste allemand, J.

Aschoff (1913-1998) dans les années 1950 sur les poulets (Daan et al. 2001). Parallèlement, dans les années 1940-1950, l'étude du comportement des abeilles et de certains oiseaux migrateurs apportent des indices importants sur la capacité des organismes à se repérer dans le temps. C. V. Frish et ses collaborateurs décryptent depuis plusieurs années la « danse » que réalisent les abeilles, venant de butiner, à leurs congénères restées à la ruche. Ils découvrent que lors de cette danse, la direction du lieu de collecte est codée par la direction d'un segment rectiligne tracé pendant la chorégraphie. Ce segment donne la direction par rapport au soleil. 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 et al. 2001). Il apparaît donc, encore, que les abeilles connaissent l'heure. G. Kramer étudie quant à lui l'orientation des oiseaux migrateurs. Il met en évidence l'orientation des oiseaux pendant leur vol par rapport à la position du soleil, 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). 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). En 1952, C. S. Pittendrigh (1918-1996) démontra que, contrairement à la plupart des activités métaboliques, les mécanismes biochimiques de l'horloge circadienne n'étaient pas influencés par la température corporelle et que la période de l'horloge était indépendante de la température. Il analyse ces faibles modulations de périodes par la température d'un point de vue darwinien et en conclut qu'il s'agit de l'essence même d'un mécanisme horloger (Pittendrigh 1993). Quel serait l'intérêt d'une horloge dont l'heure indiquée dépendrait de la température extérieure ? Les rythmes sont dès lors dits compensés par la température. Le terme d'horloge biologique sera inventé par Bünning (Boissin et Canguilhem 1998).

Jusqu'en 1960, de nombreuses espèces ont été étudiées mais la rythmicité circadienne en tant que propriété fondamentale de la vie n'est toujours pas reconnue (Boissin and Canguilhem 1998; Daan et al. 2001; Klarsfeld 2009). Les découvertes sont accompagnées de controverses très vives sur la nature des rythmes. Il sera très difficile de renoncer à l'idée que les rythmes journaliers ne sont pas qu'une simple conséquence de la rotation terrestre, mais que l'évolution biologique a permis de développer des horloges endogènes participant à l'autonomie des êtres vivants, capables de donner un sens aux signaux qu'ils reçoivent périodiquement. Le congrès de *Cold Spring Harbor*, organisé par J. Aschoff, C. S. Pittendrigh, E. Bünning et J. Woodland Hastings, et tenu en juin 1960 à Long Island (Etats-Unis), est généralement considéré comme signant la naissance de la chronobiologie moderne. Rassemblant de nombreux scientifiques travaillant sur les rythmes biologiques, 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). Au terme du congrès, l'origine endogène des rythmes semble entendue et rassemble la grande majorité des chercheurs.

De plus, ce congrès vit l'émergence de deux approches différentes afin d'étudier les rythmes biologiques (Ramji, 2008):

- l'approche systémique qui se base sur une échelle macroscopique,
- l'approche moléculaire qui se base sur une échelle microscopique.

Une compétition va alors s'engager entre les défenseurs de ces deux approches. En 1970, les études obtenues dévoilent, dans les deux approches, des résultats conséquents. L'approche systémique révèle une structure anatomique : les noyaux supra-chiasmatiques, horloge centrale des mammifères (Moore et Eichler, 1972; Stephan et Zucker, 1972) ; l'approche moléculaire, quant à elle, découvre les mécanismes moléculaires de l'horloge circadienne (Konopka et Benzer, 1971; Takahashi, 2004).

5.2. Caractéristiques des rythmes biologiques

Les rythmes biologiques sont un ensemble de paramètres biologiques périodiques, produits par une horloge interne. Ils constituent une adaptation ancestrale des organismes à leur environnement, en leur permettant de synchroniser et d'anticiper les variations cycliques de l'environnement (Boissin and Canguilhem 1998; Klarsfeld 2009). Les organismes peuvent donc prévoir et répondre par anticipation aux changements cycliques de leur environnement (Ouyang et al. 1998; Emerson et al. 2008; Yerushalmi and Green 2009). De plus, les rythmes biologiques permettent une organisation temporelle intégrée, de la cellule à l'organisme entier, permettant le maintien d'une homéostasie et l'optimisation des fonctions biologiques et des dépenses énergétiques de l'organisme (Boissin and Canguilhem 1998). Cette notion d'organisation temporelle intégrée est également valable au sein des populations et des écosystèmes.

Les rythmes biologiques sont constitués de trois grandes composantes : (1) une horloge endogène auto-entraînée, présente dans chaque cellule d'un organisme, constituée d'une boucle de rétrocontrôle transcriptionnel / post-traductionnel, (2) la synchronisation de ce mécanisme endogène par les facteurs environnementaux cycliques appelés « zeitgeber » (*donneurs de temps* en allemand), (3) le tempo donné par l'horloge aux fonctions métaboliques, physiologiques, et comportementales de l'organisme (Figure I 10).

En absence de zeitgeber, l'horloge est en « libre-cours » (ou « *free-running* » en anglais) et exprime sa période propre, endogène (Aschoff 1981; Klarsfeld 2009).

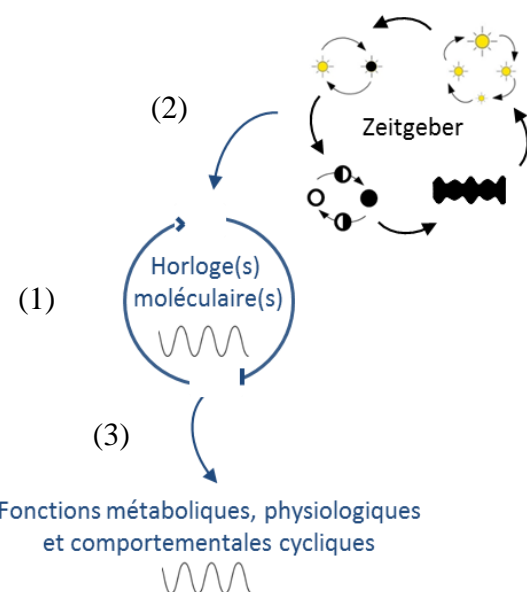


Figure I 10. Schéma de principe des rythmes biologiques.

Ces rythmes endogènes présentent une période proche mais pas égale au cycle environnemental, qui est alors notée « circa- » à celle du cycle correspondant. Les horloges sont propres à chaque espèce et à chaque individu. La persistance de leurs oscillations ne dépend pas de la température.

Un rythme biologique est caractérisé par (Figure I 11):

- la période (τ), définit l'intervalle de temps séparant l'apparition de deux évènements identiques ;
- le méson, ou niveau moyen, est la moyenne arithmétique des valeurs mesurées, dont l'unité est celle du paramètre 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, sont toutes deux localisées sur l'échelle des temps et exprimées dans l'unité correspondante ;
- l'amplitude est l'écart entre la valeur la plus élevée (ou la plus faible) et le niveau moyen, exprimé dans l'unité du paramètre étudié ;
- la phase 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.

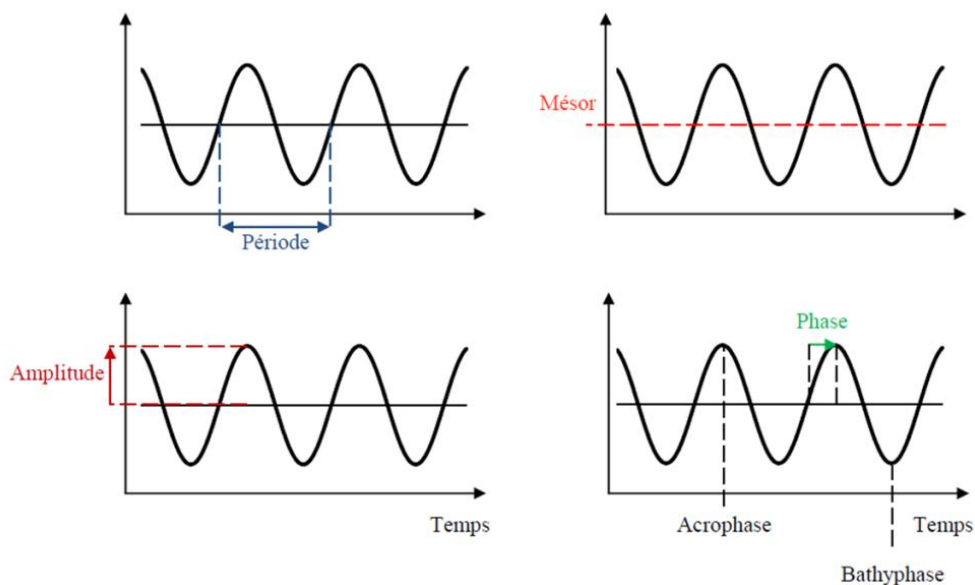


Figure I 11. Paramètres caractérisant un rythme (schéma issu de Mat, 2012).

Un rythme peut être caractérisé selon sa période :

- un rythme ultradien est caractérisé par une période inférieure à 20 heures (par exemple le rythme circatidal)
- un rythme circadien est caractérisé par une période de 24 ± 4 heures

- un rythme infradien est caractérisé par une période supérieure à 28 heures (par exemple les rythmes lunaires et circannuels).

5.3. Le rythme circadien

Echapper à la lumière, et donc aux effets délétères des UV, aurait joué un rôle majeur dans l'évolution de l'organisation circadienne, constituant une pression de sélection (Pittendrigh 1993; Gehring and Rosbash 2003).

Le rythme circadien est sans doute le rythme biologique le plus étudié. Si l'approche systémique était dominante en 1960, c'est aujourd'hui l'approche moléculaire qui règne très largement sur l'étude des rythmes biologiques. La majorité des recherches est portée sur des organismes terrestres modèles, tel que la drosophile, la souris, ou l'arabette. Par conséquent, la compréhension moléculaire de ce rythme est très avancée en milieu terrestre par rapports aux organismes vivant en milieu marin.

5.3.1. L'horloge moléculaire circadienne

L'ère moderne de la chronobiologie moléculaire commence en 1971 lorsque R. Konopka et S. Benzer observent chez la drosophile que différents mutants d'un seul gène présentent des phénotypes du rythme d'éclosion et du rythme locomoteur circadien différents, aux périodes variables « longue » ou « courte », ou arythmiques. Le gène *Period (Per)* vient d'être découvert (Konopka and Benzer 1971). Au cours du début des années 1990, d'autres mutants permettent d'identifier de nombreux autres gènes de l'horloge moléculaire et vont permettre la compréhension progressive du mécanisme horloger. 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).

Un principe unifiant du fonctionnement de l'horloge circadienne est observé chez les organismes tant procaryotes qu'eucaryotes : une boucle de rétrocontrôle transcriptionnel / post-traductionnel. Cette horloge est présente dans chaque cellule des organismes. Elle est capable de maintenir son tempo d'environ 24 heures en absence de stimuli externes (Roenneberg and Merrow 2005). La ou les origine(s) ancestrale(s) et l'évolution de cette (ces) horloge(s) circadienne(s) font l'objet de nombreuses études (Young and Kay 2001; Roenneberg and Merrow 2005; Kyriacou et al. 2008; Rosbash 2009).

Cette boucle simple de rétro-contrôle négatif (*transcription-translation feedback loop*, TTFL, ou *transcription-translation oscillator loop*, TTO) consiste en des facteurs de transcription positifs et négatifs qui forment une boucle de rétroaction négative, revenant à une situation initiale toutes les 24 heures environ. Une boucle de rétroaction négative consiste en l'activation par un élément ou un complexe d'éléments activateurs de son propre répresseur, induisant ainsi sa propre répression. Elle permet d'engendrer une oscillation au cours du

temps. Par exemple chez les mammifères, les facteurs de transcriptions positifs CLOCK et BMAL1 forment un hétéro-dimère protéique et se fixe sur les éléments E-box de l'ADN, localisés au niveau des promoteurs des gènes *Period* (*Per*) et *Cryptochrome* (*Cry* des vertébrés), faisant également partie de l'horloge. L'activation de leur transcription entraîne l'accumulation progressive des protéines PER et CRY qui, sous forme d'hétéro-dimères, forment un facteur de transcription négatif, qui entre dans le noyau et vient inhiber la fonction de CLOCK-BMAL1 et par là-même empêcher leur propre expression. Le stock de protéines PER et CRY diminue peu à peu, l'inhibition se lève, un nouveau cycle peut recommencer, comme illustré Figure I 12 (Zhang and Kay 2010). Les modèles varient en fonction des embranchements et des espèces. Chez la drosophile, la boucle de rétrocontrôle négatif est constituée de PER et TIM et la protéine CRY, dont l'action est dépendante de la lumière, vient réguler cet hétérodimère.

Ce mécanisme horloger de base permet la transmission directe du message temporel de l'horloge, via les éléments E-box, présents dans les promoteurs d'un grand nombre de gènes, dits sous contrôle de l'horloge (*controlled clock genes, ccg*).

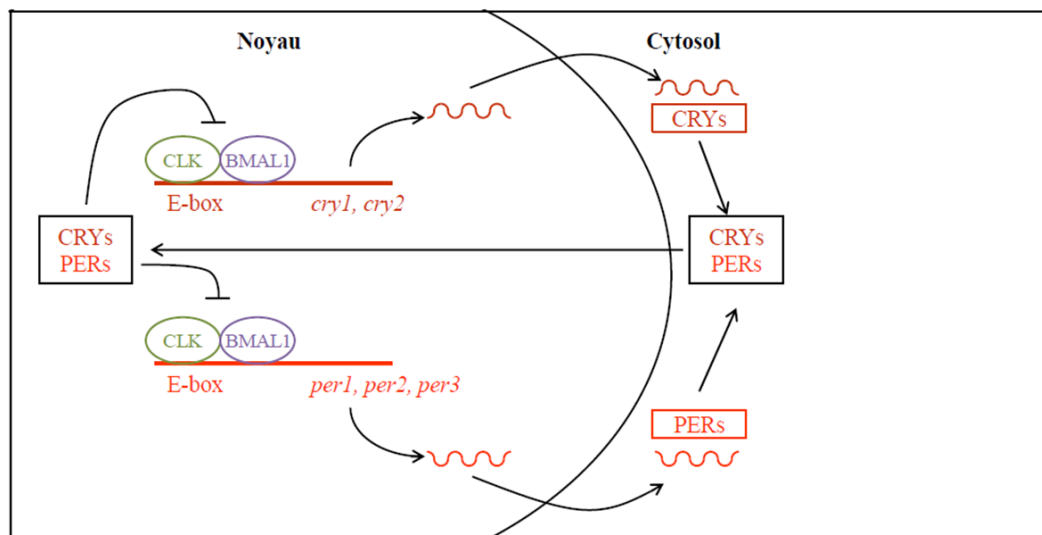


Figure I 12. Boucle de rétrocontrôle transcriptionnel / post-traductionnel chez les mammifères (schéma issu de Mat, 2012).

Depuis une ou deux décennies, les découvertes s'enchaînent sur de nombreux aspects du fonctionnement de l'horloge chez les organismes terrestres. Une myriade de nouveaux composants et de mécanismes sont identifiés. Dans ce document nous allons essentiellement continuer sur l'exemple de l'évolution de ces connaissances chez les mammifères.

5.3.2. Complexification du mécanisme horloger

Des mécanismes secondaires de l'horloge des mammifères viennent moduler la boucle TTFL :

Des boucles secondaires à l'horloge circadienne

De nouvelles boucles de rétrocontrôle positif ou négatif viennent complexifier l'horloge. C'est le cas des récepteurs nucléaires des familles REV-ERB et ROR (receptor-related orphan receptor), qui sont régulés au niveau transcriptionnel par le complexe CLOCK/BMAL1. En retour, les protéines REV-ERB et ROR répriment ou activent la transcription de *Bmal1*, par la fixation sur des régions promotrices spécifiques (RORE-responsive elements, RREs) de l'ADN (Ueda et al. 2002; Takeda et al. 2012).

Les régulations post traductionnelles de l'horloge

Des régulations au niveau post-traductionnel sont essentielles pour la régulation des protéines de l'horloge. En effet, elles peuvent avoir un rôle dans leur relocalisation nucléaire, dans leur dégradation ou dans leur activation (Zhang and Kay 2010; Partch et al. 2014; Mermet et al. 2017). Ces modifications font intervenir en particulier un certain nombre d'enzymes telles les kinases, phosphatases, ubiquitinasés et acétylases.

La kinase CK1 (casein kinase 1), par exemple, chez les mammifères, permet la phosphorylation de différents constituants de l'horloge. Elles ont été bien décrites chez l'Homme et la souris. Elles ont un impact sur la phase du rythme. Les isoformes CK1 δ et ϵ permettent la phosphorylation des protéines PER sur des sites menant à sa dégradation par le protéasome après ubiquitination par des protéines (Eide et al. 2005; Shirogane et al. 2005). Leur activité est contrée ou régulée par les phosphatases PP1 et PP5 respectivement (Partch et al. 2014).

D'autres protéines sont impliquées dans des mécanismes épigénétiques. Ces facteurs ont la capacité de moduler l'activité transcriptionnelle en agissant sur les protéines histones formant les nucléosomes (acétylation, déacétylation, méthylation, phosphorylation et ubiquitination) ou bien directement sur l'ADN (méthylation) pour le remodelage de la chromatine.

Par exemple, les histones acétyl transférasés (HATs) sont des enzymes qui catalysent l'acétylation des lysines (très présentes dans la composition des histones). Cette activité est souvent reliée aux protéines présentant une capacité d'activation transcriptionnelle. La protéine CLOCK elle-même possède en particulier une activité HAT (Doi et al. 2006) permettant l'initiation de la transcription des gènes sous contrôle de l'horloge circadienne. À l'inverse, des histones déacétylases (HDACs) enlèvent les groupements acétyles situés sur les histones et sur les autres protéines provoquant la limitation de la transcription des gènes.

De même, les processus de méthylation des histones ou des régions promotrices des gènes impliqués dans l'horloge ou sous son contrôle sont impliqués dans le mécanisme horloger limitant la transcription des gènes (Liu et al. 2007; Lin 2009).

La machinerie horlogère est alors un ensemble extrêmement complexe, constitué de multiples boucles de rétrocontrôles. Une des propriétés intéressantes de toute cette machinerie réside dans sa capacité à moduler les caractéristiques du rythme circadien. De plus, on comprend peu à peu que cette machinerie horlogère est capable de percevoir son environnement cellulaire grâce à des co-régulateurs eux-mêmes impliqués dans d'autres cycles comme le cycle du métabolisme. Par exemple, dans le foie des mammifères, la protéine SIRT1, une

HDAC NAD⁺-dépendante inhibe l'activité de CLOCK-BMAL1 (Nakahata et al. 2008). CLOCK-BMAL1 active la transcription de la « rat-limiting enzyme » NAMPT, impliquée dans la biosynthèse de NAD⁺, ce qui finit par entraîner l'activation de SIRT1 et à boucler la boucle (Ramsey et al. 2009a). Ainsi, ce mécanisme utilise les métabolites du cycle cellulaire pour intégrer le statut énergétique de la cellule à l'horloge circadienne (Berger and Sassone-Corsi 2016).

5.3.3. L'information cyclique

Le principe de la transmission de l'information temporelle par l'horloge circadienne est la régulation de l'expression cyclique des gènes sous-contrôle de l'horloge (*controlled clock genes*, ou « *ccg* », en anglais), menant à un transcriptome cyclique. Les protéines correspondantes s'accumulent alors de façon cyclique et permettent des fonctions métaboliques, physiologiques et comportementales cycliques (Figure I 13).

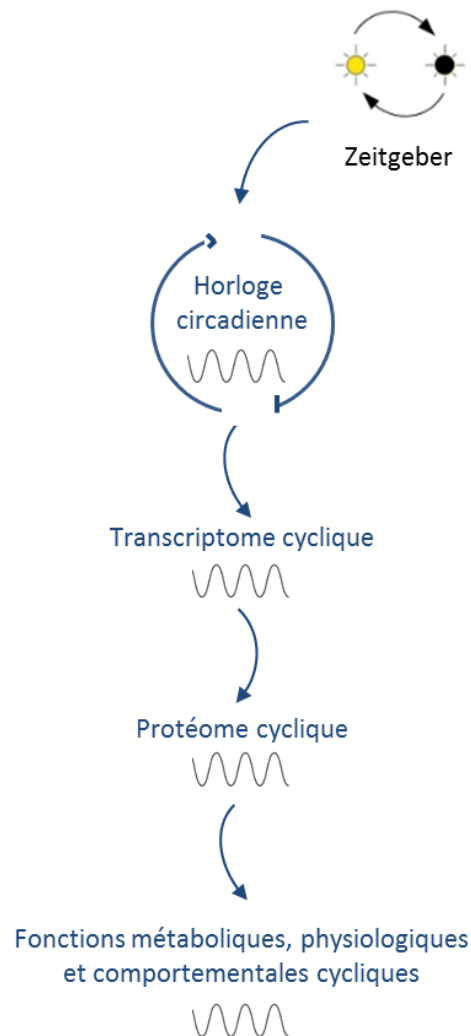


Figure I 13. Principe de la transmission du message temporel par l'horloge circadienne.

Le développement des techniques telles que le séquençage haut débit a aidé à se rendre compte de l'extrême complexité et de la finesse de la régulation circadienne chez un organisme. Les recherches sur la compréhension de la régulation circadienne sont prolifiques et mettent à jour des systèmes de régulation extrêmement complexes. L'aspect tissu spécifique du fonctionnement circadien illustre très bien cette complexité. Chez les mammifères, l'horloge centrale qui est elle-même synchronisée par la photopériode, permet de resynchroniser les oscillateurs périphériques (un mécanisme d'horloge circadienne est présent dans chaque cellule de l'organisme) en employant une multitude de différents *zeitgebers*. Les signaux neuronaux et humoraux sont les deux voies directes de régulation des tissus périphériques par le noyau supra chiasmatic (NSC). Cette régulation circadienne, par le NSC, des organes périphériques aboutit à une régulation et une expression rythmique des phénomènes physiologiques qui est tissu spécifique, tant par les fonctions représentées que par la temporalité (phase) de chaque fonction. De même, au sein d'un tissu donné, chaque événement biologique n'aura pas lieu au même moment.

*Régulation transcriptionnelle des gènes sous contrôle de l'horloge
(ccg)*

Il est peu à peu découvert que la transmission de l'information rythmique est réalisée par de multiples couches de régulation, formant un réseau complexe, encore peu compris (Zhang and Kay 2010; Partch et al. 2014; Mermet et al. 2017). L'expression de gènes peut-être directement sous le contrôle des composants principaux de l'horloge, par fixation sur les régions promotrices des gènes comme les E-boxes et RRE (Korenčič et al. 2014) et par le jeu des mécanismes épigénétiques de régulation de la transcription (Partch et al. 2014). De plus, de nombreux gènes sous contrôles de l'horloge sont régulés de façon indirecte, par l'expression circadienne de facteurs de transcription eux-mêmes contrôlés par l'horloge (Korenčič et al. 2014). Chez les mammifères par exemple, il a été montré dans le foie que divers gènes contrôlés par l'horloge sont régulés par les facteurs de transcription PARbZip (*proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper*) que sont HLF (*hepatic leukemia factor*), TEF (*tyrotroph embryonic factor*) et DBP (*D-site of albumin promoter*). Ces facteurs de transcription directement contrôlés par l'horloge induisent à leur tour la transcription cyclique d'un grand nombre de gènes, via la fixation sur les régions promotrices D-boxes de ces gènes (Gachon et al. 2004, 2006; Stratmann et al. 2012; Korenčič et al. 2014). Des études montrent que des centaines de gènes seraient impliqués dans ces processus de régulation (Zhang et al. 2009; Fang et al. 2014).

Le nombre total de transcrits cycliques dans les tissus est difficile à établir de façon certaine car leur détection dépend de plusieurs critères techniques, mais ils seraient de quelques centaines à plusieurs milliers en fonction des tissus, impliqués dans de très nombreuses fonctions physiologiques. De plus, la comparaison des transcriptomes de différents tissus laisse apparaître que les transcrits circadiens sont extrêmement tissu-spécifiques (Panda et al. 2002; Storch et al. 2002; Hughes et al. 2009; Zhang et al. 2014). Ainsi, chez les mammifères, il est estimé qu'environ 50 % du génome est potentiellement oscillant, mais cette estimation est réduite à 10 % dans un tissu donné (Akhtar et al. 2002; Panda et al. 2002; Ueda et al. 2005; Hughes et al. 2009; Zhang et al. 2014; Li et al. 2015). Les facteurs de transcription

activés par l'horloge circadienne diffèrent d'un tissu à l'autre, pour répondre aux demandes physiologiques spécifiques (Korenčič et al. 2014; Zhang et al. 2014).

Régulation post-transcriptionnelle

Des régulations post-transcriptionnelles rythmiques telles que la maturation ou la dégradation rythmique des ARN non matures peuvent également agir sur l'expression des gènes. Une quantité non négligeable de gènes serait soumise à ces mécanismes de régulation (Beckwith and Yanovsky 2014; Lück et al. 2014). Ces régulations circadiennes peuvent passer par des mécanismes rythmiques de méthylation des ARN, d'épissage alternatif, de déadénylation des queues poly-A des ARN, de dégradation des ARN par des microARN (Preußner and Heyd 2016; Mermet et al. 2017).

Régulation traductionnelle

Enfin, on comprend aujourd'hui que la traduction des ARN en protéine fait partie intégrale de la machinerie de régulation rythmique (Mermet et al. 2017). Des travaux ont révélé que l'expression de facteurs impliqués dans la machinerie traductionnelle tels que des facteurs d'initiation, des protéines ribosomales et des ARN ribosomiaux présentent des expressions rythmiques (Jouffe et al. 2013). Des études des cellules humaines ou dans le foie de souris ont alors tenté d'observer si les processus de traduction eux-mêmes étaient rythmiques. Ces résultats montrent que globalement, les gènes qui présentent des niveaux d'ARN messenger rythmiques sont également traduits en protéines de façon rythmique. Cependant, quelques exceptions existent. La synthèse de certaines protéines peut-être rythmique alors que l'accumulation d'ARNm correspondant ne l'était pas, et inversement (Atger et al. 2015; Jang et al. 2015; Janich et al. 2015).

Les premières approches de transcriptomique dans le foie ou le cerveau de souris, évaluent que 5 à 10 % des protéines détectées sont accumulées de façon cyclique, codant pour des fonctions essentielles, de façon tissu spécifique (Robles et al. 2014; Mauvoisin et al. 2014; Chiang et al. 2014). Notons que ces approches de protéomique sont moins sensibles à l'heure actuelle que celle de séquençage du génome ou du transcriptome et que cela joue très certainement sur la proportion détectée des protéines accumulées de façon cyclique dans les tissus.

5.4. Le rythme circannuel

L'ensemble des habitats sur terre est marqué par des changements saisonniers plus ou moins drastiques de température, précipitation et disponibilité de nourriture. Cela a créé une pression de sélection, qui a mené à l'évolution d'une mesure calendaire (365 jours), permettant aux organismes d'anticiper ces changements environnementaux clés pour leur survie et leur reproduction. Les organismes présentent de très nombreuses adaptations physiologiques saisonnières. On peut citer les cycles annuels de croissance, de métabolisme, de prise et de perte de poids, de mue ou de formation du pelage, de comportement sexuel, d'hibernation pour les mammifères, de migration pour les oiseaux, de diapause pour les insectes, ou de

floraisons pour les plantes. Tous ces cycles physiologiques sont synchronisés par un mécanisme horloger interne, adaptatif, qui permet une programmation physiologique calée sur les saisons. Il y a aujourd'hui de nombreuses preuves montrant que l'évolution saisonnière de la photopériode, est le premier signal environnemental à entraîner ce mécanisme interne. À l'inverse des changements de température ou de nourriture, le changement annuel de photopériode offre aux plantes et aux animaux un signal fiable et entièrement prédictif, pour activer les processus de reproduction ou de croissance au moment de l'année le plus approprié (Wood and Loudon 2014).

La réponse photopériodique des organismes implique des mécanismes de mesure soit de la longueur de la durée de jour, soit de la longueur de la durée de nuit, soit les deux, pour intégrer les changements de photopériode. Depuis les 80 dernières années, une attention considérable est portée sur la compréhension de ces mécanismes de mesure de la photopériode. Deux points de vue se sont longtemps opposés pour expliquer ces mécanismes de mesure (Saunders 2005). En 1936, le botaniste E. Bünning émet l'hypothèse novatrice et longtemps réfutée que les plantes comme les insectes utiliseraient l'horloge circadienne pour le photopériodisme, en induisant une variation journalière de sensibilité à la lumière (Bünning 1936). Parallèlement, T. Lees propose en 1950, à partir de son travail sur des insectes, que le photopériodisme implique un mécanisme de sablier fonctionnant sans horloge interne (Lees 1950). L'endogénie du cycle de la photosensibilité amenée par E. Bünning, puis nettement affirmée par C. S. Pittendrigh et D. H. Minis dans les années 60, est aujourd'hui largement démontrée chez les oiseaux et les mammifères. Néanmoins la lecture de la photopériode n'implique pas une origine circadienne de photosensibilité chez toutes les espèces. Chez certains invertébrés ou chez le lézard, au cours de certaines phases du cycle biologique, le déclenchement du phénomène physiologique contrôlé par la photopériode est seulement lié à la durée de la phase de jour ou de la phase de nuit qui doit présenter une certaine valeur pour être efficace, ce rapportant alors au modèle du sablier (Boissin and Canguilhem 1998; Saunders 2005; Wood and Loudon 2014). Les deux mécanismes de E. Bünning et T. Lees ne seraient alors pas exclusifs, mais mutualisés chez certaines espèces pour la mesure du temps à l'échelle annuelle (Saunders 2005).

Un fort intérêt est encore porté sur la recherche des mécanismes génétiques responsables de la génération des rythmes circannuels, mais aujourd'hui encore, peu de choses sont connues sur les mécanismes impliqués. En revanche la compréhension des réponses neuroendocrines qui en découlent s'améliore, de même que le rôle clé que pourrait jouer l'horloge circadienne dans la lecture de l'information calendaire (Foster and Kreitzman 2009; Visser et al. 2010; Helm et al. 2013; Pegoraro et al. 2014; Wood and Loudon 2014).

Dans un contexte d'altération globale du climat, la compréhension des rythmes circannuels est d'un intérêt majeur en écologie, en santé publique, ou en biologie des changements globaux (Numata and Helm 2015). Les modifications rapides du climat, risques d'entraîner la désynchronisation entre le mécanisme endogène circannuel, qui est le fruit de millions d'année d'évolution et l'environnement des organismes.

6. Les rythmes biologiques chez les organismes marins

Les organismes marins ont évolué et se sont adaptés à un écosystème complexe, influencé par de multiples cycles environnementaux. Ainsi, de nombreux rythmes biologiques sont observés chez ces organismes, influencés directement ou indirectement par les récurrences périodiques du soleil mais aussi de la lune. Ces cycles comprennent le cycle journalier (nyctéméral) d'alternance du jour et de la nuit, mais aussi d'autres aux périodes plus courtes ou plus longues, tels que le cycle des marées, les cycles lunaires ou les cycles circannuels (Palmer 1995; Naylor 1999; Tessmar-Raible et al. 2011). Chez les organismes marins, en fonction des espèces, une multitude de rythmes biologiques correspondant à ces différentes périodes peut alors être observée au niveau de leur comportement, de leur reproduction, de leur physiologie.

Malgré leur intérêt en termes évolutifs (la vie serait apparue dans la mer) et la part importante de la composante marine dans l'ensemble de la biodiversité, l'attention portée en chronobiologie sur les organismes marins a été bien moins importante que celle sur leurs congénères terrestres.

6.1. Rappel sur les cycles astraux influençant l'environnement marin

En plus du rythme journalier (alternance jour/nuit) et du rythme annuel (évolution de la photopériode), le milieu marin est soumis aux cycles lunaires de façon conséquente, le plus important étant le cycle de marées appelé cycle tidal. 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, la lune en raison de sa proximité. À chaque marée, les organismes marins sont donc confrontés à des variations de leur environnement : exposition à l'air puis à l'eau (seulement pour les espèces des zones intertidales), variation de la salinité, de température, de la pression hydrostatique, du courant d'eau, de la nourriture et/ou de la prédation.

Plusieurs cycles sont définis pour les mouvements des trois astres terre, soleil, lune.

La terre effectue une rotation complète autour de son axe en 24h par rapport au soleil, c'est le cycle journalier, entraînant l'alternance de jour et de nuit.

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. Cela définit le jour lunaire, et entraîne le cycle des marées. Les marées peuvent être de plusieurs types : diurne (une marée par jour solaire), semi-diurne, semi-diurne à inégalité diurne ou mixte. En Atlantique et en Manche, les marées sont essentiellement de type semi-diurne, avec deux pleines mers et deux basses mers par jour lunaire, soit des cycles de 12,4h. Les points de l'océan caractérisés par une absence de marées sont dits amphidromiques.

Le temps nécessaire à la lune pour accomplir une révolution complète autour de la terre est de 29,53 jours, ce qui correspond au cycle synodique, et à l'intervalle de temps entre deux nouvelles lunes (Figure I 14). Le cycle synodique est le principal responsable des marées de vives-eaux et de mortes-eaux dans nos zones côtières, c'est-à-dire des variations

d'amplitude de marée, qui se renouvelle deux fois par cycle synodique, et a donc une période de 14,76 jours (*neap-spring tidal cycle*), alors qu'il faut un cycle synodique complet pour le cycle de l'éclairement de la lune. 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 (*spring tides*). 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 (*neap tides*).

Plusieurs autres cycles viennent moduler les amplitudes de marées. Principalement, le cycle lunaire anomalistique, de 27,55 jours, désigne l'intervalle de temps séparant deux périgées, moment où la distance terre-lune est la plus courte (Figure I 14). Il se superpose au cycle synodique et induit une inégalité bimensuelle dans les hauteurs d'eau aux marées de vives-eaux.

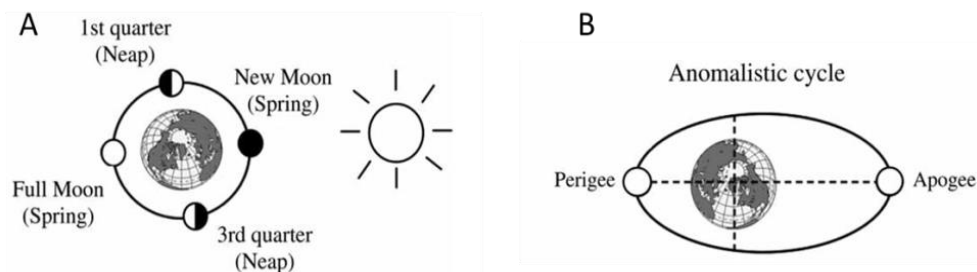


Figure I 14. (A) Le cycle synodique crée un cycle de 29,53 jours d'éclairement de la lune ainsi que d'un cycle de 14,76 jours de coefficient de marées. (B) Le cycle anomalistique se superimpose au cycle synodique pour influencer le cycle des marées.

Le cycle de révolution de la terre autour du soleil dure 365 jours. À une latitude donnée, ce cycle est à l'origine d'un changement annuel de photopériode, et entraîne des changements environnementaux saisonniers, parfois drastiques aux pôles.

6.2. Les rythmes observés chez les invertébrés marins

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. Ils sont fréquemment décrits comme labiles et bruités, et s'amenuisent rapidement en conditions constantes. De plus, une forte variabilité interindividuelle est généralement présente dans les données (Neumann 1981, 2014; Palmer 1995; Naylor 2010). D'un point de vue évolutif, une des explications à cette labilité pourrait être que les rythmes des marées, contrairement au rythme journalier, peuvent varier d'un endroit à l'autre de la planète, comme expliqué précédemment (marée diurne, semi-diurne ou même amphidromique). Il n'est donc pas rare que différentes populations d'une même espèce soient retrouvées dans des environnements soumis à chacun de ces types de cycle tidal.

Les premières observations scientifiques de variations du comportement des organismes au cours du cycle des marées apparaissent dans les années 1900 avec les travaux de Bohn (1903), Gamble et Keeble (1903), Bohn et Pieron (1906), et Martin (1907) et concernent la migration du ver plat *Convoluta roscoffensis*. Ce ver vit en symbiose avec une algue *Tetraselmis convolutae*. Ces vers vivent enterrés dans le sable et émergent à la surface le jour pendant les marées basses. Ainsi, lorsqu'ils sont exposés au soleil, ils permettent à l'algue de réaliser sa photosynthèse et *Convoluta roscoffensis* devient vert. Dès le retour de la marée, ils s'enfouissent dans le sable (Bohn 1903; Gamble and Keeble 1903). Placés dans des boîtes de pétri contenant du sable et de l'eau de mer, Martin observe la migration verticale et tidale du ver qui persiste pendant 4 à 7 jours en laboratoire. Cette observation est la première preuve de l'existence d'un rythme circatidal chez un organisme marin. Un rythme tidal au niveau du comportement et de la physiologie (mue, ventilation, rythme cardiaque..) a depuis été observé chez de nombreuses autres espèces marines, telles que des crabes ou autres crustacées, des anémones de mer, et des mollusques (Numata and Helm 2015). Pour beaucoup d'entre elles, un contrôle endogène de la rythmicité circatidale a également été avancé (Fingerman 1957).

De plus, des rythmes reliés au cycle semi-lunaire (14,76 jours, *neap-spring tidal cycle*) et au cycle lunaire (29,53 jours, « *moonlight* » cycle de la lune) sont très souvent observés dans les processus de reproduction, chez des nombreux métazoaires marins, tels que les coraux, les oursins, les vers annélides, les mollusques, ainsi que chez des vertébrés (poissons) ; mais aussi chez des organismes marins non métazoaires tels que les algues brunes et les algues vertes (Tessmar-Raible et al. 2011). Ces rythmes sont en effet typiques chez les espèces pratiquant une fécondation externe, après relargage des gamètes dans la colonne d'eau, qui implique une grande synchronisation entre les individus (Mercier et al. 2011). On les retrouve également au niveau du comportement de certaines espèces, comme dans la migration verticale du zooplancton (Last et al. 2016) ou le comportement valvaire des mollusques bivalves (García-March et al. 2008; Tran et al. 2011).

En parallèle, les organismes marins peuvent présenter des rythmes circadiens et circannuels. D'une espèce à l'autre, la combinaison de l'expression de l'ensemble des rythmes lunaires et solaires est variable. À titre d'exemples, il a été rapporté que le vers *Nereis virens* présente un rythme d'émergence/enfouissement qui peut être circatidal, circadien ou circalunaire selon les conditions d'entraînement ou en libre cours (Last et al. 2009). Chez le crabe *Carcinus maenas*, ce sont à la fois les rythmes circadien et circatidal qui sont mentionnés (Reid and Naylor 1989; Naylor 2010). De la même façon, l'activité du ver plat *Convoluta roscoffensis* précédemment cité est reliée à la fois aux marées et à l'alternance du jour et de la nuit, et donc dépendante des saisons (Keeble 1912). En général, les pontes synchronisées par le rythme lunaire ou semi-lunaire le sont également par le rythme annuel, tidal et circadien (Numata and Helm 2015). Chez le bivalve *Pinna nobilis*, un cycle journalier d'activité valvaire a été décrit *in situ* (Garcia-March et al. 2016), tandis que chez la palourde *Austrovenus stutchburyi* un rythme circatidal d'activité valvaire et d'extension des siphons est analysé (Beentjes and Williams 1986). Chez le pétoncle *Chlamys islandica*, un rythme circadien d'ouverture valvaire est observé, même pendant la nuit polaire, mais aucun rythme annuel ou circatidal n'est observé au niveau du comportement (Tran et al. 2016).

6.3. Etudes moléculaires de la rythmicité chez les invertébrés marins

Les connaissances concernant les mécanismes moléculaires mis en œuvre dans la génération des rythmes circadiens chez les organismes terrestres sont très poussées, mais les mécanismes internes des invertébrés marins sont très peu décrits et leur caractérisation fait partie des grands enjeux actuels de la chronobiologie marine. Les rythmes observés par une approche systémique sont-ils retrouvés au niveau moléculaire ? Quels mécanismes de régulation sont mis en place ? Les grands enjeux actuels sont définitivement la caractérisation des horloges et de leur évolution chez les organismes marins pour une régulation adaptative de leurs fonctions biologiques et une optimisation de leur fonctionnement au sein de leur environnement (Raible and Falciatore 2014; Numata and Helm 2015).

6.3.1. À la recherche de l'horloge circadienne chez les invertébrés marins

La chronobiologie marine était jusqu'alors abordée par une approche systémique (Palmer 1995; Naylor 2010). Les approches moléculaires se développent depuis quelques années et mettent peu à peu à jour les mécanismes circadiens comme on peut le voir sur les quelques exemples cités ci-dessous.

Chez les mollusques bivalves, l'observation d'expression oscillante de gènes a été observée en premier lieu chez la moule *Mytilus californianus* exposée à une combinaison d'entraînements tidal et journalier. Les auteurs ont observé l'expression rythmique journalière de gènes orthologues de l'horloge circadienne des mammifères *Cryptochrome 1* (*Cry 1*) ainsi que de *RAR-related orphan receptor B* (*RorB*), suggérant fortement de l'activité d'une horloge circadienne chez cet organisme (Connor and Gracey 2011). Récemment, le clonage et la caractérisation transcriptionnelle des composants principaux des gènes de l'horloge circadienne en conditions d'entraînement constant ou d'alternance jour/nuit chez un bivalve marin ont été réalisés pour la première fois chez l'huître creuse *C. gigas* (Perrigault and Tran 2017a). Cette partie sera développée Chapitre 6.4.2.

La caractérisation de l'horloge circadienne est également en cours chez plusieurs crustacés marins. Chez le krill en Antarctique *Euphausia superba*, une espèce clef de l'écosystème polaire, des oscillations circadiennes du gène *Cryptochrome 2* est observée en conditions d'entraînement jour/nuit. Une périodicité maintenue mais raccourcie en conditions constantes, semble également être le signe d'une horloge circadienne active. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'horloge du krill serait entrainable dans une large gamme, ce qui lui permettrait de s'adapter aux photopériodes extrêmes de son environnement de vie (Teschke et al. 2011). Chez la langoustine *Nephrops norvegicus*, des oscillations de *Timeless* et *Cryptochrome 2* (homologue vertébrés) ont été observées (Sbragaglia et al. 2015). Enfin, la description la plus aboutie chez un crustacé a été réalisée chez le pou de mer tacheté *Eurydice pulchra*, de l'étude de l'expression à l'analyse fonctionnelle de l'horloge circadienne.

Des études sur l'horloge circadienne des annélides ont également été réalisées chez le ver marin *Platynereis dumerilii*. Le séquençage et l'expression cyclique des gènes *Bmal*, *Period*, *Clock*, *Pdp1*, *Vrille*, et *Tr-cry* ont été décrits (Zantke et al. 2013).

Enfin, chez les cnidaires les gènes *Clock* et *Cycle* de l'horloge circadienne ont été identifiés chez l'anémone de mer *Nematostella vectensis*, montrant que leur fonctionnement sous forme d'hétérodimère protéique est conservé (Reitzel et al. 2010). Les gènes *Timeout* et *Cry* sont également impliqués (Peres et al. 2014). Des gènes tels que *Clock*, *Cryptochrome 2* et *Cycle* des coraux symbiotiques *Acropora millepora* ont également été identifiés comme oscillants, même en absence d'entraînement (Brady et al. 2011).

6.3.2. Quelle est la part de rythmicité dans l'expression des gènes chez les invertébrés marins ?

Comme pour les organismes terrestres, le développement de techniques de séquençage haut-débit permet aujourd'hui d'accéder à une vision plus large de l'importance quantitative et qualitative de l'implication des rythmes biologiques depuis l'expression temporelle des gènes. Ces méthodes commencent alors à être appliquées depuis peu et vont sans nul doute accélérer la compréhension de la régulation du message cyclique et l'implication des rythmes biologiques dans les fonctions métaboliques et physiologiques.

Le premier transcriptome cyclique (non exhaustif) chez un mollusque bivalve a été réalisé chez la moule *Mytilus californianus*, grâce à une méthode de puce à ADN (10 400 transcrits). De façon intéressante, les chercheurs ont observé qu'une majorité de gènes cycliques (80 à 90 %) oscillaient à une fréquence circadienne (plutôt que tidale), et ça chez des moules prélevées sur le terrain en conditions subtidales, intertidales, ou au laboratoire en conditions simulées. Les gènes cycliques observés n'étaient pas toujours les mêmes selon les conditions. En tout, plus de 40 % des transcrits avaient un potentiel oscillant (Connor and Gracey 2011).

Le premier transcriptome diurne du krill d'Antarctique a également été réalisé, en condition de jour polaire. Sur les 1300 gènes différentiellement exprimés plusieurs d'entre eux montraient une expression cyclique sinusoïdale. De façon intéressante, les pics d'expressions de gènes du métabolisme énergétique étaient répartis par fonction au cours de la journée (De Pittà et al. 2013).

Chez l'anémone de mer *Nematostella vectensis*, en accord avec son comportement, 180 transcrits cycliques ont été identifiés comme oscillant à une période circadienne et pouvaient être séparés en 5 groupes selon leur pic d'expression au cours de la journée (Oren et al. 2015).

6.3.3. Les horloges énigmatiques

Si la description de l'horloge moléculaire circadienne chez les organismes marins est facilitée par les connaissances accumulées chez un grand nombre d'autres espèces, toutes les autres horloges restent largement « énigmatiques » (Numata and Helm 2015). D'ailleurs, plusieurs horloges sont-elles nécessaires ? Les intrications observées entre les rythmes pourraient suggérer l'utilisation d'une machinerie moléculaire commune et/ou l'existence de régulateurs moléculaires communs, génétiques, hormonaux ou métaboliques, qui serviraient de

médiateurs pour la communication entre les différents rythmes (Tessmar-Raible et al. 2011; Numata and Helm 2015). Dans un cas (horloge commune) comme dans l'autre (horloges séparées, potentiellement intriquées), les mécanismes moléculaires mis en jeux pour l'expression de ces rythmes sont à découvrir.

La question de la connexion entre les différentes horloges n'est pas nouvelle et a déjà été très débattue concernant le lien entre les rythmes circatidaux et les rythmes circadiens observés chez les crabes intertidaux. Une première hypothèse, avancée par Naylor et Webb par rapport à leur travaux sur le crabe *Carcinus maenas*, défend l'existence de deux horloges couplées mais séparées : une horloge circadienne et une horloge circatidale, chacune étant unimodale (Webb 1976; Naylor 2010). Une deuxième hypothèse défendue par Palmer, envisage la présence de deux horloges unimodales, toutes les deux circalunidiennes (période de 24,8h), couplées en antiphase (Palmer 1995). La troisième hypothèse, donnée par Enright en 1976 d'après son étude sur l'isopode *Excitrolana chiltoni*, suggère qu'une seule horloge oscillant soit sur un mode unimodal soit sur un mode bimodal gouverne les rythmes circadiens et circatidaux (Enright 1976).

Aujourd'hui, l'approche moléculaire semble être une piste prometteuse pour répondre à ces questions (Neumann 2014; Numata and Helm 2015). Quelques études ont déjà apporté des résultats intéressants :

Lien entre rythme circadien et rythme circalunaire/circasemilunaire

Chez l'espèce corallienne *Acropora millipora*, la ponte est synchronisée par le cycle lunaire. Des études ont montré que l'expression d'un gène *Cryptochrome 2* (*Cry 2*) (photorécepteur potentiellement synchronisateur et/ou directement impliqué dans l'horloge circadienne) augmente pendant les nuits de pleine lune comparé aux nuits de nouvelle lune (Levy et al. 2007), suggérant l'implication de ce gène dans la détection de la lumière de la lune. De la même façon, un ensemble d'études sur des poissons-lapins *Siganus* sp., qui présentent des rythmes circalunaire et circasemilunaire de ponte et gamétogénèse respectivement, ont montré une influence de la lumière de la lune sur des acteurs de l'horloge circadienne, tels que les gènes *Cry 1*, *Cry 3* et *Per 2* ou la mélatonine (Takemura et al. 2004, 2010; Sugama et al. 2008; Numata and Helm 2015). En effet, en pleine lune, les chercheurs observent une diminution de la mélatonine, suggérant la perception et l'utilisation des changements de lumière de la lune par les poissons pour la synchronisation de leur métabolisme. De plus, l'expression du gène *Period* (*Per 2*) dans la glande pinéale augmente à minuit pendant la pleine lune, tandis que l'expression des gènes *Cryptochrome* (*Cry1* et *Cry 3*) augmente au quart de lune. Ces résultats suggèrent fortement que des éléments du système circadien sont impliqués dans la génération des rythmes de reproduction liés à la lune chez ces espèces de poissons-lapins (Ikegami et al. 2014; Numata and Helm 2015). En revanche, pour conclure à l'implication de ces gènes dans une horloge circalunaire à proprement parlé, c'est-à-dire à leur rôle dans la génération de ces rythmes, ces observations restent à être vérifiées en absence de zeitgeber (Tessmar-Raible et al. 2011).

Chez le ver marin *Platynereis dumerilii*, un rythme circadien et un rythme circalunaire ont été démontrés, le premier jouant en premier lieu sur le comportement, et le deuxième

essentiellement sur la maturation sexuelle. Par ailleurs, le rythme lunaire module ici également le comportement en interagissant sur le niveau d'expression cyclique des gènes de l'horloge circadienne. Cependant, la perturbation du rythme circadien par un inhibiteur de la Caséine kinase 1 (CK1, kinase de l'horloge circadienne, impliqué dans la phosphorylation de PER pour sa dégradation) n'entraîne pas de perturbation du rythme circalunaire de maturation. L'horloge circadienne ne serait alors pas nécessaire au fonctionnement de l'horloge circalunaire. Ces résultats suggèrent fortement la présence de deux horloges moléculaire distinctes et indépendantes, bien qu'interconnectées (Zantke et al. 2013; Numata and Helm 2015).

Lien entre rythme circadien et rythme circatidal

Le criquet des mangroves *Apteronemobius asahinai* est un insecte intertidal essentiellement terrestre. Il s'agit de la seule espèce d'insecte connue pour présenter un rythme tidal clair et persistant en plus de son rythme circadien. Son activité locomotrice est liée à un rythme tidal, qui est modulé par le rythme circadien. Des approches d'interférence par ARN (ARNi) ont permis de montrer que les gènes *Period* et *Clock* sont impliqués dans le rythme circadien de cette espèce, mais pas, ou très peu, dans la génération de son rythme tidal. Les auteurs proposent alors que le rythme circatidal d'*A. asahinai* soit expliqué par une horloge au composants moléculaires distincts de ceux de l'horloge circadienne (Takekata et al. 2012, 2014).

Le crustacé marin *Eurydice pulchra* présente également un comportement gouverné par une horloge circatidale et une horloge circadienne. En effet, son comportement circatidal est modulé par un rythme circadien. La méthode d'interférence par ARN a été utilisée pour inhiber l'expression du gène *Period*. Si le rythme circadien a bien été impacté, le rythme circatidal fut maintenu. Une horloge circadienne ne serait alors pas nécessaire pour la génération de la rythmicité tidale. Le rythme circatidal serait alors le fruit d'une horloge circatidale dédiée, distincte de l'horloge circadienne. En revanche, l'utilisation d'un inhibiteur de la Caséine kinase 1 (CK1) augmente à la fois la période du rythme tidal et celle du rythme circadien, cette enzyme est proposée pour être un élément intervenant dans les deux horloges. Les auteurs suggèrent alors la possibilité d'un partage de substrats entre les deux horloges (Zhang et al. 2013).

Les résultats de ces deux études précédemment citées, correspondraient alors au modèle proposé par Naylor (Naylor 2010). Nous verrons dans la partie suivante que des résultats chez l'huître *C. gigas* tendent à poser une hypothèse différente.

6.4. Les rythmes biologiques chez *Crassostrea gigas*

6.4.1. Les rythmes comportementaux *in situ*

Durée d'ouverture valvaire

Une année de suivi en continu (fréquence d'échantillonnage de 10 Hz) du comportement d'huîtres *C. gigas* sur le terrain a permis de mettre en évidence une très forte relation entre la durée d'ouverture valvaire des huîtres et les mouvements et interactions complexes entre le soleil, la terre et la lune (Tran et al. 2011). Le comportement des huîtres en conditions subtidales (immergées en permanence) est en premier lieu relié au cycle tidal d'alternance des marées. Les huîtres se ferment à marée basse. De plus, la modulation de l'intensité du cycle des marées par le cycle semi-lunaire (*neap-spring tidal cycle*) et par le cycle anomalistique (jouant sur la distance terre-lune) joue sur l'intensité de l'entraînement tidal sur le comportement de l'huître (Tran et al. 2011) (Tran et al. 2011). La durée d'ouverture des huîtres est proportionnelle à la grandeur des coefficients de marées. Un rythme de 24 heures, synchronisé par l'alternance du jour et de la nuit, est bien présent dans le comportement d'ouverture de l'huître, mais plus faible que l'entraînement par le rythme des marées (Tran et al. 2011). De plus, ce rythme circadien est lui aussi modulé par un cycle plus long, qui est le cycle annuel de la photopériode. En effet, pendant les saisons de printemps et d'été, quand la durée du jour est plus importante que celle de la nuit, les huîtres ont un comportement diurne, c'est-à-dire qu'elles sont ouvertes plus longtemps pendant la journée que pendant la nuit. À l'inverse, pendant l'automne et l'hiver, quand la durée du jour est inférieure à la durée de la nuit, le rythme circadien a une modalité nocturne, les huîtres sont plus ouvertes pendant la nuit. La transition a lieu au moment des équinoxes (Mat et al. 2012).

Pontes

La ponte des huîtres femelles *C. gigas* a été caractérisée par le mouvement valvaire typique lors de l'expulsion des gamètes dans la colonne d'eau. Ces événements de pontes sont déterminés précisément par la conjonction des différents rythmes lunaires (tidal, synodique et anomalistique) et solaires (circadien et annuel). En effet, ces pontes sont observées pendant l'été, le matin (\approx 6-8 h UTC) ou en début de soirée (\approx 18-20 h UTC), aux moments de l'étalement et du début du jusant lors de forts coefficients de marées, associant le cycle semilunaire (pleine lune ou nouvelle lune) et le cycle anomalistique (périgée) (Bernard et al. 2016).

6.4.2. Le rythme circadien de *C. gigas*

La caractérisation au niveau comportemental

Un rythme circadien endogène a été montré chez l'huître creuse *C. gigas* et caractérisé comme plastique et dual. En condition d'entraînement lumineux (Light : Dark 12 h : 12 h), l'huître *C. gigas* présente au laboratoire un rythme d'activité valvaire de 24 h. Ce rythme est maintenu en condition constante de jour ou de nuit. En effet, les individus présentant un

rythme significatif ont une période circadienne (20-28 heures). Ce rythme a été caractérisé comme relevant d'un oscillateur faible et plastique, car les huîtres présentent en condition constante une forte variabilité individuelle et répondent rapidement à un décalage d'entraînement lumineux (Mat et al. 2012, 2014). Il est proposé que cette horloge faible constitue un avantage adaptatif pour ce bivalve qui possède une aire de répartition géographique très large, en lui permettant de s'adapter à des conditions très variées de marées et d'alternance jour/nuit. Enfin, les organismes présentent un rythme circadien duel. La transition nocturne/diurne observée sur le terrain a également été observée au laboratoire autour de l'équinoxe de printemps, alors que les huîtres étaient hors de leur environnement naturel, suggérant une origine endogène à ce rythme annuel. Ce dualisme pourrait être un avantage adaptatif en réponse au changement de besoins énergétiques au cours de l'année (Mat et al. 2012).

Phylogénie et séquençage de l'horloge circadienne

Les gènes principaux de l'horloge circadienne ont été caractérisés chez *C. gigas*, incluant *Clock*, *Bmal*, *Period*, *Timeless*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erb*, *Ror*, ainsi que d'autres membres de la famille des *cryptochrome/photolyase* (plant-like *Cry*, 6-4 *Photolyase*).

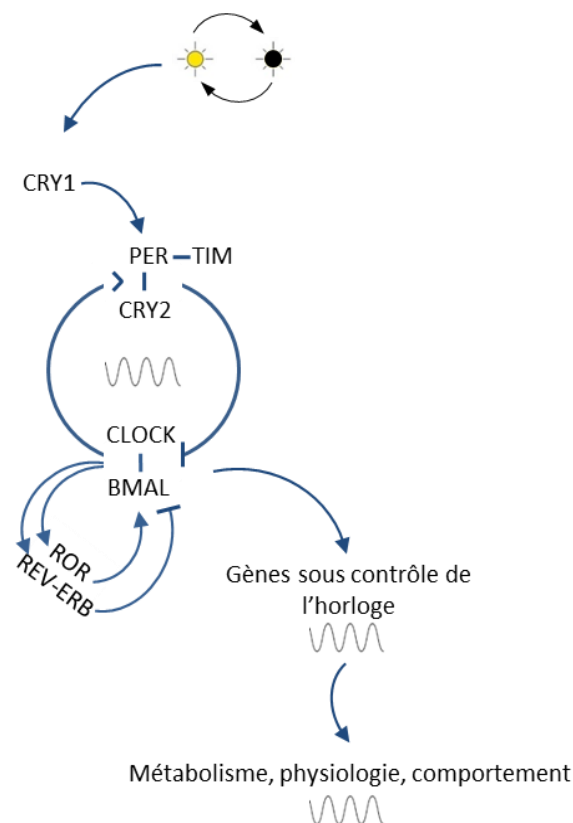


Figure I 15. Fonctionnement putatif de l'horloge circadienne chez *C. gigas* décrit par Perrigault et Tran (2017).

L'analyse phylogénétique, ainsi que l'expression temporelle de ces gènes chez des huîtres exposées à un entraînement lumineux journalier ou en condition constante d'obscurité a permis de proposer un modèle putatif de l'horloge circadienne chez *C. gigas*, proche du modèle du papillon Monarque *Danaus plexippus* (Zhu et al. 2005), intermédiaire entre celui décrit chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, les mammifères, et les annélides (Perrigault and Tran 2017a). Cette horloge fonctionnerait selon différentes boucles de rétrocontrôles positives et négatives déjà décrites chez différents embranchements de vertébrés et d'invertébrés. Il s'agit ici d'une première caractérisation de l'horloge circadienne chez un mollusque. Cette description constitue une base essentielle pour la compréhension des interactions entre les différents composants de l'horloge associées à la génération et à la synchronisation des rythmes biologiques chez *C. gigas*, de l'expression génétique aux fonctions métaboliques et physiologiques (Figure I 15).

Les rythmes journaliers observés

Chez des huîtres étudiées au laboratoire pendant l'hiver en condition d'entraînement jour/nuit, une cyclicité au niveau du comportement valvaire est observée. De plus, l'expression circadienne du gène *Cry 1* a été associée à l'expression à une fréquence circadienne de gènes impliqués dans le stress oxydant (*catalase*, *glutathione peroxidase* et *superoxide dismutase*), dans le métabolisme mitochondrial (*cytochrome oxydase 1*) et dans l'immunité (*interleukine*), montrant tous un pic d'expression pendant la nuit (Tran et al. 2015). Une cyclicité journalière a également été montrée au niveau de la physiologie digestive de *C. gigas*, avec une rythmicité dans la synthèse du stylet cristallin (Tran et al. 2015).

6.4.3. Le rythme tidal

Alors qu'il est prédominant sur le terrain, aucune preuve d'un rythme tidal endogène n'a pu être montrée chez *C. gigas* (Mat et al. 2014). Au laboratoire, le comportement de *C. gigas* présente un rythme circadien et un rythme tidal en condition d'entraînement lumineux (L : D 12 : 12) et de cycle tidal simulé par un générateur de courant d'eau. Cependant, seul le rythme circadien est maintenu en conditions constantes (Mat et al. 2012, 2014). Aucune preuve d'un mécanisme endogène circatidal ne peut alors être établie. Cependant, un rythme de période circadienne peut être entraîné par un zeitgeber tidal (vitesse du courant d'eau) de période de 24h, et inversement un rythme de période circatidale peut être entraîné par un zeitgeber lumineux de période tidale (12,4h). Deux mécanismes possibles pour la génération d'un comportement tidal ont été proposés (Figure I 16A) : (1) l'activité tidale apparente n'est dû qu'à une réaction directe aux facteurs environnementaux de la marée, sans passer par une horloge moléculaire, (2) une horloge endogène circadienne est capable d'être synchronisée par des zeitgebers tidaux, et ainsi d'osciller à fréquence tidale, rejoignant l'hypothèse proposée par Enright (Enright 1976) (voir partie 6.3.3.). La deuxième hypothèse semble appuyée suite à l'approche moléculaire de cette problématique. Chez des huîtres placées en conditions d'entraînement tidal associées à une absence d'entraînement lumineux (D : D), l'expression du gène *Cryptochrome 1* (*Cry 1*), impliqué dans l'horloge moléculaire circadienne en tant que synchronisateur, oscille à une fréquence tidale (Mat et al. 2016).

L'horloge circadienne de *C. gigas* serait alors flexible (Figure I 16B) avec deux rythmes apparents et une seule horloge. Selon l'entraînement, le rythme exprimé par l'horloge circadienne pourrait alors aller d'un rythme unimodal tidal à un rythme unimodal circadien, tous les intermédiaires bimodaux étant possibles (Mat 2012; Mat et al. 2014, 2016). Toutefois cette hypothèse reste à être validée en bloquant le fonctionnement de l'horloge circadienne par exemple par interférence par ARN.

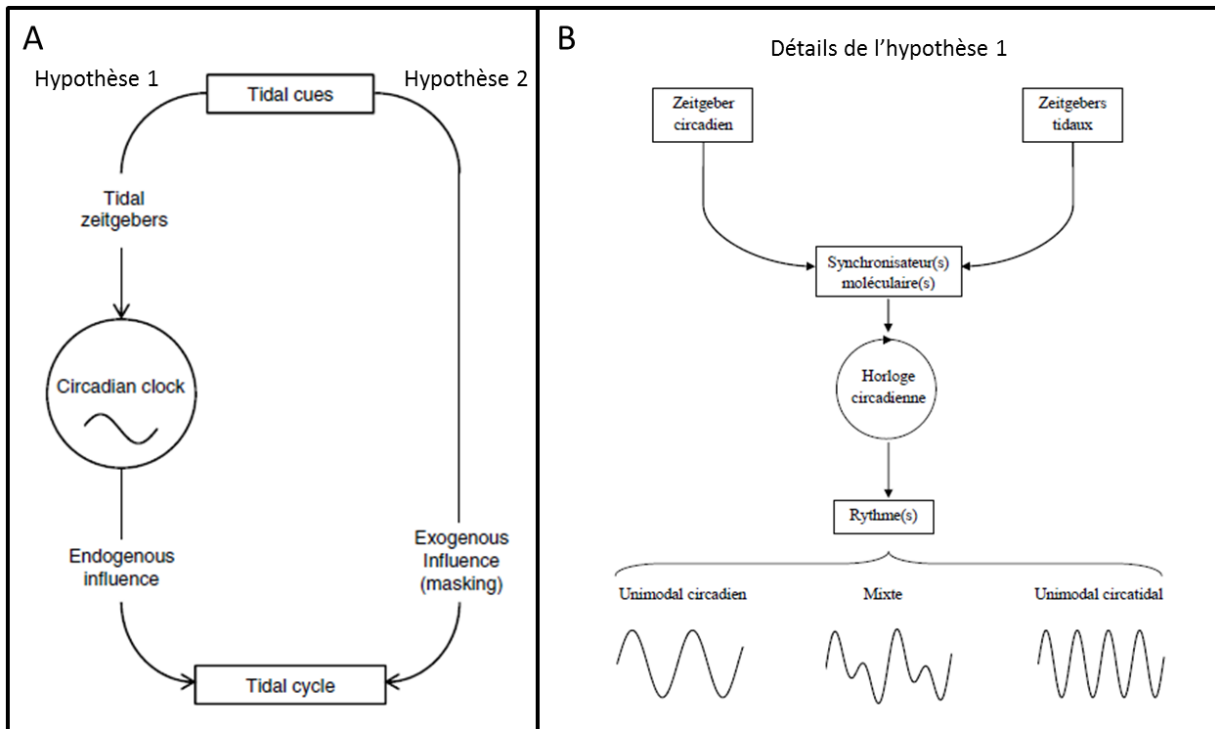


Figure I 16. Les deux hypothèses proposées pour la génération du rythme tidal chez l'huître *C. gigas* (A) (Mat et al., 2014). Détail de l'hypothèse 1 (B) (Mat, 2012).

7. Lien entre rythmes biologiques et contamination

7.1. Études des interactions entre rythmes biologiques et xénobiotiques

Alors que les interactions entre rythmes biologiques et contamination par des xénobiotiques sont relativement connues et de plus en plus considérées chez les mammifères, ces approches ont jusqu'à présent été complètement négligées chez les organismes aquatiques (Sánchez-Vázquez et al. 2011).

Chez les mammifères, ces études ont été initiées dès le milieu du XX^e siècle par le médecin F. Halberg, qui crée la chronotoxicologie, discipline tournée vers les problématiques de santé humaine. Il a notamment travaillé sur l'importance de la prise en compte des rythmes

biologiques pour estimer l'effet des médicaments, montrant que leur action peut être forte ou négligeable selon le moment auquel ils sont administrés (Halberg et al. 2003).

7.1.1. Implication des rythmes biologiques dans la durée de vie et les effets des xénobiotiques dans l'organisme

Il est aujourd'hui montré que les rythmes biologiques jouent un rôle fondamental dans le devenir et les effets d'un xénobiotique dans l'organisme. Sous l'influence de l'horloge circadienne, de nombreux paramètres tels que les cycles de veille / sommeil, les cycles d'alimentation, l'activité cardiaque, la pression sanguine, la production de bile et d'urines, le métabolisme, ainsi que les fonctions endocrines, sont soumis à des fluctuations journalières. Les approches de séquençage haut débit ont mis en évidence que les mécanismes de transport, de métabolisation (enzymes de phase I à III), et d'excrétion des xénobiotiques sont rythmiques. Il a été observé dans les tissus hépatiques de la souris que leur expression est régulée par l'activité de facteurs de transcription de la famille PARbZip, contrôlée par l'horloge circadienne (Gachon et al. 2004, 2006; Ripperger and Schibler 2006; Claudel et al. 2007). L'accumulation cyclique des protéines impliquées dans ces processus de détoxification a également été observée (Robles et al. 2014). De plus, des mutants de l'horloge révèlent une hypersensibilité aux xénobiotiques et au stress oxydant (Gorbacheva et al. 2005; Gachon et al. 2006). Le rythme propre de l'individu, ainsi que l'état temporel dans lequel il se trouve, joue alors sur la durée de vie, l'efficacité s'il y en a, et la toxicité d'un xénobiotique dans l'organisme. En médecine, ces trois notions sont respectivement appelées cinétique chronopharmacologique, chronoefficacité, et chronotoxicologie (Ohdo 2010; Kaur et al. 2013).

7.1.2. Perturbations des rythmes biologiques

En parallèle de l'étude de l'implication des rythmes biologiques dans la prise en charge des xénobiotiques par l'organisme, quelques études s'intéressent aujourd'hui aux possibles perturbations des rythmes biologiques par des xénobiotiques. Par exemple, il a déjà été montré au niveau moléculaire que plusieurs xénobiotiques peuvent altérer l'expression des gènes de l'horloge circadienne, via différentes voies, telles que AhR et PPAR α (Garrett and Gasiewicz 2006; Mukai and Tischkau 2007; Claudel et al. 2007). Il est intéressant de noter que par la perturbation de l'horloge circadienne, et donc la perturbation de l'expression cyclique de gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques, certains xénobiotiques vont alors modifier leur propre métabolisme, et donc leur toxicité (Claudel et al. 2007).

De plus, de très nombreuses pathologies, telles que l'obésité, les maladies cardiaques, les cancers, ou des troubles métaboliques sont aujourd'hui associés à des perturbations des rythmes biologiques, et les mécanismes moléculaires mis en jeu sont de plus en plus étudiés (Knutsson 2003; Sharifian et al. 2005; Suwazono et al. 2008; Doi et al. 2010; Antunes et al. 2010; Fonken et al. 2010; Viitasalo et al. 2015).

7.2. Perturbation des rythmes biologiques par *Alexandrium minutum*

Les études sur la perturbation des rythmes biologiques par l'algue toxique *A. minutum* se limite à ma connaissance à celles menées par notre équipe (équipe Ecotoxicologie Aquatique, axe 2 : Rythmes, Perturbations et conséquences) sur l'huître creuse *C. gigas*. En revanche quelques études ont montré un impact de la TTX (tétrodotoxine), homologue de la STX produite par les algues *A. minutum*, sur l'horloge circadienne chez d'autres espèces.

7.2.1. Effets connus de la TTX sur le rythme circadien chez les mammifères et l'aplysie

La TTX (tétrodotoxine) est un analogue de la saxitoxine (STX) produite par *A. minutum*. Elle est utilisée pour son action neurotoxique (blocage des canaux sodium voltage-dépendants) pour la recherche en neurosciences. Des impacts de cette toxine (TTX) sur le fonctionnement de l'horloge circadienne ou la transmission neuronale du signal rythmique ont été observés dans des cellules neuronales. L'horloge moléculaire régule l'activité électrique membranaire, par des voies de signalisation encore peu connues, pour générer un profil circadien de potentiels d'action (Allen et al. 2017). Des études chez des mammifères, mais aussi chez des mollusques gastéropodes tel que l'aplysie, ont montré que le potentiel d'action des neurones horlogers était bloqué par la TTX. Le mécanisme horloger interne à ces cellules gardait le tempo, mais ne transmettait plus le message circadien aux autres régions du cerveau (Eskin 1977; Schwartz et al. 1987). Chez les rats, la TTX réinitialise l'horloge circadienne des cellules du noyau suprachiasmatique NSC (Noguchi and Watanabe 2005). Une autre étude chez des mammifères a montré que la TTX atténue et désynchronise l'expression oscillante de *Period 1* des cellules du NSC (Yamaguchi et al. 2003). Les chercheurs en ont conclu que les potentiels d'actions sodium-dépendant apparaissent alors cruciaux dans la synchronisation entre les cellules du NSC ainsi que dans la persistance de leur oscillation circadienne autonome (Yamaguchi et al. 2003).

7.2.2. Perturbation des rythmes biologiques de *C. gigas* par *A. minutum*

Il a été montré qu'une exposition à des concentrations environnementales d'efflorescences de l'algue toxique productrice de STX *Alexandrium minutum* entraîne l'altération, voire l'abolition, de certains paramètres rythmiques chez l'huître *C. gigas*. Il semble que le bon fonctionnement du mécanisme horloger de l'huître, dans son rôle de régulateur de l'expression cyclique des gènes, des fonctions physiologiques et du comportement soit impacté par la STX accumulée suite à l'ingestion de cette micro-algue toxique.

L'altération du rythme journalier de *C. gigas* par *A. minutum* a été observée à différents niveaux biologiques (Tran et al. 2015). Une exposition des huîtres à des concentrations environnementales d'*A. minutum* entraîne la perte de la cyclicité nyctémérale du gène *Cry 1* dans les branchies. Ce gène est impliqué dans la transmission du signal lumineux à l'horloge circadienne de *C. gigas*. Au moment de cette expérience, il s'agissait du seul gène de

l'horloge séquencé chez *C. gigas*. La perte de cyclicité du niveau d'ARNm de ce gène est associée à la perte de cyclicité journalière de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation de stress oxydant (catalase, glutathione peroxydase et superoxyde dismutase), le métabolisme mitochondrial (cytochrome oxydase 1) et l'immunité (interleukine) dans ce même tissu (Tran et al. 2015). En effet l'expression de ces gènes, qui comme celle du gène *Cry 1*, présentait un pic pendant la nuit, devient constante au cours du temps chez les organismes exposés aux algues toxiques. De plus, une perte de cyclicité journalière est également observée au niveau du processus digestif. Le cycle journalier de formation et dissolution du stylet cristallin semble devenir beaucoup plus variable d'un organisme à l'autre. La différence de taille de ce stylet entre le jour et la nuit au niveau du groupe est annulée chez les huîtres exposées à *A. minutum* (Tran et al. 2015). Enfin, le rythme circadien observé au niveau du comportement d'ouverture et de fermeture des valves des huîtres est aboli (Tran et al. 2015).

Par ailleurs, chez des huîtres exposées à un entraînement uniquement tidal (simulation par la génération d'un courant d'eau) associé à une absence d'entraînement lumineux (D : D), une perte de cyclicité tidale de l'expression du gène *Cryptochrome 1 (Cry1)* est également observée suite à leur exposition à des concentrations environnementales d'*A. minutum*. La cyclicité tidale au niveau du comportement valvaire des huîtres exposées à l'algue toxique disparaît également (Mat et al. 2016). De plus, un effet dose-réponse a été observé dans la perte de cyclicité tidale du comportement des huîtres. Le nombre d'individus arythmiques augmente avec l'augmentation de la concentration d'exposition à *A. minutum* et l'augmentation de l'accumulation des STX. De plus, la disparition de la cyclicité tidale de l'expression du gène *Cgry 1* dans le muscle des huîtres précède la perte significative de cyclicité tidale du comportement au niveau du groupe (Mat et al. 2016).

Par leur impact sur le rythme biologique, les efflorescences d'*A. minutum* pourraient alors altérer le bon fonctionnement métabolique et physiologique de l'animal, ainsi que son adaptation avec son environnement (Tran et al. 2015; Mat et al. 2016).

Chapitre II

Matériels et méthodes

1. Huîtres et micro-algues

Les expérimentations de terrain et de laboratoire ont été réalisées sur des huîtres creuses *Crassostrea gigas* diploïdes et triploïdes. Au laboratoire, les huîtres sont exposées à des micro-algues.

1.1. Les huîtres creuse *Crassostrea gigas*

1.1.1. Stratégie de collecte

Afin d'homogénéiser les résultats de ces travaux de thèse, la provenance des huîtres creuses *Crassostrea gigas* est identique pour toutes les expériences. Les huîtres diploïdes et triploïdes sont obtenues auprès d'ostréiculteurs locaux.

Les huîtres diploïdes sont issues d'un captage naturel dans le bassin d'Arcachon (Gironde, France), assurant un fort brassage génétique, et cultivées dans ce même bassin, au niveau de l'Estey d'Afrique.

Les huîtres triploïdes sont achetées en écloserie (Grainocéan, Saint-Martin-de-Ré, 17, France), puis cultivées à Grand Banc, dans le bassin d'Arcachon. L'écloserie de provenance opte pour un brassage génétique important lors de la fécondation, avec une dizaine de géniteurs mâles quadriploïdes, et 100 à 200 génitrices femelles diploïdes.

Ainsi, la stratégie de provenance des huîtres pour la comparaison d'huîtres diploïdes et triploïdes est (1) un fort brassage génétique et (2) des lieux de cultures proches. Pour chaque expérience, des huîtres relativement jeunes (18 à 24 mois) sont sélectionnées selon un critère de taille (hauteur de la coquille) homogène d'environ 7-8 cm.

1.1.2. Stabulation

Les huîtres sont maintenues en stabulation 2 à 4 semaines à l'animalerie de la station marine d'Arcachon avant toute expérimentation. Elles sont placées dans des bacs circulaires (400 L) alimentés en circuit ouvert par l'eau de mer du bassin d'Arcachon, et soumises à la photopériode naturelle.

1.1.3. Préparation des animaux et acclimatation

Suite à la stabulation, les huîtres sont nettoyées, séchées à l'air libre pour la pose des électrodes dans le cas d'un enregistrement par valvométrie HFNI, et mises en place dans les systèmes expérimentaux. Ces manipulations engendrent un stress potentiel chez les organismes. Chaque expérience comprend alors une phase préalable d'acclimatation des

huîtres dans le système expérimental d'une durée d'une semaine. Cette phase permet un espacement entre le stress lié aux manipulations et le début de l'expérience, ainsi que l'acclimatation aux conditions contrôlées des systèmes expérimentaux propres à chaque expérience. De la même façon, lors des études *in situ*, les enregistrements sont pris en compte environ 1 semaine après la mise en place des organismes sur le terrain.

1.2. Micro-algues

1.2.1. Les micro-algues utilisées

Les expériences en laboratoire sont réalisées avec la souche AM89BM (Halim) de la micro-algue toxique *Alexandrium minutum*, productrice de toxines PSP et de composés extracellulaires, et la souche HT99PZ (Ehrenberg, 1840) de la micro-algue non toxique *Heterocapsa triquetra*. Ces deux souches ont été fournies gracieusement par le Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin de Plouzané (LEMAR, IUEM, Brest, France).

Ces deux dinoflagellés possèdent des propriétés de forme et de taille comparables : 19–28 μm pour *H. triquetra*, 23–29 μm pour *A. minutum* (Figure II 1). Les huîtres nourries avec des algues non toxiques servent de contrôle aux animaux exposés à *A. minutum*.

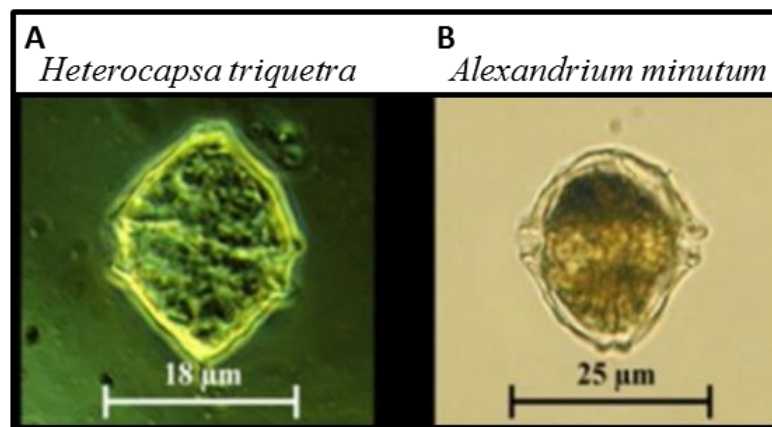


Figure II 1. Photos des dinoflagellés utilisés pour les expériences en laboratoire: la micro-algue non toxique *Heterocapsa triquetra* (A) et l'algue toxique *Alexandrium minutum* (B) (www.serc.si.edu, www.envlit.ifremer.fr).

1.2.2. Cultures des micro-algues

Les cultures d'algues sont réalisées à la station marine d'Arcachon en conditions contrôlées. Les micro-algues sont cultivées dans du milieu f/2 (Guillard, 1975) à une température de $17 \pm 1^\circ\text{C}$ et une photopériode L : D de 14h :10h. Le maintien des cultures s'effectue sur des petits volumes (1-3 L) en armoire. Pour les expériences, la production des algues s'effectue dans

des phytoréacteurs de plus gros volumes (10-80 L) en conditions de bullage, dans une salle climatisée (Figure II 2).

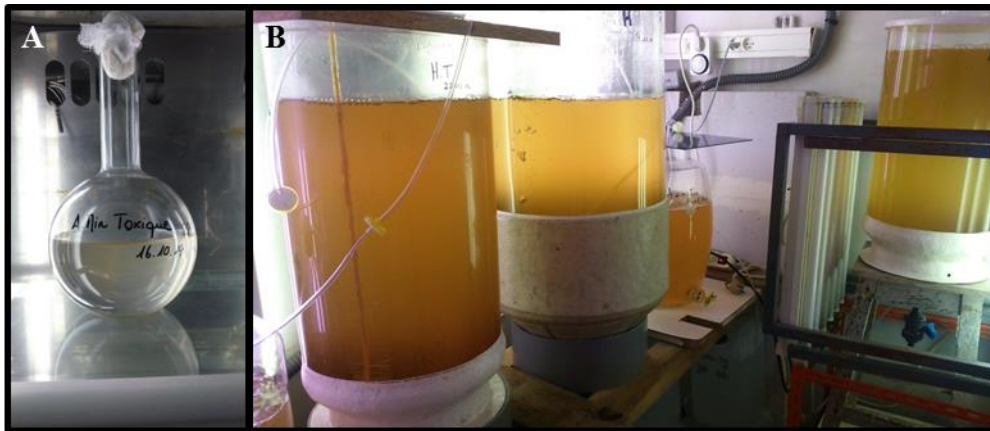


Figure II 2. Photos des cultures de micro-algues *H. triquetra* et / ou *A. minutum* en armoire (A) et en salle climatisée pour la production de plus gros volumes (B).

2. Conditions générales d'expérimentation

2.1. Dispositif expérimental

Les expériences au laboratoire ont été réalisées à la station marine d'Arcachon en conditions contrôlées de température, photopériode, apports de micro-algues, salinité et pH. En effet, les processus expérimentaux doivent permettre d'observer les effets de variable(s) établie(s). Le dispositif expérimental doit limiter toutes autres sources de variabilités.

La salle d'expérimentation est climatisée et rendue hermétique à la lumière extérieure. La température de l'air est maintenue constante de jour comme de nuit grâce à un système de climatisation. La photopériode est réalisée grâce à des néons (Zolux T8, 36W) placés au-dessus de chaque bac. Les valeurs de températures et photopériodes appliquées sont déterminées en fonction des valeurs environnementales au moment de chaque expérimentation, afin de respecter l'état physiologique des animaux.

Les huîtres sont placées dans des bacs alimentés en continu. Ce dispositif en circuit ouvert permet un renouvellement régulier de l'eau des bacs, le contrôle de la température, et évite une dégradation des conditions physico-chimiques du milieu. De plus, les bacs expérimentaux sont aérés de façon homogène via des bulleurs d'aquarium placés dans des air-lifts.

Enfin, afin d'éviter toute perturbation des animaux par des vibrations parasites, les bulleurs sont munis d'une chambre de capacitance et les bacs sont installés sur des dispositifs antivibratoires.

2.2. Apports en eau de mer et micro-algues

L'utilisation de pompes péristaltiques (Gilson, USA) permet la circulation constante, contrôlée et continue, de l'eau de mer et des cultures de micro-algues dans les bacs.

L'apport de l'eau de mer est réalisé depuis une nourrice d'eau de mer du bassin d'Arcachon ou d'eau de mer artificielle (Instant ocean) selon les besoins de l'expérience, dont la température est contrôlée grâce à un groupe froid, et l'oxygénation assurée par des bulleurs. Dans le cas d'utilisation d'eau de mer du bassin, une nourrice intermédiaire suffisamment grande (200 L) est nécessaire pour permettre une homogénéisation nécessaire à l'annihilation des cycles environnementaux et une stabilisation de la température.

L'apport en micro-algues est réalisé depuis des nourrices de 3 à 10 L de cultures d'algues, renouvelées toutes les 8 à 24 h en fonction des expériences afin de maintenir la qualité et la concentration de la culture. L'homogénéité dans les nourrices est assurée par un bullage doux. À l'arrivée dans les bacs, la répartition homogène des algues dans l'ensemble du bac est assurée par le système air lift / bullage.

Le niveau d'exposition des huîtres dépend de la concentration en micro-algues en entrée, du débit total (cultures de micro-algues et eau de mer), du volume des bacs, et du nombre d'huîtres par bac. Les concentrations en algues dans les nourrices et dans les bacs sont respectivement fixées et contrôlées grâce au réglage des débits et à des mesures au compteur Coulter (Coulter Z2, Beckman Coulter Inc., USA).

Le trop plein des bacs est évacué par surverse vers une nourrice de déchets liquides traitée à l'eau de javel (lors de contamination par des algues toxiques ou traitement à l'interférence par ARN) et vidée toutes les 24 heures.

2.3. Prélèvement des organismes

Les temps de prélèvement lors des expériences et le nombre d'individus prélevés par temps sont fixés pour chaque expérimentation. Les huîtres sont prélevées dans les bacs à l'aide d'une pince afin de limiter la perturbation des autres individus. Ils sont immédiatement mesurés, pesés et disséqués. Un temps court entre le prélèvement et le conditionnement des échantillons est indispensable, notamment pour les approches de biologie moléculaire. Les prélèvements et dissections pendant les phases de nuit s'effectuent à la lumière rouge (lumière à laquelle les bivalves sont peu ou pas sensibles) (Figure II 3).



Figure II 3. Photographie de dissections de nuit, en lumière rouge à la station marine d'Arcachon (collaboration EPOC / LEMAR).

3. Dosage des toxines paralysantes (PSP)

La quantification de l'ensemble des toxines paralysantes (saxitoxine et ses dérivés) bioaccumulées dans les tissus des huîtres est réalisée à l'aide d'un test ELISA par compétition directe (Abraxis, Novakits, France), conformément aux instructions du fabricant. Ce test ELISA possède l'avantage d'être très sensible (limite de détection à $0,015 \text{ ng.mL}^{-1}$) et pratique d'utilisation. Une évaluation du profil toxinique, non nécessaire à nos études, nécessiterait le dosage des échantillons par HPLC / FLD (chromatographie liquide à haute performance avec détection par fluorescence), ne peut se faire à l'heure actuelle en France qu'au Laboratoire Phycotoxines PHYC de l'IFREMER Nantes.

3.1. Principe du test ELISA

Le test ELISA (de l'anglais *enzyme-linked immunosorbent assay*) PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) est un test immuno-enzymatique par compétition directe réalisé en microplaque 96 puits, basé sur la reconnaissance de la saxitoxine et ses dérivés par des anticorps spécifiques (Abraxis, Novakits, France). La saxitoxine présente dans l'échantillon est mise en compétition avec de la saxitoxine couplée à une enzyme, pour la fixation sur un anticorps de lapin anti-saxitoxine. Ce même anticorps de lapin anti-saxitoxine vient se fixer sur un second anticorps (anticorps de mouton anti-lapin), fixé à la paroi du micro-puit. Après une étape de lavage, l'ajout du substrat en solution crée un signal coloré (bleu) si la saxitoxine couplée à l'enzyme précédemment citée est encore présente. Ainsi, l'intensité de la couleur bleue est inversement proportionnelle à la concentration de saxitoxine présente dans l'échantillon, comme schématisé Figure II 4. La réaction colorée est stoppée après un temps défini, et les mesures de colorations sont effectuées au spectrophotomètre (valeurs d'absorbance à 450 nm). La concentration dans les échantillons est déterminée par interpolation, grâce à des échantillons standards.

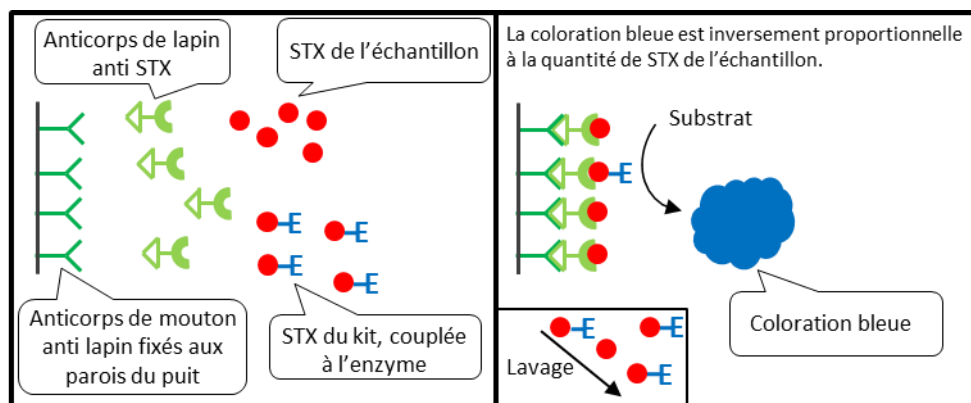


Figure II 4. Principe schématisé du test ELISA saxitoxine (PSP), un test immuno-enzymatique par compétition directe (Abraxis, Novakits, France). La STX de l'échantillon est en compétition avec de la STX couplée à une enzyme fournie dans le kit.

3.2. Protocole

Les tissus de branchies sont disséqués et stockés à -80°C . Au moment de l'analyse, les échantillons (1 mL d'acide chlorhydrique à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pour 1g de tissu) sont broyés dans la glace puis mis à bouillir pendant 5 minutes à 100°C pour hydrolyser partiellement les différentes molécules analogues de la saxitoxine. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4°C et 3500 G pendant 10 minutes afin de récupérer le surnageant contenant les toxines. Ils sont ensuite dilués de 1/200 à 1/ 1000 en fonction des échantillons. Les solutions standards ($50 \mu\text{L}$) et les échantillons ($50 \mu\text{L}$) sont déposés en duplicatas dans les puits de la microplaque du test ELISA. Puis $50 \mu\text{L}$ de la solution de saxitoxine couplée à l'enzyme (peroxydase du raifort) et $50 \mu\text{L}$ de la solution de l'anticorps primaire (de lapin, anti-saxitoxine) sont ajoutées dans les puits de façon successive. Les plaques sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante puis lavées quatre fois avec $300 \mu\text{L}$ de solution de lavage. Enfin, $100 \mu\text{L}$ de la solution contenant le substrat de l'enzyme (tétraméthyl-benzidine) sont ajoutés dans chaque puit. Une incubation de 30 minutes à température ambiante est suivie de l'ajout de $100 \mu\text{L}$ de solution contenant de l'acide sulfurique, permettant de stopper la réaction enzymatique. L'absorbance est observée à une longueur d'onde de 450 nm au spectrophotomètre à microplaques. La concentration en PSP dans les échantillons est calculée à partir des résultats obtenus pour les échantillons standards.

4. Étude du comportement par valvométrie HFNI

4.1. Principe de la valvométrie HFNI

Le mouvement valvaire de *Crassostrea gigas*, c'est-à-dire l'activité d'ouverture et de fermeture des valves, est mesuré par valvométrie Haute Fréquence Non Invasive. Cette

technique a été développée au sein de l'équipe Ecotoxicologie Aquatique pour l'expérimentation au laboratoire depuis 1997 et sur le terrain depuis 2006. L'objectif est de permettre un suivi à haute fréquence et sur le long terme de l'activité valvaire d'organismes bivalves, en minimisant, voire éliminant, le stress potentiel généré par le dispositif sur les animaux, ainsi que l'intervention humaine (Tran et al. 2003, 2011). Pour cela, deux électrodes très légères (poids nue 54 mg ; poids enrobée jusqu'à 1g) reliées à des câbles flexibles sont collées en vis-à-vis, sur chacune des valves d'un individu. Chaque électrode est un solénoïde (électro-aimant) enrobé d'une résine protectrice, l'une étant émettrice et l'autre réceptrice. Le principe est alors de mesurer les variations de voltage produites par le courant électromagnétique entre les deux électrodes. La mesure réalisée est une application de la loi de Maxwell :

$$\varepsilon = -N \cdot \frac{d\varphi_B}{dt}$$

Où ε correspond à la force électromagnétique (en Volts), N au nombre de tours de l'électro-aimant, φ_B au flux magnétique (en Webers) et t au temps. La distance entre les 2 électro-aimants, 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.

4.1.1. Études au laboratoire

Au laboratoire, le signal est transmis à une carte électronique reliée à un ordinateur permettant l'acquisition, le traitement et l'enregistrement des données. Toutes les 0,3 s, 3 valeurs sont enregistrées : l'heure, le numéro de l'animal et le voltage correspondant à l'écartement valvaire. Un valvomètre permet le suivi de l'activité valvaire de 16 animaux. Par individu, la fréquence d'échantillonnage est alors de 0,2 Hz, soit toutes les 4,8 secondes.

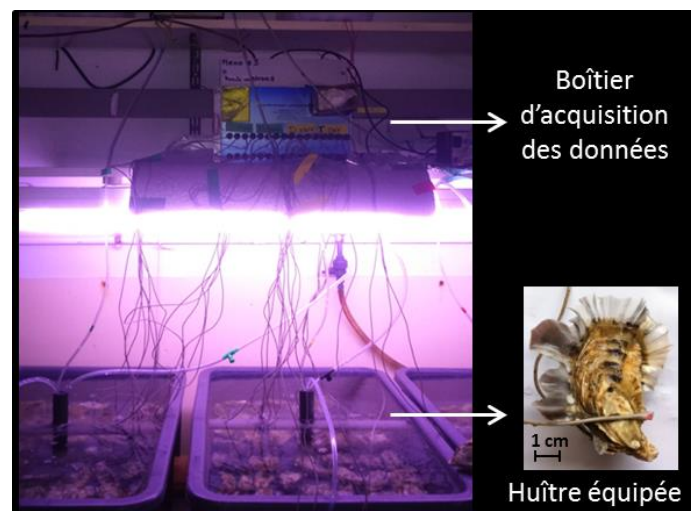


Figure II 5. Exemple d'expérience en laboratoire, où une partie des huîtres est équipée par valvométrie HFNI. Les électrodes de 16 animaux sont branchées au boîtier d'acquisition.

Pendant les expérimentations, un ou plusieurs valvomètres sont utilisés. Les huîtres équipées peuvent être réparties dans les différents bacs, mélangées aux huîtres non équipées, selon les protocoles expérimentaux (Figure II 5).

4.1.2. Études sur le terrain

Sur le terrain, les données sont récupérées par une première carte électronique analogique, contenue dans un dispositif waterproof immergé. Cette première carte est connectée par un câble ombilical à une seconde carte émergée. Un transfert quotidien des données depuis le terrain vers le laboratoire (station marine d’Arcachon) est réalisé par le réseau de téléphonie mobile (GPRS; de l’anglais *General Packet Radio Service*). Le tout forme un système Linux embarqué. La fréquence d’acquisition est de 10 Hz, soit toutes les 1,6 secondes par individu. Les 3 valeurs (heure, numéro de l’animal et voltage) sont enregistrées à chaque acquisition.

Les 16 animaux par valvomètre sont placés dans une poche à huître, fixée sur une table pour éviter l’engasement des animaux (Figure 6). Le suivi du comportement sur le terrain a été réalisé à la jetée d’Eyrac (Gironde, France), dans le bassin d’Arcachon (latitude 44,66°, longitude -1,16°), comme site de référence non soumis à des événements d’efflorescences d’*A. minutum* (Figure II 6).

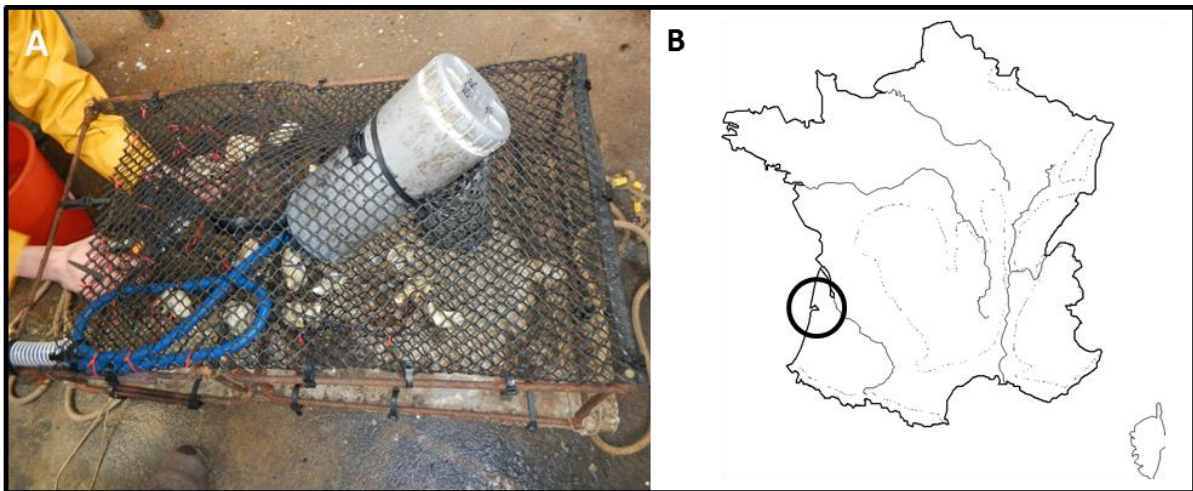


Figure II 6. Photo d’une poche à huîtres contenant les animaux équipés pour un suivi par valvométrie HFNI sur le terrain. La poche est fixée sur une table. Le dispositif waterproof (gris) contenant la première carte électronique de réception des données est immergé avec les huîtres, et relié par un câble (bleu) à la deuxième carte, émergée (A). Localisation du dispositif : bassin d’Arcachon, France (B).

4.2. Traitement des données HFNI

Les données sont traitées par un algorithme et permettent d’obtenir, chaque jour et pour chaque huître, les valeurs d’écartement valvaire en fonction du temps. Les données sont traitées manuellement à l’aide d’une application logicielle (« Play ») développée au sein du laboratoire sous LabView (National Instruments) ou par automatisation (Sow et al. 2011) sur

le site internet Molluscan Eye (<https://molluscan-eye.epoc.u-bordeaux.fr/>). Diverses analyses peuvent ensuite être conduites avec cet outil.

Les paramètres étudiés lors des expériences au laboratoire ou des études de terrain présentées dans ce document sont présentées ci-dessous. Les paramètres de durée d'ouverture, amplitude d'ouverture, et nombre de micro-fermetures sont mesurés heure par heure, individu par individu. Les paramètres journaliers sont calculés par le calcul de la moyenne des 24 données horaires de la journée. Les paramètres horaires / journaliers peuvent également être déterminés au niveau du groupe étudié, par le calcul de la moyenne des valeurs individuelles.

4.2.1. Durée d'ouverture

La durée d'ouverture valvaire est basée sur la mesure du temps que l'animal passe ouvert. Elle est établie à partir d'un seuil d'ouverture fixant l'état « ouvert » ou « fermé » de l'animal. 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 II 7).

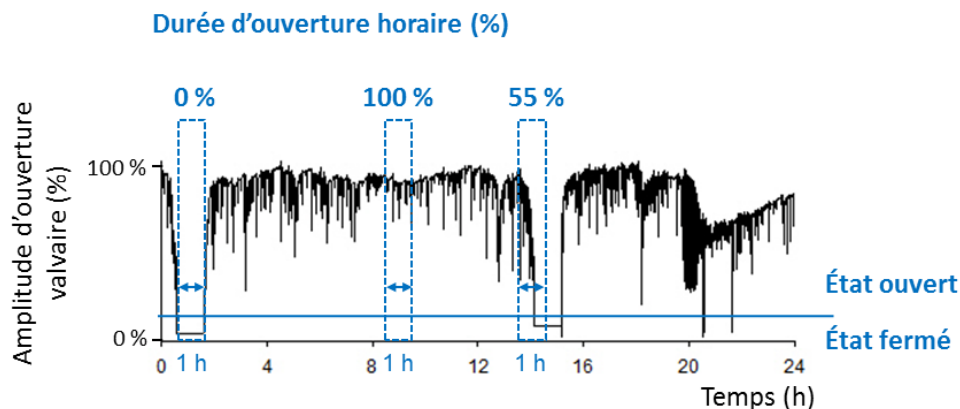


Figure II 7. Comportement valvaire d'une huître *C. gigas* pendant 24 heures. Principe de mesure de la durée d'ouverture horaire.

4.2.2. Amplitude d'ouverture

L'amplitude d'ouverture valvaire est mesurée à partir de deux valeurs : le niveau le plus bas observé pour chaque animal sur la durée de l'expérience définit la valeur 0 ; et la valeur maximale définit le 100 % d'amplitude d'ouverture. À chaque valeur d'écartement valvaire est donc associée une amplitude d'ouverture (Figure II 8).

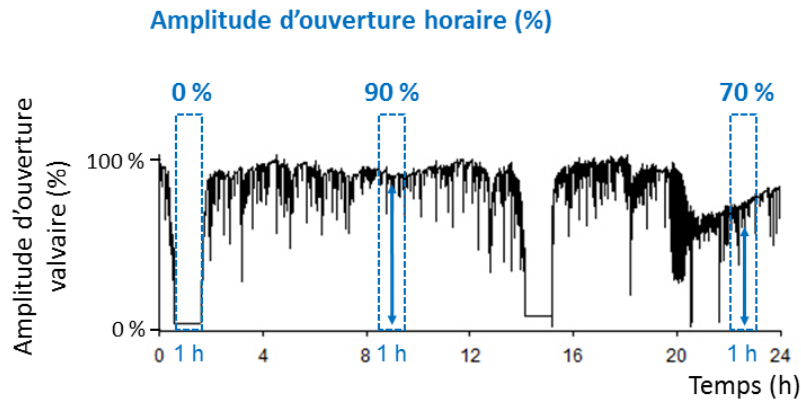


Figure II 8. Comportement valvaire d'une huître *C. gigas* pendant 24 heures. Principe de mesure de l'amplitude d'ouverture horaire.

4.2.3. Croissance

Chez les mollusques bivalves, la calcification (fabrication de la coquille) s'effectue au niveau de la cavité palléale par le manteau, donc par la surface interne des coquilles. Par conséquent, la croissance journalière se traduit par une augmentation de la distance minimale de la distance entre les électrodes (minimum d'écartement valvaire), c'est-à-dire lorsque les valves de l'animal sont closes (Figure II 9). L'index de taux de croissance peut également être calculé en divisant la croissance mesurée par le pas de temps étudié.

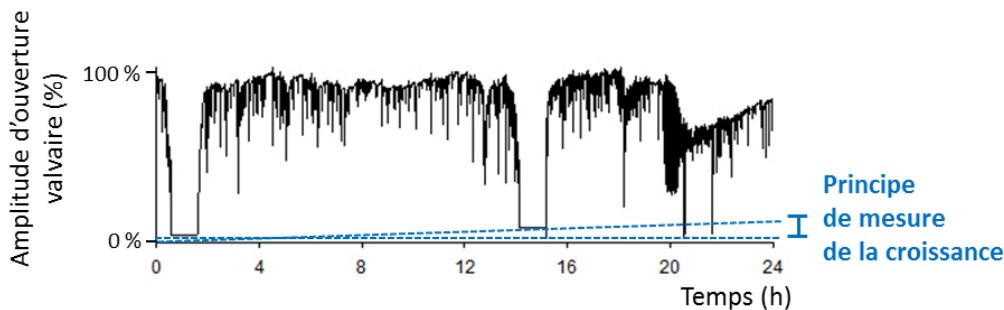


Figure II 9. Comportement valvaire d'une huître *C. gigas* pendant 24 heures. Principe de mesure de la croissance, par l'évolution du minimum d'ouverture valvaire (exagérée ici sur 24 heures).

4.2.4. Pontes

Les pontes des huîtres *C. gigas* femelles sont caractérisées par un profil très typique de fermetures brusques et réouvertures plus lentes, se succédant pendant une quinzaine de minutes (Galtsoff 1938; Nelson 1928). Via la valvométrie HFNI, la caractérisation des pontes a été décrite par (Bernard et al. 2016) (Figure II 10). Un algorithme pour l'automatisation de ces pontes a été publié par (Ahmed et al. 2016a).

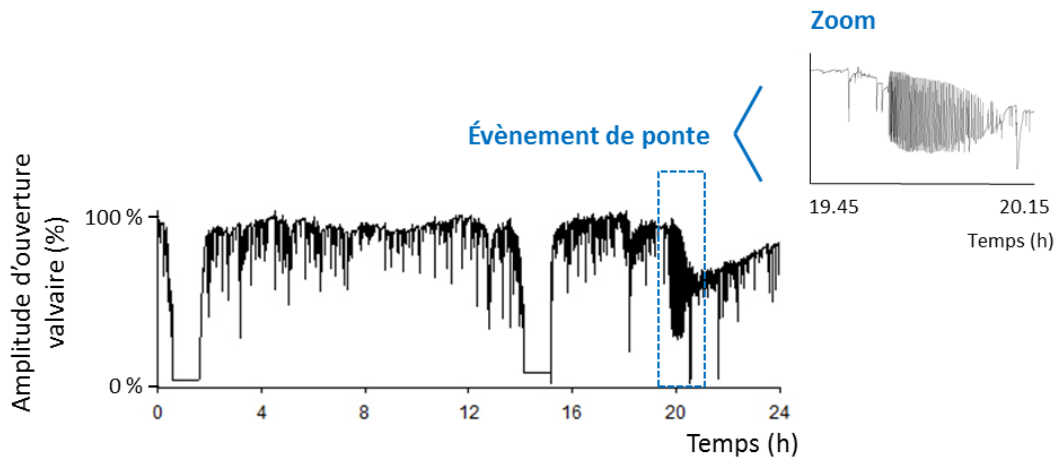


Figure II 10. Comportement valvaire d'une huître *C. gigas* pendant 24 heures. Exemple d'un évènement de ponte femelle.

5. Expression des gènes de l'horloge

Le niveau d'expression de gènes de l'horloge circadienne de l'huître *C. gigas* est mesuré par PCR (de l'anglais *Polymerase Chain Reaction*) quantitative en temps réel (RT-qPCR). Il s'agit d'une quantification relative du niveau d'acides ribonucléiques messagers (ARNm) d'intérêt, fruit de la transcription des gènes d'intérêts.

5.1. Prélèvement et conditionnement des échantillons

Cette analyse moléculaire a été effectuée sur des échantillons de branchies, individu par individu. Le plus rapidement possible après le prélèvement de l'organisme, 50 à 70 mg de tissus sont disséqués et mis en tubes avec 800 μ L de Trizol (Tri reagent, Ambion). En suivant, le tissu est broyé au FastPrep (MP Biomedicals, USA) grâce à des microbilles de silices (0.5 gr), et laissé quelques minutes à température ambiante. Cette étape permet la pénétration du Trizol dans l'ensemble du tissu. Le Trizol permet la dissociation des complexes protéiques type ribosomiques et des ARN, et ainsi de stopper l'évolution du niveau d'ARN dans les tissus. Il permet aussi d'empêcher la dégradation des ARN par des ARNases. Les échantillons sont par la suite conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

5.2. Extraction des ARN totaux

La première étape consiste à isoler l'ensemble des ARN de l'échantillon. Les ARN sont très fragiles et facilement dégradables par des enzymes (ARNases) présentes de façon ubiquiste dans l'environnement. Il est donc important de prendre les précautions nécessaires : port de

gants, nettoyage de la paillasse à l'éthanol et au « RNA away » (Molecular BioProducts), utilisation de tubes et cônes garantis « RNAses free » ou autoclavés, utilisation d'eau « DEPC » « RNAses et DNAses free » (traitée au diéthyl pyrocarbonate 0,1 %).

La méthode d'extraction des ARN utilisée est l'extraction au Trizol (Tri reagent, Ambion), conformément aux instructions du fabricant.

La décongélation des échantillons et suivie de l'ajout de 160 μL de chloroforme au mélange de tissus broyés et de Trizol. Après agitation des tubes pendant environ 45 secondes, les échantillons sont laissés à incuber pendant 5 minutes à température ambiante, puis centrifugés 15 minutes à 12 000 G et 4°C. Trois phases sont alors observées : la phase aqueuse, supérieure et limpide, qui contient l'ARN ; la phase protéique, intermédiaire et blanche ; et la phase phénolique, inférieure et rose, qui contient l'ADN. La phase aqueuse est prélevée et transférée dans un tube propre. Un ajout de 500 μL d'isopropanol, suivi d'un mélange doux par inversion, d'une incubation pendant 10 minutes à température ambiante, et d'une centrifugation pendant 15 minutes à 12 000 G et 4°C, permet la précipitation et le culottage des ARN. L'isopropanol est jeté. Le culot d'ARN lavé avec 1 mL d'éthanol à 75 % puis séché à l'air libre pendant 3 à 5 minutes. L'ARN est resuspendu et dilué dans 50 à 100 μL d'eau DEPC. Avant d'être conservé à -80°C, 3 à 4 μL par échantillon sont prélevés pour un contrôle de la qualité et la quantité d'ARN par spectrophotométrie (rapport de la densité optique (DO) à 260 nm / 280 nm).

5.3. Retro-transcription

La quantification relative des ARNm d'intérêts nécessite leur rétro-transcription en ADNc (acide désoxyribonucléique codant). La retro-transcription est effectuée sur 4 μg d'ARN total en utilisant des oligos dT 12-18 et de la reverse transcriptase du rétrovirus *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV; Promega), dans des microplaques de 96 puits.

Pour chaque échantillon, 10 μL d'ARN total à 4 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ sont mélangés à 1 μL d'oligo dT 12-18 dans un puit. Dans un puit « contrôle eau », 10 μL d'eau DEPC remplace l'échantillon. Dans des puits « contrôles échantillons », des échantillons d'ARN sont ajoutés comme dans un puit classique. Ce premier mélange est incubé à 80°C pendant 3 minutes, avant d'être immédiatement transféré dans la glace. Cette première étape permet la dénaturation de la structure tridimensionnelle des ARN et la fixation d'amorces poly T (oligo dT 12-18) sur les queues poly A des ARNm de l'échantillon.

Dans chaque puit, 5 μL de tampon 5X de M-MLV, 1 μL de dNTP 10 mM, 0,25 μL de RNAsin, 1 μL de M-MLV et 6,75 μL d'eau DEPC sont ajoutés. Le volume final de chaque puit est alors de 25 μL . Dans les puits « contrôles échantillons », la M-MLV est remplacée par de l'eau DEPC. Le tout est incubé à 37°C pendant 60 minutes. Cette étape permet à l'enzyme M-MLV de retro-transcrire les brins d'ARNm, auxquels se sont fixées les queues poly T, en ADNc. La solution de dNTP permet d'apporter les bases nécessaires à la formation des nouveaux brins. La RNAsin permet d'empêcher la dégradation des ARN par les RNAses. Elle n'est plus nécessaire à la fin des 60 minutes d'incubation. L'étape de retro-transcription

est terminée, les échantillons d'ADNc, moins fragiles que les ARN, sont conservés à -20°C. Avec une quantité initiale de 4 µg d'ARN total dans un volume final de 25 µL, la concentration estimée d'ADNc dans les échantillons est de 160 ng / µL.

5.4. PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Les réactions de RT-qPCR sont réalisées avec le kit « Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix kit » (Agilent) sur la machine MX3000P thermocycleur (Stratagene), dans un volume final de 15 µL.

5.4.1. Principe

La RT-qPCR est basée sur la quantification en temps réel de l'amplification des ADNc d'intérêts. Des amorces spécifiques à chaque gène d'intérêt permettent l'amplification de ce gène d'intérêt par la *Taq* polymérase. À chaque cycle, cette enzyme crée un brin complémentaire à chaque brin nu. Entre chaque cycle, ces brins sont séparés, pour pouvoir créer une nouvelle copie. Le SYBR Green est un agent intercalent qui s'insère dans les brins synthétisés à chaque cycle, et fluoresce dans le milieu réactionnel. La fluorescence, mesurée à 530 nm, permet le suivi en direct de l'amplification par la *Taq polymérase*. À partir du moment où une copie de chaque brin d'ADNc du gène d'intérêt initialement présent dans l'échantillon a été synthétisé, la quantité d'ADNc est doublée à chaque cycle. La production de copies d'ADNc au cours des cycles augmente alors de façon exponentielle. Le nombre de cycle nécessaire pour l'entrée dans cette phase exponentielle est appelé Ct. Plus le Ct est important, moins la quantité initiale d'ADNc d'intérêt initialement présent dans l'échantillon est importante.

5.4.2. Protocole

La RT-qPCR est réalisée sur microplaque 96 puits. Dans chaque puit, 3 µL d'échantillon d'ADNc (soit 0.48 µg d'équivalent ADNc) sont mélangés à 12 µL d'un mélange contenant les amorces sens et amorces anti-sens de l'ADNc d'intérêt (concentration finale de 0.2 µM chacune), et le mélange « SYBR » (Agilent). Ce mélange contient le tampon d'activité, la *Taq* polymérase, du MgCl₂, des dNTP et le SYBR green. Chaque RT-qPCR est constituée de plusieurs étapes : activation de la *Taq* polymérase à 95°C pendant 3 minutes, suivie de 40 cycles de dénaturation/amplification (10 secondes à 95 °C, 30 secondes à 60 °C).

5.4.3. Qualité de l'analyse

En fin de réaction, 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 (amplicon) 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 SYBER green et détermine le Tm.

Chaque échantillon est analysé par RT-qPCR en dupliquas pour chaque ADNc d'intérêt. La non reproductibilité du Ct obtenu sur les dupliquas invalide le résultat obtenu. Si la reproductibilité est validée, le calcul de l'expression relative (partie II 5.5) est réalisée sur la moyenne des Ct obtenue dans les dupliquas. De plus, les « contrôles eau » et « contrôles échantillons » issus de l'étape de retro-transcription sont également analysés. Les « contrôles eau » permettent de valider l'absence de contamination ARN pendant l'étape de retro-transcription. Les « contrôles échantillons » permettent de valider l'absence de contamination ADN dans les échantillons après l'étape d'extraction des ARN totaux. Dans les deux cas, une absence de contamination ARN ou ADN au cours des différentes étapes est validée par l'absence d'amplification par la *Taq* polymérase.

5.5. Calcul de l'expression relative

Pour chaque échantillon, le nombre de copies d'ADNc des gènes d'intérêts est quantifié relativement au nombre de copies d'un ou plusieurs gènes de référence. Des gènes dit « de ménage », c'est-à-dire ayant une fonction constitutive les amenant à être exprimés de façon constante dans un tissu, et peu à même d'être perturbés par les conditions expérimentales, sont analysés par RT-qPCR, en même temps que les gènes d'intérêts. La stabilité des Ct de ces gènes prétendants, testée sur l'ensemble des échantillons analysés déterminera ou non leur utilisation comme gènes de référence.

Dans ce travail, les gènes de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*Gadph*) et du facteur d'élongation (*Ef1*) sont testés comme gènes de références.

L'expression relative des gènes d'intérêts est calculée d'après Livak et Schmittgen (2001), par la méthode du $2^{-\Delta Ct}$, où :

$$\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt}} = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de référence}}$$

L'expression relative des gènes d'intérêts peut aussi être exprimée en terme de changement de niveau d'expression (« Fold change » en anglais, Livak et Schmittgen 2001) par la méthode de double normalisation $2^{-\Delta\Delta Ct}$, où :

$$\Delta\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt}} = \Delta Ct_{\text{gène d'intérêt}} - \text{Référence}$$

La référence utilisée pour la deuxième normalisation est alors commune au groupe d'échantillon étudié. Cette référence est par exemple la moyenne des ΔCt du gène d'intérêt sur l'ensemble des échantillons, toutes conditions confondues.

6. Séquençage haut débit du transcriptome

Le séquençage des ARNm totaux de branchies d'huître *C. gigas* a été réalisé à l'aide d'un séquenceur haut débit via une collaboration avec la plateforme génomique de la Génopole de Toulouse / Midi-Pyrénées (INRA, Auzeville, France). Les données relatives à ce séquençage sont disponibles sur la base de données ArrayExpress (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) sous le numéro d'accèsion E-MTAB-5345.

6.1. Prélèvement et conditionnement des échantillons

Pour cette analyse, les branchies de 6 huîtres diploïdes *C. gigas* ont été prélevées toutes les 4 heures pendant 13 temps de prélèvement, et ce pour 2 conditions, nommées *H.t* et *A.m* (voir Chapitre V). Le prélèvement et conditionnement des échantillons est le même que pour les analyses par RT-qPCR (voir partie II 5.1.).

6.2. Préparation des échantillons

L'extraction au Trizol (Tri reagent, Ambion) des ARN totaux est réalisée au niveau individuel selon le protocole décrit partie II.5.2. Cette étape est réalisée à la station marine d'Arcachon. Les échantillons sont ensuite envoyés par carboglace, et le reste des étapes est réalisé à la plateforme génomique de Toulouse (Génopole). La qualité est vérifiée au BioAnalyzer Agilent 210 (la valeur de RIN doit être supérieure à 8,5) et au Nanodrop (les rapports 260/230 et 260/280 doivent être supérieurs à 1,8). La quantité est également vérifiée, au Nanodrop.

Pour la préparation des 26 bibliothèques, les 6 échantillons par temps et par condition sont normalisés et « poolés » (groupés) en quantité équivalente d'ARN total, pour une quantité finale de 4 µg d'ARN total par bibliothèque. Les ARNm sont purifiés à l'aide de billes magnétiques poly-T, fragmentés, retro-transcrits, et agrémentés d'adaptateurs selon les instructions du fournisseur (Kit TruSeq Strand mRNA Sample, Illumina).

6.3. Séquençage

Le séquençage de fragments de 100 paires de bases, depuis chaque extrémité (« paired-end ») est réalisé sur 4 « pools » de bibliothèques (les fragments de chaque bibliothèques sont discriminables par la suite grâce à leur adaptateurs spécifiques), chaque pool étant séquençé sur 2 lignes de séquençage, le tout sur la même « flowcell » (support du séquençage) d'un séquenceur haut débit Illumina HiSeq 2500 (plateforme génomique, Génopole Toulouse/Midi-Pyrénées (INRA Auzeville, France)). Cela permet une grande profondeur de séquençage (nombre de fragments séquençés).

6.4. Traitement bio-informatique

Le traitement bio-informatique des données de séquençage a été réalisé en collaboration avec la plateforme bio-informatique Genotoul (MIAT, Université de Toulouse, INRA, Castanet-Tolosan, France).

6.4.1. Nettoyage des séquences

Une première étape de vérification de la qualité des fragments et de nettoyage est nécessaire, notamment pour la suppression des adaptateurs de séquençage. Cette étape est réalisée avec l'outil Trim Galore (le score Phred doit être inférieur à 20 ; trim_galore_v0.3.7).

6.4.2. Alignement

Les fragments séquencés sont ensuite alignés par le logiciel STAR (STAR_2.4.2a ; Dobin et al. 2013) sur le génome (Zhang et al. 2012) et le génome mitochondrial de *C. gigas*, disponible respectivement sur Ensembl (version 1.30) et NCBI (référence NC_001276). Les fragments qui ne s'alignent pas sont éliminés.

6.4.3. Assignement

L'assignement, ou caractérisation des fragments alignés, est réalisé par le logiciel FeatureCount version 1.4.5 (Liao et al. 2014) par rapport aux annotations des génomes de *C. gigas*. Lors de cette étape, des fragments qui par exemple sont alignés entre deux gènes, ou au niveau d'introns, sont éliminés.

On accède alors à la quantification (directe) du niveau d'expression de chaque transcrit, exprimé en cpm (compte par million), dans chaque librairie, par le comptage des fragments correspondant à chaque transcrit.

6.4.4. Filtrage

Les transcrits présentant 0 cpm dans l'ensemble des librairies sont éliminés. Les transcrits qui présentent au moins 1 cpm dans au moins une librairie sont considérés comme des transcrits à faible expression et ne sont pas éliminés.

6.4.5. Normalisation

Avant de pouvoir analyser les données de comptage, une étape de normalisation est nécessaire pour la comparaison entre les librairies. En effet, des biais sont possibles, notamment liés à une profondeur de séquençage (nombre de fragments séquencés) qui peut varier d'une librairie à l'autre, malgré la normalisation en amont des quantités d'ADNc déposées sur les lignes de séquençage.

Analyse de l'expression différentielle

Pour l'analyse de l'expression différentielle, la méthode utilisée est celle développée par Anders et Huber (2010), appelée « Relative Log Expression » (RLE), grâce à l'outil edgeR (edgeR version 3.8.6, Robinson et al. 2010).

Analyse de l'expression cyclique

L'analyse de l'expression cyclique des gènes est extrêmement sensible aux différences de profondeur de séquençage décrites précédemment (Li et al. 2015). La méthode de normalisation sélectionnée est le « down sampling ». Elle intervient en amont des étapes d'alignement et d'assignement, et consiste à fixer la profondeur de chaque librairie en fonction du nombre de fragments séquencés dans la librairie qui en possède le moins (librairie à la plus faible profondeur). Dans cette analyse, la profondeur de chaque librairie est fixée à 47 millions de fragments pour notre expérience (la profondeur reste très importante). Cette méthode représente la meilleure stratégie pour normaliser la profondeur d'analyse et accéder à la détection d'un maximum de transcrits cycliques (Li et al. 2015).

6.5. Traitement bio-statistique pour l'analyse des expressions différentielles

Cette étape du traitement bio-statistique des données de séquençage a été réalisée en collaboration avec la plateforme bio-informatique Genotoul (MIAT, Université de Toulouse, INRA, Castanet-Tolosan, France). L'analyse de l'expression différentielle est réalisée pour déterminer les gènes qui ont un niveau d'expression significativement différent d'une condition à l'autre. Pour ça les 13 librairies de chaque condition (*H.t* et *A.m*) sont considérées comme des répliques. On teste donc si le niveau moyen de chaque gène sur les 13 temps de prélèvement est différent entre la condition *H.t* et la condition *A.m*.

Le traitement bio-statistique pour l'analyse de l'expression cyclique sera présenté Chapitre II 7.2.

6.5.1. Le test statistique

La détermination des transcrits différentiellement exprimés est réalisée avec l'outil edgeR (edgeR version 3.8.6, Robinson et al. 2010). Il détermine pour chaque gène une valeur de changement de niveau d'expression (« Fold change ») dans la condition *A.m* relativement à la condition *H.t* (contrôle), et une valeur de *p*-value associée.

6.5.2. L'élimination des faux positifs

Lors de la réalisation de tests indépendants sur plusieurs milliers de gènes (par exemple 20 846 dans le cas de cette analyse différentielle) la probabilité d'erreur du test (déclarer qu'un gène est différentiellement exprimé alors qu'il ne l'est pas, calculé par la *p*-value

classique) devient trop importante. Il est nécessaire de prendre en compte le « False Discovery Rate » (FDR), c'est à dire la proportion de faux positifs dans les gènes déclarés différentiellement exprimés. Dans cette analyse, le FDR est déterminé par la méthode de Benjamini-Hochberg (Benjamini et Hochberg 1995).

6.6. L'analyse des fonctions biologiques

6.6.1. Caractérisation des transcrits

Le nom et la fonction de chaque gène correspondant aux transcrits quantifiés sont établis grâce à l'annotation du génome de référence de *Crassostrea gigas* (version 1.30) disponible sur l'outil Biomart de la base de donnée Ensembl metazoa (<http://metazoa.ensembl.org/biomart/martview/>).

6.6.2. Analyse « Gene Ontology »

Principe du « Gene Ontology »

« Gene Ontology Consortium » est un projet bio-informatique collaboratif basé sur le regroupement de plusieurs bases de données bio-informatiques. Il vise à structurer la description des gènes et de leur produit, dans le cadre d'une ontologie commune à toutes les espèces. Il définit des classes pour décrire la fonction des gènes, et les relations entre ces classes. L'outil « Gene Ontology » (GO) classe la fonction de chaque gène selon 3 aspects : « molecular function » (fonction moléculaire du produit du gène), « cellular component » (localisation cellulaire où le produit du gène est actif), « biological process » (voies et grands processus biologiques dans lesquels le produit du gène est impliqué).

La description GO des gènes peut être obtenue via l'outil Biomart de la base de données Ensembl metazoa. L'analyse des descriptions GO du jeu de données étudié, telle que la distribution des fonctions GO représentées dans le transcriptome séquencé, est réalisée grâce à l'outil Blast2GO (version 2.8).

Test d'enrichissement

Le principe du test d'enrichissement est la comparaison de la représentation des fonctions GO entre un groupe de référence (par exemple le transcriptome total) et un groupe testé (par exemple un groupe de gènes différentiellement exprimés). Il s'agit de déterminer si le groupe testé est un échantillon représentatif du groupe de référence (caractérisé par la même multitude de GO), ou si cet échantillon surreprésente significativement une ou plusieurs fonctions GO comparé au groupe de référence (il y a dans ce cas enrichissement). Cette analyse est réalisée grâce à un test de Fisher sur le logiciel Blast2GO (version 2.8).

7. Analyses chronobiologiques

7.1. Analyse statistique des données comportementales

La valvométrie HFNI permet l'acquisition d'un grand jeu de données comportementales, sur plusieurs jours d'analyses, en continu. Les données horaires, individuelles ou moyennes, de durée d'ouverture et d'amplitude d'ouverture obtenues après traitement des données brutes de valvometry HFNI permettent une approche chronobiologique du comportement de *C. gigas*.

7.1.1. Les actogrammes

Les actogrammes permettent une représentation visuelle du profil d'activité des organismes. Ils sont réalisés à l'aide du logiciel Chronos-Fit (version 1.05, Zuther et al. 2004). Chaque ligne représente l'activité de deux jours consécutifs. Pour chaque jour, l'activité moyenne horaire 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 journalière sont représentées en blanc.

1.2. Recherche et caractérisation statistique d'un rythme

Les analyses chronobiologiques sont réalisées avec le logiciel Time Series Analysis Serial Cosinor (version 6.3). Détecter un rythme implique de respecter différentes étapes : vérifier la qualité des données, déterminer la périodicité éventuellement dans le jeu de données et enfin modéliser le rythme potentiel (Gouthière et Mauvieux 2004; Gouthière et al. 2005a, 2005b).

Qualité du jeu de données

Un diagramme d'autocorrélation permet de s'assurer de l'absence de distribution aléatoire des données. Ensuite, le graphe de la fonction d'autocorrélation 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 ou physique.

Recherche de périodicité par analyse spectrale

La périodicité éventuellement présente dans le jeu de données s'étudie par analyse spectrale. Lorsque la qualité du jeu de données est validée, le périodogramme de Lomb et Scargle (Scargle 1982) est utilisé pour déterminer la période dans un jeu de données (Figure II 11). 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.

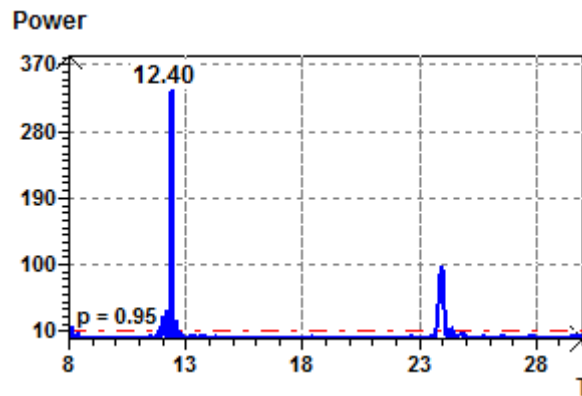


Figure II 11. Exemple d'un périodogramme de Lomb et Scargle sur des données de durée d'ouverture d'huîtres *C. gigas* sur le terrain. Deux périodes significatives sont ici déterminées: 12,4 h et 24 h. Elles doivent encore être confirmées par les étapes de modélisation et de validation statistique.

Modélisation et validation statistique

Lorsqu'une période est significative la rythmicité du jeu de données est ensuite modélisée par le modèle Cosinor, qui utilise une fonction cosinus, calculée par régression (Bingham et al. 1982; Nelson et al. 1979).

L'équation du modèle s'écrit:

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

Où : $Y(t)$ est une observation de la valeur d'activité au temps t , A correspond à l'amplitude (ampleur de variation du rythme), τ à la période du rythme, φ à la phase (moment où l'approximation du cosinus ajusté atteint sa valeur maximale), M au mésor (estimation de la moyenne statistique du rythme, moyenne du jeu de données) 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 doit être rejeté et la probabilité que l'amplitude soit nulle doit être inférieure à 0,05.

Les caractéristiques du rythme étudié sont déterminées par le modèle: acrophase, mésor 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.

7.2. Analyse bio-statistique des données de transcriptomique

Le développement récent des séquençages haut-débits a conduit au développement d'outils bio-statistiques pour l'analyse chronobiologique de ces jeux de données limités par le pas de

temps et la durée d'échantillonnage. Plus précisément, des algorithmes ont été développés pour la détermination statistique et la caractérisation de rythmes sur des données temporelles de séquençage haut-débit. Plusieurs paramètres sont déterminants pour la détection des transcrits cycliques. Les plus importants sont : le protocole d'échantillonnage (qualité, durée totale, pas de temps), la profondeur de séquençage, la normalisation des données, l'utilisation d'un algorithme adapté au protocole d'échantillonnage (Li et al. 2015).

7.2.1. Traitement bio-statistique

La détection des transcrits cycliques est réalisée grâce à l'algorithme ARSER (Yang and Su 2010) qui analyse l'expression cyclique des données par régression harmonique basée sur une estimation spectrale autorégressive. Cet outil est utilisé via la package MetaCycle (Wu et al. 2016), version 1.1.0) sur R (32-bit, version 3.2.2). Il est particulièrement adapté pour un protocole expérimental basé sur des prélèvements toutes les 4 heures pendant 52 heures (Yang and Su 2010; Wu et al. 2014, 2016). Il détermine pour chaque gène un rythme et une valeur de p -value associée. Le rythme est notamment caractérisé par une période d'oscillation et une phase (moment du pic d'expression du gène au cours du cycle). La gamme de périodes recherchées est fixée par l'expérimentateur.

L'outil jvenn (Bardou et al. 2014) est quant à lui utilisé pour la comparaison des listes de transcrits entre deux ou plusieurs groupes.

7.2.2. L'élimination des faux positifs

Comme pour l'expression différentielle (voir partie II.6.5.2.), il est nécessaire de prendre en compte le « False Discovery Rate » (FDR), c'est à dire la proportion de faux positifs dans les gènes déclarés significativement cycliques par ARSER. Pour l'élimination des faux positifs, la méthode des valeurs q est appliquée en test post-hoc sous R (Storey and Tibshirani 2003; Storey et al. 2005).

7.2.3. Les heatmaps

Les heatmaps sont une représentation visuelle du niveau d'expression des gènes dans les différents échantillons, représenté par un code couleur. Chaque case représente le niveau d'expression d'un gène dans un échantillon. Les « heatmaps cycliques » sont réalisés après l'analyse de l'algorithme ARSER, et permettent une représentation visuelle de l'expression cyclique d'un groupe de gènes. Les colonnes correspondent chacune à un temps de prélèvement et sont classées par ordre chronologique (du temps 1 au temps 13). Les lignes correspondent chacune à un gène, et sont classées selon la valeur de la phase, de la plus précoce à la plus tardive. Les données d'expression de chaque gène sont normalisées par rapport à la médiane de son niveau d'expression sur l'ensemble des 13 points, selon la formule :

$$\text{Valeur normalisée (gène X, au temps t)} = \frac{\text{Expression (gène X, au temps t)} - \text{Mediane (expression gène X, t1} \rightarrow \text{t13)}}{\text{Mediane (expression gène X, t1} \rightarrow \text{t13)}}$$

8. Interférence par ARN

8.1. Principe de l'interférence

L'interférence par ARN est un mécanisme post-transcriptionnel de mise sous silence d'un gène, décrit pour la première fois chez le nématode *Caenorhabditis elegans* par Andrew Z. Fire et Craig C. Mello en 1998 (Fire et al. 1998). En effet, ils ont découvert que l'introduction d'un ARN double brin (ARNdb) spécifique dans des cellules induit l'inactivation du gène cible par la dégradation de l'ARN messager (ARNm) endogène correspondant. Cette découverte leur a valu le prix Nobel de Médecine en 2006 (Fire 2007). Ce phénomène est un mécanisme naturel de défense contre des pathogènes ou de régulation de l'expression génétique chez de nombreuses espèces (Fire 1999). Pour la recherche scientifique, la possibilité de mise sous silence d'un gène d'intérêt a ouvert de grandes perspectives pour l'étude de la fonction des gènes.

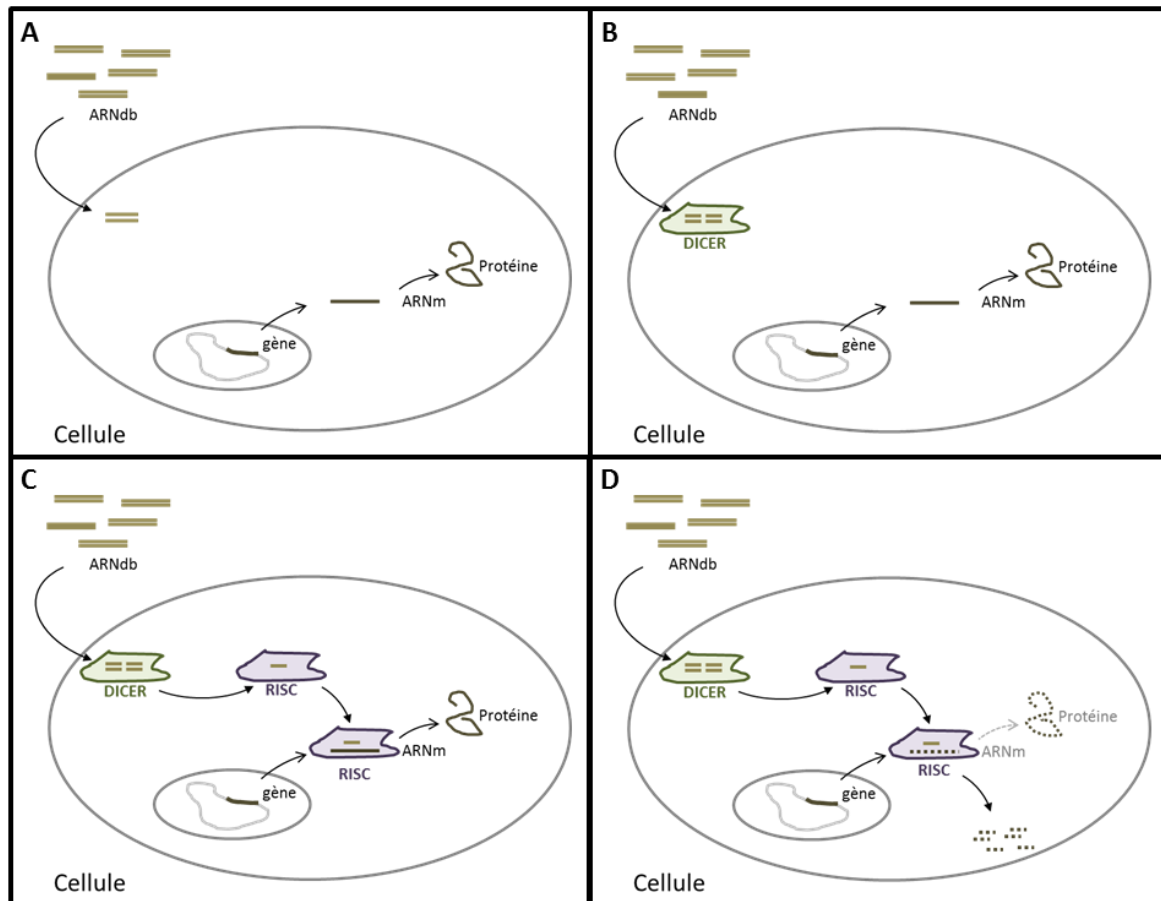


Figure II 12. Schéma de principe du mécanisme cellulaire de l'interférence par ARN.

Le principe de l'interférence par ARN est présenté Figure II 12. Le fonctionnement classique de l'expression d'un gène codant pour une protéine comprend : sa transcription en ARNm, puis la traduction de cette ARNm en protéine. Lors de l'introduction d'ARNdb dans la cellule (Figure II 12A), ils sont pris en charge par le complexe protéique DICER, qui les découpe en

petits fragments simple brin d'environ 25 nucléotides (Figure II 12B). En suivant, le complexe protéique RISC prend en charge un de ces fragments, et vient se lier à l'ARNm cible par appariement de base (Figure II 12C). L'ARNm est alors découpé et détruit par RISC, et la protéine ne peut pas être synthétisée. Le gène est mis sous silence (Figure II 12D).

8.2. Principe de la stratégie du cheval de Troie

La stratégie du cheval de Troie a été développée pour le traitement non invasif des huîtres *C. gigas* à l'interférence par ARN.

La cible de l'interférence par ARN dans ce travail est le gène *Clock* de l'huître *C. gigas*. Dans la volonté d'une approche non invasive, la voie alimentaire a été privilégiée (Timmons et al. 2001). La production d'ARNdb est réalisée par des bactéries transformées (c'est-à-dire dans lesquelles un plasmide a été intégré). Cependant, les bactéries ont une taille trop petite (environ 1 μm) pour être retenues par les branchies et amenées jusqu'à la bouche de l'huître (Cole 1982; Doucette 1995; Franca et al. 1995; Rausch De Traubenberg et Soyer-Gobillard 1990; Tosteson et al. 1989). La méthode dite « du cheval de Troie » consiste à permettre l'ingestion des bactéries transformées grâce à leur adsorption préalable à des micro-algues non toxiques *H. triquetra* (19 à 28 μm), qui elles sont très bien ingérées par les huîtres (Figure II 13).

Cette approche nécessite alors la création de bactéries capables de synthétiser des ARNdb du gène *Clock*. De plus, des huîtres contrôles sont exposées par la méthode du « cheval de Troie » à des bactéries synthétisant de l'ARNdb du gène de l'*Invertase*, un gène de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce gène n'est pas présent chez l'huître *C. gigas*, et ne pourra donc pas induire de mécanisme d'interférence.

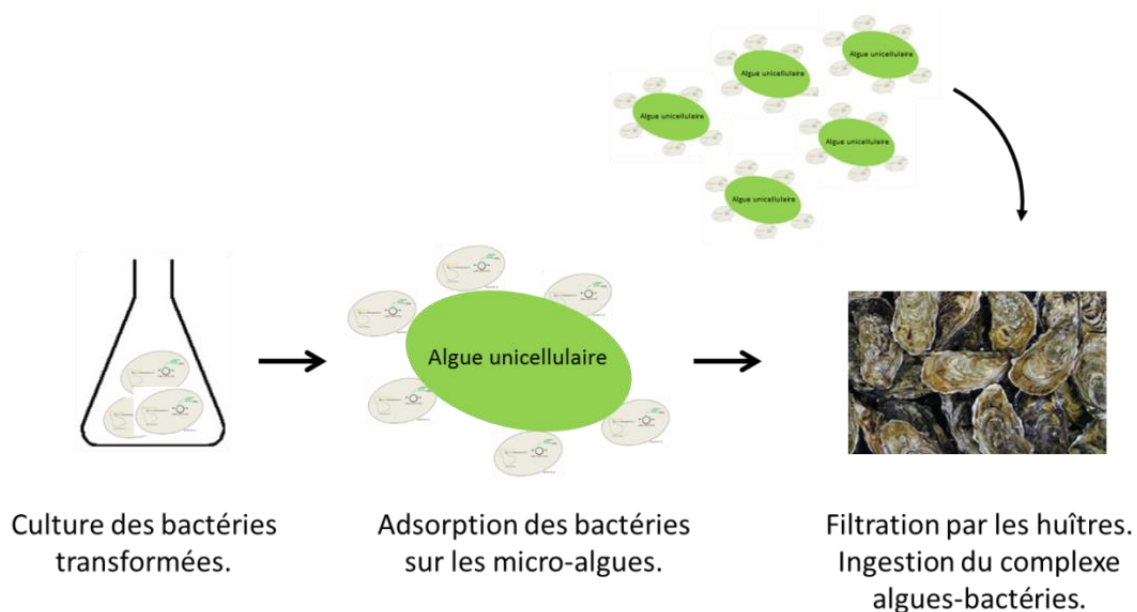


Figure II 13. Principe de la stratégie du « cheval de Troie » pour l'application de l'interférence par ARN chez le bivalve filtreur *C. gigas*.

8.3. Production d'ARN double brin par des bactéries transformées

8.3.1. Principe

Le but est de construire des bactéries capables de synthétiser des ARN double brin (ARNdb) du gène *Clock* de *C. gigas*, ou du gène *Invertase* de *Saccharomyces cerevisiae*. Les plasmides pL4440 et les bactéries *Escherichia coli* HT115 sont sélectionnés pour cette application. Les plasmides pL4440 possèdent deux promoteurs T7. Les bactéries *Escherichia coli* HT115 quant à elles sont déficientes en ARNase III et possèdent une ARN polymérase T7 sous contrôle du promoteur de l'opéron lactose. Après ligation des ADNc d'intérêt dans les plasmides pL4440 et leur intégration dans des bactéries HT115, une induction par IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) permet l'activation du promoteur de l'opéron lactose et donc la synthèse d'ARN polymérase T7 de la bactérie. L'ARN polymérase T7 vient alors se fixer aux deux promoteurs T7 qui bornent l'ADNc d'intérêt intégré dans le plasmide et synthétiser l'ARNdb correspondant. La déficience en ARNase III des bactéries HT115 empêche la dégradation des ARNdb produit par la bactérie, qui restent alors intègres. Ce mécanisme est schématisé Figure II 14.

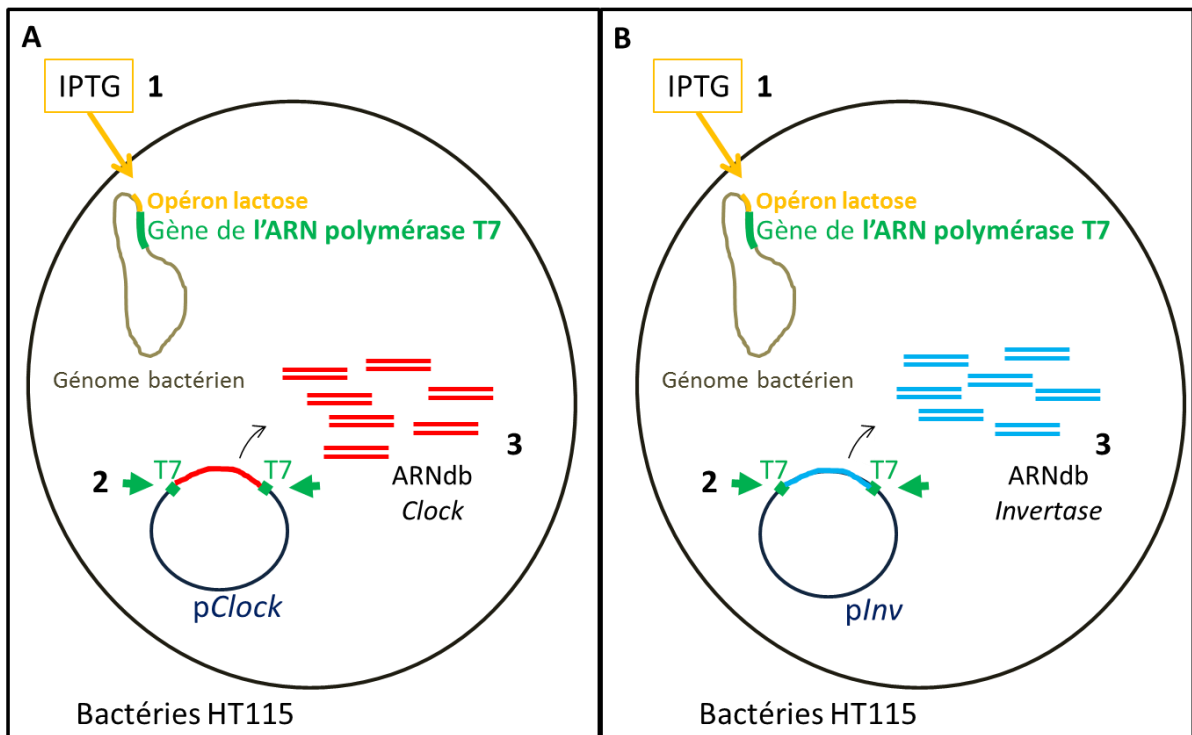


Figure II 14. Principe de la production d'ARNdb de *Clock* (A) et *Invertase* (B) par des bactéries HT115 transformées avec les plasmides pL4440 p*Clock* (ligation avec ADNc *Clock*) et p*Inv* (ligation avec ADNc *Invertase*) respectivement. L'introduction d'IPTG dans le milieu de culture (1) entraîne la production d'ARN polymérase T7 de la bactérie par activation du promoteur de l'opéron lactose. Les deux promoteurs T7 du plasmide pL4440 qui bornent l'ADNc d'intérêt permettent sa transcription en ARNdb par l'ARN polymérase T7 (3).

8.3.2. Étapes de construction

Plusieurs étapes sont nécessaires à cette construction.

Amplification des brins d'intérêts par PCR

Un fragment de 1104 paires de base (pb) du gène *Clock* de *C. gigas* (KX371073, 2031 paires de bases au total), de la position 315 à la position 1418, ainsi que le gène *Invertase* de *Saccharomyces cerevisiae* (AB495285, 1599 pb) sont amplifiés par PCR, en utilisant des amorces spécifiques, présentées dans le Tableau II 1.

Tableau II 1. Amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification des 1104 pb du gène *Clock* de *C. gigas* et du gène de l'*Invertase* de *Saccharomyces cerevisiae* par PCR.

Nom des amorces	Amorces sens	Amorces anti-sens
<i>CgClock</i> dsRNA	5'-AGCTCAGGCCCATGAAATC-3'	5'-GTCATTGTGTGCGGGAGAT-3'
<i>ScInvertase</i> dsRNA	5'-GGGCTGGATGAATGACCCAA-3'	5'-CCACATCTCCATCGTTGA-3'

Ligation des brins dans les plasmides pGEM-T et transformation de bactéries DH5α

Les fragments PCR sont par la suite purifiés et ligaturés dans des plasmides pGEM-T (Promega, Madison, USA, Figure II 15) à forte capacité de copies. Ces plasmides ont l'avantage d'être commercialisé linéarisé (T terminal aux deux extrémités 3'). La ligation est alors très simple. Elle est réalisée par incubation des plasmides avec les produits de PCR (qu'on appellera maintenant « inserts »), une ADN ligase et un tampon associé (contenant notamment des bases A, qui vont permettre la jonction entre le plasmide et les inserts). Des bactéries DH5α (Invitrogen, USA) sont transformées avec ces plasmides, c'est à dire que les plasmides sont intégrés dans le cytoplasme des bactéries. Les bactéries transformées sont ensuite sélectionnées et cultivées sur du milieu Luria-Bertani (LB) contenant 100 µg.ml⁻¹ d'ampicilline (résistance acquise par le plasmide).

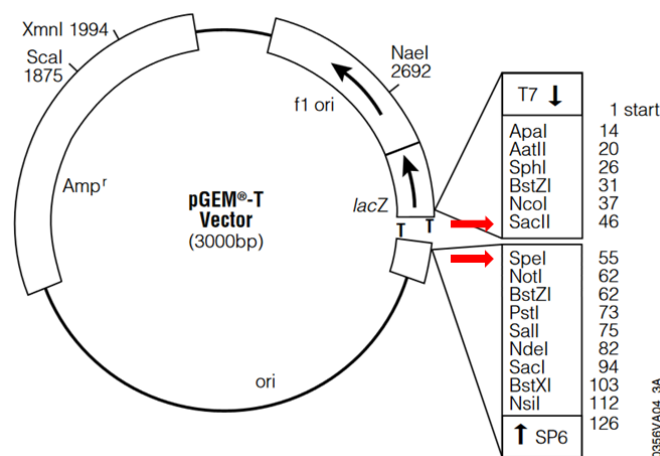


Figure II 15. Description du plasmide pGEM-T avant ligation de l'insert (Promega, Madison, USA). Les flèches rouges indiquent les futures zones de coupures enzymatiques sélectionnées (partie suivante).

Digestions enzymatiques

Les plasmides sont ensuite extraits des DH5 α , puis digérés avec les enzymes SpeI et SacII (Promega) (Figure II 15). Cette digestion vient « couper » le plasmide de part et d'autre de l'insert. L'insert est ensuite purifié après migration sur gel d'électrophorèse.

Parallèlement, le plasmide pL4440 (Addgene, Figure II 16), qui lui n'est pas initialement linéarisé, est également digéré par SpeI et SacII (Figure II 16). Cette digestion entraîne la linéarisation du plasmide, qui est ensuite purifié par migration sur gel d'électrophorèse.

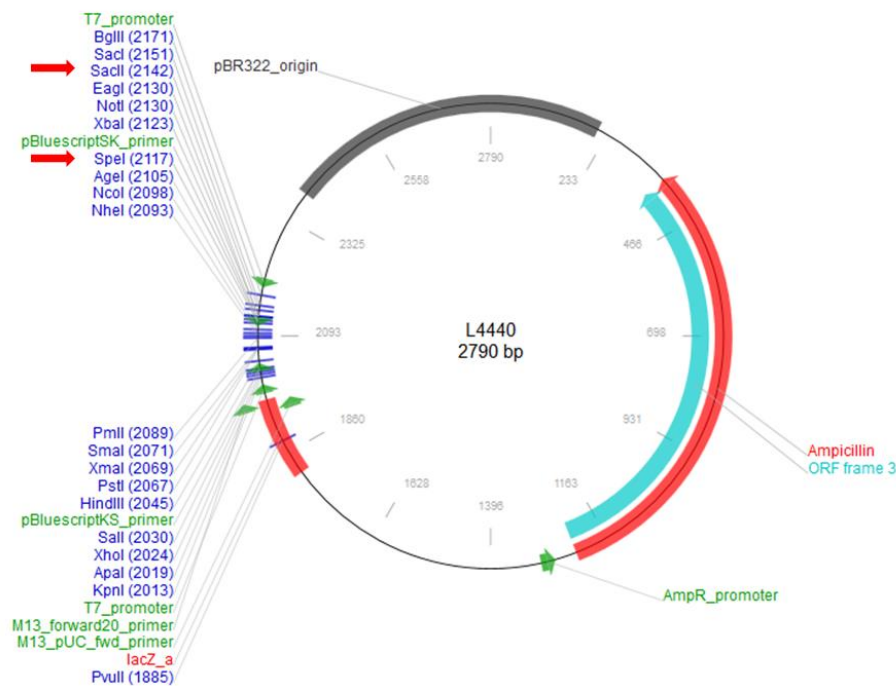


Figure II 16. Description du plasmide pL4440 avant ligation de l'insert (Addgene). Les flèches rouges indiquent les zones de coupures enzymatiques sélectionnées pour la linéarisation du plasmide.

Construction finale: ligation des inserts dans les plasmides pL4440 et transformation de bactéries HT115

La ligation des inserts et du plasmide pL4440, qui possèdent maintenant des extrémités complémentaires, peut avoir lieu, grâce à l'incubation avec une ligase. Les plasmides formés sont appelés pClock et pInv, relativement à leurs inserts respectifs : la portion de 1104 pb du gène *Clock*, et le gène *Invertase* de 1599 pb. Chacune de ces constructions est validée par séquençage, et schématisée Figure II 17. Des bactéries *E. coli* HT115 ([F⁻, mcrA, mcrB, IN (rrnD-rrnE) 1, rnc14:Tn10 (DE3 lysogen: lavUV5 promoter) -T7 polymerase]) déficientes en ARNase III sont rendues compétentes par une méthode classique utilisant du chlorure de calcium (CaCl₂), et transformées avec les constructions pClock ou pInv. Des clones

individuels sont sélectionnés sur milieu LB-agar contenant de l'ampicilline à $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (résistance acquise par le plasmide) et de la tétracycline à $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (résistance propre aux HT115) et sont testés pour valider la construction et la production efficace d'ARNdb. Pour ça, les clones sont induits avec $0,4 \text{ mM}$ d'IPTG à 37°C pendant 4 heures. Les ARN sont ensuite extraits et analysés par gel d'électrophorèse. Une bande de taille correspondante aux ARNdb *Clock* et *Inv* doit apparaître.

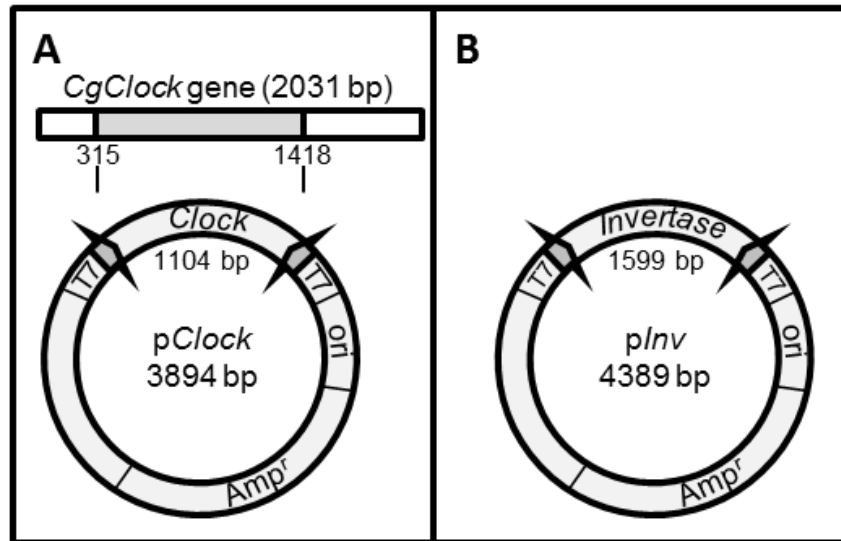


Figure II 17. Construction finale des plasmides *pClock* et *pInv* issus de la ligation des plasmides *pL4440* et des fragments *Clock* et *Invertase*. La taille des fragments et des plasmides totaux, ainsi que la position du fragment *Clock* dans le gène *Clock* de *C. gigas* sont indiqués sur le schéma.

8.4. Protocole d'administration

Le co-inoculum micro-algues / bactéries est réalisé par mélange de cultures d'algues et de bactéries en suspension à un ratio de 600 bactéries par cellule d'*H. triquetra*, pour une concentration finale d'algue de $10\,000 \text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ce co-inoculum est administré aux huîtres en continu à un débit de $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 5 jours. Pour assurer l'administration de bactéries en pleine production d'ARNdb, ce mélange est renouvelé toute les 8 heures.

Pour cela, des cultures stock sont renouvelées quotidiennement (Figure II 18A). Pour chaque co-inoculum, 7 mL de culture stock sont dilués dans 500 mL de milieu LB liquide propre, contenant de l'ampicilline ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) et de la tétracycline ($12,5 \mu\text{g}/\text{ml}$), et laissés sous agitation (220 rpm) à 37°C jusqu'à obtention d'une culture présentant une densité optique (DO) de 0,4 à 595 nm. Cette DO, obtenue après 4 heures de culture, est signe que les bactéries sont en phase exponentielle de croissance. La production d'ARNdb est alors induite par l'ajout d'IPTG ($0,4 \text{ mM}$). Après 4 heures sous agitation (220 rpm) à 37°C , les cultures sont centrifugées. Les culots bactériens rincés deux à trois fois à l'eau de mer artificielle (Instant ocean), avant d'être resuspendu dans 30 mL d'eau de mer artificielle. Une nouvelle mesure de

DO est alors réalisée à 595 nm pour calculer le volume à ajouter à la culture d'algue fraîche pour un ratio de 600 bactéries par cellule d'algue. Ce processus est renouvelé en continu pour apporter un co-inoculum frais toutes les 8 heures, comme schématisé dans le Figure II 18B. Toutes les 4 heures, une culture « t » est initiée, tandis que la culture « t - 1 » est induite à l'IPTG, et la culture « t - 2 » est prête à être mélangée aux micro-algues.

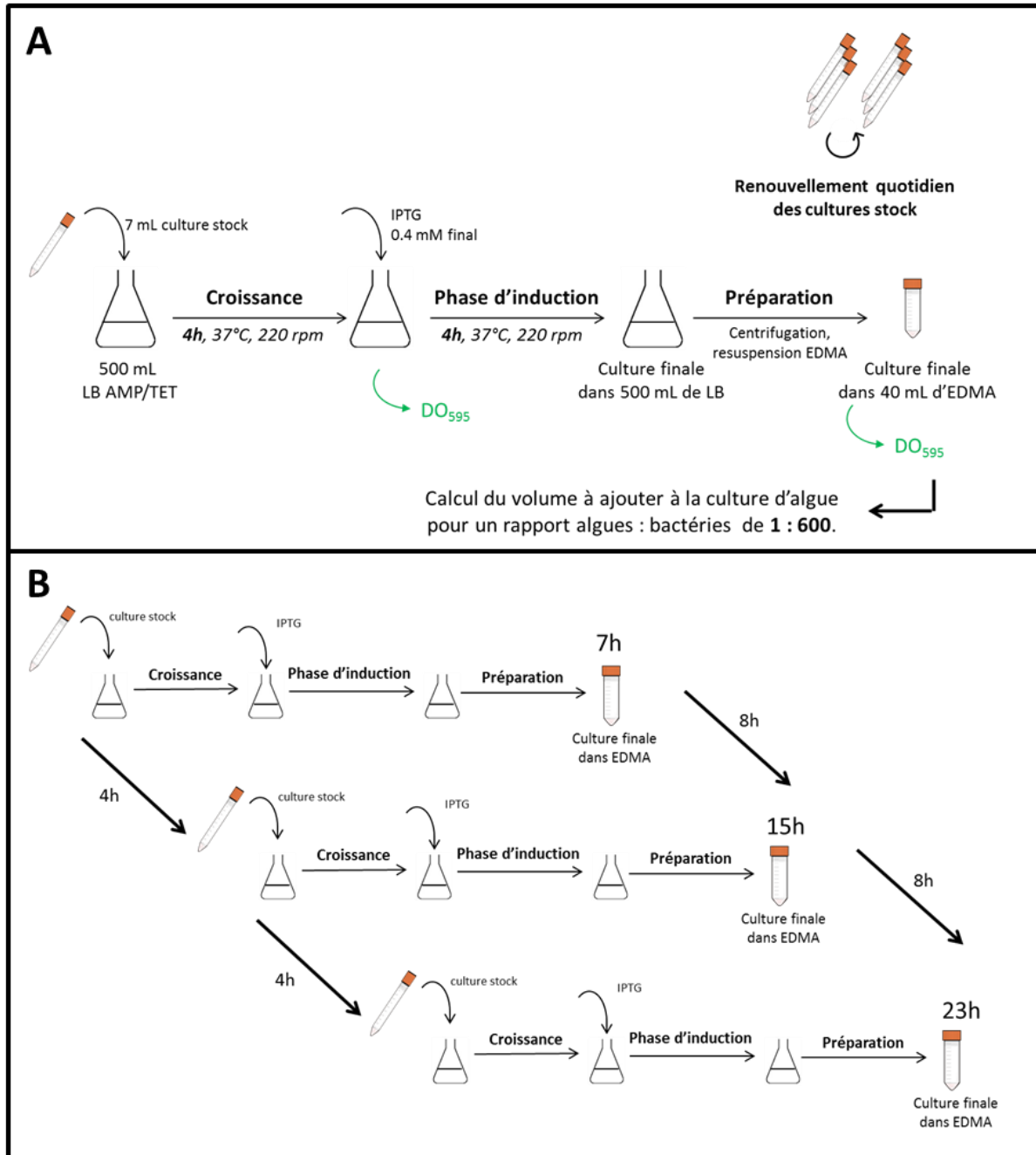


Figure II 18. Principe de cultures des bactéries productrices d'ARNdb pour leur administration aux huîtres *C. gigas* après mélange avec des micro-algues (A). Principe de la production bactérienne en continu pour un renouvellement des nourrices toutes les 8 heures (B). (EDMA : eau de mer artificielle ; LB : milieu LB ; AMP : ampicilline, TET : tétracycline.)

8.5. Discrimination entre les ARNm *Clock* endogène et les ARN double brin *Clock* introduits dans les tissus de l'huître

La finalité de la méthode du cheval de Troie est l'entrée des brins interférents (ARNdb *Clock*) dans les tissus de l'huître. La détection des ARNdb *Clock* dans les tissus étudiés (branchies) est réalisée par RT-qPCR, après extraction des ARN totaux et une retro-transcription initiée par des hexaprimers (permettant la rétro-transcription des ARNm et des ARNdb). Les amorces nécessaires à la RT-qPCR sont dessinées de façon à pouvoir discriminer les ARNdb *Clock* des ARNm *Clock* endogène (Tableau II 2 et Figure II 19). Les couples d'amorces (*CgClock*, Tableau II 2) permettent la détection du niveau endogène d'ARNm *Clock*. Elles sont dessinées en dehors du fragment *Clock* présent dans le plasmide p*Clock*, pour éviter la quantification des ARNdb *Clock* (Figure II 19). Un autre couple d'amorces (*CgClockp*, Tableau II 2) est dessiné dans le fragment *Clock* présent dans le plasmide p*Clock* (Figure II 19). Ces amorces *CgClockp* permettent la quantification des ARNdb *Clock* et des ARNm endogène du gène *Clock*. La détection des ARNdb est calculée par le ratio :

$$\frac{(\text{ARNdb } \textit{Clock} + \text{ARNm } \textit{Clock}) \text{ quantifiés grâce aux amorces } \textit{CgClockp}}{(\text{ARNm } \textit{Clock}) \text{ quantifiés grâce aux amorces } \textit{pClock}}$$

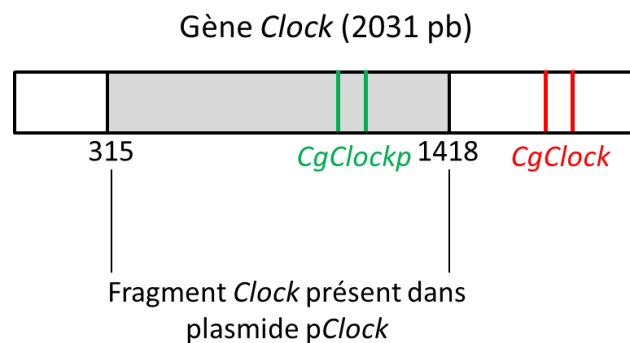


Figure II 19. Schéma de la portion codante du gène *Clock* de *C. gigas* (2031 paires de bases). La position du fragment inséré dans le plasmide p*Clock*, correspondante aux ARNdb produits, ainsi que les positions des amorces *CgClockp* et *CgClock* sont également schématisées.

Tableau II 2. Séquences des amorces de RT-qPCR et position (paire de bases) dans le gène *Clock* des amplicons quantifiés.

Nom des amorces	Séquences des amorces	Position amplicon dans le gène
<i>CgClock</i> -sens	5'-TGGGAATGATGTCCAACAGAG-3'	1553 → 1799
<i>CgClock</i> -anti-sens	5'-GGTCCATCAATGACAGGAAGT-3'	
<i>CgClockp</i> -sens	5'-CGCTACTACATAACGTACCATCAG-3'	1084 → 1175
<i>CgClockp</i> -anti-sens	5'-TGTTCTCTAACATCGGCATAGC-3'	

Chapitre III

**Étude *in situ* des rythmes des huîtres
C. gigas diploïdes et triploïdes.**

**Effet de la ploïdie sur le
comportement saisonnier.**

1. Préambule

Le premier objectif de mon travail de recherche est d'évaluer l'implication des rythmes biologiques dans le déterminisme de la bioaccumulation de toxines PSP chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Pour cette approche, la comparaison des huîtres diploïdes et triploïdes sert de sujet d'étude. J'émetts l'hypothèse que la différence de ploïdie pourrait modifier les rythmes biologiques chez l'huître *C. gigas* et être à l'origine des différences d'accumulation de toxines PSP précédemment observées entre les huîtres diploïdes et triploïdes (Haberkorn et al. 2010a; Guéguen et al. 2012).

L'objectif de ce premier travail est alors d'étudier si la ploïdie (*i.e.* le nombre de copies de chaque chromosome) des huîtres impacte le comportement des huîtres *in situ* et sa synchronisation avec les facteurs environnementaux. Je me suis particulièrement intéressée à l'impact de l'évolution annuelle de la photopériode sur le comportement et la chronobiologie des huîtres, en fonction de leur ploïdie. J'ai regardé en particulier si au cours de l'année les rythmes nycthémeraux, tidaux et lunaires pouvaient s'exprimer différemment entre les huîtres diploïdes et triploïdes.

Une précédente analyse chronobiologique réalisée à partir d'une année de suivi en continu du comportement *in situ* d'huîtres *C. gigas* diploïdes a permis de mettre en évidence une très forte relation entre la durée d'ouverture valvaire des huîtres et les multiples cycles environnementaux auxquels elles sont soumises (Tran et al. 2011). Le comportement des huîtres en conditions subtidales (immergées en permanence) est en premier lieu relié au cycle tidal d'alternance des marées (12,4 h), et modulé par le cycle semi-lunaire (*neap-spring tidal cycle*), ainsi que par le cycle lunaire anomalistique. Un rythme synchronisé par l'alternance du jour et de la nuit (24 h), est également présent dans le comportement d'ouverture de l'huître, mais plus faible que le rythme tidal (Tran et al. 2011). Parallèlement, des études récentes au laboratoire ont montré que la synchronisation entre l'huître *C. gigas* et son environnement dépend d'un mécanisme horloger endogène circadien (Mat et al. 2012; Perrigault and Tran 2017).

Nous savons aujourd'hui que les organismes vivants intègrent les changements annuels de photopériode, beaucoup plus fiables et prédictifs que les variations de température ou de nourriture, pour anticiper les variations saisonnières et mettre en place une programmation physiologique et comportementale adaptée (Wood and Loudon 2014). Chez les huîtres *C. gigas*, une variation annuelle de la modalité du rythme circadien a été observée (*i.e.* nocturne l'automne-hiver et diurne printemps-été) (Mat et al. 2012). Il s'agit à ma connaissance de la seule variation saisonnière de l'activité valvaire des huîtres décrite à ce jour. Par ailleurs, il est aujourd'hui bien décrit qu'un grand nombre de processus physiologiques de l'huître s'organisent à l'échelle annuelle autour du cycle saisonnier de gamétogénèse, qui débute pendant l'hiver et se terminant au moment des pontes en été (Chávez-Villalba et al. 2002; Ren et al. 2003; Fabioux et al. 2005; Enríquez-Díaz et al. 2009). Les huîtres triploïdes en revanche, sont commercialisées car elles présentent une gamétogénèse réduite et une vitesse

de croissance plus rapide, avec par ailleurs un déterminisme moléculaire peu compris (Nell 2002a; Osborn et al. 2003). Jusqu'à présent, aucune étude n'a encore été réalisée sur l'impact de la triploïdie sur le comportement valvaire des huîtres et sa synchronisation par les facteurs environnementaux.

Dans cette étude, le comportement d'huîtres diploïdes et triploïdes placées *in situ* en conditions subtidales dans un site non contaminé par *A. minutum* (jetée d'Eyrac, Arcachon) a été enregistré à haute fréquence et de manière non invasive pendant une année entière grâce à un suivi par valvométrie HFNI. J'ai alors analysé l'effet de l'évolution annuelle de la photopériode chez les deux types d'huîtres sur : la durée et l'amplitude d'ouverture valvaire, les rythmicités journalières, tidales et lunaires, la croissance, et les évènements de pontes. Pour cela, la photopériode au cours de l'année a été caractérisée selon deux variables qualitatives : le sens d'évolution de la durée d'ensoleillement (« croissant » ou « décroissant »), et la durée d'ensoleillement (« courte », *i.e.* inférieure à 12 heures ; ou « longue », *i.e.* supérieure à 12 heures). Parallèlement, un suivi de l'évolution annuelle de la gamétogénèse pour quantifier son évolution chez les diploïdes et les triploïdes a également été réalisé sur des huîtres provenant du même lot que les huîtres équipées pour la valvométrie.

2. Article: How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*

Laura Payton^{1, 2}, Mohamedou Sow¹, Jean-Charles Massabuau^{1,2}, Pierre Ciret^{1,2},
Damien Tran^{1,2*}

¹University of Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France

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

* to whom correspondence should be addressed. UMR 5805 EPOC, Place du Dr Peyneau, 33120, Arcachon, France. E.mail: d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr. Tel: +33 562239237

En révision à Plos One

Abstract

In this work, we study if ploidy (*i.e.* number of copies of chromosomes) in the oyster *Crassostrea gigas* may introduce differences in behavior and in its synchronization by the annual photoperiod. Diploid oysters' *C. gigas* have physiological processes largely organized as a function of their annual gametogenesis cycle. On the contrary, triploid oysters have been selected to reduce gametogenesis activity and favor growth for commercial needs. To answer to the question about the effect of the seasonal course of the photoperiod on the behavior of *C. gigas* according to its ploidy, we quantified valve activity by HFNI valvometry *in situ* for 1 year in both diploid and triploid oysters. We did a chronobiological analysis of daily, tidal and lunar rhythms according the annual change of the photoperiod. In parallel, we measured growth, gametogenesis status and detected spawning events by valvometry. The results showed that triploids had reduced gametogenesis, without spawning events, and approximately three times more growth than diploids. These differences in physiological efforts could explain the result that photoperiod (daylength and/or direction of daylength) differentially drives and modulates seasonal behavior of diploid and triploid oysters. Most differences were observed during long days (spring and summer), where triploids showed longer valve opening duration but lower opening amplitude, stronger daily rhythm and weaker tidal rhythm. During this period, diploids did major gametogenesis and spawning whereas triploids did maximal growth. Differences were also observed in terms of moonlight rhythmicity and neap-spring tidal cycle rhythmicity. We suggest that the seasonal change of photoperiod differentially synchronizes oyster behavior and biological rhythms according to physiological needs based on ploidy.

Introduction

Valve opening activity in many bivalves species is closely related to physiological processes such as respiration, nutrition, and reproduction, which are modulated by environmental parameters (García-March et al. 2008; Jou et al. 2013). As a marine organism, valve behavior of the oyster *Crassostrea gigas* is driven in its biotope by the multiple environmental cycles linked to periodical recurrence of sun-earth-moon orbital positions (Tran et al. 2011). Specifically, valve opening duration of permanently immersed diploid oysters follows a strong tidal cycle, modulated by synodic moon cycles (neap-spring tides) and anomalistic moon cycles (based on moon - earth distance) (Tran et al. 2011). However, until now no moonlight effect has been shown in diploid oysters. Additionally, a circadian clock was demonstrated in *C. gigas*, synchronizing with the daily solar cycle to run at 24h (Tran et al. 2011; Mat et al. 2012; Perrigault and Tran 2017a). This circadian clock allows the anticipation of light / dark alternation, and an internal temporal organization of biological processes (Tran et al. 2015; Perrigault and Tran 2017a). In situ, the daily rhythm of subtidal oyster behavior was less expressed than the circatidal rhythm (Tran et al. 2011).

The year, a far-reaching environmental cycle of about 365 days caused by the earth's revolution around the sun, is reflected by an entirely predictable annual change of photoperiod at any given latitude and leads to seasonal changes in the environment. Temporal coordination with annual cycles is crucial for the maintenance of fitness in organisms, as seasonality commonly implies alternations in the availability of conditions that are conducive to growth and gametogenesis (Stevenson et al. 2015). It is now well documented that some species exhibit an endogenous circannual rhythm, synchronized by photoperiod, in which the circadian clock should provide a reference clock for the reading of calendar information (Foster and Kreitzman 2009; Visser et al. 2010; Helm et al. 2013). Seasonal cycles are observed in the Pacific oyster, *C. gigas*, especially the widely described reproductive cycle (Chávez-Villalba et al. 2002; Ren et al. 2003; Fabioux et al. 2005; Enríquez-Díaz et al. 2009). Others biological processes such as immune parameters, catecholamine levels, growth, metabolism or biochemical content also show seasonal variations (Brown 1988; Osada and Nomura 1989; Ren et al. 2003; Fabioux et al. 2005; Mao et al. 2006; Duchemin et al. 2007; Dridí et al. 2007). However, the importance of seasonal cycles in shaping valve behavior is globally unknown. A previous study highlighted a dualism in the circadian rhythm of valve opening duration, characterized by a switch from nocturnal valve activity in autumn and winter to diurnal activity in spring and summer (Mat et al. 2012). Switches happened in the field and laboratory, where animals were disconnected from field conditions, suggesting an internal origin for this annual rhythm (Mat et al. 2012). Thus, seasonal oscillations would come from oysters themselves, which would be sensitive to photoperiodic information to synchronize a putative endogenous circannual rhythm, leading to synchronized seasonal biology.

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* has been widely introduced and dominates bivalve production for human consumptions in many regions (FAO 2016a, 2016b; Herbert et al. 2016). A common method of increasing commercialization and production of this marine mollusk is induced triploidy, a physiological status in which organisms have three sets of

chromosomes as opposed to the normal two sets in diploids. Triploidy mainly confers reduced gonadic development, hence it facilitates commercialization over the summer, and faster growth (Allen and Downing 1986; Nell 2002b; Garnier-Gere et al. 2002; Normand et al. 2009; Jouaux et al. 2010; Suquet et al. 2016). The molecular mechanisms by which polyploidy contributes to novel phenotype variation are not well understood. The augmented genetic material in triploids can lead to increased heterozygosity, as well as potential genome rearrangements or modifications of repeated elements, and thus possibly novel forms of regulation of gene expression and modification of transcription (Hawkins et al. 2000; Osborn et al. 2003; Riddle et al. 2006; Birchler et al. 2007). In *C. gigas*, triploidy led to modification in immune parameters, in lipid content, or in toxin bioaccumulation during harmful algae bloom exposure (Allen and Downing 1986; Nell 2002b; Duchemin et al. 2007; Haberkorn et al. 2010a). Moreover, triploids appeared less sensitive to environmental cues concerning seasonality of immune parameters (17). Despite their wide use, however, triploid oyster behavior in the ecosystem is not known and the impact of triploid status on valve behavior and its synchronization with environmental factors remains to be elucidated.

In the present study, the first aim was to further understand seasonal valve activity behavior of *C. gigas* including how it is shaped by photoperiodism and lunar cycles. Then, we aimed to analyze if triploid status could modify oyster behavior and its synchronization with environmental cycles. For that, we took advantage of the high-frequency noninvasive valvometry technique that allowed one full year of continuous recording of *in situ* animal valve movements without any human intervention (Andrade et al. 2016).

Thanks to this technique, we analyzed the seasonal course of photoperiod in the environment on several behavioral parameters including: valve opening duration and amplitude; daily, tidal and lunar month rhythmicity; growth index; and spawning events in the Bay of Arcachon (France) in subtidal conditions.

Materials and methods

Animals

The study was carried out on 104 diploid and 104 triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* comparable in shell length (65.8 ± 2.0 mm, 24 months-old and 66.6 ± 1.4 mm, 18 months-old, respectively), both purchased in February 2014 from oyster farmers in front of the Marine Station at the Bay of Arcachon (S.W. France). Diploid oysters were collected by the farmers from natural settlements and triploids were purchased by the farmers from a commercial hatchery which used many diploids (≈ 200 females) and quadriploids (10 males) parents, and thus limited parenting effect. The oysters were positioned in the field site (Eyrac Pier, Bay of Arcachon, latitude 44.66° , longitude -1.16°) on February 14, 2014 in the proximity of wild oysters. They were in permanently immersed oyster bags (1×0.5 m) fixed on an oyster table for valvometry measurement and in two oyster bags (one for diploids and one for triploids) suspended from a chain, for morphogenesis and gametogenesis monitoring at ≈ 0.4 m above the seafloor. The oysters were always in subtidal conditions, at a minimum water depth of ≈ 1 m. The tides were semidiurnal, *i.e.* 2 tides per day, with an amplitude maximal ± 2.4 m and a

maximal tidal flow at mid-tide reaching $\approx 0.5 - 0.6 \text{ m.s}^{-1}$ (Bernard et al. 2016). The astronomical data related to the sun, earth, and moon positions were provided from the site www.imcce.fr.

All experiments presented in this paper complied with the laws in effect in France, where they were performed, and they conformed to international ethical standards.

Morphogenesis and gametogenesis monitoring

Sixteen diploid oysters and 16 triploid oysters were followed for morphogenesis monitoring throughout the 1-yr study. Shell high, shell length, and total fresh body weight were measured prior to positioning in the field site, and 7 times (14/02/14, 17/03/14, 12/05/14, 16/07/14, 11/09/14, 04/11/14, and 08/01/15). Additionally, oyster gametogenesis was estimated by gonad observation after sacrifice for 10 diploid and 10 triploid oysters at each time. Gametogenesis status was according to the scale of Marteil (Marteil 1976). This scale ranges from 0 to 3 where level 0 corresponds to an absence of gonads by visual inspection and level 3 to the most advanced level of gonadal development just before spawning. An additional observation date was added after the first spawning event, 29 July 2014.

Photoperiod

Photoperiod is the predictable annual change of daylength throughout a year (Fig1A). The four seasons caused by the earth's revolution around the sun at any given latitude are delimited by the predictable events of equinoxes and solstices. The spring and autumn equinoxes, when day and night are the same length (12 L / 12 D), marks the beginning of spring and autumn, the 20th of March 2014 and the 21st of September 2014, respectively. The longest day duration is reached at the summer solstice and marks the beginning of summer, the 21st of June 2014. The shortest daylength is reached at the winter solstice and marks the beginning of winter, the 20th of December 2014. Thus, for each season, photoperiod is characterized by two parameters. The first one is the daylength, described in this study as “long” when day is longer than night (*i.e.* photophase > 12 h, in spring and summer) and “short” when day is shorter than night (*i.e.* photophase < 12 h, in autumn and winter). The second one is the direction of daylength: increasing (winter and spring) or decreasing (summer and autumn) photoperiod.

High-frequency noninvasive (HFNI) valvometry

The *in situ* valve movement behavior of the bivalves was recorded using a high-frequency noninvasive (HFNI) valvometer technology, described by (Tran et al. 2003, 2011). Briefly, a pair of lightweight electrodes designed to minimize disturbance to bivalve behavior, were glued on each half shell (Fig 1B). Between the electrodes, an electromagnetic current was generated, which allowed measurement of the amount of valve opening and closing. The signal was recorded using a custom acquisition card every 0.1 s. Because 16 oysters were

monitored, each oyster was measured every 1.6 s and the data were automatically transmitted daily to a data processing center in the Arcachon Marine Biological Station (France) using cellular and Internet networks and were reported daily on the Molluscan Eye website (<http://molluscan-eye.epoc.u-bordeaux1.fr/>).

The present study analyzed data from 20 March 2014 (Spring Equinox 2014) to 19 March 2015 (Spring Equinox 2015), on 8 diploid and 8 triploid oysters. During this 1-y analysis, two periods of missing data occurred: from 21 to 31 July 2014 (11 days) and from 6 to 14 October 2014 (9 days), due to electrical issues.

HFNI valvometry data treatment

Valve opening amplitude and valve opening duration.

Each day of the year, individual valve opening amplitudes of each oyster were reported (Fig 1C). Then, on an hr-per-hr and individual basis, two parameters were reported: the amount of time the valves of each oyster were open, called valve opening duration (VOD, %); and the amplitude of the opening (relatively to maximum opening), called valve opening amplitude (VOA, %) (Fig 1C). A mean VOD of 100% meant that the valves of the animal were open during the entire 1 hour period and 0% that the valves were closed during the entire hour. A VOA of 100 % meant that the valves of the animal were maximally opened for the 1 hour period and 0 % that valves were closed during the entire 1 hour. Individual hourly VOD and VOA were averaged based on ploidy status (diploid *vs* triploid). Daily VOD and VOA values were the result of the average of the 24 hours of each day. A chronobiological analysis was performed every 15 days, according to the moon Neap Spring Tidal cycle (*i.e.* new moon to full moon or full moon to new moon), dividing the 365 days of data into 25 parts.

Growth index.

In bivalve mollusks, calcification takes place in the mantle cavity, over the shell's internal surface. As a result, the consequence of daily growth was an increase in the minimal distance between electrodes when valves were closed, *i.e.* the minimum valve opening amplitude (min) (schematized in a one day record in Fig 1C). Thus, growth index was calculated individually by isolating daily values for minimum valve opening amplitude, and then averaged according to ploidy status (diploid *vs* triploid). For each 15-day analysis, mean growth index was set to 0 on day 1. The growth rate index was calculated as follow: $\Delta \text{min} (\text{day } x_{[1-15]} - \text{day } 1)$ of distance between electrodes / $\Delta \text{duration} (\text{day } x_{[1-15]} - \text{day } 1)$.

Spawning events.

Spawning events of female oysters have already been characterized by HFNI valvometry (Bernard et al. 2016; Ahmed et al. 2016b). Briefly, female spawning corresponds to a typical pattern of valve movement comprising a burst of rhythmic valve closures, which males do not show (Nelson 1928; Galtsoff 1938) . The beginning of a spawning event was considered as the beginning of the first adductor muscle contraction in a burst.

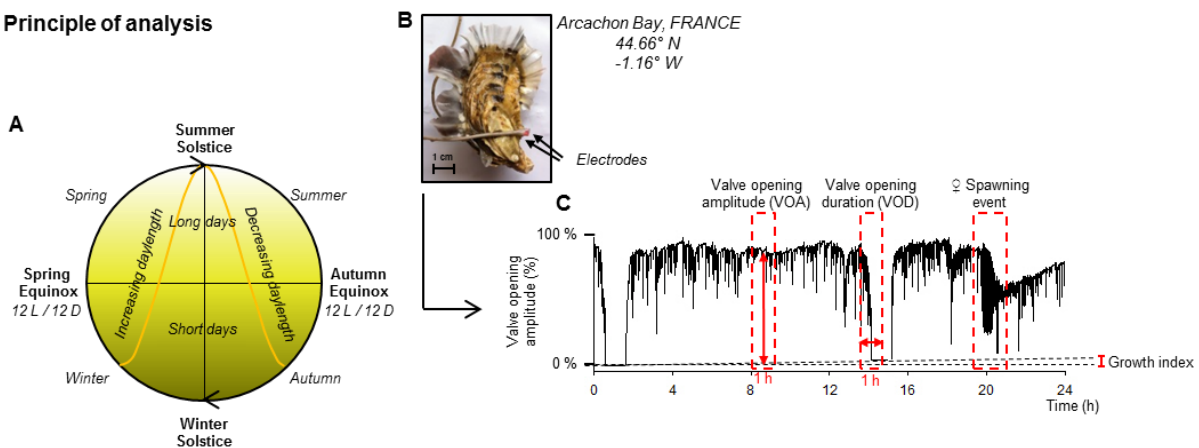
Principle of analysis


Figure 1. Principle of analysis. A. Schematic representation of an annual cycle where seasons are characterized by two photoperiod parameters: daylength (long or short days) and direction of daylength (increasing or decreasing daylength). L for light, D for dark. B. Example of light electrodes of high frequency non-invasive valvometry glued to one of the triploid oysters deployed in Arcachon bay (France), for the one-year recording in the field. The black arrows indicate the position of the electrodes glued on opposite edges of the shells. Only the electrode glued on the superior valve is apparent in this picture. C. Typical records of valve opening behavior of *Crassostrea gigas* during a one-day period (24 h). Four parameters were used in this study: hourly valve opening amplitude (VOA), hourly valve opening duration (VOD), spawning events and growth index corresponding to evolution of minimum valve opening over time (schematized in the one-day period in this figure).

Chronobiological analysis
Actograms

Double-plotted actograms were produced with Chronos-Fit 1.05, starting at 20:00 h. Each line represented 2 days (365 lines in our case). By convention, each 2-day period was first represented from 24 to 48 h, and then repeated on the next line from 0 to 24 h. The black and white sections of each line represent hourly behavioral values above and below the mean behavior of the day, respectively.

Statistical chronobiological analyses

Chronobiological analyses were performed using the software Time Series Analysis Seriel Cosinor 6.3. Several steps were required to validate a significant rhythm (Gouthière and Mauvieux 2004; Gouthière et al. 2005a, b).

Quality of the data set.

The absence of random distribution in the data set was controlled using an autocorrelation diagram, and the absence of a stationary phenomenon by a partial autocorrelation function calculation (Box et al. 1994). These checks indicated a real biological or physical phenomenon.

Search for periodicity.

The Lomb and Scargle periodogram was used to determine the period in the equispaced data (Scargle 1982). To be accepted, a period needed to be significant with the Lomb and Scargle periodogram ($p = 0.95$).

Modeling and statistical validation.

Rhythmicity was modeled with the Cosinor model, which uses a cosine function calculated by regression (Nelson et al. 1979; Bingham et al. 1982). For a given period, the model is written as: $Y(t) = A \cos(\pi t/\tau + \phi) + M + \varepsilon(t)$, where A is the amplitude, ϕ the acrophase, τ the period, M the mesor and ε the relative error (Gouthière and Mauvieux 2004; Gouthière et al. 2005a). Two key tests validated the calculated model and the existence of a rhythm: the elliptic test (Bingham et al. 1982) had to be rejected and the probability for the null amplitude hypothesis had to be <0.05 . A chronobiometric parameter was calculated: the percent rhythm (PR, %), which is the percentage of cyclic behavior explained by the model. Rhythms with different periods might be superimposed on a single dataset. For 15-day data, we analyzed the first two periods expressed by the oysters: tidal rhythm ($\tau = 12.4$ h) and daily rhythm ($\tau = 24$ h). For 1-yr data, moonlight effect ($\tau = 29.53$ d) and Neap-spring tidal cycle ($\tau = 14.76$ d) of the lunar synodic cycle was analyzed.

Statistical analyses

Results were expressed as mean \pm 1 SE. Three-way analyses of variance (ANOVA) were performed after checking assumptions (normality of data and homoscedasticity of the error term). In case of significant differences, Student-Newman-Keuls method was applied for all pairwise multiple comparisons. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks and Mann-Whitney rank sum test were applied for multiple comparisons and for two group comparisons respectively when data failed normality tests. Paired t-tests were used after checking assumptions (normality of data) for seasonal comparison of diploid and triploid rhythms. For all statistical results, a probability of $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using Sigma Plot software (Version 13.0; Systat Software, USA).

Results

Valve opening duration and valve opening amplitude

Figure 2A1 shows the mean daily valve opening duration (VOD, %) of diploid and triploid oysters from spring equinox 2014 to spring equinox 2015. At the annual scale, a three-way ANOVA showed no global ploidy effect on daily VOD (Fig 2A2). However, there was a significant ploidy effect during long days (spring and summer), which disappeared during short days (autumn and winter). Triploid oysters were open for a longer daily duration than diploid during long days. Furthermore, the three-way ANOVA interactions showed that both daylength (short days vs long days) and direction of daylength (increasing vs decreasing photoperiod) significantly influenced daily VOD in all oysters (Fig 2A2). Valve opening

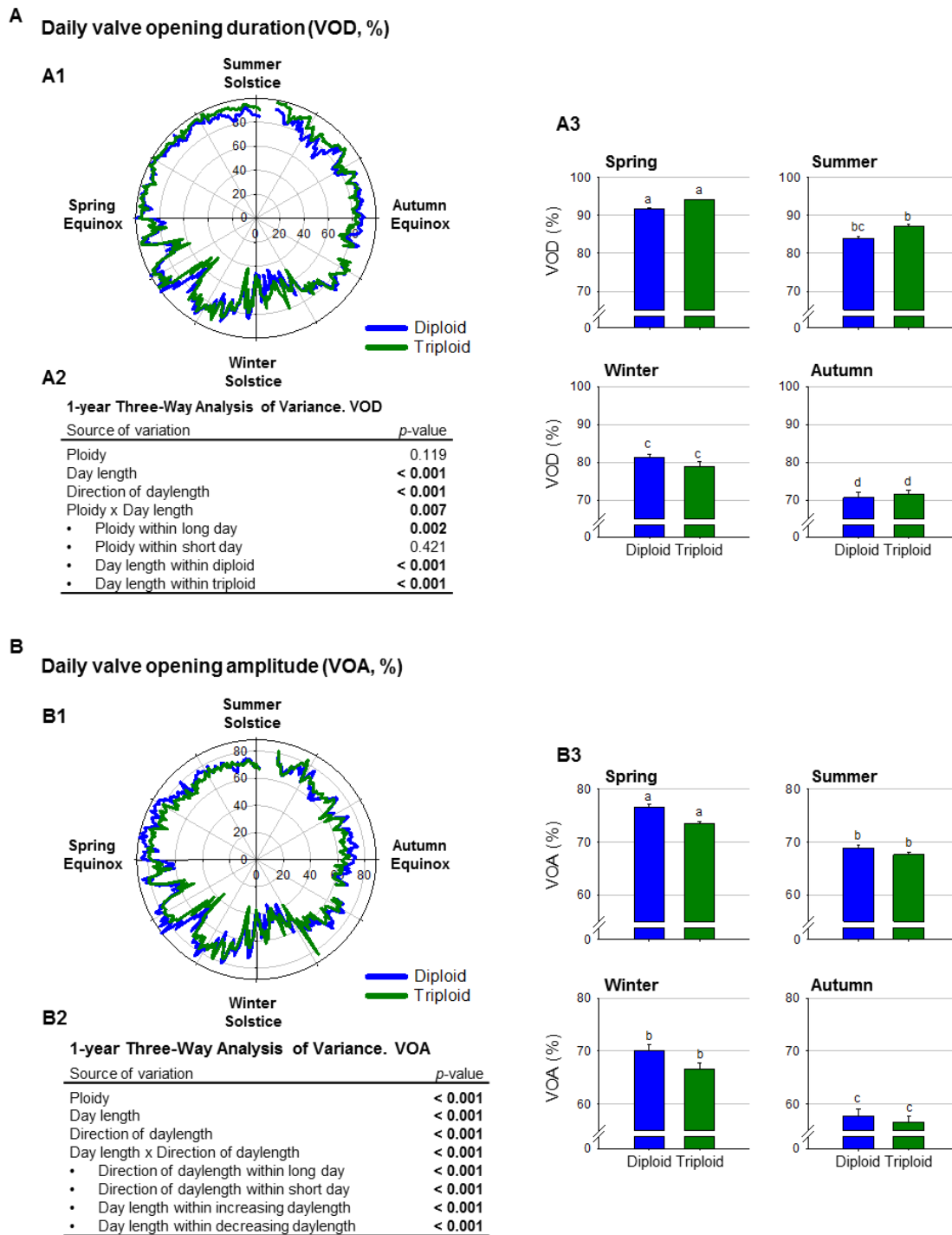


Figure 2. Valve opening duration (VOD) and amplitude (VOA). A. Mean daily valve opening duration (VOD, %) of diploid (blue, $n = 8$) and triploid (green, $n = 8$) oysters during the 1-year analyses. A1. Polar plot representation of mean daily VOD. A2. Three-way analysis of variance of VOD using ploidy (diploid or triploid), daylength (long or short days) and direction of daylength (increasing or decreasing daylength). A3. Seasonal histograms of VOD. Letters indicate significant differences (one-way analysis of variance, $p < 0.05$). B. Mean daily valve opening amplitude (VOA, %) of diploid (blue, $n = 8$) and triploid (green, $n = 8$) oysters during the 1-year analyses. B1. Polar plot representation of VOA. B2. Three-way analysis of variance of VOA using ploidy (diploid or triploid), daylength (long or short days) and direction of daylength (increasing or decreasing daylength). B3. Seasonal histograms of VOA. Letters indicate significant differences (one-way analysis of variance, $p < 0.05$).

duration was longer during long days and with increasing photoperiod. At the seasonal scale, a one-way ANOVA (Fig 2A3) showed that oysters had a maximum daily VOD in spring (91.6 ± 0.4 % in diploid and 94.0 ± 0.2 % in triploid) and a minimum daily VOD in autumn (70.7 ± 1.5 % in diploid and 71.5 ± 1.1 % in triploid). In diploids, there were significant differences between seasons except summer (83.9 ± 0.6 %) vs winter VOD (81.1 ± 1.0 %) while in triploids, all seasons were significantly different from each other.

Figure 2B1 shows the mean daily valve opening amplitude (VOA, %) at the annual scale.

The three-way ANOVA (Fig 2B2) revealed a significant impact of ploidy on the mean daily VOA. Triploid oysters presented a significant lower VOA than diploid oysters throughout the year. The three-way ANOVA also revealed a significant effect of both daylength and direction of daylength on VOA without ploidy distinction (Fig 2B2). Moreover, significant interactions between these two factors in all oysters included direction of photoperiod within long (spring VOA differed from summer) and short days (winter VOA differed from autumn), as well as daylength within increasing (winter VOA differed from spring) and decreasing days (summer VOA differed from autumn). At the seasonal level, a one-way ANOVA (Fig 2B3) confirmed maximum daily VOA in spring (76.7 ± 0.6 % in diploid and 73.5 ± 0.4 % in triploid), minimum in autumn (57.7 ± 1.3 % in diploids and 56.6 ± 1.0 % in triploids), while VOA in summer (68.9 ± 0.5 % in diploid and 67.7 ± 0.5 % in triploid) and winter (70.2 ± 1.1 % in diploid and 66.6 ± 1.2 % in triploid) were intermediate in both diploid and triploid oysters.

Tidal and daily rhythms

Actograms showed the main pattern of diploid (Fig 3A1) and triploid (Fig 3A2) VOD from spring equinox 2014 to spring equinox 2015, with in parallel the annual photoperiod and water temperature measured near the oysters (Fig 3A3). The VOD distribution was clearly not random, but followed the semi-diurnal tidal cycle (*i.e.* two tidal cycles 12.4 h / day), with two main periods of valve closure (light grey) per day, synchronized to low tide slacks. Also, a diurnal rhythm was observed, with one main period of valve closure per day. Chronobiological analyses of 15-day periods revealed the percentage of cyclic behavior (percent rhythm (PR), %) explained by tidal ($\tau = 12.4$ h) and daily rhythms ($\tau = 24$ h), when significant rhythms were determined (Fig 3B1 and B2), presented in a circular time scale (Fig 3B1' and B2'). Null PRs corresponded to non-significant rhythms. Three-way ANOVA showed a significant difference between tidal and daily PRs (rhythm effect) in both ploidies: tidal VOD behavior was stronger than circadian VOD behavior throughout the year (Fig 3C1 and C2). In diploid oysters, tidal and daily PRs were significantly affected by both daylength and direction of photoperiod. VOD rhythms (tidal and daily) were stronger during short days (autumn and winter) than long (spring and summer), and during decreasing photoperiod (summer and autumn) than increasing (winter and spring) (Fig 3C1). In triploid oysters, daylength had a significant effect on the tidal rhythm (stronger during short days than long days) but not on the daily one, while the direction of photoperiod affected both rhythms (stronger during decreasing days than increasing) (Fig 3C2).

Tidal and daily rhythms of valve opening duration (VOD)

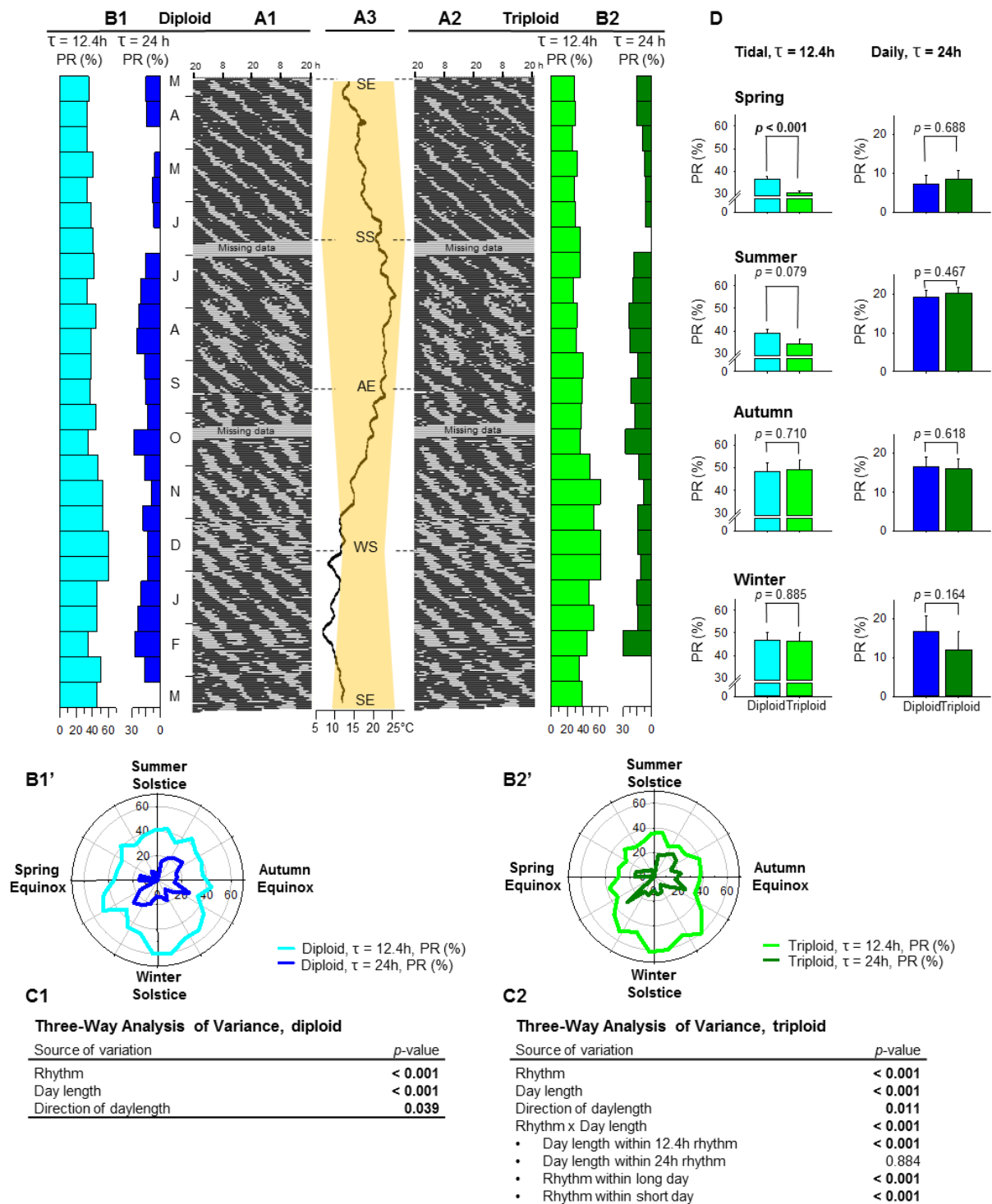


Figure 3. Tidal and daily rhythms of valve opening duration (VOD). A. Actograms show the 1-year pattern of VOD in diploids ($n = 8$) (A1) and triploids ($n = 8$) (A2). Letters indicate either months (form March 2014 to March 2015) or equinoxes (SE: summer equinox, AE: autumn equinox) and solstices (SS: summer solstice, WS: winter solstice). Temperature (A3). B. Percent rhythms (PR, %) of tidal (light blue for diploids or light green for triploids) and daily (dark blue for diploids or dark green for triploids) rhythms for each 15-day part of the 1-year analysis of VOD in diploids (B1) and triploids (B2). Zero values mean no significant rhythms. Same results presented as polar plots for diploid (B1') and triploid (B2') oysters. C. Three-way analysis of variance on percent rhythms data using rhythm (tidal or daily), daylength (long or short days) and direction of daylength (increasing or decreasing daylength) in diploid (C1) and triploid (C2) oysters. D. Seasonal histograms of tidal and daily percent rhythms data in diploid (blue) and triploid (green) oysters. *P*-values indicate differences between diploid and triploid oysters in a given season for tidal and/or daily rhythms.

Tidal and daily rhythms of valve opening amplitude (VOA)

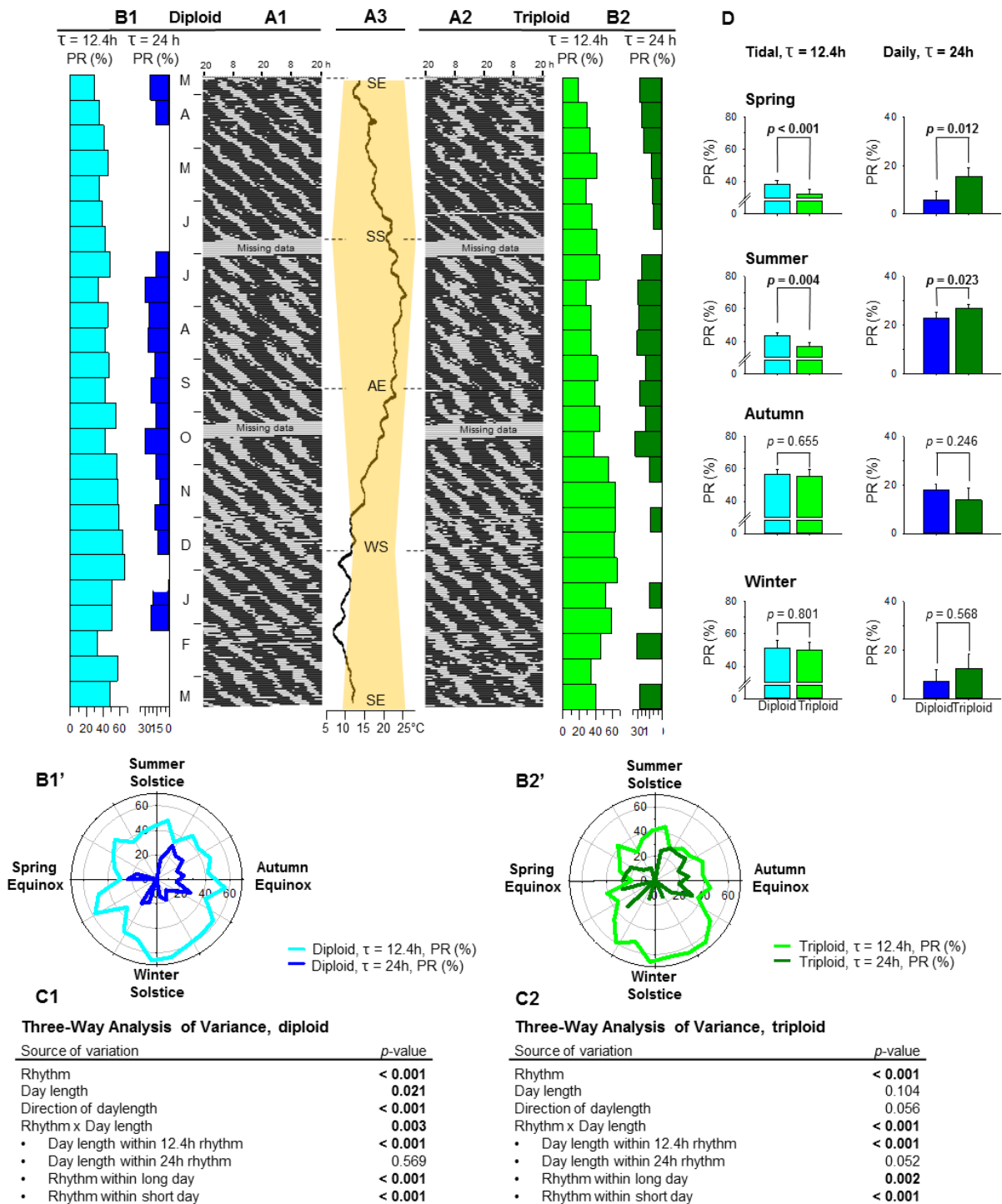


Figure 4. Tidal and circadian rhythms of valve opening amplitude (VOA). A. Actograms show the 1-year pattern of VOA in diploids ($n = 8$) (A1) and triploids ($n = 8$) (A2). Letters indicate either months (form March 2014 to March 2015) or equinoxes (SE: summer equinox, AE: autumn equinox) and solstices (SS: summer solstice, WS: winter solstice). Temperature (A3). B. Percent rhythms (PR, %) of tidal (light blue for diploids or light green for triploids) and daily (dark blue for diploids or dark green for triploids) rhythms for each 15-day part of the 1-year analysis of VOA in diploid (B1) and triploid (B2) oysters. Zero values mean no significant rhythms. Same results presented as polar plots for diploid (B1') and triploid (B2') oysters. C. Three-way analysis of variance on percent rhythms using rhythm (tidal or daily), daylength (long or short days) and direction of daylength (increasing or decreasing daylength) data in diploid (C1) and triploid (C2) oysters. D. Seasonal histograms of tidal and daily percent rhythms data in diploid (blue) and triploid (green) oysters. *P*-values indicate differences between diploid and triploid oysters in a given season for tidal and/or daily rhythms.

At the seasonal level, the VOD tidal rhythm in diploids and triploids was significantly different only in the spring (Fig 3D).

Figure 4 shows the same trends as Figure 3, mean valve opening amplitude (VOA) behavior, but here three-way ANOVA on diploid and triploid oysters independently showed a significant difference between tidal and daily rhythms in both ploidies: tidal VOA behavior was stronger than daily throughout the year (Fig 4C1 and C2). In diploid oysters, daylength affected only the VOA tidal rhythm and not the daily one: tidal rhythm was stronger during short days than during long days (Fig 4C1). However, both tidal and daily VOA rhythms were affected by the direction of daylength: they were stronger during decreasing photoperiod (Fig 4C1). Similarly, in triploid oysters, only VOA tidal rhythm was impacted by daylength, with stronger tidal PRs during short days (Fig 4C2). However, in triploid oysters, neither VOA tidal nor daily rhythms were significantly affected by direction of daylength (Fig 4C2). There were no significant interactions between a rhythm and the direction of daylength. At the seasonal level, shown Fig. 4D, a significant ploidy effect was revealed in both tidal and daily rhythms during the spring and summer: tidal rhythm was stronger in diploids whereas daily rhythm was stronger in triploids.

Circalunar rhythms

Synodic lunar cycles reflect the duration of time required for the moon to align with the sun and the earth in the same order ($\tau = 29.53$ days) (Fig 5). Due to this phenomenon, a moonlight cycle appears every lunar cycle, with a maximum of moonlight during the full moon and a minimum during the new moon. Moreover, the tidal intensity variation corresponds to neap-spring cycles, which occur two times/synodic month ($\tau = 14.76$ days). The strongest tides (spring tides) occur during syzygy (full or new moon), whereas the lowest tides (neap tides) occur at first- and third-quarter phases of the moon. Chronobiological analyses on 1-year VOD indicated a significant neap-spring tidal cycle rhythmicity in diploid oysters but not in triploids (Fig 5A); and inversely, a significant moonlight effect in triploid oysters but not in diploids (Fig 5B). Then, chronobiological analyses on 1-year VOA showed no significant neap-spring tidal cycle rhythmicity for VOA in either diploids or triploids (Fig. 5A). On the contrary, a moonlight effect appeared significant in both ploidies (Fig. 5B).

Spawning event

All female spawning events characterized by valvometry were in summer (*i.e.* long days, decreasing daylength) (Fig 6). The 15th of July, 2 days after the full moon, four diploid oysters (oysters 2, 5, 6 and 8) spawned in a synchronized manner, around 20 h (UTC), while no spawning events were observed in triploid oysters (Fig 6A1). The 11th of August, 1 day after the full moon, four diploid oysters (oysters 1, 2, 6 and 8) spawned, again in a synchronized manner, around 6 h (UTC), while no spawning events were observed in triploid oysters (Fig 6A2). Thus, diploid females 2, 6 and 8 spawned twice in the same summer, while oyster 5 spawned only in July, and oyster 1 only in August. Mean gametogenesis levels were

estimated with the Marteil index and showed increased gametogenesis throughout the spring, reaching a maximum of index 3 in summer just before the first spawning event (Fig 6B). In triploid oysters, the mean Marteil index revealed delayed and weak gametogenesis compared to diploids, never reaching index 1. In all oysters, the Marteil index was 0 at the beginning of autumn.

Growth

Figure 7A presents growth data collected with HFNI valvometry. Figure 7A1 shows the annual mean growth index (curves in background) of diploid and triploid oysters. In triploids, the index was ≈ 2.6 times higher than in diploids. Growth rate indexes based on the 15-day periods are presented in the same graph (Fig 7A1) and in a polar plot (Fig 7A2). At the annual scale, three-way ANOVA showed a significant effect of ploidy, a daylength effect (growth rate index higher during long days than during short days), but no direction of daylength effect on oyster growth rate index. There was also a significant interaction among the three factors. The ploidy effect was significant during increasing daylength (winter and spring), with a 3.6 times higher growth rate index in triploids in spring, when the index was maximum for both ploidies. During decreasing days, a significant ploidy effect was observed solely during long days, with a 2.8 times higher growth rate index in triploids in summer. There was no significant effect of ploidy in autumn. The daylength effect on growth rate index was significant only during increasing daylength, with a maximum in spring in both diploids and triploids. Direct measures (Fig 7B) on individual diploid and triploid oysters showed significant differences in morphogenesis traits. The change of the slope of the growth rate was in accordance with the valvometric growth index (Fig. 7A1) and the direct measures (Fig. 7B): maximum growth rate between the spring equinox and the summer solstice; intermediate growth rate between summer solstice and autumn equinox; very low growth rate between the autumn and spring equinoxes. Finally, in accordance with the growth rate index measured, the measures of shell length, shell width, and soft body weight were respectively 2.9, 2.5 and 4.2 times higher in triploid oysters after one year (Fig 7B).

Discussion

The aim of this study was to investigate the relationship between the annual course of the photoperiod and seasonal behavior in diploid and triploid oysters. Animals react to annual changes in daylength and direction of daylength in order to anticipate environmental changes, using photoperiod to determine the timing of key physiological processes such as gametogenesis and spawning, growth and energy storage. In any given location, photoperiod is a much more reliable seasonal cue than temperature, food availability or rainfall, which vary greatly over time (Meuti and Denlinger 2013; Helm et al. 2013). The underlying mechanisms of use of the photoperiod signal are still debated. Two major theories have been advanced, i) the oscillator model using the circadian clock, proposed by E. Bunning in 1936 (Bünning 1936) and ii) the hourglass model functioning without any internal clock, proposed

Moon rhythms of valve opening duration (VOD) and amplitude (VOA)

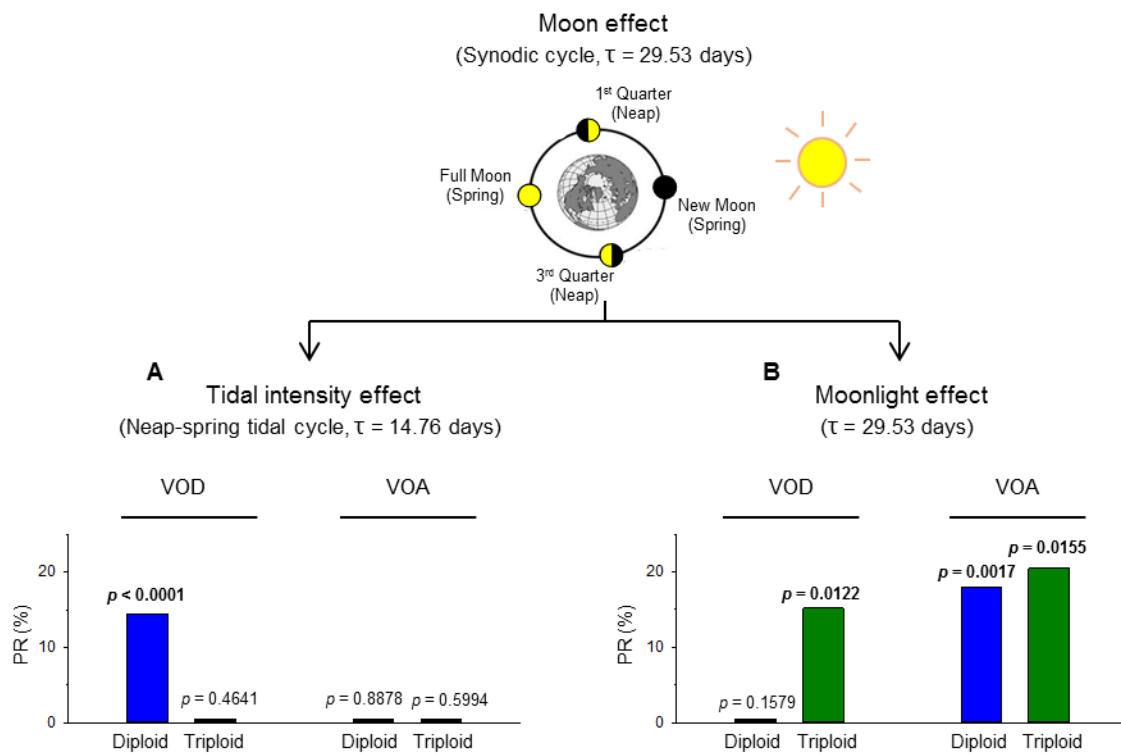


Figure 5. Circalunar rhythms. A. Percent rhythms (PR, %) of neap-spring tidal cycle (tidal intensity effect, $\tau = 14.46$ d)) during the 1-year analysis of VOD and VOA in diploid ($n = 8$, blue) and triploid ($n = 8$, green) oysters. B. Percent rhythms (PR, %) of the entire synodic cycle (moonlight cycle, $\tau = 29.53$ d) during the 1-year analysis of VOD and VOA in diploid (blue) and triploid (green) oysters. *P*-values indicate significance of the Cosinor model. Zero percent rhythms correspond to an absence of significant rhythmicity.

Gametogenesis and spawning events

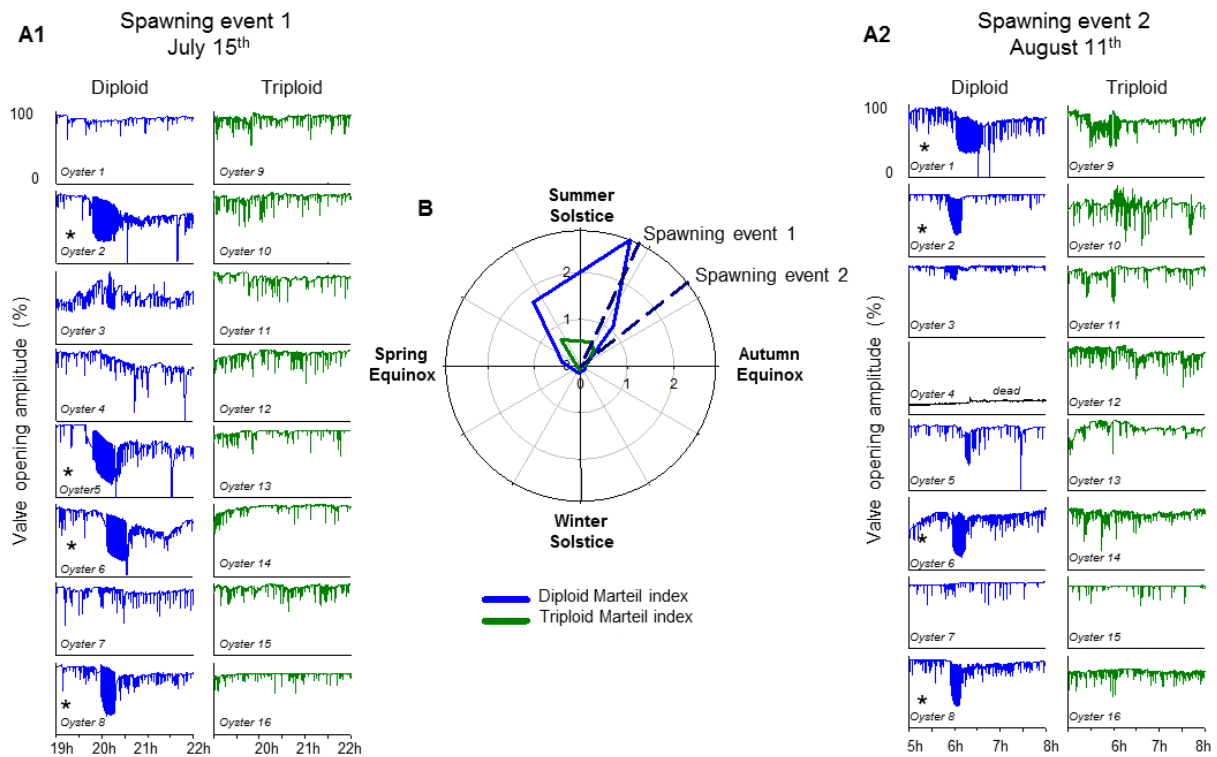


Figure 6. Gametogenesis and spawning events. A. *In situ* spawning events recording during the 1-year analysis of diploid (blue) and triploid (green) oysters. The first spawning event was recorded in July (A1), the second in August (A2). Stars (*) indicate spawning events, p -value = 0.05. B. Mean Marteil index measured on a dedicated group of diploid (blue) and triploid (green) oysters presented on a polar plot (7 measurements, $n = 10$ per time and ploidy).

Growth

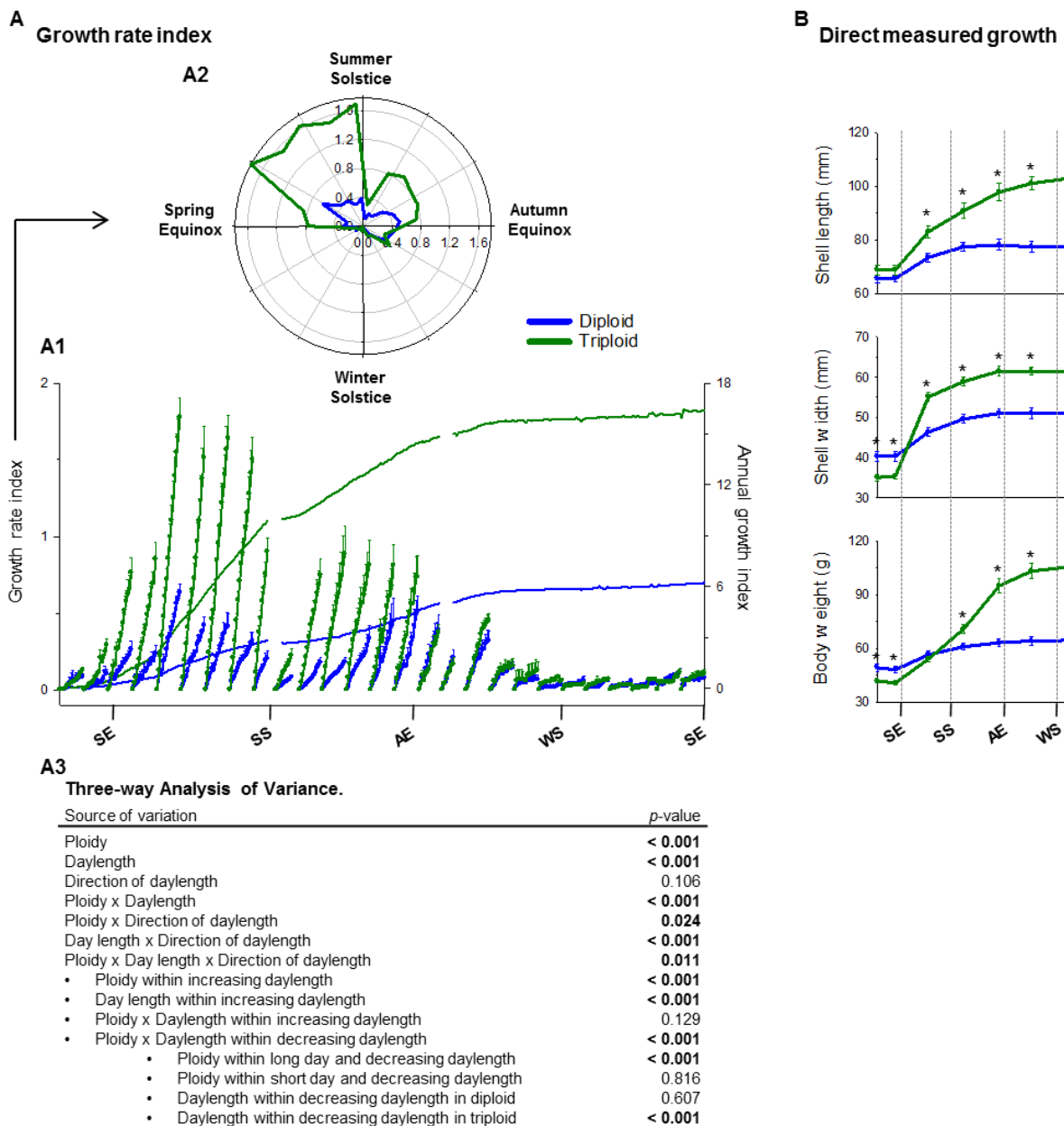


Figure 7. Growth. A. Mean growth rate index in diploid (blue, $n = 8$) and triploid (green, $n = 8$) oysters, measured with valvometry HFNI. A1. One-year (right axis) and 15-day (left axis) growth rate index in diploid and triploid oysters. The x-axis shows time, with SE for summer equinox, SS for summer solstice, AE for autumn equinox, WS for winter solstice. A2. Fifteen-day growth rate indices presented on a polar plot. A3. Three-way analysis of variance on 15-day growth rate index using ploidy (diploid or triploid), daylength (long or short days) and direction of daylength (increasing or decreasing daylength). B. Direct measured growth on a dedicated group of oysters (7 measurements, $n = 16$ per ploidy). Stars (*) indicate significant differences between diploid and triploid oysters at a given time point. P -value = 0.05.

by T. Lees in 1950 (Lees 1950). Recent studies in insects suggest that both mechanisms, not mutually exclusive, explain the measure of time at the annual scale (Saunders 2005).

In the present work, we study how ploidy (*i.e.* the number of copies of chromosomes) may introduce a difference in physiological and behavioral activities of the oyster *C. gigas*. It is well-known that most physiological processes at the annual scale in diploid (2 copies of chromosomes) *C. gigas* are organized as a function of the annual gametogenesis cycle; starting in the beginning of winter and finishing in summer with spawning events (Chávez-Villalba et al. 2002; Ren et al. 2003; Fabioux et al. 2005; Enríquez-Díaz et al. 2009). On the contrary, triploid oysters (3 copies of chromosomes) have been selected for commercial needs to avoid or reduce gametogenesis activity and favor growth (Allen and Downing 1986; Nell 2002b; Garnier-Gere et al. 2002; Jouaux et al. 2010).

Gametogenesis and growth

A characteristic behavioral signature coupled with the Marteil index showed female spawning events and gametogenesis in diploid oysters. Moreover, we showed for the first time *in situ* to our knowledge that in a given individual, a spawning event could happen twice in the same summer. On the contrary, there was an absence of spawning events and much reduced gametogenesis in triploids, yet their annual growth rate was 2.6 (valvometric index) and 2.9 (direct measures) times higher than diploids.

The annual reproductive cycle of *C. gigas* seen here followed previous reports (Chávez-Villalba et al. 2002; Ren et al. 2003; Fabioux et al. 2005; Enríquez-Díaz et al. 2009); In diploid oysters, spring was characterized by active gametogenesis and summer by gonad maturation and spawning events. The lower, but not null, gametogenesis index of triploid oysters in spring and summer also agrees with previous studies: triploid *C. gigas* are generally considered sterile, yet partial gametogenesis events are sometimes recorded (Shpigel et al. 1992; Nell 2002b; Normand et al. 2008, 2009; Jouaux et al. 2010); here the partial gametogenesis seen in triploids in spring and summer did not lead to spawning events. The initiation of gametogenesis was at the end of autumn / beginning of winter, and as the resorption period is in autumn (degenerating stage), this stage of gonadal proliferation could not be observed macroscopically (Fabioux et al. 2005). This first stage of gonadal mitosis can differ between diploid and triploid oysters (Jouaux et al. 2010), and is sometimes delayed in triploids (Normand et al. 2008). This winter initiation of gametogenesis appears of fundamental importance for a later benefit from the warm spring and summer temperatures indispensable for gonad development, maturation and spawning (Mann 1979; Shpigel et al. 1992; Chávez-Villalba et al. 2002). While it was demonstrated that gametogenesis cycles are shaped by photoperiod and/or temperature (Fabioux et al. 2005), at a sufficient temperature, spawning in *C. gigas* primarily occurs according to seasonal (summer), daily (morning or evening), circalunar and tidal (essentially at high tide of perigean spring tides) cycles (Bernard et al. 2016). Such synchronization has ecological consequences associated with gamete encounters and the dispersal of fertilized eggs, and this interplay of the many rhythms

in a complex environment are in accordance with other results and widely observed in other marine organisms (Tessmar-Raible et al. 2011).

Maximum growth rate for all oysters was reached in spring, when days were long and increasing, and the maximal difference in growth rate between diploid and triploid oysters was highest in spring (3.6 higher in triploid). Growth rate was still important but slowed down in summer. Interestingly, decreased growth rate at the beginning of summer was correlated in both diploid and triploid oysters with the first spawning event, although no spawns were observed in triploids. A hypothesis could be advanced that triploids and diploids use the same environmental signal (*i.e.* a photoperiod milestone, such as the summer solstice) to turn on physiological systems. Triploids thus have the same ability to respond to photoperiod changes, although a loss of necessity leads to no actual physiological action. Finally, these results show different energy allocations in diploids and triploids for different physiological needs.

Photoperiod influences in both diploid and triploid oysters

First, independently of ploidy, photoperiod (daylength and direction of daylength) affect duration and amplitude of valve opening. Valve opening activity of many species is closely related to physiological processes such as respiration, nutrition, reproduction and responses to environmental stimuli (García-March et al. 2008). In this study, we showed that *in situ* valve opening duration (VOD) and amplitude (VOA) of *C. gigas* were driven by photoperiod and clearly exhibited seasonality. This is opposite to the bivalve *Chlamys islandica*, an arctic scallop in which mean VOA and VOD don't change throughout the year, despite very drastic seasonal changes (Tran et al. 2016). In the present study, VOA and VOD for similar water temperatures were maximum in spring when day durations were long and increasing, and minimum in autumn when day durations were short and decreasing. In spring, increased VOA and VOD could be correlated to nutritional needs as food intake increases for growth and gametogenesis. In fact, a 20 % increase of protein content in muscle was observed in diploid *C. gigas* in spring (Berthelin et al. 2000) and lipid content in gonads multiplied by three between the start of spring and summer spawning events. As filter-feeders, oysters consume unicellular phytoplankton, which exhibit a seasonal cycle in temperate regions. After the winter period of lowest plankton concentration, spring is generally characterized by the highest abundance and by the most important algal blooms (Cloern 1996; Glé et al. 2008). These supports the maximal growth rate in both diploids and triploids and increasing gonad maturation in diploids, occurring during spring. The seasonal variations in oyster valve behavior shown here suggest that photoperiodic signals allow an anticipation of seasonal changes in the food supply. Finally, the results also show that photoperiod influences seasonal modulations of rhythmic behaviors in both diploid and triploid oysters. As previously shown for VOD in diploids (Tran et al. 2011), here tidal cycle was the main driver of valve opening behavior, but for VOD and VOA and in both diploid and triploid oysters. However, during short days (winter and autumn) the tidal component of valve behavior was significantly stronger than during long days (spring and summer), revealing that photoperiod could modify

the strength of the tidal rhythm in oysters. Autumn remained the season with the strongest tidal rhythm for both VOA and VOD behavior.

Behavioral differences to photoperiod changes between diploid and triploid oysters.

At the annual scale and independent of photoperiod, triploid amplitude of valve opening was lower than diploid. However, photoperiod differentially affected valve activity. During the long days of spring and summer, triploid VOD and daily rhythm were significantly higher than this of diploids. On the contrary, tidal rhythm was stronger in diploids. These significant differences disappeared during the short days of autumn and winter.

A dualism of daily rhythm had already been observed in *C. gigas*, switching from a nocturnal pattern during short days to a diurnal pattern during long days (Mat et al. 2012). Here, we showed that in diploid oysters, the intensity of daily rhythm was also modulated by daylength (only for VOD) and by the direction of daylength (for both VOA and VOD). Interesting nuances were observed in rhythmic patterns between amplitude and duration of valve opening. Particularly, daily light / dark alternation was an important driver of diploid VOD in winter, but not on diploid VOA. In spring, daily rhythm was a weak driver for both VOD and VOA activity in diploids, while in triploids daily rhythm for VOA did not decrease in spring. Tidal rhythm of diploid behavior was modified by both daylength (stronger during short days) and direction of daylength (stronger during decreasing daylength), while tidal rhythm of triploids VOA was only modified by daylength. Rhythm is entrained by changes in daylength in many species, but the direction of daylength is also known as an entraining factor in other invertebrates including sea urchins (McClintock and Watts 1990) and fan mussels *Pinna nobilis* (Garcia-March et al. 2016).

Difference between triploids and diploids in response to the lunar synodic cycle.

The synodic lunar month cycle is involved in two circalunar rhythms in marine organisms: the neap-spring tidal cycle rhythm and the moonlight rhythm. Here, a different impact was shown depending on ploidy and valve parameter. It was previously reported that the neap-spring tidal cycle, the two times per synodic cycle when the moon, sun and earth are in syzygy, i.e. alignment, during the new or full moon, significantly drives diploid VOD, increasing when tide coefficient increases, and vice versa (Tran et al. 2011). In the present study, there was no significant effect of neap-spring tidal cycle on triploid VOD, meaning triploid opening duration was driven by tidal cycles but not modulated by their intensity. In the same way, no neap-spring tidal rhythm was observed in the amplitude of valve opening (VOA) in either diploids or triploids.

The synodic lunar cycle induces a moonlight cycle, with light intensity maximal at the full moon and minimal at the new moon. This cycle is well-known to drive moonlight cycles in marine organisms (Numata and Helm 2015) such as corals (Babcock et al. 1986; Kaniewska et al. 2015), fishes (Sugama et al. 2008), annelids (Zantke et al. 2013), crustaceans and mollusks (Forward Jr 1987; Naylor 1999; García-March et al. 2008). The moonlight rhythm

has been reported to drive valve behavior in a marine bivalve, *Pinna nobilis* (García-March et al. 2008) but was observed here for the first time in the oyster *C. gigas*. Both diploids and triploids showed a moonlight rhythm of valve opening amplitude while only triploids exhibited a rhythm with valve opening duration.

Taken together, these results suggest that triploid oysters are more sensitive to light cues (moonlight rhythms and stronger daily rhythms in spring and summer) and less sensitive to tidal cues (no significant neap-spring tidal rhythm and weaker tidal rhythm in spring and summer) than diploids.

Conclusion

Seasonal variations were observed in level of activity and rhythmic patterns of *C. gigas* valve behavior, as well as in growth and gametogenesis. Variations based on annual photoperiod and lunar rhythms exhibited significant differences according to ploidy. The molecular mechanism behind these differences remains to elucidate, but differences in gametogenesis and growth between diploid and triploid oysters is likely to be at least a part of the explanation. The annual course of the photoperiod seems to act as an essential environmental cue synchronizing circannual/seasonal rhythms, however in mollusk bivalves, little is known about the potential relationship between a putative circannual clock and the outside world, which remains to study. These results suggest a complex interaction of tidal and daily rhythms with photoperiod, allowing optimization of seasonal biological processes through a selected sensitivity based on ploidy.

Acknowledgement

This work was supported by the financial support of the National Research Agency (ANR), ACCUTOX project 13-CESA-0019 (2013-2017) and a French ministerial PhD scholarship for L. Payton. Authors thank Dr. Katherine Flynn for English corrections.

References

- Ahmed H, Ushirobira R, Efimov D, et al (2016) A fault detection method for automatic detection of spawning in oysters. *IEEE Trans Control Syst Technol* 24:1140–1147. doi: 10.1109/TCST.2015.2472999
- Allen SK, Downing SL (1986) Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J Exp Mar Biol Ecol* 102:197–208. doi: 10.1016/0022-0981(86)90176-0
- Andrade H, Massabuau J-C, Cochrane S, et al (2016) High frequency non-invasive (HFNI) bio-sensors as a potential tool for marine monitoring and assessments. *Front Mar Sci* 3:187.

- Babcock RC, Bull GD, Harrison PL, et al (1986) Synchronous spawnings of 105 scleractinian coral species on the Great Barrier Reef. *Mar Biol* 90:379–394. doi: 10.1007/BF00428562
- Bernard I, Massabuau J-C, Ciret P, et al (2016) *In situ* spawning in a marine broadcast spawner, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: timing and environmental triggers. *Limnol Oceanogr* 61:635–647. doi: 10.1002/lno.10240
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 125:359–369. doi: 10.1016/S0305-0491(99)00187-X
- Bingham C, Arbogast B, Guillaume GC, et al (1982) Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9:397–439.
- Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S (2007) Biological consequences of dosage dependent gene regulatory systems. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr* 1769:422–428. doi: 10.1016/j.bbaexp.2006.12.002
- Box GE, Jenkins GM, Reinsel GC (1994) Time series analysis: Forecasting and control. 3rd Prentice Hall.
- Brown JR (1988) Multivariate analyses of the role of environmental factors in seasonal and site-related growth variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Ecol Prog Ser* Oldendorf 45:225–236.
- Bünning E (1936) Endogenous daily rhythms as the basis of photoperiodism. *Ber Deut Bot Ges* 590–607.
- Chávez-Villalba J, Pommier J, Andriamiseza J, et al (2002) Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214:115–130. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00898-5
- 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. doi: 10.1029/96RG00986
- Dridi S, Romdhane MS, Elcafsi M 'hamed (2007) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture* 263:238–248. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.10.028
- Duchemin MB, Fournier M, Auffret M (2007) Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 264:73–81. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.12.030
- Enríquez-Díaz M, Pouvreau S, Chávez-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. *Aquac Int* 17:491–506. doi: 10.1007/s10499-008-9219-1
- Fabioux C, Huvet A, Le Souchu P, et al (2005) Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250:458–470.
- FAO (2016a) FAO Fisheries & Aquaculture - Species Fact Sheets - *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). <http://www.fao.org/fishery/species/3514/en>. Accessed 14 Feb 2017
- FAO (2016b) The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 - a-i5555e.pdf. <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Accessed 14 Feb 2017
- Forward Jr RB (1987) Larval release rhythms of decapod crustaceans: an overview. *Bull Mar Sci* 41:165–176.
- Foster RG, Kreitzman L (2009) Seasons of life: The biological rhythms that enable living things to thrive and survive. Yale University Press
- Galtsoff PS (1938) Physiology of reproduction of *ostrea virginica*: I. Spawning reactions of the female and male. *Biol Bull* 74:461–486. doi: 10.2307/1537816
- Garcia-March JR, Jiménez S, Sanchis MA, et al (2016) In situ biomonitoring shows seasonal patterns and environmentally mediated gaping activity in the bivalve, *Pinna nobilis*. *Mar Biol* 163:29. doi: 10.1007/s00227-016-2812-3
- García-March JR, Sanchís Solsona MÁ, 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. doi: 10.1007/s00227-007-0842-6
- Garnier-Gere PH, Naciri-Graven Y, Bougrier S, et al (2002) Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol Ecol* 11:1499–1514. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01531.x
- Glé C, Del Amo Y, Sautour B, et al (2008) Variability of nutrients and phytoplankton primary production in a shallow macrotidal coastal ecosystem (Arcachon Bay, France). *Estuar Coast Shelf Sci* 76:642–656. doi: 10.1016/j.ecss.2007.07.043
- 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 (Paris)* 53:285–289.
- Gouthière L, Mauvieux B (2004) Etapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers, modélisation.
- 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.

- Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, et al (2010) Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 97:96–108. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.12.006
- Hawkins AJS, Magoulas A, Héral M, et al (2000) Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genet Res* 76:273–284.
- Helm B, Ben-Shlomo R, Sheriff MJ, et al (2013) Annual rhythms that underlie phenology: biological time-keeping meets environmental change. *Proc R Soc B Biol Sci* 280:20130016–20130016. doi: 10.1098/rspb.2013.0016
- Herbert RJH, Humphreys J, Davies CJ, et al (2016) Ecological impacts of non-native Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and management measures for protected areas in Europe. *Biodivers Conserv* 25:2835–2865. doi: 10.1007/s10531-016-1209-4
- Jou L-J, Lin S-C, Chen B-C, et al (2013) Synthesis and measurement of valve activities by an improved online clam-based behavioral monitoring system. *Comput Electron Agric* 90:106–118. doi: 10.1016/j.compag.2012.09.008
- Jouaux A, Heude-Berthelin C, Sourdain P, et al (2010) Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort. *J Exp Mar Biol Ecol* 395:162–170. doi: 10.1016/j.jembe.2010.08.030
- Kaniewska P, Alon S, Karako-Lampert S, et al (2015) Signaling cascades and the importance of moonlight in coral broadcast mass spawning. *eLife* 4:e09991. doi: 10.7554/eLife.09991
- Lees AD (1950) Diapause and photoperiodism in the fruit tree red spider mite (*Metatetranychus ulmi* Koch). *Nature* 166:874–875. doi: 10.1038/166874a0
- Mann R (1979) Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J Mar Biol Assoc U K* 59:95. doi: 10.1017/S0025315400046208
- Mao Y, Zhou Y, Yang H, Wang R (2006) Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. *Aquaculture* 253:322–333. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.05.033
- Marteil L (1976) La conchyliculture française. 2ème partie. Biologie de l’huître et de la moule, ISTPM.
- Mat AM, 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. doi: 10.3109/07420528.2012.699126

- McClintock JB, Watts SA (1990) The effects of photoperiod on gametogenesis in the tropical sea urchin *Eucidaris tribuloides* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *J Exp Mar Biol Ecol* 139:175–184. doi: 10.1016/0022-0981(90)90145-3
- Meuti ME, Denlinger DL (2013) Evolutionary links between circadian clocks and photoperiodic diapause in insects. *Integr Comp Biol* 53:131–143. doi: 10.1093/icb/ict023
- Naylor E (1999) Marine animal behavior in relation to lunar phase. *Earth Moon Planets* 85/86:291–302. doi: 10.1023/A:1017088504226
- Nell JA (2002) Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210:69–88. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00861-4
- Nelson TC (1928) Relation of spawning of the oyster to temperature. *Ecology* 9:145–154. doi: 10.2307/1929351
- Nelson W, Tong YL, Lee J-K, Halberg F (1979) Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 6:305.
- Normand J, Ernande B, Haure J, et al (2009) Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. *Aquat Biol* 7:229–241. doi: 10.3354/ab00190
- Normand J, Le Pennec M, Boudry P (2008) Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture* 282:124–129. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.026
- Numata H, Helm B (2015) Annual, Lunar, and Tidal Clocks: Patterns and Mechanisms of Nature's Enigmatic Rhythms. Springer
- Osada M, Nomura T (1989) Seasonal variations of catecholamine levels in the tissues of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol Part C Comp Pharmacol* 93:171–173. doi: 10.1016/0742-8413(89)90029-7
- Osborn TC, Chris Pires J, Birchler JA, et al (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet* 19:141–147. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00015-5
- Perrigault M, Tran D (2017) Identification of the molecular clockwork of the oyster *Crassostrea gigas*. *PLOS ONE* 12:e0169790. doi: 10.1371/journal.pone.0169790
- Ren JS, Marsden ID, Ross AH, Schiel DR (2003) Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the Marlborough Sounds, New Zealand. *N Z J Mar Freshw Res* 37:171–182. doi: 10.1080/00288330.2003.9517155
- Riddle NC, Kato A, Birchler JA (2006) Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays L.* *Theor Appl Genet* 114:101–111. doi: 10.1007/s00122-006-0414-z

- Saunders DS (2005) Erwin Bünning and Tony Lees, two giants of chronobiology, and the problem of time measurement in insect photoperiodism. *J Insect Physiol* 51:599–608. doi: 10.1016/j.jinsphys.2004.12.002
- Scargle JD (1982) Studies in astronomical time series analysis. II-Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. *Astrophys J* 263:835–853.
- Shpigel M, Barber BJ, Mann R (1992) Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Exp Mar Biol Ecol* 161:15–25. doi: 10.1016/0022-0981(92)90186-E
- Stevenson TJ, Visser ME, Arnold W, et al (2015) Disrupted seasonal biology impacts health, food security and ecosystems. *Proc R Soc B* 282:20151453. doi: 10.1098/rspb.2015.1453
- Sugama N, Park J-G, Park Y-J, et al (2008) Moonlight affects nocturnal *Period2* transcript levels in the pineal gland of the reef fish *Siganus guttatus*. *J Pineal Res* 45:133–141. doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00566.x
- Suquet M, Malo F, Quere C, et al (2016) Gamete quality in triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 451:11–15. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.08.032
- Tessmar-Raible K, Raible F, Arboleda E (2011) Another place, another timer: Marine species and the rhythms of life. *BioEssays* 33:165–172. doi: 10.1002/bies.201000096
- Tran D, Ciret P, Ciutat A, et al (2003) Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: Application to cadmium. *Environ Toxicol Chem* 22:914–920. doi: 10.1002/etc.5620220432
- Tran D, Ciutat A, Mat A, et al (2015) The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 158:41–49. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.10.023
- Tran D, Nadau A, Durrieu G, 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. doi: 10.3109/07420528.2011.565897
- Tran D, Sow M, Camus L, et al (2016) In the darkness of the polar night, scallops keep on a steady rhythm. *Sci Rep* 6:32435. doi: 10.1038/srep32435
- Visser ME, Caro SP, van Oers K, et al (2010) Phenology, seasonal timing and circannual rhythms: towards a unified framework. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365:3113–3127. doi: 10.1098/rstb.2010.0111
- Zantke J, Ishikawa-Fujiwara T, Arboleda E, et al (2013) Circadian and circalunar clock interactions in a marine annelid. *Cell Rep* 5:99–113. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.031

3. Conclusion

Jusqu'à présent, l'impact de la ploïdie des huîtres sur leur comportement *in situ* et leur synchronisation avec les facteurs environnementaux, et particulièrement l'évolution annuelle de la photopériode, n'avait jamais été étudié. Le seul paramètre du comportement rythmique de l'huître diploïdes *C. gigas* sur le terrain qui avait été étudié était la durée d'ouverture des valves (Tran et al. 2011). Des variations saisonnières de comportement chez l'huître n'avaient jusqu'alors été observées que sur la modalité diurne ou nocturne du rythme journalier (Mat et al. 2012).

Cette analyse annuelle haute fréquence du comportement valvaire d'huîtres diploïdes et triploïdes *in situ* a permis de caractériser un comportement saisonnier marqué de *C. gigas*, ainsi que des différences de synchronisation du comportement par les facteurs environnementaux relatives à la ploïdie des huîtres. L'hypothèse que la différence de ploïdie modifierait les rythmes biologiques chez l'huître *C. gigas* semble alors validée.

La durée et l'amplitude d'ouverture des valves des huîtres diploïdes et triploïdes sont influencées par le sens d'évolution de la durée d'ensoleillement (« croissant » ou « décroissant ») et par la durée d'ensoleillement (« courte », *i.e.* inférieure à 12 heures ; ou « longue », *i.e.* supérieure à 12 heures). La durée comme l'amplitude d'ouverture des valves sont alors maximales au printemps et minimales en automne, chez les diploïdes et le triploïdes. Les huîtres triploïdes présentent cependant une amplitude d'ouverture plus faible que celle des diploïdes tout au long de l'année, mais une durée d'ouverture valvaire plus importante que les diploïdes pendant les jours longs (printemps et été).

Comme il avait déjà été observé par Tran et al. (2011), le comportement des huîtres *in situ* étudié dans cette nouvelle étude présente un rythme tidal marqué, ainsi qu'un rythme journalier plus faible. Si la variation annuelle de la modalité (diurne pendant les jours longs / nocturne pendant les jours courts) du rythme journalier avait été montrée dans une étude précédente (Mat et al. 2012), cette analyse a pour la première fois mise en évidence que l'intensité de ce rythme journalier, mais également celle du rythme tidal, sont elles aussi modulées par l'évolution annuelle de photopériode. Le sens de l'évolution de la durée d'ensoleillement et/ou la durée d'ensoleillement ont un effet sur cette modulation, qui diffère en fonction de la ploïdie des huîtres.

La différence de comportement rythmique en fonction de la ploïdie est essentiellement marquée pendant le printemps et l'été. En effet, c'est pendant ces saisons à jours longs, que les rythmes tidaux et nycthémeraux sont significativement différents. Les huîtres triploïdes présentent alors un rythme tidal plus faible et un rythme nycthémeraal plus fort que les huîtres diploïdes.

Enfin, la croissance des huîtres est également modulée par l'évolution annuelle de la photopériode, de manière légèrement différente entre les huîtres diploïdes et triploïdes, avec

une diminution beaucoup plus brutale de la vitesse de croissance lors du passage en jours courts pour les triploïdes. La croissance annuelle des huîtres triploïdes est 2 à 3 fois supérieure à celle des huîtres diploïdes. Le suivi de l'évolution des vitesses de croissance permet de mettre en évidence que c'est pendant le printemps et l'été que cette différence de croissance entre huîtres diploïdes et triploïdes se crée, alors que la croissance continue jusqu'au milieu de l'automne à une vitesse identique entre les deux types d'huîtres.

Le comportement des huîtres présente également des rythmes liés aux cycles lunaires. Comme précédemment observé (Tran et al. 2011), le rythme semi-lunaire de mortes eaux et de vives eaux (*neap-spring tidal cycle*), jouant sur l'intensité des marées, influence la durée d'ouverture des huîtres *C. gigas* diploïdes. En revanche, ce rythme semi-lunaire n'influence pas la durée d'ouverture des huîtres triploïdes. De plus, nous avons observé pour la première fois chez *C. gigas*, une influence significative du rythme lunaire (synodique), lié à l'intensité de l'éclairement de la lune, sur le comportement des huîtres *C. gigas*. Ce cycle lunaire n'influence que l'amplitude d'ouverture valvaire chez les huîtres diploïdes, alors qu'il influence la durée d'ouverture et l'amplitude d'ouverture valvaire chez les huîtres triploïdes.

Globalement, les huîtres triploïdes sembleraient plus sensibles aux signaux lumineux (alternance jour / nuit et éclairement de la lune) que les huîtres diploïdes. À l'inverse, elles semblent moins sensibles aux facteurs tidaux.

Les résultats suggèrent que les différences de synchronisation du comportement des huîtres diploïdes et triploïdes par l'évolution annuelle de la photopériode sont étroitement liées aux différences de besoins physiologiques, notamment liés à la gamétogénèse. En effet, la majorité des différences de comportements entre huîtres diploïdes et triploïdes est observée pendant les jours longs (printemps et été). Or ces deux saisons sont caractérisées par une gamétogénèse intense et des événements de pontes, observés seulement chez les huîtres diploïdes.

Enfin, l'hypothèse que la différence de rythmes biologiques entre les huîtres diploïdes et triploïdes chez l'huître *C. gigas* (observée ici *in situ* sur un site non contaminé par les algues toxiques *A. minutum*) pourrait être à l'origine des différences d'accumulation de toxines PSP lors d'efflorescences d'algues *A. minutum* reste valide. Notamment, la durée d'ouverture valvaire plus importante, associée à un rythme tidal plus faible et un rythme journalier plus fort chez les huîtres triploïdes relativement aux huîtres diploïdes pendant le printemps et l'été, pourrait être à l'origine de différences d'accumulation de PSP lors de phénomènes d'efflorescences d'*A. minutum* (Guéguen et al., 2012; Haberkorn et al., 2010), principalement observés pendant ces mêmes saisons ces dernières années en rade de Brest (Chapelle et al. 2015).

Pour vérifier l'hypothèse de l'implication des rythmes biologiques dans les processus de bioaccumulation, une étude expérimentale a été réalisée au printemps-été lorsque le rythme nyctéméral du comportement est significativement différent entre les huîtres diploïdes et triploïdes. Cette expérience a consisté à exposer, en conditions d'alternance jour-nuit, des huîtres diploïdes et triploïdes à *A. minutum*, après avoir interféré l'expression de l'horloge circadienne. Cette étude est présentée dans le chapitre suivant (Chapitres IV).

Chapitre IV

Interférence du gène *Clock* par la stratégie du cheval de Troie pour l'étude de l'implication de l'horloge circadienne dans les processus de bioaccumulation des phycotoxines PSP.

1. Préambule

Le travail présenté dans ce chapitre s'intègre dans le premier objectif de ma recherche, qui est d'évaluer l'implication des rythmes biologiques dans le déterminisme de la bioaccumulation de toxines PSP chez l'huître *Crassostrea gigas*. Pour cette approche, j'ai émis l'hypothèse de travail que la différence de ploïdie pourrait modifier les rythmes biologiques chez l'huître *C. gigas* et être à l'origine, du moins en partie, des différences d'accumulation de toxines PSP précédemment observées entre les huîtres diploïdes et triploïdes (Guéguen et al. 2012; Haberkorn et al. 2010). Une première étude comportementale *in situ* a permis de mettre en évidence que les huîtres diploïdes et triploïdes peuvent en effet présenter des rythmes biologiques différents (nyctéméral et tidal) pendant les saisons de printemps et d'été (Chapitre III). A partir de ce constat, j'ai testé à cette période l'implication potentielle du rythme nyctéméral de *C. gigas* dans les processus de bioaccumulation des toxines PSP.

Dans cette expérience, nous avons testé expérimentalement l'implication de l'horloge circadienne des huîtres dans la bioaccumulation des toxines PSP (Figure IV 1). Pour cela, nous avons développé une approche originale non invasive de l'interférence par ARN pour court-circuiter temporairement l'horloge circadienne des huîtres diploïdes et triploïdes, par l'interférence du gène *Clock*, un gène clé de cette horloge, impliqué dans la transmission du message cyclique à l'organisme (Perrigault and Tran 2017a).

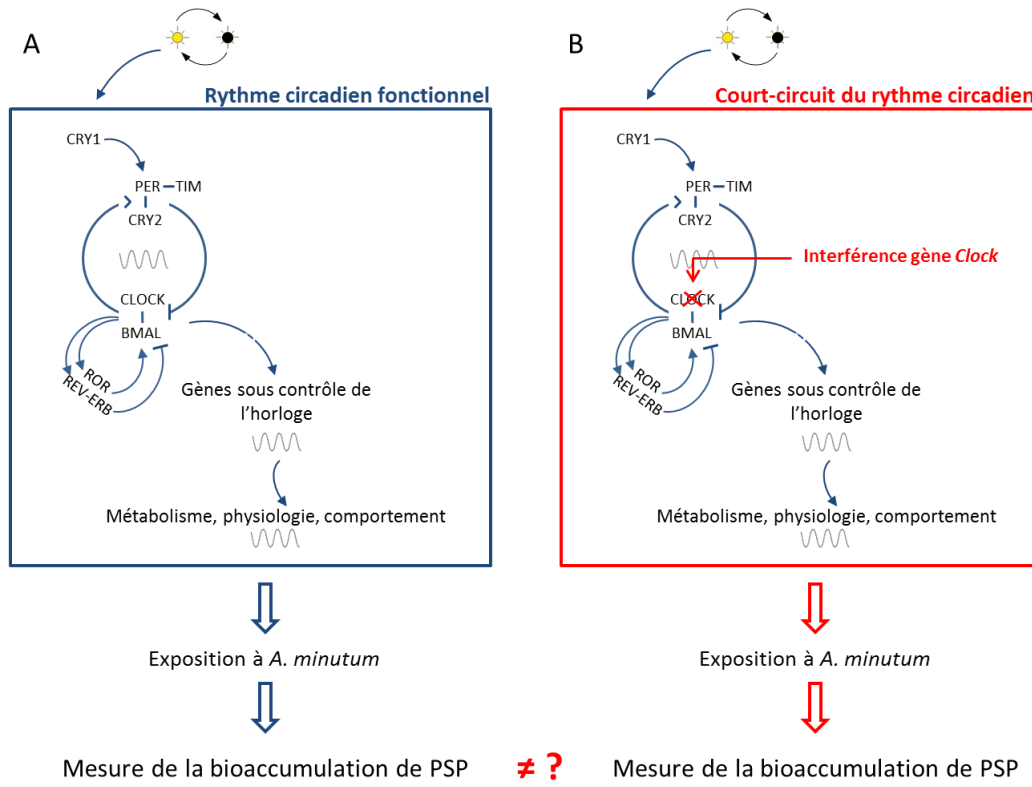


Figure IV 1. Principe de l'approche expérimentale pour tester l'implication de l'horloge circadienne dans les processus de bioaccumulation des PSP : la comparaison de la bioaccumulation de PST chez les huîtres témoins (A) et les huîtres interférées (B). Chez les organismes (B), la stratégie du cheval de Troie est appliquée pour l'interférence du gène *Clock*, afin de court-circuiter l'horloge moléculaire circadienne.

L'interférence par ARN (ARNi) est un mécanisme post-transcriptionnel de mise sous silence temporaire d'un gène. Ce mécanisme a été décrit pour la première fois par A. Z. Fire et C. C. Mello en 1998 (Fire et al. 1998 ; prix Nobel 2006). L'introduction d'un ARN double brin (ARNdb) dans des cellules induit l'inactivation du gène cible par la dégradation de l'ARN messager (ARNm) endogène correspondant. Ce mécanisme naturel a été très utilisé en recherche depuis 1998, sur de nombreuses espèces, pour l'intérêt qu'il présente dans la caractérisation de la fonction d'un gène. En revanche les méthodes d'application sont parfois laborieuses, ce qui peut limiter le nombre d'individus traités, et sont souvent invasives. Classiquement, les ARN interférents sont administrés par piqûres dans un tissu, après anesthésie des animaux. Des méthodes non invasives ont été développées pour certains organismes, tels que des vers ou des insectes (Timmons et al. 2001; Chen et al. 2010; Rouhana et al. 2013), mais ne sont pas applicables chez des organismes aquatiques et filtreurs, tels que l'huître.

Pour éviter de perturber le comportement et la physiologie des huîtres, nous avons développé une approche non invasive de l'interférence applicable aux animaux filtreurs. La stratégie du cheval de Troie est basée sur une culture de bactéries transformées par un plasmide pour exprimer les ARNdb d'intérêt (*clockdsRNA* pour l'interférence du gène *Clock*, *invdsRNA* pour la condition contrôle, produisant l'ARNdb du gène *Invertase* de la levure, absent chez les huîtres). Ces bactéries sont ensuite adsorbées sur les algues unicellulaires qui servent de nourriture aux huîtres. Cette stratégie permet aux huîtres d'incorporer ces ARNdb, tout en étant non-invasive.

Cette étude a alors deux objectifs. Le premier objectif est de valider l'efficacité de la méthode non invasive d'interférence par ARN développée pour cette expérience, appelée approche « du cheval de Troie », par la mesure du niveau d'expression du gène cible *Clock*, ainsi que celui de l'ensemble des gènes de l'horloge circadienne impactés en conséquence. Le deuxième objectif est d'évaluer si l'altération de l'horloge circadienne des huîtres modifie le niveau d'accumulation des toxines PSP lors d'une exposition à *A. minutum*.

2. Article: Trojan horse strategy for non-invasive interference of *Clock* gene in the oyster *Crassostrea gigas*.

Laura Payton^{1,2}, Mickael Perrigault^{1,2}, Jean-Paul Bourdineaud³, Anjara Marcel¹,
Jean-Charles Massabuau^{1,2}, Damien Tran^{1,2*}

¹University of Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France

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

³University of Bordeaux, CNRS, UMR 5234, Fundamental Microbiology and Pathogenicity
Laboratory, European Institute of Chemistry and Biology, 2, rue Robert Escarpit, 33607
Pessac, France

* to whom correspondence should be addressed.

UMR 5805 EPOC, Place du Dr Peyneau, 33120, Arcachon, France.

E.mail: d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr

Fax : +33 56549383

Tel : +33 562239237

Publié dans Marine Biotechnology le 3 juillet 2017

DOI: 10.1007/s10126-017-9761-9

Abstract

RNA interference is a powerful method to inhibit specific gene expression. Recently, silencing target genes by feeding has been successfully carried out in nematodes, insects, and small aquatic organisms. A non-invasive feeding-based RNA interference is reported here for the first time in a mollusk bivalve, the pacific oyster *Crassostrea gigas*. In this Trojan horse strategy, the unicellular alga *Heterocapsa triquetra* is the food supply used as a vector to feed oysters with *Escherichia coli* strain HT115 engineered to express the double stranded RNA targeting gene. To test the efficacy of the method, the *Clock* gene, a central gene of the circadian clock, was targeted for knockout. Results demonstrated specific and systemic efficiency of the Trojan horse strategy in reducing *Clock* mRNA abundance. Consequences of *Clock* disruption were observed in *Clock*-related genes (*Bmal*, *Tim1*, *Per*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erb* and *Ror*) and triploid oysters were more sensitive than diploid to the interference. This non-invasive approach shows an involvement of the circadian clock in oyster bioaccumulation of toxins produced by the harmful alga *Alexandrium minutum*.

Keywords

Crassostrea gigas, RNA interference, Feeding, Clock gene, Biological rhythms, Harmful Algae

Introduction

RNA interference (RNAi) is a mechanism of post-transcriptional gene silencing initially described in the nematode *Caenorhabditis elegans* and characterized by the introduction of double-stranded RNA (dsRNA) in cells, which induces specific inactivation of targeted genes through degradation of the corresponding endogenous mRNA (Fire et al. 1998; Mello and Conte 2004). Although the RNAi technique has been widely applied since its debut in 1998, including in fungi, plants, insects and mammals, the method had several constraints which limited its use in many research fields. For instance, RNAi is classically performed by injecting dsRNA into soft tissues; this invasive approach can compromise physiological investigations because it produces both wounds and stress and may require anesthesia. Moreover, this method is often limited to a small number of individuals since *in vitro* synthesis of dsRNA is relatively expensive and the injection procedure is time consuming. An alternative to dsRNA injection, which reduces both animal stress and non-specific responses, is to feed engineered bacteria, *Escherichia coli* strain HT115, which express dsRNA (Tabara et al. 1998; Timmons and Fire 1998). This approach is an inexpensive and high output technique to produce large quantities of dsRNA. Non-invasive, food-mediated RNA interference preserves the integrity of treated animals; it was initially reported in nematodes and thereafter in small invertebrates such as insects, planarians, sponges and microcrustaceans (Kamath et al. 2000; Timmons et al. 2001; Newmark et al. 2003; Turner et al. 2006; Sarathi et al. 2008; Nunes and Simões 2009; Walshe et al. 2009; Chen et al. 2010; Rivera et al. 2011; Li et al. 2011; Rouhana et al. 2013; Schumpert et al. 2015), but has not yet been applied to larger organisms such as bivalve mollusks.

The pacific oyster *Crassostrea gigas* is a bivalve mollusk of high interest in biological research and as an economic resource. Recent studies demonstrated the efficiency of RNAi in *C. gigas* (Fabioux et al. 2009; Huvet et al. 2012; Choi et al. 2013; Jee et al. 2014; Huvet et al. 2015a). However, all RNAi approaches in *C. gigas* and other bivalves were performed by soft tissue injection of dsRNA. In theory, oysters could be directly fed with engineered bacteria suspended in the water column, but such small particles ($\approx 1 \mu\text{m}$) are not efficiently retained by gill filtration (Dupuy et al. 2000). Larger organisms such as phytoplankton (unicellular algae with cell size $> 4\text{-}5 \mu\text{m}$) have an optimum retention rate in oysters ($\approx 100 \%$) and constitute the main food source for filter-feeders. In nature, algae and bacteria form associations via extracellular associations based on the cellulose theca of the algae (Cole 1982; Tosteson et al. 1989; Rausch De Traubenberg and Soyer-Gobillard 1990; Franca et al. 1995; Doucette 1995). Our study combined this bacteria-algae interaction with bacterial engineering to generate non-invasive RNA interference in filter-feeders. We applied it to the study of biological rhythms, a highly sensitive process that requires minimal disturbance of animals, in diploid and triploid *C. gigas* oysters.

Biological rhythms play a fundamental role in the metabolism and physiology of most living organisms. Circadian rhythms have been conserved in organisms across phyla to allow synchronization and anticipation of daily cycles and to optimize biological processes (Yerushalmi and Green 2009). At a cellular level, a molecular clock is composed of a complex network of genes organized by multiple transcriptional and translational feedback

loops coordinated with environmental cues. In *C. gigas*, genetic components of the circadian clock have been identified, including *Clock*, *Bmal*, *Period*, *Timeless 1*, *Cryptochrome 1*, *Cryptochrome 2*, *Ror* and *Rev-erb*, where the heterodimer CLOCK-BMAL is a core component, acting as the main positive transcriptional factor by inducing the transcription of the other clock genes (Perrigault and Tran 2017b).

In the field, oysters are highly susceptible to proliferation of toxic algae, or harmful algal blooms (HABs), which have major impacts on marine ecosystems and shellfish harvesting. Among those harmful algae, the dinoflagellate species *Alexandrium minutum* produces paralytic shellfish toxins (PST), and has been widely reported across the world (Bricelj and Shumway 1998; Hallegraeff et al. 2003; Anderson et al. 2012). PST bioaccumulation by oysters through the ingestion of *A. minutum* has significant consequences on oyster physiology as well as on economics and public health (FAO/WHO, 2016). Circadian clock regulation of oyster physiology and behavior could be involved in bioaccumulation of PST but has not yet been addressed.

In this work, we report for the first time a non-invasive RNAi method (Trojan horse strategy) in the oyster *C. gigas*, using unicellular algae associated to engineered bacteria to mediate *Clock* gene silencing by feeding. We used oyster ploidy, the number of chromosome sets in each nuclear cell, to evaluate the effect of RNAi on *Clock* interference and PST bioaccumulation. Genetic manipulation, done for commercial needs, produces triploid oysters (Piferrer et al. 2009). Triploidy disrupts oyster reproductive function and could modify global physiological status, such as circadian rhythmicity, and studies have shown that ploidy could affect PST accumulation (Haberkorn et al. 2010a; Guéguen et al. 2012).

Here, to assess the efficiency of the non-invasive RNAi method, we: 1) measured mRNA level of the silenced *Clock* gene; 2) observed functional consequences of *Clock* silencing on expression of other circadian clock genes; 3) investigated the implication of the oyster circadian clock on PST bioaccumulation; 4) used oyster ploidy as a proxy of differential response.

Materials and Methods

Algal culture and animals

Non-toxic alga *Heterocapsa triquetra* (strain HT99PZ) and PST-producing alga *Alexandrium minutum* (strain AM89BM) cultures were grown in f/2 medium (Guillard 1975) using artificial seawater. Cultures were maintained at $17 \pm 1^\circ\text{C}$, under a light:dark (L:D) 14:10 cycle. Both algal species are dinoflagellates with similar morphology and size (19-29 μm).

Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, were 18 months old (32 diploid (2N) oysters of 59.6 ± 8 mm shell length and 32 triploid (3N) oysters of 75.7 ± 7 mm shell length; mean \pm SE) and collected from an oyster farm (Arcachon bay, France). Experiments were performed at the Marine Station in Arcachon (France) in June 2015. Oysters were divided into 4 tanks of 20 L

(8 diploid and 8 triploid oysters per tank) equipped with an open circulatory system of artificial seawater (ASW, 30 psu, Instant ocean) at a flow rate of 20 ml.min⁻¹. Oysters were acclimated 7 days before the start of the experiment under a 15:9 L:D regime, to match the late Spring light at the time of the experiments, and continuously fed with *H. triquetra* (10,000 cells.ml⁻¹ at a flow rate of 20 ml.min⁻¹).

Vector construction and expression of dsRNA

Fragments of *CgClock* from *C. gigas* (1104 bp, from positions 315 to 1418 of the 2031 bp long *CgClock* gene, KX371073) and *Invertase* from *Saccharomyces cerevisiae* (1599 bp, AB495285) were amplified by PCR using specific primers (Table S1). Fragments were purified, ligated into pGEM-T vectors (Promega, Madison, USA) and used to transform DH5 α bacteria (Invitrogen, USA). Bacteria were cultured in Luria-Bertani (LB) broth containing 100 μ g.ml⁻¹ ampicillin. Plasmids containing inserts were extracted, digested with SpeI and SacII and sub-cloned into p4440 (Abgene), generating constructs *pClock* and *pInv*. Each construction was confirmed by sequencing. Competent *E. coli* cells HT115 ([F-, mcrA, mcrB, IN (rrnD-rrnE) 1, rnc14:Tn10 (DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase)], deficient in RNase III) were used for efficient production of dsRNAs. HT115 (DE3) competent cells were prepared using standard CaCl₂ methodology and were transformed with constructions (*pClock* and *pInv*). Individual clones were selected on LB-agar with ampicillin and tetracycline and tested to validate construction and dsRNA induction under the conditions described below.

Experimental procedures

During the first phase (interference treatment), two tanks of diploid (2N) and triploid (3N) oysters were continuously exposed to the *H. triquetra* / dsRNA-producing bacteria co-inoculum (*clockdsRNA* condition i.e., Trojan horse strategy) for 5 days. Two other tanks were exposed to algae / *Invertase* dsRNA-producer bacteria (*invdsRNA* condition) as a control condition. Algae / bacteria co-inoculum was produced by mixing algal culture and bacterial suspension at a ratio of 600 bacteria per algal cell, with a final *H. triquetra* concentration of 10,000 cells.ml⁻¹ and were continuously supplied to tanks at a flow rate of 20 ml.min⁻¹. Food reserves were renewed with fresh algae / bacteria co-inoculum every 8 hours. Briefly, overnight cultures of transformed bacteria were generated daily and, every 8h, 7 ml of overnight culture was diluted 100-fold in 500 ml of fresh LB medium containing ampicillin (50 μ g/ml) and tetracycline (12,5 μ g/ml) at 37°C and under agitation (220 rpm). Optical density of bacterial cultures was monitored at 595 nm and an OD of 0.4 and dsRNA production was induced by 0.4 mM IPTG for 4 h at 37°C under agitation. Cultures were centrifuged and bacterial pellets were washed twice in ASW and re-suspended in 30 ml ASW before OD assessment. Bacteria adsorption rate on algae was evaluated to 25-35 % by preliminary experiments. Briefly, algae/bacteria inoculum was filtrated through 5 μ m pore size (Minisart steril-EO 5 μ m) and was spread on LB agar (100 μ g.ml⁻¹ ampicillin), as well as

the total inoculum. The adsorption rate was assessed as the difference between the number of colonies from total inoculum and from filtrated suspension.

During the second phase (*A. minutum* exposure), *clockdsRNA* and *invdsRNA* oysters were continuously exposed to 2,500 cells.ml⁻¹ of *A. minutum* at a flow rate of 20 ml.min⁻¹ for 5 additional days. Concentrations of algae and bacteria were monitored daily with a coulter (Coulter Z2, Beckman Coulter Inc., USA) for the duration of the experiment. Gill tissues from 16 oysters per condition were individually sampled at the end of the interference phase (day 5) and at the end of the *A. minutum* phase (day 10) and immediately processed for RNA extraction (n = 64). Because of the death of one oyster in *clockdsRNA* 2N condition, only 15 oysters were sampled at day 10. All research complied with French laws and was performed in conformity with institutional guidelines.

Total RNA extraction and cDNA synthesis

RNA extractions were performed on individual samples using Tri reagent (Ambion), per the manufacturer's instructions. Total RNA quantity and quality were assessed by spectrophotometry (OD260, OD280) and 5 µg of total RNA was individually subjected to reverse transcription using M-MLV (Promega).

Real-Time PCR analyses

Real time PCR reactions were performed on individual samples with Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix kits (Stratagene, USA) at a final concentration of 100 nM for each primer according to manufacturer's instructions. Primers set were designed from full cDNA sequences of *CgClock* (*Clock*), *CgClockp* (*pClock*), *CgCryptochrome 1* (*Cry1*), *CgCryptochrome 2* (*Cry2*), *CgPeriod* (*Period*), *CgBmal* (*Bmal*), *CgTimeless 1* (*Tim1*), *CgRev-erb* (*Rev-erb*), *CgRor* (*Ror*) (Perrigault and Tran 2017b); glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gadph*) and elongation factor (*Efl*) were used as reference genes (Table 1). Primers set (*CgClock*) for endogenous *Clock* mRNA level were designed in the region outside the cloned fragment of *pClock* (amplicon position from 1553 to 1799) to avoid quantification of RNAi products (*Clock dsRNA*). Primers set (*CgClockp*) were designed in the region inside the cloned fragment of *pClock* (amplicon position from 1084 to 1175). PCR efficiency (E) was assessed for each primer pair by determining the slope of standard curves obtained from cDNA serial dilution analyses of different experimental samples. Reactions were initiated with DNA polymerase activation at 95°C for 10 min followed by amplification of the target cDNA (40 cycles: denaturation at 95°C for 30 s, annealing and extension at 72°C for 1 min). Reaction specificity was controlled using a melting curve step from 95°C to 60°C (temperature decrease of 0.5°C every 10 s). The comparative Ct method 2^{-ΔCt} method (Livak and Schmittgen 2001) was used to determine transcript levels of circadian clock candidates, where ΔCt = Ct(gene) - Ct(housekeeping gene). Clock genes values were normalized in each sample with *Gadph* housekeeping gene levels, as no significant differences in Ct values were

observed in *Gadph* between conditions. Results were expressed as number of copies of gene per copy of *Gadph*.

The detection of RNAi products (*Clock* dsRNAs) in oyster gills was assessed as the mean \pm SE of individuals $2^{-(\Delta Ct (CgClockp) - \Delta Ct (CgClock))}$, *i.e.* the ratio of the *Clock* mRNA level measured with primers set (*CgClockp*) designed in the region inside the cloned fragment of *pClock* (allowing amplification and thereby quantification of both endogenously expressed *Clock* mRNAs and *Clock* dsRNAs), to the *Clock* mRNA level obtained with primers set (*CgClock*) designed in the region outside the cloned fragment of *pClock* (and only able to hybridize and quantify the endogenously expressed *Clock* mRNAs). Therefore, this ratio is equal to $(Clock\ dsRNAs + Clock\ mRNAs)/Clock\ mRNAs = (Clock\ dsRNAs/Clock\ mRNAs) + 1$.

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

	Primer names	Primer sequences
Plasmid construction	<i>Clock</i> dsRNA-F	AGCTCAGGCCCATGAAATC
	<i>Clock</i> dsRNA-R	GTCATTGTGTGCGGGAGAT
	<i>Invertase</i> dsRNA-F	GGGCTGGATGAATGACCCAA
	<i>Invertase</i> dsRNA-R	CCACATCTCCATCGTTGA
Quantitative real-time PCR	<i>CgClock</i> -F	TGGGAATGATGTCCAACAGAG
	<i>CgClock</i> -R	GGTCCATCAATGACAGGAAGT
	<i>CgClockp</i> -F	CGCTACTACATAACGTACCATCAG
	<i>CgClockp</i> -R	TGTTCTCTAACATCGGCATAGC
	<i>CgCry2</i> -F	AACCTTACAGCAAGCACGAA
	<i>CgCry2</i> -R	TGACATCTGGCTGTGGTTTC
	<i>CgBmal</i> -F	CACAAGTTCAGGTCAGAGTGTAG
	<i>CgBmal</i> -R	TCACCTGAGGTAGACTGGTTAT
	<i>CgPeriod</i> -F	CCGATGACAGAAATCCCAGTAG
	<i>CgPeriod</i> -R	CCATCCTATTCTCCTGCTCTTG
	<i>CgTimeless</i> -F	AAAGATCCCGGACACAGTATG
	<i>CgTimeless</i> -R	TGGAACTCGTTCCTGACTTG
	<i>CgCry1</i> -F	TCATGAAGCAGCTCAGATACG
	<i>CgCry1</i> -R	ACCTCCCAGTTCAACCAAAG
	<i>CgRev-erb</i> -F	GACTTTGCTGATCGCTTCAAC
	<i>CgRev-erb</i> -R	CTTTCCAAGTCTCCACATTTTC
	<i>CgRor</i> -F	CTACGTGAGCAGGTGTTTGA
	<i>CgRor</i> -R	CGTCCGCTATGTCCTTCAAT
	<i>Gadph</i> -F	CGTACCAGTTCCAGATGTTTCC
	<i>Gadph</i> -R	GCCTTGATGGCTGCCTTAATA
	<i>Ef1</i> -F	ACCACCCTGGTGAGATCAAG
	<i>Ef1</i> -R	ACGACGATCGCATTTCTCTT

Elongation factor 1 and *Gadph* (*EF1*, AB122066 and GAPDH, CAD67717) were tested as housekeeping genes. F and R designate forward, and reverse primers respectively.

Paralytic Shellfish Toxin (PST) quantification

PST (saxitoxin) concentration in gill tissues of diploid and triploid oysters was assessed at day 10 using a direct competitive ELISA assay (Abraxis, USA) following manufacturer's instructions and previous studies (Tran et al. 2015).

Statistical analyses

Data were expressed as mean \pm SE. Differences between variables (mRNA level and PST content) were investigated using ANOVA after checking assumptions (normality of data and equal variance tests). When assumptions were not validated, non-parametric tests were performed. A Kruskal–Wallis One-Way ANOVA on rank was applied to compare two distributions, followed by Dunn's Method for all pairwise multiple comparisons. Three-Way ANOVA was performed to compare the effect of 3 variables (ploidy, phase, RNAi), followed by the Student-Newman-Keuls method for all pairwise multiple comparisons. For all statistical results, a probability of $p < 0.05$ was considered significant. Analyses were performed with SigmaStat (Version 3.5, Systat, Chicago, USA).

Results

Plasmid constructs and induction assays

The RNAi approach using the Trojan horse strategy required optimization of dsRNA production and delivery conditions, defined according to previous studies (Timmons et al. 2001). The *Clock* gene from *C. gigas* was selected for its central role in the molecular circadian clock and *Invertase* from *S. cerevisiae* was chosen as a control. After induction with 0.4 mM IPTG at 37 °C for 4 hours, isolated RNA from induced and non-induced engineered bacteria was analyzed via 1 % agarose gel electrophoresis. A band of dsRNA corresponding to the *Clock* gene (1104 bp) was observed in the IPTG-induced *E. coli* transformed with p*Clock* (Fig. 1, lane 3), but not in the non-induced *E. coli* transformed with p*Clock* (Fig. 1, lane 2), indicating the successful expression of *Clock* dsRNA in *E. coli*. Similarly, a band of dsRNA corresponding to the *Invertase* gene (1599 pb) was observed in the IPTG-induced *E. coli* transformed with p*Inv* (Fig. 1, lane 5), but not in the non-induced *E. coli* transformed with p*Inv* (Fig. 1, lane 4), indicating the successful expression of *Invertase* dsRNA in *E. coli*.

Detection of RNAi products in gill tissues

The detection of RNAi products (*Clock* dsRNA) in oyster gills was assessed as a function of the ratio of the interfering *Clock* dsRNAs to the endogenous *Clock* mRNAs level (Fig. 2). The significant levels of RNAi products in 2N and 3N *clock*dsRNA oysters compared to respective *inv*dsRNA oysters at day 5 ($p = 0.001$ and $p = 0.002$ respectively) is a clear evidence of dsRNA entrance in gill tissues during the phase of interference treatment. At day

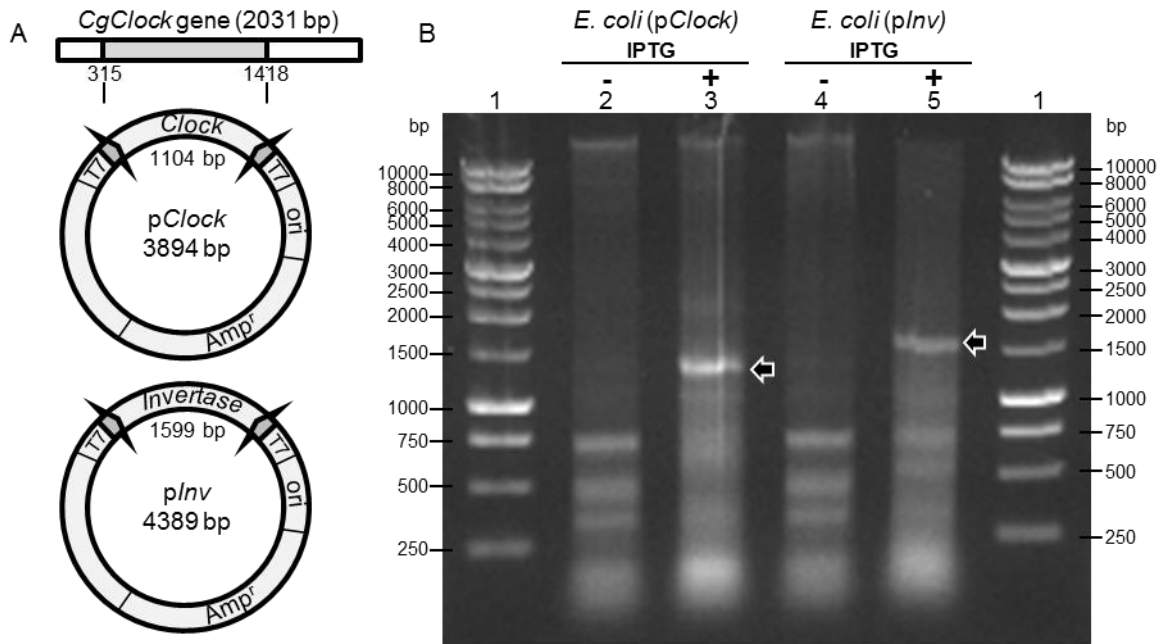


Figure 1. Plasmid constructs and induction assays. (A) Plasmid construction of pClock and pInv with Clock and Invertase fragments sizes and total plasmids sizes. Clock fragment position on CgClock gene was indicated on the top. (B) Lanes 1 in gel electrophoresis corresponded to a 1kb DNA Ladder (Promega, Madison). Arrows indicated bands associated with Clock (lane 3, 1104 bp) and Invertase (lane 5, 1599 bp) double stranded RNAs, from RNAs extraction of the IPTG-induced *E. coli* transformed with pClock (*E. coli* (pClock)) and pInv (*E. coli* (pInv)) respectively.

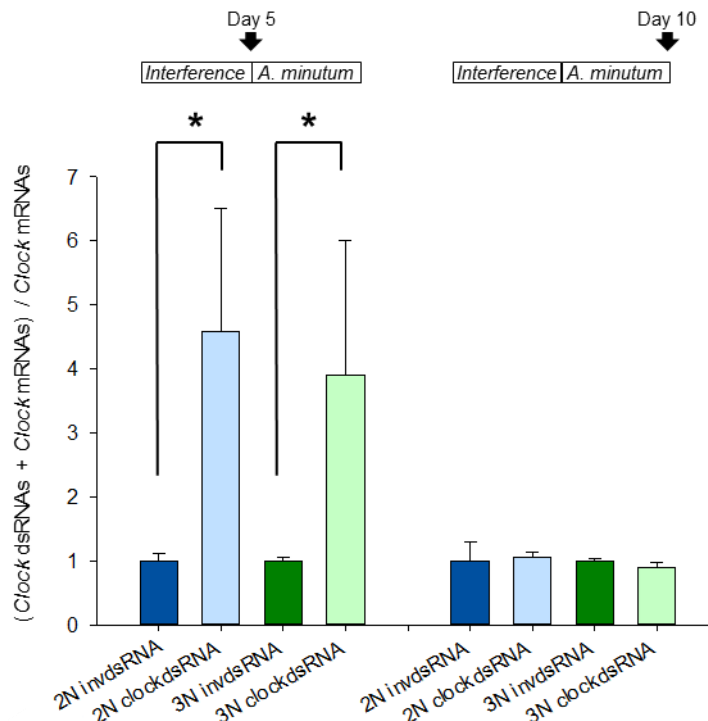


Figure 2. Detection of RNAi products in gill tissues. Levels of RNAi products as the ratio between all Clock RNAs (Clock dsRNAs + Clock mRNAs) and exclusively endogenous Clock mRNAs, analyzed by qPCR in gills of diploid (2N) and triploid (3N) oysters at the end of interference (day 5) and *A. minutum* (day 10) phases, set to 1 in control invdsRNA oysters (mean \pm SE, n = 15-16). Asterisks referred to significant differences between invdsRNA and clockdsRNA oysters for each ploidy and at each sampling time ($p < 0.05$).

5, *Clock* dsRNAs were 3.6 and 2.9-times more abundant than endogenously expressed *Clock* mRNAs in RNAi-treated 2N and 3N oysters, respectively. At day 10, RNAi products were no longer detected.

Efficiency of RNAi on the target *Clock* transcripts

A significant 29 % decrease in the mean level of *Clock* transcripts was seen in 3N oysters of the *clockdsRNA* condition compared to *invdsRNA* oysters ($p = 0.018$) at the end of the experiment (day 10). There were no significant differences in *Clock* transcripts between *clockdsRNA* and control (*invdsRNA*) in 2N ($p = 0.185$) or 3N ($p = 0.353$) oysters at the end of interference exposure (day 5, Fig. 3A) nor in 2N ($p = 0.079$) at the end of the experiment (day 10). At day 10, individual analysis revealed that 53.3 % of 2N and 62.5 % of 3N *clockdsRNA* oysters expressed *Clock* transcript decreased by more than 40 % compare to control (Fig. 3B).

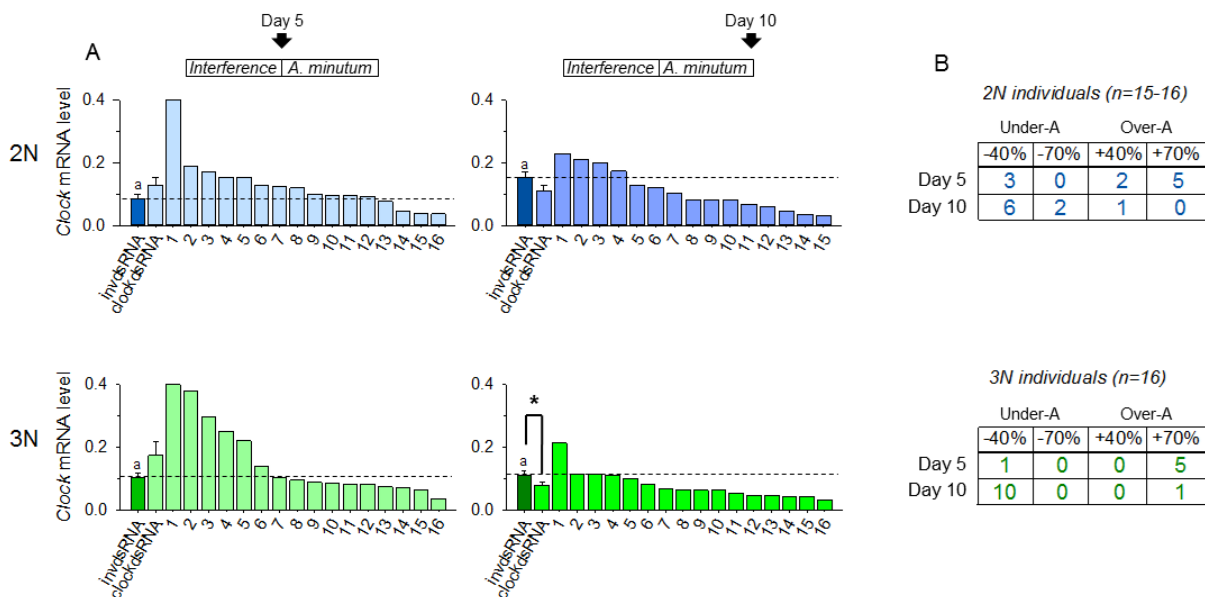


Figure 3. Levels of *Clock* transcripts relative to *Gadph* transcripts analyzed by qPCR and expressed as number of copies of *Clock* per copy of *Gadph*, in gills of diploid (2N) and triploid (3N) oysters at the end of interference (day 5) and *A. minutum* (day 10) phases, expressed in fold change. (A) Results expressed as mean mRNA abundance for *invdsRNA* and *clockdsRNA* oysters (FC, mean \pm SE, $n = 15-16$) as well as individual transcript levels for *clockdsRNA* condition. The horizontal dotted line refers to the mean value in *invdsRNA* oysters. Letters indicate significant differences in *invdsRNA* oysters between sampling times and ploidy, and asterisks referred to significant differences between *invdsRNA* and *clockdsRNA* oysters at each sampling time and each ploidy ($p < 0.05$). (B) Number of *clockdsRNA* individuals presenting under abundance (under-A) or over abundance (over-A) relative to the corresponding mean level in *invdsRNA* oysters.

Effects of RNAi on the expression of core clock genes

Further effects of *Clock* silencing on transcript levels of other clock components in the gills of 2N and 3N *C. gigas* are shown in Fig. 4 and 5. On day 10, in 2N and 3N oysters, significant decreases of *Period* (39 %, $p = 0.005$ in 2N, 35 %, $p = 0.027$ in 3N), *Rev-erb* (47 %, $p = 0.016$ in 2N, 61 %, $p < 0.001$ in 3N) and *Cry 1* (44 %, $p = 0.019$ in 2N, 42 %, $p = 0.004$ in 3N) were observed in *clockdsRNA* oysters (day 10, Fig. 4A and 5A). In 3N oysters on day 10, *Bmal* was also significantly decreased (45 %, $p = 0.002$) in *clockdsRNA* oysters (Fig. 5A). On day 5, only *Tim1* presented a 40 % decrease ($p = 0.01$) in *clockdsRNA* 2N oysters (Fig. 4A). In control oysters, from day 5 to day 10, a significant decrease of *Rev-erb* transcripts was noted in *invdsRNA* 2N ($p = 0.004$) and 3N ($p = 0.023$), whereas others were stable throughout the experiment (Fig. 4A and 5A). Individual analysis revealed a global decrease in the expression of clock components in *clockdsRNA* oysters on day 10. For instance, more than half of *clockdsRNA* oysters exhibited lower transcript levels (> 40%) than *invdsRNA* oysters for *Bmal*, *Cry2* and *Ror* in 3N and for *Period*, *Rev-erb* and *Cry1* in both 2N and 3N (day 10, Fig. 4B and 5B). Finally, 3-way ANOVA on the expression of the whole set of clock genes (8 genes, Table 2) revealed a significant impact of RNAi (*clockdsRNA* oysters vs *invdsRNA* oysters) in both phases of the experiment and a phase effect (day 5 vs day 10) in *clockdsRNA* oysters but not in *invdsRNA* oysters.

Table 2 Three-way ANOVA analysis assessing the effect of ploidy, phase and RNAi effect on whole clock gene mRNA levels (*Clock*, *Bmal*, *Period*, *Tim1*, *Cry2*, *Ror*, *Rev-erb* and *Cry1*) in oyster gills.

Effect of phase (day 5 / day 10)	$p < \mathbf{0.001}$
Effect of RNAi (<i>invdsRNA</i> / <i>clockdsRNA</i>)	$p = 0.933$
Effect of ploidy (2N / 3N)	$p = 0.084$
Interaction between phase and RNAi	$p < \mathbf{0.001}$
RNAi effect (<i>invdsRNA</i> / <i>clockdsRNA</i>)	
At day 5	$p = \mathbf{0.001}$
At day 10	$p = \mathbf{0.002}$
Phase effect (day 5 / day 10)	
Within <i>invdsRNA</i>	$p = 0.540$
Within <i>clockdsRNA</i>	$p < \mathbf{0.001}$

Impact of RNAi on PST bioaccumulation

Consequences of *Clock* gene silencing and clock alteration in 2N and 3N oysters on PST bioaccumulation in gills are shown in Fig. 6. PST content in the gills of oysters on day 10 was significantly decreased in *clockdsRNA* 3N oysters compared to *invdsRNA* 3N oysters ($p = 0.023$). In contrast, there was no significant difference in PST bioaccumulation in 2N oysters.

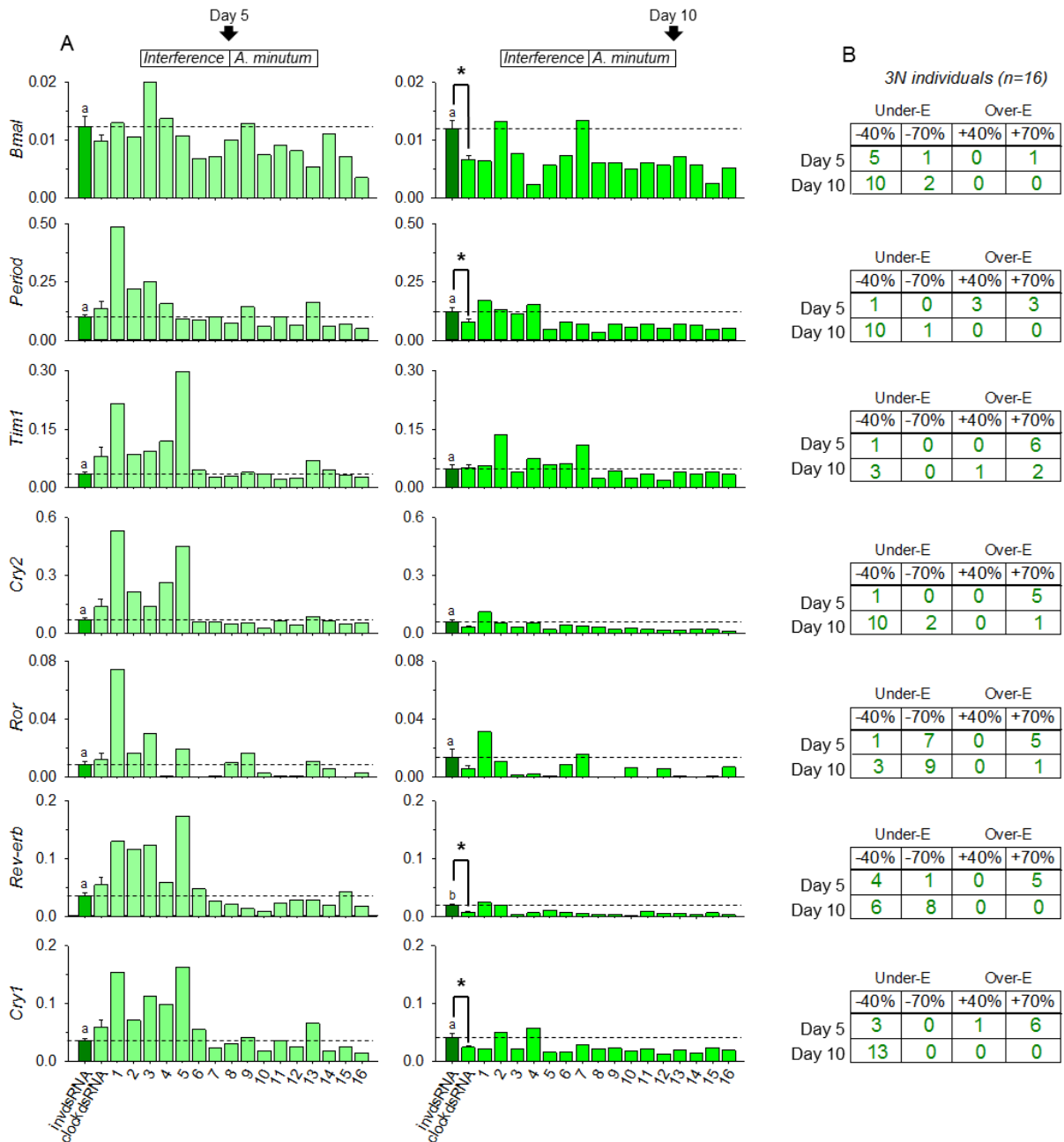


Figure 5. Levels of circadian clock transcripts relative to *Gadph* transcripts analyzed by qPCR, in gills of triploid (3N) oysters analyzed by qPCR at the end of interference (day 5) and *A. minutum* (day 10) phases, expressed as number of copies of gene of interest per copy of *Gadph*. (A) Results are expressed as mean expression values for *invdsRNA* and *clockdsRNA* oysters (mean \pm SE, n = 16) as well as individual transcript levels for *clockdsRNA*. The horizontal dotted line refers to the mean value in *invdsRNA*. Letters indicated significant differences in *invdsRNA* oysters between sampling times and asterisks referred to significant differences between *invdsRNA* and *clockdsRNA* oysters at each sampling time ($p < 0.05$). (B) Numbers of *clockdsRNA* individuals presenting under-expression (under-E) or over-expression (over-E) relative to the corresponding mean level in *invdsRNA* oysters.

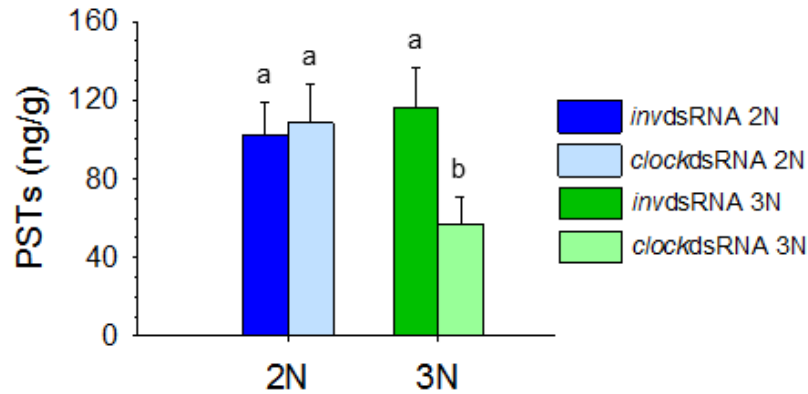


Figure 6. PST bioaccumulation in gills of 2N and 3N oysters at day 10 (mean \pm SE, n = 16). Letters indicated significant differences among conditions ($p < 0.05$).

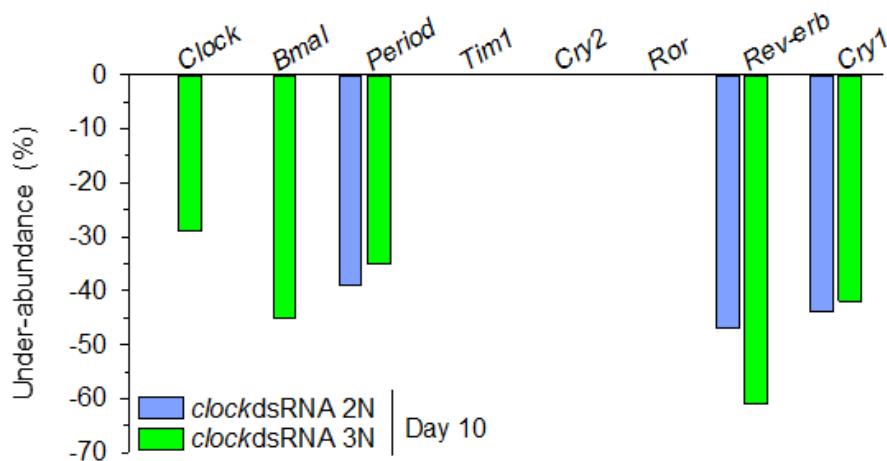


Figure 7. Summary of significant alteration ($p < 0.05$) of clock genes mRNA levels in gills of 2N and 3N oysters exposed to *clockdsRNA* at the end of the experiment (day 10).

Discussion

This experiment demonstrated that the Trojan horse strategy, a feeding-based, non-invasive RNAi approach using the dinoflagellate *H. triquetra* as a vector for the dsRNA-producer *E. coli* HT115, is an efficient method to trigger a specific RNAi response in *C. gigas*. The interference was more efficient in triploid than in diploid oysters. In triploids, a 29 % reduction of *Clock* mRNA level was observed at day 10 compared to *invdsRNA* condition (see the summary, Figure 7). This result was validated by the 62.5 % of 3N individuals with *Clock* mRNA level decreased by more than 40 %. Moreover, the impact of *Clock* gene interference on the expression of other components of the circadian clock was clearly shown, with a decrease of mean expression for four associated genes, *Period*, *Bmal*, *Rev-erb* and *Cry1* in 3N oysters (Fig. 7). Silencing the *Clock* gene in other organisms, using direct dsRNA

injection by syringe, also significantly decreased *Period* transcripts (Moriyama et al. 2012; Takekata et al. 2014). This attests to the functional impact of *Clock* interference, as *Clock* codes for a protein crucial in the interconnected feedback loops of the circadian clock (Perrigault and Tran 2017b). A significant effect of RNAi on the entire core clock gene mRNA level regardless of ploidy status was confirmed by a 3-way ANOVA. However, despite a significant under-expression of *Period*, *Rev-erb* and *Cry 1* at day 10 in 2N oysters (Fig. 7), no apparent decrease of mean *Clock* mRNA level was observed. Physiological variations between 2N and 3N oysters have been observed in numerous studies and could explain the differential efficiency of Trojan horse strategy depending on ploidy status (Shpigel et al. 1992; Hawkins et al. 2000; Nell 2002a). Results of PST gill content showed decreased bioaccumulation for the interference condition in 3N but not 2N oysters. These results suggested that when the clock is sufficiently disrupted it could modify the phycotoxin bioaccumulation rate. Indeed, the circadian clock of 3N oysters was more disrupted than that of 2N oysters: 5 clock genes in 3N versus 3 in 2N were under-expressed with the genes *Clock* and *Bmal* disrupted only in 3N (Fig. 7). These genes code for the heterodimer CLOCK-BMAL, the principal positive transcription factor of the clock and clock-controlled genes (Dunlap 1999; Perrigault and Tran 2017b) involved in the tempo of physiological and metabolic functions in oysters. These results strongly suggested a difference in the impact of clock interference on physiological outputs between 2N and 3N oysters.

In gill tissues, the presence of dsRNAs in *clockdsRNA* oysters during the interference treatment phase, as well as the interference effects previously discussed, showed a systemic interference response with a feeding approach in *C. gigas* (Whangbo and Hunter 2008). This is in accordance with previous studies on other aquatic invertebrates: the sponges *Tethya wilhelma* and *Ephydatia muelleri*, the microcrustacean *Daphnia*, and the shrimp *Penaeus monodon* (Sarathi et al. 2008; Rivera et al. 2011; Schumpert et al. 2015). The efficiency of the Trojan horse strategy was delayed, occurring 10 days after the start of interference treatment, when RNAi products were no longer detected in gills tissues. This result could appear counterintuitive but it is not. During the interference process, the dsRNA are digested in small interfering RNAs (primary siRNAs) by the DICER endonuclease. Additionally, delayed effect of interference suggested either a long lifespan of siRNAs or the existence of an endogenous siRNA amplification (forming secondary siRNAs) by an RNA polymerase, as it was demonstrated in *Drosophila* and *Caenorhabditis* (Sijen et al. 2001, 2007; Agrawal et al. 2003; Pak and Fire 2007). Moreover, this late effect was in agreement with results observed in *C. gigas* (Choi et al. 2013; Jee et al. 2014), and the pearl oyster *Pinctada fucata* (Suzuki et al. 2009; Fang et al. 2011; Funabara et al. 2014), where knockout RNAi effects were observed in distant parts of the organism 6 to 8 days after injection of dsRNA into the adductor muscle. In *C. gigas*, oyster *vasa*-like gene interference by injection of dsRNA directly in gonadic tissues lead to a maximum effect 15 days to one month post injection (Fabioux et al. 2009). Similarly, in insects, RNAi reached maximum effect 1-2 weeks and 1 month after the injection of dsRNA in crickets and firebrats, respectively (Uryu et al. 2013), with no more detection of RNAi products at those times. In our experiment, the 3-way analysis showed an effect of algae / bacteria association exposure at day 5 on the whole clock genes, corresponding to a global trend towards over-expression of clock genes, despite no significant

increases of mRNA level in the gene by gene analyses. Increased mRNA abundance of target genes was observed in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* fed with dsRNA or bacteria expressing dsRNA (Li et al. 2011). The 3-way analysis also validated the stability of the clock genes mRNA levels in *invdsRNA* where *Rev-erb* was the only modified transcript between days 5 and 10, probably due to *A. minutum* exposure, as indeed PST has already been associated with perturbation of the circadian clock system in *C. gigas* (Mat et al. 2013; Tran et al. 2015).

Finally, several parameters can be optimized to achieve a maximal knockout of gene expression, including the algae / bacteria co-inoculum concentration in order to increase the bacteria adsorption rate, and the treatment duration (Suzuki et al. 2009; Fang et al. 2011; Rivera et al. 2011; Schumpert et al. 2015). In *Caenorhabditis elegans*, the interference effect generated by feeding can be titrated to uncover a series of hypomorphic phenotypes, by feeding bacteria induced with different concentrations of IPTG (Kamath et al. 2000). These considerations promise opportunities to develop this feeding-based RNAi delivery method in oysters.

These results showed, for the first time to our knowledge that a circadian clock alteration led to a modification in bioaccumulation. In mammals, links between circadian clock and pharmaceutical actions have led to pharmacokinetics and pharmacodynamics approaches in treatment to increase drug effects or decrease side effects (Redfern 2003). The molecular explanation of this phenomenon is that most aspects of xenobiotic metabolism and excretion are subjected to circadian regulation (Claudel et al. 2007; Gachon and Firsov 2011). In *C. gigas*, modification of toxin bioaccumulation through an alteration of circadian clock could be explained by a circadian regulation of valve behavior, gill filtration, digestion, or toxin metabolism and excretion. It is already known that valve opening duration in *C. gigas* was controlled by an endogenous circadian clock (Mat et al. 2012), and that digestive processes follow circadian cycles (Tran et al. 2015). The observation of high algae concentration in *clockdsRNA* tanks at the end of the experiment, suggesting reduced feeding (results not shown), fortify this hypothesis. This evidence of biological rhythms influencing toxin bioaccumulation opened new considerations in ecotoxicological and fisheries studies. Knowledge is still limited concerning aquatic organisms, but there is evidence showing the alteration of circadian clock by factors such as light pollution, drugs, or xenobiotics (Nakamura et al. 2005; Garrett and Gasiewicz 2006; Mukai and Tischkau 2007; Navara and Nelson 2007; Fonken et al. 2010; Tran et al. 2015). Circadian clock disturbances should not be neglected as they can influence contamination processes.

In conclusion, these results show that the Trojan horse strategy, which used micro algae as a vector for the dsRNA-producer *E. coli* HT115 for RNAi by feeding, is an efficient method to trigger a non-invasive, specific and systemic RNAi response in the oyster *C. gigas*, and constitutes a promising tool for elucidating gene functions in filter-feeders. Moreover, the involvement of biological rhythms in toxin bioaccumulation in a harmful algal bloom context is strongly suggested, opening new consideration in ecotoxicology studies.

Acknowledgements

This work was supported by the financial support of the National Research Agency (ANR), ACCUTOX project 13-CESA-0019 (2013-2017) and a ministerial PhD scholarship for L. Payton. Authors thank Dr. Denis Dupuy (IECB, ARNA-INSERM, U869, Pessac, France) for providing HT115 bacteria, Dr. H el ene Hegaret and Dr. Malwenn Lassudrie (LEMAR, UMR 6539, Plouzan e, France) for providing *A. minutum* (strain AM89BM). Authors also thank Dr. Katherine Flynn for English corrections.

References

- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmmed A, et al (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:657–685. doi: 10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003
- Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (2012) Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annu Rev Mar Sci* 4:143–176. doi: 10.1146/annurev-marine-120308-081121
- Bricelj VM, Shumway SE (1998) Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev Fish Sci* 6:315–383. doi: 10.1080/10641269891314294
- Chen J, Zhang D, Yao Q, et al (2010) Feeding-based RNA interference of a *trehalose phosphate synthase* gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol Biol* 19:777–786. doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01038.x
- Choi SH, Jee BY, Lee SJ, et al (2013) Effects of RNA interference-mediated knock-down of *hypoxia-inducible factor-α* on respiratory burst activity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 35:476–479. doi: 10.1016/j.fsi.2013.05.001
- Claud el T, Cretenet G, Saumet A, Gachon F (2007) Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock. *FEBS Lett* 581:3626–3633. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.009
- Cole JJ (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annu Rev Ecol Syst* 13:291–314.
- Doucette GJ (1995) Interactions between bacteria and harmful algae: A review. *Nat Toxins* 3:65–74. doi: 10.1002/nt.2620030202
- Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96:271–290. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80566-8

- Dupuy C, Vaquer A, Lam Hoai T, et al (2000) Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. *Mar Ecol Prog Ser* 205:171–184.
- Fabioux C, Corporeau C, Quillien V, et al (2009) In vivo RNA interference in oyster –*vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS J* 276:2566–2573. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06982.x
- Fang D, Xu G, Hu Y, et al (2011) Identification of genes directly involved in shell formation and their functions in pearl oyster, *Pinctada fucata*. *PLOS ONE* 6:e21860. doi: 10.1371/journal.pone.0021860
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811. doi: 10.1038/35888
- Fonken LK, Workman JL, Walton JC, et al (2010) Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci* 107:18664–18669. doi: 10.1073/pnas.1008734107
- Franca S, Viegas S, Mascarenhas V, et al (1995) Prokaryotes in association with a toxic *Alexandrium lusitanicum* in culture.
- Funabara D, Ohmori F, Kinoshita S, et al (2014) Novel genes participating in the formation of prismatic and nacreous layers in the pearl oyster as revealed by their tissue distribution and RNA interference Knockdown. *PLOS ONE* 9:e84706. doi: 10.1371/journal.pone.0084706
- Gachon F, Firsov D (2011) The role of circadian timing system on drug metabolism and detoxification. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7:147–158. doi: 10.1517/17425255.2011.544251
- Garrett RW, Gasiewicz TA (2006) The *aryl hydrocarbon receptor agonist* 2, 3, 7, 8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* alters the circadian rhythms, quiescence, and expression of clock genes in murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Mol Pharmacol* 69:2076–2083.
- Guéguen M, Baron R, Bardouil M, et al (2012) Influence of *Crassostrea gigas* (Thunberg) sexual maturation stage and ploidy on uptake of paralytic phycotoxins. *Toxicon* 60:40–43. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.03.003
- Guillard RRL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH (eds) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer US, Boston, MA, pp 29–60
- Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, et al (2010) Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 97:96–108. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.12.006

- Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD, Enevoldsen HO (2003) Manual on harmful marine microalgae. Unesco
- Hawkins AJS, Magoulas A, Héral M, et al (2000) Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genet Res* 76:273–284.
- Huvet A, Béguel J-P, Cavaleiro NP, et al (2015) Disruption of *amylase* genes by RNA interference affects reproduction in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Biol* 218:1740–1747. doi: 10.1242/jeb.116699
- Huvet A, Fleury E, Corporeau C, et al (2012) In vivo RNA interference of a gonad-specific transforming *growth factor-β* in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol* 14:402–410. doi: 10.1007/s10126-011-9421-4
- Jee BY, Kim MS, Cho MY, et al (2014) Simultaneous and systemic knock-down of *Big Defensin 1* and 2 gene expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* using long double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Fish Aquat Sci* 17:377–380.
- Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, et al (2000) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2:research0002. doi: 10.1186/gb-2000-2-1-research0002
- Li X, Zhang M, Zhang H (2011) RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLOS ONE* 6:e17788. doi: 10.1371/journal.pone.0017788
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Mat AM, Haberkorn H, Bourdineaud J-P, et al (2013) Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum*. *Aquat Toxicol* 140–141:458–465. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.07.008
- Mat AM, 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. doi: 10.3109/07420528.2012.699126
- Mello CC, Conte D (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431:338–342. doi: 10.1038/nature02872
- Moriyama Y, Kamae Y, Uryu O, Tomioka K (2012) *Gb*'Clock is expressed in the optic lobe and is required for the circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J Biol Rhythms* 27:467–477. doi: 10.1177/0748730412462207
- Mukai M, Tischkau SA (2007) Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: searching for a physiological role for *aryl hydrocarbon receptor*. *Toxicol Sci* 95:172–181.

- Nakamura TJ, Moriya T, Inoue S, et al (2005) Estrogen differentially regulates expression of *Per1* and *Per2* genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. *J Neurosci Res* 82:622–630.
- Navara KJ, Nelson RJ (2007) The dark side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences. *J Pineal Res* 43:215–224. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00473.x
- Nell JA (2002) Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210:69–88. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00861-4
- Newmark PA, Reddien PW, Cebrià F, Alvarado AS (2003) Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc Natl Acad Sci* 100:11861–11865. doi: 10.1073/pnas.1834205100
- Nunes FMF, Simões ZLP (2009) A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect Biochem Mol Biol* 39:157–160. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.10.011
- Pak J, Fire A (2007) Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* 315:241–244. doi: 10.1126/science.1132839
- Perrigault M, Tran D (2017) Identification of the molecular clockwork of the oyster *Crassostrea gigas*. *PLOS ONE* 12:e0169790. doi: 10.1371/journal.pone.0169790
- Piferrer F, Beaumont A, Falguière J-C, et al (2009) Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293:125–156. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.036
- Rausch De Traubenberg C, Soyer-Gobillard MO (1990) Bacteria associated with a photosynthetic dinoflagellate in culture. *Symbiosis* 8:117–133.
- Redfern P (2003) *Chronotherapeutics*. Pharmaceutical Press
- Rivera AS, Hammel JU, Haen KM, et al (2011) RNA interference in marine and freshwater sponges: actin knockdown in *Tethya wilhelma* and *Ephydatia muelleriby* ingested dsRNA expressing bacteria. *BMC Biotechnol* 11:67. doi: 10.1186/1472-6750-11-67
- Rouhana L, Weiss JA, Forsthoefel DJ, et al (2013) RNA interference by feeding in vitro-synthesized double-stranded RNA to planarians: Methodology and dynamics. *Dev Dyn* 242:718–730. doi: 10.1002/dvdy.23950
- Sarathi M, Simon MC, Venkatesan C, Hameed ASS (2008) Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Mar Biotechnol* 10:242–249. doi: 10.1007/s10126-007-9057-6
- Schumpert CA, Dudycha JL, Patel RC (2015) Development of an efficient RNA interference method by feeding for the microcrustacean *Daphnia*. *BMC Biotechnol* 15:91. doi: 10.1186/s12896-015-0209-x

- Shpigel M, Barber BJ, Mann R (1992) Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Exp Mar Biol Ecol* 161:15–25. doi: 10.1016/0022-0981(92)90186-E
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, et al (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465–476. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00576-1
- Sijen T, Steiner FA, Thijssen KL, Plasterk RHA (2007) Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* 315:244–247. doi: 10.1126/science.1136699
- Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, et al (2009) An acidic matrix protein, *Pif*, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325:1388–1390. doi: 10.1126/science.1173793
- Tabara H, Grishok A, Mello CC, others (1998) RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282:430–431.
- Takekata H, Numata H, Shiga S, Goto SG (2014) Silencing the circadian clock gene *Clock* using RNAi reveals dissociation of the circatidal clock from the circadian clock in the mangrove cricket. *J Insect Physiol* 68:16–22. doi: 10.1016/j.jinsphys.2014.06.012
- Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263:103–112. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00579-5
- Timmons L, Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395:854–854. doi: 10.1038/27579
- Tosteson TR, Ballantine DL, Tosteson CG, et al (1989) Associated bacterial flora, growth, and toxicity of cultured benthic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* and *Gambierdiscus toxicus*. *Appl Environ Microbiol* 55:137–141.
- Tran D, Ciutat A, Mat A, et al (2015) The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 158:41–49. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.10.023
- Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, et al (2006) RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol Biol* 15:383–391. doi: 10.1111/j.1365-2583.2006.00656.x
- Uryu O, Kamae Y, Tomioka K, Yoshii T (2013) Long-term effect of systemic RNA interference on circadian clock genes in hemimetabolous insects. *J Insect Physiol* 59:494–499. doi: 10.1016/j.jinsphys.2013.02.009
- Walshe DP, Lehane SM, Lehane MJ, Haines LR (2009) Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Mol Biol* 18:11–19. doi: 10.1111/j.1365-2583.2008.00839.x

Whangbo JS, Hunter CP (2008) Environmental RNA interference. *Trends Genet* 24:297–305.
doi: 10.1016/j.tig.2008.03.007

Yerushalmi S, Green RM (2009) Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms.
Ecol Lett 12:970–981. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01343.x

3. Conclusion

Jusqu'alors, l'implication de l'horloge circadienne d'un bivalve dans les processus de bioaccumulation d'un contaminant n'avait à ma connaissance jamais été étudiée. Pour tester expérimentalement l'implication de cette horloge chez *C. gigas* dans la bioaccumulation des toxines PSP produites par l'algue *A. minutum*, nous avons développé une approche non invasive de l'interférence par ARN dite du « cheval de Troie ». Afin de court-circuiter le rythme circadien des huîtres, nous avons interféré le gène *Clock*, qui a une position centrale dans l'horloge et dans la transmission du message rythmique (Perrigault and Tran 2017a). L'objectif de cette expérience était donc double. Le premier objectif était de valider l'efficacité de la méthode « du cheval de Troie ». Le deuxième objectif était d'évaluer si l'altération de l'horloge circadienne des huîtres modifiait le niveau d'accumulation des toxines PSP lors d'une exposition à *A. minutum*.

Les résultats de cette étude montrent que la stratégie du cheval de Troie est une méthode efficace pour entraîner l'interférence du gène *Clock* chez les huîtres. L'effet de l'interférence (diminution de niveau des ARNm du gène *Clock*) a été observé avec un effet retard, après l'administration des ARNdb. Cet effet retard a déjà été observé chez d'autres organismes (Choi et al. 2013; Funabara et al. 2014), et suggère soit une durée de vie importante des ARNdb interférents, soit des processus d'amplification de brins interférents par les cellules de l'organisme (Pak and Fire 2007; Sijen et al. 2007). L'impact attendu de l'interférence du gène *Clock* sur le fonctionnement de l'horloge circadienne, *i.e.* l'expression des autres gènes centraux de l'horloge, a été observé. Comme l'interférence du gène *Clock* elle-même, cet impact est plus important chez les huîtres triploïdes. En tout, 5 gènes de l'horloge sur 8 montrent une diminution significative du niveau d'ARNm chez les huîtres triploïdes, contre 3 chez les huîtres diploïdes. La conséquence observée en termes de bioaccumulation des PST suite à l'exposition à *A. minutum* est que chez les huîtres diploïdes, chez lesquelles l'horloge semble moins perturbée, aucune différence de bioaccumulation des PSP entre les huîtres interférées ou non n'est observée au bout de 5 jours d'exposition. Par contre chez les huîtres triploïdes, une diminution significative de bioaccumulation des PSP est observée chez les huîtres interférées. Ces résultats suggèrent fortement que lorsque l'horloge circadienne est suffisamment impactée, des modifications de la bioaccumulation de toxines PSP apparaissent. Par conséquent, ces résultats suggèrent aussi que la gestion des fonctions physiologiques par le mécanisme horloger a une influence sur la manière avec laquelle les organismes peuvent se contaminer. Par ailleurs, l'utilisation de la différence de ploïdie chez l'huître a permis de mettre en évidence un effet dose de l'interférence de l'horloge sur les processus de bioaccumulation. En effet, l'horloge diploïde apparemment moins impactée, ne modifie pas la bioaccumulation, au contraire de l'horloge triploïde plus impactée qui elle provoquerait une modification de la cinétique d'accumulation des phycotoxines.

Il est à noter que contrairement à des études précédentes (Guéguen et al. 2012; Haberkorn et al. 2010), nous n'avons pas mis en évidence de différences statistiques de bioaccumulation

des toxines PSP entre les huîtres diploïdes et triploïdes dans nos conditions expérimentales après 5 jours d'exposition à *A. minutum* chez les huîtres non interférées.

Pour conclure, les résultats montrent que la méthode du cheval de Troie, basée sur l'ingestion de bactéries transformées (productrices d'ARNdb interférents) adsorbées à des algues, est une méthode prometteuse et efficace pour activer une machinerie d'interférence par ARN dans les tissus de l'huître *C. gigas* sans perturber le comportement (méthode non-invasive). Toutefois, des concentrations bactériennes plus importantes ou une durée de traitement plus long pourraient permettre d'améliorer encore l'efficacité de cette méthode d'interférence. Enfin, cette méthode innovante ouvre des perspectives de recherche très intéressantes car elle est applicable à tous les organismes filtreurs et à l'étude de tous les gènes d'intérêts.

Pour finir, cette approche non-invasive a permis de mettre en évidence pour la première fois que le rythme circadien des huîtres pourrait être impliqué dans les processus de bioaccumulation des toxines PSP et pourrait aussi expliquer en partie des différences d'accumulation entre les huîtres triploïdes et diploïdes *in situ* lors d'une efflorescence d'algues toxiques *A. minutum*.

Chapitre V

Transcriptome cyclique de *Crassostrea gigas*. Impact d'une exposition à *Alexandrium minutum*

1. Préambule

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre est d'étudier l'impact d'*Alexandrium minutum* sur le transcriptome cyclique des branchies de l'huître en entraînement jour / nuit. Après avoir étudié précédemment l'impact du rythme circadien sur la contamination par *Alexandrium minutum*, le but est ici de voir à l'inverse, l'impact de la contamination par *A. minutum* sur la genèse et l'expression des rythmes circadiens. L'effet chronotoxique de l'algue toxique *A. minutum* sur le rythme nyctéméral de *C. gigas* a récemment été mis en évidence dans une étude préliminaire (Tran et al. 2015). La cyclicité journalière de l'expression du gène *Cryptochrome 1*, impliqué dans la synchronisation de l'horloge circadienne (Perrigault and Tran 2017a), de même que celle de 5 autres gènes, présumés sous contrôle de l'horloge, était abolie suite à une exposition à *A. minutum* à des concentrations réalistes d'exposition. Cette abolition du rythme était également observée pour le cycle nyctéméral de la fonction digestive et celui du comportement valvaire de l'huître (Tran et al. 2015). Par ailleurs, une origine endogène à la génération du rythme journalier chez l'huître *C. gigas* a été mise en évidence (Mat et al. 2012), et un fonctionnement putatif de l'horloge circadienne de *C. gigas* a été proposé suite au séquençage des gènes qui la constituent (Perrigault and Tran 2017a).

Pour aller plus loin dans la compréhension du rythme nyctéméral de *C. gigas*, ainsi que dans l'impact d'*A. minutum* sur ce rythme, nous avons réalisé le premier transcriptome cyclique de l'huître *C. gigas*. Cette étude s'est faite par une approche de séquençage haut-débit de nouvelle génération (*next generation sequencing*, NGS) de l'ensemble du transcriptome (RNAseq) dans les branchies (*i.e.* l'ensemble des ARNm, issus de l'expression des gènes, qui seront après maturation traduits en protéines, à la base du fonctionnement métabolique, physiologique et comportemental). Cette étude s'est faite en collaboration avec la plateforme Genotoul (Génotopie Toulouse Midi-Pyrénées) qui a réalisé le séquençage et le traitement bio-informatique. Mon travail a consisté à faire en suivant le traitement bio statistique, l'analyse des données et l'interprétation. Le but était d'identifier et de quantifier le niveau d'ARNm dans les branchies d'huîtres à un temps donné, et de réaliser cette opération toutes les 4 heures pendant 52 heures. J'ai ainsi pu analyser l'expression temporelle de l'ensemble des transcrits codants chez des huîtres exposées ou non à des concentrations environnementales d'*A. minutum*. L'algue non toxique *Heterocapsa triquetra* a été utilisée pour la condition contrôle. L'expérience a été réalisée en décembre, pour éviter la gamétogénèse qui influence fortement la physiologie de l'huître. Le cycle d'entraînement lumineux des huîtres correspondait à la photopériode de cette saison à Arcachon, autour du solstice d'hiver : 9h de jour et 15h de nuit ; ceci afin de perturber le moins possible le rythme circannuel des huîtres.

Cette expérience avait deux objectifs. Le premier est une meilleure compréhension de l'importance du rythme nyctéméral dans la régulation de l'expression génétique chez *C. gigas*. Dans la continuité de la caractérisation récente de l'horloge circadienne (Perrigault and Tran 2017a), l'analyse du transcriptome des huîtres non exposées nous a permis d'appréhender et de quantifier pour la première fois l'organisation temporelle de l'ensemble du transcriptome chez l'huître *C. gigas* (Figure V 1A.). Pour exemple, chez les mammifères,

il est montré que approximativement 10 % du génome aurait le potentiel d'être exprimé de façon oscillante dans un tissu donné (Panda et al. 2002; Ueda et al. 2005; Hughes et al. 2009; Zhang et al. 2014). Les connaissances chez les bivalves se limitent à une seule étude, par puce à ADN, réalisée sur une portion seulement du transcriptome de la moule *Mytilus californianus* (Connor and Gracey 2011).

Le deuxième objectif est d'observer pour la première fois l'impact d'une exposition à *A. minutum* sur l'expression de l'ensemble des gènes de l'horloge circadienne (RT-qPCR), ainsi que son impact sur l'organisation temporelle de l'ensemble du transcriptome cyclique des huîtres (Figure V 1B.)

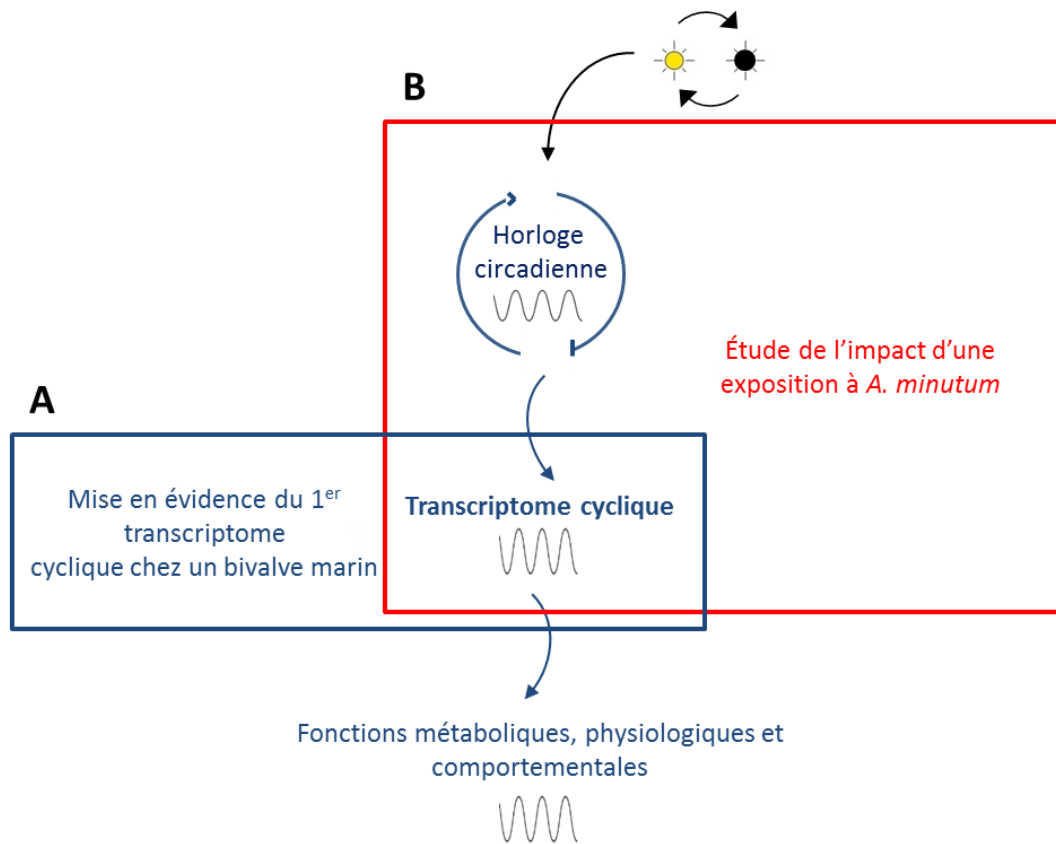


Figure V 1. Schématisation des deux objectifs de l'étude. (A) Analyse des branchies des huîtres *C. gigas* témoins. (B) Analyse des branchies des huîtres *C. gigas* exposées à des concentrations environnementales d'*A. minutum*.

2. Article : Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum*.

Laura Payton^{1,2}, Mickael Perrigault^{1,2}, Claire Hoede³, Jean-Charles Massabuau^{1,2},
Mohamedou Sow¹, Arnaud Huvet⁴, Floriane Boullot^{4,5}, Caroline Fabioux^{4,5},
Hélène Hegaret^{4,5}, Damien Tran^{1,2*}

¹University of Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France

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

³Plate-forme bio-informatique Genotoul, MIAT, Université de Toulouse, INRA, F-31326
Castanet-Tolosan, France.

⁴Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539
UBO/CNRS/IRD/IFREMER), CS 10070, F-29280 Plouzané, France

⁵Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), Institut Universitaire
Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539
CNRS/UBO/IRD/IFREMER, F-29280 Plouzané, France

* to whom correspondence should be addressed

UMR 5805 EPOC, Place du Dr Peyneau, 33120, Arcachon, France.

E.mail: d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr. Tel : +33 562239237

Publié dans Scientific Reports le 14 juin 2017

DOI : 10.1038/s41598-017-03797-4

Abstract

As a marine organism, the oyster *Crassostrea gigas* inhabits a complex biotope governed by interactions between the moon and the sun cycles. We used next-generation sequencing to investigate temporal regulation of oysters under light/dark entrainment and the impact of harmful algal exposure. We found that $\approx 6\%$ of the gills' transcriptome exhibits circadian expression, characterized by a nocturnal and bimodal pattern. Surprisingly, a higher number of ultradian transcripts were also detected under solely circadian entrainment. The results showed that a bloom of *Alexandrium minutum* generated a remodeling of the bivalve's temporal structure, characterized by a loss of oscillations, a genesis of de novo oscillating transcripts, and a switch in the period of oscillations. These findings provide unprecedented insights into the diurnal landscape of the oyster's transcriptome and pleiotropic remodeling due to toxic algae exposure, revealing the intrinsic plasticity of the cycling transcriptome in oysters.

Keywords

Cyclic Transcriptome, Circadian, Ultradian, Oyster, Harmful Algal Bloom

Introduction

The physiological and behavioral processes of living organisms oscillate. Temporal organization is a necessary adaptation to cope with an ecosystem governed by various periodic changes (Yerushalmi and Green 2009). At a cellular level, the circadian clock consists of a self-sustainable auto-regulatory network of transcriptional and translational feedback loops synchronized by environmental zeitgeber, which produce oscillations in the expression of clock-controlled genes (CCGs) (Zhang and Kay 2010). Most studies on the circadian network have used terrestrial organisms, while little is known about these networks in marine organisms, which inhabit complex ecosystems governed by sun-earth-moon trajectories and interactions. The study of clocks in marine species is a relevant issue for understanding how clocks evolved along different evolutionary lineages (Wilcockson and Zhang 2008; Tessmar-Raible et al. 2011; Connor and Gracey 2011; Teschke et al. 2011; Hur et al. 2012; Zhang et al. 2013; Zantke et al. 2013; Oren et al. 2015).

In the phylum of marine molluscan, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, an ecologically and economically important marine species, exhibits *in situ* behavior following not only a circadian rhythm but also ultradian and infradian rhythms (Tran et al. 2011; Bernard et al. 2016). An endogenous circadian rhythm has been demonstrated in free running conditions and is characterized as weak, plastic, and dual (Mat et al. 2012, 2013). Recently, components of a biological clock in *C. gigas* have been identified (Perrigault and Tran 2017b) without any information on the extent of clock output (Perrigault and Tran 2017b). The first study in marine mollusks showed that 40 % of microarray transcripts are susceptible to oscillation in the mussel *Mytilus californianus* (Connor and Gracey 2011). In mammals, next-generation sequencing has indicated that approximately 50 % of the genome has the potential to oscillate; based on a sophisticated regulation of gene expression in each peripheral organ, which is still misunderstood, this estimation has been reduced to 10 % in a given tissue (Akhtar et al. 2002; Panda et al. 2002; Ueda et al. 2005; Hughes et al. 2009; Eckel-Mahan et al. 2013; Zhang et al. 2014; Li et al. 2015). In parallel, alterations in the temporal organization of physiological and metabolic processes have been associated with disorders such as obesity, cardiac disease, cancer or disruption of energy balance (Knutsson 2003; Sharifian et al. 2005; Suwazono et al. 2008; Doi et al. 2010; Antunes et al. 2010; Fonken et al. 2010; Viitasalo et al. 2015).

In coastal areas, marine organisms are subjected to various stresses, including proliferations of planktonic microalgae producing toxins, called harmful algal blooms (HABs), reaching up to millions of cells per liter. Among these planktonic algae, the dinoflagellate species *Alexandrium minutum* is known to produce saxitoxin (STX) and its derivatives, called paralytic shellfish toxins (PSTs). *A. minutum* has a worldwide distribution and has been associated with massive deaths of marine animals and human health issues (Bricelj and Shumway 1998; Hallegraeff et al. 2003; Anderson et al. 2012). The oyster *C. gigas*, as a filter feeder, is highly susceptible to HAB exposure by feeding on harmful algae (FAO and WHO 2016). Much physiological damage in response to *A. minutum* exposure has already been demonstrated in oysters (Hégaret et al. 2007a; Galimany et al. 2008b; Tran et al. 2010; Haberkorn et al. 2010a, b; Mello et al. 2013; Mat et al. 2013). In particular, it has been shown that *A. minutum* leads to a loss of daily cycle in the expression of genes involved in

detoxification, oxidative stress, valve behavior, and crystalline style length, as implicated in digestion (Tran et al. 2015).

In the present study, we used RNA sequencing (RNAseq) to investigate for the first time, to our knowledge, (1) the manner in which the whole transcriptome in gills of *C. gigas* is temporally organized under light / dark entrainment and (2) the impact on this temporal organization of an *A. minutum* exposure mimicking a realistic HAB.

Results

A circadian transcriptome with a nocturnal pattern remodeled by *A. minutum* exposure

To assess the cycling transcriptome of *Crassostrea gigas*, a first group of oysters was entrained to a 9-hr light / 15-hr dark (L: D 9:15) environment, without tidal cycles, and fed with the non-toxic alga *Heterocapsa triquetra* (*H.t* condition). To explore the effect of PST ingestion, a second group of oysters was exposed to the PST-producing alga *Alexandrium minutum* (*A.m* condition), mimicking a harmful algal bloom (≈ 400 cells.mL⁻¹). ELISA assays confirmed a PST bioaccumulation of 95.8 ± 13.5 ng.g⁻¹ eqSTX in the gills in the *A.m* group, whereas the *H.t* oysters accumulated no PST (Supplementary Fig. S1). Gills were sampled every 4 hr over 52 hr, and the cyclic transcriptome was analyzed by RNA sequencing (RNAseq) followed by ARSER (Yang and Su 2010) to evaluate any significant cyclicity in the 20,846 transcripts. For all cycling detection, a false discovery rate (FDR) of < 0.05 was considered significant (Storey and Tibshirani 2003; Storey et al. 2005).

In the *H.t* oysters, 1300 (1247 + 53) significant circadian transcripts were identified, corresponding to 6.2 % of total transcripts in the *H.t* gills (Fig. 1A-C; Supplementary Table S2). Among these 1300 transcripts, only 53 oscillated in both the *H.t* and *A.m* oysters (Fig. 1A, 1C). The total number of circadian transcripts in the *A.m* group (630) was two-fold lower than that in the *H.t* oysters (Supplementary Table S2). A large number of transcripts (577) oscillated exclusively in *A.m* (Fig. 1A, 1D). In *H.t*, the phase lag distribution of circadian transcripts showed a nocturnal and bimodal pattern, with one peak during the beginning of the night (N1, ZT9-ZT19, 40 % of circadian transcripts) and another peak at the end of the night (N2, ZT19-ZT24, 47 % of circadian transcripts) (Fig. 1E). Finally, only 13 % of transcripts peaked during the daytime (D, ZT0-ZT9). In *A.m*, the nocturnal phase peak transcripts decreased to 63 % (N1+N2), and diurnal transcripts reached 37 % of circadian transcripts (Fig. 1G). An increase in daytime peak expression with *A. minutum* exposure was also observed in the 53 circadian transcripts common in both *H.t* and *A.m* (Fig. 1F). Furthermore, we observed a trend toward a relative decrease in significant transcripts with low amplitude in favor of transcripts oscillating with high amplitude when exposed to *A.m* compared to *H.t* (Fig. 1H-J).

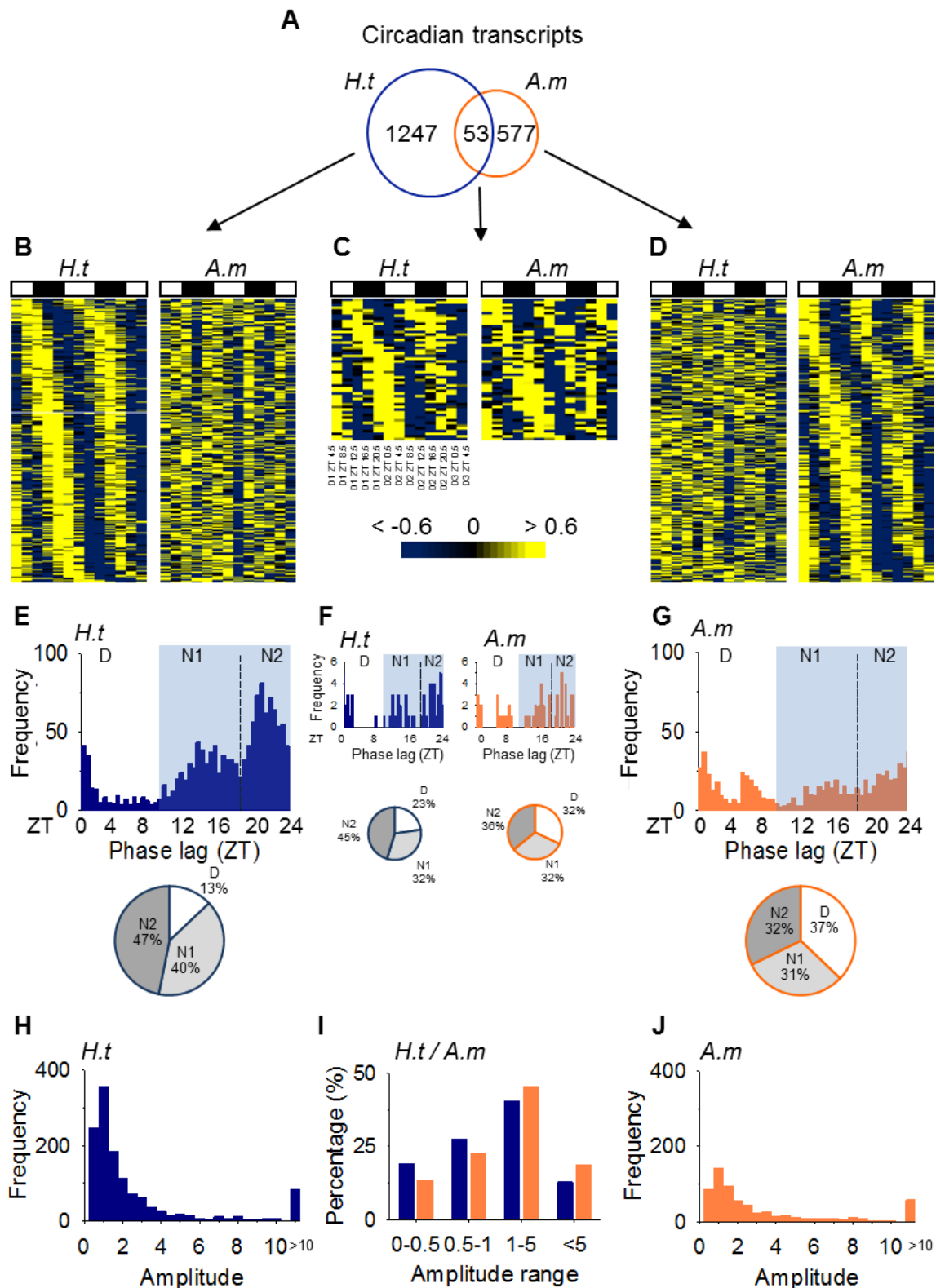


Figure 1. A circadian transcriptome with a nocturnal pattern remodeled with *A. minutum* exposure. (A) The number of circadian transcripts. (B-D) Heat maps of expression organized by phase for the 300 most significant transcripts oscillating only in *H.t* (B), common in both (C) and only in *A.m* (D). (E-G) Phase lag, i.e., peak of expression along the cycle, distributions (frequency in number of transcripts) and corresponding pie charts for all oscillating genes in *H.t* (E), *A.m* (G) and both (F). “D”: phase lag distribution during the day (ZT0-ZT9). “N1” (ZT9-ZT19) and “N2” (ZT19-ZT24): phase lag distribution during the first and second part of the night. (H-J) Amplitude distribution (frequency in number of transcripts) for all circadian transcripts in *H.t* (H), *A.m* (J), and both (I), classed by amplitude range.

A nocturnal pattern of circadian core clock gene expression and valve activity behavior modeled with *A. minutum* exposure

Oyster clock gene expression in the gills of oysters was analyzed by RT-qPCR and exhibited nocturnal phase peaks in *H.t* (Fig. 2A, 2B). There were significant differences between day and night phase expression for *Clock*, *Cryptochrome 1 (Cry1)*, *Period* and *Timeless (Tim1)*, but not for *Ror*, *Rev-erb*, *Cryptochrome 2 (Cry2)* or *Bmal*, peaking just before the night or at the beginning of the day (Fig. 2A, *H.t*, first column of histograms). Figures 2A and 2B reveal an effect of *A. minutum* on the clock gene temporal patterns previously observed in *H.t*. First, the overall levels of expression were higher in *A.m* for *Bmal* ($p = 0.026$) and *Tim1* ($p = 0.038$) (Fig. 2A). In addition, none of the 8 clock genes showed differential expression between day and night in *A.m* (Fig. 2A, *A.m*, first column of histograms), leading to a loss of nocturnality. Furthermore, in *A.m*, the amplitude of oscillation decreased for *Bmal*, *Period*, *Tim1* and *Cry2* and increased for *Ror* and *Rev-erb* (Fig. 2A, second column of histograms). A two-way ANOVA confirmed a day / night effect on clock gene expression in *H.t* ($p < 0.001$) but not in *A.m* ($p = 0.492$) and a significant effect of *A. minutum* on gene expression during the night ($p < 0.001$) (Fig. 2C). Finally, significant correlation (p -value < 0.0001 for both conditions) between qPCR and RNAseq results on global clock gene expression in *H.t* and *A.m* conditions, comforting results of RNAseq analyses (Supplementary Fig. S2).

Figure 2D shows the mean valve opening duration (VOD) in the *H.t* and *A.m* oysters. Control oysters exhibited cycling and nocturnal valve activity with a rapid increase in VOD at the beginning of the night, corresponding to the N1 phase illustrated in Fig. 1E. This increase in VOD was followed by a decrease to basal levels, observed during the rest of the night and during daytime. The *A.m* oysters exhibited conserved cyclic valve activity, but the mean VOD was significantly increased ($p < 0.001$) and a trend for diurnal activity was observed corresponding to the D phase, shown in Fig. 1G. Figure 2E shows that during the day, the VOD increased from 20.6 ± 1.2 % in *H.t* to 38.0 ± 2.6 % in *A.m* ($p < 0.001$), whereas during the nighttime, no significant difference in VOD was observed ($p = 0.305$). Finally, the nocturnality observed in *H.t* was disrupted in *A.m*. Indeed, the day / night difference in *H.t* ($p < 0.001$) was abolished in *A.m* ($p = 0.763$).

Discovery of an ultradian transcriptome remodeled by *A. minutum* exposure

Analysis of the cyclic transcriptome provided evidence for a large amount of transcripts with ultradian periodicity. Within this range, two major clusters of transcripts appeared in both *H.t* and *A.m* conditions (Fig. 3A): transcripts oscillating with a period in the range of 8-11 hr (Ultradian 1, U1) and transcripts oscillating with a period in the range of 12-16 hr (Ultradian 2, U2). For the U2 transcripts, the peak of period length distribution was shortened in *A.m* oysters. Ultradian transcripts (U1 + U2) represented 18.1 % of the transcriptome in *H.t* and 22.4 % in *A.m* (Supplementary Table S2). In *H.t*, 2185 (1891 + 294) transcripts were U1 (Fig. 3B-D) whereas in *A.m* oysters, 2452 (2158 + 294) transcripts were U1 (Fig. 3B, 3D, 3E), representing 10.5 % and 11.8 % of the transcriptome in *H.t* and *A.m*, respectively

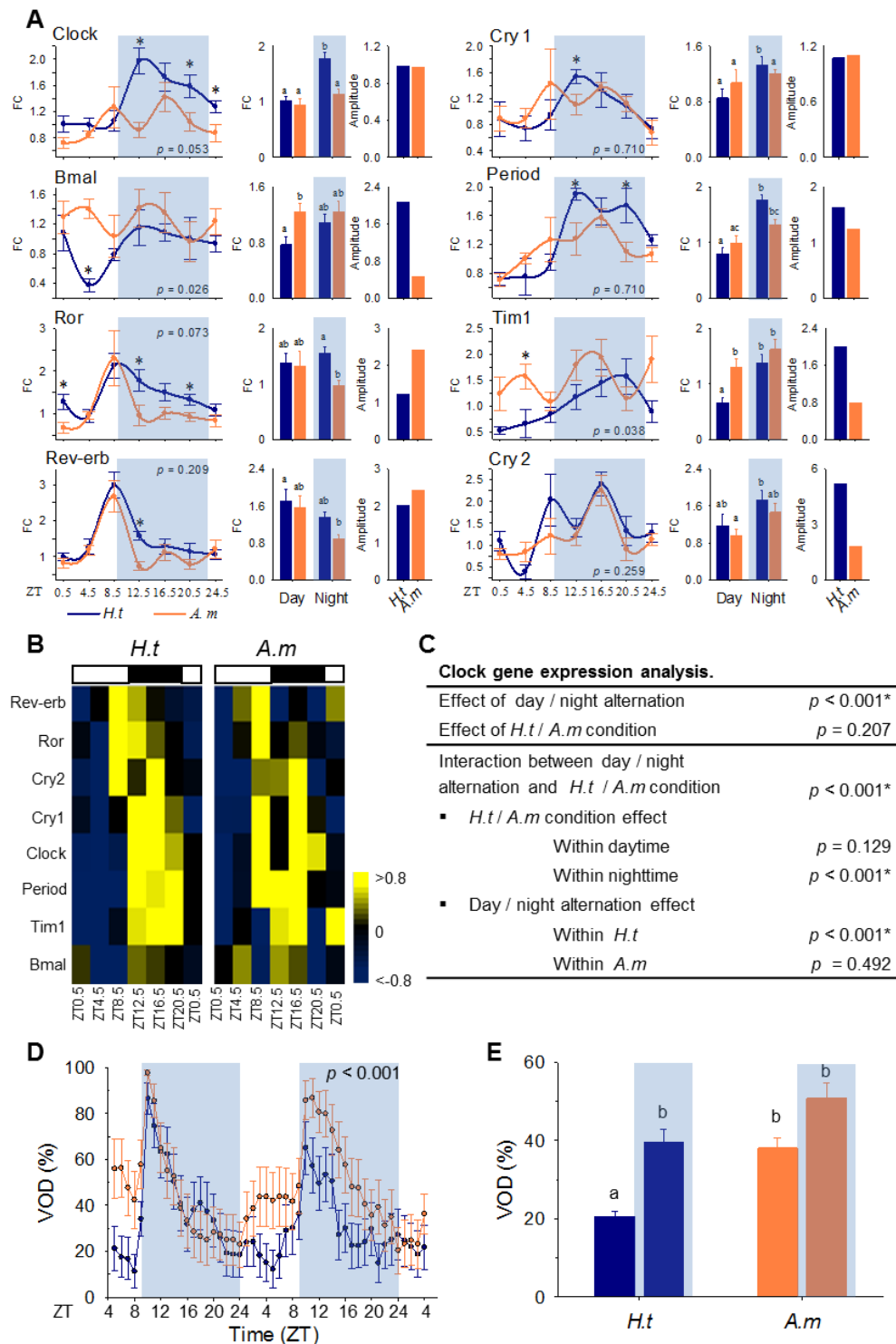


Figure 2. A nocturnal pattern of circadian core clock gene expression and valve activity behavior modeled by *A. minutum* exposure. (A) Real-time qPCR analysis of circadian clock gene expression expressed in fold change (FC, mean \pm SE, $n = 5-6$) for *H.t* and *A.m*. Gray areas correspond to nighttime. The p -values show different levels of expression over 28 hr between *H.t* and *A.m*, while stars indicate the different levels of expression at each time point. The first histograms show the mean levels of gene expression (FC). Different letters correspond to significant differences ($p < 0.05$). The second histograms show amplitudes of clock gene expression in *H.t* and *A.m*. (B) Heat maps of clock gene expression over 28 hr, organized by phase for *H.t* and *A.m* (RT-qPCR). (C) Two-way ANOVA testing the effect of day / night and *H.t* / *A.m* conditions on overall clock gene expression. (D) Mean hourly valve opening duration (VOD, %; mean \pm SE; $n=16$ per condition) of *H.t* (blue) and *A.m* (orange) oysters during the two days of sampling. The p -value corresponds to the difference in the mean VOD between the two conditions. (E) Mean VOD during daytime and nighttime for each condition. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

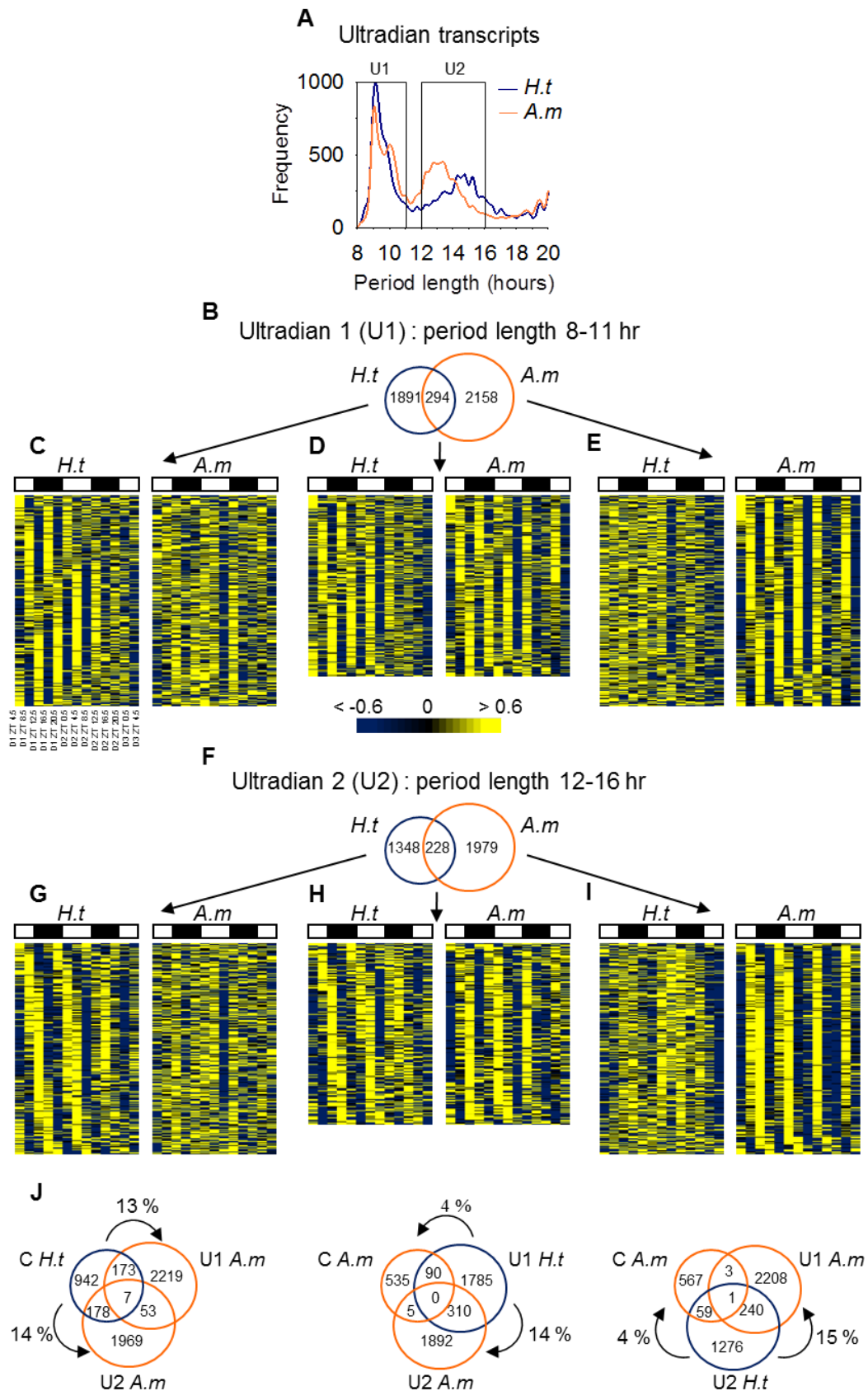


Figure 3. Discovery of an ultradian transcriptome remodeled with *A. minutum* exposure. (A) Period distribution of ultradian transcripts in *H.t* and *A.m*. (B) The number of U1 transcripts in *H.t* and *A.m*. (C-E) Heat maps of expression organized by phase for the 300 most significant U1 transcripts oscillating only in *H.t* (C), common in both (D), and only in *A.m* (E). (F) The number of U2 transcripts. (G-I) Heat maps of expression organized by phase for the 300 most significant U2 transcripts oscillating only in *H.t* (G), common in both (H), and only in *A.m* (I). (J) Venn diagrams of circadian (C), U1 and U2 transcripts in *H.t* and *A.m*.

(Supplementary Table S2). Note, only 294 U1 transcripts were common to *H.t* and *A.m* (Fig. 3B, 3D).

Subsequently, in *H.t*, we observed 1576 (1348 + 228) U2 transcripts (Fig. 3F-H), whereas in *A.m*, 2207 (1979 + 228) transcripts were U2 (Fig. 3F, 3H, 3I), representing 7.6 % and 10.6 % of the transcriptome, respectively (Supplementary Table S2). Finally, only 228 U2 transcripts were common to *H.t* and *A.m* (Fig. 3F, 3H). A gene-to-gene comparison of cycling transcripts in *H.t* and *A.m* showed that *A. minutum* exposure led to a switch in the period range of many transcripts (Fig. 3J). Indeed, 13 % and 14 % of circadian transcripts in *H.t* became U1 and U2 in *A.m*. By contrast, 14 % of U1 in *H.t* became U2 in *A.m*, while 15 % of U2 in *H.t* became U1 in *A.m*. When exposed to *A. minutum*, the switch from an ultradian period to a circadian one was scarce, 4 % for both U1 and U2 transcripts.

Ultradian oscillations observed in circadian clock network elements

A cycling transcriptome is the result of sophisticated regulation achieved by an integrated and complex network of core clock genes, kinases, deacetylases, and transcription factors (TFs) (Zhang and Kay 2010; Westermark and Herzel 2013; Korenčič et al. 2014). In *C. gigas* (Fig. 4), we identified 19 orthologs of vertebrate and insect genes associated with the circadian network (Takeuchi et al. 1993; Vielhaber et al. 2000; Martinek et al. 2001; Lin et al. 2002; Ueda et al. 2005; Duffield et al. 2009; Ramsey et al. 2009b; Yoshitane et al. 2012; Korenčič et al. 2014; Xi and Chen 2014; Zhao et al. 2015; Tao et al. 2015). Circadian oscillations were observed for 2 of these orthologs in *H.t*: the TFs *AP-1* and *CTCF*. Interestingly, in *H.t*, 3 transcripts were ultradian: the TF *HLF isoform 1* and the kinases *JNK-3* and *JNK interacting protein 4*. We noted a remodeling of clock elements in *A.m*, with an increase in ultradian oscillations. Indeed, in *A.m*, 9 transcripts were ultradian while only 1 transcript, *HLF isoform 1*, was circadian. In addition to remodeling the rhythmic status in *A.m*, the mean expression levels of 7 of the 19 clock network element transcripts were modified, among which 5 were increased and 2 were decreased.

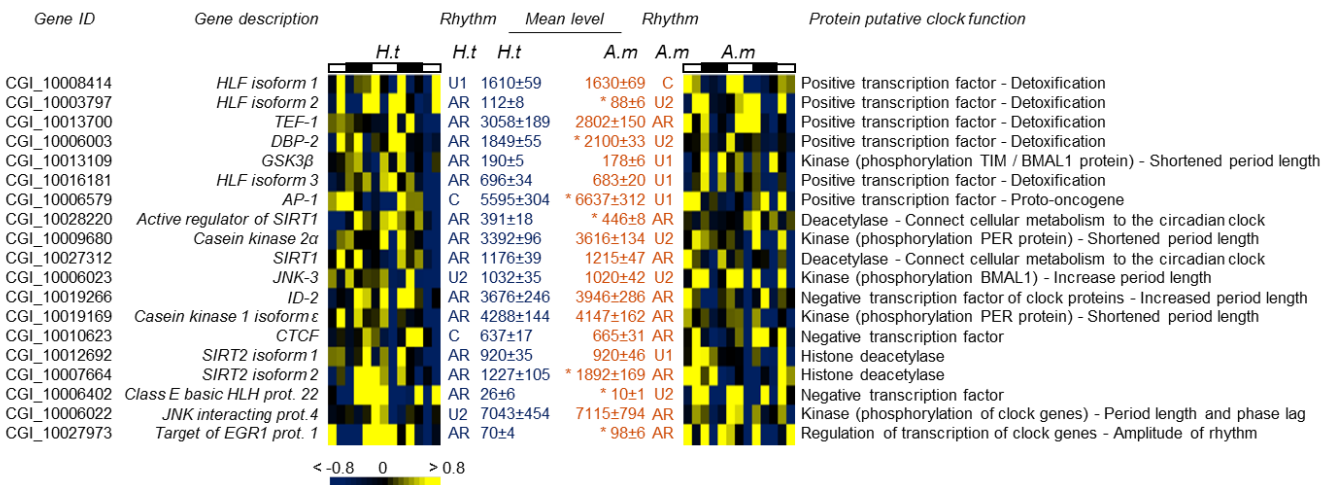


Figure 4. Ultradian oscillations observed in clock subsystem elements. Heat map expression of orthologous genes implicated in the clock network in mammals and insects, organized by phase of oscillation in *H.t*. “Rhythms”, results of cycling analysis (circadian, U1, U2). “Mean level”, the mean level of expression (mean ± SE). *Significant difference at $p < 0.05$.

Functional implications of cycling transcripts

Overall, 5061 and 5289 transcripts oscillated (circadian and ultradian), respectively, in *H.t* and *A.m* (24.3 % and 25.4 % of the transcriptome, respectively (Supplementary Table S2). An enrichment analysis of the biological processes for all oscillating genes in *H.t* showed an enrichment of DNA replication initiation and DNA duplex unwinding gene ontology (GO) terms (Fig. 5A), accounting for 0.3 % of total cyclic transcripts in *H.t*. The same analysis conducted with *A.m* oysters showed an enrichment accounting for 2.8 % of cyclic transcripts (Fig. 5B). Pseudouridine synthesis, mRNA and ncRNA (non-coding RNA) processing, nucleotide-excision repair and catabolic processes of proteins and cellular macromolecules were enriched in the *A.m* cycling transcriptome. Finally, Fig. 5C shows that the transcripts oscillating exclusively in *A.m* enrichment in RNA processing account for 1.3 %. For further analysis, Supplementary Table S3 provides the gene ID, a gene description, and their cyclic status under the other condition (*H.t* or *A.m*) for the 30 most significant circadian, U1 and U2 transcripts under *H.t* and in *A.m* conditions.

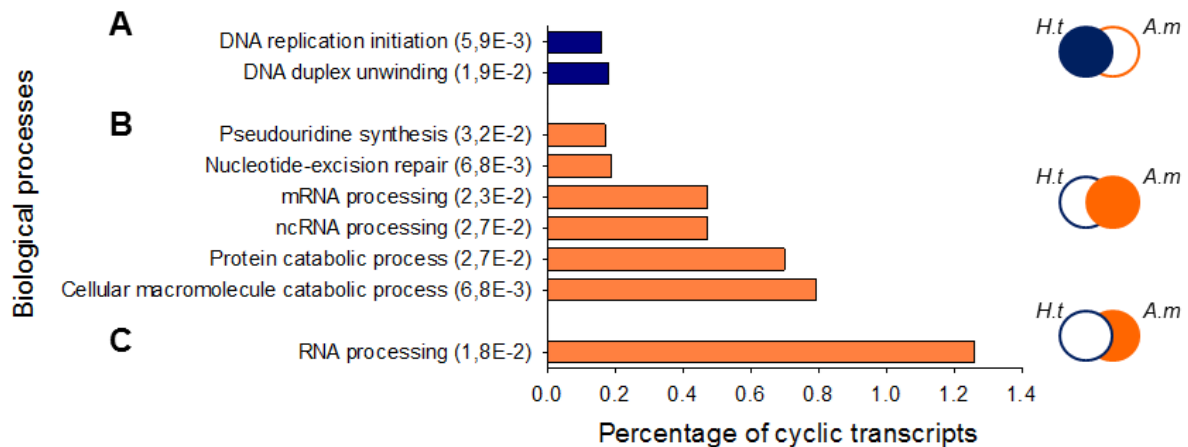


Figure 5. Functional implications of cycling transcripts. Enrichment analysis of biological processes of total cycling transcripts (circadian, U1, and U2) in *H.t* (A), in *A.m* (B), and uniquely in *A.m* (C). The ordinate axis shows the GO terms and significance (FDR) of enrichment while the abscissa axis shows the percentage of cycling for each GO term.

A. minutum effect on gene expression level throughout the whole transcriptome

Finally, we analyzed the impact of *A. minutum* exposure on the level of gene expression in the gills of *C. gigas*. Differential expression analysis was conducted using 13 time samples of each condition as replicates (summarized in Fig. 6A). At a FDR of < 0.01 , 740 transcripts were differentially expressed (DE); 89.5 % of transcripts were upregulated and 10.5 % were downregulated in *A.m* (Fig. 6A, 6B). Among these 740 transcripts, we conducted GO enrichment analyses to assess their functional implications (Fig. 6C). We found that in enriched biological processes, most of the transcripts were upregulated, especially those involved in the oxidative-reduction process, transmembrane transport and ATP catabolic process. Figure 6D shows a pie chart detailing the percentage of rhythmic status for the 740

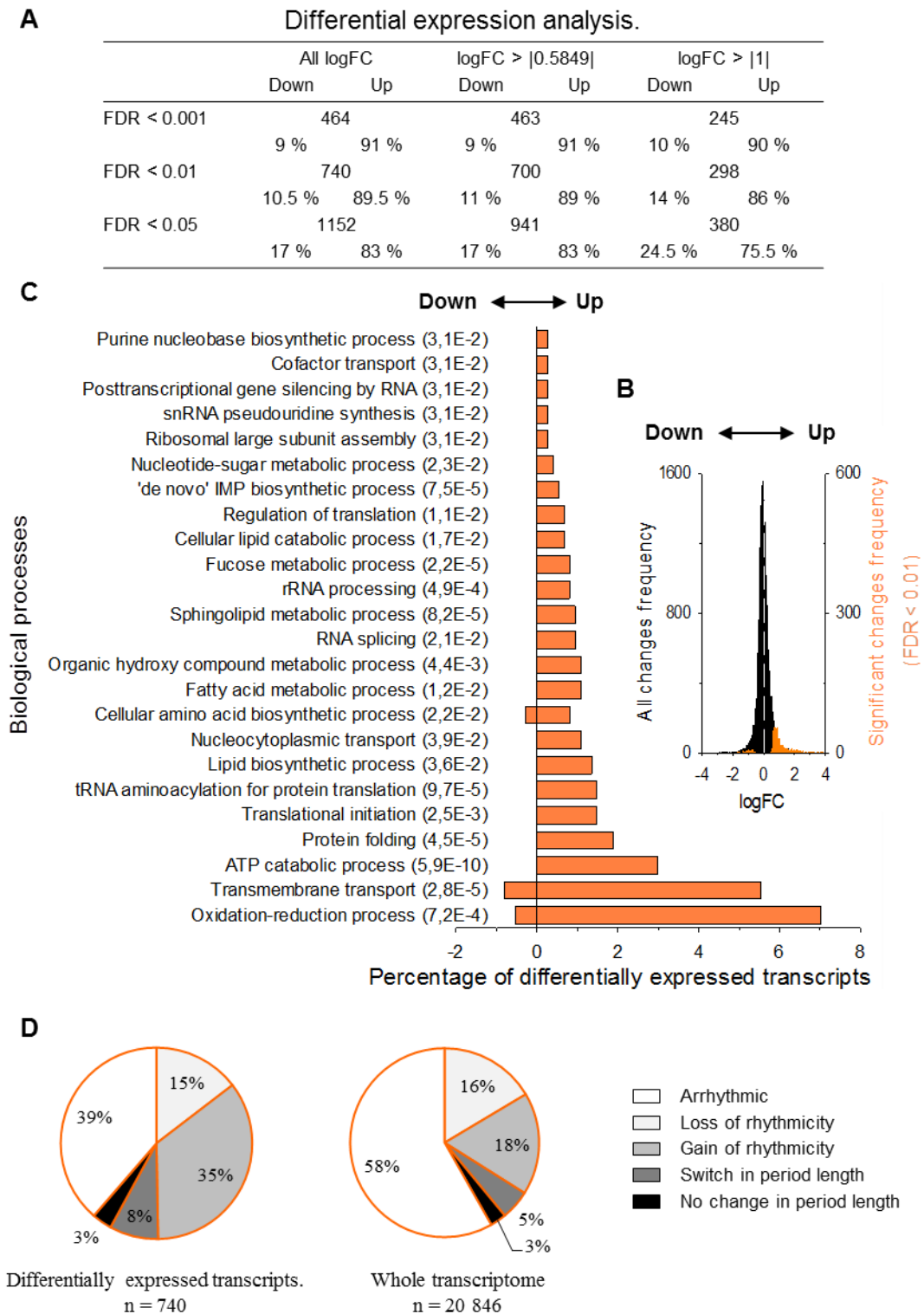


Figure 6. Effect of *A. minutum* on gene expression level throughout the whole transcriptome. (A) Number of differentially expressed (DE) transcripts in *A.m* for different significances (FDR) and fold changes (log FC). **(B)** Fold change distribution. The black bars represent equally expressed transcripts, while the orange bars represent DE transcripts. The white dotted line shows the limit between up- and downregulated transcripts. **(C)** Enrichment analysis of biological processes of DE transcripts with an FDR of < 0.01. The ordinate axis shows the GO term and significance of enrichment (FDR) while the abscissa axis shows the percentage of DE transcripts enriched for each GO term. Positive and negative values indicate up- and downregulated transcripts, respectively. **(D)** The right pie chart shows the cycling transcripts' status for the DE transcripts. The left pie chart shows the cycling transcripts' status for the whole transcriptome in *A.m*.

DE transcripts (left pie chart) and for the whole transcriptome (right pie chart). We showed that 58 % of the differentially expressed (DE) transcripts were affected by remodeling of their cyclic status compared to 39 % in the whole transcriptome. This result highlighted the overrepresentation of transcripts with remodeling cycling status in differentially expressed transcripts. Specifically, transcripts with a gain of rhythmicity tend to be over-represented in DE transcripts, affecting 35 % of the transcripts, compared to 18 % in the whole transcriptome. Furthermore, Supplementary Fig. S3 showed the rhythmic status of the DE transcripts associated with all the significantly enriched GO terms. We noted that all the enriched GO terms were associated with remodeling of the cycling transcriptome. Finally, for further analysis, Supplementary Table S4 provides lists of the 25 most significant up- and downregulated transcripts, with their log fold change (FC) value and rhythmic status.

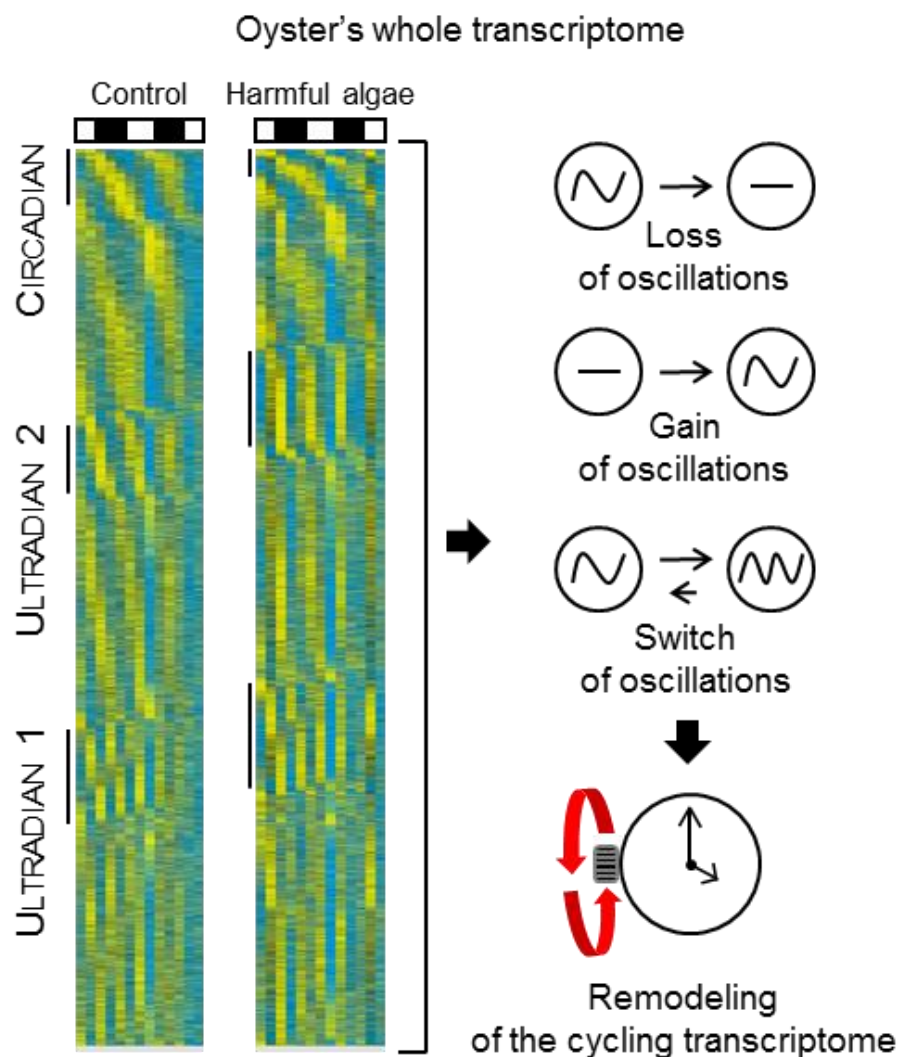


Figure 7. Remodeling of cycling transcriptome. Heat map expression of the whole transcriptome (20,846 transcripts), organized by significance, phase, and period in *H.t* and *A.m* respectively. Significant circadian, U1, and U2 transcripts are highlighted by a line in each condition. A summary of remodeling processes due to *A. minutum* exposure is presented on the right.

Discussion

Little is known about the strategy of molecular biological rhythms in marine organisms. Our work provides significant insights for the first time, to our knowledge, into the temporal regulation of the gill transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas*. Such gills are of importance as one of the primary tissues implicated in the mechanisms for adapting to environmental changes, such as exposure to a bloom of the PST-producer *A. minutum*. We provide evidence for the complexity and plasticity of the cycling transcriptome when oysters face a disruption in their environment. We showed that for conditions *H.t* and *A.m*, at least 42 % of the different transcripts were able to exhibit rhythmicity (Supplementary Table S2). Strikingly, heat maps of the whole transcriptomes (Fig. 7) suggest wide cyclic gene expression, strongly implying a more extensive temporal organization than specifically indicated in the present work. Such visualization of global oscillation of the transcriptome was achieved by an extensive deep sequencing effort (*i.e.* an important read depth). As explained (Li et al. 2015), read depth sequencing is a key factor that determines the accuracy of measurements made by high-throughput sequencing. The number of identified cycling transcripts depends on read depth, specifically for low-amplitude cyclic transcripts. For example, in fruit flies (Li et al. 2015), characterized by a transcriptome of about 50 000 transcripts, 18 million reads per sample were estimated to be sufficient to characterize most of the circadian transcripts. According to these results, the sequencing of the 20 846 transcripts in the gills performed in this study, with a read depth of 24.5-33 million reads per sample (Supplementary Table S1), allowed to visualize possible cyclic transcripts even if the statistical analysis was not always significant. To our knowledge, the whole transcriptome organized according to the phase of the periodicity is not shown in most of published studies, supposedly due to a lack of sequencing effort in term of read depth analysis.

The results of the transcriptome analysis revealed circadian oscillations of 6.2 % of the gill transcriptome (Fig.s 1A-C). This proportion of oscillating transcripts is consistent with circadian transcript levels of 3–10 % reported in specific mammalian tissues (Akhtar et al. 2002; Panda et al. 2002; Ueda et al. 2005; Hughes et al. 2009; Eckel-Mahan et al. 2013; Zhang et al. 2014; Li et al. 2015). In the gills of the mussel *Mytilus californianus*, microarray analysis identified that ≈ 23 % of the transcripts were circadian³. Circadian transcripts in our analysis were characterized by a nocturnal and bimodal pattern (Fig. 1E). Nocturnal peaks of expression for circadian genes in the gills were correlated with the expression of clock genes and the nocturnal behavior of the oysters (Fig. 2). The nocturnal pattern of behavior and core clock genes expression was in accordance to the time of year (winter) when was performed the experiment. Indeed, previous studies demonstrated the dualism of the circadian rhythm in *C. gigas*. Oyster behavior and clock gene expression profiles were nocturnal during autumn and winter (Mat et al. 2012; Tran et al. 2015), and diurnal during spring and summer (Mat et al. 2012; Perrigault and Tran 2017b). This present study, performed in winter, provided an extensive characterization of nocturnal pattern of gene expression. Although the maximum VOD occurs during the first part of the night (N1), most circadian transcripts peaked during the last part of the night (N2), when the VOD returned to its basal value (Fig. 1E and 2D). These findings clearly suggested that the circadian genes in N1 and N2 are not involved in similar physiological processes. In N1, the oysters remained open most of the time,

suggesting intense activity related to the surrounding environment, such as gill filtration, feeding, or respiration. By contrast, during N2, the oysters were closed most of the time, and other molecular mechanisms took over. Surprisingly, in addition to circadian transcripts, we also observed two larger groups of ultradian transcripts in *H.t.*: 10.5 % oscillating under a period range of 8-11 hr (U1) and 7.6 % under a period range of 12-16 hr (U2). In the crustacean *Eurydice pulchra*, it has been shown that ultradian rhythms, \approx 12.4-hr cycles, were driven by a dedicated circatidal pacemaker that is independent from the circadian system (Zhang et al. 2013). In *M. californianus* exposed to simulated daily and tidal entrainments, \approx 2 % of transcripts oscillated at a periodicity of 10-14 hr (Connor and Gracey 2011). However, no endogenous circatidal rhythm has been demonstrated in *C. gigas* (Mat et al. 2013), and oysters in this experiment were not exposed to ultradian zeitgeber, such as tidal cues. Several studies have identified clock transcripts with an ultradian period of 12 hr in the mouse liver (Hughes et al. 2009, 2012; Ramsey et al. 2009b; Vollmers et al. 2009; Cretenet et al. 2010). A system involving a layered circadian transcriptional cascade has been proposed, which could lead to the generation of ultradian genes by an interaction with TFs, which is in turn associated with the induction of clock genes and CCGs (Westermarck and Herzel 2013). In this study, we identified oyster orthologs of the mammalian and insect circadian subsystems, such as TF *HLF isoform 1*, kinase *JNK 3*, and *JNK interacting protein 4*, which oscillated with an ultradian periodicity, suggesting that the oyster circadian network was involved in ultradian rhythmicity (Fig. 4, *H.t.*). The unusual period of ultradian transcripts (U1 and U2) may be explained by the 9L : 15D regime, mimicking the winter photoperiod observed in the field at the time of the experiment. Indeed, both periods of oscillation, U1 and U2, were close to the unequal durations of light and night (9L : 15D) (Fig. 3A). This regime differed from the classical 12L : 12D cycle used in most chronobiological studies.

HABs are currently increasing due to concomitant factors such as global warming, world shipping, and agriculture, and exert a significant effect in terms of ecological and physiological consequences on marine organisms such as filter-feeding bivalves (FAO and WHO 2016). In oysters, much damage has been shown in terms of genotoxicity, lipid metabolism impairment, immunotoxicity, increase of mucus in gills, myopathies, and modifications of filtration and valve behavior (Bardouil et al. 1996; Wildish et al. 1998; Hégaret et al. 2007a; Galimany et al. 2008b; Tran et al. 2010; Haberkorn et al. 2010a, b; Mello et al. 2013; Mat et al. 2013). Here, we discovered an important remodeling of the cycling transcriptome. Compared to *H.t.*, *A. minutum* exposure led to (1) a loss of 68 % of previous cyclic transcripts; (2) a gain of 69 % of *de novo* cyclic transcripts; and (3) a switch of periodicity in 21 % of cyclic transcripts, as shown in Supplementary Table S2. At the circadian level, exposure to *A. minutum* led to a \approx 50 % decrease in the number of cyclic transcripts, with a modification in phase lag and a loss of cyclic transcripts with low amplitudes (Fig. 1, Supplementary Table S2). The modification of phase lag expression was associated with a loss in nocturnal and bimodal pattern, leading to the absence of a clear pattern of daily expression (Fig. 1E-G). Similar trends were observed in the expression of clock genes and valve opening behavior (Fig. 2). As explain earlier, diurnal and nocturnal behavioral patterns alternate in *C. gigas* throughout the year in a predictable way (Mat et al. 2012). This dualism could be an adaptive response to variations in energy needs during the year (Mat et al. 2012). Consequently, the disruption of the nocturnal circadian pattern

observed in this study could lead to a loss of fitness of the oyster within its biotope. Note, in *A.m.*, we observed an increase in *Target of EGR1* expression (Fig. 4). As *EGR1* is involved in the amplitude of circadian transcripts in the mouse (Tao et al. 2015), *Target of EGR1* could be implicated in the increase of circadian transcripts with high amplitudes in *A.m.* (Fig. 11). Remodeling of circadian gene profiles (loss and gain of oscillation, as well as modification of phase lag expression) has been previously demonstrated in the mouse. Evidence for a modulatory role of the transcriptional factor *KLF15* in the diurnal pattern of the circadian genes in the mouse heart has been shown (Zhang et al. 2015). Indeed, in the heart of *KLF15* knockout mice, authors observed 805 circadian transcripts compared to 1335 in control heart, with only 332 common circadian transcripts. Authors demonstrated that *KLF15* was involved in the generation of transcripts oscillations and biphasic patterns as well as in the inhibition of oscillations of others transcripts and the quiescent expression of other genes associated to the circadian subsystem (Zhang et al. 2015). Similar weak number of commonly detected circadian transcripts was observed in liver of mice fed with high fat diet compared to normal diet (Eckel-Mahan et al. 2013). This reprogramming involved both an impairment of CLOCK-BMAL chromatin recruitment and a cyclic activation of surrogate pathway through the transcriptional regulator PPAR γ (Eckel-Mahan et al. 2013).

At the ultradian level, we observed a 24 % increase in ultradian transcripts in *A.m.* compared to *H.t.* (Supplementary Table S2). An analysis of oyster orthologs of TFs and kinases involved in the circadian network of mammals and insects also showed an increase in ultradian oscillations in *A.m.* (Fig. 4). Interestingly, the circadian TFs *HLF* and *DBP2* are known to control the expression of enzymes and regulators involved in detoxification and drug metabolism in mice (Gachon et al. 2006; Claudel et al. 2007). In our study, *HLF isoform 2*, *HLF isoform 3*, and *DBP2*, which were arrhythmic in *H.t.*, exhibited an ultradian oscillation in *A.m.* Thus, the increase of ultradian transcripts in *A.m.* could be linked to the implementation of detoxification mechanisms in response to PSTs bioaccumulation, through the TF *HLFs* and *DBP2*. The TF ortholog of *AP-1* was observed to switch from circadian to U1 oscillation in *A.m.* This result suggested an acceleration of cell proliferation, apoptosis, and abnormal cell cycles, *i.e.* cellular processes in which *AP-1* is a regulator (Fu and Lee 2003). The kinase *GSK-3 β* and casein kinase 2 α , which are also arrhythmic in *H.t.*, gained ultradian rhythmicity. Both kinases are known to act on TIM or BMAL1 phosphorylation and could induce a shortened period of cyclic processes, offering interesting leads to explain the decrease of U2 period length observed in *A.m.* (Lin et al. 2002; Itaka et al. 2005; Sahar et al. 2010).

In addition to the remodeling of the cycling transcriptome, *A. minutum* exposure led to a change in the expression level of 740 transcripts (FDR of < 0.01), with 89.5 % exhibiting overexpression (Fig. 6), suggesting physiological reactions against this harmful alga. Fig. 6D revealed that 58 % of differentially expressed transcripts appeared to be affected by cyclic remodeling. Moreover, all enriched biological processes (GO terms) were impacted by a remodeling of the cyclic transcriptome (Supplementary Fig. S3), suggesting a pleiotropic impact of *A. minutum*.

Mechanisms associated to the remodeling of cyclic transcriptome of *C. gigas* during *A. minutum* exposure remained unknown. *Alexandrium minutum* is known to produce paralytic

shellfish toxins (such as STX) but also bioactive extracellular compounds that can exhibit toxic activities by direct contact with gills (Borcier et al. 2017). An effect of *A. minutum* directly on core clock genes or on the clock subsystem genes, through genotoxic impacts could be suggested, as previously observed (Mat et al. 2013). Moreover, previous studies on chronotoxic effects in mammals and mollusk gastropods such as *Aplysia* have shown that the potential action of clock neurons was blocked by TTX, a homologue of STX toxin. The master clock kept time, but did not send the circadian message to other regions (Eskin 1977; Schwartz et al. 1987). Another study reported that TTX damped and desynchronized the suprachiasmatic nucleus cellular rhythms in *Per1* expression (Yamaguchi et al. 2003).

To conclude, this original study of the temporal transcriptome of *C. gigas* revealed highly cyclic gene expression and highlighted the complexity of clock mechanisms, with an intriguing predominance of ultradian genes in a circadian context. Moreover, the results showed pleiotropic impacts of *A. minutum* exposure on the oyster gill transcriptome. The transcriptional remodeling associated with exposure to harmful algae revealed plasticity in the temporal organization of gene expression. To date, the consequences of this remodeling plasticity remain unknown. This response could be an adaptive reaction to the toxicity of the harmful algae. It may also reveal a consequent chronotoxicity effect leading to a disruption in the temporal structure and an uncoupling of the transcriptional rhythmicity associated with the physiological needs. In any case, this effect led to a loss of fitness of the oyster within its environment.

Experimental procedures

Animals and experimental treatment

Diploid Pacific *C. gigas* oysters (1.5 years old, n=156) from the Bay of Arcachon (France) (72.8 ± 0.5 mm shell length; 40.6 ± 0.4 mm shell width; 38.5 ± 0.8 g total fresh weight; mean \pm SE) were divided among 6 tanks isolated from external vibration using an anti-vibrating bench and continuously supplied with homogenized seawater of constant composition ($T^{\circ}\text{C} = 15.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 8.0 \pm 0.1$; salinity = 35.8 ± 0.01 ‰). Experiments were conducted in December to avoid gametogenesis. Oysters were acclimated for 7 days to 9 hr light-15 hr dark conditions mimicking the natural light regime in winter time fed with the non-harmful alga *Heterocapsa triquetra* of pre-exposure (continuously supplied with algae at a flow rate of $100\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ at a concentration of $1000\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$; $208.3 \pm 44.5\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ measured in *H.t* tanks; $208.7 \pm 38.1\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ measured in the *A.m* tanks, mean \pm SE). Then, the *H.t* treatment group (3 replicate tanks) remained exposed to *H. triquetra* whereas the *A.m* treatment group (3 replicate tanks) was exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum* for 6 days (continuously supplied with algae at a flow rate of $100\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ at a concentration of $1000\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$; $159.1 \pm 15.7\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ measured in *H.t* tanks; $430.9 \pm 160.8\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ measured in the *A.m* tanks, mean \pm SE). During the two last days of exposure, gill tissue (n = 6 oysters

per condition) was collected every 4 hr for 52 hr, under natural light during light phases and under dim red light during dark phases, for a total of 13 sampling times (day 1: Zeitgeber time ZT 4.5, ZT 8.5, ZT 12.5, ZT 16.5, ZT 20.5; day 2: ZT 0.5, ZT 4.5, ZT 8.5, ZT 12.5, ZT 16.5, ZT 20.5; day 3: ZT 0.5; ZT 4.5). Zeitgeber time 0 (ZT0) corresponds to the light switch-on.

Algae

The paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellate *A. minutum* (strain AM89BM, Halim) and the non-toxic dinoflagellate *H. triquetra* (strain HT99PZ –Ehrenberg, 1840) were grown in 10L and 80L phyto reactors using f/2 medium. During the exponential growth phase, *A. minutum* produced 1.3 ± 0.1 pg saxitoxin per cell. *Heterocapsa triquetra* was chosen as control for several reasons. As *A. minutum*, *H. triquetra* belonged to the dinoflagellates and both species exhibited similar characteristics of shape and size with 19–28 μm and 23–29 μm cell sizes for *H. triquetra* and *A. minutum*, respectively. Algae concentrations were assessed by a Beckman Coulter Z2 (Beckman Coulter Inc., USA).

Paralytic Shellfish Toxins (PST)

Measurement of PST content in gill tissues of animals used for RNA-seq analysis was done during the 52 hr of sampling ($n = 72$). PST (saxitoxin and its derivatives) were assessed by ELISA (Abraxis, Novakits, France) according to manufacturer's instructions. Briefly, individual samples were crushed on ice, centrifuged, and diluted. Standard solutions and samples were added in duplicate (50 μl) into wells of an ELISA microtiter plate coated with a secondary sheep anti-rabbit antibody. Then, the saxitoxin horseradish peroxidase (saxitoxin-HRP) conjugate solution and the primary antibody solution (rabbit anti-saxitoxin) were added successively. Plates were incubated at room temperature and washed four times using washing solution. Substrate solution containing tetramethyl-benzidine was added to each well and plates were incubated. Finally, reactions were stopped by a solution containing sulfuric acid and absorbance was read at 450 nm. Color intensity was inversely proportional to the concentration of PSTs in the samples.

RNA sequencing (RNAseq)

Total RNA from gills was extracted from samples using TRI® Reagent (Invitrogen). After purity (Nanodrop) and quality (Agilent 210 BioAnalyzer, RIN value > 8.5) checks, RNA samples were normalized and pooled ($n = 6$) in equal quantities of total RNA, according to time and condition. Messenger RNA purifications were performed to generate 26 libraries from 4 μg of total RNA using the Illumina TruSeq Strand mRNA Sample Prep kit according to the manufacturer's protocol. Sequencing of 100 bp paired-end fragments was performed on four pooled libraries, each one on two lanes, on the same flowcell, using an Illumina HiSeq 2500 at the genomic platform Génopole Toulouse/Midi-Pyrénées (INRA Auzeville, France).

RNAseq data analysis

Adapter and base quality trimming (Phred score < 20) was performed with Trim Galore (trim_galore_v0.3.7). The read depth was fixed at 47.0 million reads/sample (down-sampling normalization, Supplementary Table S1) for cycling transcriptome analysis, according to (Li et al. 2015). Relative log expression normalization (RLE) was applied instead of down-sampling for differential expression analysis (edgeR version 3.8.6 ; (Robinson et al. 2010)). Sequenced reads were aligned by STAR (STAR_2.4.2a ; (Dobin et al. 2013)) to both the genome and mitochondrial genome of *Crassostrea gigas* (Zhang et al. 2012), Ensemble 1.30; and NCBI reference NC_001276) and assigned by FeatureCount (1.4.5 version ; (Liao et al. 2014)) to annotations of the genome in public databases. Expression levels of genes were presented as cpm (counts per million). Filtering of transcripts with 0 cpm in the whole set of libraries was applied. Indeed, considering the homogenized read depth of samples (Supplementary Table S2), 0 cpm value for a transcript that have at least 1 cpm in at least one library was considered as a low expression and not a missing data. Finally, a total of 20,846 and 20,796 transcripts were obtained for analysis of cycling transcripts and differentially expressed transcripts, respectively.

Analysis of transcripts

Sequencing outputs and bioinformatics treatments were carefully analyzed and checked several times to ensure the reliability of data supporting the discussion. Cycling transcripts were detected using ARSER (Yang and Su 2010) with MetaCycle (version 1.1.0 ; (Wu et al. 2016) on R (32-bit, version 3.2.2). ARSER algorithm was developed and applied to high-throughput time-series analysis and particularly adapted to experimental designs with a timeframe of 4 h over 52 hr (Yang and Su 2010; Wu et al. 2014, 2016). Post-hocs were corrected for multiple comparisons to remove false discoveries (Storey and Tibshirani 2003; Storey et al. 2005). For all cycling detection, a false discovery rate (FDR) of < 0.05 was considered significant. Note that in 24 hr light / dark entrainment, the external circadian cues may directly generate 24 hr rhythms, in an addition of CCGs group. Amplitudes of oscillating transcripts were calculated as ((high value - low value) / low value) (Hughes et al. 2012). All these genes with a period length between 20 hr and 28 hr comprise circadian transcripts (Westermarck and Herzog 2013). Differentially expressed transcripts were analyzed with edgeR (edgeR version 3.8.6), considering the 13 sample times (day 1 ZT 0.5 to day 3 ZT 0.5) of each algal treatment as replicates; the results were corrected for multiple tests using the FDR (Benjamini and Hochberg 1995).

Gene ontology analysis

Gene descriptions were obtained using the *C. gigas* reference genome (Zhang et al. 2012) on Biomart, Ensembl Metazoa (<http://metazoa.ensembl.org/biomart/martview/>). Enrichment analyses were performed using the Fisher test on Blast2GO software (version 2.8), selecting only specific biological processes.

cDNA synthesis and real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

The same samples used for RNA sequencing were analyzed by performing RT-qPCR at 7 sampling times (day 2: ZT 0.5, ZT 4.5, ZT 8.5, ZT 12.5, ZT 16.5, ZT 20.5 and day 3: ZT 0.5). Total RNA from individual samples of gills was extracted as previously described and reverse transcribed using oligo dT17 and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV; Promega). RT-qPCR reactions were performed in replicate (n = 6) on individual samples using Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix kit (Agilent) (Perrigault and Tran 2017b). Primer sets of circadian clock genes were designed (Perrigault and Tran 2017b) and are listed in Supplementary Table S5. EF1 (Elongation factor 1) was selected as the housekeeping gene using geNorm, BestKeeper and Normfinder (Wang et al., 2012) and relative expression levels were calculated using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method ; (Livak and Schmittgen 2001). Validation of the RNAseq analysis was done by RT-qPCR assessment of clock genes. Normalization of gene expression was done for both analyses as follow: $(X_i - \min) / (\max - \min)$, where X_i was the gene expression value, min and max were the minimum and maximum values of the gene expression in a given condition and for a specific clock gene (Supplementary Fig. S2).

Behavioral monitoring

The valve activity of *C. gigas* (n = 32) was studied using two HFNI (high-frequency non-invasive) valvometers (Tran et al. 2003, 2015). Lightweight electromagnets (0.1 g) were glued on each valve of each animal. These electrodes were connected to the valvometer by flexible wires which allowed the oysters to move their valves without constraint. The sampling frequency for each individual was 0.2 Hz. Data were processed using LabView 8.0 software (National Instruments). For the VOD, the mean hourly valve opening duration was expressed as the percentage of time that oysters spent with their valves open: 100 % indicates that the valves were open for the entire hour and 0% indicates that the valves were closed for the hour. The 48-hr mean hourly opening durations for 16 oysters per condition was used in the analyses.

Statistical analysis for RT-qPCR and behavioral analysis

Results are expressed as the means \pm the SE. Treatment differences were determined using analysis of variance (ANOVA) after checking assumptions (normality and homoscedasticity of the error term). When assumptions were not met, the non-parametric Kruskal–Wallis test was performed. If the null hypothesis was rejected, the Student–Newman-Keuls method was applied to determine significant differences between conditions. For all statistical results, a probability of $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using Sigma Stat software (Version 13.0, SYSTAT, Chicago, USA).

Data access

RNAseq data are available in the ArrayExpress database (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under accession number E-MTAB-5345.

Acknowledgments

This work was supported by the financial support of the Nation Research Agency (ANR), ACCUTOX project 13-CESA-0019 (2013-2017) and a ministerial PhD scholarship for L. Payton. We thank O. Bouchez and A. Chaubet (Génopole Toulouse/Midi-Pyrénées, INRA Auzeville, France) for sequencing and discussions. We would thank I. Gonzalez, G. Lefort (Genotoul, INRA Auzeville, France) and Anthony Bertucci (UMR EPOC, Arcachon, France) for their advices in bioinformatics and biostatistics treatment. Authors also thank Dr. K.Flynn for English corrections.

Author contributions

Conceptualization, L.P., D.T.; Investigation, L.P., D.T., M.P., A.H., F.B., C.F., H.H., J.C.M.; Samples treatment, L.P., M.P.; Bioinformatics treatment, C.H.; Biostatistics treatment, L.P., M.S., C.H.; Funding acquisition, D.T., J.C.M.; Visualization, L.P., D.T., Writing-Original Draft, L.P.; Writing correction, D.T, M.P., J.C.M., M.S., A.H., C.H., H.H., F.B.; Supervision, D.T.

Additional information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

References

- Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, et al (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 12:540–550. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00759-5
- Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11:R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106
- Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (2012) Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annu Rev Mar Sci* 4:143–176. doi: 10.1146/annurev-marine-120308-081121
- Antunes LC, Levandovski R, Dantas G, et al (2010) Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutr Res Rev* 23:155–168. doi: 10.1017/S0954422410000016

- Bardouil M, Bohec M, Bougrier S, et al (1996) Feeding responses of *Crassostrea gigas* (Thunberg) to inclusion of different proportions of toxic dinoflagellates in their diet. *Oceanol Acta* 19:177–182.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 57:289–300.
- Bernard I, Massabuau J-C, Ciret P, et al (2016) *In situ* spawning in a marine broadcast spawner, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: timing and environmental triggers. *Limnol Oceanogr* 61:635–647. doi: 10.1002/lno.10240
- Borcier E, Morvezen R, Boudry P, et al (2017) Effects of bioactive extracellular compounds and paralytic shellfish toxins produced by *Alexandrium minutum* on growth and behaviour of juvenile great scallops *Pecten maximus*. *Aquat Toxicol* 184:142–154. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.01.009
- Bricelj VM, Shumway SE (1998) Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev Fish Sci* 6:315–383. doi: 10.1080/10641269891314294
- Claudiel T, Cretenet G, Saumet A, Gachon F (2007) Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock. *FEBS Lett* 581:3626–3633. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.009
- Connor KM, Gracey AY (2011) Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *Proc Natl Acad Sci* 108:16110–16115. doi: 10.1073/pnas.1111076108
- Cretenet G, Le Clech M, Gachon F (2010) Circadian clock-coordinated 12 hr period rhythmic activation of the *IRE1 α* pathway controls lipid metabolism in mouse liver. *Cell Metab* 11:47–57. doi: 10.1016/j.cmet.2009.11.002
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
- Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, et al (2010) Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient *Cry*-null mice involves dysregulated adrenal *Hsd3b6*. *Nat Med* 16:67–74. doi: 10.1038/nm.2061
- Duffield GE, Watson NP, Mantani A, et al (2009) A role for *Id2* in regulating photic entrainment of the mammalian circadian system. *Curr Biol* 19:297–304. doi: 10.1016/j.cub.2008.12.052
- Eckel-Mahan KL, Patel VR, de Mateo S, et al (2013) Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell* 155:1464–1478. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.034
- Eskin A (1977) Neurophysiological mechanisms involved in photo-entrainment of the circadian rhythm from the *Aplysia* eye. *J Neurobiol* 8:273–299. doi: 10.1002/neu.480080310

- FAO, WHO (2016) Technical paper on Toxicity Equivalency Factors for Marine Biotoxins Associated with Bivalve Molluscs.
- Fonken LK, Workman JL, Walton JC, et al (2010) Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci* 107:18664–18669. doi: 10.1073/pnas.1008734107
- Fu L, Lee CC (2003) The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 3:350–361. doi: 10.1038/nrc1072
- Gachon F, Olela FF, Schaad O, et al (2006) The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab* 4:25–36. doi: 10.1016/j.cmet.2006.04.015
- Galimany E, Sunila I, Hégaret H, et al (2008) Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7:630–638. doi: 10.1016/j.hal.2008.01.001
- Guillard RRL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH (eds) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer US, Boston, MA, pp 29–60
- Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, et al (2010b) Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 97:96–108. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.12.006
- Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, et al (2010a) Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 9:427–439. doi: 10.1016/j.hal.2010.01.003
- Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD, Enevoldsen HO (2003) *Manual on harmful marine microalgae*. Unesco
- Hégaret H, Wikfors GH, Shumway SE (2007) Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc when exposed to three species of harmful algae. *J Shellfish Res* 26:549–559. doi: 10.2983/0730-8000(2007)26[549:DFROFS]2.0.CO;2
- Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, et al (2009) Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLOS Genet* 5:e1000442. doi: 10.1371/journal.pgen.1000442
- Hughes ME, Grant GR, Paquin C, et al (2012) Deep sequencing the circadian and diurnal transcriptome of drosophila brain. *Genome Res* 22:1266–1281. doi: 10.1101/gr.128876.111
- Hur S-P, Takeuchi Y, Itoh H, et al (2012) Fish sleeping under sandy bottom: interplay of melatonin and clock genes. *Gen Comp Endocrinol* 177:37–45. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.01.007

- Iitaka C, Miyazaki K, Akaike T, Ishida N (2005) A role for *glycogen synthase kinase-3 β* in the mammalian circadian clock. *J Biol Chem* 280:29397–29402. doi: 10.1074/jbc.M503526200
- Knutsson A (2003) Health disorders of shift workers. *Occup Med* 53:103–108. doi: 10.1093/occmed/kqg048
- Korenčič A, Košir R, Bordyugov G, et al (2014) Timing of circadian genes in mammalian tissues. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep05782
- Li J, Grant GR, Hogenesch JB, Hughes ME (2015) Chapter Sixteen - Considerations for RNA-seq analysis of circadian rhythms. In: Sehgal A (ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 349–367
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923–930. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656
- Lin J-M, Kilman VL, Keegan K, et al (2002) A role for *casein kinase 2 α* in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 420:816–820. doi: 10.1038/nature01235
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, Young MW (2001) A role for the segment polarity gene *shaggy/GSK-3* in the *drosophila* circadian clock. *Cell* 105:769–779. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00383-X
- Mat AM, Haberkorn H, Bourdineaud J-P, et al (2013) Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum*. *Aquat Toxicol* 140–141:458–465. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.07.008
- Mat AM, 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. doi: 10.3109/07420528.2012.699126
- Mello DF, Silva PM da, Barracco MA, et al (2013) Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. *Harmful Algae* 26:45–51. doi: 10.1016/j.hal.2013.03.003
- Oren M, Tarrant AM, Alon S, et al (2015) Profiling molecular and behavioral circadian rhythms in the non-symbiotic sea anemone *Nematostella vectensis*. *Sci Rep* 5:11418. doi: 10.1038/srep11418
- Panda S, Antoch MP, Miller BH, et al (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109:307–320. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00722-5

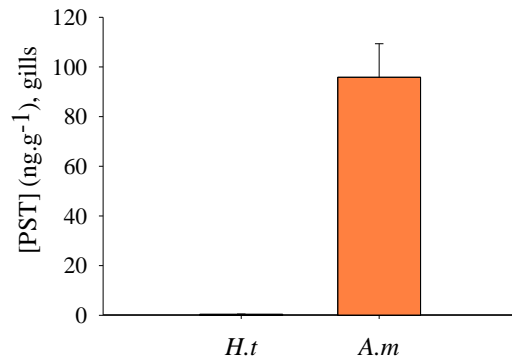
- Perrigault M, Tran D (2017) Identification of the molecular clockwork of the oyster *Crassostrea gigas*. PLOS ONE 12:e0169790. doi: 10.1371/journal.pone.0169790
- Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, et al (2009) Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. Science 324:651–654. doi: 10.1126/science.1171641
- Ravn H, Anthoni U, Christophersen C, et al (1995) Standardized extraction method for paralytic shellfish toxins in phytoplankton. J Appl Phycol 7:589–594. doi: 10.1007/BF00003947
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
- Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, et al (2010) Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3 β -mediated phosphorylation. PLoS ONE 5:e8561. doi: 10.1371/journal.pone.0008561
- Schwartz WJ, Gross RA, Morton MT (1987) The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. Proc Natl Acad Sci 84:1694–1698.
- Sharifian A, Farahani S, Pasalar P, et al (2005) Shift work as an oxidative stressor. J Circadian Rhythms 3:15. doi: 10.1186/1740-3391-3-15
- Storey JD, Tibshirani R (2003) Statistical significance for genomewide studies. Proc Natl Acad Sci 100:9440–9445. doi: 10.1073/pnas.1530509100
- Storey JD, Xiao W, Leek JT, et al (2005) Significance analysis of time course microarray experiments. Proc Natl Acad Sci 102:12837–12842. doi: 10.1073/pnas.0504609102
- Suwazono Y, Dochi M, Sakata K, et al (2008) A longitudinal study on the effect of shift work on weight gain in male japanese workers. Obesity 16:1887–1893. doi: 10.1038/oby.2008.298
- Takeuchi J, Shannon W, Aronin N, Schwartz WJ (1993) Compositional changes of AP-1 DNA-binding proteins are regulated by light in a mammalian circadian clock. Neuron 11:825–836. doi: 10.1016/0896-6273(93)90112-5
- Tao W, Wu J, Zhang Q, et al (2015) EGR1 regulates hepatic clock gene amplitude by activating *Per1* transcription. Sci Rep 5:15212. doi: 10.1038/srep15212
- Teschke M, Wendt S, Kawaguchi S, et al (2011) A circadian clock in antarctic krill: an endogenous timing system governs metabolic output rhythms in the euphausiid species *Euphausia superba*. PLoS ONE 6:e26090. doi: 10.1371/journal.pone.0026090
- Tessmar-Raible K, Raible F, Arboleda E (2011) Another place, another timer: Marine species and the rhythms of life. BioEssays 33:165–172. doi: 10.1002/bies.201000096

- Tran D, Ciret P, Ciutat A, et al (2003) Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: Application to cadmium. *Environ Toxicol Chem* 22:914–920. doi: 10.1002/etc.5620220432
- Tran D, Ciutat A, Mat A, et al (2015) The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 158:41–49. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.10.023
- Tran D, Haberkorn H, Soudant P, et al (2010) Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture* 298:338–345. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.10.030
- Tran D, Nadau A, Durrieu G, 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. doi: 10.3109/07420528.2011.565897
- Ueda HR, Hayashi S, Chen W, et al (2005) System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* 37:187–192. doi: 10.1038/ng1504
- Vielhaber E, Eide E, Rivers A, et al (2000) Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian *casein kinase I varepsilon*. *Mol Cell Biol* 20:4888–4899. doi: 10.1128/MCB.20.13.4888-4899.2000
- Viitasalo K, Puttonen S, Kuosma E, et al (2015) Shift rotation and age – interactions with sleep–wakefulness and inflammation. *Ergonomics* 58:65–74. doi: 10.1080/00140139.2014.958573
- Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, et al (2009) Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 106:21453–21458. doi: 10.1073/pnas.0909591106
- Westermarck PO, Herzog H (2013) Mechanism for 12 hr rhythm generation by the circadian clock. *Cell Rep* 3:1228–1238. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.013
- Wilcockson D, Zhang L (2008) Circatidal clocks. *Curr Biol* 18:R753–R755. doi: 10.1016/j.cub.2008.06.041
- Wildish D, Lassus P, Martin J, et al (1998) Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium sp.* on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 11:35–43.
- Wu G, Anafi RC, Hughes ME, et al (2016) MetaCycle: an integrated R package to evaluate periodicity in large scale data.
- Wu G, Zhu J, Yu J, et al (2014) Evaluation of five methods for genome-wide circadian gene identification. *J Biol Rhythms* 29:231–242. doi: 10.1177/0748730414537788

- Xi Y, Chen D (2014) Partitioning the circadian clock. *Science* 345:1122–1123. doi: 10.1126/science.1259601
- Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, et al (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302:1408–1412. doi: 10.1126/science.1089287
- Yang R, Su Z (2010) Analyzing circadian expression data by harmonic regression based on autoregressive spectral estimation. *Bioinformatics* 26:i168–i174. doi: 10.1093/bioinformatics/btq189
- Yerushalmi S, Green RM (2009) Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecol Lett* 12:970–981. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01343.x
- Yoshitane H, Honma S, Imamura K, et al (2012) JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep* 13:455–461. doi: 10.1038/embor.2012.37
- Zantke J, Ishikawa-Fujiwara T, Arboleda E, et al (2013) Circadian and circalunar clock interactions in a marine annelid. *Cell Rep* 5:99–113. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.031
- Zhang EE, Kay SA (2010) Clocks not winding down: unravelling circadian networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:764–776. doi: 10.1038/nrm2995
- Zhang G, Fang X, Guo X, et al (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490:49–54. doi: 10.1038/nature11413
- Zhang L, Hastings MH, Green EW, et al (2013) Dissociation of circadian and circatidal timekeeping in the marine crustacean *Eurydice pulchra*. *Curr Biol* 23:1863–1873. doi: 10.1016/j.cub.2013.08.038
- Zhang L, Prosdocimo DA, Bai X, et al (2015) KLF15 establishes the landscape of diurnal expression in the heart. *Cell Rep* 13:2368–2375. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.038
- Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, et al (2014) A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci* 111:16219–16224. doi: 10.1073/pnas.1408886111
- Zhao H, Sifakis EG, Sumida N, et al (2015) PARP1- and CTCF-mediated interactions between active and repressed chromatin at the lamina promote oscillating transcription. *Mol Cell* 59:984–997. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.019

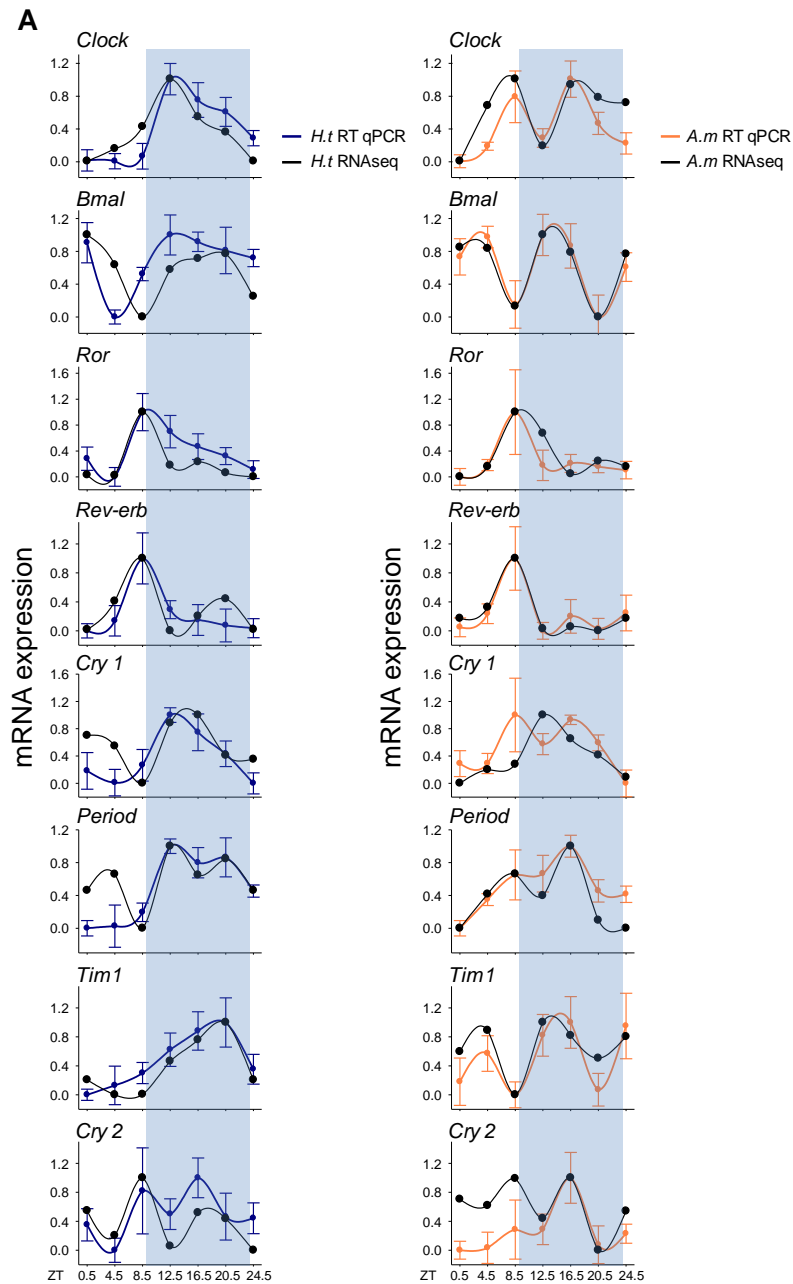
Suppléments d'information

Supplementary Figures

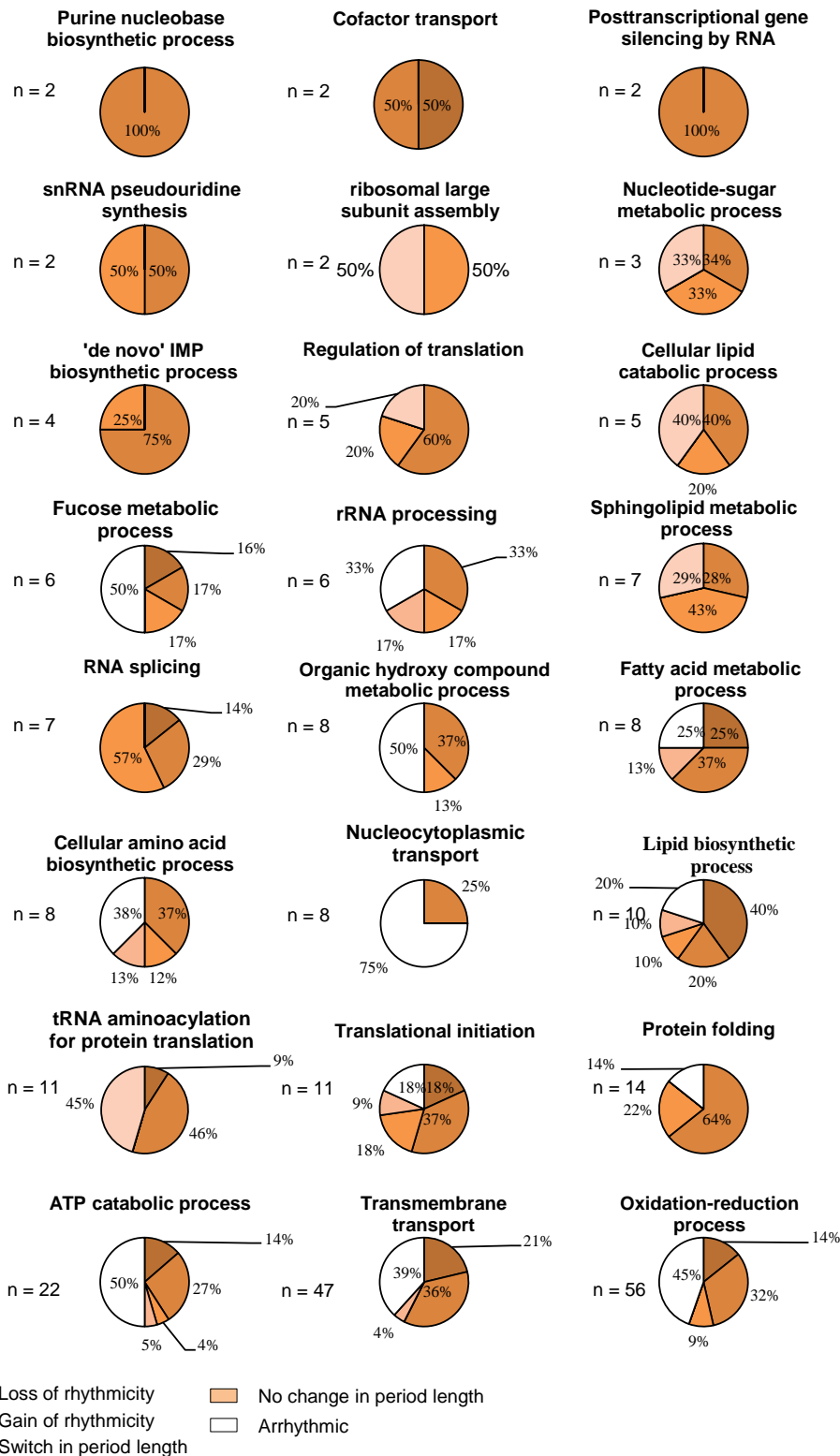


Supplementary Figure S1. PST toxins bioaccumulation in gills.

Quantification of PST bioaccumulation (ng.g⁻¹ eqSTX, mean \pm SE, n = 72) in gills of *H.t* and *A.m C. gigas*.



Supplementary Figure S2. Circadian core clock gene expression quantified by both real-time qPCR and RNAseq. (A) Relative expression measured with real-time qPCR (mean \pm SE) were compared with RNAseq approach in *H.t* (on the left) and *A.m* (on the right) (normalized expression). Gray areas correspond to nighttime. (B) Pearson correlation results between both analysis (normalized data) on each circadian clock genes (*H.t* and *A.m* confounded) and on the all gene expression in *H.t* and *A.m* condition respectively.



Supplementary Figure S3. Details of cycling status for enriched biological processes of DE analysis.

“n”: the number of transcripts affected by GO terms.

Supplementary Tables

Supplementary Table S1. Details of RNAseq analyzes.

Analysis of cycling transcripts, Down Sampling normalization.

Time	Sample	Total reads, millions	Aligned reads, millions (STAR) (percentage of total reads)	Assigned reads, millions (FeatureCount) (percentage of aligned reads)
day 1 ZT 4.5	1 <i>H.t</i>	47	45.2 (96.2 %)	27.0 (59.8 %)
day 1 ZT 8.5	2 <i>H.t</i>	47	45.8 (97.4 %)	27.8 (60.8 %)
day 1 ZT 12.5	3 <i>H.t</i>	47	45.5 (96.8 %)	27.6 (60.6 %)
day 1 ZT 16.5	4 <i>H.t</i>	47	45.9 (97.7 %)	27.8 (60.4 %)
day 1 ZT 20.5	5 <i>H.t</i>	47	45.9 (97.7 %)	27.0 (58.9 %)
day 2 ZT 0.5	6 <i>H.t</i>	47	45.6 (97.0 %)	27.2 (59.6 %)
day 2 ZT 4.5	7 <i>H.t</i>	47	45.9 (97.7 %)	27.4 (59.9 %)
day 2 ZT 8.5	8 <i>H.t</i>	47	51.9 (100.0 %)	33.1 (63.7 %)
day 2 ZT 12.5	9 <i>H.t</i>	47	45.7 (97.2 %)	27.6 (60.4 %)
day 2 ZT 16.5	10 <i>H.t</i>	47	45.9 (97.7 %)	27.7 (60.3 %)
day 2 ZT 20.5	11 <i>H.t</i>	47	46.1 (98.1 %)	27.2 (58.9 %)
day 3 ZT 0.5	12 <i>H.t</i>	47	44.7 (95.1 %)	24.5 (54.8 %)
day 3 ZT 4.5	13 <i>H.t</i>	47	45.5 (96.8 %)	25.0 (54.9 %)
day 1 ZT 4.5	1 <i>A.m</i>	47	46.3 (98.5 %)	28.2 (60.9 %)
day 1 ZT 8.5	2 <i>A.m</i>	47	46.3 (98.5 %)	28.4 (61.2 %)
day 1 ZT 12.5	3 <i>A.m</i>	47	46.4 (98.7 %)	29.3 (63.0 %)
day 1 ZT 16.5	4 <i>A.m</i>	47	42.5 (90.4 %)	25.4 (59.7 %)
day 1 ZT 20.5	5 <i>A.m</i>	47	48.5 (100.0 %)	29.3 (60.5 %)
day 2 ZT 0.5	6 <i>A.m</i>	47	46.5 (98.9 %)	28.6 (61.5 %)
day 2 ZT 4.5	7 <i>A.m</i>	47	45.9 (97.6 %)	27.9 (60.8 %)
day 2 ZT 8.5	8 <i>A.m</i>	47	53.4 (100.0 %)	33.9 (63.4 %)
day 2 ZT 12.5	9 <i>A.m</i>	47	46.6 (99.1 %)	29.0 (62.3 %)
day 2 ZT 16.5	10 <i>A.m</i>	47	46.1 (98.1 %)	26.2 (56.9 %)
day 2 ZT 20.5	11 <i>A.m</i>	47	46.3 (98.5 %)	26.5 (57.2 %)
day 3 ZT 0.5	12 <i>A.m</i>	47	46.3 (98.5 %)	26.7 (57.8 %)
day 3 ZT 4.5	13 <i>A.m</i>	47	46.1 (98.1 %)	26.2 (56.7 %)

Analysis of differential expressed transcripts, Relative Log Expression (RLE) normalization.

day 1 ZT 4.5	1 <i>H.t</i>	62.6	60.4 (96.5 %)	36.2 (59.8 %)
day 1 ZT 8.5	2 <i>H.t</i>	67.1	65.5 (97.6 %)	39.8 (60.8 %)
day 1 ZT 12.5	3 <i>H.t</i>	65	63.1 (97.1 %)	38.3 (60.6 %)
day 1 ZT 16.5	4 <i>H.t</i>	68.5	67.1 (98.0 %)	40.6 (60.5 %)
day 1 ZT 20.5	5 <i>H.t</i>	59.2	57.9 (97.8 %)	34.2 (59.0 %)
day 2 ZT 0.5	6 <i>H.t</i>	59	57.5 (97.6 %)	34.3 (59.7 %)
day 2 ZT 4.5	7 <i>H.t</i>	69.4	68.0 (98.0 %)	40.8 (60.0 %)
day 2 ZT 8.5	8 <i>H.t</i>	62.8	69.6 (100.0 %)	44.4 (63.8 %)
day 2 ZT 12.5	9 <i>H.t</i>	62.3	60.8 (97.6 %)	36.8 (60.5 %)
day 2 ZT 16.5	10 <i>H.t</i>	47	45.9 (97.7 %)	27.7 (60.3 %)
day 2 ZT 20.5	11 <i>H.t</i>	73.4	72.2 (98.4 %)	40.3 (55.9 %)

day 3 ZT 0.5	12 <i>H.t</i>	54.6	52.0 (95.2 %)	28.1 (53.9 %)
day 3 ZT 4.5	13 <i>H.t</i>	51.3	49.7 (97.0 %)	27.1 (54.4 %)
day 1 ZT 4.5	1 <i>A.m</i>	87.6	86.4 (98.6 %)	52.6 (60.9 %)
day 1 ZT 8.5	2 <i>A.m</i>	61.2	60.5 (98.9 %)	37.1 (61.2 %)
day 1 ZT 12.5	3 <i>A.m</i>	60.5	59.9 (99.0 %)	37.8 (63.1 %)
day 1 ZT 16.5	4 <i>A.m</i>	51.3	46.4 (90.4 %)	27.7 (59.7 %)
day 1 ZT 20.5	5 <i>A.m</i>	70.8	73.2 (100.0 %)	44.3 (60.5 %)
day 2 ZT 0.5	6 <i>A.m</i>	71	70.3 (99.0 %)	43.2 (61.5 %)
day 2 ZT 4.5	7 <i>A.m</i>	62.4	45.8 (73.4 %)	27.3 (59.6 %)
day 2 ZT 8.5	8 <i>A.m</i>	65.9	75.1 (100.0 %)	47.6 (63.4 %)
day 2 ZT 12.5	9 <i>A.m</i>	63.4	63.1 (99.5 %)	39.3 (62.3 %)
day 2 ZT 16.5	10 <i>A.m</i>	60.6	59.5 (98.2 %)	33.0 (55.9 %)
day 2 ZT 20.5	11 <i>A.m</i>	66.4	65.6 (98.8 %)	36.1 (55.0 %)
day 3 ZT 0.5	12 <i>A.m</i>	61.8	61.0 (98.7 %)	34.2 (56.0 %)
day 3 ZT 4.5	13 <i>A.m</i>	54.7	53.8 (98.3 %)	30.1 (55.9 %)

Supplementary Table S2. Number of cycling transcripts (ARSER, FDR < 0.05) in *H.t* and *A.m* condition, details of *A.m* exposure's effect on cycling transcripts (number).

Period range	Cycling transcripts in <i>H.t</i> (% among total transcripts)	Cycling transcripts in <i>A.m</i> (% among total transcripts)	Details of <i>A.m</i> exposure's effect on cycling transcripts			
			No change in period length	Switch in period length range	Loss of rhythmicity	Gain of rhythmicity
Circadian (20-28 hr)	1300 (6.2 %)	630 (3.0 %)	53	358	889	428
Ultradian 1 (8-11 hr)	2185 (10.5 %)	2452 (11.8 %)	294	400	1491	1737
Ultradian 2 (12-16 hr)	1576 (7.6 %)	2207 (10.6 %)	228	300	1048	1484
All period range	5061 (24.3 %)	5289 (25.4 %)	575	1058	3428	3649

Number of total transcripts: 20846

Supplementary Table S3. The 30 most significant circadian, U1 (8-11 hr) and U2 (12-16 hr) transcripts in *H.t* (on the left) and *A.m* (on the right) condition, ARSER. Published as Excel format.

p-value: *p*-value of ARSER analysis in *H.t* (left) and *A.m* (right); *H.t*: cycling status in *H.t*; *A.m*: cycling status in *A.m*. (C, circadian; U1, ultradian 1; U2, ultradian 2 / D, phase peak during daytime; N1, phase peak in first part of night; N2, phase peak in second part of night).

Gene ID	Gene description	<i>p</i> -value <i>H.t</i>	<i>H.t</i>	<i>A.m</i>	Gene ID	Gene description	<i>p</i> -value <i>A.m</i>	<i>A.m</i>	<i>H.t</i>
CGI_1001 2905	Tripartite motif-containing protein 3	8.71E-06	C/N1	AR	CGI_100 10275	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2	3.77E-07	C/D	U1
CGI_1002 7030	Transcription initiation factor TFIIID subunit 6	2.25E-05	C/N2	AR	CGI_100 08400		8.93E-06	C/D	AR
CGI_1000 0698	Nacrein-like protein P2	5.94E-05	C/N1	C/N2	CGI_100 11325		2.17E-05	C/N2	U2
CGI_1001 0871	RNA polymerase II-associated protein 2	6.15E-05	C/N2	U1	CGI_100 15212	Tripartite motif-containing protein 2	2.53E-05	C/N1	AR
CGI_1002 0789	tRNA isopentenyltransferase, mitochondrial	6.53E-05	C/N2	AR	CGI_100 11276	FMRFamide receptor	6.02E-05	C/D	AR
CGI_1002 1942	von Willebrand factor D and EGF domain-containing protein	7.43E-05	C/N2	AR	CGI_100 27929	Protein flightless-1	1.44E-04	C/N1	AR
CGI_1000 9381	Tripartite motif-containing protein 3	8.18E-05	C/D	AR	CGI_100 11977		1.49E-04	C/N1	AR
CGI_1001 2213		1.07E-04	C/N1	AR	EMCGI G000000 01831	tRNA-Pseudo for anticodon AGA	2.12E-04	C/N2	AR
CGI_1002 7789		1.20E-04	C/N2	AR	CGI_100 10220	TP53-regulated inhibitor of apoptosis 1	2.61E-04	C/N1	AR
CGI_1001 9027	Neuropilin and tolloid-like protein 2	1.41E-04	C/N2	U1	CGI_100 12261	Tripartite motif-containing protein 2	2.85E-04	C/N2	AR
CGI_1001 0708	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1	1.43E-04	C/N2	U2	CGI_100 15994		4.35E-04	C/N1	U1
CGI_1002 6590	Exportin-6	1.78E-04	C/N2	U1	CGI_100 00599	Tripartite motif-containing protein 3	4.95E-04	C/N2	U2
CGI_1000 9652	Multidrug resistance-associated protein 1	2.34E-04	C/N2	C/N1	CGI_100 21668	BTB/POZ domain-containing protein 17	5.12E-04	C/N2	AR
CGI_1001 6304	Hsp90 co-chaperone Cdc37	2.99E-04	C/N1	AR	CGI_100 09348	F-box only protein 33	6.04E-04	C/D	U1
CGI_1002 5265		3.36E-04	C/N1	U2	CGI_100 09949		6.14E-04	C/N1	AR
CGI_1001 3476		3.64E-04	C/N1	AR	CGI_100 28254	Angiomotin	7.29E-04	C/D	AR
CGI_1002 3786	Serine/threonine-protein kinase-transforming protein Rmil	4.36E-04	C/N1	AR	CGI_100 09120	Multiple epidermal growth factor-like domains 10	7.75E-04	C/N2	U1
CGI_1000 9654	Multidrug resistance-associated protein 1	4.56E-04	C/N2	U1	CGI_100 16363	Baculoviral IAP repeat-containing protein 7-A	9.75E-04	C/D	AR
CGI_1000 2783		4.62E-04	C/N1	AR	CGI_100 15719	Bone morphogenetic protein 3	9.90E-04	C/D	C/N 2
CGI_1000 1633	Kelch-like protein 2	4.73E-04	C/D	AR	CGI_100 15693	FMRFamide receptor	1.16E-03	C/D	AR

CGI_1001 5719	Bone morphogenetic protein 3	5.13E-04	C/N2	C/D	CGI_100 25708		1.20E-03	C/N1	AR
CGI_1000 6666	Heat shock 70 kDa protein 12A	5.49E-04	C/N2	AR	CGI_100 00790	Hepatocyte growth factor receptor	1.21E-03	C/D	AR
CGI_1000 8648	Amine oxidase	6.19E-04	C/N2	C/N2	CGI_100 00819	Short-chain collagen C4	1.28E-03	C/N2	AR
CGI_1000 8865	Proteasome subunit beta type	6.19E-04	C/N1	C/N1	CGI_100 03379	DnaJ-like protein subfamily C member 28	1.30E-03	C/D	U2
CGI_1000 7343	Polycomb group RING finger protein 3	6.20E-04	C/N1	AR	CGI_100 16528	Ribosomal protein S6 kinase alpha-5	1.30E-03	C/D	U1
CGI_1001 6434		6.45E-04	C/D	AR	CGI_100 05719	39S ribosomal protein L11, mitochondrial	1.38E-03	C/N1	AR
CGI_1000 6246	Plexin-A2	6.51E-04	C/N1	U1	CGI_100 17579	Tripartite motif-containing protein 3	1.44E-03	C/D	C/N2
CGI_1001 1123	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	7.59E-04	C/N1	C/D	CGI_100 24754		1.47E-03	C/D	AR
CGI_1002 6290	Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40	7.77E-04	CN1	U2	CGI_100 24574	Krueppel-like factor 1	1.60E-03	C/N2	U1
CGI_1002 3849	Bis (5'-nucleosyl)-tetrakisphatase	8.10E-04	C/N1	AR	CGI_100 18843		1.60E-03	C/D	U1
CGI_1000 6199	Zinc transporter ZIP14	4.16E-06	U1	U2	CGI_100 11114		8.33E-07	U1	AR
CGI_1000 4134	Complement C1q-like protein 4	1.88E-05	U1	U1	CGI_100 28599	Actin-1	3.20E-06	U1	AR
CGI_1001 1453		2.24E-05	U1	AR	CGI_100 27644	Tripartite motif-containing protein 2	7.70E-06	U1	C
CGI_1001 0275	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2	4.65E-05	U1	C	CGI_100 24435	Golgin subfamily A member 1	2.58E-05	U1	C
CGI_1001 5396	Toll-interacting protein	5.90E-05	U1	AR	CGI_100 14238	Transcription elongation factor B polypeptide 3	2.60E-05	U1	AR
CGI_1000 6215	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	8.13E-05	U1	AR	CGI_100 15735		2.67E-05	U1	U1
CGI_1001 5868	Sestrin-1	8.22E-05	U1	AR	CGI_100 10664		2.86E-05	U1	U1
CGI_1000 5255		9.86E-05	U1	AR	CGI_100 27647	Zinc finger protein RFP	4.17E-05	U1	AR
CGI_1001 9205		1.02E-04	U1	AR	CGI_100 26867	Retinal dehydrogenase 1	4.47E-05	U1	AR
CGI_1002 5135		1.11E-04	U1	AR	CGI_100 12563	Poly [ADP-ribose] polymerase 14	4.55E-05	U1	AR
CGI_1000 0705		1.31E-04	U1	U2	CGI_100 07385	Putative transmembrane protein ORF57	7.92E-05	U1	AR
CGI_1001 1101	UPF0465 protein C5orf33	1.36E-04	U1	U1	CGI_100 26883	Fibrinogen C domain-containing protein 1	8.15E-05	U1	AR
CGI_1000 4591		1.61E-04	U1	U1	CGI_100 23357	Putative E3 ubiquitin-protein ligase ARI3	8.40E-05	U1	C
CGI_1002 8434	Gem-associated protein 5	1.68E-04	U1	AR	CGI_100 21737	Toll-like receptor 2	9.05E-05	U1	U2
CGI_1000 3772	Spartin	1.69E-04	U1	AR	CGI_100 06543		1.11E-04	U1	AR
CGI_1000 2989	DNA replication licensing factor mcm4-B	1.71E-04	U1	AR	CGI_100 07175		1.33E-04	U1	U1
CGI_1000 1416		1.79E-04	U1	U1	CGI_100 20700	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	1.36E-04	U1	U2
CGI_1002	Plexin-A2	1.88E-04	U1	U1	CGI_100		1.45E-04	U1	AR

4776					18527				
CGI_1002		1.89E-04	U1	AR	CGI_100		1.55E-04	U1	AR
5491					09718				
CGI_1000	LSM domain-	1.89E-04	U1	AR	CGI_100		1.66E-04	U1	U2
0380	containing protein				23699				
	1								
CGI_1001		1.89E-04	U1	AR	CGI_100		1.70E-04	U1	C
6740					23299				
CGI_1002	DNA mismatch	1.94E-04	U1	AR	CGI_100	Beta-lactamase	2.11E-04	U1	AR
5856	repair protein Msh2				18278				
CGI_1001		2.74E-04	U1	C	CGI_100	DNA mismatch repair	2.33E-04	U1	AR
8539					06861	protein Mlh1			
CGI_1002	DNA mismatch	2.76E-04	U1	AR	CGI_100		2.38E-04	U1	AR
0971	repair protein Msh6				19347				
CGI_1002	Vitamin D3	2.88E-04	U1	AR	CGI_100		2.45E-04	U1	AR
0896	receptor A				00578				
CGI_1001	Spermine oxidase	2.92E-04	U1	AR	CGI_100	Tripartite motif-	2.50E-04	U1	U2
9135					25493	containing protein 2			
CGI_1000		2.98E-04	U1	AR	CGI_100		2.58E-04	U1	C
2607					09744				
CGI_1000		3.12E-04	U1	AR	CGI_100	Multiple epidermal	2.61E-04	U1	U1
3997					22916	growth factor-like			
						domains 6			
CGI_1000		3.54E-04	U1	AR	CGI_100	E3 ubiquitin-protein	3.07E-04	U1	U2
9387					01488	ligase UBR3			
CGI_1000	Fem-1-like protein	3.86E-04	U1	AR	CGI_100		3.42E-04	U1	AR
6319	C				17387				
CGI_1001		1.98E-05	U2	AR	CGI_100	U3 small nucleolar	2.00E-06	U2	C
1584					17253	RNA-associated protein			
						15-like protein			
CGI_1002	Proactivator	2.04E-05	U2	AR	CGI_100	Myoneurin	7.00E-06	U2	AR
1835	polypeptide				05244				
CGI_1000		2.43E-05	U2	U2	CGI_100	Krüppel-like factor 11	1.50E-05	U2	C
2011					04830				
CGI_1001	U4/U6.U5 small	3.14E-05	U2	U1	CGI_100	Putative glycerol kinase	1.70E-05	U2	C
8752	nuclear				08133	5			
	ribonucleoprotein								
	27 kDa protein								
CGI_1002		3.71E-05	U2	C	CGI_100	Actin-related protein 6	2.30E-05	U2	AR
5800					00659				
CGI_1000	Scavenger receptor	4.43E-05	U2	U1	CGI_100	Signal recognition	2.60E-05	U2	AR
4414	class F member 2				10631	particle 9 kDa protein			
CGI_1001	Zinc finger MYM-	6.95E-05	U2	AR	CGI_100	Endoglucanase 1	3.00E-05	U2	AR
6380	type protein 3				11702				
CGI_1002	Neuronal	8.60E-05	U2	U1	CGI_100		3.60E-05	U2	AR
4896	acetylcholine				11449				
	receptor subunit								
	alpha-3								
CGI_1000	E3 ubiquitin-	1.00E-04	U2	AR	CGI_100	AP-1 complex subunit	3.80E-05	U2	C
9138	protein ligase				09211	mu-1			
	DZIP3								
CGI_1001	THAP domain-	1.04E-04	U2	C	CGI_100		4.00E-05	U2	AR
5109	containing protein				21753				
	10								
CGI_1000	Cytochrome c-type	1.05E-04	U2	U2	CGI_100	DnaJ-like protein	4.10E-05	U2	U2
4088	heme lyase				10432	subfamily C member 11			
CGI_1000		1.16E-04	U2	U2	CGI_100	Betaine--homocysteine	4.70E-05	U2	AR
7598					17122	S-methyltransferase 2			
CGI_1001		1.21E-04	U2	AR	CGI_100		5.90E-05	U2	U2
4469					02987				
CGI_1000	3-ketoacyl-CoA	1.21E-04	U2	U2	CGI_100	Mitochondrial	6.90E-05	U2	C
2160	thiolase,				26290	intermembrane space			
	mitochondrial					import and assembly			
						protein 40			
CGI_1000		1.36E-04	U2	AR	CGI_100	Nucleolar protein 14	8.10E-05	U2	AR
2658					10087				
CGI_1001	Endothelin-	1.38E-04	U2	AR	CGI_100	Tetratricopeptide repeat	8.20E-05	U2	AR

9681	converting enzyme 1				27854	protein 27			
CGI_10007196	Beta-hexosaminidase subunit beta	1.48E-04	U2	AR	CGI_10001834	Mitochondrial ribonuclease P protein 1-like protein	8.80E-05	U2	AR
CGI_10004846		1.79E-04	U2	AR	CGI_10003579	Acetyl-CoA carboxylase	1.00E-04	U2	AR
CGI_10008739	Carbonic anhydrase-related protein	1.89E-04	U2	AR	CGI_10002310	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A, mitochondrial	1.30E-04	U2	AR
CGI_10005334	Zinc finger MYM-type protein 3	1.93E-04	U2	AR	CGI_10027851		1.50E-04	U2	AR
CGI_10015738	Putative E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2	1.94E-04	U2	AR	CGI_10026004	V-type proton ATPase subunit G	1.60E-04	U2	AR
CGI_10005980	tRNA 2-thiocytidine biosynthesis protein ttcA	2.01E-04	U2	AR	CGI_10006467	Williams-Beuren syndrome chromosomal region 16-like protein	1.60E-04	U2	U1
CGI_10004359		2.01E-04	U2	AR	CGI_10003139	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	1.70E-04	U2	U2
CGI_10005094	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	2.02E-04	U2	U2	CGI_10025909	SH2 domain-containing protein 4B	1.70E-04	U2	AR
CGI_10014732		2.31E-04	U2	AR	CGI_10020866	Mismatch repair endonuclease PMS2	1.80E-04	U2	AR
CGI_10018709	Tenascin-R	2.59E-04	U2	AR	CGI_10006526	N(2),N(2)-dimethylguanosine tRNA methyltransferase	1.90E-04	U2	AR
CGI_10025440		2.73E-04	U2	AR	CGI_10001165	Histone H2A	1.90E-04	U2	AR
CGI_10005063	Ankyrin repeat and SOCS box protein 13	2.87E-04	U2	AR	CGI_10012125	Cell division protein kinase 8	1.90E-04	U2	U1
CGI_10014415	Hemicentin-1	2.88E-04	U2	U1	CGI_10020915	H/ACA ribonucleoprotein complex non-core subunit NAF1	2.00E-04	U2	AR
CGI_10000812	Iduronate 2-sulfatase	3.13E-04	U2	AR	CGI_10020815	Collagen alpha-2(VIII) chain	2.00E-04	U2	C

Supplementary Table S4. The 25 transcripts most significantly up and down regulated with *Am* condition. “FDR”: significance and fold change of differential expression analysis; “*H.t*”: cycling status of transcripts in *H.t*; “*A.m*”: cycling status of transcripts in *A.m* (AR, arrhythmic; C, circadian; U1, ultradian 1; U2, ultradian 2).

Gene ID	Gene description	FDR	logFC	<i>H.t</i>	<i>A.m</i>
Up-regulated transcripts					
CGI_10017999	Multidrug resistance protein 1	5.4E-46	3.36	AR	AR
CGI_10017108	Tyramine beta-hydroxylase	7.7E-38	3.67	AR	AR
CGI_10017107	Temptin	2.5E-37	3.40	AR	AR
CGI_10001849	Dopamine beta-hydroxylase	9.1E-35	3.55	AR	AR
CGI_10027142	Nose resistant to fluoxetine protein 6	3.7E-34	3.48	AR	U2
CGI_10002724	Arylacetamide deacetylase	5.4E-30	2.29	U2	U1
CGI_10020743	AOX, Alternative oxidase, mitochondrial	2.5E-29	3.53	AR	AR
CGI_10009284	von Willebrand factor D and EGF domain-containing protein	8.2E-29	2.99	AR	AR
CGI_10021001	Inositol-3-phosphate synthase 1-B	3.3E-28	2.54	AR	U2
CGI_10022749	Glutathione-requiring prostaglandin D synthase	2.3E-27	2.52	U1	AR
CGI_10026302	CCAAT/enhancer-binding protein delta	4.1E-27	3.76	AR	U2
CGI_10005728	Cholinesterase	2.5E-26	3.23	AR	AR
CGI_10022331	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	2.7E-25	1.88	U2	AR
CGI_10010435	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	5.5E-25	1.98	AR	AR
CGI_10002314	Short chain dehydrogenase/reductase family 9C member 7	3.8E-23	4.74	AR	AR
CGI_10005726	Neuroigin-4, X-linked	2.1E-21	2.30	U1	AR
CGI_10026674	DBH-like monooxygenase protein 1	3.0E-21	3.85	AR	C
CGI_10018845	Periostin	1.1E-20	2.67	U1	U2
CGI_10027533	General transcription factor 3C polypeptide 1	2.0E-20	2.17	AR	AR
CGI_10002509	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	1.3E-19	2.11	AR	AR
CGI_10008887	Solute carrier family 15 member 4	1.1E-18	1.62	AR	AR
CGI_10016297	WW domain-containing oxidoreductase	2.8E-18	1.58	AR	AR
CGI_10016303	Cytochrome P450 3A11	5.1E-18	2.07	AR	AR
CGI_10002510	Cytochrome P450 1A1	5.8E-18	2.07	AR	AR
CGI_10021884	GRAM domain-containing protein 4	1.2E-16	1.52	AR	U2
Down-regulated transcripts					
CGI_10024446	Aquaporin-2	3.4E-15	-2.08	AR	U2
CGI_10021193	Caveolin	1.3E-06	-1.17	AR	AR
CGI_10025965	Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A	2.4E-06	-6.10	U2	AR
CGI_10003354	Catalase	2.5E-05	-0.76	C	AR
CGI_10017582	Heat shock protein beta-1	1.1E-05	-0.92	AR	AR
CGI_10024262	Transporter	1.6E-05	-0.72	AR	AR
CGI_10003354	Catalase	2.5E-05	-0.76	C	AR
CGI_10017584	Solute carrier family 22 member 13	2.6E-05	-2.26	AR	AR
CGI_10000246	Glutamate carboxypeptidase 2	3.0E-05	-1.02	AR	U2
CGI_10003810	Transporter	5.2E-05	-1.58	AR	AR
CGI_10022548	Solute carrier family 23 member 2	7.2E-05	-0.91	AR	AR
CGI_10001136	N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase 2	1.1E-04	-0.92	AR	U2
CGI_10018043	Solute carrier family 22 member 4	1.2E-04	-0.88	AR	U1
CGI_10006430	Aminopeptidase N	1.2E-04	-1.37	AR	AR
CGI_10012084	Alpha-crystallin B chain	1.5E-04	-1.01	AR	U2
CGI_10003369	Ammonium transporter Rh type B-A	2.3E-04	-1.36	AR	AR
CGI_10009373	Solute carrier family 43 member 3	3.2E-04	-0.76	AR	AR
CGI_10016164	BTB/POZ domain-containing protein 2	3.3E-04	-0.85	U2	AR
CGI_10024248	Transmembrane protease, serine 9	3.4E-04	-0.73	AR	AR
CGI_10022918	Putative RNA-directed DNA polymerase from transposon BS	4.7E-04	-2.87	AR	AR
CGI_10013419	Calmodulin-like protein	4.9E-04	-0.75	AR	AR
CGI_10021737	Toll-like receptor 2	6.3E-04	-2.51	U2	U1
CGI_10026928	Glutamyl aminopeptidase	6.7E-04	-1.01	U2	C
CGI_10013723	Aquaporin-4	7.0E-04	-1.10	AR	AR
CGI_10014539	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	7.3E-04	-1.67	U2	U1

Supplementary Table S5. Forward, reverse primers sequences for Real-Time PCR analyzed genes and housekeeping gene.

GeneBank access	Gene name	Forward	Reverse
KX371073	CgClock	5'-TGGGAATGATGTCCAACAGAG-3'	5'-GGTCCATCAATGACAGGAAGT-3'
KT991835	CgCry 1	5'-TCATGAAGCAGCTCAGATACG-3'	5'-ACCTCCCAGTTCAACCAAAG-3'
KX371074	CgCry 2	5'-AACCTTACAGCAAGCACGAA-3'	5'-TGACATCTGGCTGTGGTTTC-3'
KX371075	CgBmal	5'-CACAAGTTCAGGTCAGAGTGTAG-3'	5'-TCACCTGAGGTAGACTGGTTAT-3'
KX371076	CgPeriod	5'-CCGATGACAGAAATCCCAGTAG-3'	5'-CCATCCTATTCTCCTGCTCTTG-3'
(Vogeler et al. 2014)	et CgRev-erb	5'-GACTTTGCTGATCGCTTCAAC-3'	5'-CTTTCCAAGTCTCCACATTTTC-3'
(Vogeler et al. 2014)	et CgRor	5'-CTACGTGAGCAGGTGTTTGA-3'	5'-CGTCCGCTATGTCCTTCAAT-3'
KX371077	CgTim 1	5'-AAAGATCCCGGACACAGTATG-3'	5'-TGGAACCTCGTTCCTGACTTG-3'
AB122066	CgEF1	5'-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3'	5'-ACGACGATCGCATTCTCTT-3'

3. Conclusion

L'objectif de cette étude était double. D'une part, le but était d'aller plus loin dans la compréhension du rythme circadien de *C. gigas*, de sa genèse (par l'horloge circadienne) à l'expression des gènes sous contrôle de cette horloge. Pour cela, j'ai réalisé pour la première fois une analyse du transcriptome cyclique dans les branchies de l'huître *C. gigas*. D'autre part, il s'agissait de mettre en évidence l'impact d'une exposition à l'algue toxique *A. minutum* (400 cell.mL⁻¹) sur ce transcriptome cyclique, ainsi que sur les gènes de l'horloge moléculaire circadienne.

Après les différentes étapes de traitement du jeu de données, la profondeur d'analyse allait de 24,5 à 33 millions de reads par échantillon, et l'expression de 20 846 gènes a pu être observée toutes les 4 heures pendant 52 heures (13 temps de prélèvement). L'analyse chronobiologique de l'expression temporelle de ces gènes a été réalisée par l'algorithme développé dans la méthode ARSER (Yang and Su 2010).

Les résultats obtenus dans la branchie d'huîtres non exposées (*H.t*) montrent que 6,2 % du transcriptome total de l'huître oscille à une fréquence circadienne. La proportion des gènes régulés par l'horloge circadienne chez les huîtres est alors non négligeable. Chez les mammifères, il est estimé qu'environ 10 % du transcriptome est cyclique de manière tissu spécifique, et que ces gènes sous contrôle de l'horloge sont impliqués dans des fonctions physiologiques essentielles. Nous avons caractérisé dans les branchies de *C. gigas* que le transcriptome circadien est majoritairement nocturne, et bimodal : certains transcrits ont un pic d'expression pendant le début de nuit, et d'autres en deuxième partie de nuit. Cette nocturnité est en accord avec la nocturnité que l'on observe dans l'expression des gènes de l'horloge circadienne, à l'origine de l'oscillation des transcrits circadiens. Cette temporalité est également en accord avec la nocturnité du rythme valvaire observée précédemment à cette période de l'année, lui aussi sous contrôle de l'horloge circadienne (Mat et al. 2012). Le premier pic nocturne d'expression des transcrits circadiens dans la branchie est coordonné au pic d'ouverture des valves, contrôlé par le muscle adducteur. Le pic des transcrits circadiens de fin de nuit quant à lui, correspond à un moment où les valves sont fermées, suggérant que les deux groupes de transcrits circadiens dans les branchies de l'huître (ceux du début et ceux de fin de nuit) sont impliqués dans des processus physiologiques différents. Ces résultats démontrent que le rythme comportemental peut être le reflet, au moins partiel, du pattern d'expression cyclique de nombreux gènes, y compris dans un autre tissu que le muscle adducteur, à l'origine de ce comportement. L'expérience étant réalisée en hiver, la modalité nocturne des rythmes circadiens concorde avec la dualité du rythme circadien (*i.e.* nocturne en automne et hiver, diurne au printemps et été) précédemment observée au niveau du comportement de l'huître (Mat et al. 2012). On peut alors supposer que par analogie, le transcriptome cyclique est diurne au printemps et en été.

Un résultat très surprenant de cette analyse chez les huîtres non exposées (*H.t*) a été que sous une alternance jour / nuit de 24 h, les transcrits circadiens ne sont ni les seuls transcrits cycliques, ni les transcrits cycliques majoritaires. La majeure partie des transcrits oscillants dans les branchies est ultradienne (période inférieure à 20 h), et représente au minimum 18 % du transcriptome total, soit 3 fois plus importante que la part de transcrits circadiens. Deux groupes se distinguent parmi ces transcrits ultradiens, selon leur période d'oscillation. Le premier groupe oscille à environ 9h, et le deuxième à environ 15h. Nous ne sommes pas capables à l'heure actuelle de comprendre le sens de telles rythmicités. La présence de transcrits ultradiens chez les organismes terrestres commence à peine être étudiée (Hughes et al. 2009). Une étude récente pose l'hypothèse de la génération endogène de ces rythmes (van der Veen and Gerkema 2017). Curieusement, chez l'huître dans ce cas présent, ces périodes d'oscillations correspondent à la durée de jour (9h) et à la durée de nuit (15h) de l'alternance jour / nuit à laquelle les huîtres sont exposées, en adéquation avec la photopériode naturelle au moment de l'expérience (autour du solstice d'hiver). Une oscillation à ces périodes de 9h et 15 h n'a aucune utilité pour une synchronisation avec l'alternance jour/nuit du milieu. Pour cela, seul un rythme circadien (24 h) est adapté. En revanche, ces résultats suggèrent que les huîtres seraient capables de mesurer la durée de jour et la durée de nuit. Cette notion de mesure de durée de jour et / ou de nuit est fondamentale dans le photopériodisme des êtres vivants (au fonctionnement moléculaire inconnu) pour la mise en place d'une physiologie adaptée à l'échelle annuelle, et nécessite l'horloge circadienne (Wood and Loudon 2014). J'émetts alors l'hypothèse que ces transcrits ultradiens sont le fruit d'une régulation pour une optimisation physiologique à l'échelle annuelle. Ces transcrits ultradiens concerneraient des fonctions ayant besoin d'être coordonnées selon un tempo plus ou moins rapide en fonction des besoins physiologiques saisonniers, et non directement dépendantes de la lumière. Pour vérifier cette hypothèse, une analyse du transcriptome cyclique doit être réalisée à différent moment de l'année.

Un deuxième résultat très surprenant a été le complet remodelage du transcriptome cyclique chez les huîtres exposées à *A. minutum* (*A.m*). Quantitativement d'abord, l'exposition à cette algue toxique et l'ingestion des PSP a pour effet de réduire de plus de moitié le nombre de transcrits cycliques circadiens. À l'inverse, une augmentation de 24 % des transcrits ultradiens est observée. L'exposition à *A. minutum* a également des effets sur les paramètres du rythme des transcrits cycliques. Par exemple, la nocturnité des transcrits circadiens est complètement estompée, avec une augmentation relative de transcrits diurnes (dont l'expression est maximale pendant le jour). Cette perte de la nocturnité est également observée au niveau de l'horloge circadienne et du comportement valvaire. Un rythme comportemental nyctéméral est cependant encore visible, bien que moins marqué, contrairement à ce qui avait déjà été observé (Tran et al. 2015). Cela peut être expliqué par des concentrations d'exposition à l'algue *A. minutum* plus faibles dans cette présente expérience que dans celle de Tran et al. (2015). En ce qui concerne les transcrits ultradiens, une modification de leur périodes d'oscillations est observée. Ces changements de caractéristiques rythmiques (phase des transcrits circadiens, périodes des transcrits ultradiens) pourraient suggérer que la perception du signal lumineux par l'organisme est perturbée. Cette défaillance pourrait venir d'une toxicité au niveau des récepteurs de la lumière, ou être liée à

un dysfonctionnement de l'horloge elle-même ou bien de sa synchronisation entre les tissus. Enfin, le croisement des listes nominatives des transcrits cycliques permet de se rendre compte que extrêmement peu de gènes sont cycliques dans les deux conditions *H.t* et *A.m.* Seulement 11,4 % des transcrits cycliques chez les huîtres non exposées le sont encore chez les huîtres exposées à *A. minutum*. L'exposition à *A. minutum* a donc entraîné la perte mais aussi le gain de cyclicité dans l'expression de nombreux gènes. Chez les moules *Mytilus edulis*, les transcrits cycliques sont également très différents selon que les moules soient soumises à un environnement tidal ou sub-tidal *in situ*, pour la mise en place d'une physiologie adaptée (Connor and Gracey 2011). Ici, les conditions d'exposition (alternance jour/ nuit) sont maintenues constantes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces pertes ou gains de cyclicité sont liés à la répression ou à l'activation de l'expression de gènes, en réponse adaptative à la toxicité d'*A. minutum*.

Outre la mise en lumière de cet impact profond d'une exposition à *A. minutum* par la remodelage de la régulation temporelle du transcriptome qu'elle entraîne, l'exposition à *A. minutum* a également permis de mettre en évidence des liens étroits entre les transcrits circadiens et les transcrits ultradiens. En effet, certains transcrits présentent une modification de leur fréquence d'oscillation en réponse à l'exposition à *A. minutum*. Les transcrits circadiens et les transcrits ultradiens auraient alors au moins en partie, des mécanismes communs de régulation temporelle. Nous posons l'hypothèse que la génération des transcrits ultradiens pourrait impliquer l'horloge circadienne. Notre hypothèse est appuyée par le fait que l'horloge circadienne de l'huître est connue pour être très faible et plastique, et par conséquent très malléable. Son implication dans la génération de rythmes ultradiens, à caractères tidaux, a déjà été proposée lors de précédents travaux (Mat et al. 2012, 2014, 2016; Mat 2012). Pour appuyer notre hypothèse, nous avons recherché chez l'huître des homologues de gènes impliqués dans le réseau horloger circadien complexe chez d'autres espèces, dont nous savons qu'ils participent à la régulation complexe, fine, et multi-couche de la régulation temporelle de l'expression génétique (Korenčič et al. 2014). Notre hypothèse est alors appuyée par l'observation du fait que certains transcrits de ce réseau circadien présentent des oscillations ultradiennes. De plus, la proportion de transcrits ultradiens dans cet échantillon du réseau circadien complexe augmente avec l'exposition à *A. minutum*, en dépit d'une rythmicité circadienne, en accord avec ce qui a été observé sur l'ensemble du transcriptome. La forte plasticité de l'horloge circadienne semble à nouveau être mise en lumière, ainsi que la complexité de la régulation temporelle chez l'huître.

Pour conclure, cette étude du transcriptome cyclique des huîtres *C. gigas* a mis en évidence une forte proportion de gènes exprimés de façon cyclique dans les branchies de l'huître. Elle a également permis de mettre en lumière la complexité de la régulation temporelle chez l'huître, avec une étonnante prédominance de transcrits ultradiens malgré un entraînement journalier. Cette forte proportion de transcrits cycliques a certainement un fort impact au niveau des fonctions métaboliques et physiologiques de ces organismes. En effet, pour une condition donnée, au minimum 24,3 % du transcriptome est exprimé de façon oscillante dans les branchies de l'huître. De plus, l'analyse des deux conditions confondues montre qu'au moins 42 % du transcriptome de *C. gigas* a un potentiel oscillant. Enfin, ces résultats montrent un impact profond d'une exposition à *A. minutum* à des concentrations environnementales sur le

transcriptome de l'huître. Le remodelage du transcriptome révèle une forte plasticité dans l'organisation temporelle de l'expression génétique, dont les conséquences restent encore inconnues. Cela peut être au moins en partie expliqué par une réponse adaptative de l'huître face à la toxicité d'*A. minutum*. Mais cela peut également révéler une conséquence chronotoxique, sur l'horloge ou sa synchronisation, entraînant la perturbation de la structure temporelle, découplant alors la rythmicité transcriptionnelle des besoins physiologiques de l'organisme, et des variations environnementales. Dans ce cas, ce remodelage peut mener à une perte d'adaptation / harmonie de l'huître avec son écosystème.

Chapitre VI

Conclusions générales et perspectives

1. Discussion et conclusions générales

Les travaux de cette thèse visent à mieux comprendre les interactions entre les rythmes biologiques des huîtres *C. gigas* et la contamination de ces organismes par les phycotoxines PSP produites par l'algue *Alexandrium minutum*. La question posée était double. D'une part, des différences de rythmes biologiques, notamment entre huîtres diploïdes et triploïdes, peuvent-elles être impliquées dans des différences de bioaccumulation des PSP ? D'autre part, la bioaccumulation des toxines PSP peut-elle induire une perturbation des rythmes biologiques des huîtres à l'échelle du transcriptome total ? Les rythmes biologiques chez les organismes marins restent cependant beaucoup moins étudiés que chez leurs homologues terrestres. Les connaissances sur les rythmes biologiques de *C. gigas* d'une part et sur leurs interactions avec une contamination par les algues *A. minutum* d'autre part, avancent de front.

Les approches nouvelles et originales utilisées dans ces travaux ont permis de mettre en avant de nouveaux aspects de la chronobiologie moléculaire et comportementale des huîtres *C. gigas*. Les résultats obtenus ont également appuyés l'importance de la prise en compte des rythmes biologiques dans les études écotoxicologiques. L'horloge circadienne des huîtres semble avoir un impact direct sur les processus d'accumulation des PSP, et une exposition à *A. minutum* entraîne un impact profond sur la régulation temporelle de l'expression d'un nombre très important de gènes chez l'huître *C. gigas*.

1.1. Apport des résultats en chronobiologie des huîtres diploïdes et triploïdes

L'ensemble des résultats met en avant la multiplicité et l'intrication des rythmes biologiques qui semblent régir de manière fine et complexe l'optimisation physiologique de *C. gigas*, en harmonie avec son environnement.

Sur le terrain, nous avons mis en évidence pour la première fois chez l'huître une relation entre le cycle d'éclairement de la lune (« moonlight effect ») et son comportement valvaire, une régulation saisonnière marquée, et une relation fine et subtile des cycles d'activité valvaire nycthéméraux et tidaux chez les huîtres *C. gigas* avec l'évolution annuelle de la photopériode. De plus, nous avons mis en évidence des différences de synchronisation par les facteurs environnementaux entre les huîtres diploïdes et triploïdes.

Effet de l'éclairement de la lune. Dans mes travaux, j'ai montré pour la première fois un effet du cycle lunaire, lié à l'éclairement de la lune, dans la modulation du comportement des huîtres. La lune a un fort impact sur l'écosystème des organismes marins (Naylor 2010). L'analyse des comportements valvaires que j'ai réalisée a permis de montrer que si le comportement d'ouverture des huîtres diploïdes est modulé par le cycle semi-lunaire (« neap-spring tidal cycle »), l'amplitude d'ouverture, elle, est modulée par le cycle lunaire (Chapitre

III). Ce cycle est très souvent observé pour synchroniser les processus de reproduction chez des nombreuses espèces marines, telles que les coraux, les oursins, les vers annélides ou les poissons (Naylor 1999; Tessmar-Raible et al. 2011). En revanche son impact sur le comportement valvaire des bivalves n'avait été montré que chez la grande nacre *Pinctada mazatlanica* (García-March et al. 2008), et est mis en évidence chez l'huître *C. gigas* pour la première fois dans ce travail. Cela suppose que les huîtres sont dotées de récepteurs sensibles au très faible éclaircissement de la lune. De plus, chez le vers marin *Platynereis dumerilii*, un mécanisme horloger endogène indépendant de l'horloge circadienne est suggéré pour la génération du rythme lunaire (Zantke et al. 2013). Chez l'huître, la régulation « paramètres-spécifique » du comportement montre la grande subtilité des mécanismes de régulation par les cycles lunaires. De manière extrêmement intéressante, les huîtres triploïdes montrent une insensibilité aux variations d'intensité de marée du cycle semi-lunaire, contrairement aux huîtres diploïdes. En revanche, les deux paramètres du comportement, que sont la durée et l'amplitude valvaire, sont influencés par le cycle lunaire d'éclaircissement de la lune. Ces résultats suggèrent que la triploïdie modifie soit le fonctionnement de(s) mécanisme(s) horlogers potentiel(s) à l'origine de ces rythmicités, soit l'expression de gènes qui seraient impliqués dans les réponses directes à ces cycles lunaires. En effet, la polyploïdie entraîne des modifications de la régulation de l'expression des gènes encore peu comprises (Osborn et al. 2003).

Interaction du photopériodisme avec les rythmes circadiens et tidaux. Mes travaux ont également permis de mettre en évidence une influence marquée de l'évolution annuelle de la photopériode sur le comportement des huîtres, jusque-là méconnue chez l'huître, mettant en évidence l'intrication des rythmicités chez *C. gigas*. Il y a aujourd'hui de nombreuses preuves montrant qu'un mécanisme interne aux organismes vivants, encore inconnu au niveau moléculaire, est entraîné par l'évolution saisonnière de la photopériode pour la mise en place de fonctions physiologiques adaptées au cours de l'année (Wood and Loudon 2014). Chez l'huître, nous avons observé que les deux paramètres qui caractérisent l'évolution de la photopériode (*i.e.* la durée du jour supérieure ou inférieure à celle de la nuit, et l'évolution de la durée du jour, croissante ou décroissante) influencent le comportement des huîtres. Ainsi, les durées et amplitudes d'ouverture sont maximales au printemps, minimales en automne et intermédiaires en hiver et en été. Par ailleurs, le comportement des huîtres est également modulé au cours de l'année dans son aspect rythmique. Nous avons montré que comme chez de nombreuses espèces, des liens étroits entre horloge circadienne et horloge annuelle sont observés chez l'huître (Numata and Helm 2015). Une modulation saisonnière de la modalité du rythme nyctéméral avait déjà été montrée chez *C. gigas*, synchronisée par la durée du jour : un rythme nocturne pendant les jours courts (automne et hiver) et un rythme diurne pendant les jours longs (printemps et été) (Mat et al. 2012; Tran et al. 2015; Perrigault and Tran 2017a). Dans mes travaux, j'ai mis en évidence que l'intensité du rythme nyctéméral d'activité valvaire est également modulée, de façon paramètre-spécifique (ouverture ou amplitude), au cours des saisons. La modulation de l'intensité du rythme nyctéméral est non seulement influencée par la durée des jours (courts ou longs), mais également et surtout par le sens d'évolution de la photopériode, croissante ou décroissante, de manière paramètre-spécifique. Notamment, l'intensité du rythme nyctéméral d'ouverture valvaire augmente de

façon significative après le solstice d'été (pour les jours décroissants, en été et en automne) et diminue significativement après le solstice d'hiver (pour les jours croissants, en hiver et au printemps). Chacun des paramètres du rythme nyctéméral d'ouverture (modalité et intensité) est donc modulé par une caractéristique différente de la photopériode (durée du jour et sens d'évolution de la durée du jour, respectivement). Une modulation de l'intensité du rythme nyctéméral au cours de l'année a déjà été observée chez le hamster européen, qui présente des interconnexions complexes entre rythme circadien et rythme circannuel (Numata and Helm 2015).

De manière surprenante, nos résultats ont montré que l'intensité du rythme tidal est elle aussi modifiée par les deux paramètres caractérisant la variation annuelle de photopériode. L'intensité du rythme tidal est globalement maximale en hiver, et minimale au printemps. Cette connexion entre photopériodisme et rythme tidal est inattendue. Le fait que le rythme nyctéméral et le rythme tidal soit modulé par le même signal, c'est-à-dire la photopériode, pourrait appuyer la théorie proposée par A. Mat pendant sa thèse. Le rythme circadien et le rythme tidal pourrait avoir une même origine, l'horloge circadienne, qui serait capable d'osciller de façon unimodal ou bimodale (Mat 2012; Mat et al. 2014, 2016). À l'inverse, il semble que ces deux rythmes (tidaux et circadiens) soient dissociés chez le crustacé marin *Eurydice pulchra* (Zhang et al. 2013).

Comme pour le rythme lunaire, les huîtres triploïdes présentent une différence de synchronisation avec l'évolution annuelle de la photopériode. Les paramètres de la photopériode n'agissent pas exactement de la même façon sur la modulation des rythmes nyctéméraux et tidaux de ces huîtres triploïdes. *In fine*, le rythme nyctéméral d'ouverture valvaire des huîtres triploïdes est plus fort que celui des huîtres diploïdes pendant le printemps et l'été. À l'inverse, le rythme tidal des huîtres triploïdes est plus faible que celui des diploïdes pendant ces deux mêmes saisons. À nouveau, les huîtres triploïdes apparaissent moins sensibles aux signaux environnementaux liés aux marées (alternance des marées et intensité des marées), mais plus sensibles aux signaux environnementaux liés à la luminosité (alternance jour/nuit et éclairage de la lune) que les huîtres diploïdes. Par ailleurs, les différences de rythmicités comportementales sont associées avec une durée d'ouverture plus importante chez les triploïdes que chez les diploïdes, pendant ces deux mêmes saisons de printemps et d'été. Les résultats suggèrent que les différences de synchronisation du comportement des huîtres diploïdes et triploïdes par l'évolution annuelle de la photopériode sont étroitement liées aux différences physiologiques des huîtres triploïdes, notamment marquées pendant le printemps et l'été, avec une réduction drastique de la gamétogénèse et une forte augmentation de la croissance comparé aux huîtres diploïdes.

Ces résultats de l'analyse comportementale *in situ* mettent en lumière une modulation fine et précise des cycles lunaires et du photopériodisme sur les paramètres comportementaux de l'huître *C. gigas*. Nous pensons que la modulation et l'intrication des rythmes valvaires observés permettent d'optimiser le comportement de l'animal dans son environnement pour répondre aux besoins physiologiques de l'huître. En revanche, très peu de choses sont connues sur les rythmes observés au niveau moléculaire chez les organismes marins.

Caractérisation du transcriptome circadien. Une approche transcriptomique nous a permis d'évaluer pour la première fois l'importance de l'organisation temporelle dans l'expression des gènes chez un bivalve marin (Chapitre V). Chez les mammifères, il est estimé qu'environ 10 % du transcriptome est cyclique de manière tissu spécifique, et que ces gènes sous contrôle de l'horloge sont impliqués dans des fonctions physiologiques essentielles (Li et al. 2015). Nous avons pu montrer que chez des huîtres *C. gigas* diploïdes exposées à une alternance jour/nuit (9L : 15D), 6,2 % du transcriptome a une expression circadienne dans les branchies. Les branchies sont un tissu central de l'huître, impliqué dans les processus de respiration mais aussi d'acheminement de la nourriture jusqu'à la bouche. Le transcriptome circadien observé dans ce tissu est caractérisé comme nocturne et bimodal. Cela veut dire que la majorité des transcrits circadiens a une expression nocturne, en accord avec l'horloge circadienne, ainsi qu'avec le comportement valvaire. Cette nocturnité est en accord avec la dualité nocturne/diurne du rythme circadien précédemment caractérisée (Mat et al. 2012), car cette expérience a été réalisée en hiver, pour éviter le processus (trop intense) de gamétogénèse. Bimodal veut dire que parmi les transcrits circadiens nocturnes, certains ont un pic d'expression au début de la nuit, d'autres à la fin de la nuit. La fonction de ces transcrits reste à déterminer plus en avant, mais nous suggérons que ces deux groupes de transcrits sont impliqués dans des fonctions physiologiques différentes. En effet le groupe du début de nuit présente un pic d'expression au moment du pic d'ouverture des valves. Les transcrits du groupe de fin de nuit en revanche ont un pic d'expression à un moment où les valves de l'huître se sont refermées.

Prédominance du rythme ultradien sur le rythme circadien chez les transcrits. Contre intuitivement, malgré l'alternance jour/nuit, j'ai mis en évidence que la majorité des transcrits cycliques dans les branchies de l'huître sont ultradiens (période d'oscillation inférieure à 20 h). Ces transcrits ultradiens représentent au moins 18 % du transcriptome. Ils sont 3 fois plus nombreux que les transcrits circadiens. Ce résultat est alors opposé au constat de l'analyse par puce à ADN (transcriptome partiel) chez la moule *Mytilus californianus*, qui en condition tidale présente une majorité de transcrits circadiens (Connor and Gracey 2011). Dans notre analyse, deux groupes distincts de transcrits ultradiens se dessinent, selon leur période d'oscillation, autour de 9h ou autour de 15h. Les connaissances sur les rythmes ultradiens chez les organismes terrestres sont extrêmement peu avancées. Il semble que pendant longtemps, les méthodes et outils utilisés pour la détection des transcrits cycliques n'aient pas permis de les mettre en évidence, notamment au laboratoire. Ils étaient alors considérés comme des réponses directes à l'environnement et peu d'intérêt leur a été porté (van der Veen and Gerkema 2017). Mais depuis peu, des études s'y intéressent et suggèrent une origine endogène à la génération de ces transcrits (Hughes et al. 2009; van der Veen and Gerkema 2017). Cependant tout reste à comprendre. Dans notre étude, la recherche de gènes impliqués dans l'horloge circadienne ou dans la régulation transcriptionnelle circadienne chez d'autres espèces a mis en évidence que certains de ces transcrits ont une expression ultradienne. Cela suggère que ces transcrits ultradiens pourraient être régulés directement ou indirectement (via des boucles secondaires) par l'horloge circadienne. L'exposition à *A. minutum* (décrite partie suivante), a permis d'appuyer ces liens parfois étroits entre ces deux rythmicités ultradienne et

circadienne. Certains transcrits, selon la condition d'exposition, peuvent osciller de manière ultradienne ou circadienne. Cela appuierait à nouveau la notion de plasticité de l'horloge circadienne discutée dans la thèse d'A. Mat (Mat 2012). Toutefois, pour prouver une origine commune aux rythmes ultradiens et circadiens, il faudrait mettre sous silence l'horloge circadienne (par exemple par interférence) et voir si les rythmes ultradiens persistent.

De manière surprenante, les fréquences d'oscillations des deux groupes de transcrits ultradiens (9h et 15h) correspondent respectivement à la durée de jour et à la durée de nuit de la photopériode naturelle au moment où l'expérience a été réalisée (autour du solstice d'hiver), et de l'entraînement lumineux appliqué pour l'expérience. Ce constat fait écho à l'implication de l'horloge circadienne pour mesurer la durée du jour et/ou de nuit nécessaire à la régulation circannuelle, connue chez un grand nombre d'espèces (Wood and Loudon 2014; Numata and Helm 2015). Cependant pourquoi retranscrire cette mesure dans l'induction cyclique de l'expression de tous ces transcrits ? De telles périodes d'oscillations n'ont aucun intérêt pour la synchronisation avec la lumière du cycle journalier d'alternance jour /nuit. Je pose alors l'hypothèse que ces transcrits ultradiens seraient le fruit d'une régulation pour une optimisation physiologique à l'échelle annuelle. Ces transcrits ultradiens concerneraient alors des fonctions ayant besoin d'être coordonnées selon un tempo ultradien, plus ou moins rapide en fonction des besoins physiologiques saisonniers. De plus, ces fonctions ne seraient pas directement dépendantes de la lumière. Toutefois, pour appuyer cette hypothèse, il faudrait commencer par réaliser une même analyse transcriptomique temporelle à un autre moment de l'année, et observer si les périodes d'oscillation des transcrits ultradiens suivent à nouveau les durées de jour et de nuit correspondantes.

Prédominance de l'expression cyclique à l'échelle du transcriptome. Enfin, il est important de noter que la détection des transcrits cycliques est largement dépendante du nombre de temps de prélèvements, de la profondeur de l'analyse transcriptionnelle, du traitement des données (et notamment les méthodes de normalisation) et de la puissance de l'algorithme utilisé (Li et al. 2015). Nous avons établi qu'environ 24 % du transcriptome dans une condition donnée avait une expression cyclique significative, ultradienne pour la majeure partie. La représentation sous forme de « heatmap » (code couleur représentant les oscillations d'expression d'un gène autour de sa valeur d'expression médiane, qui ne possède pas de pouvoir statistique) de l'ensemble du transcriptome de l'huître, laisse suggérer toutefois que l'oscillation est largement majoritaire (Figure VI 1.). L'expression constante des transcrits au cours du temps semblerait être l'exception. Il est fort à parier qu'avec des outils statistiques plus performants et surtout des temps d'échantillonnages plus nombreux, ce transcriptome se révélerait quantitativement bien plus cyclique.

Finalement, cette étude a permis de mettre en lumière la complexité de la régulation temporelle du transcriptome cyclique des huîtres *C. gigas*, avec une majorité surprenante de transcrits ultradiens, qui ouvre des perspectives de recherches passionnantes. De plus, les résultats ont mis en évidence une forte proportion de gènes exprimés de façon cyclique dans

les branchies de l'huître. Cette forte proportion de transcrits cycliques a certainement une forte implication au niveau des fonctions métaboliques et physiologiques de l'huître.

Il est intéressant de noter que même en condition simple d'alternance jour/nuit, des problématiques d'intrication des rythmes biologiques nous rattrapent. Un rythme n'est jamais seul. Il est toujours impliqué dans un autre cycle. Pièce du rouage d'une superstructure horlogère ?

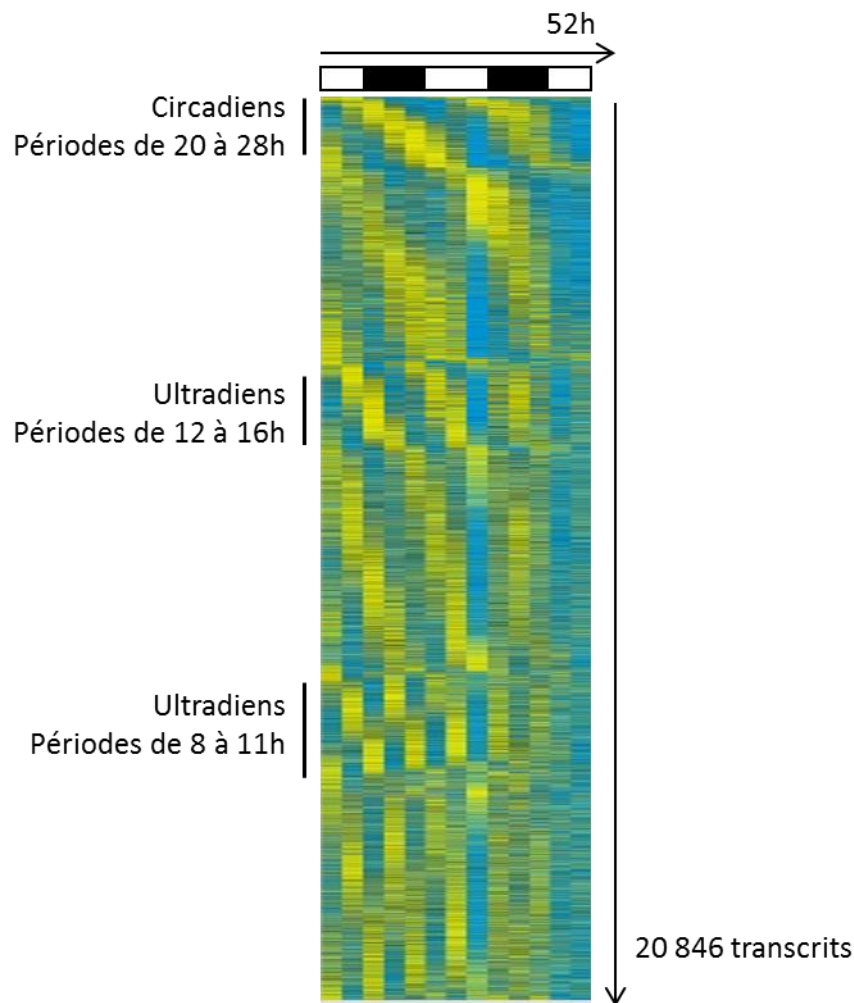


Figure VI 1. Représentation par heatmap de l'expression temporelle (52h, toutes les 4h) de l'expression de l'ensemble du transcriptome (20 846 transcrits) dans les branchies de *C. gigas* en condition d'alternance jour/ nuit (9L : 15D). Les variations d'expression de chaque transcrits autour de la médiane sur l'ensemble de 52h suivent un dégradé de couleur du bleu (pour les valeurs inférieures à la médiane) au jaune (pour les valeurs supérieures à la médiane) en passant par du noir (pour les valeurs équivalente à la médiane). Les transcrits sont classés par gamme de période d'oscillation, puis par phase (pic) d'expression. Les transcrits significatifs sont marqués d'un trait noir, et la gamme de période d'oscillation des transcrits significatifs est précisée sur la figure.

1.2. Apport des résultats sur la contamination des huîtres par *A. minutum*

L'étude des interactions entre le rythme circadien de *C. gigas* et l'accumulation de toxines PSP a permis d'appuyer l'importance de la prise en compte des processus temporels dans l'étude des phénomènes de contaminations en écotoxicologie. Nos résultats suggèrent fortement l'implication de l'horloge circadienne des organismes dans les processus de bioaccumulation des toxines PSP. De plus, un impact profond d'une exposition à des concentrations environnementales d'*A. minutum* sur le transcriptome cyclique de l'huître a été observé. Dans un contexte d'augmentation constante des phénomènes d'efflorescences algales, ces impacts ne sont pas anodins, et peuvent notamment entraîner une perte de synchronisation des organismes avec leur environnement.

Implication de l'horloge circadienne de C. gigas dans la bioaccumulation des PSP. Le premier objectif de ma thèse était d'évaluer l'implication des rythmes biologiques dans le déterminisme de la bioaccumulation de toxines PSP chez l'huître *Crassostrea gigas*. Pour cela, j'avais émis l'hypothèse de travail que la différence de ploïdie pourrait modifier les rythmes biologiques chez l'huître *C. gigas* et être à l'origine des différences d'accumulation de toxines PSP précédemment observées entre les huîtres diploïdes et triploïdes (Guéguen et al. 2012; Haberkorn et al. 2010). Une première approche comportementale *in situ* (présentée dans la partie précédente) a permis de mettre en évidence que les huîtres diploïdes et triploïdes présentent en effet des rythmes biologiques différents, notamment au printemps et en été (Chapitre III), saisons où les efflorescences d'*A. minutum* sont les plus fréquentes sur le littoral français (Chapelle et al. 2015). Une deuxième approche expérimentale a visé à prouver expérimentalement l'implication de l'horloge circadienne dans les processus de bioaccumulation des PSP par *C. gigas*. Dans cette approche expérimentale, des différences de bioaccumulation entre les huîtres diploïdes et les huîtres triploïdes, n'ont pas été observées chez les organismes témoins après 5 jours d'expositions à *A. minutum* au laboratoire. En revanche, nous avons montré pour la première fois, grâce à l'application de l'interférence par la stratégie du cheval de Troie, qu'une perturbation efficace de l'horloge circadienne entraîne une modification de l'accumulation de phycotoxines PSP, prouvant pour la première fois l'implication de l'horloge circadienne dans les processus de bioaccumulation de ces toxines (Chapitre IV). L'implication des rythmes biologiques entre huîtres diploïdes et triploïdes dans des niveaux de bioaccumulation des PSP potentiellement différents sur le terrain reste alors encore ouverte.

L'implication de l'horloge circadienne dans les processus d'accumulation appuie l'intérêt de la prise en compte du temps dans les études écotoxicologiques. Ce résultat suggère d'une part que des rythmes biologiques différents peuvent contribuer à des bioaccumulations différentes, comme proposé dans l'objectif de ma thèse. Cela suggère également qu'en fonction du moment du cycle de l'horloge circadienne auquel des organismes sont exposés à une contamination, la bioaccumulation et la toxicité peut-être plus ou moins importante.

Impact de l'exposition à A. minutum sur le transcriptome de C. gigas. Le deuxième objectif de ma thèse était d'observer l'impact chronotoxique d'une exposition à *A. minutum* au niveau du transcriptome total des huîtres *C. gigas*. Cette analyse a montré un impact profond de l'exposition à des concentrations pourtant environnementales d'*A. minutum*. L'exposition aux algues toxiques entraîne un remodelage du transcriptome cyclique des huîtres, associé à des modifications d'oscillation de l'expression des gènes de l'horloge circadienne. Ce remodelage révèle une forte plasticité dans l'organisation temporelle de l'expression génétique de l'huître.

Quantitativement, le nombre de transcrits circadiens est diminué de 50 % suite à l'exposition à *A. minutum*, tandis que la proportion de transcrits ultradiens augmente de 24 %. Cette diminution des oscillations circadiennes au profit d'oscillations ultradiennes est également retrouvée dans l'expression des homologues de gènes impliqués dans le réseau de l'horloge circadienne chez des espèces terrestres modèles, appuyant les liens étroits entre horloge circadienne et génération des transcrits ultradiens. La diminution drastique des transcrits circadiens concorde avec les résultats précédemment observés par Tran et al. (2015), qui avaient noté la disparition de la cyclicité nycthémerale de 5 gènes suite à une exposition à *A. minutum*. En revanche une perte de la rythmicité circadienne du comportement valvaire avait été observée lors de cette précédente expérience, tandis qu'elle est ici seulement altérée. Cette différence s'expliquerait par des concentrations plus faibles utilisées dans notre expérience (400 cell.mL⁻¹) et souligne l'effet précoce du remodelage du transcriptome.

Plus qu'une modification quantitative, le transcriptome cyclique est également remodelé dans ses caractéristiques rythmiques suite à l'exposition à l'algue toxique. Le transcriptome circadien perd sa nocturnalité, pourtant adaptative à la saison hivernale à laquelle l'expérience a été réalisée (Mat et al. 2012). Le transcriptome circadien est également représenté par des amplitudes d'oscillations plus importantes que chez les huîtres non exposées. De plus, les périodes d'oscillation des transcrits ultradiens, pour lesquelles nous avons fait l'hypothèse qu'elles soient impliquées dans un mécanisme de régulation photopériodique, sont modifiées. Ces résultats peuvent suggérer que l'organisme a perdu son repère temporel journalier et/ou annuel. Cela pourrait venir d'un défaut de synchronisation de l'organisme avec son environnement lumineux suite à l'exposition à *A. minutum*, par l'atteinte de l'horloge elle-même ou des protéines impliquées dans la perception du signal lumineux. Par ailleurs, de précédents travaux sur la TTX (homologue de la STX, principale PSP) montrent un impact de cette toxine dans la transmission neuronale du message circadien chez les mammifères (Yamaguchi et al. 2003). Une deuxième hypothèse pour expliquer la perte de repère temporel des huîtres serait alors que la bioaccumulation de STX par l'huître suite à l'ingestion d'*A. minutum* entraîne des perturbations dans la coordination entre un système horloger central chargé de la perception lumineuse et les différents tissus de l'organisme, qui ne seraient alors plus synchronisés convenablement avec l'environnement. Cependant l'existence d'un système horloger central chez l'huître reste encore à démontrer. Chez les bivalves dépourvus d'yeux comme l'huître, les photorécepteurs non-visuels de la lumière serait plutôt répartis dans tout le corps (Musio and Santillo 2009; Perrigault and Tran 2017a).

Parallèlement aux modifications des caractéristiques des rythmes, nous avons observé que seulement très peu de gènes sont observés oscillants dans les deux conditions (huîtres contrôles ou exposées à *A. minutum*). Cela implique des apparitions, des disparitions, et des

changements de cyclicité chez un grand nombre de transcrits suite à l'exposition à *A. minutum*. Ce genre de phénomène a déjà été observé chez des souris mutante d'un gène impliqué dans la régulation circadienne (Zhang et al. 2015), chez des souris soumises à un régime gras de longue durée (Eckel-Mahan et al. 2013), mais aussi chez la moule *Mytilus edulis* en fonction des conditions environnementales dans lesquelles elle est placée (Connor and Gracey 2011). Cela peut alors souligner à nouveau une toxicité sur le fonctionnement horloger, mais aussi une réponse adaptative transcriptomique en réponse à la toxicité d'*A. minutum*. Cette deuxième hypothèse est appuyée par la surexpression et l'oscillation ultradienne des facteurs de transcription HLF (isoforme2) et DBP-2 suite à l'exposition à l'algue toxique. Ces facteurs de transcription sont impliqués chez les mammifères dans la transcription du message cyclique, par l'activation de gènes notamment liés aux processus de détoxification des xénobiotiques (Gachon et al. 2006). Pour finir, une analyse différentielle sur l'ensemble du transcriptome (cyclique ou non) a permis de mettre en évidence que le niveau moyen d'un grand nombre de transcrits est augmenté suite à l'exposition des huîtres à *A. minutum*. Ces transcrits sont impliqués dans un grand nombre de fonctions biologiques dont la biosynthèse des lipides ou les processus d'oxydo-réduction, faisant écho à la diminution des lipides structurelles (phospholipides) et aux modifications d'expressions de gènes impliqués dans la défense du stress oxydant préalablement observées dans les branchies d'huîtres exposées à *A. minutum* (Haberkorn et al. 2010a; Mat et al. 2013; Fabioux et al. 2015). Si tous les gènes différentiellement exprimés ne sont pas significativement cycliques, nous avons pu observer la présence de gènes impactés par une modification de cyclicité dans chacune de ces fonctions. Cela laisse suggérer un impact indirect de la perturbation des transcrits cycliques sur des transcrits non cycliques via leur rôle dans leur fonction biologique respectives.

Pour conclure, cette étude du transcriptome cyclique a mis en évidence un profond remodelage du transcriptome cyclique des huîtres *C. gigas* suite à l'exposition à des concentrations environnementales d'*A. minutum*. La perturbation des cycles par cette algue toxique semble bien être visible depuis leur genèse (perturbation de l'horloge circadienne) jusqu'au comportement valvaire, en passant par la régulation transcriptionnelle. Les cycles sont impactés dans plusieurs de leurs paramètres (phase, période et amplitude). Ce remodelage peut alors mener à une perte d'adaptation / harmonie de l'huître avec son écosystème, en découplant la rythmicité transcriptionnelle des besoins physiologiques adaptés aux conditions environnementales cycliques. La question de savoir si cette perturbation est liée à une toxicité directe de l'horloge, ou, par exemple, à la perturbation de sa synchronisation avec l'environnement reste ouverte. Cette exposition a également permis de se rendre compte que si 20-25 % du transcriptome est oscillant dans une condition spécifique donnée, au moins 42 % du transcriptome des branchies de *C. gigas* a un potentiel oscillant. Nous suggérons que cela révèle au moins en partie la capacité de l'horloge à répondre de manière adaptative à un évènement toxique.

1.3. Développement de l'interférence par la stratégie du cheval de Troie

Efficacité de la stratégie du cheval de Troie. Pour tester expérimentalement l'implication de l'horloge circadienne dans la bioaccumulation de PSP, nous avons développé une approche non invasive de l'interférence chez *C. gigas* (Chapitre IV). Le but était la mise sous silence temporaire de l'expression du gène *Clock*. Les résultats montrent que l'approche « du cheval de Troie » développée pour cette étude est efficace pour entraîner la machinerie d'interférence (Fire 2007) dans les cellules de l'huître et induire la diminution des ARNm du gène cible (*Clock*) dans les branchies.

L'interférence par ARN est un mécanisme post-transcriptionnel de mise sous silence temporaire d'un gène. L'introduction d'un ARN double brin (ARNdb) dans des cellules met en place une machinerie cellulaire qui mène à l'inactivation partielle du gène cible par la dégradation des ARN messagers (ARNm) endogènes correspondant (Timmons and Fire 1998; Fire 2007). L'utilisation de cette machinerie naturelle constitue un outil très intéressant pour l'étude de la fonction d'un gène. Des études récentes avaient déjà montré l'application possible de la mise sous silence par ARN d'interférence chez les huîtres (Fabioux et al. 2009; Jee et al. 2014; Huvet et al. 2015b).

Jusqu'alors, l'application de l'interférence par ARN chez les organismes aquatiques filtreurs était cependant nécessairement invasive (anesthésie, puis application à la seringue), et difficilement applicable à un grand nombre d'individus. La méthode du cheval de Troie par la voie nutritive a consisté à rendre applicable un traitement non invasif, pour éviter de perturber entre autre le comportement des bivalves. Une approche non-invasive avait été développée en premier lieu chez le ver (Timmons and Fire 1998; Timmons et al. 2001), et appliquée depuis à d'autres espèces, notamment chez des petits insectes. Elle consiste en l'ingestion de bactéries (*Escherichia coli* HT115) transformées, capables de produire les ARN interférents (ARNdb) correspondant au gène cible. Elle n'avait en revanche jamais été utilisée chez les organismes filtreurs, ni (à ma connaissance) chez des organismes d'une taille aussi importante. En effet, l'ingestion directe des bactéries par les huîtres est très limitée. Leur petite taille (1 μm) les empêche d'être retenues par le filtre branchial de l'huître (taux de rétention trop faible). La stratégie du cheval de Troie a alors consisté à imaginer une étape intermédiaire : l'adsorption des bactéries productrices d'ARN interférents sur des algues unicellulaires. En complexe avec les algues, les bactéries peuvent alors être retenues par les cils branchiaux et amenées jusqu'à la bouche de l'huître pour être ingérées.

L'efficacité de la stratégie du cheval de Troie, en fait un outil prometteur, applicable à tous les organismes aquatiques filtreurs. De plus, cette stratégie est également applicable pour l'étude de la fonction de n'importe quel gène d'intérêt. Dans le futur, l'efficacité de la stratégie du cheval de Troie pourra être améliorée notamment par des ratios bactéries/algues plus importants ou des temps d'exposition plus longs.

Comparaison entre la méthode d'interférence par ARN et CRISPR. Récemment, un autre outil prometteur, CRISPR-Cas9 a été découvert et déjà appliqué chez des organismes modèles

(Shalem et al. 2014; Wang et al. 2014; Doudna and Charpentier 2014) pour mettre sous silence l'expression d'un gène, afin de caractériser la fonction d'un gène. Les deux approches (interférence et CRISPR-Cas9) possèdent leurs intérêts respectifs et sont applicables selon l'objectif de l'étude. Elles possèdent chacune des caractéristiques différentes. CRISPR-Cas9 consiste en une endonucléase d'ADN guidé par un ARN d'intérêt, qui permet de venir « couper » la séquence d'ADN du gène d'intérêt. CRISPR-Cas9, annihile alors complètement l'expression du gène étudié puisqu'il élimine de façon définitive la séquence d'ADN correspondant (« Knock-out »). L'autre, l'interférence par ARN, diminue temporairement l'expression du gène d'intérêt par la dégradation des ARN messagers correspondants (« knock-down »). Elle permet alors d'une part d'obtenir un « effet-dose » de la diminution de l'ARNm du gène d'intérêt, d'autre part d'obtenir une diminution temporaire et réversible de l'expression de ce gène. Toutefois, l'approche CRISPR-Cas9 n'est pas encore mise au point sur les mollusques bivalves, ce qui ne saurait tarder.

2. Perspectives de recherches

2.1. En chronobiologie des huîtres *C. gigas*

Compréhension du fonctionnement de l'horloge circadienne chez C. gigas.

Après la découverte de l'origine endogène du rythme circadien chez *C. gigas* (Mat et al. 2012), et la caractérisation des composants principaux de l'horloge circadienne impliqués dans la genèse du rythme (Perrigault and Tran 2017a), l'analyse transcriptomique réalisée dans ma thèse a permis d'étudier les gènes sous contrôle de l'horloge circadienne (« *controlled clock genes* », *ccgs*) dans les branchies de l'huître, qui vont induire la temporalité aux fonctions métaboliques et physiologiques de l'huître. La compréhension des régulations transcriptionnelles complexes mises en évidence dans cette étude va passer par une meilleure compréhension du rythme circadien dans son ensemble.

Synchronisation de l'horloge avec son environnement. Une meilleure compréhension de la régulation de l'horloge circadienne de l'huître implique d'abord de comprendre en amont sa synchronisation par le régime lumineux (Figure VI 2). Des familles de protéines telles que les cryptochromes et les opsines, notamment les rhodopsines ou la mélanopsine sont impliquées dans la perception du signal lumineux, et pour certaines dans la synchronisation de l'horloge circadienne (Musio and Santillo 2009; Oliveri et al. 2014; Biscontin et al. 2016). L'étude de l'implication de ces protéines photosensibles dans la régulation du mécanisme horloger chez les huîtres *C. gigas* et ceci en fonction des différentes longueurs d'ondes, constitue une piste de recherche primordiale. De plus, l'étude de ces protéines photosensibles permettrait de découvrir si une ou plusieurs de ces protéines sont sensibles à la faible intensité de l'éclairement de la lune, permettant à l'organisme de se

synchroniser sur le cycle lunaire comme cela a déjà été montré chez le corail *Acropora millepora* (Levy et al. 2007) avec l'implication du cryptochrome 2.

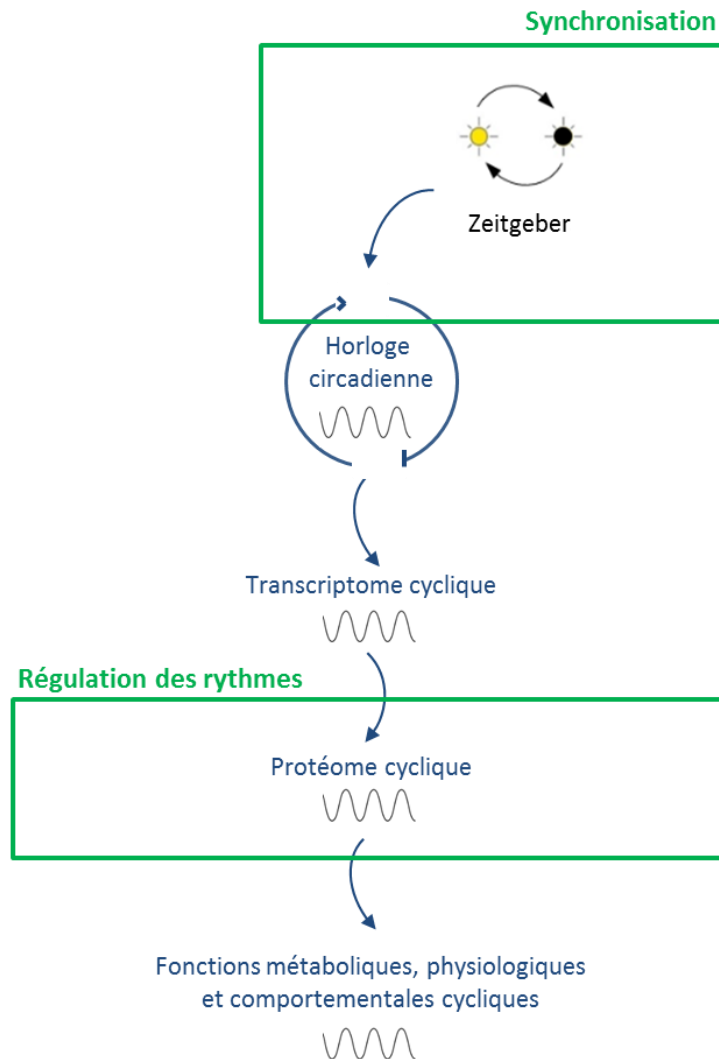


Figure VI 2. Perspectives d'études pour la compréhension du fonctionnement de l'horloge circadienne chez *C. gigas*.

Protéome cyclique. L'étude du protéome cyclique permettrait d'appréhender de façon plus fonctionnelle les processus biologiques temporels de *C. gigas* (Figure VI 2). En effet, ce sont les protéines qui sont à l'origine du fonctionnement effectif de la cellule. L'horloge circadienne régule la rythmicité du transcriptome cyclique (étudiée dans mes travaux de recherche) qui après traduction, va donner lieu au protéome cyclique, amenant alors à la variation cyclique des niveaux d'abondance protéique dans les tissus et au fonctionnement cyclique des fonctions physiologiques. De plus, on comprend aujourd'hui chez les organismes terrestres que la traduction des ARNm en protéine fait également partie intégrale de la machinerie de régulation rythmique (Mermet et al. 2017). Le protéome n'est donc pas simplement un décalque du transcriptome, mais également le fruit de nouvelles régulations, post-transcriptionnelles. Quelle est l'importance de ces régulations chez *C. gigas* ? Quel est la

part effective de protéines cycliques associées aux fonctions physiologiques de l'huître ? Répondre à ces questions permettra de continuer à mieux appréhender et à affiner notre connaissance de la machinerie circadienne de *C. gigas* et son implication dans la biologie de l'huître.

Mécanismes sous-jacents à la genèse des transcrits ultradiens.

Une autre question que mes travaux soulèvent est l'origine des transcrits ultradiens chez l'huître. L'analyse transcriptionnelle temporelle dans les branchies de *C. gigas* réalisée en hiver a révélé que la majorité des transcrits présentaient une oscillation ultradienne. Une hypothèse a été posée concernant les périodes d'oscillations des transcrits ultradiens, qui seraient en adéquation avec la durée de jour et la durée de nuit de la photopériode naturelle. Pour vérifier cette hypothèse, une même analyse de transcriptome total pourrait être réalisée à différents moments de l'année. Ainsi, cela permettrait d'observer si les périodes des transcrits ultradiens évoluent en adéquation avec l'évolution de la durée de jour ou de nuit. Autrement dit, la question est de savoir si la genèse et la périodicité des transcrits ultradiens dépendent du photopériodisme, c'est-à-dire d'une horloge circannuelle. De plus, il serait intéressant de comparer l'évolution des gènes et fonctions sous le contrôle de cette rythmicité ultradienne au cours de l'année en fonction des besoins physiologiques saisonniers de l'huître.

Des liens étroits entre transcrits ultradiens et transcrits circadiens ont été proposés. Notamment, des éléments du réseau horloger circadien connus chez d'autres espèces ont été observés avec une expression ultradienne. Cela suggère que les transcrits circadiens et ultradiens auraient (au moins partiellement) la même origine : l'horloge circadienne. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait inhiber temporairement l'horloge circadienne via l'interférence par ARN (stratégie du cheval de Troie) et observer la persistance des transcrits ultradiens dans le transcriptome de l'huître.

Enfin, il serait intéressant d'observer au niveau protéomique si les rythmes transcriptionnels ultradiens sont également observés au niveau des mécanismes de régulation post-transcriptionnel et post-translationnel. Les transcrits ultradiens seront-ils observés au niveau du protéome cyclique ? Et dans quelles fonctions physiologiques seraient-ils impliqués ? Ces questions méritent d'être explorées.

2.2. Sur l'étude de la contamination des huîtres par *A. minutum*

*Étude du comportement des huîtres diploïdes et triploïdes lors d'efflorescences d'*A. minutum* in situ.*

Nous proposons de compléter l'étude de l'implication des rythmes biologiques des huîtres diploïdes et triploïdes dans les processus bioaccumulations des PSP *in situ*, en Rade de Brest par exemple, qui est régulièrement soumise aux efflorescences d'*A. minutum*. Le suivi par valvométrie HFNI permettrait le suivi du comportement valvaire et l'analyse des rythmes biologiques associés. Nous pourrions alors observer si les différences de comportement et de

rythmes biologiques des huîtres diploïdes et triploïdes présentent les mêmes caractéristiques qu'à Arcachon, en présence ou non d'efflorescences. En parallèle, un suivi de la bioaccumulation des PSP pourrait être réalisé sur des organismes du même lot pour déterminer *in situ* si des différences de rythmes biologiques sont associées à des différences d'accumulations des phycotoxines.

Par ailleurs, des réponses comportementales précoces des huîtres face à une exposition à *A. minutum* ont été décrites au laboratoire dans de précédentes études. Elles sont caractérisées par une augmentation de la durée d'ouverture et du nombre de micro-fermetures, et une diminution de l'amplitude valvaire ((Tran et al. 2010; Haberkorn et al. 2011). Le suivi du comportement valvaire *in situ* permettrait alors de tester si, dans un écosystème réel, la réponse du comportement des huîtres peut constituer un outil de bio-détection précoce d'efflorescences d'*A. minutum* en Rade de Brest.

Étude des gènes cycliques impliqués dans la réponse à une exposition à A. minutum.

Dans l'analyse transcriptomique réalisée dans cette thèse, il semble que l'expression d'un certain nombre de transcrits cycliques soit activée en réponse à l'exposition à *A. minutum*, par exemple via les facteurs de transcription cyclique HLF ou DBP2 (connus pour activer les mécanismes de détoxification chez les mammifères). Une étude approfondie de ces transcrits cycliques, notamment au niveau protéique, pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de prise en charge et/ou de détoxification des phycotoxines dans les tissus de l'huître (métabolisation, excrétion..).

Cible(s) des PSP pour la perturbation du rythme circadien.

Enfin, la caractérisation des protéines (cryptochromes, opsines) impliquées dans la synchronisation du rythme circadien chez *C. gigas* fait partie des perspectives proposées pour l'étude du rythme circadien. Il sera alors envisageable de tester si ces récepteurs lumineux non-visuels chez l'huître qui ne possède pas d'yeux, peuvent être une cible des toxines PSP, entraînant la perte de synchronisation du rythme de l'animal avec son environnement.

Références bibliographiques

A

- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmmed A, et al (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:657–685. doi: 10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003
- Ahmed H, Ushirobira R, Efimov D, et al (2016a) A fault detection method for automatic detection of spawning in oysters. *IEEE Trans Control Syst Technol* 24:1140–1147. doi: 10.1109/TCST.2015.2472999
- Ahmed H, Ushirobira R, Efimov D, et al (2016b) A fault detection method for automatic detection of spawning in oysters. *IEEE Trans Control Syst Technol* 24:1140–1147. doi: 10.1109/TCST.2015.2472999
- Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, et al (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 12:540–550. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00759-5
- Allen CN, Nitabach MN, Colwell CS (2017) Membrane Currents, Gene Expression, and Circadian Clocks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* a027714. doi: 10.1101/cshperspect.a027714
- Allen SK, Downing SL (1986) Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J Exp Mar Biol Ecol* 102:197–208. doi: 10.1016/0022-0981(86)90176-0
- Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11:R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106
- Anderson DM (1995) Toxic red tides and harmful algal blooms: A practical challenge in coastal oceanography. *Rev Geophys* 33:1189–1200.
- Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (2012) Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annu Rev Mar Sci* 4:143–176. doi: 10.1146/annurev-marine-120308-081121
- Anderson DM, Glibert PM, Burkholder JM (2002) Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25:704–726. doi: 10.1007/BF02804901
- Andrade H, Massabuau J-C, Cochrane S, et al (2016) High frequency non-invasive (HFNI) bio-sensors as a potential tool for marine monitoring and assessments. *Front Mar Sci* 3:187.
- Antunes LC, Levandovski R, Dantas G, et al (2010) Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutr Res Rev* 23:155–168. doi: 10.1017/S0954422410000016

- Armengaud A, Lasalle J-L, De Haro L, et al (2011) Bilan de la surveillance et de la prévention des effets sanitaires d'*Ostreopsis* sur le littoral méditerranéen en France (2007–2010). *Bull Epidemiol Hebd* 29–30.
- Arzul G, Seguel M, Guzman L, Erard-Le Denn E (1999) Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. *J Exp Mar Biol Ecol* 232:285–295. doi: 10.1016/S0022-0981(98)00120-8
- Aschoff J (1981) Freerunning and entrained circadian rhythms. In: Aschoff J (ed) *Biological Rhythms*. Springer US, Boston, MA, pp 81–93
- Atger F, Gobet C, Marquis J, et al (2015) Circadian and feeding rhythms differentially affect rhythmic mRNA transcription and translation in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci* 112:E6579–E6588. doi: 10.1073/pnas.1515308112

B

- Babcock RC, Bull GD, Harrison PL, et al (1986) Synchronous spawnings of 105 scleractinian coral species on the Great Barrier Reef. *Mar Biol* 90:379–394. doi: 10.1007/BF00428562
- Babin C (1993) La répartition géographique des mollusques bivalves du Paléozoïque (Cambrien à Dévonien): une revue. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 100:7–20. doi: 10.1016/0031-0182(93)90027-G
- Babin C (1995) Les premiers mollusques et leur evolution: où en est l'enquête. *Rev Espanola Paleontol* 10:45–57.
- Bardou P, Mariette J, Escudié F, et al (2014) jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15:293. doi: 10.1186/1471-2105-15-293
- Bardouil M, Bohec M, Bougrier S, et al (1996) Feeding responses of *Crassostrea gigas* (Thunberg) to inclusion of different proportions of toxic dinoflagellates in their diet. *Oceanol Acta* 19:177–182.
- Beckwith EJ, Yanovsky MJ (2014) Circadian regulation of gene expression: at the crossroads of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks. *Curr Opin Genet Dev* 27:35–42.
- Beentjes MP, Williams BG (1986) Endogenous circatidal rhythmicity in the New Zealand cockle *Chione stutchburyi* (Bivalvia, Veneridae). *Mar Freshw Behav Phy* 12:171–180.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 57:289–300.
- Berger SL, Sassone-Corsi P (2016) Metabolic signaling to chromatin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a019463. doi: 10.1101/cshperspect.a019463

- Bernard I, Massabuau J-C, Ciret P, et al (2016) *In situ* spawning in a marine broadcast spawner, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: timing and environmental triggers. *Limnol Oceanogr* 61:635–647. doi: 10.1002/lno.10240
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 125:359–369. doi: 10.1016/S0305-0491(99)00187-X
- Bingham C, Arbogast B, Guillaume GC, et al (1982) Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9:397–439.
- Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S (2007) Biological consequences of dosage dependent gene regulatory systems. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr* 1769:422–428. doi: 10.1016/j.bbaexp.2006.12.002
- Biscontin A, Frigato E, Sales G, et al (2016) The opsin repertoire of the Antarctic krill *Euphausia superba*. *Mar Genomics* 29:61–68.
- Bohn G (1903) Sur les mouvements oscillatoires des *Convolvata roscoffensis*. *CR Acad Sci Paris* 137:576–8.
- Boissin J, Canguilhem B (1998) Les rythmes du vivant: origine et contrôle des rythmes biologiques. Nathan: CNRS éd.
- Borcier E, Morvezen R, Boudry P, et al (2017) Effects of bioactive extracellular compounds and paralytic shellfish toxins produced by *Alexandrium minutum* on growth and behaviour of juvenile great scallops *Pecten maximus*. *Aquat Toxicol* 184:142–154. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.01.009
- Boulot F (2017) Implication des canaux sodium voltage-dépendant dans la réponse aux toxines chez *Crassostrea gigas* : le cas des phycotoxines paralysantes. Thèse. Université de Bretagne Occidentale.
- Boulot F, Castrec J, Bidault A, et al (2017) Molecular characterization of voltage-gated sodium channels and their relations with paralytic shellfish toxin bioaccumulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Drugs* 15:21. doi: 10.3390/md15010021
- Box GE, Jenkins GM, Reinsel GC (1994) Time series analysis: Forecasting and control. 3rd Prentice Hall.
- Brady AK, Snyder KA, Vize PD (2011) Circadian cycles of gene expression in the coral, *Acropora millepora*. *PLoS ONE* 6:e25072. doi: 10.1371/journal.pone.0025072
- Bricelj VM, Connell L, Konoki K, et al (2005) Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* 434:763–767. doi: 10.1038/nature03415
- Bricelj VM, Shumway SE (1998) Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev Fish Sci* 6:315–383. doi: 10.1080/10641269891314294

Brown JR (1988) Multivariate analyses of the role of environmental factors in seasonal and site-related growth variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Ecol Prog Ser* Oldendorf 45:225–236.

Bünning E (1936) Endogenous daily rhythms as the basis of photoperiodism. *Ber Deut Bot Ges* 590–607.

C

Chapelle A, Le Gac M, Labry C, et al (2015) The bay of Brest (France), a new risky site for toxic *Alexandrium minutum* blooms and PSP shellfish contamination. *Harmful Algae News* 51:4–5.

Chávez-Villalba J, Pommier J, Andriamiseza J, et al (2002) Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214:115–130. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00898-5

Chen J, Zhang D, Yao Q, et al (2010) Feeding-based RNA interference of a *trehalose phosphate synthase* gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol Biol* 19:777–786. doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01038.x

Chiang C-K, Mehta N, Patel A, et al (2014) The proteomic landscape of the suprachiasmatic nucleus clock reveals large-scale coordination of key biological processes. *PLoS Genet* 10:e1004695. doi: 10.1371/journal.pgen.1004695

Choi SH, Jee BY, Lee SJ, et al (2013) Effects of RNA interference-mediated knock-down of *hypoxia-inducible factor- α* on respiratory burst activity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 35:476–479. doi: 10.1016/j.fsi.2013.05.001

Claudel T, Cretenet G, Saumet A, Gachon F (2007) Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock. *FEBS Lett* 581:3626–3633. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.009

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. doi: 10.1029/96RG00986

Cole JJ (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annu Rev Ecol Syst* 13:291–314.

Connor KM, Gracey AY (2011) Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *Proc Natl Acad Sci* 108:16110–16115. doi: 10.1073/pnas.1111076108

Coulson JC, Potts GR, Deans IR, Fraser SM (1968) Exceptional mortality of shags and other seabirds caused by paralytic shellfish poison. *Br Birds* 61:1–404.

Cretenet G, Le Clech M, Gachon F (2010) Circadian clock-coordinated 12 hr period rhythmic activation of the IRE1 α pathway controls lipid metabolism in mouse liver. *Cell Metab* 11:47–57. doi: 10.1016/j.cmet.2009.11.002

D

Daan S, Albrecht U, Van der Horst GTJ, et al (2001) Assembling a clock for all seasons: are there M and E oscillators in the genes? *J Biol Rhythms* 16:105–116.

De Pittà C, Biscontin A, Albiero A, et al (2013) The Antarctic krill *Euphausia superba* shows diurnal cycles of transcription under natural conditions. *PLoS ONE* 8:e68652. doi: 10.1371/journal.pone.0068652

Dell'Aversano C, Walter JA, Burton IW, et al (2008) Isolation and structure elucidation of new and unusual saxitoxin analogues from mussels. *J Nat Prod* 71:1518–1523. doi: 10.1021/np800066r

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635

Doi M, Hirayama J, Sassone-Corsi P (2006) Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* 125:497–508.

Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, et al (2010) Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient *Cry*-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat Med* 16:67–74. doi: 10.1038/nm.2061

Doucette GJ (1995) Interactions between bacteria and harmful algae: A review. *Nat Toxins* 3:65–74. doi: 10.1002/nt.2620030202

Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:1258096–1258096. doi: 10.1126/science.1258096

Dridi S, Romdhane MS, Elcafsi M 'hamed (2007) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture* 263:238–248. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.10.028

Duchemin MB, Fournier M, Auffret M (2007) Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 264:73–81. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.12.030

Duffield GE, Watson NP, Mantani A, et al (2009) A role for *Id2* in regulating photic entrainment of the mammalian circadian system. *Curr Biol* 19:297–304. doi: 10.1016/j.cub.2008.12.052

Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96:271–290. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80566-8

Dupuy C, Vaquer A, Lam Hoai T, et al (2000) Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. *Mar Ecol Prog Ser* 205:171–184.

E

Eckel-Mahan KL, Patel VR, de Mateo S, et al (2013) Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell* 155:1464–1478. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.034

Eide EJ, Woolf MF, Kang H, et al (2005) Control of mammalian circadian rhythm by CKIε-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol Cell Biol* 25:2795–2807.

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.

Emura A, Matsuyama Y, Oda T (2004) Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori*. *Harmful Algae* 3:29–37. doi: 10.1016/j.hal.2003.08.004

Enright JT (1976) Resetting a tidal clock: a phase-response curve for *Excirolana*. *Biol Rhythms Mar Environ* 103:114.

Enríquez-Díaz M, Pouvreau S, Chávez-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. *Aquac Int* 17:491–506. doi: 10.1007/s10499-008-9219-1

Eskin A (1977) Neurophysiological mechanisms involved in photo-entrainment of the circadian rhythm from the *Aplysia* eye. *J Neurobiol* 8:273–299. doi: 10.1002/neu.480080310

Etheridge SM (2010) Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives. *Toxicon* 56:108–122. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.12.013

Evangelista V, Barsanti L, Frassanito AM, et al (2008) Algal toxins: Nature, occurrence, effect and detection. Springer Science & Business Media

F

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

Fabioux C, Huvet A, Le Souchu P, et al (2005) Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250:458–470.

- Fabioux C, Sulistiyani Y, Haberkorn H, et al (2015) Exposure to toxic *Alexandrium minutum* activates the detoxifying and antioxidant systems in gills of the oyster *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 48:55–62. doi: 10.1016/j.hal.2015.07.003
- Fang B, Everett LJ, Jager J, et al (2014) Circadian enhancers coordinate multiple phases of rhythmic gene transcription in vivo. *Cell* 159:1140–1152.
- Fang D, Xu G, Hu Y, et al (2011) Identification of genes directly involved in shell formation and their functions in pearl oyster, *Pinctada fucata*. *PLOS ONE* 6:e21860. doi: 10.1371/journal.pone.0021860
- FAO (2016a) FAO Fisheries & Aquaculture - Species Fact Sheets - *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). <http://www.fao.org/fishery/species/3514/en>. Accessed 14 Feb 2017
- FAO (2016b) The state of world fisheries and aquaculture 2016 - a-i5555e.pdf. <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Accessed 14 Feb 2017
- FAO, WHO (2016) Technical paper on Toxicity Equivalency Factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs.
- Fingerman M (1957) Lunar rhythmicity in marine organisms. *Am Nat* 91:167–178. doi: 10.1086/281976
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811. doi: 10.1038/35888
- Fire AZ (2007) Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed* 46:6966–6984. doi: 10.1002/anie.200701979
- Flores H, Wikfors G, Dam H (2012) Reactive oxygen species are linked to the toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium spp.* to protists. *Aquat Microb Ecol* 66:199–209. doi: 10.3354/ame01570
- Fonken LK, Workman JL, Walton JC, et al (2010) Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci* 107:18664–18669. doi: 10.1073/pnas.1008734107
- Ford SE, Bricelj VM, Lambert C, Paillard C (2008) Deleterious effects of a nonPST bioactive compound(s) from *Alexandrium tamarense* on bivalve hemocytes. *Mar Biol* 154:241–253. doi: 10.1007/s00227-008-0917-z
- Forward Jr RB (1987) Larval release rhythms of decapod crustaceans: an overview. *Bull Mar Sci* 41:165–176.
- Foster RG, Kreitzman L (2009) Seasons of life: The biological rhythms that enable living things to thrive and survive. Yale University Press
- Franca S, Viegas S, Mascarenhas V, et al (1995) Prokaryotes in association with a toxic *Alexandrium lusitanicum* in culture.

Fu L, Lee CC (2003) The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 3:350–361. doi: 10.1038/nrc1072

Funabara D, Ohmori F, Kinoshita S, et al (2014) Novel genes participating in the formation of prismatic and nacreous layers in the pearl oyster as revealed by their tissue distribution and RNA interference knockdown. *PLOS ONE* 9:e84706. doi: 10.1371/journal.pone.0084706

G

Gachon F, Firsov D (2011) The role of circadian timing system on drug metabolism and detoxification. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7:147–158. doi: 10.1517/17425255.2011.544251

Gachon F, Nagoshi E, Brown S, et al (2004) The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma*. doi: 10.1007/s00412-004-0296-2

Gachon F, Olela FF, Schaad O, et al (2006) The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab* 4:25–36. doi: 10.1016/j.cmet.2006.04.015

Galimany E, Sunila I, Hégaret H, et al (2008a) 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.

Galimany E, Sunila I, Hégaret H, et al (2008b) Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7:630–638. doi: 10.1016/j.hal.2008.01.001

Galler S (2008) Molecular basis of the catch state in molluscan smooth muscles: a catchy challenge. *J Muscle Res Cell Motil* 29:73–99. doi: 10.1007/s10974-008-9149-6

Galtsoff PS (1938) Physiology of reproduction of *Ostrea virginica*: I. Spawning reactions of the female and male. *Biol Bull* 74:461–486. doi: 10.2307/1537816

Gamble FW, Keeble F (1903) The bionomics of *Convolvata roscoffensis*, with special reference to its green cells. *Proc R Soc Lond* 72:93–98.

García-March JR, Jiménez S, Sanchis MA, et al (2016) *In situ* biomonitoring shows seasonal patterns and environmentally mediated gaping activity in the bivalve, *Pinna nobilis*. *Mar Biol* 163:29. doi: 10.1007/s00227-016-2812-3

García-March JR, Sanchis Solsona MÁ, 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. doi: 10.1007/s00227-007-0842-6

Garnier-Gere PH, Naciri-Graven Y, Bougrier S, et al (2002) Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in

- contrasting natural environments. *Mol Ecol* 11:1499–1514. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01531.x
- Garrett RW, Gasiewicz TA (2006) The *aryl hydrocarbon receptor* agonist 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters the circadian rhythms, quiescence, and expression of clock genes in murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Mol Pharmacol* 69:2076–2083.
- Gehring W, Rosbash M (2003) The coevolution of blue-light photoreception and circadian rhythms. *J Mol Evol* 57:S286–S289. doi: 10.1007/s00239-003-0038-8
- Glé C, Del Amo Y, Sautour B, et al (2008) Variability of nutrients and phytoplankton primary production in a shallow macrotidal coastal ecosystem (Arcachon Bay, France). *Estuar Coast Shelf Sci* 76:642–656. doi: 10.1016/j.ecss.2007.07.043
- Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, et al (2005) Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3407–3412.
- 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 (Paris)* 53:285–289.
- Gouthière L, Mauvieux B (2004) Etapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers, modélisation.
- 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.
- Grastilleur C, Arnich N, Belin C Vigilance, veille et surveillance des risques alimentaires phycotoxiques. *Santé Anim-Aliment* 31.
- Grizel H, Héral M (1991) Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J Cons ICES J Mar Sci* 47:399–403.
- Guéguen M, Baron R, Bardouil M, et al (2012) Influence of *Crassostrea gigas* (Thunberg) sexual maturation stage and ploidy on uptake of paralytic phycotoxins. *Toxicon* 60:40–43. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.03.003
- Guillard RRL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH (eds) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer US, Boston, MA, pp 29–60
- Guo X, Allen Jr SK (1994) Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting *polar body 1* in eggs. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:42–50.
- Guo X, DeBrosse GA, Allen SK (1996) All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture* 142:149–161.

Guo X, Hedgecock D, Hershberger WK, et al (1998) Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* 52:394. doi: 10.2307/2411076

H

Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, et al (2010a) Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 97:96–108. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.12.006

Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, et al (2010b) Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 9:427–439. doi: 10.1016/j.hal.2010.01.003

Haberkorn H, Tran D, Massabuau J-C, et al (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. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.03.034

Halberg F, Cornélissen G, Katinas G, et al (2003) Transdisciplinary unifying implications of circadian findings in the 1950s. *J Circadian Rhythms* 1:2. doi: 10.1186/1740-3391-1-2

Hall S, Reichardt PB (1984) Cryptic Paralytic Shellfish Toxins. In: Ragelis EP (ed) *Seafood Toxins*. American Chemical Society, Washington, D.C., pp 113–123

Hallegraeff GM (1993) A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32:79–99. doi: 10.2216/i0031-8884-32-2-79.1

Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD, Enevoldsen HO (2003) *Manual on harmful marine microalgae*. Unesco

Hawkins AJS, Magoulas A, Héral M, et al (2000) Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genet Res* 76:273–284.

Hégaret H, da Silva PM, Wikfors GH, et al (2011) *In vitro* interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve molluscs. *Cell Biol Toxicol* 27:249–266. doi: 10.1007/s10565-011-9186-6

Hégaret H, Wikfors GH, Shumway SE (2007a) Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc when exposed to three species of harmful algae. *J Shellfish Res* 26:549–559. doi: 10.2983/0730-8000(2007)26[549:DFROFS]2.0.CO;2

Hégaret H, Wikfors GH, Soudant P, et al (2007b) Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Mar Biol* 152:441–447. doi: 10.1007/s00227-007-0703-3

- Helm B, Ben-Shlomo R, Sheriff MJ, et al (2013) Annual rhythms that underlie phenology: biological time-keeping meets environmental change. *Proc R Soc B Biol Sci* 280:20130016–20130016. doi: 10.1098/rspb.2013.0016
- Herbert RJH, Humphreys J, Davies CJ, et al (2016) Ecological impacts of non-native Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and management measures for protected areas in Europe. *Biodivers Conserv* 25:2835–2865. doi: 10.1007/s10531-016-1209-4
- Hermabessiere L, Fabioux C, Lassudrie M, et al (2016) Influence of gametogenesis pattern and sex on paralytic shellfish toxin levels in triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to a natural bloom of *Alexandrium minutum*. *Aquaculture* 455:118–124. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.01.001
- Hoagland P, Scatasta S (2006) The Economic Effects of Harmful Algal Blooms. In: Granéli E, Turner JT (eds) *Ecology of Harmful Algae*. Springer Berlin Heidelberg, pp 391–402
- Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, et al (2009) Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLOS Genet* 5:e1000442. doi: 10.1371/journal.pgen.1000442
- Hughes ME, Grant GR, Paquin C, et al (2012) Deep sequencing the circadian and diurnal transcriptome of drosophila brain. *Genome Res* 22:1266–1281. doi: 10.1101/gr.128876.111
- Hur S-P, Takeuchi Y, Itoh H, et al (2012) Fish sleeping under sandy bottom: interplay of melatonin and clock genes. *Gen Comp Endocrinol* 177:37–45. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.01.007
- Huss HH (2002) Safety aspects associated with preharvest conditions of aquatic food products. *Food Saf Assur Pre-Harvest Phase* 1:217–228.
- Huvet A, Béguel J-P, Cavaleiro NP, et al (2015) Disruption of *amylase* genes by RNA interference affects reproduction in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Biol* 218:1740–1747. doi: 10.1242/jeb.116699
- Huvet A, Fleury E, Corporeau C, et al (2012) In vivo RNA interference of a gonad-specific transforming *growth factor-β* in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol* 14:402–410. doi: 10.1007/s10126-011-9421-4

I

- Iitaka C, Miyazaki K, Akaike T, Ishida N (2005) A role for *glycogen synthase kinase-3β* in the mammalian circadian clock. *J Biol Chem* 280:29397–29402. doi: 10.1074/jbc.M503526200
- Ikegami T, Takeuchi Y, Hur S-P, Takemura A (2014) Impacts of moonlight on fish reproduction. *Mar Genomics* 14:59–66. doi: 10.1016/j.margen.2013.11.007

J

- Jang C, Lahens NF, Hogenesch JB, Sehgal A (2015) Ribosome profiling reveals an important role for translational control in circadian gene expression. *Genome Res* 25:1836–1847. doi: 10.1101/gr.191296.115
- Janich P, Arpat AB, Castelo-Szekely V, et al (2015) Ribosome profiling reveals the rhythmic liver transcriptome and circadian clock regulation by upstream open reading frames. *Genome Res* 25:1848–1859. doi: 10.1101/gr.195404.115
- Jee BY, Kim MS, Cho MY, et al (2014) Simultaneous and systemic knock-down of *Big Defensin 1* and 2 gene expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* using long double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Fish Aquat Sci* 17:377–380.
- Jou L-J, Lin S-C, Chen B-C, et al (2013) Synthesis and measurement of valve activities by an improved online clam-based behavioral monitoring system. *Comput Electron Agric* 90:106–118. doi: 10.1016/j.compag.2012.09.008
- Jouaux A, Heude-Berthelin C, Sourdain P, et al (2010) Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort. *J Exp Mar Biol Ecol* 395:162–170. doi: 10.1016/j.jembe.2010.08.030
- Jouffe C, Cretenet G, Symul L, et al (2013) The circadian clock coordinates ribosome biogenesis. *PLoS Biol* 11:e1001455. doi: 10.1371/journal.pbio.1001455

K

- Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, et al (2000) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2:research0002. doi: 10.1186/gb-2000-2-1-research0002
- Kaniewska P, Alon S, Karako-Lampert S, et al (2015) Signaling cascades and the importance of moonlight in coral broadcast mass spawning. *eLife* 4:e09991. doi: 10.7554/eLife.09991
- Kaur G, Phillips C, Wong K, Saini B (2013) Timing is important in medication administration: a timely review of chronotherapy research. *Int J Clin Pharm* 35:344–358. doi: 10.1007/s11096-013-9749-0
- Kayser C, Heusner AA (1967) Le rythme nycthemeral de la dépense d'énergie-Etude de physiologie comparée. *J Physiol (Paris)* 59:3.
- Keeble F (1912) *Plant-animals: a study in symbiosis*. The University Press
- Kent M, Whyte J, LaTrace C (1995) Gill lesions and mortality in seawater pen-reared Atlantic salmon *Salmo salar* associated with a dense bloom of *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira* species. *Dis Aquat Organ* 22:77–81. doi: 10.3354/dao022077

- Klarsfeld A (2009) Horloges du vivant (Les): Comment elles rythment nos jours et nos nuits. Odile Jacob
- Klouch KZ, Schmidt S, Andrieux-Loyer F, et al (2016) Historical records from dated sediment cores reveal the multidecadal dynamic of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* in the Bay of Brest (France). FEMS Microbiol Ecol 92:fiw101. doi: 10.1093/femsec/fiw101
- Knutsson A (2003) Health disorders of shift workers. Occup Med 53:103–108. doi: 10.1093/occmed/kqg048
- Konopka RJ, Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci 68:2112–2116.
- Korenčič A, Košir R, Bordyugov G, et al (2014) Timing of circadian genes in mammalian tissues. Sci Rep. doi: 10.1038/srep05782
- Kyriacou CP, Peixoto AA, Sandrelli F, et al (2008) Clines in clock genes: fine-tuning circadian rhythms to the environment. Trends Genet 24:124–132. doi: 10.1016/j.tig.2007.12.003

L

- Lango-Reynoso F, Devauchelle N, Le Pennec M, Hatt P-J (1999) Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the “Rade de Brest”, France. Invertebr Reprod Dev 36:141–144. doi: 10.1080/07924259.1999.9652690
- Larkin SL, Adams CM (2007) Harmful algal blooms and coastal business: Economic consequences in Florida. Soc Nat Resour 20:849–859. doi: 10.1080/08941920601171683
- Lassudrie M, Wikfors GH, Sunila I, et al (2015) Physiological and pathological changes in the eastern oyster *Crassostrea virginica* infested with the trematode *Bucephalus sp.* and exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. J Invertebr Pathol 126:51–63. doi: 10.1016/j.jip.2015.01.011
- Lassus P, Amzil Z, Baron R, et al (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. doi: 10.1051/alr:2007016
- Lassus P, Baron R, Garen P, et al (2004) Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. Aquat Living Resour 17:207–214. doi: 10.1051/alr:2004012
- Last KS, Bailhache T, Kramer C, et al (2009) Tidal, daily, and lunar-day activity cycles in the marine polychaete *Nereis virens*. Chronobiol Int 26:167–183.

- Last KS, Hobbs L, Berge J, et al (2016) Moonlight drives ocean-scale mass vertical migration of zooplankton during the Arctic winter. *Curr Biol* 26:244–251. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.038
- Lees AD (1950) Diapause and photoperiodism in the fruit tree red spider mite (*Metatetranychus ulmi* Koch). *Nature* 166:874–875. doi: 10.1038/166874a0
- Lelong A, Haberkorn H, Le Goïc N, et al (2011) A new Insight into allelopathic effects of *Alexandrium minutum* on photosynthesis and respiration of the diatom *Chaetoceros neogracile* revealed by photosynthetic-performance analysis and flow cytometry. *Microb Ecol* 62:919–930. doi: 10.1007/s00248-011-9889-5
- Levy O, Appelbaum L, Leggat W, et al (2007) Light-responsive cryptochromes from a simple multicellular animal, the coral *Acropora millepora*. *Science* 318:467–470. doi: 10.1126/science.1145432
- Li J, Grant GR, Hogenesch JB, Hughes ME (2015) Chapter Sixteen - Considerations for RNA-seq analysis of circadian rhythms. In: Sehgal A (ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 349–367
- Li X, Zhang M, Zhang H (2011) RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLOS ONE* 6:e17788. doi: 10.1371/journal.pone.0017788
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923–930. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656
- Lin JD (2009) Minireview: The PGC-1 coactivator networks: chromatin-remodeling and mitochondrial energy metabolism. *Mol Endocrinol* 23:2–10. doi: 10.1210/me.2008-0344
- Lin J-M, Kilman VL, Keegan K, et al (2002) A role for *casein kinase 2α* in the drosophila circadian clock. *Nature* 420:816–820. doi: 10.1038/nature01235
- Liu C, Li S, Liu T, et al (2007) Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature* 447:477–481.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lück S, Thurley K, Thaben PF, Westermark PO (2014) Rhythmic degradation explains and unifies circadian transcriptome and proteome data. *Cell Rep* 9:741–751. doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.021

M

- Ma H, Krock B, Tillmann U, Cembella A (2009) Preliminary characterization of extracellular allelochemicals of the toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* using a *Rhodomonas salina* bioassay. *Mar Drugs* 7:497–522. doi: 10.3390/md7040497
- Mann R (1979) Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J Mar Biol Assoc U K* 59:95. doi: 10.1017/S0025315400046208
- Mao Y, Zhou Y, Yang H, Wang R (2006) Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. *Aquaculture* 253:322–333. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.05.033
- Marteil L (1976) La conchyliculture française. 2ème partie. Biologie de l’huître et de la moule, ISTPM.
- Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, Young MW (2001) A role for the segment polarity gene *shaggy/GSK-3* in the drosophila circadian clock. *Cell* 105:769–779. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00383-X
- Masó M, Garcés E (2006) Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Mar Pollut Bull* 53:620–630. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.08.006
- Mat A (2012) Étude des rythmes biologiques de l’huître *Crassostrea gigas* et de leur perturbation par l’algue toxique *Alexandrium minutum*. Thèse. Université Bordeaux 1
- Mat AM, Haberkorn H, Bourdineaud J-P, et al (2013) Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum*. *Aquat Toxicol* 140–141:458–465. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.07.008
- Mat AM, 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. doi: 10.3109/07420528.2012.699126
- Mat AM, Massabuau J-C, Ciret P, Tran D (2014) Looking for the clock mechanism responsible for circatidal behavior in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol* 161:89–99. doi: 10.1007/s00227-013-2317-2
- Mat AM, Perrigault M, Massabuau J-C, Tran D (2016) Role and expression of *cry1* in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during daily and tidal valve activity rhythms. *Chronobiol Int* 33:949–963. doi: 10.1080/07420528.2016.1181645
- Mauvoisin D, Wang J, Jouffe C, et al (2014) Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci* 111:167–172. doi: 10.1073/pnas.1314066111
- McClintock JB, Watts SA (1990) The effects of photoperiod on gametogenesis in the tropical sea urchin *Eucidaris tribuloides* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *J Exp Mar Biol Ecol* 139:175–184. doi: 10.1016/0022-0981(90)90145-3

- McCombie H, Lapègue S, Cornette F, et al (2005) Chromosome loss in bi-parental progenies of tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 247:97–105. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.02.003
- Mello CC, Conte D (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431:338–342. doi: 10.1038/nature02872
- Mello DF, Silva PM da, Barracco MA, et al (2013) Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. *Harmful Algae* 26:45–51. doi: 10.1016/j.hal.2013.03.003
- Mercier A, Zhao Sun, Baillon S, Hamel J-F (2011) Lunar Rhythms in the Deep Sea: Evidence from the Reproductive Periodicity of Several Marine Invertebrates. *J Biol Rhythms* 26:82–86. doi: 10.1177/0748730410391948
- Mermet J, Yeung J, Naef F (2017) Systems chronobiology: global analysis of gene regulation in a 24-hour periodic world. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9:a028720.
- Meuti ME, Denlinger DL (2013) Evolutionary links between circadian clocks and photoperiodic diapause in insects. *Integr Comp Biol* 53:131–143. doi: 10.1093/icb/ict023
- Møller LF, Riisgård HU (2007) Impact of jellyfish and mussels on algal blooms caused by seasonal oxygen depletion and nutrient release from the sediment in a Danish fjord. *J Exp Mar Biol Ecol* 351:92–105. doi: 10.1016/j.jembe.2007.06.026
- Moriyama Y, Kamae Y, Uryu O, Tomioka K (2012) *Gb*'Clock is expressed in the optic lobe and is required for the circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J Biol Rhythms* 27:467–477. doi: 10.1177/0748730412462207
- 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. doi: 10.1016/0022-0981(77)90103-4
- Mukai M, Tischkau SA (2007) Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: searching for a physiological role for *aryl hydrocarbon receptor*. *Toxicol Sci* 95:172–181.
- Musio C, Santillo S (2009) Non visual photoreception in invertebrates.

N

- Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, et al (2008) The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134:329–340. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.002

- Nakamura TJ, Moriya T, Inoue S, et al (2005) Estrogen differentially regulates expression of *Per1* and *Per2* genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. *J Neurosci Res* 82:622–630.
- Narahashi T, Moore JW (1968) Neuroactive agents and nerve membrane conductances. *J Gen Physiol* 51:93.
- Navara KJ, Nelson RJ (2007) The dark side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences. *J Pineal Res* 43:215–224. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00473.x
- Naylor E (1999) Marine animal behavior in relation to lunar phase. *Earth Moon Planets* 85/86:291–302. doi: 10.1023/A:1017088504226
- Naylor E (2010) *Chronobiology of marine organisms*. Cambridge University Press
- Nell JA (2002) Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210:69–88. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00861-4
- Nelson TC (1928) Relation of spawning of the oyster to temperature. *Ecology* 9:145–154. doi: 10.2307/1929351
- Nelson W, Tong YL, Lee J-K, Halberg F (1979) Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 6:305.
- Neumann D (1981) Tidal and lunar rhythms. In: Aschoff J (ed) *Biological Rhythms*. Springer US, Boston, MA, pp 351–380
- Neumann D (2014) Timing in tidal, semilunar, and lunar rhythms. In: Numata H, Helm B (eds) *Annual, Lunar, and Tidal Clocks*. Springer Japan, Tokyo, pp 3–24
- Newmark PA, Reddien PW, Cebrià F, Alvarado AS (2003) Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc Natl Acad Sci* 100:11861–11865. doi: 10.1073/pnas.1834205100
- Nezan E, Piclet G, Grossel H (1997) *Guide pratique à l'usage des analystes du Réseau National de Surveillance du phytoplancton*.
- Noguchi T, Watanabe K (2005) Tetrodotoxin resets the clock. *Eur J Neurosci* 21:3361–3367. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04180.x
- Normand J, Ernande B, Haure J, et al (2009) Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. *Aquat Biol* 7:229–241. doi: 10.3354/ab00190
- Normand J, Le Pennec M, Boudry P (2008) Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture* 282:124–129. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.026
- Numata H, Helm B (2015) *Annual, lunar, and tidal clocks: Patterns and mechanisms of nature's enigmatic rhythms*. Springer

Nunes FMF, Simões ZLP (2009) A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect Biochem Mol Biol* 39:157–160. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.10.011

O

Ohdo S (2010) Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption ☆. *Adv Drug Deliv Rev* 62:859–875. doi: 10.1016/j.addr.2010.01.006

Oliveri P, Fortunato AE, Petrone L, et al (2014) The cryptochrome/photolyase family in aquatic organisms. *Mar Genomics* 14:23–37.

Oren M, Tarrant AM, Alon S, et al (2015) Profiling molecular and behavioral circadian rhythms in the non-symbiotic sea anemone *Nematostella vectensis*. *Sci Rep* 5:11418. doi: 10.1038/srep11418

Osada M, Nomura T (1989) Seasonal variations of catecholamine levels in the tissues of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol Part C Comp Pharmacol* 93:171–173. doi: 10.1016/0742-8413(89)90029-7

Osborn TC, Chris Pires J, Birchler JA, et al (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet* 19:141–147. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00015-5

Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, et al (1998) Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci* 95:8660–8664.

P

Pak J, Fire A (2007) Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* 315:241–244. doi: 10.1126/science.1132839

Palmer JD (1995) 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. doi: 10.3109/07420529509057279

Panda S, Antoch MP, Miller BH, et al (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109:307–320. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00722-5

Partch CL, Green CB, Takahashi JS (2014) Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol* 24:90–99. doi: 10.1016/j.tcb.2013.07.002

Payton L, Perrigault M, Bourdineaud J-P, et al (2017a) Trojan horse strategy for non-invasive interference of *clock* gene in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol*. doi: 10.1007/s10126-017-9761-9

- Payton L, Perrigault M, Hoede C, et al (2017b) Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Sci Rep*. doi: 10.1038/s41598-017-03797-4
- Pegoraro M, Gesto JS, Kyriacou CP, Tauber E (2014) Role for circadian clock genes in seasonal timing: testing the Bünning hypothesis. *PLoS Genet* 10:e1004603.
- Peres R, Reitzel AM, Passamaneck Y, et al (2014) Developmental and light-entrained expression of melatonin and its relationship to the circadian clock in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *EvoDevo* 5:26.
- Perrigault M, Tran D (2017) Identification of the molecular clockwork of the oyster *Crassostrea gigas*. *PLOS ONE* 12:e0169790. doi: 10.1371/journal.pone.0169790
- Piferrer F, Beaumont A, Falguière J-C, et al (2009) Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293:125–156. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.036
- Pittendrigh CS (1993) Temporal organization: Reflections of a darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 55:17–54. doi: 10.1146/annurev.ph.55.030193.000313
- Preußner M, Heyd F (2016) Post-transcriptional control of the mammalian circadian clock: implications for health and disease. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 468:983–991. doi: 10.1007/s00424-016-1820-y

R

- Raible F, Falciatore A (2014) It's about time: rhythms as a new dimension of molecular marine research. *Mar Genomics* 14:1.
- Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, et al (2009) Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science* 324:651–654. doi: 10.1126/science.1171641
- Rausch De Traubenberg C, Soyer-Gobillard MO (1990) Bacteria associated with a photosynthetic dinoflagellate in culture. *Symbiosis* 8:117–133.
- Ravn H, Anthoni U, Christophersen C, et al (1995) Standardized extraction method for paralytic shellfish toxins in phytoplankton. *J Appl Phycol* 7:589–594. doi: 10.1007/BF00003947
- Redfern P (2003) *Chronotherapeutics*. Pharmaceutical Press
- Reid DG, Naylor E (1989) Are there separate circatidal and circadian clocks in the shore crab *Carcinus maenas*? *Mar Ecol Prog Ser* 1–6.
- Reitzel AM, Behrendt L, Tarrant AM (2010) Light entrained rhythmic gene expression in the sea anemone *Nematostella vectensis*: the evolution of the animal circadian clock. *PLoS One* 5:e12805.

- Ren JS, Marsden ID, Ross AH, Schiel DR (2003) Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the Marlborough Sounds, New Zealand. *N Z J Mar Freshw Res* 37:171–182. doi: 10.1080/00288330.2003.9517155
- Riddle NC, Kato A, Birchler JA (2006) Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays L.* *Theor Appl Genet* 114:101–111. doi: 10.1007/s00122-006-0414-z
- Ripperger JA, Schibler U (2006) Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian *Dbp* transcription and chromatin transitions. *Nat Genet* 38:369–374.
- Rivera AS, Hammel JU, Haen KM, et al (2011) RNA interference in marine and freshwater sponges: actin knockdown in *Tethya wilhelma* and *Ephydatia muelleriby* ingested dsRNA expressing bacteria. *BMC Biotechnol* 11:67. doi: 10.1186/1472-6750-11-67
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
- Robles MS, Cox J, Mann M (2014) *In-vivo* quantitative proteomics reveals a key contribution of post-transcriptional mechanisms to the circadian regulation of liver metabolism. *PLoS Genet* 10:e1004047. doi: 10.1371/journal.pgen.1004047
- Roenneberg T, Merrow M (2005) Circadian clocks—the fall and rise of physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:965–971.
- Rosbash M (2009) The implications of multiple circadian clock origins. *PLoS Biol* 7:e1000062. doi: 10.1371/journal.pbio.1000062
- Rouhana L, Weiss JA, Forsthoefel DJ, et al (2013) RNA interference by feeding *in vitro*–synthesized double-stranded RNA to planarians: Methodology and dynamics. *Dev Dyn* 242:718–730. doi: 10.1002/dvdy.23950
- Ruesink JL, Lenihan HS, Trimble AC, et al (2005) Introduction of non-native oysters: ecosystem effects and restoration implications. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:643–689. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152638

S

- Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, et al (2010) Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3 β -mediated phosphorylation. *PLoS ONE* 5:e8561. doi: 10.1371/journal.pone.0008561
- Sánchez-Vázquez FJ, Terry MI, Felizardo VO, Vera LM (2011) Daily rhythms of toxicity and effectiveness of anesthetics (MS222 and Eugenol) in zebrafish (*Danio Rerio*). *Chronobiol Int* 28:109–117. doi: 10.3109/07420528.2010.538105

- Sarathi M, Simon MC, Venkatesan C, Hameed ASS (2008) Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Mar Biotechnol* 10:242–249. doi: 10.1007/s10126-007-9057-6
- Sato S, Kodama M (2008) Metabolism of paralytic shellfish toxins incorporated into bivalves. In: Botana L (ed) *Seafood and Freshwater Toxins*. CRC Press, pp 165–175
- Saunders DS (2005) Erwin Bünning and Tony Lees, two giants of chronobiology, and the problem of time measurement in insect photoperiodism. *J Insect Physiol* 51:599–608. doi: 10.1016/j.jinsphys.2004.12.002
- Sbragaglia V, Lamanna F, Mat AM, et al (2015) Identification, characterization, and diel pattern of expression of canonical clock genes in *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda) eyestalk. *PLoS One* 10:e0141893.
- Scargle JD (1982) Studies in astronomical time series analysis. II-Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. *Astrophys J* 263:835–853.
- Scholín CA, Gulland F, Doucette GJ, et al (2000) Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 403:80–84. doi: 10.1038/47481
- Schumpert CA, Dudycha JL, Patel RC (2015) Development of an efficient RNA interference method by feeding for the microcrustacean *Daphnia*. *BMC Biotechnol* 15:91. doi: 10.1186/s12896-015-0209-x
- Schwartz WJ, Gross RA, Morton MT (1987) The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci* 84:1694–1698.
- Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343:84–87. doi: 10.1126/science.1247005
- Sharifian A, Farahani S, Pasalar P, et al (2005) Shift work as an oxidative stressor. *J Circadian Rhythms* 3:15. doi: 10.1186/1740-3391-3-15
- Shirogane T, Jin J, Ang XL, Harper JW (2005) SCF-TRCP controls clock-dependent transcription via *Casein Kinase I*-dependent degradation of the mammalian Period-1 (Per1) protein. *J Biol Chem* 280:26863–26872. doi: 10.1074/jbc.M502862200
- Shpigel M, Barber BJ, Mann R (1992) Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Exp Mar Biol Ecol* 161:15–25. doi: 10.1016/0022-0981(92)90186-E
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, et al (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465–476. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00576-1
- Sijen T, Steiner FA, Thijssen KL, Plasterk RHA (2007) Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* 315:244–247. doi: 10.1126/science.1136699

- Stevenson TJ, Visser ME, Arnold W, et al (2015) Disrupted seasonal biology impacts health, food security and ecosystems. *Proc R Soc B* 282:20151453. doi: 10.1098/rspb.2015.1453
- Storch K-F, Lipan O, Leykin I, et al (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417:78–83.
- Storey JD, Tibshirani R (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci* 100:9440–9445. doi: 10.1073/pnas.1530509100
- Storey JD, Xiao W, Leek JT, et al (2005) Significance analysis of time course microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci* 102:12837–12842. doi: 10.1073/pnas.0504609102
- Stratmann M, Suter DM, Molina N, et al (2012) Circadian Dbp transcription relies on highly dynamic BMAL1-CLOCK interaction with E boxes and requires the proteasome. *Mol Cell* 48:277–287.
- Sugama N, Park J-G, Park Y-J, et al (2008) Moonlight affects nocturnal *Period2* transcript levels in the pineal gland of the reef fish *Siganus guttatus*. *J Pineal Res* 45:133–141. doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00566.x
- Suquet M, Malo F, Quere C, et al (2016) Gamete quality in triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 451:11–15. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.08.032
- Suwazono Y, Dochi M, Sakata K, et al (2008) A longitudinal study on the effect of shift work on weight gain in male japanese workers. *Obesity* 16:1887–1893. doi: 10.1038/oby.2008.298
- Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, et al (2009) An acidic matrix protein, *Pif*, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325:1388–1390. doi: 10.1126/science.1173793
- Sow M, Durrieu G, Briollais L, et al (2011) Water quality assessment by means of HFNI valvometry and high-frequency data modeling. *Environ Monit Assess* 182:155–170. doi: 10.1007/s10661-010-1866-9

T

- Tabara H, Grishok A, Mello CC, others (1998) RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282:430–431.
- Takeda Y, Jothi R, Birault V, Jetten AM (2012) ROR directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 40:8519–8535. doi: 10.1093/nar/gks630
- Takekata H, Matsuura Y, Goto SG, et al (2012) RNAi of the circadian clock gene period disrupts the circadian rhythm but not the circatidal rhythm in the mangrove cricket. *Biol Lett* 8:488–491. doi: 10.1098/rsbl.2012.0079

- Takekata H, Numata H, Shiga S, Goto SG (2014) Silencing the circadian clock gene *Clock* using RNAi reveals dissociation of the circatidal clock from the circadian clock in the mangrove cricket. *J Insect Physiol* 68:16–22. doi: 10.1016/j.jinsphys.2014.06.012
- Takemura A, Rahman MS, Park YJ (2010) External and internal controls of lunar-related reproductive rhythms in fishes. *J Fish Biol* 76:7–26.
- Takemura A, Susilo ES, Rahman MD, Morita M (2004) Perception and possible utilization of moonlight intensity for reproductive activities in a lunar-synchronized spawner, the golden rabbitfish. *J Exp Zool Part Ecol Genet Physiol* 301:844–851.
- Takeuchi J, Shannon W, Aronin N, Schwartz WJ (1993) Compositional changes of AP-1 DNA-binding proteins are regulated by light in a mammalian circadian clock. *Neuron* 11:825–836. doi: 10.1016/0896-6273(93)90112-5
- Tao W, Wu J, Zhang Q, et al (2015) EGR1 regulates hepatic clock gene amplitude by activating *Per1* transcription. *Sci Rep* 5:15212. doi: 10.1038/srep15212
- Teschke M, Wendt S, Kawaguchi S, et al (2011) A circadian clock in antarctic krill: an endogenous timing system governs metabolic output rhythms in the euphausiid species *Euphausia superba*. *PLoS ONE* 6:e26090. doi: 10.1371/journal.pone.0026090
- Tessmar-Raible K, Raible F, Arboleda E (2011) Another place, another timer: Marine species and the rhythms of life. *BioEssays* 33:165–172. doi: 10.1002/bies.201000096
- Tillmann U, John U, Cembella A (2007) On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protists. *J Plankton Res* 29:527–543. doi: 10.1093/plankt/fbm034
- Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263:103–112. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00579-5
- Timmons L, Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395:854–854. doi: 10.1038/27579
- Tosteson TR, Ballantine DL, Tosteson CG, et al (1989) Associated bacterial flora, growth, and toxicity of cultured benthic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* and *Gambierdiscus toxicus*. *Appl Environ Microbiol* 55:137–141.
- Tran D, Ciret P, Ciutat A, et al (2003) Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: Application to cadmium. *Environ Toxicol Chem* 22:914–920. doi: 10.1002/etc.5620220432
- Tran D, Ciutat A, Mat A, et al (2015) The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 158:41–49. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.10.023
- Tran D, Haberkorn H, Soudant P, et al (2010) Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture* 298:338–345. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.10.030

- Tran D, Nadau A, Durrieu G, 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. doi: 10.3109/07420528.2011.565897
- Tran D, Sow M, Camus L, et al (2016) In the darkness of the polar night, scallops keep on a steady rhythm. *Sci Rep* 6:32435. doi: 10.1038/srep32435
- Troost K (2010) Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *J Sea Res* 64:145–165. doi: 10.1016/j.seares.2010.02.004
- Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, et al (2006) RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol Biol* 15:383–391. doi: 10.1111/j.1365-2583.2006.00656.x

U

- Ueda HR, Chen W, Adachi A, et al (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418:534.
- Ueda HR, Hayashi S, Chen W, et al (2005) System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* 37:187–192. doi: 10.1038/ng1504
- Uryu O, Kamae Y, Tomioka K, Yoshii T (2013) Long-term effect of systemic RNA interference on circadian clock genes in hemimetabolous insects. *J Insect Physiol* 59:494–499. doi: 10.1016/j.jinsphys.2013.02.009

V

- van der Veen DR, Gerkema MP (2017) Unmasking ultradian rhythms in gene expression. *FASEB J* 31:743–750.
- Van Dolah FM (2000) Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ Health Perspect* 108:133.
- Vielhaber E, Eide E, Rivers A, et al (2000) Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian *casein kinase I varepsilon*. *Mol Cell Biol* 20:4888–4899. doi: 10.1128/MCB.20.13.4888-4899.2000
- Viitasalo K, Puttonen S, Kuosma E, et al (2015) Shift rotation and age – interactions with sleep–wakefulness and inflammation. *Ergonomics* 58:65–74. doi: 10.1080/00140139.2014.958573
- Visser ME, Caro SP, van Oers K, et al (2010) Phenology, seasonal timing and circannual rhythms: towards a unified framework. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365:3113–3127. doi: 10.1098/rstb.2010.0111

Vogeler S, Galloway TS, Lyons BP, Bean TP (2014) The nuclear receptor gene family in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, contains a novel subfamily group. BMC Genomics 15:369. doi: 10.1186/1471-2164-15-369

Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, et al (2009) Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. Proc Natl Acad Sci 106:21453–21458. doi: 10.1073/pnas.0909591106

W

Walshe DP, Lehane SM, Lehane MJ, Haines LR (2009) Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. Insect Mol Biol 18:11–19. doi: 10.1111/j.1365-2583.2008.00839.x

Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. Science 343:80–84. doi: 10.1126/science.1246981

Webb HM (1976) Interactions of daily and tidal rhythms. Biol Rhythms Mar Environ Univ S C Press Columbia 129–135.

Westermarck PO, Herzog H (2013) Mechanism for 12 hr rhythm generation by the circadian clock. Cell Rep 3:1228–1238. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.013

Whangbo JS, Hunter CP (2008) Environmental RNA interference. Trends Genet 24:297–305. doi: 10.1016/j.tig.2008.03.007

Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, et al (2010) Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. Mar Drugs 8:2185–2211. doi: 10.3390/md8072185

Wilcockson D, Zhang L (2008) Circatidal clocks. Curr Biol 18:R753–R755. doi: 10.1016/j.cub.2008.06.041

Wildish D, Lassus P, Martin J, et al (1998) Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium sp.* on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. Aquat Living Resour 11:35–43.

Wood S, Loudon A (2014) Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. J Endocrinol 222:R39–R59. doi: 10.1530/JOE-14-0141

Wu G, Anafi RC, Hughes ME, et al (2016) MetaCycle: an integrated R package to evaluate periodicity in large scale data.

Wu G, Zhu J, Yu J, et al (2014) Evaluation of five methods for genome-wide circadian gene identification. J Biol Rhythms 29:231–242. doi: 10.1177/0748730414537788

X

Xi Y, Chen D (2014) Partitioning the circadian clock. *Science* 345:1122–1123. doi: 10.1126/science.1259601

Y

Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, et al (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302:1408–1412. doi: 10.1126/science.1089287

Yamasaki Y, Katsuo D, Nakayasu S, et al (2008) Purification and characterization of a novel high molecular weight exotoxin produced by red tide phytoplankton, *Alexandrium tamarense*. *J Biochem Mol Toxicol* 22:405–415. doi: 10.1002/jbt.20253

Yan T, Zhou M, Fu M, et al (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. doi: 10.1016/S0041-0101(01)00080-0

Yang R, Su Z (2010) Analyzing circadian expression data by harmonic regression based on autoregressive spectral estimation. *Bioinformatics* 26:i168–i174. doi: 10.1093/bioinformatics/btq189

Yerushalmi S, Green RM (2009) Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecol Lett* 12:970–981. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01343.x

Yoshitane H, Honma S, Imamura K, et al (2012) JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep* 13:455–461. doi: 10.1038/embor.2012.37

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

Z

Zantke J, Ishikawa-Fujiwara T, Arboleda E, et al (2013) Circadian and circalunar clock interactions in a marine annelid. *Cell Rep* 5:99–113. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.031

Zhang EE, Kay SA (2010) Clocks not winding down: unravelling circadian networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:764–776. doi: 10.1038/nrm2995

Zhang EE, Liu AC, Hirota T, et al (2009) A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells. *Cell* 139:199–210. doi: 10.1016/j.cell.2009.08.031

Zhang G, Fang X, Guo X, et al (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490:49–54. doi: 10.1038/nature11413

- Zhang L, Hastings MH, Green EW, et al (2013) Dissociation of circadian and circatidal timekeeping in the marine crustacean *Eurydice pulchra*. *Curr Biol* 23:1863–1873. doi: 10.1016/j.cub.2013.08.038
- Zhang L, Prosdocimo DA, Bai X, et al (2015) KLF15 establishes the landscape of diurnal expression in the heart. *Cell Rep* 13:2368–2375. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.038
- Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, et al (2014) A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci* 111:16219–16224. doi: 10.1073/pnas.1408886111
- Zhao H, Sifakis EG, Sumida N, et al (2015) PARP1- and CTCF-mediated interactions between active and repressed chromatin at the lamina promote oscillating transcription. *Mol Cell* 59:984–997. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.019
- Zhu H, Yuan Q, Froy O, et al (2005) The two CRYs of the butterfly. *Curr Biol* 15:R953.

Annexes

Liste des articles scientifiques

- Payton, L.**, Perrigault, M., Hoede, C., Massabuau, J.-C., Sow, M., Huvet, A., Fabioux, C., Hegaret, H., Boullot, F., and Tran, D. (2017). Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Sci Rep.* doi: 10.1038/s41598-017-03797-4
- Payton, L.**, Perrigault, M., Bourdineaud, J.-P., Marcel, A., Massabuau, J.-C., and Tran, D. (2017). Trojan horse strategy for a non-invasive interference of *clock* gene in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol.* doi: 10.1007/s10126-017-9761-9
- Boullot, F., Castrec, J., Bidault, A., Dantas, N., **Payton, L.**, Perrigault, M., Tran, D., Amzil, Z., Boudry, P., Soudant, P., Hégaret, H., and Fabioux, C. (2017). Molecular characterization of voltage-gated sodium channels and their relations with paralytic shellfish toxin bioaccumulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Drugs* 15, 21. doi: 10.3390/md15010021
- Ahmed, H., Ushirobira, R., Efimov, D., Tran, D., Sow, M., **Payton, L.**, and Massabuau, J.-C. (2016). A fault detection method for automatic detection of spawning in oysters. *IEEE Trans. Control Syst. Technol.* 24, 1140–1147. doi: 10.1109/TCST.2015.2472999
- Payton, L.**, Massabuau, J.-C., Ciret, P., Sow, M., and Tran, D. How photoperiodism shapes seasonal behavior of diploids and triploids oysters. (*Soumis, PlosOne*).
- Payton, L.**, Ahmed, H., Ushirobira, R., Efimov, D., Massabuau, J.-C., Hegaret, H., Pouvreau, S., Sow, M., Mat, A., Ciret, P., and Tran, D. Harmful algal bloom detection using oysters as bio-sensors (*en préparation*).
- Castrec, J., Soudant, P., **Payton, L.**, Tran, D., Miner, P., Lambert, C., Le Goïc, N., Huvet, A., Quillien, V., Boullot, F., Hégaret, H., and Fabioux, C. Behavioral and physiological responses of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to three strains of *Alexandrium minutum* producing different toxin types (from PSTs to allelopathic extracellular compounds) (*en préparation*).

Implication dans des projets de recherche

Agence Nationale de Recherche, projet WaQMoS (2015 - 2019)

Surveillance de la qualité de l'eau des milieux marins par l'utilisation de bivalves comme bio-détecteurs.

Groupe de Recherche PHYCOTOX (2014 - 2017)

Responsables: Dr. Hess, P. (Ifremer), Dr. Hegaret, H. (CNRS, LEMAR, IUEM)

Des micro-algues aux risques pour l'Homme et l'écosystème.

Agence Nationale de Recherche, projet ACCUTOX (2013 - 2017)

De la caractérisation des déterminants de l'accumulation des toxines paralysantes (PST) chez l'huître (*C. gigas*) au risque sanitaire dans son contexte sociétal.

Collaborations pendant le travail de thèse

Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS / UBO / IRD / IFREMER, Plouzané, France.

Dr. Soudant, P.; Dr. Hegaret, H.; Dr. Huvet, A.; Dr. Fabioux, C ; Dr. Bouillot, F. ; Dr. Mat, A.

Laboratoire Physiologie des Invertébrés, Ifremer, Argenton, France.

Dr. Pouvreau, S.

Plateforme de bio-informatique Genotoul, MIAT, Université de Toulouse, INRA, Castanet-Tolosan, France.

Dr. Hoede, C.

Equipe Non-Asymptotic estimation for online systems, INRIA, Lille, France.

Dr. Ahmed, H ; Dr. Ushirobira, R.; Dr. Efimov, D.

Présentations orales et posters

Réunion du projet ANR ACCUTOX; Brest, France (2 *oraux*) **6 - 8 Février 2017**

« Remodelage du transcriptome cyclique de l'huître *C. gigas* par l'algue toxique *A. minutum*. »

« Saisonnalité des rythmes journaliers et tidaux chez les huîtres *C. gigas* diploïdes et triploïdes. »

30th ESCPB Congress; Barcelone, Espagne (*oral*) **4 - 7 Septembre 2016**

« Trojan horse strategy to interfere *clock* gene expression in the oyster *C. gigas*; impacts on PSTs bioaccumulation. »

Symposium Time and Light; Vienne, Autriche (*poster*) **8 - 10 Mai 2016**

« Diurnal cycling transcriptome of the oyster *C. gigas*. Effect of the harmful algae *A. minutum*. »

Journées JEST; Gujan-Mestras, France (*oral*) **11 - 12 Avril 2016**

« Impacts de l'algue toxique *A. minutum* sur les rythmes biologiques de l'huître *C. gigas*, de l'expression des gènes au comportement. »

Journées d'échanges du GdR PHYCOTOX; Villefranche-sur-Mer, France (*oral*) **15 - 16 Mars 2016**

« Diurnal cycling transcriptome of the oyster *C. gigas*. Effect of the harmful algae *A. minutum*. »

Réunion du projet ANR ACCUTOX; Brest, France (2 *oraux*) **28 – 29 Janvier 2016**
 « Stratégie du cheval de Troie pour l'interférence par ARN du gène *Clock* chez l'huître *C. gigas*. Impact sur la bioaccumulation de toxines PST. »
 « L'utilisation des huîtres comme bio-détecteurs des efflorescences algales. »

Réunion du projet ANR ACCUTOX; Brest, France (2 *oraux*) **5 - 6 Mars 2015**
 « Comportements saisonniers des huîtres diploïdes et triploïdes, 3 sites d'étude. »
 « Impacts de l'algue *A. minutum* sur les rythmes biologiques des huîtres, de l'expression des gènes au comportement. »

Réunion du projet ANR ACCUTOX; Brest, France (1 *oral*) **21 - 22 Janvier 2014**
 « La valvométrie haute fréquence non-invasive, outils pour l'étude de l'éthologie des bivalves et des rythmes biologiques. »

Activités complémentaires au travail de recherche pendant la thèse

Monitorat en écotoxicologie (niveau licence 3, 68h) **Octobre 2015 - Octobre 2016**
 Université de Bordeaux, Département Sciences et Technologies, France

Monitorat en écotoxicologie (niveau licence 3, 66h) **Octobre 2014 - Octobre 2015**
 Université de Bordeaux, Département Sciences et Technologies, France

Encadrement de stage (élève ingénieur ENSTBB 2^{ème} année) **Juin - Juillet 2015**
 Université de Bordeaux, UMR CNRS 5805 EPOC, équipe Ecotoxicologie Aquatique, France

Tutorat en écotoxicologie (niveau master 2, 24 h) **Septembre - Décembre 2013**
 Bureau d'étude de la Société Française d'Exportation des Ressources Educatives (SFERE), France

Résumé

Les efflorescences de la micro-algue toxique *Alexandrium minutum* sont en constante augmentation au niveau mondial, accentuées par les apports anthropiques et le réchauffement global, et posent des problèmes écologiques, économiques et sanitaires. Lors d'une exposition à *A. minutum*, l'accumulation des phycotoxines paralysantes (PSP) dans les tissus semble être différente entre les huîtres diploïdes et triploïdes. Par ailleurs, de nombreuses fonctions physiologiques de l'huître *C. gigas* sont impactées. L'ensemble des fonctions physiologiques d'un organisme est régulé par des rythmes biologiques. Propriété fondamentale de la vie, les rythmes biologiques permettent aux organismes de se synchroniser et d'anticiper les variations cycliques de l'environnement. Dans mes travaux, je me suis intéressée aux rythmes biologiques des huîtres diploïdes et triploïdes *C. gigas* et à leurs interactions avec la contamination par les PSP. Une analyse *in situ* sur un an a mis en évidence une relation jusque-là inconnue entre le comportement valvaire de *C. gigas* et le cycle d'éclairement de la lune, ainsi qu'une relation fine et subtile des cycles comportementaux nycthémeraux et tidaux avec l'évolution annuelle de la photopériode. Cette relation est modulée par la ploïdie. Par ailleurs, la mise au point d'une approche non-invasive d'interférence par ARN a permis de mettre en évidence l'implication de l'horloge circadienne dans les processus de bioaccumulation des PSP chez *C. gigas*. Enfin, l'analyse du transcriptome cyclique dans les branchies de *C. gigas* a mis en évidence qu'au moins 42 % du transcriptome peut être exprimé de façon oscillante. Contre intuitivement, en condition d'alternance jour / nuit, une majorité de transcrits sont ultradiens, trois fois plus nombreux que les transcrits circadiens. Exposées à *A. minutum*, les huîtres ont montré un remodelage profond de leur transcriptome cyclique, pouvant entraîner la perte de synchronisation de l'huître avec son environnement.

Mots clefs : Huîtres, Algues toxiques, Chronobiologie, Comportement, RNAseq, Interférence

Abstract

Harmful algal blooms of *Alexandrium minutum* are constantly increasing at the global level, accentuated by anthropogenic contributions and global warming, causing ecological, economical and sanitary problems. During exposition to *A. minutum*, paralytic phycotoxins (PSP) accumulation differs between diploid and triploid oysters. Moreover, many physiological functions of the oyster *C. gigas* are impacted. All physiological functions of an organism are regulated by biological rhythms. As a fundamental property of life, biological rhythms allow organisms to synchronize and anticipate cyclic variations of the environment. In my work, I was interested in the biological rhythms of diploid and triploid oysters *C. gigas*, and their interactions with PSP contamination. A one-year *in situ* analysis revealed a previously unknown relationship between valve behavior of *C. gigas* and the lunar illumination cycle, as well as a fine and subtle relationship of the nycthemeral and tidal behavioral cycles with the annual evolution of the photoperiod. This relationship was modulated by the ploidy. Moreover, the development of a non-invasive approach of RNA interference revealed the involvement of the circadian clock in bioaccumulation processes of PSPs in *C. gigas*. Finally, analysis of the cyclic transcriptome in the gills of *C. gigas* showed that at least 42 % of the transcriptome can oscillate. Surprisingly, in day / night entrainment, most of transcripts were ultradians, three times more abundant than circadian transcripts. Exposed to *A. minutum*, results showed a profound remodeling of the cyclic transcriptome of *C. gigas*, which could lead to loss of synchronization of the oyster with its environment.

Keywords : Oysters, Harmful algae, Chronobiology, Behavior, RNAseq, Interference