

# Diversité et fonctionnalité de " nouveaux types " de Heat Shock Protein-70 kDa chez les arthropodes

Stéphane Baringou

#### ▶ To cite this version:

Stéphane Baringou. Diversité et fonctionnalité de " nouveaux types " de Heat Shock Protein-70 kDa chez les arthropodes. Biologie animale. Université du Maine, 2016. Français. NNT: 2016LEMA1009. tel-01718232

# HAL Id: tel-01718232 https://theses.hal.science/tel-01718232

Submitted on 27 Feb 2018

**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 de Doctorat

# St¶phane BARINGOU

M¶moire pr¶sent¶ en vue de l'obtention du grade de Docteur de Le Mans Universit¶ sous le sceau de l'Universit¶ Bretagne Loire

§cole doctorale: VENAM (V¶g¶tal - Environnement - Nutrition - Agro-alimentaire - Mer)

Discipline: Biologie des organismes (CNU 68)

Unit¶ de recherche : Laboratoire MMS (Mer - Mol¶cules - Sant¶)

Soutenue le 26 Septembre 2016 Th· se Né: 2016LEMA1009

Directeur de Th·se:

# Diversit¶ et fonctionnalit¶ de i nouveaux types ò de Heat Shock Protein-70 kDa chez les arthropodes

## **JURY**

Rapporteurs: Patrick CORMIER, Professeur des universit¶s, Universit¶ Pierre et Marie CURIE / Station Biologique de Roscoff

Alain VAN WORMHOUDT, Directeur de recherche honoraire CNRS, Mus¶um National d'Histoire Naturelle

Examinateurs : Benoit CHENAIS, Professeur des universit¶s, Universit¶ du Maine

Myriam HARRY, Professeur des universit¶s, Universit¶ Paris-Sud

Jean-Yves TOULLEC, Maltre de conf¶rences-HDR, Station Biologique de Roscoff

Invit¶(s): Richard COSSON, Charg¶ de recherche CNRS, Universit¶ de Nantes Yann HARDIVILLIER, Ma¾re de conf¶rences, Universit¶ du Maine

Vincent LEIGNEL, Ma¾re de conf¶rences-HDR, Universit¶ du Maine

Co-encadrement de Th· se: Yann HARDIVILLIER, Ma‰re de conf¶rences, Universit¶ du Maine

Jacques-D¶ric ROUAULT, Charg¶ de recherche CNRS, EGCE Gif-sur-Yvette

# Remerciements

Cette thèse de doctorat a été financée par le ministère de l'éducation supérieure et de la recherche et a été effectuée dans le laboratoire Mer-Molécules-Santé de l'Université du Maine.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Vincent Leignel, maître de conférences-HDR de l'Université du Maine, et mes co-encadrants Yann Hardivillier, maître de conférences de l'Université du Maine, et Jacques-Deric Rouault, chargé de recherche CNRS de l'EGCE de Gif-sur-Yvette, de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de recherche et de m'avoir accompagnée tout au long de cette thèse de doctorat. Leur soutien, leur écoute et leurs conseils ont rendu ce travail possible, et m'ont permis de développer mon esprit critique et mes compétences, aussi bien en recherche qu'en enseignement. Je les remercie également pour ces échanges, agréables et quotidiens, qui m'ont permis de prendre le recul nécessaire au cours de ces travaux, ainsi que pour leur patience et leur temps consacré à relire et corriger mes productions scientifiques.

Merci à messieurs Patrick Cormier, professeur à la Station Biologique de Roscoff (UPMC), et Alain Van Wormhoudt, directeur de recherche CNRS et membre honoraire du Muséum National d'Histoire Naturelle, d'avoir accepté le rôle de rapporteur et d'avoir consacré une partie de leur temps à examiner mon manuscrit. Je remercie les membres du jury Benoit Chénais, professeur à l'Université du Maine, Myriam Harry, professeur à l'Université Paris Sud, Jean-Yves Toullec, maître de conférences-HDR à la Station Biologique de Roscoff et Richard Cosson, chargé de recherche CNRS à l'Université de Nantes, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de doctorat.

Je remercie également les membres de mon Comité de Suivi de Thèse, Myriam Harry et Marcel Koken, pour avoir suivi mes travaux avec assiduité et m'avoir apporté leurs regards extérieurs et leurs conseils tout au long de ce travail de doctorat. Je remercie particulièrement Marcel Koken pour son aide précieuse pour la production de protéines recombinantes et pour les agréables moments passés au laboratoire, ainsi que pour les corrections pertinentes qu'il a su apporter à mes productions scientifiques.

Un grand merci à Richard Cosson, Yann Hardivillier et surtout à François Lallier de m'avoir fait l'honneur de pouvoir participer à cette aventure exceptionnelle que fut l'expédition océanographique BioBaz. Merci à tout l'équipage scientifique et technique du « Pourquoi pas ? » pour leur convivialité et pour ces moments inoubliables.

Je souhaite aussi remercier les membres du laboratoire MMS, qui m'ont permis de bénéficier d'une mission complémentaire d'enseignement. Merci à Nathalie Casse, Benoit Chénais, Yann Hardivillier, Annick Manceau et Alain Rojo de la Paz, de m'avoir fait confiance pour assurer une partie de leurs cours, travaux dirigés et travaux pratiques, à l'UFR Sciences et Techniques de l'Université du Maine. Merci également à Sophie Hiard, Brigitte Moreau et Marie Zanella pour leurs conseils techniques avisés et leur bonne humeur au quotidien.

Merci à mes collègues et compagnons de galère Charlotte, Chiraz, Dorothée, Fiddy, Hélène, Rahma, Romain, Sahar et Svenja, pour nos conversations, autour d'un café ou d'un ordinateur, pour leur écoute, leurs conseils, leur soutien et cette merveilleuse ambiance de travail.

Enfin, un grand merci à mes proches Côme, Grzegorz, Noche et Elsa, à mes parents et à ma mamie qui ont vécu cette thèse avec moi, et sans le soutien de qui je n'aurais pu arriver jusque-là.

# TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABREVIATIONS	XI
1 INTRODUCTION GENERALE	55
1.1 Présentation des Heat Shock Proteins ou HSPs	3
1.1.1 Historique des découvertes et évolution des connaissances	
1.1.2 Classification, structures et fonctions principales des HSPs	
1.1.2.1 Les small HSPs	4
1.1.2.2 Les HSP40	5
1.1.2.3 Les HSP60	6
1.1.2.4 Les HSP70	7
1.1.2.5 Les HSP90	10
1.1.2.6 Les HSP100	11
1.1.3 Les organismes, leur environnement et les HSPs	13
1.2 Particularités des HSP70	15
1.2.1 Facteurs d'induction des HSP70	
1.2.1.1 Fluctuations naturelles de l'environnement	16
1.2.1.2 Impacts des activités anthropiques	19
1.2.1.3 Influence des conditions physiologiques	22
1.2.2 Intérêts des HSP70 en biologie et en médecine	
1.2.2.1 Utilisation des HSP70 comme biomarqueur de stress global	
1.2.2.2 Applications potentielles des HSP70 en médecine	26
1.3 Conservation et diversité des HSP70	27
1.3.1 La famille des HSP70s : Spécificités et rôles	27
1.3.2 Diversité des HSP70 cytosoliques	
1.3.2.1 HSP70 et HSC70	
1.3.2.2 Etudes sur les espèces modèles	30
1.4 Objectifs de la thèse	35
2 CONSTRUCTION DU JEU DE DONNEES	39
2.1 Caractérisation par biologie moléculaire de HSP70 chez les crustacés	41
2.1.1 Analyse préliminaire et définitions des amorces	
2.1.2 Matériel biologique	42
2.1.3 Démarche de biologie moléculaire	
2.1.3.1 Protocoles d'extraction des acides nucléiques	12

## TABLE DES MATIERES

2.1.3.2 Protocoles d'amplifications et de clonages des séquences nucléiques	44
2.1.4 Analyses et bilan des séquences obtenues <i>de novo</i>	46
2.2 Recherche des HSP70 d'arthropodes dans GenBank	47
2.2.1 Recherches <i>via</i> Blast dans les génomes et transcriptomes séquencés	
2.2.1 Recherches <i>via</i> blast dans les genomes et transcriptomes sequences	
2.2.3 Finalisation du jeu de données	
2.2.3 I mansation du jeu de données	<del>प</del> ्र
2.3 Mise en forme et analyses du jeu de données	
2.3.1 Codification des séquences obtenues	
2.3.2 Détection des séquences chimériques	
2.3.3 Discussion et conclusion	52
3 CLASSIFICATION ET RELATIONS DE PARENTE DES HS	P70
YTOSOLIQUES	55
3.1 Classification automatique des séquences nucléotidiques	
3.1.1 La méthode agrégative de classification automatique « Les Rosaces »	
3.1.2 Résultats	58
3.2 Relations de parenté des HSP70 cytosoliques	60
3.2.1 Démarches d'analyses phylogénétiques	
3.2.2 Résultats.	
3.2.2.1 Liens de parenté des HSP70 cytosoliques dans le phylum Arthropoda	
3.2.2.2 Diversité des HSP70 cytosoliques dans la classe des Malacostraca	64
3.2.2.3 Diversité des HSP70 cytosoliques chez les Chelicerata et les Hexapoda	
3.3 Comparaisons structurales entre les différentes sous familles	70
3.3.1 Structures géniques des HSP70 identifiées	
3.3.1.1 Comparaison des longueurs des séquences complètes	
3.3.1.2 Présence et localisation des introns	
3.3.1.3 Comparaison des séquences régulatrices	
3.3.2 Structure protéique des HSP70 identifiées	
3.3.2.1 Comparaison des structures primaires	
3.3.2.2 Comparaison des structures secondaires et tertiaires	
3.4 Discussion et conclusions	83
4 NIVEAUX D'EXPRESSION DES HSP70 CYTOSOLIQUES	85
4 INVENTION DEM RESIDION DES 1151 /V C1 TOSOEIQUES	05
4.1 Expériences de chocs thermiques	
4.1.1 Protocoles d'expérimentation animale	
4.1.2 Protocole de quantification des transcrits	88
4.2 Revue : Approche comparative de l'expression des HSP70	88
4.2.1 Etudes d'expression en réponse aux stress thermiques chez les malacostracés	
4.2.2 Extensions de l'étude aux HSP70 d'hexapodes et de chélicérates	
4.3 Discussion et conclusion	91

5	PRODUCTION PROTEIQUE DE HSP70 CYTOSOLIQUES	93
5.	Matériel et méthode : Protocole de vectorisation et de production protéique  1.1 Protocole de vectorisation	95
5.2	Résultats	98
5.3	Discussion et conclusion	. 101
6	DISCUSSION GENERALE	103
7	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	109
8	ANNEXES	115
9	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	179

# TABLE DES FIGURES

Figure 1.1 : Structure de la HSP27	5
Figure 1.2 : Structures des 3 types de HSP40.	
FIGURE 1.3 : STRUCTURE D'UNE HSP60 ET DU COMPLEXE CHAPERON HSP60-HSP10	7
Figure 1.4 : Structure et conformations de la HSP70.	
FIGURE 1.5 : CYCLE DES INTERACTIONS DE LA HSP70 AVEC LES CO-CHAPERONNES DE TYPES NEF ET J	
Figure 1.6 : Structure du dimere de HSP90 dans ces differentes conformations	
FIGURE 1.7 : CYCLE DES INTERACTIONS DU DIMERE DE HSP90 AVEC SES CO-CHAPERONNE	11
Figure 1.8 : Organisation des domaines pour les differentes sous familles de HSP100	11
Figure 1.9 : Structures des HSP100 de classes 1 et 2 et de leurs domaines AAA+	12
FIGURE 1.10 : FONCTIONNEMENT DE LA HSP100 EN COLLABORATION AVEC LE COMPLEXE HSP40/ HSP70	12
Figure 1.11 : Profils d'expressions des HSP70 typiquement rencontres chez des especes	12
THERMOSENSIBLES ET THERMOTOLERANTES	1./
FIGURE 1.12 : ALIGNEMENT DES EXTREMITES CARBOXY-TERMINALES POUR LES DNAK ET LES HSP70	17
EUCARYOTES.	28
Figure 1.13 : Niveaux d'expression pour differentes formes de HSP70 cytosoliques humain	
I IGORE 1.13 . 141VEAGA D EXTRESSION FOOR DITTERENTES FORWES DE 1101 /0 CT 1050ELQUES HOMAIN	
Figure 1.14 : Arbre phylogenetique des HSP70-cytosoliques chez les poissons teleosteens	
Figure 1.15 : Arbre phylogenetique representant les relations de parente entre des espec	
REPRESENTATIVES DU PHYLUM ARTHROPODA.	
Figure 1.16 : Relations de parente des differents taxa appartenant a l'ordre Decapoda	
(Malacostraca).	36
FIGURE 1.17 : SCHEMA DES OBJECTIFS INITIALEMENT PREVUS POUR LES TRAVAUX DE RECHERCHE ET	
QUESTIONNEMENTS ASSOCIES.	37
Figure 2.1 : Localisation des amorces sur la sequence codante de la HSP70 cytosolique	41
Figure $2.2$ : Profils electrophoretiques d'ARN totaux et d'ADNg degrades ou integres	44
Figure 2.3 : Principe de l'optimisation des volumes fonctionnels par des amplifications	
D'UBIQUITINE.	45
Figure $2.4$ : Schema general de la demarche de caracterisation des fragments de ${\sf HSP70}$	
Figure 2.5 : Localisation et sequences des motifs signature de la HSP70 cytosolique	46
FIGURE 2.6 : SCHEMA DU POSITIONNEMENT DES SONDES SPECIFIQUES DES SEQUENCES CODANTS LES	
HSP70 CYTOSOLIQUES.	
FIGURE 2.7: STRUCTURE DU FORMAT SUPERFASTA ET CODAGE DES SEQUENCES UTILISEES	
FIGURE 2.8 : ALIGNEMENT D'UNE CHIMERE AVEC DEUX AUTRES SEQUENCES DE HSP70	
FIGURE 2.9 : FORMATION DE SEQUENCES CHIMERIQUES PENDANT LES PREMIERS CYCLES DE PCR	
FIGURE 3.1 : PROCESSUS DE VALIDATION DES GROUPES AU COURS DE LA CLASSIFICATION AGREGATIVE	
Figure 3.2 : Resultats de classification des sequences nucleiques de HSP70 d'arthropode:	
FIGURE 3.3: ARBRE PHYLOGENETIQUE DES HSP70 CYTOSOLIQUES D'ARTHROPODA.	
FIGURE 3.4: ARBRE PHYLOGENETIQUE DES HSP70 CYTOSOLIQUES DE MALACOSTRACA	
FIGURE 3.5: ARBRE PHYLOGENETIQUE DES HSP70 CYTOSOLIQUES DE CHELICERATA.	
FIGURE 3.6 : Arbre phylogenetique des HSP70 cytosoliques d'Hexapoda	09
CYTOSOLIQUES	71
Figure 3.8 : Schema des regions regulatrices pour les differents genes de HSP70 de	12
DROSOPHILA MELANOGASTER	74
~ 1.0001 IIIL I IIILI II 1001 0 I LIX	/ 1

## TABLE DES FIGURES

Figure 3.9 : Schema des structures des regions regulatrices pour les differents genes de
HSP70 DECRITS CHEZ LES CHELICERATES ET HEXAPODES
Figure 3.10: Localisation des motifs discriminants pour les differents groupes de HSP7079
Figure $3.11$ : Alignement de deux sequences de longueurs extremes, la plus courte et la plus
LONGUE, PARMI LES HSP70 DU JEU DE DONNEES80
FIGURE 3.12: PROFILS D'HYDROPHOBICITE (A) ET ALIGNEMENT (B) DES FORMES HSP70 A1, A2, B1 ET B2
D'ASTACUS ASTACUS
FIGURE 3.13: MODELISATION DE LA STRUCTURE 3-D DE LA HSP70 A1 D'ASTACUS ASTACUS (D1977A6).
82
Figure 4.1 : Phylogenie des HSP70 associees a leur capacite d'induction lors de stress
THERMIQUES (MALACOSTRACA)
FIGURE 5.1 : STRUCTURE DU VECTEUR PRB493 ET DEMARCHE DE VECTORISATION
FIGURE 5.2 : PRINCIPE DE L'INDUCTION DU PRB493 A L'IPTG
Figure 5.3: Electrophorese des doubles digestions de pRB493 pour la selection des clones de problemation des clones de problemation de
E. COLI BL21 (DE3)
FIGURE 5.4: VERIFICATION PREALABLE DES PROFILS PROTEIQUES NON PURIFIES POUR CHAQUE
CONSTRUCTION AVANT ET APRES INDUCTION, PAR SDS-PAGE
$Figure \ 5.5: Analyse \ SDS-PAGE \ des \ profils \ proteiques \ non \ purifies \ pour \ chaque \ echantillon,$
AVANT ET APRES INDUCTION
$Figure \ 5.6: Analyse \ SDS-PAGE \ des \ extraits \ purifies \ de \ proteines \ produites \ pour \ chaque \ type$
DE CLONE. 101

# LISTE DES TABLEAUX

17
18
ES19
20
21
23
26
SP7027
NNEES
48
60
OMIQUE
71
HSP70
78
CACUS ET
99
<b>S</b>

### LISTE DES ABREVIATIONS

AAA+: ATPases Associated with various cellular Activities

ADN: Acide désoxyribonucléique ADNs: ADN complémentaire ARN: Acide ribonucléique

ADP / ATP : Adénosine diphosphate / adénosine triphosphate

BAG: Bcl-2 associated athanogene

BET: Bromure d'éthidium

CHIP: Carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein

CTD : *C-terminal domain*DO : Densité optique
DTT : Dithiothreitol

ETM : Elément trace métallique Hip : *HSC70-interacting protein* 

Hop: Hsp70-Hsp90 Organizing Protein

HSC70: *Heat shock cognate-70 kDa* (protéine) hsc70: *Heat shock cognate-70 kDa* (gène)

**HSE**: Heat shock element

HSF ou HSTF: *Heat shock transcription factor* HSP70: *Heat shock protein-70 kDa* (protéine) hsp70: *Heat shock protein-70 kDa* (gène)

HSR : *Heat shock response* IB : Inférence bayésienne

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

JDP: *J-domain protein*MCS: *Multiple cloning site*MD: *Middle Domain* 

Milieu LB: milieu Luria-Bertani Milieu TB: milieu Terrific Broth

ML: Maximum likelihood

MP: Maximum de parcimonie NBD: Nucleotide binding domain NEF: Nucleotide Exchange Factor NFκB: Nuclear factor kappa B

NJ: Neighbor joining ORF: Open reading frame

PCR: Polymerase chain reaction

RACE-PCR: Rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction

SBD : Substrate binding domain

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

UPGM-VM: Unweighted pair group method with variation metric UPGMA: Unweighted pair group method with arithmetic means

X-gal: Bromo-5-chloro-4-indolyl-3-β-D-galactopyranoside

#### 1.1 Presentation des *Heat Shock Proteins* ou HSPs

#### 1.1.1 Historique des découvertes et évolution des connaissances

La découverte des *Heat Shock Proteins* (HSPs) a débuté par l'observation de puffs sur des loci spécifiques du chromosome 2L de glandes salivaires de *Drosophila busckii*, après exposition à un choc thermique de 30 minutes à 30°C (+5°C) (Ritossa, 1962). Ces puffs sont caractéristiques d'un déroulement de l'ADN, permettant une transcription intense de groupes de gènes associée à une réponse au stress thermique (*Heat Shock Response* ou HSR). Quelques années plus tard, d'autres puffs sont observés après des chocs thermiques sur plusieurs chromosomes chez *Drosophila melanogaster* et *Drosophila simulans*. L'amplitude et la durée de ces structures induites se révèleront dépendantes de l'intensité du traitement thermique (Ashburner, 1970). Des profils particuliers d'ARN messagers et un ensemble de protéines de tailles différentes, induits par la chaleur chez *Drosophila melanogaster* seront mis en évidence peu de temps après (Tissiéres et al., 1974).

Ces découvertes inspirent alors de nombreux travaux de recherche. Les premières séquences nucléiques isolées codent 7 à 9 polypeptides (en fonction des espèces de Drosophile) présentant des homologies de séquences : les Heat Shock Proteins ou HSPs. Elles seront classées et nommées en fonction de leurs poids moléculaires: 80, 72, 70, 68, 28, 26, 23 et 22 kDa (small HSP) (Livak et al., 1978). Les transcrits correspondants aux 70 kDa Heat shock Protein (HSP70) étant les plus abondants, ils seront les premiers à être caractérisés (Artavanis-Tsakonas et al., 1979; Schedl et al., 1978). La synthèse de ces protéines particulières en réponse aux chocs thermiques (Heat Shock Response, ou HSR) est observée dans de nombreux organismes : bactéries, protistes, champignons, plantes, insectes et mammifères (Schlesinger et al., 1982a, 1982b). L'universalité de ces réponses est confirmée par d'importantes homologies de séquences entre les gènes de hsp70 de drosophiles et de DnaK bactériennes caractérisées chez Escherichia coli (Bardwell and Craig, 1984). Les HSP70 et DnaK possèdent un domaine capable de fixer et d'hydrolyser l'ATP (Zylicz et al., 1983). Cette activité du domaine ATPase permet des cycles de liaison/libération de protéines substrats (Lewis and Pelham, 1985). Les premières recherches sur les fonctions des HSP70s montrent leur capacité à dissocier des agrégats de protéines dénaturées et à replier correctement ces dernières pour restaurer leur fonctionnalité. De plus, elles participent au repliement de protéines néosynthétisées et à leur association en complexes (Pelham, 1986). Le terme de chaperonne moléculaire est alors proposé pour les classes de protéines dont la fonction est d'assurer le repliement et l'assemblage de chaines polypeptidiques (Ellis, 1987, 1990). Les Heat Shock Proteins seront ensuite rapidement considérées comme des représentants majeurs de ces chaperonnes moléculaires (Ellis and van der Vies, 1991).

Les HSPs sont localisées dans différents compartiments cellulaires et migrent vers des destinations particulières en réponse aux chocs thermiques (cytoplasme, membrane, mitochondrie et noyau). Un signal d'adressage cellulaire est donc rapidement soupçonné (Arrigo et al., 1980; Velazquez et al., 1980), et un premier type de motif d'adressage nucléaire sera mis en évidence quelques années plus tard (Knowlton and Salfity, 1996). La translocation des HSPs dans la cellule lors de stress thermiques ou lors de stress anoxiques révèle un rôle de protection face à divers stress environnementaux (Velazquez and Lindquist, 1984). Un lien direct est ensuite établi entre les HSPs et la thermotolérance des organismes, puis plus largement dans l'adaptation générale à l'environnement (Alahiotis and Stephanou, 1982; Craig and Jacobsen, 1984; Craig and Schlesinger, 1985; Lindquist, 1986). Les HSPs sont induites par plusieurs facteurs stressants chimiques et physiologiques, susceptibles de causer des dommages cellulaires directs ou indirects (Pelham, 1985). Cependant, la régulation de la synthèse de HSP est également observée lors du cycle cellulaire, en condition non stressante. Par exemple, la HSP70

est induite lors de la phase de synthèse d'ADN précédant la division cellulaire (Milarski and Morimoto, 1986).

L'induction des différentes HSPs est variable en fonction des conditions de stress thermique, impliquant des facteurs de régulation transcriptionnels (Lindquist, 1980). La caractérisation des régions promotrices de plusieurs gènes de hsp70 chez *Drosophila melanogaster* révèle la présence de motifs caractéristiques (Ingolia et al., 1980; Karch et al., 1981). Ces motifs homologues répétés sont directement impliqués dans l'induction thermique de plusieurs gènes de hsp70 (Lis et al., 1981; Mirault et al., 1982). Ces domaines promoteurs fonctionnels sont alors nommés *Heat Shock Element* (HSE) (Pelham, 1982). Il est établi par la suite que ces HSE interagissent avec des facteurs de transcription spécifiques, les *Heat Shock Transcription Factor* (HSTF ou HSF) (Pelham, 1985).

A la fin des années 80, de nombreuses HSPs différentes sont identifiées. On les distingue en fonction de leur poids moléculaire, pour définir les grandes classes de HSPs utilisées de nos jours : HSP110 kDa, HSP90, HSP70, HSP60, small HSP (entre 15 et 30 kDa) (Burdon, 1986) et HSP40 (Liberek et al., 1988). A partir des années 90, le séquençage de nombreux de gènes de HSPs rend compte de leur grande diversité au sein de chaque sous famille. Leurs fonctions et leurs modes de régulation se précisent, ainsi que le véritable réseau d'interactions des HSPs entre elles et avec d'autres co-chaperonnes. Dans les années 2000, les HSPs sont particulièrement étudiées chez des organismes exposés aux polluants et deviennent des outils importants en écotoxicologie. On envisage alors de les utiliser comme des indicateurs de l'adaptation des organismes aux variations de l'environnement (Evgen'ev et al., 2014). Ces dix dernières années, l'intérêt des chercheurs pour les HSPs s'est renforcé en écologie pour leur usage dans l'évaluation de l'impact du réchauffement climatique (Colson-Proch et al., 2010; Tomanek, 2010). Récemment, les recherches se sont également étendues au domaine de la médecine, où les scientifiques voient dans les HSPs de nouvelles cibles pour les traitements de demain contre de nombreuses maladies neurodégénératives et cancers (cf. partie 1.2.2.2).

#### 1.1.2 Classification, structures et fonctions principales des HSPs

Les HSPs sont regroupées dans une superfamille de chaperonnes moléculaires pouvant interagir entre elles par oligomérisation. Elles possèdent des homologies de domaine et sont classées selon leur poids moléculaire : les small HSP, les HSP40, les HSP60, les HSP70, les HSP90 et les HSP110 (Fink, 1999; Kiang and Tsokos, 1998). Selon les types, elles sont retrouvées dans le cytosol et divers organites (chloroplastes, mitochondries et réticulum endoplasmique) et peuvent même être exportées dans le milieu extracellulaire (Calderwood et al., 2007; Fink, 1999).

#### 1.1.2.1 Les small HSPs

Les *small* HSP (sHSP ou HSPB chez l'humain) sont les plus petites molécules de la superfamille des HSPs. Leur poids moléculaire est compris entre 10 et 30 kDa, l'élément le plus étudié actuellement étant la HSP27 (**Figure 1.1**). Elles partagent un domaine C-terminal appelé domaine α-crystallin de 80 à 90 résidus aminés formant un feuillet β, impliqué dans l'assemblage des sHSP en dimères et dans les interactions avec leurs substrats (Van Montfort et al., 2001). Elles possèdent également plusieurs sites phosphorylables, un domaine N-terminal et un motif conservé de 4 acides aminés (WDPF) permettant leur assemblage en multimères et la stabilisation des complexes formés (Lambert et al., 1999). On distingue 5 principales fonctions attribuées aux sHSP (Garrido et al., 2012) : (1) Les HSP18 préviennent l'agrégation de protéines dénaturées en formant des complexes dodécamériques (voies indépendantes de l'ATP) et peuvent agir en coopération avec la HSP70 (voie ATP-dépendante) (Lee et al., 1997) ; (2) La HSPB8 (ou HSP22) peut s'associer avec la co-chaperonne BAG-3 (*Bcl-2 associated athanogene*)

pour stimuler l'autophagie de protéines dénaturées (Carra et al., 2010). La HSP27 est également impliquée dans l'adressage de protéines dénaturées, par ubiquitination vers le protéasome (Parcellier et al., 2003). De manière plus générale, certaines sHSP participent à l'évaluation de l'intégrité protéique (*Protein Quality Control* ou PQC) et influencent ainsi l'activation des voies cellulaires de dégradation ou de réparation des protéines malformées (Lanneau et al., 2010; Morrow and Tanguay, 2015); (3) Les sHSP phosphorylées s'associent avec les 3 principaux composants du cytosquelette (microtubules, filaments intermédiaires et microfilaments) pour réguler et assister leur assemblage (Bluhm et al., 1998; Launay et al., 2006; Nicholl and Quinlan, 1994; Tessier et al., 2003); (4) Les sHSP sont impliquées dans les réponses des cellules aux stress oxydants, en agissant par exemple sur la régulation enzymatique de la Glucose-6-Phosphate DésHydrogenase (G6PDH) et la Glutathion Réductase (GR) (Préville et al., 1999); enfin (5) les sHSP préviennent la mort cellulaire programmée en inhibant la maturation des caspases, acteurs majeurs de l'apoptose (Bruey et al., 2000; Kamradt et al., 2001; Lanneau et al., 2008).

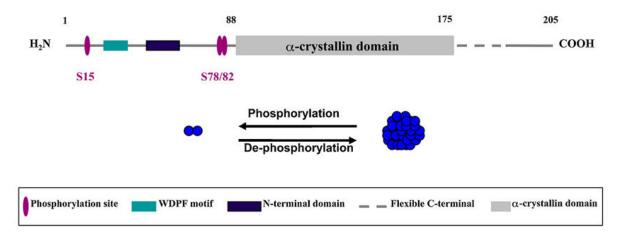


Figure 1.1: Structure de la HSP27. Le domaine N-terminal, le motif WDPF et les différents sites de phosphorylation sont responsables de l'assemblage multimérique. Le domaine central  $\alpha$ -crystallin, bien conservé dans la famille des sHSP, est responsable de l'activité chaperonne et de l'assemblage des sHSP en dimères. (D'après Garrido et al., 2012)

#### 1.1.2.2 Les HSP40

Egalement appelées DnaJ chez les procaryotes, elles sont caractérisées par la présence d'un « domaine J » très conservé, d'environ 70 résidus aminés, qui leur permet d'interagir avec les HSP70 et HSP90. On distingue 3 grands types de HSP40, classés en fonction de leurs particularités structurales, et retrouvés dans la plupart des organismes procaryotes et dans tous les organismes eucaryotes (Cheetham and Caplan, 1998). Bien que cette famille regroupe des molécules à la nomenclature complexe, dépendante de l'espèce et du type de HSP40 étudié, on distingue des caractéristiques structurales communes pour les espèces modèles Escherichia coli, Homo sapiens et Saccharomyces cerevisiae définissant ainsi ces 3 types de HSP40 (Figure 1.2). Les types I et II possèdent un « domaine J » en position N-terminale, suivi d'une zone riche en glycines et phénylalanines et d'un domaine carboxyl-terminal. De plus, les HSP40 de type I possèdent une région en doigt de zinc riche en cystéines, spécialisée dans la dissociation de certains agrégats protéiques. Cette région est absente dans le type II, et souvent remplacée par une zone riche en glycines et méthionines. Pour leur part, les HSP40 de type III partagent uniquement un domaine J conservé, et ont des zones de liaisons peptidiques variables et spécifiques de différents substrats (Cheetham and Caplan, 1998; Fan et al., 2003; Tamadaddi and Sahi, 2016). Le domaine J permet la fixation des HSP40 aux HSP70, les autres régions permettent la liaison aux peptides substrats et la régulation de leur activité par des co-chaperonnes. Ces interactions

permettent un transfert facilité du peptide sur la HSP70, stimulent l'activité ATPase de cette dernière, et permettent un repliement coordonné du substrat par les deux chaperonnes. Les HSP40 de type I et II fonctionnent indépendamment de la présence d'ATP. Elles se fixent aux peptides dénaturés pour éviter leur agrégation lors d'un stress cellulaire. La HSP40 de type I peut fonctionner indépendamment de la HSP70, contrairement aux HSP40 de type II qui nécessite une liaison aux HSP70 pour dissocier les agrégats. Les HSP40 de type III sont moins étudiées, mais semblent intervenir avec des substrats spécifiques intéragissant avec leur domaine de liaison peptidique (Fan et al., 2003). Plus généralement, les HSP40 interviennent dans le repliement des structures tertiaires et l'assemblage des structures quaternaires des peptides néosynthétisés. Elles jouent également un rôle dans la translocation et l'endocytose de diverses protéines, et assistent la HSP70 dans l'ubiquitination et la dégradation protéasomique des protéines dénaturées (Qiu et al., 2006; Tamadaddi and Sahi, 2016).

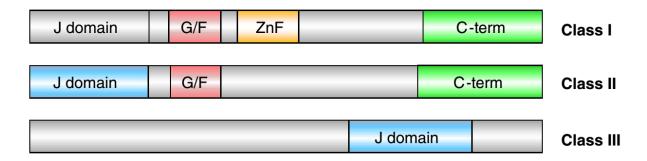


Figure 1.2: Structures des 3 types de HSP40. Le domaine J permet les interactions avec la HSP70, alors que les autres régions conservées (G/F: zone riche en glycines et phénylalanines; ZnF: doigts de Zinc; C-term: domaine Carboxyl-terminal) sont responsables de la liaison aux protéines substrats de chaque type de HSP40. Ces structures sont conservées chez E. coli, S. cerevisiae et H. sapiens. (D'après Tamadaddi and Sahi, 2016)

#### 1.1.2.3 Les HSP60

Longtemps considérées comme exclusivement localisées dans la mitochondrie, les HSP60 (chaperonine ou GroEL chez les procaryotes) peuvent également être présentes dans le cytosol, proche des ribosomes ou de la membrane plasmique (Boshoff, 2015). Les HSP60 constituent des sous-unités d'un complexe chaperon formé par l'association d'un ou deux anneaux heptamériques de HSP60. Cette association en complexe est contrôlée par l'hétérodimère HSP70/HSP10. La HSP10 (ou GroES chez les procaryotes) viendra ensuite fermer le complexe chaperon fonctionnel (Figure 1.3) (Böttinger et al., 2015; Saibil, 2013). Les complexes de HSP60 assurent des rôles classiques de chaperonnes en présence d'ATP, comme le repliement de protéines néosynthétisées et/ou dénaturées lors de stress cellulaires (Levy-Rimler et al., 2001). Les HSP60 jouent également un rôle dans les voies de signalisation immunitaire, en stimulant la production de cytokines et autres molécules pro-inflammatoires (Boshoff, 2015; Habich et al., 2003). Enfin, elles interviennent de façon complexe dans le signal de mort cellulaire programmée. En effet, elles participent au signal anti-apoptotique par séquestration d'acteurs majeurs de l'apoptose tels que la pro-caspase3 (Campanella et al., 2008), ou les inducteurs Bax (Gupta and Knowlton, 2005) et p53 (Ghosh et al., 2008). A l'opposé, la libération de ces mêmes inducteurs apoptotiques constitue un signal en faveur de l'apoptose (Gupta and Knowlton, 2005). Les HSP60 participent enfin au signal pro-apoptotique comme accélérateur de la maturation des caspases (Xanthoudakis et al., 1999).

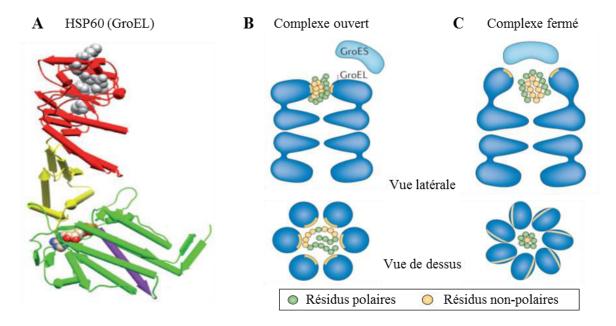


Figure 1.3: Structure d'une HSP60 et du complexe chaperon HSP60-HSP10. Sous-unité HSP60, dans sa conformation liée à la HSP10 (A). Complexe HSP60-HSP10 (ou GroEL-GroES) sous forme ouverte (B) et fermée (C). Le complexe est constitué d'un ou de deux heptamères de HSP60 en anneaux, surmonté par la HSP10. (adapté d'après Saibil, 2013)

#### 1.1.2.4 Les HSP70

Les HSP70 (ou DnaK chez les procaryotes) constituent une famille de molécules de 68 et 72 kDa et ont été les premières HSPs découvertes, en raison de leur expression abondante lors de stress cellulaires. Les HSP70 sont des membres majeurs de la superfamille des HSPs, ubiquistes et de loin les plus conservées (Boorstein et al., 1994). Leur structure est composée d'un domaine ATPase de 44 kDa (NBD pour *Nucleotide Binding Domain*) en région N-terminale, et d'un domaine de fixation des substrats d'environ 18 kDa (SBD ou *Substrate Binding Domain*) séparés par une jonction inter-domaine (*Interdomain linker*) riche en leucine et particulièrement conservée. L'extrémité carboxyle plus variable d'approximativement 10 kDa (CTD ou *C-terminal Domain*) ferme le complexe SBD-substrat et permet la fixation de nombreuses co-chaperonnes (**Figure 1.4**) (Demand et al., 1998; Kiang and Tsokos, 1998).

Le fonctionnement des HSP70 peut être résumé par un cycle en 3 étapes, régit par les communications allostériques entre les différents domaines. (1) La HSP70 fixe l'ATP et prend une conformation ouverte à la liaison peu spécifique de nombreux substrats. (2) L'hydrolyse de l'ATP en ADP augmente l'affinité du SBD au substrat et permet une fixation renforcée de ce dernier, qui sera alors replié dans sa conformation native. (3) La HSP70 libère l'ADP et fixe un nouvel ATP, ce qui diminue son affinité pour le substrat et permet la séparation du complexe HSP70/ligand (**Figure 1.4**) (Qi et al., 2013; Zuiderweg et al., 2012). La jonction inter-domaines (*interdomain linker*), particulièrement conservée, est indipensable aux changements de conformation de la HSP70 (liée à l'ATP ou à l'ADP) (Alderson et al., 2014; Vogel et al., 2006).

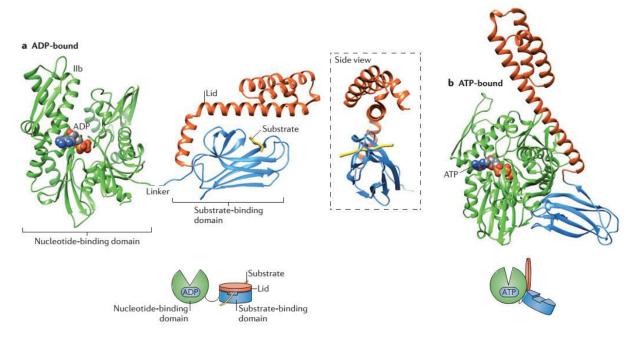


Figure 1.4: Structure et conformations de la HSP70. Dans sa conformation liée à l'ADP, le ligand est fixé de façon stable à la HSP70 (a). Dans le cas où la HSP70 est liée à l'ATP, cela permet son ouverture pour la fixation ou libération du substrat (b). (D'après Saibil, 2013)

L'efficacité de la HSP70 est régulée par des co-chaperonnes (Figure 1.5) impliquées dans la fixation/libération des substrats, dans l'activité ATPase du NBD ou dans la fixation d'un nouvel ATP sur la chaperonne (NEF ou Nucleotide Exchange Factor) (Mayer, 2010; Mayer and Bukau, 2005; Nollen and Morimoto, 2002). On distingue principalement les co-chaperonnes à « domaine J » (J-domain proteins ou JDP), la famille des protéines BAG (Bcl-2 associated athanogene) et les protéines Hip (HSC70-interacting protein), Hop (Hsp70-Hsp90 Organizing Protein) et CHIP (Carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein). Les JDP ont une fonction essentielle dans la fixation ATPase-dépendante du substrat au sein de la cavité du SBD de la HSP70; et ce, même si elles ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans la stabilité du complexe formé. La famille des protéines BAG est diversifiée, à l'image de leur « domaine BAG » hautement variable. La plupart des protéines BAG interagit directement avec les HSP70 : elles sont impliquées dans le ciblage de ses substrats, mais surtout dans la stimulation de la libération de l'ADP et donc du relargage du substrat. La co-chaperonne Hip, au contraire, stabilise le complexe HSP70-substrat et évite ainsi une libération prématurée de la protéine cible. Les protéines CHIP et Hop qui sont en compétition pour se fixer sur l'extrémité C-terminal de la HSP70, réguleraient l'activité ATPase du NBD (Mayer and Bukau, 2005). Les HSP70 interagissent également avec tous les autres membres de la superfamille des HSPs, pour les assister ou réguler leurs fonctions de chaperonnes (Böttinger et al., 2015; Garrido et al., 2012; Polier et al., 2008; Taipale et al., 2010), ou moduler leur affinité pour certains substrats (Couturier et al., 2009; Fan et al., 2003; Schuermann et al., 2008; Shomura et al., 2005). Elles peuvent également fonctionner seules, ou former des dimères pour assurer leurs multiples fonctions (Aprile et al., 2013; Sarbeng et al., 2015).

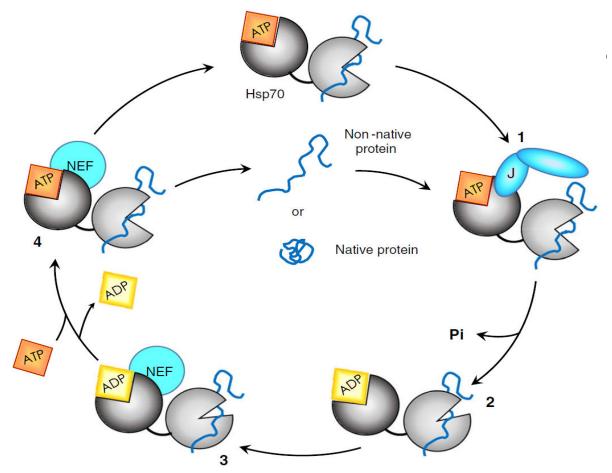


Figure 1.5: Cycle des intéractions de la HSP70 avec les co-chaperonnes de types NEF et JDP. Après liaison de la protéine-client (non-native) sur la HSP70, la co-chaperonne à domaine J (JDP) interagit avec le NBD pour stimuler l'hydrolyse de l'ATP (1). La libération de la JDP et du phosphate inorganique permet le changement de conformation de la HSP70 et la stabilisation du complexe lié au substrat (2). Le facteur d'échange de nucléotide (NEF) se fixe au NBD pour faciliter le remplacement de l'ADP par un nouvel ATP (3). La conformation de la HSP70 liée à l'ATP abaisse l'affinité de cette dernière pour son substrat et permet un relargage de ce dernier, quel que soit son état de repliement (4). (D'après Tamadaddi and Sahi, 2016)

Les HSP70 ont trois principales fonctions connexes: le repliement correct des protéines dénaturées dans leur état natif, la prévention de la formation des agrégats, ou leur dissolution pour le rétablissement de la conformation protéique correcte. Mais leurs fonctions s'étendent au bon repliement de protéines néosynthétisées, leur « contrôle qualité », leur translocation d'un compartiment cellulaire à l'autre et, le cas échéant, leur dégradation dans le protéasome. De plus, les HSP70 permettent l'activation de protéines régulatrices (récepteurs, kinases, facteurs de transcription) et interviennent ainsi dans des voies de signalisation cellulaires aussi nombreuses que diversifiées (spécialisation, division, apoptose/survie cellulaire) (Kiang and Tsokos, 1998; Mayer and Bukau, 2005). Enfin, les HSP70 sont également impliquées dans la réponse immunitaire avec la stimulation de la production de cytokines, de leucocytes et de la présentation d'antigènes (Millar et al., 2003; Multhoff, 2007), le développement et l'adaptation des organismes à leur environnement (Kiang and Tsokos, 1998; Mayer and Bukau, 2005).

#### 1.1.2.5 Les HSP90

Les HSP90 (HptG chez les procaryotes) regroupent des molécules dont le poids moléculaire varie entre 82 (*S. cerevisiae*) et 90 kDa (*H. sapiens*). Chez les eucaryotes, elles sont présentes dans le cytosol, le réticulum endoplasmique (sous le nom de Grp94 ou Grp96), dans la matrice mitochondriale (HSP75 ou TRAP1) et dans les chloroplastes. Les HSP90 partagent les mêmes caractéristiques structurales et fonctionnent sous forme de dimères. En région N-terminale, elles sont constituées d'un domaine ATPase conservé d'environ 25 kDa (*N-Terminal Domain* ou NTD), et d'une zone riche en acides aminés chargés, suivie d'un *Middle Domain* (MD) (environ 35 kDa) plus variables. Les HSP90 possèdent un dernier domaine à leur extrémité carboxyle (*C-Terminal Domain* ou CTD) nécessaire à leur dimérisation et terminée par le motif hautement conservé MEEVD (**Figure 1.6**) (Jackson, 2012; Young et al., 2001).

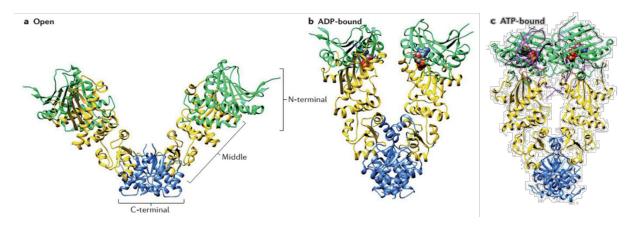


Figure 1.6: Structure du dimère de HSP90 dans ces différentes conformations. La dimérisation est dûe à l'interaction entre les domaines carboxy-terminaux (CTD) de chaque HSP90. Le dimère peut avoir 3 types de conformation: ouvert (a), partiellement fermé et lié à l'ADP (b) ou fermé et lié à l'ATP (c). (D'après Saibil, 2013)

Les HSP90 sont capables de se lier à une très large gamme de substrats protéiques, sans motif commun connu. Ces substrats partagent la particularité d'être instables ou de nécessiter l'assistance d'une chaperonne pour leur maturation, comme par exemple des kinases ou divers facteurs de transcription (Johnson, 2012; Karagöz and Rüdiger, 2015). Elles s'associent par leur domaine Nterminal et leur middle domain aux cyclines dépendantes des kinases (Cdk4) ou encore à la protéine suppresseur de tumeur p53, participant ainsi à la régulation du cycle cellulaire. Les HSP90 contrôlent également le niveau des protéines Tau, prévenant ainsi leur agrégation (ces derniers sont hautement impliqués dans la maladie d'Alzheimer). Elles sont également capables, comme d'autres types de HSPs, d'adresser des protéines à la voie de dégradation du protéasome par marquage à l'ubiquitine. En tant que chaperonnes, les HSP90 peuvent également replier les protéines néosynthétisées (Karagöz and Rüdiger, 2015). Elles permettent par exemple la maturation de nombreux récepteurs (ceux aux glucocorticoïdes et progestérone, aux *Tumor Necrosis Factor*, les *Toll-like receptor*...) (Johnson, 2012). Elles contribuent également à l'assemblage des ARN polymérases III, des kinétochores, télomérases, hélicases, protéosome 26S (Jackson, 2012; Johnson, 2012). Les mécanismes permettant l'interaction des HSP90 à une telle variété de substrats sont encore mal connus. Ils seraient probablement liés à l'intervention des HSP40 et HSP70, ainsi que d'un ensemble tout aussi diversifié de co-chaperonnes (**Figure 1.7**) (Taipale et al., 2010).

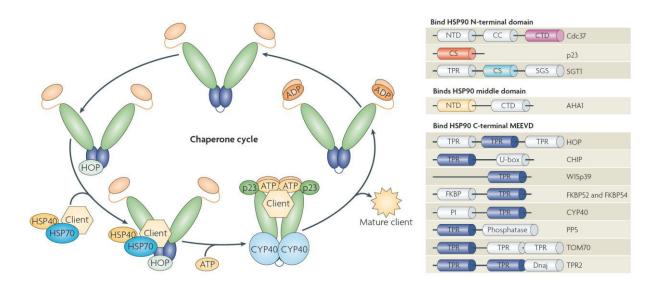


Figure 1.7 : Cycle des intéractions du dimère de HSP90 avec ses co-chaperonne. Ce cycle fait intervenir les HSP40, HSP70 et la HSP90, ainsi que de nombreuses co-chaperonnes indiquées à droite. Les domaines de liaisons de la HSP90 dépendent du type de co-chaperonne concernée. (D'après Taipale et al., 2010)

#### 1.1.2.6 Les HSP100

Les HSP100 (ou HSP110 ou Clp chez les procaryotes) regroupent plusieurs sous-familles de chaperonnes réparties en 2 grandes classes (1 et 2). Les HSP100 de classe 1 sont caractérisées par un domaine N-terminal et 2 domaines NBD conservés, ainsi qu'un *Middle domain* de taille variable. Les HSP 100 de classe 2 ne possèdent en revanche qu'un seul NBD, ainsi qu'un domaine N-terminal pour certaines d'entre elles (**Figure 1.8**). Les HSP100/Clp sont également incluses dans la superfamille des ATPases de type AAA+ (*ATPases Associated with various cellular Activities*). Les domaines AAA+ sont constitués d'environ 200 à 250 résidus aminés et sont assimilés aux *Nucleotide Binding Domains* (NBD) avec des motifs particuliers nommés *Walker* A et B (**Figure 1.9**).

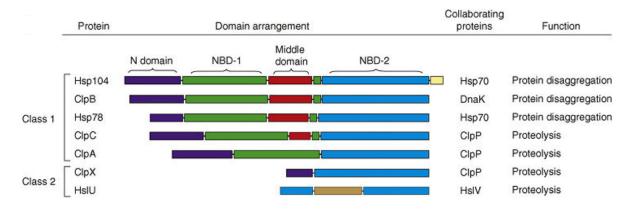


Figure 1.8: Organisation des domaines pour les différentes sous familles de HSP100. Les NBD-1 et NBD-2 sont très conservés chez les procaryotes et les eucaryotes. Le domaine N-terminal et le Middle domain sont beaucoup plus variables. Seule la HSP104 possède un domaine C-terminal. La HslU quant à elle, n'a de domaine N-terminal, mais un domaine I (jaune foncé). La droite du tableau indique les principales protéines collaboratrices et la principale fonction de chaque type de HSP100. (D'après Doyle and Wickner, 2009)

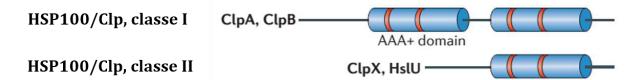


Figure 1.9: Structures des HSP100 de classes 1 et 2 et de leurs domaines AAA+. Chaque domaine AAA+ est similaire au NBD. Il est constitué d'environ 200 à 250 acides aminés et de motifs particuliers nommés Walker A et Walker B représentés en rouge. (D'après Saibil, 2013)

Les HSP100 agissent sous forme d'hexamères disposés en anneau, dont la fonction principale est la dissociation d'agrégats de peptides dénaturés et de prions. D'autres fonctions plus spécifiques, comme le repliement des peptides extraits des agrégats ou leur dégradation, dépendent du type de HSP100 concerné et des co-chaperonnes associées (Doyle and Wickner, 2009; Saibil, 2013). Par exemple, les HSP104/ClpB collaborent avec le couple HSP40/HSP70. Les peptides sont alors extraits un à un et conduits dans l'hexamère de HSP104/ClpB pour leur redonner leur conformation native en coopération avec la HSP70 (**Figure 1.10**) (Polier et al., 2008; Tyedmers et al., 2010). Les complexes de HSP100 peuvent également être associés avec des protéases et dégrader directement les peptides dénaturés extraits des agrégats (Doyle and Wickner, 2009). Les HSP100 ont également un rôle de co-chaperonne de type NEF (*Nucleotide Exchange Factor*) en facilitant l'échange ADP-ATP sur le NBD des HSP70. (Bracher and Verghese, 2015; Schuermann et al., 2008).

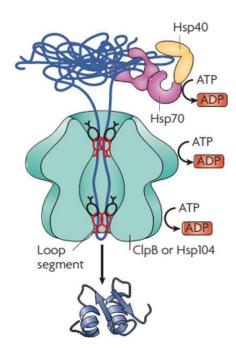


Figure 1.10: Fonctionnement de la HSP100 en collaboration avec le complexe HSP40/ HSP70. La dissociation des agrégats par le complexe peut être suivie par la restauration du repliement correct des peptides, nécessitant l'hydrolyse de plusieurs ATP en ADP. Si la HSP100 est associée à une protéase, les agrégats peuvent alors être dégradés à leur sortie du complexe. (Tyedmers et al., 2010)

#### 1.1.3 Les organismes, leur environnement et les HSPs

L'étude de l'adaptation des organismes à leur environnement permet une meilleure compréhension des mécanismes de colonisation, d'expansion, voire de déclin des espèces en fonction des conditions écologiques. Les réponses adaptatives peuvent être décelées à différents niveaux : comportementaux, physiologiques, cellulaires et moléculaires. Les avancées technologiques permettent maintenant d'appréhender les phénomènes adaptatifs à l'échelle moléculaire et de les intégrer dans un contexte plus global, physiologique voire écologique.

Globalement, les organismes répondent aux variations des paramètres écologiques par trois processus. Les premières réponses mises en jeu lors de fluctuations de ces paramètres difficilement supportables pour l'espèce portent sur des modifications comportementales d'évitement. Les animaux par exemple peuvent manifester un comportement de fuite ou d'enfouissement. Ces réponses précoces peuvent également s'observer à l'échelle moléculaire, par des mécanismes d'induction ponctuels de protéines de stress. Si les organismes restent dans ces conditions écologiques plus longuement, ils développent alors des réponses d'acclimatation, illustrées par des modifications physiologiques et morphologiques induites par des accentuations ou inhibitions plus larges d'expressions géniques. Enfin, si les conditions environnementales deviennent stables et permanentes sur le long terme, seuls les individus possédant des aptitudes à tolérer ces paramètres écologiques survivront et transmettront leurs gènes. On parle alors de processus adaptatif (par ancrage génique), pour signifier l'irréversibilité du phénomène.

La diversité des écosystèmes marins illustre particulièrement bien l'importance de ces phénomènes adaptatifs. En effet, bien qu'il constitue un ensemble connecté, l'environnement marin regroupe de nombreux écosystèmes (littoral, benthique, pélagique, hydrothermal, polaire, corallien, mangrove, etc) caractérisés par des facteurs environnementaux contrastés et plus ou moins variables, tels que la température, salinité, oxygènation, pression ou les rayonnements UV. Différents milieux terrestres sont également considérés comme particulièrement contraignants pour les organismes vivants, comme par exemple les environnements arides (chauds et secs) ou polaires. Les rôles assurés par les HSPs sont souvent montrés comme étant primordiaux dans les mécanismes d'acclimatation et d'adaptation à ces environnements dits « extrêmes » (Akbarzadeh and Leder, 2016; Evgen'ev et al., 2014; Feder and Krebs, 1997). Plus généralement, l'expression des HSP conditionne le succès des organismes à la colonisation pérenne de leur environnement (Feder et al., 2002; Feder and Hofmann, 1999).

Il est montré que les gènes de HSP sont présents en multiple copies, souvent organisées en regroupement (*cluster*), et issues de duplications liées à l'activité d'éléments transposables (Bettencourt and Feder, 2001). Des études comparatives entre différentes espèces de drosophiles ont montré une corrélation entre le nombre de copies de gène codant les HSP70 et la capacité d'adaptation à la température (Feder et al., 1996). En effet, l'espèce thermotolérante *D. virilis* possède 7 copies du gène de HSP70, réunies en *clusters*, tandis que l'espèce thermosensible *D. lummei* n'en présente que 4 (dont un pseudogène) et plus éloignées les unes des autres (Evgen'ev et al., 2014). Ces mêmes différences structurales sont retrouvées chez d'autres insectes thermotolérant (*Stratiomys singularior*) et thermosensible (*Oxycera pardalina*) de la famille des Stratiomyidae (Diptera) (Garbuz et al., 2011). De plus, la suppression expérimentale de ces copies affecte significativement la capacité de résistance de *D. melanogaster* à la température (Bettencourt et al., 2008).

Un ensemble d'études menées sur des taxa phylogénétiquement très diversifiés (mollusques, insectes, vertébrés) met en évidence d'autres traits communs aux espèces thermotolérantes. Des expériences impliquant des gradients thermiques ont été menées sur différentes espèces d'insectes

(lépidoptères : *Bombyx mori* et *Lymantria dispar*; diptères : *Drosophila melanogaster*) et de lézards (*Lacerta viviparia* et *Phrynocephalis interscapularis*). Les résultats montrent que les individus thermotolérants sont capables de synthétiser toutes les HSPs à des températures élevées, alors que les individus thermosensibles stoppent toute synthèse protéique et meurent rapidement pour des températures excédant 37 à 40°C (Alahiotis and Stephanou, 1982; Ulmasov et al., 1992). Lors de stress thermiques plus modérés (30°C), les inductions des HSPs étudiées sont moindres chez le gastéropode marin thermotolérant *Tegula funebralis*, par rapport à son congénère thermosensible *Tegula brunnea* (Tomanek and Somero, 2000). D'autre part, le niveau d'expression constitutif des HSP70 est souvent bien plus élevé chez les organismes thermotolérants, que chez les organismes thermosensibles issus de régions tempérées. Cette particularité, retrouvée notamment chez les lézards, gammares et patelles, serait une stratégie d'adaptation pour l'anticipation des variations de la température. La présence continuelle d'une concentration élevée de HSP70 permettrait d'éviter la mise en place de mécanismes d'induction lors de stress thermiques fréquents et modérés, et permettrait de minimiser cette induction lors de chocs thermiques plus importants (**Figure 1.11**) (Bedulina et al., 2013; Dong et al., 2008; Ulmasov et al., 1992).

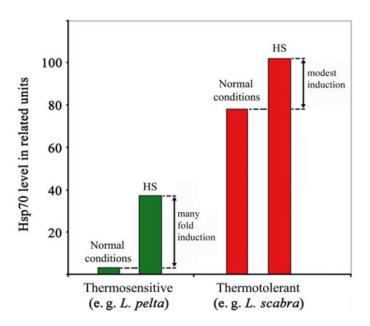


Figure 1.11: Profils d'expressions des HSP70 rencontrés chez des espèces thermosensibles et thermotolérantes. Ce graphique rassemble les données d'expression de deux espèces de patelles issues de la zone intertidale haute (en rouge Lottia scabra, thermotolérante), ou cantonée à la zone intertidale basse et donc moins exposée à la chaleur et à la dessication (en vert Lottia pelta, thermosensible). (D'après Evgen'ev et al., 2014) utilisant les résultats de Dong et al., (2008)

Chez les organismes thermotolérants, le niveau basal important de HSP70 et son induction modérée pendant un stress thermique peuvent être accompagnés d'une expression particulièrement faible des facteurs de transcription des gènes de HSP70 (HSF-1 ou *Heat Shock Factor-1*). Cependant, des expériences complémentaires montrent que HSF-1 a alors une affinité plus grande pour leurs promoteurs chez les espèces thermotolérantes, par rapport aux espèces sensibles (Buckley and Hofmann, 2002; Zatsepina et al., 2000). Le seuil d'activation des HSF-1 par la température est variable d'une espèce à l'autre, et semble primordiale dans les mécanismes d'acclimatation. En effet, leur seuil d'activation, et en conséquence l'induction des hsp, est directement corrélé avec la température

d'acclimatation des organismes (Buckley et al., 2006, 2001; Buckley and Hofmann, 2002; Farcy et al., 2009; Selvakumar and Geraldine, 2005; Tomanek and Somero, 2002). Par exemple, les moules acclimatées en région froide présentent un seuil de température d'induction des HSP70 plus bas que celles issues de régions plus chaudes (Buckley et al., 2001). Sur des périodes plus courtes, il a été montré chez *Drosophila virilis* qu'une augmentation de la tolérance à la température peut être induite par un pré-traitement par choc thermique. Ce traitement a pour effet l'accumulation des différentes HSPs dans les individus, les prémunissant ainsi contre des stress ultérieurs (Garbuz et al., 2003).

L'accumulation des HSPs a également été constatée pour d'autres types de stress environnementaux. Par exemple, les cystes du crustacé Artemia franciscana ont la faculté de survivre des années dans des conditions anoxiques et de dessiccation importante. Ces embryons en diapause ont montré une accumulation massive de small HSPs typique de ce stade, et qui n'est détectée à aucun autre moment du cycle de vie de l'artémie (Beristain et al., 2010; King et al., 2013). Ce phénomène de diapause embryonnaire permettant la survie des organismes en cours de développement face à divers stress environnementaux est loin d'être un cas isolé. En effet, l'accumulation de HSP lors de latence du stade embryonaire a été observée chez de nombreuses espèces telles que le copépode Calanus finmarchicus (Aruda et al., 2011), le poisson Austrofundulus limnaeus (Podrabsky and Somero, 2007), la mouche Sarcophaga crassipalpis (Hayward et al., 2004) ou le tardigrade Milnesium tardigradum (Schill et al., 2004). Une forte concentration cellulaire de HSP de faible poids moléculaire entrainerait une gelification du cytosol, permettant ainsi le maintien d'un minimum vital d'hydratation et de prévenir la formation d'agrégats protéiques (Evgen'ev et al., 2014). L'intervention des HSPs a également été observée lors de phase d'hibernation chez différentes espèces de vertébrés (Carey et al., 1999). Par exemple, l'hibernation de la tortue de floride (Trachemys scripta elegans) ou de la grenouille commune (Rana temporaria) entraine des périodes d'hypoxie prolongées caractérisées par l'induction protectrice de plusieurs HSP telle que la HSP70 (Currie and Boutilier, 2001; Krivoruchko and Storey, 2010).

#### 1.2 Particularites des HSP70

Les HSP70 jouent un rôle central dans le fonctionnement du réseau d'interactions entre les différentes HSPs. Elles participent à de nombreuses voies de signalisation cellulaire (prolifération, apoptose, immunité, réponse globale aux stress) et leurs fonctions sont essentielles dans le maintien de l'intégrité et de l'activité des protéines. Cette particularité est caractérisée par des inductions de leur expression lors de diverses circonstances environnementales ou physiologiques. Leurs rôles et leurs profils d'inductions typiques conduisent les scientifiques à s'intéresser aux HSP70 comme biomarqueurs de stress en écotoxicologie et en médecine, ou encore comme cibles thérapeutiques contre les maladies neurodégénératives et les cancers.

Cette partie abordera tout d'abord les principaux facteurs d'induction environnementaux et physiologiques des HSP70 chez divers organismes modèles en écotoxicologie ou à fort intérêt économique. Nous nous intéresserons ensuite à leur utilisation comme biomarqueurs de stress dans un contexte écologique, ainsi qu'à leur importance en médecine comme cible thérapeutique.

#### 1.2.1 Facteurs d'induction des HSP70

Les principaux facteurs d'induction des HSP70 sont ici classés en 4 groupes : les variations naturelles et anthropiques des paramètres physico-chimiques de l'environnement, la présence d'agents

pathogènes, ou encore l'impact de facteurs physiologiques tels que le stade de développement et le sexe des organismes. Cette partie s'intéressera aux invertébrés marins et d'eau douce, (considérés comme particulièrement affectés par les variations naturelles de l'environnement et la pollution), aux poissons (économiquement importants), aux insectes et aux chélicérates (expérimentation facile et modèles d'intérêt en agriculture

#### 1.2.1.1 Fluctuations naturelles de l'environnement

Les HSP70 sont induites par les variations de facteurs environnementaux, dépendantes des saisons, des alternances jour/nuit, ou encore de la localisation géographique des individus. Chez les organismes aquatiques, les paramètres les plus étudiés sont les variations de température, de disponibilité en oxygène, et de salinité.

Induction par stress thermique. Chez les organismes aquatiques, les variations de température journalières et saisonnières sont les plus importantes dans les eaux peu profondes (cours d'eau, littoraux...) des régions à climat tempéré, où l'on constate des décalages de 10 à 15°C entre hiver et été (Hopkin et al., 2006; Locarnini et al., 2013; Paaijmans et al., 2013). Dans la colonne d'eau des océans chauds (entre les tropiques), on retrouve également un gradient thermique vertical, allant de 30°C en surface à 4°C à 700 m de profondeur (délimitation de la thermocline) (Abraham et al., 2013). Ces variations impactent particulièrement les organismes ectothermes dont la température corporelle est étroitement liée à celle de leur environnement. Physiologiquement, leurs seuils de tolérance à la température CT<sub>min</sub> et CT<sub>max</sub> (Critical Temperature) peuvent fluctuer grâce à des phases d'acclimatation aux périodes chaudes ou froides (Hopkin et al., 2006; Paaijmans et al., 2013). Dans un contexte de réchauffement climatique mondial, la compréhension de ces mécanismes d'adaptation est particulièrement importante, et passe par l'étude de l'expression des HSP70 (Colson-Proch et al., 2010). Chez les Actinopterygii (poissons), Anthozoa (coraux), Holothuroidea (concombres de mer), Malacostraca et Maxillopoda (crustacés), les expérimentations de gradients thermiques ont montré une induction des HSP70 lors d'un stress d'environ +10 à +15°C par rapport au lot témoin. Cette induction est observée également pour des stress thermiques plus importants allant jusqu'à +20°C, chez les bivalves, insectes et arachnides (Tableau 1.1). L'intensité de cette surexpression varie en fonction de la température d'acclimatation des organismes avant l'expérimentation (Selvakumar and Geraldine, 2005). Les études de stress à basses températures sont beaucoup moins fréquentes dans la littérature, et les réponses des HSP70 sont très variables d'une espèce à l'autre. Chez le crabe Scylla serrata, les HSP70 sont induites par des baisses de 5 à 20°C par rapport à la température d'acclimatation (Fu et al., 2013), alors que chez une espèce proche Scylla paramamosain, les HSP70 sont faiblement sous-exprimées ou sans changement significatif par une baisse de température de 10°C à 15°C par raport au lot témoin (Yang et al., 2013). De même, aucune différence significative d'expression n'a été constatée après un stress froid chez le copépode Tigriopus japonicus (Rhee et al., 2009). Chez les mites, les HSP70 sont induites par une baisse de température de 15 et 20°C pour *Tetranychus cinnabarinus* (Li et al., 2009) mais aucune modification de l'expression n'est observable dans des conditions similaires pour les espèces proches Panonychus citri et Neoseiulus cucumeris (Chen et al., 2015; Yang et al., 2012). Chez le papillon Xestia cnigrum, les HSP70 sont induites lors de baisses importantes de température (diminutions de 20 et 35°C comparées à la température d'acclimatation) à différentes étapes de développement (Wang et al., 2015). Sachant que les HSP70 sont induites avec un stress de +10 à +20°C par rapport à la température d'acclimatation, beaucoup d'études se focalisent sur la dynamique d'expression, pendant des périodes de choc thermique ou de rétablissement de la température témoin plus ou moins longues. Les profils d'expression montrent une induction rapide des HSP70, 1 à 6 h après le stress thermique, pouvant se prolonger plusieurs jours après l'expérimentation. Ce type de réponse semble commun à de nombreux taxa tels que les bivalves (Farcy et al., 2009; Monari et al., 2011; Piano et al., 2002), les holothuries (Dong and Dong, 2008), les malacostracés (Luan et al., 2010; Xiu et al., 2014) et les poissons (Boone and Vijayan, 2002; Purohit et al., 2014). Cependant, ces profils d'expression peuvent varier dans le temps et en intensité, en fonction de l'espèce (Dong et al., 2008), de la température d'acclimatation (Farcy et al., 2009), du tissu (Li et al., 2016; Wu et al., 2014; Xiu et al., 2014) et de la forme de HSP70 étudiée (Luan et al., 2010; Piano et al., 2002; Xiu et al., 2014).

Tableau 1.1: Conditions d'induction des HSP70 par des stress thermiques. Pour chaque expérimentation les conditions de stress sont précisées: le temps d'exposition (temps de rétablissement) / température d'exposition. Abréviations des classes: Act: Actinopteri, Ant: Anthozoa, Ara: Arachnida, Biv: Bivalvia, Hol: Holothuroidea, Ins: Insecta, Mal: Malacostraca, Max: Maxillopoda. Abréviations des tissus et organes: Abd.: abdomen, Bra.: branchies, Ceph.: cephalothorax, Haem.: haemocytes, Hepat.: hepatopancréas, Gl. dig.: glande digestive, Musc.: muscle.

	Espèce	Tissu	Molécule	Témoin	Conditions expérimentales	Référence
Act	Channa striatus	Foie	ADNc	25°C	4 à 30 jours / 36°C	Purohit et al., 2014
Act	Oncorhynchus mykiss	Foie	Prot.	13°C	1 h (23 h) / 28°C	Boone and Vijayan, 2002
Ant	Acropora Millepora	Tout	ADNc	24°C	3 h et 20 h / 31°C	Rodriguez-Lanetty et al., 2009
Ara	Neoseiulus cucumeris	Tout	ADNc	25°C	1 h / 35-45°C	Chen et al., 2015
Ara	Panonychus citri	Tout	ADNc	25°C	1 h / 41°C	Yang et al., 2012
Ara	Tetranychus cinnabarinus	Tout	ADNc	26°C	1 h (0,5 h) / 7-10°C et 34-40°C	Li et al., 2009
Biv	Chamelea gallina	Gl. dig.	Prot.	17°C	7 jours / 30°C	Monari et al., 2011
Biv	Crassostrea gigas	Bra.	ADNc	7°C	1 h (24-48 h) / 37°C	Farcy et al., 2009
Biv	Crassostrea gigas	Bra.	ADNc	18°C	1 h (1-8 h) / 37°C	Farcy et al., 2009
Biv	Mytilus galloprovincialis	Bra.	ADNc	13°C	1-3 h / 24-32°C	Lockwood et al., 2010
Biv	Mytilus galloprovincialis	Gl. dig.	ADNc	16°C	1 h (0 et 3 h) / 35°C	Franzellitti and Fabbri, 2005
Biv	Mytilus trossulus	Bra.	ADNc	13°C	1-3 h / 24-32°C	Lockwood et al., 2010
Biv	Ostrea edulis	Bra.	Prot.	15°C	1 h (12 h à 7 jours) / 35°C	Piano et al., 2002
Biv	Paphia undulata	Bra.	ADNc	19°C	2 h (1-4 h) / 32°C	Wu et al., 2014
Biv	Pinctada martensii	Bra. Haem.	ADNc	25°C	1 h (2-12 h) / 35°C	Li et al., 2016
Hol	Apostichopus japonicus	Tout	Prot.	20°C	2 h (1 à 48 h) / 30°C	Dong and Dong, 2008
Ins	Melitaea cinxia	Tout	ADNc	25°C	2 h / 40°C	Luo et al., 2015
Ins	Xestia cnigrum	Tout	ADNc	25°C	2 h (1 h) / 40-47°C	Wang et al., 2015
Mal	Fenneropenaeus chinensis	Ceph.	ADNc	25°C	1-6 h / 35°C	Luan et al., 2010
Mal	Homarus americanus	Hepat. Musc.	ADNc	13,5°C	2 h / 26,5°C	Spees et al. 2002a
Mal	Litopenaeus vannamei	Hepat.	ADNc	20°C	2 h / 30°C	Wu et al., 2008
Mal	Litopenaeus vannamei	Bra.	ADNc	20°C	3-6 h / 30°C	Wu et al., 2008
Mal	Macrobrachium malcolmsonii	Bra. Cœur	Prot.	20°C	3 h (1 h) / 30 à 36°C	Selvakumar and Geraldine, 2005
Mal	Macrobrachium malcolmsonii	Bra. Cœur	Prot.	30°C	3 h (1 h) / 34 à 38°C	Selvakumar and Geraldine, 2005
Mal	Macrobrachium nipponense	Bra.	ADNc	15°C	12 h (6 à 48h) / 25°C	Xiu et al., 2014
Mal	Palaemonetes varians	Abd.	ADNc	10°C	1-2 h / 28°C	Cottin et al., 2010
Mal	Penaeus monodon	Haem.	ADNc	26°C	1 h / 36°C	Chuang et al., 2007
Mal	Rimicaris exoculata	Abd.	ADNc	10°C	1-2 h / 30°C	Cottin et al., 2010
Mal	Scylla paramamosain	Haem.	ADNc	25°C	6 h / 32 à 36°C	Yang et al., 2013
Mal	Scylla serrata	Haem.	ADNc	25°C	2 h / 5 - 20°C et 35 à 40°C	Fu et al., 2013
Max	Tigriopus japonicus	Tout	ADNc	20°C	1 à 2 h (1 h) / 30°C	Rhee et al., 2009

<u>Induction par stress osmotique</u>. La salinité océanique varie d'environ 36 ‰ (ou 36 g.L<sup>-1</sup>) à l'équateur à 28 ‰ en région Arctique (Zweng et al., 2013). Des différences de concentration bien plus importantes sont constatées localement comme en mer Baltique (5 à 20 ‰), dans les mangroves ou les estuaires (Kijewska et al., 2016; Tine et al., 2010; Yang et al., 2013). Les organismes marins et d'eau douce subissent donc des stress osmotiques réguliers en fonction des marées, des saisons ou lors de

migrations. La majorité des organismes marins étudiés parmi les malacostracés (Homarus americanus, S. serrata), bivalves (Pinctada martensii, Chamelea gallina) et actinopterii (Gadus morhua) (Tableau 1.2) semblent fortement sensibles à la baisse de salinité. Chez ces organismes, l'induction des HSP70 est observée dès 5 à 10 g.L<sup>-1</sup> en dessous de leurs conditions d'acclimatation (Fu et al., 2013; Kijewska et al., 2016; Li et al., 2016; Monari et al., 2011; Spees et al., 2002b). L'intensité de cette induction est d'ailleurs proportionnelle à celle du stress osmotique hyposalin chez le crabe des mangroves S. serrata (Fu et al., 2013). Une augmentation de salinité d'au moins 15 g.L<sup>-1</sup> induit également une surexpression des HSP70 chez les crabes (S. paramamosain et S. serrata) et le homard (H. americanus) (Fu et al., 2013; Spees et al., 2002b; Yang et al., 2013). Cependant, les réponses à l'augmentation de salinité sont, quant à elles, très variables d'une espèce à l'autre chez les bivalves et les poissons. Dans la famille des clams (Veneridae), les stress hypersalins induisent la surexpression des HSP70 chez *Paphia undulata*, mais pas pour C. gallina (Monari et al., 2011; Wu et al., 2014). Chez des poissons subissant naturellement de grandes fluctuations de salinité, un stress hypersalin induit une surexpression des HSP70 chez le tilapia africain (Sarotherodon melanotheron) et la dorade (Sparus sarba), mais pas chez la morue de mer Baltique (G. morhua) (Deane, 2004; Kijewska et al., 2016; Tine et al., 2010). Toutefois, la comparaison des conclusions de ces études précédemment citées, pourrait être fortement biaisée par les temps de stress et de mesures de quantités de HSP70 très différents. L'induction à basse salinité est précoce chez le homard, entre 30 et 60 minutes après le début de l'expérience (Spees et al., 2002b). Pour les autres espèces, les relevés sont plus tardifs. L'induction est significative dès les premières mesures après 2h de stress hyposalin chez S. serrata (Fu et al., 2013) et 12h chez S. paramamosain (Yang et al., 2013). Chez l'huître P. martensii, l'induction des HSP70 est importante à partir de 12h dans les branchies, avec un décalage d'induction à 48h seulement dans les haemocytes (Li et al., 2016). Ce décalage entre tissus pourrait s'expliquer par l'impact direct de la salinité sur les branchies. Les profils d'induction des HSP70 face au stress osmotique sont très différents : chez le crabe S. paramamosain l'induction est continue de 12h jusqu'à la fin de l'expérience à 72h, tandis que chez l'huître P. martensii une induction ponctuelle n'est observée qu'entre 12h et 24h (Li et al., 2016; Yang et al., 2013).

Tableau 1.2 : Conditions d'induction des HSP70 par des stress osmotiques. Pour chaque expérimentation les conditions de stress sont précisées : durée de l'expérience (temps de rétablissement) / conditions de stress. Abréviations des classes : Act : Actinopteri, Biv : Bivalvia, Mal : Malacostraca. Abréviations des tissus et organes : Bra. : branchies, Haem. : haemocytes, Gl. dig. : glande digestive.

	Espèce	Tissu	Molécule	Témoin	Conditions expérimentales	Référence
Act	Gadus morhua	Bra.	ADNc	18 ‰	72 h / 8 ‰	Kijewska et al., 2016
Act	Sarotherodon melanotheron	Bra.	ADNc	40 ‰	In situ / 60 et 100 ‰	Tine et al., 2010
Act	Sparus sarba	Bra. Foie	ADNc	33 ‰	1 mois / 50 ‰	Deane, 2004
Biv	Chamelea gallina	Gl. dig.	Prot.	34 ‰	7 jours / 28 ‰	Monari et al., 2011
Biv	Paphia undulata	Haem.	ADNc	20 ‰	24-96 h / 32 ‰	Wu et al., 2014
Biv	Pinctada martensii	Haem. Bra.	ADNc	30 ‰	48 h / 10 ‰	Li et al., 2016
Mal	Homarus americanus	Musc.	ARN	32 ‰	1 h / 16 ‰ et 48 ‰	Spees et al., 2002b
Mal	Scylla paramamosain	Haem.	ADNc	15 ‰	12 à 96 h / 30 ‰	Yang et al., 2013
Mal	Scylla serrata	Bra.	ADNc	25 ‰	2 h / 0 à 20 ‰ et 40 à 45 ‰	Fu et al., 2013

Induction par stress hypoxique. Dans les estuaires et environnements marins peu profonds, la concentration en oxygène varie entre la valeur de saturation (11 à 14 mg.L<sup>-1</sup>) et 2,8 mg.L<sup>-1</sup> pour les milieux les moins oxygénés. En dessous de cette concentration, le milieu est considéré comme hypoxique (Diaz and Rosenberg, 1995). Le seuil de stress par hypoxie est très variable chez les organismes marins, avec une concentration létale (LC<sub>50</sub>) en moyenne plus élevée chez les crustacés (2,45

mg.L<sup>-1</sup>) et plus basse chez les gastéropodes et bivalves (respectivement 0,89 et 1,42 mg.L<sup>-1</sup>) (Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008). L'expression des HSP70 en condition hypoxique/ischémique a principalement été étudiée chez les mammifères dans le cadre médical. Les HSP70 sont induites dans le cœur et le cerveau chez le rat, au cours du développement et à l'âge adulte, afin de prévenir les dommages protéiques trop importants et la mort cellulaire (Chen et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Myrmel et al., 1994). Les conditions hypoxiques peuvent aussi être induites dans les tissus musculaires et les haemocytes par des stress bionénergétiques provoqués par un exercice physique intense (Milne and Noble, 2002) (**Tableau 1.3**). Cependant, ce type de stress n'entraine pas d'induction chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) (Clarkson et al., 2005). En conditions naturelles, les HSP70 sont induites à long terme (un mois), lors de la phase d'hypoxie vécue par la grenouille commune (*Rana temporaria*) pendant l'hibernation hivernale (Currie and Boutilier, 2001). Des stress hypoxiques courts de 48 heures induisent également les HSP70 chez la crevette *Macrobrachium nipponense*, et le bivalve *Chamelea gallina* (Monari et al., 2011; Sun et al., 2016) et une anoxie entraine une surexpression des hsp70 chez le barnacle, *Amphibalanus amphitrite*, après 24 heures (Cheng et al., 2003).

Tableau 1.3 : Conditions d'induction des HSP70 par des stress anoxiques et hypoxiques. Pour chaque expérimentation les conditions de stress sont précisées : durée de l'expérience (temps de rétablissement) / conditions de stress. Abréviations des classes : Apb : Amphibia, Biv : Bivalvia, Mal : Malacostraca, Mam : Mammalia, Max : Maxillopoda. Abréviations des tissus et organes : Bra. : branchies, Gl. dig. : glande digestive, Musc. : muscle.

	Espèce	Tissu	Molécule	Témoin	Conditions expérimentales	Référence
Apb	Rana temporaria	Cœur	Prot.	Normoxie	1 mois / 60 mmHg (3,5 mg.L <sup>-1</sup> )	Currie and Boutilier, 2001
Biv	Chamelea gallina	Gl. dig. Bra.	Prot.	Saturation	48 h / 0,06 mg.L <sup>-1</sup>	Monari et al., 2011
Mal	Macrobrachium nipponense	Musc.	ADNc	6,5 mg.L <sup>-1</sup>	48 h / 2 mg.L <sup>-1</sup>	Sun et al., 2016
Mam	Rattus norvegicus	Cœur Vastus	Prot.	Repos	1 h (24 h) / course : 33 m.min <sup>-1</sup>	Milne and Noble, 2002
Max	Amphibalanus amphitrite	Tout	ADNc	Saturation	24 h / 1 mg.L <sup>-1</sup>	Cheng et al., 2003

#### 1.2.1.2 Impacts des activités anthropiques

Les études d'expression ont montré l'induction des hsp70 après l'exposition des organismes à divers produits chimiques et métaux issus de l'activité anthropique (Cruz-Rodríguez and Chu, 2002; De Pomerai, 1996; Lindquist, 1986; Sanders, 1993; Snyder et al., 2001; Xu et al., 2016). Ces rejets industriels sont responsables de stress abiotiques qui impactent particulièrement les organismes aquatiques. Ces contaminants déclenchent des stress oxydatifs ou des perturbations physiologiques pouvant conduire à des troubles de la reproduction et du développement (perturbateurs endocriniens). Les HSP70 sont impliquées dans la réponse cellulaire à ces stress oxydants et leur expression est affectée par ce type de contamination.

Induction par stress métalliques. Le problème environnemental des métaux est leur abondance dans certains milieux, due aux activités anthropiques (agriculture, industrie ...). Certains métaux sont essentiels au bon fonctionnement des organismes. Par exemple, ils entrent dans la composition de protéines sous formes d'hèmes ou participent aux réactions biochimiques comme co-facteurs enzymatiques. La notion de « métaux essentiels » dépend de l'organisme considéré, et de la concentration dans l'environnement (Le Goff and Bonnomet, 2004). On leur oppose souvent les notions de métaux « lourds » ou « non essentiels », mal définies scientifiquement, avec une connotation de

toxicité. Les métaux n'étant pas ou peu métabolisés par les organismes, ils sont susceptibles d'être toxiques à partir de faibles concentrations. On définit donc plus largement ces contaminants comme des Eléments-Trace Métalliques (ETM). La contamination des organismes par les ETM dépend de nombreux facteurs, tels que leur disponibilité dans l'environnement (solubilité variable en fonction du pH et de la présence d'autres réactifs capables de précipiter les métaux), la capacité d'assimilation de l'organisme concerné ainsi que sa capacité à gérer le stress métallique (par exemple, la diversité et l'expression des métallothionéines qui peuvent prendre en charge les métaux) (Du Laing et al., 2009). Il est donc parfois difficile de dissocier l'impact de l'exposition aux ETM sur l'expression des HSP70 de celui de ces autres facteurs, après exposition à des compartiments écologiques contaminés (eau, sédiments...) (Benhamed et al., 2016). Les études de réponses aux contaminations par ETM en milieu marin s'intéressent principalement au cadmium et au cuivre, mais on retrouve également des expérimentations d'exposition à l'argent, chrome, fer, manganèse, mercure et zinc (**Tableau 1.4**).

Tableau 1.4: Conditions d'induction des HSP70 lors de stress aux métaux. Pour chaque stress, le métal et les conditions expérimentales sont précisées (durée de l'expèrience (temps de rétablissement) / conditions de stress). Abréviations des classes : Act : Actinopteri, Biv : Bivalvia, Ins : Insecta, Mal : Malacostraca, Mam : Mammalia, Max : Maxillopoda. Abréviations des tissus et organes : Bra. : branchies, Ceph. : cephalothorax, Gl. dig. : glande digestive, Haem. : haemocytes, Hepat. : hepatopancréas, Musc. : muscle, Testi. : testicules.

Métal		Espèce	Tissu	Molécul	e Conditions expérimentale	s Référence
Argent	Max	Tigriopus japonicus	Tout	ADNc	96h / 0,05 μg.L <sup>-1</sup>	Rhee et al., 2009
Cadmium	Act	Oncorhynchus mykiss	Hepat.	Prot.	$24h / 10 \mu M$	Boone and Vijayan, 2002
	Biv	Mytilus coruscus	Haem.	ADNc	5-25 jours / 200 μg.L <sup>-1</sup>	Liu et al., 2014a
	Mal	Exopalaemon carinicauda	Musc.	ADNc	12-36 h / 0,2-5 μM	Gao et al., 2016
	Mal	Litopenaeus vannamei	Hepat.	ADNc	6 à 48h / 2,2 $\mu M$	Qian et al., 2012
	Ins	Chironomus riparius	Tout	ADNc	24 h / 10Mm	Morales et al., 2011
Chrome	Biv	Mytilus galloprovincialis	Gl. dig.	ADNc	7 jours / 1 à 10 ng.L <sup>-1</sup>	Franzellitti and Fabbri, 2005
Cuivre	Act	Oncorhynchus mykiss	Hepat.	Prot.	$24h$ / $200\mu M$	Boone and Vijayan, 2002
	Biv	Argopecten purpuratus	Tout	ADNc	8 jours / 2,5 μg.L <sup>-1</sup>	Zapata et al., 2009
	Biv	Crassostrea hongkongensis	Bra.	ADNc	2 à 4 jours / 50 μg.L <sup>-1</sup>	Zhang and Zhang, 2012
	Biv	Crassostre hongkongensis	Gl. dig.	ADNc	6h à 8 jours / 50 μg.L <sup>-1</sup>	Zhang and Zhang, 2012
	Biv	Mytilus coruscus	Haem.	ADNc	5-20 jours / 20 μg.L <sup>-1</sup>	Liu et al., 2014a
	Mal	Fenneropenaeus chinensis	Ceph.	ADNc	$6$ à 24h / $50\mu M$	Luan et al., 2010
	Mal	Macrobrachium malcolmsonii	Hepat.	Prot.	12 et 24h / 151 μg.L <sup>-1</sup>	Yamuna et al., 2000
	Max	Tigriopus japonicus	Tout	ADNc	96h / 0,1 à 0,5 μg.L <sup>-1</sup>	Rhee et al., 2009
Mercure	Biv	Mytilus galloprovincialis	Gl. dig.	ADNc	8 à 24h / 150 $\mu$ g.L <sup>-1</sup>	Franzellitti and Fabbri, 2005
	Biv	Mytilus galloprovincialis	Gl. dig.	ADNc	6 jours / 150 μg.L <sup>-1</sup>	Franzellitti and Fabbri, 2005
Zinc	Max	Tigriopus japonicus	Tout	ADNc	96h / 1 μg.L <sup>-1</sup>	Rhee et al., 2009
Nano argent	Act	Oreochromis niloticus	Reins	Prot.	7 jours / 50 à 200 μg.L <sup>-1</sup>	Girilal et al., 2015
	Ins	Drosophila melanogaster	Tout	Prot.	24 et 48h / 50 et 100 mg.L <sup>-1</sup>	Ahamed et al., 2010
	Mam	Mus musculus	Testi.	ADNc	35 jours / 0,5 mg.kg <sup>-1</sup>	Rezazadeh-Reyhani et al., 2015
Nano zinc	Act	Oryzias melastigma	Tout	Prot.	96h / 4 et 40 mg.L <sup>-1</sup>	Wong et al., 2009

Le niveau d'expression des HSP70 mesuré en réponse à un stress métallique est spécifique du tissu étudié (Boutet et al., 2003; Yamuna et al., 2000). Une exposition au cuivre induit les HSP70 chez plusieurs crustacés tels que *Tigriopus japonicus* (Maxillopoda), et les crevettes *Fenneropenaeus chinensis* et *Macrobrachium malcolmsonii* (Luan et al., 2010; Rhee et al., 2009; Yamuna et al., 2000). Cette induction est également observée chez la truite *Oncorhynchus mykiss* (Boone and Vijayan, 2002) et plusieurs bivalves tels que la moule (*Mytilus coruscus*), le pétoncle (*Argopecten purpuratus*) et l'huître (*Crassostrea hongkongensis*) (Liu et al., 2014; Zapata et al., 2009; Zhang & Zhang, 2012), mais pas chez *Crassostrea gigas* (HSP70 sous-exprimées) (Boutet et al., 2003). Pour des contaminations au

cadmium, les réponses sont plus variables : l'expression des HSP70 diminue chez l'huître C. gigas et la crevette F. chinensis (Boutet et al., 2003; Luan et al., 2010), mais augmente chez la moule (M. coruscus), la crevette (Litopenaeus vannamei), le chironome (Chironomus riparius) et la truite (O. mykiss) (Boone & Vijayan, 2002; Liu et al., 2014; Morales et al., 2011; Qian et al., 2012). L'induction des HSP70 en réponse à d'autres types de métaux a également été observée, mais les études présentes dans la litérature ne sont pas aussi nombreuses. Il a ainsi été montré que des expositions à l'argent et au zinc induisent l'expression des HSP70 chez T. japonicus (Rhee et al., 2009), et que ce phénomène a également été observé chez la moule Mytilus galloprovincialis après des expositions au mercure ou au chrome (Franzellitti and Fabbri, 2005). Les études les plus ciblées ont montré que les expositions aux métaux entrainent des profils d'expression variables en fonction de la forme de HSP70 étudiée. Certaines formes de HSP70 ne sont pas significativement induites par ce type de stress (Boone and Vijayan, 2002; Luan et al., 2010; Qian et al., 2012), tandis que d'autres peuvent être sous-exprimées dans un premier tremps et fortement induite après quelques jours (Franzellitti and Fabbri, 2005). Depuis peu, les recherches se portent également sur la toxicité des métaux sous forme de nanoparticules pour différents organismes marins (animaux et végétaux), ainsi que pour plusieurs lignées cellulaires de mammifères (Hardilová et al., 2015; Wong et al., 2009). Cette toxicité provoque l'induction de HSP70 chez les poissons Oryzias melastigma et Oreochromis niloticus (Girilal et al., 2015; Wong et al., 2009), la drosophila Drosophila melanogaster (Ahamed et al., 2010) et la souris Mus musculus (Rezazadeh-Reyhani et al., 2015).

Induction par exposition aux polluants organiques. Les polluants organiques sont des déchets générés par l'activité anthropique, majoritairement issus des rejets industriels ou agricoles. Ils sont composés d'éléments de natures diverses, dérivés principalement des hydrocarbures et des pesticides et peuvent présenter une résistance à la dégradation biologique naturelle, on les nomme alors Polluants Organiques Persistants (POP). Ces substances induisent l'expression de HSP70 pour la majorité des concentrations testées dans la littérature, et chez de nombreuses espèces représentatives d'un large spectre de taxa (Actinopteri, Arachnida, Bivalvia, Demospongiae, Gastropoda, Insecta, Malacostraca, Scyphosoa) (Tableau 1.5). Chez D. melanogaster, les contaminations aux hydrocarbures monocycliques (HAM) entrainent des réponses rapides, avec une surexpression dès 6 à 12 h d'exposition au benzène, toluène et xylène (Singh et al., 2009). Les expérimentations de contaminations aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont montré des temps d'induction des HSP70s plus variables et globalement plus longs en fonction du type de substances utilisées. Elles sont observées après 12 à 24 h d'exposition au benzopyrène chez les bivalves C. gallina et Ruditapes philippinarum, et l'isopode Oniscus asellus (Köhler et al., 1999; Liu et al., 2015; Monari et al., 2011); et après 7 à 15 jours d'exposition au fuel chez l'huître C. gigas et la moule M. coruscus (Boutet et al., 2004; Liu et al., 2014a) Les autres composés toxiques étudiés induisent également les HSP70s après des temps d'exposition variables : seulement 6 à 48 h pour les composés organochlorés, organostanniques, deltaméthrine et chlorfénapyr (Clayton et al., 2000; Köhler et al., 1999; Schröder et al., 1999; Schroth et al., 2005; Selvakumar et al., 2005; Snyder et al., 2001; Sonoda and Tsumuki, 2007); et 4 à 40 jours pour les organosphosphorés et l'atrazine (Eder et al., 2009; Gupta et al., 2007; Janssens et al., 2014; Wilczek, 2005; Xing et al., 2013; Yang et al., 2010). Néanmoins, plusieurs cas de sous-expression de HSP70 ont été observés dans des études récentes sur le saumon (Salmo salar) exposé à la deltaméthrine (Olsvik et al., 2014) ou encore sur l'huître (C. gigas) exposée au glyphosate (Mottier et al., 2015).

Tableau 1.5: Conditions d'induction des HSP70 lors d'expositions à des polluants organiques. Pour chaque stress, le type de polluant et les conditions expérimentales sont précisées (durée de l'expèrience (temps de rétablissement) / conditions de stress). Abréviations des classes : Act : Actinopteri, Ara :

## 1 Introduction generale

Arachnida, Biv: Bivalvia, Dem: Demospongiae, Gas: Gastropoda, Ins: Insecta, Mal: Malacostraca, Scy: Scyphosoa. Abréviations des tissus et organes: Adip.: tissu adipeux, Bra.: branchies, Gl. dig.: glande digestive, Haem.: haemocytes, Int.: intestins, Musc.: muscle, Testi.: testicules. PCB: Polychlorobiphényle, PCP: Pentachlorophénol, TBT: Tributylétain.

Polluants		Espèce	Tissu	Mol.	Conditions expérimentales	Référence
Hydrocarbures						
Benzopyrène	Biv	Chamelea gallina	Gl. dig.	Prot.	1-12 jours / 0,5 mg.L <sup>-1</sup>	Monari et al., 2011
	Mal	Oniscus asellus	Tout	Prot	0,5-3 et 14 jours / 7-59 mg.kg <sup>-1</sup>	Köhler et al., 1999
	Biv	Ruditapes philippinarum	Gl. dig.	ADNc	1-15 jours / 1 et 4 μg.L <sup>-1</sup>	Liu et al., 2015
Fuel	Biv	Crassostrea gigas	Gl. dig.	Prot.	7 et 15 jours / 0,1 %	Boutet et al., 2004
	Biv	Mytilus coruscus	Haem.	ADNc	15-25 jours / 40 μg.L <sup>-1</sup>	Liu et al. 2014a
Benzène	Ins	Drosophila melanogaster	Tout	ADNc	6-24 h / 100 Mm	Singh et al., 2009
Toluène	Ins	Drosophila melanogaster	Tout	ADNc	12-48 h / 100Mm	Singh et al., 2009
Xylène	Ins	Drosophila melanogaster	Tout	ADNc	12-48 h / 100Mm	Singh et al., 2009
Organochlorés						
Endosulfan	Mal	Macrobrachium malcolmsonii	Bra.	Prot.	1-24 h / 0,016 et 0,32 µg.L <sup>-1</sup>	Selvakumar et al., 2005
Lindane	Mal	Oniscus asellus	Tout	Prot	0,5-14 jours / 58-230 μg.kg <sup>-1</sup>	Köhler et al., 1999
PCB	Mal	Oniscus asellus	Tout	Prot	24 h / 0,1-21 mg.kg <sup>-1</sup>	Köhler et al., 1999
	Dem	Suberites domuncula	Tout	Prot.	1-6 jours / 25 μg.g <sup>-1</sup>	Schröder et al., 1999
PCP	Ins	Chironomus riparius	Tout	ADNc	4 jours / 25 et 250 μg.L <sup>-1</sup>	Morales et al., 2014
	Gas	Haliotis rufescens	Gl. dig.	Prot.	24 h / 0,1 ppm	Snyder et al., 2001
	Mal	Oniscus asellus	Tout	Prot	0,5-7 jours / 86,7 et 867 μg.kg <sup>-1</sup>	Köhler et al., 1999
Organophospho	orés					
Chlorpyrifos	Act	Cyprinus carpio	Bra.	ADNc	40 jours / 11,6 et 116 μg.L <sup>-1</sup>	Xing et al., 2013
	Ins	Drosophila melanogaster	Testi.	Prot.	24 h / 1,5 et 15 ppb	Gupta et al., 2007
	Ins	Ischnura elegans	Tête	Prot.	16 jours / 2 μg.L <sup>-1</sup>	Janssens et al., 2014
	Act	Oncorhynchus tshawytscha	Musc. Bra.	ADNc	4 jours / 1,2 et 7,3 $\mu$ g.L <sup>-1</sup>	Eder et al., 2009
Diméthoate	Ara	Agelena. labyrinthica	Int.	Prot.	6 jours / 64 μg	Wilczek, 2005
	Ara	Pardosa lugubris	Int.	Prot.	6 jours / 64 μg	Wilczek, 2005
Organostanniq	ue					
TBT	Scy	Aurelia spp.	Tout	ADNc	13 h / 50 ng.L <sup>-1</sup>	Schroth et al., 2005
	Biv	Dreissena polymorpha	Tout	Prot.	24 h / 0,3-68 μg.L <sup>-1</sup>	Clayton et al., 2000
Pyréthrinoïde						
Deltaméthrine	Act	Oncorhynchus mykiss	Musc. Foie	ADNc	$6\text{-}48h/1\mu g.L^{\text{-}1}$	Ceyhun et al., 2010
	Act	Channa punctata	Reins Bra.	Prot.	48 h / 0,75 ppb	Kaur et al., 2011
Pyrrole (dérivé	)					
Chlorfénapyr	Ins	Mamestra brassicae	Adip.	ADNc	6 à 24 h/ 10 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup>	Sonoda and Tsumuki, 2007
Triazine						
Atrazine	Act	Cyprinus carpio	Bra.	ADNc	40 jours / 42,8 et 428 μg.L <sup>-1</sup>	Xing et al., 2013
		Grobiocypris rarus	Foie	ADNc		Yang et al., 2010

## 1.2.1.3 Influence des conditions physiologiques

L'expression des HSP70 est également variable, en fonction de l'état physiologique des organismes étudiés. En effet, elles interviennent dans de nombreuses voies de signalisation immunitaires ou hormonales, ce qui implique des variations de leur expression lors d'infections ou au cours du développement des organismes.

Influence des agents pathogènes. Les études d'expression des HSP70 lors de stress infectieux portent majoritairement sur des espèces d'invertébrés marins à fort intérêt économique. Ces études ont comme objectif d'évaluer l'amélioration des conditions d'élevage des animaux en aquaculture (Rungrassamee et al., 2010), mais surtout d'enrayer les épisodes saisonniers de forte mortalité, particulièrement importants chez les huîtres ces dernières années. En effet, la mortalité des bivalves en aquaculture a été expliquée par l'impact de pathogènes tels que le virus OsHV-1 (Ostreid herpes virus type 1) et des bactéries du genre Vibrio (Domeneghetti et al., 2014).Le système immunitaire des invertébrés est uniquement inné, et non acquis comme chez les vertébrés (Roch, 1999), et son activation est fortement corrélée avec une surexpression de HSP70 (Tableau 1.6). L'induction des HSP70 intervient très rapidement dans les haemocytes, 1 à 12 heures après exposition aux pathogènes, chez la majorité des invertébrés étudiés (Altincicek et al., 2008; Cui et al., 2010; Fu et al., 2013; Li et al., 2016; Rungrassamee et al., 2010; Song et al., 2006; Wang et al., 2009; Xiu et al., 2014; Yang et al., 2013; Zhang et al., 2013; Zhou et al., 2010). Cette induction est généralement de courte durée puisqu'elle décroit rapidement après 24 h de stress biotique, bien qu'elle puisse rester significative pendant plusieurs dizaines de jours chez Crassostrea virginica (Nikapitiya et al., 2014). On peut également noter que les HSP70s peuvent montrer des profils d'expression distincts en fonction de la forme étudiée. Par exemple, les HSP70-1 et HSP70-2 montrent des inductions décalées, après respectivement 1 h et 12 h d'exposition aux pathogènes (Xiu et al., 2014).

Tableau 1.6: Conditions d'induction des HSP70 par des agents pathogènes. Pour chaque stress, l'espèce pathogène et les conditions expérimentales sont précisées (durée de l'infection / dose inoculée). Abréviations des classes : Ant : Anthozoa, Biv : Bivalvia, Ins : Insecta, Mal : Malacostraca. Abréviations des tissus et organes : Bra. : branchies, Haem. : haemocytes, Hepat. : hepatopancréas, Morc. : morceau. CFU (Colony Forming Unit) : nombre de cellules vivantes comptées ; CPU (Chloroplatinate unit) : nombre de cellules estimées par colorimétrie.

Pathogène	Espèce	Tissu Mol.	Conditions expérimentale	s Référence
Aeromonas hydrophila	Mal Macrobrachium nipponense	Hepat. ADNc	1 h / 5.10 <sup>2</sup> CFU 12 h / 5.10 <sup>2</sup> CFU	Xiu et al., 2014
Alteromonas sp.	Ant Acropora millepora	Morc. ADNc	24 h / 106 CFU.mL <sup>-1</sup>	Brown et al., 2013
Escherichia coli (toxines)	Ins Tribolium castaneum	Tout ADNc	8 h / 10 mg.mL <sup>-1</sup>	Altincicek et al., 2008
Roseovarius crasssostreae	Biv Crassostrea virginica	Haem. ADNc	30 jours / 7,5.10 <sup>6</sup> CFU.mL <sup>-1</sup>	Nikapitiya et al., 2014
Staphylococcus aureus	Mal Litopenaeus vannamei	Haem. ADNc	1,5-6 h / 10 <sup>7</sup> CFU	Zhou et al., 2010
Vibrio alginolyticus	Biv Pinctada fucata	Haem. ADNc	4-6 h et 16 h / 5.10 <sup>6</sup> CFU	Wang et al., 2009
	Biv Pinctada martensii	Haem. ADNc Bra.	6-12 h / 10 <sup>7</sup> CFU 12-24 h / 10 <sup>7</sup> CFU	Li et al., 2016
	Mal Litopenaeus vannamei	Haem. ADNc	1,5-6 h / 10 <sup>7</sup> CFU	Zhou et al., 2010
	Mal Portunus trituberculatus	Haem. ADNc	6-24 h / 10 <sup>5</sup> CFU	Cui et al., 2010
	Mal Scylla paramamosain	Haem. ADNc	3-6 et 72 h / 2.10 <sup>5</sup> CFU	Yang et al., 2013
	Mal Scylla serrata	Haem. ADNc	3-48 h / 2.10 <sup>5</sup> CFU	Fu et al., 2013
Vibrio anguillarum	Biv Argopecten irradians	Haem. ADNc	2-32 h / 1.10 <sup>7</sup> CPU	Song et al., 2006
Vibrio coralliilyticus	Ant Acropora millepora	Morc. ADNc	24 h / 106 CFU.mL-1	Brown et al., 2013
Vibrio harveyi	Mal Penaeus monodon	Bra. ADNc	3-72 h / 2.10 <sup>7</sup> CFU	Rungrassamee et al., 2010
Vibrio parahaemolyticus	Mal Scylla paramamosain	Haem. ADNc	6 h / 2.10 <sup>5</sup> CFU	Zhang et al., 2013

Influence du stade de développement des individus. L'une des premières études sur l'expression des hsp70 selon les stades de développement porta sur *Drosophila melanogaster*, où il fut démontré une expression deux fois plus élevée chez l'adulte que chez l'embryon ou la larve (Craig et al., 1983). Chez *Plutella xylostella* (Lepidoptera), comme chez *D. melanogaster*, les niveaux d'expression de HSP70 observés sont plus faibles chez l'embryon, puis augmentent graduellement de la pupe à l'adulte (Sonoda

#### 1 Introduction generale

et al., 2006). Les mêmes conclusions furent apportées par l'étude des HSP70 chez *Gammarus pulex* (Amphipoda) (Cottin et al., 2015). Chez *Xestia cnigrum* (Lepidoptera), les individus au stade de pupe expriment également des niveaux 2 fois plus importants que les larves, lors de stress à basse température (Wang et al., 2015). A l'opposé, chez l'huître (*C. virginica*) et le gammare (*G. pulex*) l'induction des HSP70 en réponse à des stress chauds est globalement moins élevée pour les juvéniles par rapport aux adultes (Cottin et al., 2015; Ueda and Boettcher, 2009). De plus, les niveaux d'expression observés sont similaires pour la larve et l'adulte de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera), et ne sont significativement plus élevés qu'au stade intermédiaire de pupe (Lu et al., 2016). Chez l'acarien *Neoseiulus cucumeris*, les niveaux d'expression sont, quant à eux, similaires à tous les stades de développement des individus et ne sont significativement plus élevés que dans les œufs fertilisés (Chen et al., 2015). Enfin, il fut aussi démontré chez l'huître *Crassostrea virginica* comme pour le papillon *Xestia cnigrum*, que l'expression des hsp70 est particulièrement élevée en début et en fin de stade larvaire, et présente une baisse significative pendant la période intermédiaire (Ueda and Boettcher, 2009; Wang et al., 2015). De ce fait, il est très difficile d'établir un schéma général de l'induction des HSP70s en fonction des stades de développement, car celui-ci varie selon l'espèce étudiée.

Influence de la période de mue chez les crustacés. L'expression des HSP70 a également été étudiée lors des périodes de mue chez plusieurs crustacés. Là encore, les résultats observés sont très variables d'une espèce à l'autre et montrent qu'il est nécessaire de prendre en compte ce facteur lors des expérimentations animales. Chez la crevette *Litopenaeus vannamei*, les HSP70 sont surexprimées dans les muscles abdominaux, durant les jours précédents la mue (Cesar and Yang, 2007). Chez le homard (*Homarus americanus*), la production de HSP70 n'est pas significativement changée dans les muscles abdominaux mais est significativement induite juste avant la mue, dans les muscles des pinces (Spees et al., 2003). En revanche, pour la crevette *Exopalaemon carinicauda*, le niveau d'expression ne change pas significativement dans les muscles, que ce soit avant ou après la mue. Étonnamment, c'est dans les branchies que les HSP70 sont particulièrement surexprimées, ponctuellement dans les 5 minutes suivant la mue (Gao et al., 2016).

Influence du sexe des individus: Quelques études concernant le niveau d'expression des HSP70 ont également porté sur le sexe des organismes étudiés. Chez le papillon *Plutella xylostella* (Lepidoptera), la cochenille *Ericerus pela* (Hemiptera) ou la daphnie (*Daphnia magna*, Branchiopoda) les niveaux d'expressions observés sont significativement plus élevés chez les femelles adultes que chez les mâles (Liu et al., 2014a; Mikulski et al., 2011; Sonoda et al., 2006). Les profils d'expression basaux sont également très variables en fonction du sexe des individus chez *E. pela* et la daphnie *D. magna* où les femelles expriment plus abondament les gènes de hsp70 que les mâles lors de stress thermique élevé (Liu et al., 2014a; Mikulski et al., 2011).

#### 1.2.2 Intérêts des HSP70 en biologie et en médecine

## 1.2.2.1 Utilisation des HSP70 comme biomarqueur de stress global

Les propriétés d'induction des HSP70 lors de variations de paramètres environnementaux naturels, en présence de xénobiotiques ou lors d'infections pathogènes ont révélé leur intérêt en tant que biomarqueur en écologie, en toxicologie de l'environnement et en aquaculture (Kiang and Tsokos, 1998; Sanders, 1993). En effet, les HSP70 sont utilisées pour évaluer la qualité du milieu de vie et appréhender ainsi l'évolution de l'écosystème (Triebskorn et al., 2002).

L'étude de l'impact de la pollution sur les écosystèmes commence par le choix des organismes de référence, généralement fouisseurs et/ou aquatiques. Ce choix peut se porter sur des espèces modèles comme par exemple le nématode Caenorhabditis elegans (Boyd et al., 2012; Guven and De Pomerai, 1995) ou le poisson zèbre *Danio rerio* (Hallare et al., 2005) dont la physiologie, le développement et la génétique comptent parmi les plus étudiés. Ces espèces modèles permettent le développement de méthodologies très spécifiques et sensibles pour évaluer la qualité de l'environnement. Une de ces méthodes consiste à mettre en contact des œufs de D. rerio fertilisés avec un échantillon d'eau à analyser, le niveau d'expression des HSP70 est ensuite mesuré afin de déterminer le niveau de stress des embryons (Hallare et al., 2005). Ces organismes modèles peuvent également subir des modifications génétiques, afin d'élaborer des outils transgéniques optimisés pour les tests de toxicologie (Guven et al., 1994; Halloran et al., 2000). Cependant, un des avantages de l'utilisation des HSP70 est sa grande conservation dans le vivant, et donc une possibilité d'utilisation aisée sur une grande variété d'organismes parfois peu étudiés en laboratoire. Cette particularité permet également l'utilisation d'un même lot d'anticorps anti-HSP70 pour des espèces phylogénétiquement très éloignées, comme les crabes, moules, oiseaux, algues vertes et rouges (Lewis et al., 1999). L'utilisation des HSP70 pour l'évaluation de la pollution de l'environnement a donc été largement développée chez de nombreuses espèces telles que les éponges (Efremova et al., 2002; Wiens et al., 1998), méduses (Schroth et al., 2005), oursins (Pinsino and Matranga, 2015), moules (Hamer et al., 2004; Radlowska and Pempkowiak, 2002), gastéropodes (Downs et al., 2001), chironomes (Morales et al., 2011), drosophiles (Gupta et al., 2007), et poissons (Ceyhun et al., 2010; Ribecco et al., 2012; Webb and Gagnon, 2009; Xing et al., 2013).

L'implication des HSP70s dans le système immunitaire et par conséquent leur induction face à des stress biotiques leur permet également d'être utilisées comme biomarqueur de maladie chez divers organismes marins (Domeneghetti et al., 2014; Roch, 1999; Rungrassamee et al., 2010). Par exemple, l'utilisation des HSP70s comme biomarqueurs de stress biotiques est actuellement étudiée pour la détection et la prévention des infections chez les crustacés (Rungrassamee et al., 2010), les poissons (Plant et al., 2009) et plus particulièrement chez les bivalves (Nikapitiya et al., 2014).

Comme précédemment développé dans les parties 1.1.3 et 1.2.1.1, l'état et l'intensité de stress thermiques sont reflétés par l'induction des HSP70s. Ces dernières sont donc également utilisées comme biomarqueur dans le cadre particulier des études sur le réchauffement climatique. Cette démarche a été appliquée sur huit populations d'amphipodes du genre *Niphargus* dans l'une des premières investigations sur les conséquences cellulaires d'un réchauffement global (Colson-Proch et al., 2010). Les HSP70s, et plus largement les HSR, sont également employées pour établir de premières prédictions de la redistribution géographique d'un plus large spectre d'espèces (Tomanek, 2010). Les HSP70s sont également utilisées pour l'étude de l'impact des réchauffements saisonniers sur les écosystèmes littoraux (Madeira et al., 2012) ou sur des espèces plus ciblées (Farcy et al., 2009; Madeira et al., 2016, 2015).

Cependant, le manque de spécificité de l'induction des HSP70 en fait un biomarqueur discuté dans le domaine de l'écotoxicologie (De Pomerai, 1996; Gupta et al., 2010; Pyza et al., 1997) ou plus

#### 1 Introduction generale

généralement en physiologie et en biologie cellulaire (Gupta et al., 2010; Morris et al., 2013; Nollen and Morimoto, 2002). En effet, ces auteurs mettent en garde contre la variété et la complexité des signaux cellulaires dans lesquels sont impliquées les HSP70, leur utilisation nécessitant donc une connaissance approfondie de ces voies de signalisation afin d'éviter toute erreur d'interprétation des analyses (Gupta et al., 2010; Morris et al., 2013; Nollen and Morimoto, 2002). De plus, la sensibilité des HSP70 à de nombreux facteurs impose un contrôle rigoureux des paramètres expérimentaux, un choix éclairé des organes étudiés, ainsi que l'utilisation de biomarqueurs complémentaires (métallothionéine ou cytochrome P450 par exemple), afin de définir précisément la nature du stress observé (De Pomerai, 1996; Gupta et al., 2010; Pyza et al., 1997). Enfin, il est rappelé que les méthodes de détection immunologiques des HSP70 sont peu spécifiques et ne permettent pas de discrimination entre les différentes formes de cette famille (De Pomerai, 1996; Lewis et al., 1999; Pyza et al., 1997).

## 1.2.2.2 Applications potentielles des HSP70 en médecine

Malgré leur forte implication dans les voies de signalisation de la réponse immunitaire, c'est leur rôle dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la dissociation des agrégats protéiques qui a permis aux HSP70s d'être considérées comme des molécules particulièrement intéressantes dans le domaine de la médecine. En effet, les travaux parus ces dernières années dans la littérature scientifique portent de façon croissante sur ces chaperonnes comme cible d'intérêts thérapeutiques contre les maladies neurodégénératives et les cancers.

HSP70 et maladies neurodégénératives. Les caractéristiques communes de nombreuses maladies neurodégénératives sont une déficience des mécanismes de contrôle de l'intégrité des protéines, et par conséquent, une accumulation de protéines dénaturées dans le cerveau. Ces dernières vont alors s'assembler entre elles et/ou avec d'autres protéines, pour former des agrégats constituant des corps d'inclusion toxiques pour les neurones et entrainent la disparition progressive de ces cellules (Turturici et al., 2011). Chaque type de maladie est associé à des accumulations de protéines particulières, recensées brièvement dans le **Tableau 1.7**. Les capacités des HSPs, et en particulier des HSP70, à dissocier les agrégats protéiques et à favoriser la survie cellulaire dans la balance des signaux pro- et anti-apoptotiques en font ainsi une cible privilégiée dans les traitements (« chaperonotherapy ») contre ces maladies neurodégénératives. En effet, dans de nombreux cas, la formation de ces agrégats est associée à une diminution de l'expression ou de la quantité de HSPs, mais plus étonnamment, peut également être corrélée à leur surexpression/surproduction. Ces données confirment que ces chaperonnes sont largement impliquées dans les mécanismes d'évolution de ces maladies (Fontaine et al., 2016; Gammazza et al., 2016).

Tableau 1.7: Maladies neurodégénératives et agrégats protéiques associés. D'après Turturici et al., 2011

Maladie	Type d'inclusion	Protéines anormales associées	
Maladie d'Alzheimer	Plaques neuritiques extracellulaires	Protéines Aβ	
Maladie de Parkinson	Enchevêtrement neurofibrillaire cytosolique Corps de Lewy	Tau α-synucléine	
Famille des scléroses latérales amyotrophiques	Inclusions intracellulaires	Superoxyde dismutase Cu/Zn	
, 1 1		(SOD1)	
Maladie de Huntington Ataxie cérébelleuse de type 1, 2 et 3	Inclusions nucléaires et cytosoliques Inclusions nucléaires	Huntingtine Ataxine 1, 2 et 3	
Ataxie cerebeneuse de type 1, 2 et 3 Atrophie musculaire spinale et bulbaire (Maladie de Kennedy-Alter-Sung)	Inclusions nucléaires	Récepteurs androgènes	

HSP70 et cancer. Les HSPs participent aux signaux anti-apoptotiques et peuvent être impliquées dans la survie, la prolifération et la migration des cellules tumorales ou la formation de métastases. Elles sont impliquées dans de nombreux cancers, et leur surexpression est significativement corrélée à des phénomènes de résistance aux thérapies et à un faible taux de survie. Dans cette optique, la médecine s'intéresse aux substances capables de cibler l'action des HSPs (Lianos et al., 2015). Au moins 8 formes de HSP70 sont impliquées dans l'initiation et le développement de cancers (Sherman and Gabai, 2015). L'intervention des HSP70 dans les mécanismes de réparation de l'ADN confère aux cellules cancéreuses une résistance importante contre les chimiothérapies. En effet, certains agents actifs utilisés pour ce type de traitement altèrent l'ADN pour inhiber sa réplication. Ainsi, l'inactivation des gènes par « knockdown » de hsp70 dans les lignées cellulaires cancéreuses accroit significativement l'efficacité des chimiothérapies (Kotoglou et al., 2009; Yoshidomi et al., 2014). Plus particulièrement, les HSP70 et HSP90 sont impliquées dans l'activation et la stabilisation de la protéine WASF3, promotrice de métastases dans des cancers du sein et de la prostate. Ces lignées cellulaires cancéreuses « knockdown » pour les hsp70 ne présentent alors plus de caractères invasifs (Teng et al., 2012).

Les HSP70 présentent des intérêts multiples en médecine comme en écologie ou en écotoxicologie. Cependant, elles constituent une famille protéines qui, malgré une forte conservation dans le monde vivant, présentent des caractéristiques singulières et des spécialisations fonctionnelles. La prochaine partie de mon manuscrit s'intéressera donc à la conservation et surtout à la diversité des HSP70, qui demeurent néanmoins mal connues en dehors du cadre de quelques espèces modèles.

#### 1.3 Conservation et diversite des HSP70

# 1.3.1 La famille des HSP70s : Spécificités et rôles

Les HSP70 sont ubiquistes et ont été détectées dans les trois grands règnes du vivant : Archaea, Bacteria et Eukaryota. Elles font également partie des protéines connues les plus conservées avec au minimum 50 % d'identité protéique entre les DnaK de Methanosarcina mazei (Archaea), Escherichia coli (Bacteria) et les HSP70 eucaryotes de levures (Saccharomyces cerevisiae), végétaux (Zea mays) ou animaux (Homo sapiens) (Boorstein et al., 1994). Chez les eucaryotes, on distingue plusieurs membres dans la famille des HSP70 en fonction de leur localisation cellulaire : les HSP70 cytosoliques (Cyt-HSP70), du réticulum endoplasmique (RE-HSP70), mitochondriales (Mit-HSP70) et chloroplastiques (Chl-HSP70). La comparaison des séquences protéiques met en évidence des pourcentages d'identité particulièrement élevés entre les HSP70 mitochondriales, chloroplastiques et les DnaK procaryotes d'une part et entre les HSP70 cytosoliques et du réticulum endoplasmique d'autre part (Tableau 1.8). Cette particularité confirme la théorie actuelle d'une origine commune entre bactéries et organites cellulaires eucaryotes (Boorstein et al., 1994; Craig et al., 1993; Karlin and Brocchieri, 1998).

Tableau 1.8: Pourcentages d'identité entre différents membres de la famille des HSP70. Les séquences protéiques de HSP70 cytosolique (GenBank: AAB59186), mitochondriale (GenBank: AAA28628) et du réticulum endoplasmique (GenBank: AAA28626) sont issues de Drosophila melanogaster, la HSP70 chloroplastique (GenBank: CAA44160) provient de l'algue rouge Porphyra purpurea et la DnaK (GenBank: P0A6Y8) de Escherichia coli. Adapté d'après (Boorstein et al., 1994)

	Cyt-HSP70 (D. melanogaster)	RE-HSP70 (D. melanogaster)	Mit-HSP70 (D. melanogaster)	Chl-HSP70 (P. purpurea)
RE-HSP70 (Drosophila. melanogaster)	64	-	-	-
Mit-HSP70 (Drosophila melanogaster)	53	54	-	-
Chl-HSP70 (Porphyra purpurea)	54	52	65	-
DnaK (Escherichia coli)	51	53	65	66

## 1 Introduction generale

La distinction entre les différents membres de cette famille n'est pas toujours clairement explicitée dans les annotations de séquences des banques de données internationales. Elles sont parfois uniquement nommées HSC70 ou HSP70, mais leur nomenclature peut également être complexifiée par des dénominations propres à différents taxa. Les HSP70s du réticulum endoplasmique sont nommées Kar2 chez la levure ; *Luminal binding protein* chez les végétaux ; HSC-3 chez les insectes ; Grp78 chez les mollusques ; et Bip ou Grp78 chez les vertébrés. Les HSP70s mitochondriales peuvent également être annotées en tant que SSC1, SSC3 ou SSQ1 chez la levure ; HSC-5 chez les insectes ; et Grp75, mortalin ou HSPA9 chez les vertébrés. Pour les HSP70s cytosoliques la nomenclature est souvent plus simple, à l'exception des SSA et SSB de levure, elles sont retrouvées sous les termes de HSP70 (ou HSC70) parfois suivis de numéros plus ou moins cohérents entre les différents taxa. Chez l'être humain, l'annotation des différentes HSPs est devenue si complexe que la nomenclature entière a été remaniée pour faciliter les recherches (Kampinga et al., 2009; Tavaria et al., 1996). A défaut d'une nomenclature homogène des HSP70 pour l'ensemble des eucaryotes, des consignes d'annotation sont spécifiées aux auteurs (Bross and Tanguay, 2016).

Les HSP70 cytosoliques et du réticulum endoplasmique sont reconnaissables par des motifs *signature* très conservés à leur extrémité C-terminale, respectivement [IV]EEVD et [HK]DEL. Au contraire, les extrémités C-terminales des autres types de HSP70 et DnaK sont plus variables (**Figure 1.12**).

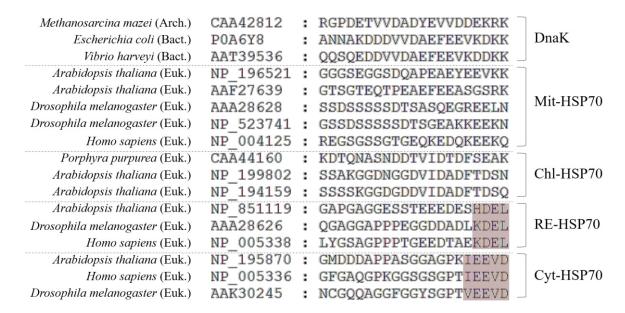


Figure 1.12 : Alignement des extrémités Carboxy-terminales pour les DnaK et les HSP70 eucaryotes. Les DnaK sont représentées par trois espèces appartenant aux archées (Arch.) et aux bactéries (Bact.). Les séquences de HSP70 eucaryotes (Euk.), localisées dans différents compartiments cellulaires, sont issues de phyla éloignés pour illustrer leur diversité ou leur conservation : Arthropoda (D. melanogaster), Mammalia (H. sapiens), Rhodophyta (P. purpurea), Streptophyta (A. thaliana). Les motifs signatures encadrés en rouge sont caractéristiques des HSP70 cytosoliques et du réticulum endoplasmique.

Les fonctions de chaperonne des HSP70, décrites dans la partie 1.1.2.4, sont globalement communes à tous les membres de la famille. Quelques spécialisations sont tout de même à noter car leurs localisations dans le réticulum endoplasmique, la mitochondrie ou les chloroplastes les isolent physiquement de partenaires potentiels. Tout d'abord, leur rôle est primordial dans la translocation des

protéines à la membrane, et dans la formation de complexes protéiques dans la lumière/matrice de leurs organites respectifs (Verghese et al., 2012; Yalovsky et al., 1992). Les RE-HSP70 sont également particulièrement impliquées dans le repliement des protéines néosynthétisées et sont parfois indispensables pour l'acquisition de leur conformation active (Simons et al., 1995). De plus, elles n'interagissent pas avec les mêmes types de co-chaperonnes, qui sont également spécifiques à chaque compartiment cellulaire. Par exemple, il existe plusieurs types de HSP40 avec des localisations cellulaires prédéterminées, qui assistent chaque type de HSP70 à être plus spécifique de son type de substrats. A l'opposé, tous les types de HSP ne sont pas représentés dans chaque compartiment : les HSP100, 90 et 60 kDa sont absentes de la lumière du réticulum endoplasmique (Verghese et al., 2012). Les HSP70 des organites ne peuvent pas participer directement aux voies de dégradation protéique, majoritairement lysosomales ou cytosoliques (protéasome, complexe de dégradation assisté par la HSP100). Les RE-HSP70 participent néanmoins au « contrôle qualité » des protéines néosynthétisées et prennent en charge les peptides malformés jusqu'à la membrane pour les diriger vers le protéasome via la voie de signalisation ERAD (ER-assiociated degradation) (McCracken and Brodsky, 1996). Dans les mitochondries, les protéines dénaturées sont prises en charge par la HSP78, homologue mitochondriale des Clp (famille des HSP100), afin d'éviter leur agrégation (Schmitt et al., 1995). Leur éventuelle dégradation est réalisée par une protéase particulière aux mitochondries, la Pim1 (proteolysis in mitochondria) (Wagner et al., 1994).

Pour ces différents types de HSP70, on peut établir un niveau de classification supplémentaire parmi leurs différents homologues. Les HSP70 cytosoliques sont de loin les plus diversifiées dans leur famille. Si cette diversité est bien connue pour certaines espèces modèles, elle demeure souvent confuse dans la plupart des espèces du monde animal. Le prochain chapitre s'intéressera à l'état de l'art concernant la diversité des HSP70 cytosoliques pour ces espèces modèles, et plus particulièrement chez les arthropodes.

# 1.3.2 Diversité des HSP70 cytosoliques

#### 1.3.2.1 HSP70 et HSC70

Les HSP70 présentent des profils d'expression caractéristiques que l'on place dans deux catégories : les HSC70 constitutives (*Heat Shock protein Cognate* 70 kDa) et les HSP70 inductibles. Ces particularités d'expression ont été mises en évidence chez la drosophile rapidement après la découverte des HSP70. Le premier gène de HSC70 décrit s'avéra plus longs d'environ 80 bases que ceux des HSP70, et son niveau d'expression est apparu similaire en conditions normales ou lors de stress thermique (Ingolia and Craig, 1982). L'expression des hsc70 est néanmoins régulée pendant le développement et présente, pour certaines formes, des niveaux bien plus élevés chez l'adulte par rapport aux stades embryonnaire (Craig et al., 1983). De manière générale, les gènes de HSC70 sont définis comme ayant des niveaux d'expression élevés et assez stables en conditions normales, et non inductible lors de stress. A l'inverse, les gènes de HSP70 sont décrits comme très peu exprimés en conditions normales et hautement induits en conditions stressantes (Palter et al., 1986). Par exemple, chez *Drosophila melanogster*, plusieurs formes de HSP70 inductibles et de HSC70 constitutives sont identifiées dans le cytosol, ces deux sous-types présentant 72 à 75 % d'identité dans leurs séquences protéiques (Rubin et al., 1993).

Au fur et à mesure des caractérisations des HSC70 et HSP70, la question de l'inductibilité ou non des HSC70 est devenue plus complexe. Par exemple, chez la moule *Mytilus galloprovincialis* ou la crevette *Fenneropenaeus chinensis*, les HSC70 montrent bien des profils constitutifs en cas de stress

#### 1 Introduction generale

thermiques, mais également une induction significative face à des expositions aux métaux (Franzellitti and Fabbri, 2005; Luan et al., 2010). De plus, les HSP70 peuvent présenter des profils d'expression différents lors de stress thermiques en fonction des tissus analysés, et peuvent donc être à la fois inductibles et constitutives selon l'organe étudié (Liu et al., 2004; Xiu et al., 2014). Enfin, l'induction des HSP70 face aux stress thermiques dépend également de la thermotolérance et de la température d'acclimatation de l'organisme étudié (cf partie 1.1.3) (Dong et al., 2008; Farcy et al., 2009; Selvakumar and Geraldine, 2005; Ulmasov et al., 1992).

Malgré le fait qu'aucune particularité structurale des HSP70 n'a encore pu être corrélée avec le caractère inductible ou constitutif de leur expression, certains auteurs annotent leurs séquences en fonction de proximité phylogénétique avec des HSP70/HSC70 connues. Cette pratique est même parfois encouragée (Mestre et al.. 2015). Cependant, cette approche rend les notions d'inductibilité/constitutivité des HSP70 ambigües, en tenant compte des profils d'expressions obtenus (Chuang et al., 2007; Wu et al., 2008; Xiu et al., 2014). Des études récentes émettent l'hypothèse que l'inductibilité des HSP70 est un caractère acquis à plusieurs reprises pendant l'évolution, cette caractéristique ne serait alors définitivement pas pertinente pour la classification de ces chaperonnes (Krenek et al., 2013; McCallister et al., 2015).

#### 1.3.2.2 Etudes réalisées sur les espèces modèles

Les HSP70 cytosoliques sont particulièrement étudiées dans les réponses aux stress environnementaux chez les organismes marins et les insectes terrestres présentant un intérêt écologique (mollusques filtreurs sentinelles, insectes pollinisateurs) et économique (bivalves et crustacés d'aquaculture, vers à soie). Cependant, les recherches s'intéressent majoritiarement à l'expression de certains membres de la famille, sans rendre compte de façon exhaustive de leur diversité. Les fortes homologies retrouvées chez les HSP70 cytosoliques compliquent les recherches en biologie moléculaire, rendant l'amplification spécifique de certains membres de la famille compliquée, en particulier pour ceux dont l'expression est très ponctuelle.

C'est pourquoi la diversité des HSP70 cytosoliques est essentiellement connue pour les organismes modèles. Leurs génomes et transcriptomes sont souvent largement étudiés par des méthodes de séquençage haut débit et sont bien assemblés et annotés.

Chez l'être humain, les HSP70 cytosoliques sont codées par 6 ou 7 gènes, et annotées (selon la nomenclature de 2009) comme HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA6, HSPA8 et HSPA7 encore soupçonnée d'être un pseudogène (Brocchieri et al., 2008; Kampinga et al., 2009). Des orthologues à ces différentes formes de HSP70 sont également observés chez de nombreux vertébrés (Brocchieri et al., 2008; Daugaard et al., 2007). Comme cela a pu être observé chez d'autres espèces, les gènes codant les HSP70 cytosoliques présentent des niveaux d'expression très variables et sont spécifiques à certains tissus (**Figure 1.13**). La raison de cette diversité dans la famille est difficile à déduire, mais pourrait être due à des capacités d'induction variables face aux stress. En effet, les HSPA1A, HSPA1B et HSPA6 sont inductibles, alors que les HSP70A1L, HSP70A2 et HSP70A8 ne le sont pas (Daugaard et al., 2007). On peut remarquer que les gènes de HSP70 humaines ne suivent pas les critères d'expression des formes constitutives ou inductibles, définies à partir du modèle *D. melanogaster* (HSPA1A et HSPA1B, **Figure 1.13**).

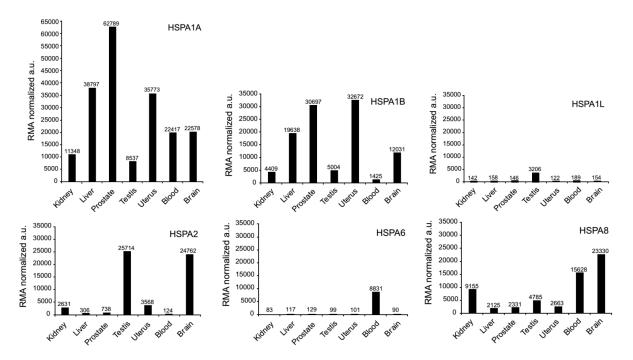


Figure 1.13: Niveaux d'expression pour différentes formes de HSP70 cytosoliques humaines. L'expression des hsp70s est représentée sur des échelles équivalentes pour différents types tissulaires (de gauche à droite : rein, foie, testicules, utérus sang et cerveau) en condition non stressante. Les valeurs d'expression (unité arbitraire) sont définies par la méthode de normalisation RMA (Robust Multi-Array) par rapport au gène codant la GNF1h. Les niveaux d'expression correspondant à la HSP70A7 ne sont pas représentés. D'après (Daugaard et al., 2007), adaptées des données de The Genomics Institute of the Novartis Research Foundation Gene Expression Database SymAtlas (Su et al., 2004)

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 6 formes de HSP70 cytosoliques sont classées en 2 groupes : les SSA et les SSB. Les SSA comprennent 4 homologues (SSA1 à SSA4), spécialisées dans le repliement de protéines dénaturées et leur translocation dans la cellule. Les SSA3 et SSA4 sont uniquement détectables en conditions stressantes. A l'opposé, la SSA2 est constitutive, exprimée de façon importante en condition normale de croissance, mais n'est pas induite par des stress, et la SSA1 montrent des caractéristiques d'expression à la fois inductible et constitutive (niveau basal élevé et induction pendant les stress). Les SSB (1 et 2) sont quant à elles spécialisées dans le repliement de protéines néosynthétisées. Observée à des niveaux modérés en conditions normales de croissance, l'expression de leurs gènes est réprimée lors de stress thermiques (Boorstein et al., 1994; Verghese et al., 2012; Werner-Washburne and Craig, 1989).

De nombreuses séquences de HSP70 du poisson zèbre *Danio rerio* (espèce modèle en biologie du développement) sont disponibles dans les bases de données internationales. Pourtant, aucune étude ne s'est encore intéressée à la diversité de ces chaperonnes et à leur classification au sein de l'espèce. Les différentes formes répertoriées sont souvent annotées en fonction de la classification réalisée chez l'être humain. Une étude récente s'est appuyée sur de nombreuses séquences de poissons, dont celles de *D. rerio*, pour analyser la diversité des paralogues de HSP70 chez les téléostéens (infra-classe Teleostei) (**Figure 1.14**). Cette analyse met en évidence l'existence de trois grands types de HSP70 cytosoliques annotées HSP70-1, HSP70-2 et HSP70A8 (Metzger et al., 2016). Le positionnement des différentes séquences de *D. rerio*, montre également un minimum de 5 homologues distincts pour cette espèce. Plusieurs séquences du groupe hsp70-2 pourraient représenter différents allèles ou une subdivision supplémentaire de ce même groupe.

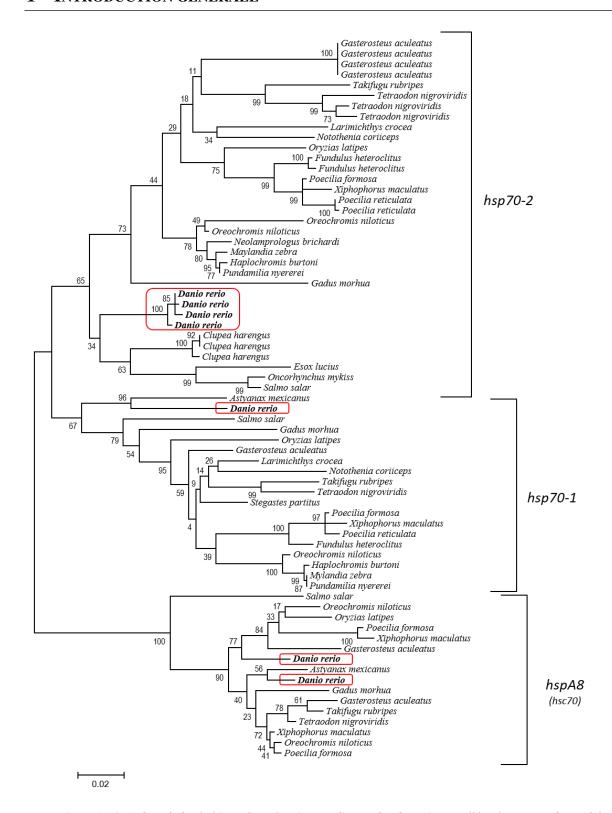


Figure 1.14 : Arbre phylogénétique des HSP70-cytosoliques chez les poissons téléostéens. L'analyse a été réalisée à partir de séquences traduites, par la méthode de maximum de vraisemblance, les valeurs de bootstrap pour chaque nœud sont représnetatives de 1500 réplications. L'arbre a été enraciné avec les séquences de HSP70A8. Les séquences de Danio rerio sont mises en évidence par des encadrés rouges. Modifié d'après (Metzger et al., 2016)

Chez *Drosophila melanogaster*, on distingue deux types de HSP70 cytosoliques constitutives (HSC70-1 et HSC70-4) et deux types de HSP70 inductibles, la HSP68 et les HSP70 (Rubin et al., 1993). Les gènes de HSP70 sont organisés en deux *clusters* de copies répétées dans le génome, on distingue ainsi deux formes codant les HSP70A (Aa et Ab) et trois formes codant les HSP70B (Ba, Bb et Bc). Le nombre de copies dans chaque *cluster*, variable au sein du genre *Drosophila*, est potentiellement lié à l'activité d'éléments transposables (Bettencourt and Feder, 2001; Maside et al., 2002).

La drosophile est la plus étudiée et représente le seul modèle de référence chez les arthropodes. Pourtant, le phylum Arthropoda est le plus vaste du règne animal (Koenemann et al., 2010). Il est composé de 3 principaux sous-phyla: Chelicerata, Myriapoda et Pancrustacea. Les pancrustacés forment un taxa régulièrement réorganisé, regroupant Hexapoda, Multicrustacea et Oligostraca (représenté notamment par les ostracodes, des crustacés microscopiques). Le taxa Multicrustacea inclut les malacostracés, ainsi que les copépodes et thecostracés, auparavant considérés comme des maxillopodes. Le positionnement des branchiopodes demeure discuté, considéré comme groupe frère des hexapodes, il peut également se révéler plus proches des multicrustacés selon les analyses (**Figure 1.15**) (Oakley et al., 2013; Regier et al., 2010).

Les séquences de HSP70 d'arthropodes présentes dans les bases de données internationales sont principalement issues des chélicérates, hexapodes et multicrustacés (dont une majorité de HSP70 de branchiopodes, copépodes et malacostracés). Jusqu'aux années 2000, la majorité des recherches portaient sur l'expression d'1 ou 2 formes de HSP70 par espèce (considérées comme HSP70 et HSC70), ce qui a sans doute limité les études concernant leur diversité. Chez les chélicérates, le premier article concernant la diversification et l'évolution des HSP70 chez des espèces non-modèles est paru en 2007 (Starrett and Waters, 2007). La même année, (Leignel et al., 2007) mettait en évidence un nouveau sous groupe de HSP70 chez les crabes Bythograeidea et Xanthidea. Depuis, plusieurs études se sont intéressées à l'existence de diverses formes de HSP70 cytosoliques chez différentes espèces (Cascella et al., 2015; Chen et al., 2015; Cottin et al., 2010; Li et al., 2009; Liu et al., 2014b; Lu et al., 2016; Luan et al., 2010; Zhang et al., 2015). Malgré cela, la diversité des HSP70 à l'échelle des arthropodes demeure encore méconnue.

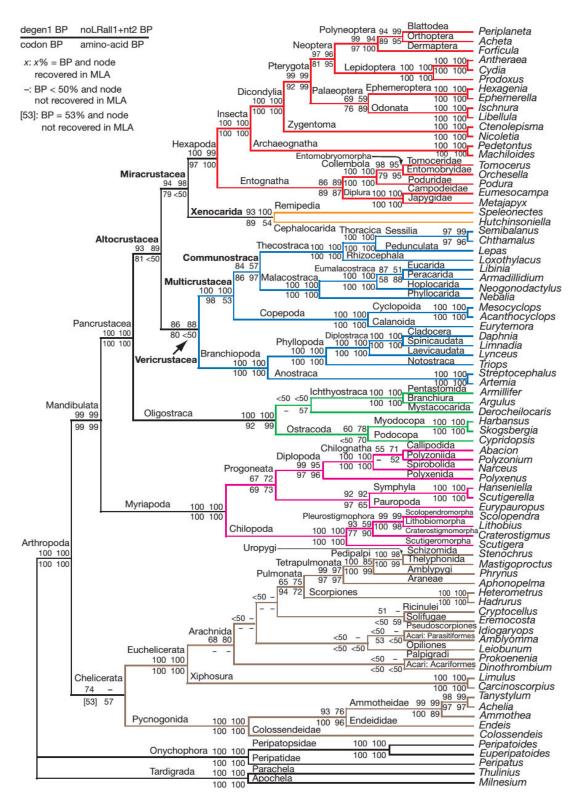


Figure 1.15 : Arbre phylogénétique représentant les relations de parenté entre des espèces représentatives du phylum Arthropoda. L'analyse a été réalisée par plusieurs approches de maximum de vraisemblance, sur un alignement de 62 séquences nucléiques codantes issues de 75 espèces d'arthropodes et 5 espèces formant le groupe externe. D'après Regier et al., 2010.

# 1.4 OBJECTIFS DE LA THESE

Ces travaux de recherche ont eu pour objectif principal l'étude de la diversité des HSP70 cytosoliques chez les crustacés et plus largement au sein du phylum Arthropoda. Dans la continuité de l'étude de (Leignel et al., 2007), la première étape de cette thèse de doctorat a été la caractérisation de séquences représentatives de nouveaux types de HSP70 cytosoliques. Ces recherches ont tout d'abord été effectuées chez les brachyoures (Leignel et al., 2007), puis dans les taxa phylogénétiquement proches des astacidés et des anomoures (Figure 1.16). Ce travail a été complété par la recherche de séquences de HSP70 cytosoliques dans les transcriptomes et génomes disponibles dans les bases de données internationales. Les génomes et transcriptomes de référence étant encore rares chez les crustacés mais particulièrement abondants pour les insectes, ces travaux se sont donc étendus au phylum Arthropoda. La démocratisation du séquençage haut débit ces dernières années a ensuite permis l'accès progressif à des données génomiques et transcriptomiques de plus en plus complètes et grandissantes, chez les chélicérates et les malacostracés. La deuxième étape de ces recherches a été de retracer les liens de parenté des HSP70 cytosoliques pour l'ensemble du phylum. Ceci a permis de proposer un scénario évolutif et de donner un aperçu global de la diversité des HSP70 cytosoliques chez les arthropodes.

Le second objectif de ces recherches a été d'aborder la fonctionnalité des HSP70 pour les différents groupes précédemment décrits. Afin d'évaluer l'expression de chaque forme, des expériences de stress thermiques ont donc été réalisées chez plusieurs espèces proches de décapodes, invasives (considérées comme résistantes aux variations environnementales) ou sensibles. Pour terminer, cette étude s'est intéressée à la production protéique de HSP70 cytosoliques complètes comme travail préliminaire à des tests d'efficacité des différentes formes. Ces dernières étapes d'expérimentation, additionnée d'une revue méticuleuse de la littérature, ont eu pour objectif la description des particularités fonctionnelles pour les différents sous-groupes de HSP70 cytosoliques mis en évidence lors de ces travaux de recherche.

Les objectifs initiaux (**Figure 1.17**) de cette thèse ont été modulés en fonction des difficultés rencontrées et des résultats obtenus, et sous les conseils avisés d'un comité de suivi de thèse composé de Myriam Harry (professeur à l'université Paris Sud) et de Marcel Koken (chargé de recherche à Labocea-CNRS de Plouzané).

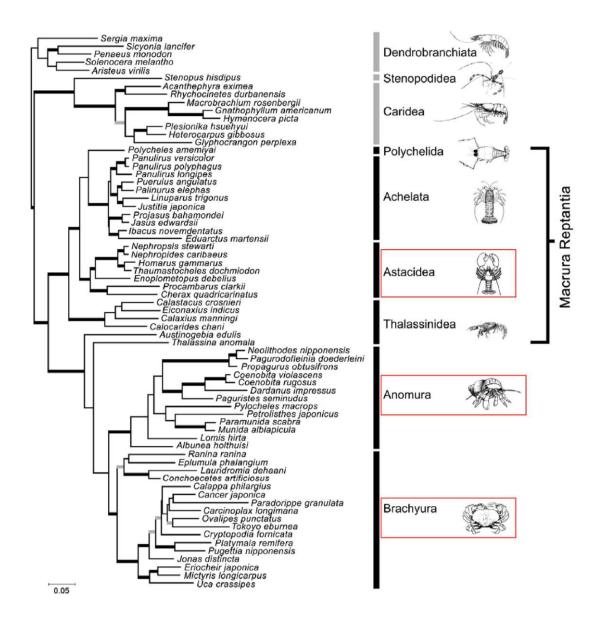


Figure 1.16: Relations de parenté des différents taxa appartenant à l'ordre Decapoda (Malacostraca). Les espèces utilisées pour la caractérisation des nouveaux types de gènes de HSP70 ont été choisies parmi les brachyoures et les infraordres proches: Anomura et Astacidea (encadrés en rouge). Les branches épaisses sont soutenues de façon significative les analyses de maximum de vraisemblance et d'inférences bayésiennes. D'après Tsang et al., 2008

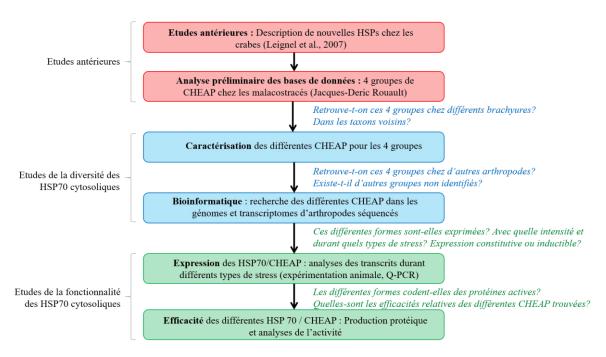
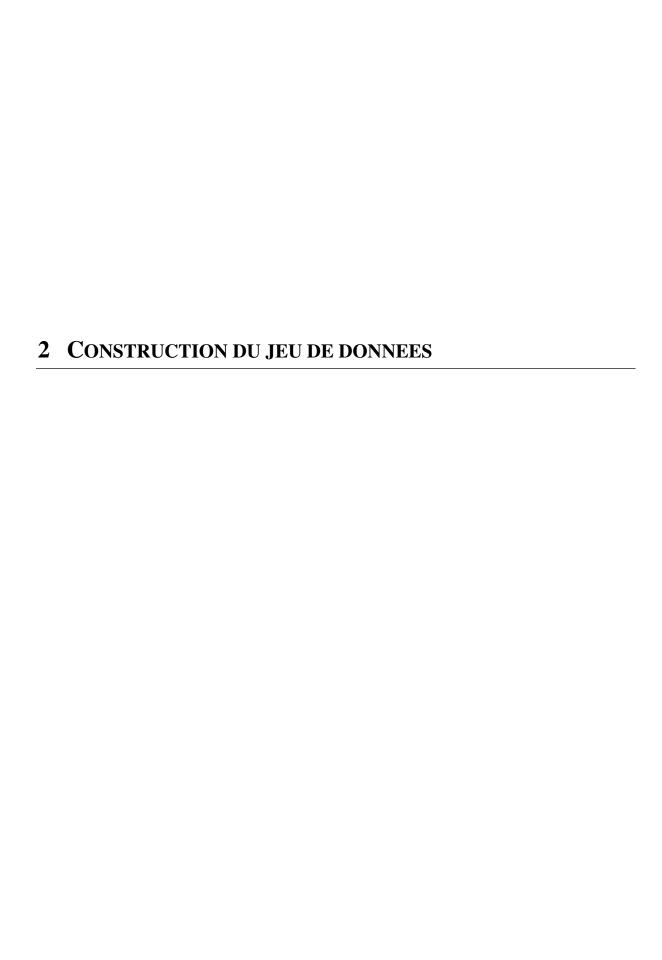


Figure 1.17 : Schéma des objectifs initialement prévus pour les travaux de recherche et questionnements associés.



L'étude de la diversité des HSP70 cytosoliques chez les Arthropodes a nécessité l'élaboration d'un jeu de données conséquent de plusieurs centaines de séquences, représentatives des principaux groupes tels que les arachnides, les insectes et les malacostracés. Les recherches ont été basées sur l'alternance de deux approches : le séquençage *de novo* de nouvelles formes de HSP70 cytosoliques par des techniques de biologie moléculaire et des recherches bioinformatiques dans les bases de données internationales. Les séquences progressivement obtenues ont été régulièrement analysées afin de définir leurs groupes d'appartenance et ainsi orienter progressivement les recherches.

# 2.1 CARACTERISATION PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE DE HSP70 CHEZ LES CRUSTACES

Les recherches ont débuté avec la caractérisation de séquences appartenant à un nouveau type de HSP70 cytosoliques chez de multiples brachyoures, dans la continuité de l'étude de (Leignel et al., 2007). Cette démarche a ensuite été étendue aux taxa voisins des astacidés et des anomoures.

## 2.1.1 Analyse préliminaire et définitions des amorces

Afin de préparer cette étude, une analyse de classification agrégative (cf. partie 3.1.1) a été réalisée à partir de 295 séquences de HSP70 cytosoliques de décapodes. Ce jeu de données préliminaire s'est basé sur des séquences issues des bases de données internationales et de 41 fragments amplifiés avec des amorces spécifiques des HSP70 cytosoliques d'invertébrés marins (amorces HS0, HS2 et HS3). Cette analyse préliminaire a permis de détecter quatre groupes de HSP70 cytosoliques présentant chacun des séquences issues d'un seul type de décapode (brachyoure ou astacidé). Néanmoins, cette première analyse a permis de définir un premier jeu d'amorces dégénérées, spécifiques ou communes à chacune de ces formes (**Figure 2.1**).

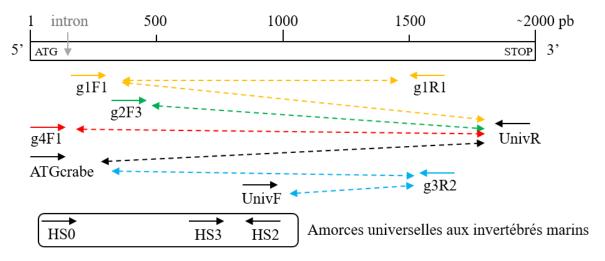


Figure 2.1 : Localisation des amorces sur la séquence codante de la HSP70 cytosolique. Les amorces définies à partir des différents groupes mis en évidence par l'analyse agrégative préliminaire sont localisées avec des flèches de différentes couleurs : groupe 1 (en jaune), groupe 2 (en bleu), groupe 3 (en vert) et groupe 4 (en rouge). Les flèches en noir représentent les amorces capables de s'hybrider avec chacune des formes. Les flèches en pointillés représentent les fragments amplifiés pour chaque couple d'amorce.

Au fur et à mesure de la construction du jeu de données, de nouvelles amorces ont été définies pour être spécifiques de certaines espèces, ou pour l'amplification de séquences complètes (au niveau du codon initiateur ATG et du codon stop). L'ensemble des amorces fonctionnelles utilisées est présenté dans l'Annexe 1.

## 2.1.2 Matériel biologique

Les 26 espèces de crabes ont été choisies afin d'être représentatives de l'infraordre Brachyura (Heterotremata et Thoracotremata). Elles appartiennent à des superfamilles de crabes marins échantillonnés sur le littoral français (Cancroidea, Majoidea, Portunoidea et Xanthoidea) ou issus de plusieurs régions du monde (Cancroidea, Leucosioidea, Ocypoidea et Portunidea). La collection s'est également étendue aux crabes marins hydrothermaux (Bythograeoidea), marins primitifs (Dromioidea et Homoloidea) et semi-terrestres (Grapsoidea). Les 7 espèces d'astacidés utilisées pour cette étude sont également représentatives de plusieurs superfamilles (Astacoidea, Enoplometopoidea et Nephropoidea), tandis que les 4 espèces d'anomoures appartiennent à la superfamille Galatheoidea (Annexe 2).

Plusieurs spécimens ont été collectées lors de campagnes océanographiques, menées sur des sites hydrothermaux de l'Est du Pacifique (Bythograea thermydron et Cyanagraea praedator, campagne HOPE 1999) et de la dorsale médio-Atlantique (Chaceon affinis et Segonzacia mesatlantica, campagne BioBaz 2012). Les espèces communes sur le littoral français ont été directement échantillonnées à Noirmoutier (GPS: 47.026073, -2.250086), Saint Enogat (GPS: 48.642000, 2.074227) et Saint Gildasde-Rhuys (GPS: 47.488567, -2.819185) (Atelecyclus undecimdentatus, Carcinus maenas, Galathea squamifera, Galathea strigosa, Munida rugosa, Necora puber, Pachygrapsus marmoratus, Pisidia longicornis et Xantho pilipes) ou achetées chez le poissonnier (Astacus astacus, Cancer pagurus, Homarus americanus, Homarus gammarus, Maia squinado, Nephrops norvegicus et Procambarus clarkii). Les Cancroidea américains (Cancer antennarius, Cancer productus et Metacarcinus magister) ont été prélevés en Californie (Bolinas Beach, GPS: 37.907484, -122.681650), tandis que d'autres espèces exotiques ont été achetées en animalerie (Enoplometopus debelius, Procambarus alleni, Perisesarma bidens). Le reste des échantillons a des origines multiples et sont issues de la collection du laboratoire (Allograea tomentosa, Austinograea rodriguezensis, Calappa granulata, Cardisoma armatum, Dromia personata, Gandalfus puia, Hemigrapsus nudus, Hemigrapsus sanguineus, Ocypode quadrata, Paromola bathyalis et Potamon potamios).

L'identification des espèces a été basée sur des critères morphologiques et/ou moléculaires avec l'amplification de fragment d'ADN mitochondrial codant la petite sous-unité ribosomique 16S (cf. amorces en **Annexe 1**). Chaque individu vivant a été congelé et stocké à -80°C pour les extractions d'ARN ou d'ADN ultérieures. Les spécimens ayant nécessité une période prolongée de transport ont été stockés dans l'éthanol absolu et utilisés uniquement pour les extractions d'ADN.

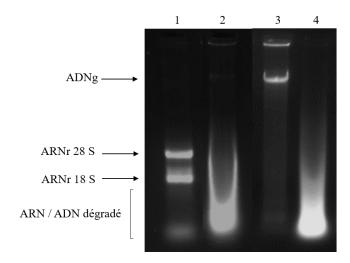
## 2.1.3 Démarche de biologie moléculaire

#### 2.1.3.1 Protocoles d'extraction des acides nucléiques

Extraction d'ADN génomique (ADNg). Le protocole utilisé pour l'isolement de l'ADN génomique a nécessité la préparation préalable d'une solution de lyse cellulaire au CTAB (*Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide*) composée d'une concentration finale de 100 mM de Tris-HCl et de 20 mM d'EDTA (*Ethylene Diamine Tetra acetic Acid*) ajustés à pH8, de 1,4 M de NaCl, de 2 % CTAB (m/v) et de 0,02 % (v/v) de β-mercaptoéthanol ajouté extemporanément pour chaque session

d'extraction. Les échantillons de 50 mg à 1 g de tissu musculaire, ou les organismes entiers pour les plus petits, ont été broyés dans un mortier stérile réfrigéré en présence d'azote liquide. Le broyat a ensuite été transféré dans des tubes stériles contenant 0,5 à 5 mL de solution de CTAB (en fonction de la masse des échantillons) préalablement incubé à 65°C. Chaque milieu a été incubé à 37°C pendant 30 min, puis additionné d'un volume équivalent d'un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 : 1) afin d'en isoler l'ADNg. Après agitation, chaque échantillon a été centrifugé 10 min à 15000 g et la phase aqueuse supérieure a été prélevée dans un nouveau tube. Cette étape a été effectuée une seconde fois pour éliminer d'éventuels résidus cellulaires. La précipitation de l'ADNg a été effectuée à froid (plusieurs heures à -80°C) après addition d'acétate de sodium 3M (1/10ème v/v) et d'éthanol absolu (2v/v). Après une centrifugation de 10 min à 15000 g, les culots d'ADNg obtenus ont été conservés, les surnageants éliminés, et lavés deux fois à l'éthanol 70°. L'excédent d'éthanol a été évaporé à la cloche à vide. Chaque échantillon a été repris dans 50 à 500 µL d'eau distillée ultra-pure stérile. La concentration de chaque extraction a été évaluée au nanodrop (Thermoscientific ®) par une mesure la densité optique (DO) à 260 nm. Les éventuelles contaminations protéiques ont été évaluées par le rapport de DO 260/280 et l'intégrité des molécules d'ADN a été vérifiée sur gel d'électrophorèse (Figure 2.2). Enfin, les échantillons ont été stockés à 4°C pour éviter toute dégradation due aux cycles de congélation/décongélation.

Extraction d'ARN et synthèse d'ADN complémentaire (ADNc): Les ARN totaux ont été extraits à partir de 50 mg de tissu branchial, ou à partir de l'intégralité de l'organisme pour les plus petits, et maintenus à 4°C afin de limiter la dégradation des transcrits. Chaque échantillon a été broyé dans un mortier stérile réfrigéré en présence d'azote liquide, puis transféré dans des tubes contenant 1 mL de solution TriReagent (Ambion ®). Les ARN ont ensuite été isolés en ajoutant 100 µL de BCP (1-Bromo-3-chloropropane), après une incubation de 30 min suivie d'une centrifugation de 15 min à 15000 g. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube stérile et les ARN totaux ont été précipités avec 500 μL d'isopropanol. Comme pour l'ADN, les culots ont été obtenus après centrifugation, élimination du surnageant et lavés deux fois à l'éthanol à 70°. Après 5 min sous la cloche à vide, les ARN totaux ont été dilués dans 20 µL d'eau ultra-pure stérile. Le dosage et le contrôle de la qualité des extraits ont également été effectués par mesure de la DO et une migration sur gel d'électrophorèse (Figure 2.2). Les ARN totaux ont été stockés à -80°C ou utilisés immédiatement après extraction pour la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse (Reverse Transcription). Afin d'éviter toute contamination d'ADN, 1 µg de chaque extraction a été traité à la DNase avec le kit RNase-Free DNase de Promega ® en suivant le protocole du fournisseur. La transcription inverse a été réalisée avec le kit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega ®) en présence de 0,5 µL d'hexamères aléatoires concentrés à 252,5 µM et de 1 µL d'oligodT-RACE. La polymérisation des ADNc s'est déroulée pendant 1h30 à 37°C suivie de 5 min à 70°C. Les échantillons ont été stockés à -20°C et utilisés rapidement pour les amplifications PCR.



Puit 1 : profil des ARN totaux intacts Puit 2 : profil des ARN totaux dégradés

Puit 3 : profil d'ADN intact Puit 4 : profil d'ADN dégradé

Figure 2.2: Profils électrophorétiques d'ARN totaux et d'ADNg dégradés ou intègres. Les profils d'ARN totaux intacts présentent deux bandes bien définies correspondant aux ARN ribosomiques 28S et 18S (puit 1). L'ADN est visible par la présence d'une bande unique de poids moléculaire élevé (puit 3). Les acides nucléiques dégradés montrent des profils électrophorétiques sous forme de trainée partant du front de migration du gel.

#### 2.1.3.2 Protocoles d'amplifications et de clonages des séquences nucléiques

Conditions d'amplifications par PCR (Polymerase Chain Reaction). Les volumes d'ADN fonctionnels pour l'amplification ont été préalablement optimisés par un test utilisant des amorces spécifiques de l'ubiquitine (Figure 2.3). Les amplifications ont été réalisées avec le kit GoTaq ® G2 flexi DNA polymerase (Promega ®). Pour chaque réaction, 100 à 200 ng d'ADN a été additionné à un mélange de 5 μL de tampon (5X), 2 μL de dNTP (2 mM), 1,5 μL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,12μL de Taq polymérase et 1,5 μL de chaque amorce (10 pmol.μL<sup>-1</sup>). De l'eau ultra-pure stérile a été ajoutée à chaque milieu réactionnel pour un volume final de 25 µL. Le programme d'amplification du thermocycleur a consisté en une phase de dénaturation de 5 min à 94°C, suivie de 35 cycles de dénaturation (45 s à 94°C), hybridation (45 s à Tm) et élongation (45 à 120 s à 72°C), et d'une étape terminale d'élongation de 2 min 30 s à 72°C. Les températures d'hybridation (Tm) ont été calculées pour chaque couple d'amorces (cf. Annexe 1 et les temps d'élongation ont été ajustés en fonction de la taille de l'amplicon. Les échantillons ont été accompagnés d'un témoin négatif (contenant de l'eau à la place de la matrice d'ADN) pour chaque couple d'amorces utilisé, afin de s'affranchir de biais de contaminations extérieures. Un témoin positif (contenant de l'ADN fonctionnel) a également été ajouté pour vérifier le bon déroulement de l'amplification PCR. Chaque bande amplifiée a ensuite été révélée au transilluminateur Ultra-Violet après une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % en présence BET (Bromure d'éthidium). Les tailles des amplicons attendues ont été comparées avec un marqueur de taille adéquat. En plus des amplifications PCR classiques avec des amorces spécifiques aux gènes de HSP70 cytosoliques, des amplifications en 3' RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction) ont été réalisées pour obtenir les parties terminales 3' des fragments obtenus. Cette méthode consiste à ajouter une cassette RACE (Annexe 1) aux oligodT lors de la synthèse des ADNc à partir des ARN messagers. Les amplifications PCR ont ensuite été réalisées avec une amorce spécifique au gène de HSP70 recherchée (sens forward) et une amorce complémentaire à la cassette RACE (sens reverse).

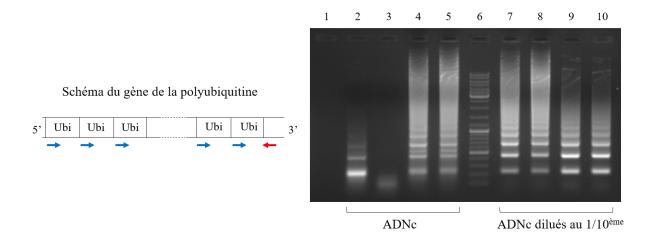


Figure 2.3: Principe de l'optimisation des volumes fonctionnels par des amplifications d'ubiquitine. Le gène de la polyubiquitine est composé d'une répétition de séquences de 228 pb codant chacune pour un monomère d'ubiquitine (à droite). L'utilisation des amorces Ubi1 (flèches bleues) et Ubi2 (flèche rouge) montrent des profils d'amplification en échelle d'une ou plusieurs unités d'ubiquitine (à gauche). Les puits 2 à 5 sont chargés de 4 échantillons d'ADNc purs et les puits 7 à 10 sont chargés de ces mêmes échantillons dilués au 1/10ème (puit 1 : témoin négatif, puit 6 : marqueur de taille). Les échantillons trop concentrés (puit 3) ou dégradés ne présentent pas d'amplification, alors que les concentrations optimisées d'ADNc de bonne qualité montrent des bandes d'approximativement à 230 pb, 460, 690, etc.

Protocoles de vectorisation et de clonage : Chaque bande obtenue à la taille attendue a été découpée du gel d'agarose avec une lame stérile. Les élutions des amplifications ont été réalisées avec le kit OIAEX II gel extraction kit (QIAGEN ®) en suivant le protocole indiqué par le fournisseur. Une fois extraites du gel d'agarose, les fragments ont été ligués à 4 °C pendant 16 heures avec le kit pGEM®-T Vector System I de Promega®. Le milieu réactionnel est composé de 5 µL de tampon 2X, de 1µL de T4 DNA ligase (3 unités) et de 1 μL de plasmide (50 ng), finalement additionnés de 3 μL d'élution d'ADN. Les 10 μL de produit de ligation sont ensuite ajoutés à 100 μL de culture de bactéries compétentes (Escherichia coli de type NEB-5α). Le plasmide a été transfecté dans les bactéries par choc thermique à 42 °C pendant 30 s, puis les cultures ont été placées dans la glace pour que les pores pariétaux des bactéries se referment et retiennent le plasmide. Chaque tube de culture a été incubé sous une agitation douce pendant 60 min, après avoir été enrichi avec 250 µL de milieu de culture LB (Luria Bertani) liquide (composition en Annexe 3). La séquence du vecteur transfecté permet une sélection en deux temps des bactéries recombinantes. D'une part, la présence d'ampicilline dans le milieu permet de sélectionner les bactéries ayant intégré le vecteur plasmidique, contenant le gène de résistance à cet antibiotique. D'autre part, le vecteur pGEM-T® contient le gène de la β-galactosidase incluant le site multiple de clonage (MCS, Multiple cloning site). La présence de l'insert dans le plasmide inhibe donc la production de l'enzyme dans les clones à sélectionner, reconnaissables par des colonies blanches en présence de X-gal (Bromo-5-chloro-4-indolyl-3-β-D-galactopyranoside). En effet, la dégradation du Xgal produit un réactif coloré et les bactéries capables de produire la β-galactosidase (contenant le vecteur non recombiné) apparaissent donc bleues. Les boîtes de pétri sélectives sont préparées avec un milieu LB solide (Annexe 3) additionné de 60 µL d'ampicilline (50 mg.mL<sup>-1</sup>), de 50 µL de X-gal (2 %) et de 10 μL d'IPTG (<u>isopropyl</u> β-D-1-thiogalactopyranoside, 400 mM) un inducteur de la β-galactosidase. Les boîtes sont inoculées avec 100 µL de culture bactérienne puis incubées à 37 °C pendant 16 heures. Les clones sélectionnés sur les boîtes sont finalement repiqués dans 500 µL de milieu LB liquide, additionné de 2 µL d'ampicilline pour éviter les contaminations. Après avoir incubé les tubes sous agitation à 37 °C durant 6 heures, les tailles des séquences clonées sont vérifiées par PCR avec des

amorces communes correspondant à des séquences T7P et SP6 proches du MCS. Les produits de PCR sont visualisés sur gel d'agarose, et les clones donnant des profils électrophorétiques satisfaisants ont été sélectionnés pour l'extraction du plasmide recombinant correspondant (kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*, Promega®). Les concentrations des plasmides extraits ont été mesurées par densité optique (DO<sub>260</sub>) au nanodrop, puis séquencés (GENEWIZ Beckman Coulter Genomics).

Le déroulement global de la démarche de biologie moléculaire est schématisé Figure 2.4.

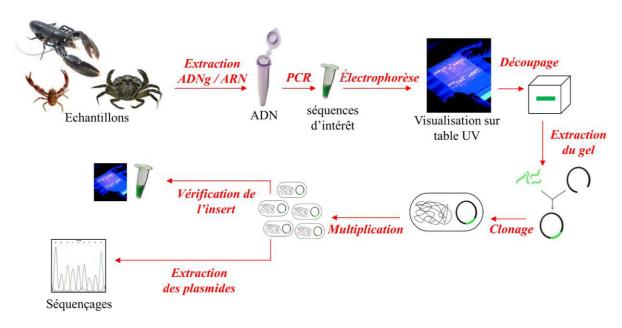


Figure 2.4 : Schéma général de la démarche de caractérisation des fragments de hsp70.

#### 2.1.4 Analyses et bilan des séquences obtenues de novo

Chaque séquence nucléotidique obtenue a été soumise au programme *nucleotide Blast* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) pour être comparée avec la base de données internationale de NCBI (*National center for biotechnology information*, USA). Des alignements multiples ont ensuite été réalisés avec d'autres séquences codant la HSP70, afin de détecter d'éventuels introns. La traduction des séquences nucléotidiques *in silico* par l'outil *translate* de la plateforme d'Expasy (http://web.expasy.org/translate/) a permis de vérifier la présence des motifs signature des HSP70 cytosoliques (**Figure 2.5**). Les résultats satisfaisants ont donné lieu au séquençage d'un second clone positif pour confirmation de la séquence obtenue.

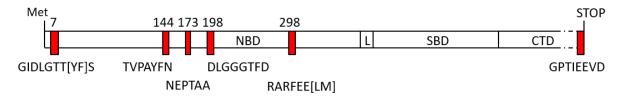


Figure 2.5: Localisation et séquences des motifs signature de la HSP70 cytosolique. Adapté d'après Karlin & Brocchieri (1998) et Rensing & Mayer (1994).

Cette démarche de biologie moléculaire a permis l'acquisition de 166 séquences issues de 37 espèces appartenant aux infraordres Anomura, Astacidea et Brachyura. Elles incluent 133 fragments et 33 séquences nucléiques complètes, dont 121 publiées dans GenBank (numéros d'accessions KU613073 à KU613193). Leurs tailles varient de 634 à 1977 pb et toutes codent pour plusieurs formes de HSP70 cytosoliques.

## 2.2 RECHERCHE DES HSP70 D'ARTHROPODES DANS GENBANK

Afin de compléter le jeu de données, des recherches méticuleuses ont été réalisées dans la base de données internationale GenBank parmi les génomes et transcriptomes séquencés. Cette méthode permet en effet de détecter des séquences non annotées et de s'affranchir des biais de nomenclature, mais également de rendre compte de la diversité des HSP70 au sein des espèces étudiées. Le nombre de données disponibles étant en pleine expansion, le jeu de données a été mis à jour plusieurs fois et a donc subi des remaniements réguliers jusqu'à la fin de la thèse.

## 2.2.1 Recherches via Blast dans les génomes et transcriptomes séquencés

La recherche de HSP70 cytosoliques dans les génomes et transcriptomes d'arthropodes a été effectuée selon deux critères principaux : la bonne qualité de l'assemblage, nécessaire pour récupérer des séquences suffisamment longues et exploitables en phylogénie, et le choix d'espèces représentatives des principaux ordres parmi les chélicérates, les hexapodes et les différents taxa de crustacés.

Afin de répondre à ces critères, les recherches se sont appuyées sur les séquences personnelles obtenues lors de cette étude (cf. partie 2.1.4), ainsi que sur les séquences complètes codant les différentes formes des HSP70 cytosoliques de Drosophila melanogaster (annotées HSP68, HSP70A, HSP70B et HSC70). Les séquences nucléotidiques ont été soumises au programme tBlastx de NCBI, qui permet leur comparaison avec les données transcriptomiques et génomiques via leur traduction in silico. Cette approche est suffisante pour détecter des résultats chez toutes les espèces d'arthropodes malgré leur éloignement phylogénétique, du fait de la forte conservation protéique de la HSP70 dans le monde vivant. Les recherches ont été effectuées préférentiellement dans la base de données WGS (Whole-Genome Shotgun contigs) afin de déterminer la présence et le nombre d'introns dans les séquences, puis ont porté sur la base de données TSA (Transcriptome Shotgun Assembly) afin de compléter le jeu de données. En effet, parmi les chélicérates et les différents taxa de crustacés, peu de génomes sont actuellement séquencés et assemblés et la majorité d'entre eux n'est disponible que depuis fin 2014. Les recherches ont ensuite été paramétrées pour cibler les principaux ordres appartenant aux chélicérates, aux différents types de crustacés et aux hexapodes. Les assemblages ont été sélectionnés parmi les résultats présentant les meilleures couvertures pour les séquences complètes soumises. Les séquences de référence ont été comparées aux bases de données via Blastn pour relever les séquences proches présentant plus de 65 % d'identité entre elles. Chaque séquence obtenue a été traduite in silico via la plateforme d'Expasy (http://web.expasy.org/translate/) afin de détecter les motifs signature des HSP70 cytosoliques et de vérifier l'intégrité du cadre de lecture. La présence et le nombre d'introns ont été detectés par des alignements multiples réalisés avec la plateforme **MAFFT** (http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/; (Katoh and Standley, 2013). Les séquences présentant des décalages de cadre de lecture ont été considérées comme pseudo-gènes et retirés du jeu de données. Les génomes et transcriptomes sélectionnés pour cette étude sont listés en Annexe 4 avec le nombre de séquences de HSP70 cytosoliques validées pour chacun d'entre eux.

#### 2 CONSTRUCTION DU JEU DE DONNEES

Cette approche a permis de détecter 387 séquences d'arthropodes issues de 64 espèces appartenant aux classes Arachnida, Branchiopoda, Chilopoda, Insecta, Malacostraca, Maxillopoda et Merostomata. Ces résutats sont listés dans l'**Annexe 4** avec les références d'assemblage et sont résumés dans le **Tableau 2.1**.

Classe	Nombre d'espèces	Nombre de résultats
Arachnida	10	52
Branchiopoda	3	13
Chilopoda	3	6
Insecta	25	141
Malacostraca	18	145
Maxillopoda	4	26
Merostomata	1	4

Tableau 2.1 : Résumé des résultats obtenus par recherche Blast dans les bases de données TSA et WGS de GenBank.

#### 2.2.2 Méthode alternative de recherche

Les recherches de séquences de HSP70 cytosoliques dans les génomes et transcriptomes séquencés ont été complétées par une méthodologie développée par JD Rouault (Laboratoire Evolution Génome et Spéciation UPR CNRS 9034, Gif-sur-Yvette). Cette approche présente l'avantage de pouvoir maitriser tous les paramètres de recherche ainsi que les versions d'assemblage interrogées, quelle que soit la longueur des fragments assemblés obtenus. Les données d'assemblage peuvent être téléchargées depuis n'importe quelle base de données et sont directement soumises à une série de programmes. Ces programmes procèdent à l'alignement des données génomiques avec 1 à 3 sondes spécifiques du gène recherché, dans les sens direct, complémentaire et complémentaire inversé. Le pourcentage d'identité minimum avec les données analysées sont paramétrables, afin d'obtenir des résultats exhaustifs et d'ajuster le nombre de faux positifs. Les résultats obtenus sont finalement compilés en indiquant les distances maximales désirées entre chaque sonde.

Les 3 sondes ont été définies à partir d'un alignement multiple de séquences complètes, sur des zones conservées, en amont, au milieu et en aval de la séquence codante (**Figure 2.6**). Les séquences de chaque sonde sont disponibles dans l'**Annexe 1**.

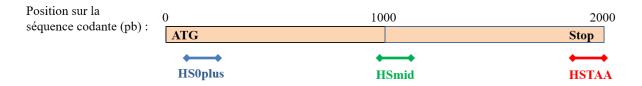


Figure 2.6: Schéma du positionnement des sondes spécifiques des séquences codants les HSP70 cytosoliques. Les séquences des sondes HS0plus, HSmid et HSTAA sont non-dégénérées et font respectivement 23, 26 et 24 pb.

Cette approche a permis une seconde recherche de séquences dans 19 des génomes et transcriptomes précédemment analysés. Ces assemblages sont mis en évidence dans l'**Annexe 5**. Les paramètres ont été fixés empiriquement avec un seuil de 22 bases de divergence pour l'ensemble des 3 sondes utilisées et une distance maximale de 3000 bases entre les sondes, permettant ainsi la détection des séquences malgré une forte proportion d'introns. En complément, des recherches à 2 sondes (HS0plus + HSmid ou HSmid + HSTAA) ont été réalisées avec des seuils de 13 bases de divergence et 2000 bases de distance.

## 2.2.3 Finalisation du jeu de données

Le jeu de données a été complété avec les séquences de la base de données *nucleotide*, provenant d'études ciblées les HSP70. La plupart des séquences complètes de décapodes ont été retenues, ainsi que plusieurs autres, provenant d'espèces non représentées dans les données de séquençage de génomes et de transcriptomes. Le jeu de données a été finalisé avec des données issues de la littérature, dans des études d'expression de différentes formes de HSP70 cytosoliques. Ainsi, un rapprochement a pu être effectué entre les différentes formes de HSP70 cytosoliques présentées dans cette étude et leurs capacités d'induction (cf. partie 4.2) (Altincicek et al., 2008; Cascella et al., 2015; Cottin et al., 2010; Fu et al., 2013; Liu et al., 2004; Luan et al., 2010; Mestre et al., 2015; Qian et al., 2012; Wu et al., 2008; Xiu et al., 2014; Yang et al., 2012, 2013).

## 2.3 MISE EN FORME ET ANALYSES DU JEU DE DONNEES

#### 2.3.1 Codification des séquences obtenues

La manipulation du jeu de données a été simplifiée par la conversion, pour chaque séquence, du fichier Fasta en format SuperFasta, développé par JD Rouault. Ce fichier est créé automatiquement par un programme et assigne un code unique à la séquence correspondante, en indiquant la taille du fragment nucléique et le numéro d'enregistrement de la séquence. La conversion au format SuperFasta présente de nombreux avantages. Tout d'abord, il réunit sous un même nom les séquences strictement identiques, tout en précisant le nombre de sources correspondant au fichier. Ensuite, il inclut les métadonnées relatives à la séquence telles que le(s) numéro(s) d'accession, l'auteur, la présence ou l'absence et le nombre d'introns, l'espèce d'origine, etc... (**Figure 2.7**). Enfin, ces fichiers sont facilement manipulables par plusieurs programmes, également développés par JD Rouault, permettant de réunir automatiquement toutes les séquences du jeu de données et leurs métadonnées sous forme de tableau, de sélectionner certaines espèces hôtes ou familles de séquences ou encore de créer des fichiers Multi-Fasta à partir de listes de noms. Dans le cadre de cette étude, les introns ont tous été retirés des séquences afin qu'elles puissent être directement utilisées pour les différentes analyses. Une copie du fichier originel étant mise de côté en cas de besoin. Ce format est également nécessaire pour utiliser la méthode de classification automatique (cf. partie 3.1.1).

#### A Structure du fichier SuperFasta

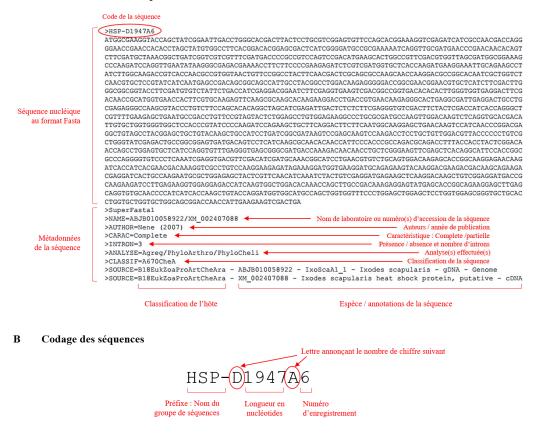


Figure 2.7 : Structure du format SuperFasta et codage des séquences utilisées.

#### 2.3.2 Détection des séquences chimériques

Certaines séquences du jeu de données, et notamment des séquences personnelles, n'ont pu être amplifiées plusieurs fois, malgré de nombreux essais. Après un alignement multiple avec d'autres fragments obtenus chez la même espèce (ou d'espèces proches), ces séquences ont montré des profils chimériques (**Figure 2.7**). Les séquences personnelles acquises par PCR ont toutes été réalisées en une seule expérience d'amplification, un mauvais assemblage peut donc être écarté. Ce biais d'amplification est peu décrit dans la littérature, et concerne principalement les études des ITS (*Internal Transcribed Spacer*) ribosomiques ou des gènes codant la sous-unité ARN16S, menées en génétique des populations (Haas et al., 2011).

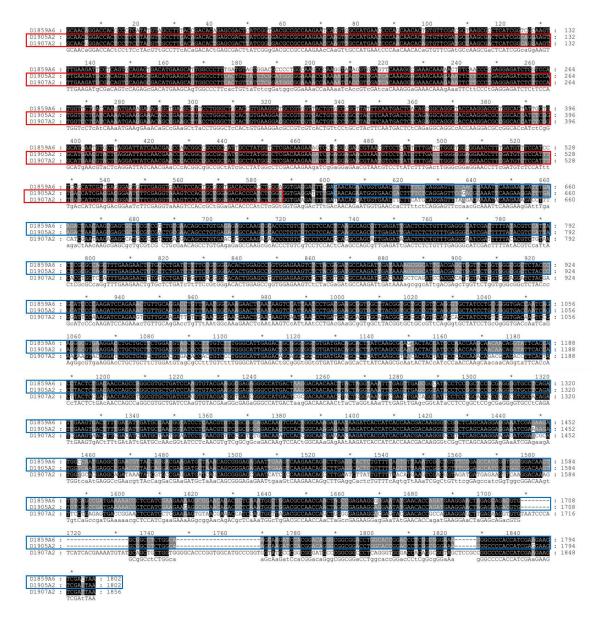


Figure 2.8 : Alignement d'une chimère avec deux autres séquences de hsp70. Les 3 séquences sont issues de Cancer pagurus et ont été amplifiées par PCR lors de cette étude. Le début de la séquence chimère (D1905A2) correspond à la première forme de hsp70 : D1859A6 (encadré rouge), tandis que le milieu et la fin de séquence correspondent avec la deuxième forme : D1907A2 (encadré bleu).

L'hypothèse retenue est une amplification incomplète et simultanée de deux formes de hsp70, l'une en amont et l'autre en aval du gène. Ces deux amplifications incomplètes se seraient alors hybridées entre elles dans les premiers cycles d'amplification, par la présence de zones fortement conservées entre chacune des séquences. Les cycles suivants auraient alors reconstitué et amplifié la chimère ainsi créée. Ce phénomène est décrit par Haas et al. (2011) lors d'amplifications d'ARN 16S (**Figure 2.9**).

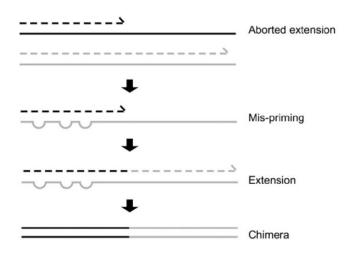


Figure 2.9: Formation de séquences chimériques pendant les premiers cycles de PCR. Le produit d'une élongation incomplète lors des premiers stades de la PCR peut fonctionner comme une amorce lors des cycles suivants et donner lieu à une amplification chimérique issue de deux gènes distincts.

Ce biais a remis en cause la solidité du jeu de données obtenu, malgré le séquençage d'un second clone positif. En effet, la formation d'un produit chimérique intervenant lors de l'amplification, les clones obtenus à partir d'un même produit de PCR pourraient être porteurs d'une même chimère majoritairement représentée. L'intégralité du jeu de donnée a donc été analysée afin de s'affranchir de tout biais d'amplification avec la fonction UCHIME du programme USEARCH (Edgar et al., 2011). En tenant compte de la nature des données à analyser, il a été nécessaire de choisir un ensemble de séquences référence représentatives de chaque forme et de chaque espèce étudiée. Les références ont été choisies à partir d'une observation minutieuse de plusieurs alignements multiples regroupant des séquences issues d'un même taxon. Les fragments personnels similaires et obtenus par des PCR distinctes ont été retenus. De même, les séquences issues des bases de données internationales et présentant une forte identité sur toute leur longueur ont été validées. Cependant, des références fiables n'ont pas pu être obtenues pour chaque espèce et chaque forme de HSP70 cytosolique. Les paramètres de recherche ont donc été ajustés pour obtenir un maximum de détection de chimères et de faux positifs. Les séquences suspectes ont ensuite été alignées une nouvelle fois avec les références. Ces alignements ont été tronqués en plusieurs morceaux pour effectuer des analyses phylogénétiques (Maximum de vraisemblance et méthode des plus proches voisins, 500 réplications) sur différentes parties en aval, au milieu ou en amont de la séquence codante. L'ensemble de ces vérifications a conduit à exclure une vingtaine de séquences du jeu de données final.

#### 2.3.3 Discussion et conclusion

Au total, 735 séquences distinctes de HSP70 cytosoliques issues de 195 espèces d'arthropodes ont été retenues pour le jeu de donnée final. Le détail des espèces, leur classification taxonomique (classe, ordre et infra-ordre) et le nombre de séquences associées sont listés en **Annexe 2**. Le jeu de données inclut 142 fragments de HSP70 issus de séquençages *de novo* réalisés lors de cette étude, 357 proviennent de données génomiques et transcriptomiques (TSA et WGS, GenBank) et 236 séquences ont été sélectionnées à partir de la base de données *nucleotide* (GenBank). La totalité des séquences utilisées pour les analyses sont recensées en **Annexe 4** avec les auteurs, les numéros d'accessions, les

caractéristiques associées (séquences partielle/complètes, issues d'ADN génomique ou d'ARN, nombre d'introns) ainsi que les analyses effectuées avec chacune d'entre elles.

Le nombre de résultats obtenus à partir des génomes et des transcriptomes séquencés est très variable d'une espèce à l'autre et dépend surtout de la qualité des assemblages réalisés. En effet, chez les brachyoures, caridés et dendrobranchiates, les fragments de HSP70 issus des assemblages sont particulièrement courts et leur appartenance à la famille des HSP70 cytosoliques est souvent difficile à confirmer (en l'absence du motif terminal [IV]EEVD). Ces fragments ont donc été utilisés pour des analyses préparatoires de classification avant d'être assignés à la famille des HSP70 cytosoliques et intégrés définitivement dans le jeu de données. Cependant, les gènes de HSP70 cytosoliques présentent tous un minimum de 69 % d'identité de séquence nucléique. De plus, dans les séquences protéiques de HSP70 cytosoliques de décapodes, un motif PEEISS (localisé dans le NBD) est conservé, alors que la proline en est absente dans les HSP70 du réticulum endoplasmique et souvent représenté par la séquence AEEISA. Le nombre de séquences obtenu pour chaque espèce ne reflète pas obligatoirement la diversité de la famille. En effet, plusieurs d'entre elles peuvent être issues d'un phénomène de duplication récent, comme c'est le cas chez Drosophila virilis (cf. 1.1.3). Bien que ces phénomènes de duplication aient un fort intérêt dans l'étude des mécanismes d'adaptation des organismes, ils sont d'une pertinence très limitée pour l'étude de la diversité et la classification des HSP70 cytosoliques à l'échelle des arthropodes. C'est pourquoi les séquences transcriptomiques de Daphnia magna n'ont pas toutes été sélectionnées pour cette étude, malgré des assemblages de très bonne qualité. En effet, la plupart des résultats correspondants à des séquences de HSP70 cytosoliques étant très nombreux (supérieurs à 20) avec des pourcentages d'identités de 99 %, seules quelques séquences plus éloignées les unes des autres ont donc été retenues pour les analyses.

Les séquences retenues avec la méthode alternative de recherche sont sensiblement les mêmes que celles obtenues *via* le programme Blast, et aucune séquence supplémentaire n'a été détectée par cette approche. Cette étape a néanmoins permis de vérifier les résultats avec une seconde méthodologie, même si cette dernière semble plus adaptée pour la recherche de séquences moins bien connues et moins conservées dans le vivant.

Les séquences complètes de HSP70 cytosoliques codent des protéines de 622 (*Acanthoscurria geniculata*, HSP-D1866B11) à 685 acides aminés (*Bombyx mori*, HSP-D2055A1), et leurs poids moléculaires varient entre 68,2 (*Daphnia pulex*, HSP-D1869A5) et 74,2 kDa (*Bombyx mori*, HSP-D2055A1). Cette variabilitée est essentiellement due à un domaine C-terminal plus ou moins long, elle est retrouvée dans l'ensemble des taxa étudiés et ne semble pas spécifique des espèces ou de leurs environnements. L'analyse des séquences d'ADN génomique a montré la présence de formes avec et sans intron dans la plupart des sous-ordres étudiés. Cependant, une présence systématique d'introns a été constatée chez certains taxa d'insectes (Hymenoptera, Odonata et Orthoptera) et de chélicérate (Scorpiones), tandis que les gènes issus de certains chélicérates (Aranae et Prostigmata) et malacostracés (Amphipoda et Dendrobranchiata) n'ont montré que des formes sans intron. La possible corrélation de ces caractéristiques avec les différentes formes de HSP70 cytosoliques sera discutée partie 3.3.1.2.

Les séquences nucléotidiques dépourvues de leurs introns présentent des tailles variables de 75 à 2031 pb et ont toutes été utilisées pour la classification automatique agrégative. Cette première analyse a permis la définition de plusieurs groupes de HSP70. Les séquences les plus longues et représentatives de chaque groupe ont été sélectionnées et traduites *in silico* pour les différentes analyses phylogénétiques. Les séquences de HSP70 traitées dans la littérature ont été privilégiées pour cette sélection, afin de les relier à des données fonctionnelles d'expression.



La diversité des HSP70 cytosoliques d'arthropodes a été étudiée par plusieurs approches. La méthode de classification automatique UPGM-VM (*Unweighted Pair Group Method with Variation Metric*) permet la comparaison d'un grand nombre de séquences nucléiques de tailles variables, complètes et partielles. Cette première approche a mis en évidence différents groupes de HSP70 et a ainsi facilité la sélection des séquences pour l'étude des liens de parenté établis en utilisant plusieurs méthodes d'analyses phylogénétiques.

## 3.1 CLASSIFICATION AUTOMATIQUE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES

## 3.1.1 La méthode agrégative de classification automatique « Les Rosaces »

La méthode agrégative UPGM-VM, développée par Rouault et Capy (2008), permet la classification automatique rapide d'un grand nombre de séquences de longueurs variables (ici, de 75 à 2055 pb) (Rouault et al., 2009). Ce processus de classification est analogue à la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) (Lebeaux & Jambu 1978). Il consiste à calculer les distances entre tous les items et à constituer progressivement des groupes par agrégation hiérarchique ascendante, en fusionnant les sous-ensembles les plus proches. Cependant, la méthode UPGM-VM se distingue de l'UPGMA par deux aspects. D'une part, il n'y a pas de consensus ou de valeur moyenne associée à chaque nœud : les séquences sont alignées deux à deux et seules ces valeurs, issues de la matrice d'identité initiale, sont utilisées pour calculer les distances entre les groupes. D'autre part, la métrique permettant de calculer la distance entre chaque item varie au cours du processus d'agrégation. En début d'analyse, la mesure des distances est globale et chaque item est considéré comme appartenant à un groupe distinct. Au cours du processus d'agrégation, la mesure des distances devient locale et les insertions/délétions sont ignorées au sein des alignements de séquences (permettant le regroupement de séquences partielles avec des séquences complètes). De la distance globale et la distance locale, le poids du gap diminue de 1 à 0 (au cours de l'analyse tous les intermédiaires sont possibles). Chaque groupe est défini par trois éléments : l'élément central (EC), le rayon interne (RI) et le rayon externe (RE). L'élément central (EC) est l'item qui minimise la somme des distances à tous les autres éléments du groupe, cet élément central varie au cours du processus d'agrégation. Le rayon interne est déterminé par la distance entre l'élément central et l'élément le plus éloigné du groupe. Le rayon externe est la distance minimale entre l'élément central et un item extérieure au groupe. Au cours de la classification, les groupes retenus sont définis par un rayon interne strictement inférieur au rayon externe (Figure 3.1).

L'ensemble des programmes utilisés pour la classification automatique a été écrit en langage de programmation ADA par Jacques-Déric Rouault (LEGS, UPR9034 CNRS, Gif-sur-Yvette, France). La figure obtenue a été réalisée à l'aide de scilab-5.5 et légendée avec inkscape.

Cette méthode de classification met en évidence différents groupes partageant des propriétés communes. Cependant, elle ne rend pas compte des liens de parenté entre chaque groupe formé.

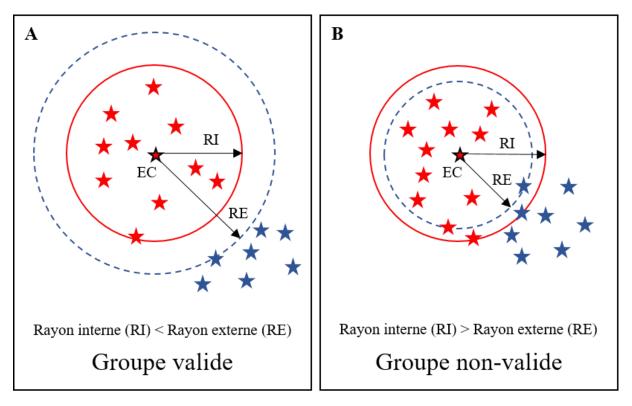


Figure 3.1: Processus de validation des groupes au cours de la classification agrégative. Pour chaque ensemble, l'élément central (EC) est défini comme minimisant la somme des distances avec les autres éléments du groupe. Si le rayon interne (RI) de l'ensemble est inférieur au rayon externe (RE), alors le groupe est considéré comme valide. Adapté d'après (Rouault et al., 2009).

#### 3.1.2 Résultats

L'ensemble du jeu de données (735 séquences) a été analysé avec la méthode de classification automatique et apparait dans la rosace ci-après (**Figure 3.2**). Les groupes ont été définis en fonction des taxa dont les séquences sont issues. Les séquences isolées n'ont pas été légendées dans la figure pour des raisons de lisibilité. Cependant, toutes ces séquences sont listées dans l'ordre du sens de lecture de la rosace (le même que celui du cercle trigonométrique) en **Annexe 5**. Les séquences partielles sont réparties dans chaque groupe et montre que la différence de taille entre les séquences ne semble pas impacter la classification. La présence d'un groupe externe n'est pas nécessaire pour ce type d'analyse, une dixaine de séquences de HSP70 mitochondriales et du réticulum endoplasmique a néanmoins été inclue dans l'analyse afin de conforter l'appartenance des autres séquences aux membres des HSP70 cytosoliques.

Les résultats montrent deux grands ensembles dans la rosace. Le premier est constitué par une grande majorité des séquences (3/4 de la rosace), et inclut tous les ordres et infra-ordres représentés. Le second groupe semble, quant à lui, spécifique des séquences d'insectes et d'arachnides. De plus, on observe 3 grands ensembles de séquences de malacostracés en position 1-101, 102-213 et 467-522 (Annexe 5). Les séquences de brachyoures issues des travaux de (Leignel et al., 2007) et représentatives d'une nouvelle forme de HSP70, apparaissent uniquement dans deux de ces ensembles parmi d'autres séquences de décapodes (positions 1-101). On peut donc supposer que les HSP70 cytosoliques sont plus diversifiées que ce qui a été précédemment mis en évidence par (Leignel et al., 2007). De plus, cette nouvelle forme semble également présente dans les taxa associés à ce groupe (Anomura, Astacidea, Caridea et Dendrobranchiata).

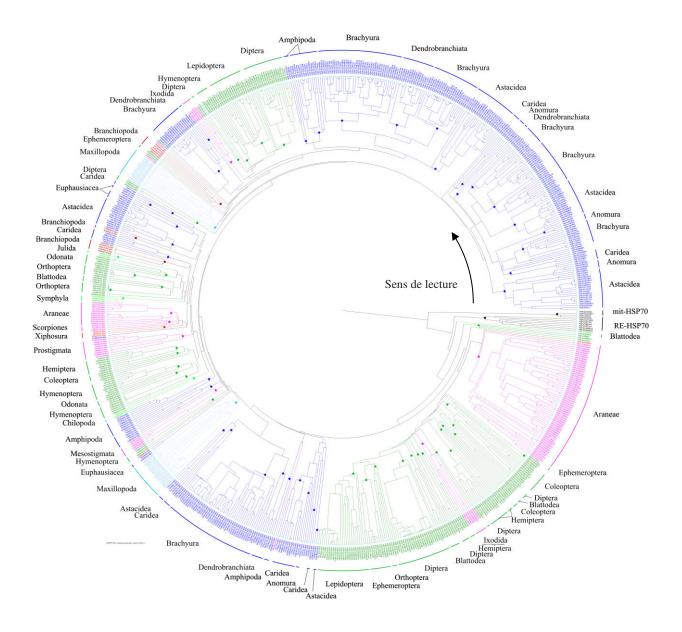


Figure 3.2: Résultats de classification des séquences nucléiques de HSP70 d'arthropodes. Chaque séquence de HSP70 cytosolique est représentée par une couleur en fonction du taxon dont elle est issue : Arachnida (rose), Branchiopoda (bordeaux), Insecta (vert), Malacostraca (bleu), Maxillopoda (bleu clair), Myriapoda (vert clair) et Xiphosura (rouge). Les HSP70 mitochondriales et du réticulum endoplasmique (respectivement mit-HSP70 et RE-HSP70 apparaissent en noir. Chaque groupe est légendé par l'ordre ou l'infraordre qu'il représente et délimité par une étoile dans la rosace.

Le nombre de groupe attribué à chaque taxon est résumé dans le **Tableau 3.1**. On constate que les subdivisions sont globalement plus nombreuses pour les HSP70 cytosoliques de malacostracés. En revanche, chez d'autres taxa (Anostraca, Cyclopoida, Julida, Sessilia, Symphyla, Thysanoptera) un seul groupe est représenté. Cette différence est vraisemblablement due à une quantité variable d'espèces et de données disponibles pour ces différents taxa. De plus, l'examen de la répartition des espèces au sein de certains groupes laissent présager des subdivisions supplémentaires chez les Amphipoda, Araneae, Diptera, Hemiptera, Maxillopoda et Prostigmata. Par exemple, dans le premier groupe de HSP70 de Maxillopoda (positions 294 à 307) l'espèce *Tigriopus californicus* est représentée dans 3 groupes distincts (positions 294-207, 300 et 306-306), intercalés par des séquences provenant d'autres espèces.

Tableau 3.1: Tableau récapitulatif des groupes constitués par la classification automatique. Les sousembranchements Chelicerata, Hexapoda et Myriapoda et les ordres associés sont regroupés dans le tableau A. Les ordres Branchiopoda, Malacostraca et Maxillopoda et les infraordres associés sont regroupés dans le tableau B.

Chelicera	nta		Myriapoda				
Araneae	2	Blattodea	4	Lepidoptera	2	Chilopoda	2
Ixodida	2	Coleoptera	3	Odonata	1	Julida	1
Mesostigmata	3	Diptera	5	Orthoptera	3	Symphyla	1
Prostigmata	1	Ephemeroptera	2	Thysanoptera	1		
Scorpiones	2	Hemiptera	3				
Xiphosura	2	Hymenoptera	4				

Branchio	poda		Mal	Maxillopoda					
Anostraca	1	Amphipoda	5	Dendrobranchiata	4	Calanoidea	2		
Diplostraca	3	Anomura	4	Euphausiacea	3	Cyclopoida	1		
Notostraca	1	Astacidea	6			Harpacticoida	2		
		Brachyura	7			Sessilia	1		
		Caridea	6			Siphonostomatoida	1		

Ces résultats confortent l'hypothèse d'une grande diversité des HSP70 cytosoliques chez les arthropodes. La très grande majorité des groupes mis en évidence est constituée de séquences issues de plusieurs espèces, et ces groupes ne reflètent donc pas uniquement une diversité allélique. Cependant, cette méthode reste insuffisante pour définir une classification générale des HSP70 cytosoliques. En effet, cette approche permet une comparaison d'identité entre séquences nucléotidiques mais ne rend pas compte de leurs relations de parenté. Néanmoins, cette approche a permis la sélection des séquences afin d'effectuer des analyses phylogénétiques complémentaires, nécessitant un nombre de séquences plus restreint.

# 3.2 RELATIONS DE PARENTE DES HSP70 CYTOSOLIQUES

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées à partir de séquences traduites *in silico*, afin de déterminer la diversité protéique des HSP70 cytosoliques et leur évolution, au regard des pressions de sélection environnementales.

### 3.2.1 Démarches d'analyses phylogénétiques

Les séquences ont été sélectionnées sur 4 critères : (1) Elles sont représentatives des groupes précédemment définis par la classification agrégative. (2) Elles incluent les différents domaines protéiques de la HSP70, dont l'intégralité du domaine C-terminal (partie la plus variable). (3) Elles sont issues d'espèces représentatives des subdivisions du taxon étudié (Arthropoda, Chelicerata, Insecta et Malacostraca). (4) Les séquences sont associées à des données d'expression dans la littérature (cf. partie 4.2).

Les alignements multiples ont été effectués sur la plateforme MAFFT (<a href="http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/">http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/</a>; (Katoh and Standley, 2013) et modifiés avec le logiciel Genedoc

(Nicholas et al., 1997), afin d'obtenir un alignement de séquences de longueurs identiques. Les données ont ensuite été exportées au format approprié (fasta ou nexus) pour effectuer les différentes analyses phylogénétiques. Des séquences de HSP70 de réticulum endoplasmique ont été utilisées comme groupe externe pour chaque analyse.

Les arbres ont été obtenus à partir des principales méthodes d'analyses phylogénétiques. La méthode cladistique du Maximum de Parcimonie (MP) détermine les caractères primitifs et dérivés (ici les acides aminés) en minimisant le nombre de transformations possibles. La méthode phénétique du *Neighbor Joining* (NJ) se base uniquement sur le nombre de caractères communs aux séquences. Les méthodes probabilistes du Maximum de vraisemblance (ML) et de l'inférence bayésienne (IB) se basent sur différentes hypothèses évolutives. L'hypothèse considérée comme la plus adaptée au jeu de données est déterminée *a priori* et conditionne les paramètres d'analyse phylogénétique.

Les analyses MP, ML et NJ ont été effectuées avec le logiciel Mega6 (Tamura et al., 2013). Les modèles évolutifs ont été déterminés sur Mega6 et confirmés par le serveur ProtTest (Abascal et al., 2005), http://darwin.uvigo.es/software/prottest\_server.html). Les valeurs de nœuds ont été soutenues par 500 réplications de bootstraps pour chaque type d'analyse. Les analyses bayésiennes ont été conduites avec le logiciel MrBayes (Ronquist et al., 2012) en se basant sur un ensemble de modèles évolutifs et sur 10 000 000 à 30 000 000 générations, afin d'obtenir des déviations standard de fréquences inférieures à 0,01. Chaque arbre a été réalisé à partir des résultats de l'inférence bayésienne, a été mis en forme dans Mega6 et légendé dans PowerPoint. La liste des séquences utilisées pour les analyses au sein des différents taxa (Arthropoda, Chelicerata, Hexapoda et Malacostraca) est disponible en **Annexe** 5.

### 3.2.2 Résultats

Les séquences les plus représentatives des différents groupes d'arthropodes ont tout d'abord été intégrées aux analyses phylogénétiques, afin d'appréhender plus précisément la classification des HSP70 dans le phylum et de retracer leur évolution. Les analyses phylogénétiques ont ensuite été effectuées à partir des séquences de HSP70 cytosoliques de Malacostraca, qui semblent être les plus diversifiées à la lumière des résultats de classification automatique agrégative. Pour terminer, la diversité des HSP70 cytosoliques a été évaluée spécifiquement sur les séquences de chélicérates et d'insectes.

### 3.2.2.1 Liens de parenté des HSP70 cytosoliques dans le phylum Arthropoda

Les analyses phylogénétiques ont été conduites à partir de 101 séquences de HSP70 cytosoliques et 2 séquences de HSP70 du réticulum endoplasmique comme groupe externe. Les arbres obtenus ont montré des topologies similaires pour chaque analyse, et sont synthétisés dans la **Figure 3.3**.

Les résultats mettent en évidence les deux principaux ensembles observés dans la rosace issue de la méthode de classification agrégative : le premier (groupe AB) est constitué de séquences issues de tous les taxa étudiés, alors que le second (groupe C) ne comprend que des séquences de chélicérates et d'insectes. Le groupe AB est constitué de nombreuses subdivisions spécifiques à chaque ordre étudié. Les séquences de malacostracés sont, quant à elles, réparties dans deux groupes annotés A et B.

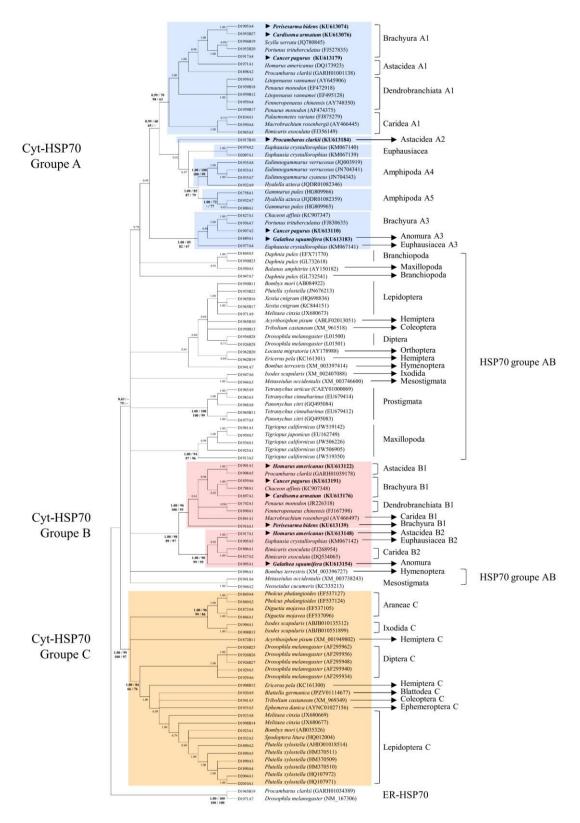


Figure 3.3: Arbre phylogénétique des HSP70 cytosoliques d'Arthropoda. Les valeurs de probabilité postérieures (IB) et de bootstraps issues de 500 réplications (ML, NJ et MP), apparaissent dans cet ordre au niveau de chaque embranchement délimitant les différents groupes. Seules les valeurs supérieures ou égales à 60 ont été retenues. Les séquences caractérisées lors de cette étude sont précédées du symbole .

Le groupe A est soutenu uniquement par l'analyse bayésienne, malgré des topologies similaires pour chaque méthode d'analyse phylogénétique, et inclut 5 subdivisions numérotées A1 à A5. Le groupe A1 est représenté par des séquences de chaque infraordre de décapodes représenté dans le jeu de données (Anomura, Astacidea, Caridea et Dendrobranchiata) et comprend également les séquences d'*Euphausia crystallorophias* (Euphausiacea) dans les résultats d'analyses NJ et MP. Le groupe A2 n'est représenté que par des séquences d'astacidés, mais les analyses phylogénétiques spécifiques aux malacostracés (**Figure 3.4**) confirment l'existence de cette subdivision. Le groupe A3 est soutenu par l'ensemble des 4 méthodes d'analyse et regroupe des cyt-HSP70 d'anomoures, brachyoures et euphausiacés. Les groupes A4 et A5 semblent exclusifs aux amphipodes, mais ces derniers ne sont pas soutenus par l'analyse NJ et pourraient être séparés en deux subdivisions distinctes (cf. partie 3.2.2.2). Le groupe B est, quant à lui, significativement soutenu par l'ensemble des analyses et divisé en deux parties annotées B1 et B2. Le groupe B1 intègre des séquences issues des infraordres Anomura, Astacidea, Brachyura, Caridea et Dendrobranchiata, tandis que le groupe B2 est constitué de séquences issues des taxa Anomura, Astacidea, Caridea et Euphausiacea.

Les groupes constitués par les analyses phylogénétiques sont globalement moins nombreux que ceux observés dans la classification agrégative. Cependant, ces résultats montrent l'existence de plusieurs formes distinctes de HSP70 pour l'ensemble du phylum Arthropoda. Les HSP70 de malacostracés forment au moins 2 groupes distincts chez les amphipodes, les anomoures et les dendrobranchiates, 4 groupes chez les astacidés et 3 groupes chez les brachyoures, les caridés et les euphausiacés. Chez les branchiopodes et les maxillopodes, on retrouve également plusieurs formes de HSP70 appartenant au groupe AB qui ne semblent pas être associées aux groupes particuliers A ou B. La plupart des taxa étudiés présentent un minimum de 2 formes de HSP70, appartenant respectivement aux groupes AB et C (Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Ixodida, Lepidoptera) ou rassemblées uniquement dans le groupe AB (Hymenoptera, Mesostigmata, Prostigmata). Cette diversité n'est cependant pas observée dans les ordres Araneae, Blattodea, Ephemeroptera et Orthoptera, sans doute à cause d'un nombre trop limité de séquences.

Les HSP70 cytosoliques semblent s'être différenciées en deux ensembles AB et C, avant la diversification du phylum Arthropoda. On peut supposer qu'un gène ancestral (correspondant à une forme hypothétique ABC), a été dupliqué avant l'apparition des arthropodes, pour évoluer en formes distinctes AB et C. Cependant, la HSP70 C est clairement absente chez les malacostracés, et sans doute également absente des classes Branchiopoda et Maxillopoda. La classification et l'évolution de ces 3 taxa est aujourd'hui encore discutée, mais l'hypothèse la plus probable semble être la perte du gène correspondant à la forme C chez les ancêtres communs à ces taxa. Si ces derniers forment bien un groupe polyphylétique, cela laisserait supposer que le gène codant cette forme C a été perdu à plusieurs reprises dans l'évolution. Cette perte a pu être compensée par la duplication du gène ancestral de la forme AB qui semble être à l'origine des groupes A et B chez les malacostracés. La forme B a été observée chez les euphausiacés et les décapodes (superordre Eucarida), mais n'a pas été mise en évidence chez les amphipodes étudiés (superordre : Peracarida). Les deux hypothèses à privilégier seraient alors : (1) une duplication du gène ancestral AB pendant l'émergence des Eucarida ou (2) une duplication du gène ancestral AB pendant l'émergence des Eucarida ou (2) une duplication du gène ancestral AB pendant l'émergence des Malacostraca, et suivie de la perte précoce du gène de la HSP70 B chez les Peracarida.

Afin d'évaluer la diversité des HSP70 et de retracer plus précisément leur histoire évolutive chez les arthropodes, ces analyses phylogénétiques nécessitent d'être complétées avec un nombre plus élevé de séquences pour chaque taxa. Les analyses suivantes se sont donc intéressées à la phylogénie des HSP70 au sein des Malacostraca, puis des Chelicerata et des Insecta.

### 3.2.2.2 Diversité des HSP70 cytosoliques dans la classe des Malacostraca

Le jeu de données utilisé pour les analyses phylogénétiques chez les Malacostraca regroupe 98 séquences de cyt-HSP70 de 467 à 506 acides aminés, et 2 séquences de RE-HSP70 comme groupe externe. L'arbre illustrant la synthèse des résultats pour les quatre méthodes d'analyse phylogénétiques est présenté **Figure 3.4**.

Les arbres obtenus par les méthodes d'analyse ML et NJ présentent les mêmes groupes de HSP70 que les résultats précédemment observés chez les arthropodes : les HSP70 de malacostracés sont réparties en deux groupes A et B comprenant 6 et 2 subdivisions respectivement.

Cependant, les méthodes d'analyses IB et MP n'ont pas soutenu l'appartenance des HSP70 d'amphipodes (HSP70 A4, A5 et A6) au groupe A. En effet, d'après ces analyses, les séquences d'amphipodes ne semblent rattachées ni aux HSP70 A, ni aux HSP70 B.

Le groupe des HSP70 A1 inclut des séquences issues de l'euphausiacé *Euphausia crystallorophias* et de chaque infraordre appartenant aux Decapoda. Il n'est pas soutenu par les analyses IB et ML, qui ne valident pas l'association de la séquence de *Pontastacus leptodactylus* (D1956B32) avec le reste du groupe. Le groupe A3 est également représenté par toutes les espèces d'eucaridés, à l'exception de celles appartenant à l'infraordre Dendrobranchiata. L'existence des HSP70 A2 est confirmée par plusieurs séquences et correctement soutenue par l'ensemble des analyses phylogénétiques. Il reste spécifique aux astacidés et rassemble des séquences issues de trois des quatre superfamilles (Astacoidea, Nephropoidea et Parastacoidea). Le groupe B et ses subdivisions B1 et B2 sont également confirmés par l'ensemble des analyses phylogénétiques. Les taxa représentés dans ces 2 groupes sont les mêmes que ceux présents dans les analyses portant sur les arthropodes. Cependant, une subdivision supplémentaire apparait nettement chez les brachyoures dans le groupe B1. Ces groupes, nommés B1a et B1b, sont correctement soutenus par l'ensemble des analyses.

Les analyses phylogénétiques des séquences de HSP70 cytosoliques chez les Malacostraca précisent les relations de parenté et les phénomènes évolutifs au sein de cette classe. Tout d'abord, ces analyses ne soutiennent pas toute l'appartenance des séquences d'amphipodes au groupe A ou au groupe B. Ceci privilégie ainsi l'hypothèse d'une duplication du gène ancestral AB durant l'émergence des eucaridés. Ensuite, les subdivisions des groupes A et B sont représentées par des espèces phylogénétiquement éloignées dans le superordre Eucarida (Koenemann et al., 2010). On peut donc supposer que les phénomènes de duplication du gène ancestral AB, puis des gènes A et B (en A1, A3, B1 et B2) se sont succédés rapidement au cours de l'émergence des eucaridés. Cependant, ces différentes formes de HSP70 ne sont pas observées chez tous les taxa d'eucaridés. Par exemple, aucun Dendrobranchiata n'est représenté dans le groupe A3, ni aucun Brachyura dans le groupe B2. Toutefois, ces travaux de recherche ne présentent pas une étude exhaustive des HSP70 cytosoliques, et ces formes pourraient exister et ne pas avoir été caractérisées, ou avoir disparu au cours de l'évolution. Les groupes B1a et B1b de brachyoures semblent clairement issus d'une duplication tardive du gène de la HSP70 B1. Ils comprennent chacun des espèces appartenant aux superfamilles Bythograeoidea et Grapsoidea. Ces familles étant éloignées l'une de l'autre au sein des Brachyura (Tsang et al., 2014), on peut émettre l'hypothèse que ces groupes de HSP70 sont apparus de façon précoce durant l'émergence de l'infraordre Brachyura. Le groupe A2, quant à lui, semble constitué uniquement par des séquences d'astacidé. Cependant, ce groupe ne se rattache à aucun autre, rendant ainsi peu probable une duplication tardive durant l'émergence de l'infraordre.

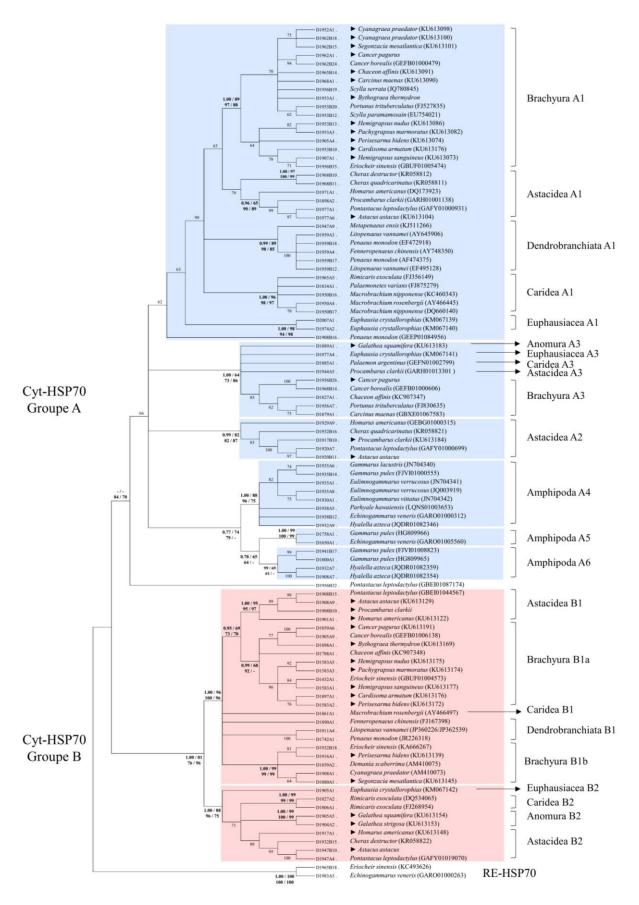


Figure 3.4: Arbre phylogénétique des HSP70 cytosoliques de Malacostraca. Les analyses ont été réalisées à partir de 4 méthodes de phylogénie (inférence bayésienne, Maximum de vraisemblance, Neighbor joining et Maximum de parcimonie). Les valeurs de probabilité postérieures (IB) et de bootstraps issues de 500

réplications (ML, NJ et MP), apparaissent dans le même ordre au niveau de chaque embranchement délimitant les différents groupes. Seules les valeurs supérieures ou égales à 60 ont été retenues. Les séquences caractérisées lors de cette étude sont précédées du symbole  $\blacktriangleright$ . Les principaux groupes sont mis en évidence par des encadrés bleus (groupe A) et rouges (groupe B).

### 3.2.2.3 Diversité des HSP70 cytosoliques chez les Chelicerata et les Hexapoda

Les analyses phylogénétiques spécifiques aux HSP70 cytosoliques de Chelicerata ont été réalisées à partir de 62 séquences de 606 à 629 acides aminés. Le jeu de données Hexapoda a été élaboré à partir de 76 séquences d'insectes complètes de 620 à 667 résidus. Comme pour les analyses chez les arthropodes et les malacostracés, les données ont été additionnées à 2 séquences de RE-HSP70 comme groupe externe. Les résultats des analyses sont résumés dans les arbres phylogénétiques **Figure 3.5** pour les chélicérates et **Figure 3.6** pour les hexapodes.

Les résultats confirment la classification agrégative et les analyses phylogénétiques effectuées chez les arthropodes. Chaque arbre présente deux ensembles principaux de HSP70 cytosoliques, AB et C, pour les deux sous embranchements. Ces ensembles sont soutenus solidement par toutes les méthodes d'analyses phylogénétiques effectuées.

Diversité des HSP70 cytosoliques de Chelicerata (Figure 3.5). Chez les chélicérates, le groupe HSP70 AB rassemble des séquences provenant de tous les taxa étudiés, alors que les HSP70 C sont uniquement représentées par les ordres Araneae, Ixodida et Xiphosura. Les taxa qui ne présentent pas les HSP70 des 2 groupes (AB et C) possèdent néanmoins plusieurs types de HSP70 (subdivisions annotées en chiffres romains). Cette caractéristique est retrouvée dans les groupes Araneae C, Mesostigmata AB et Prostigamata AB. Chacune des subdivisions observées est soutenue par l'ensemble des méthodes d'analyse et semble regrouper des séquences issues d'espèces de la même famille. En effet, cette particularité est reflétée par l'organisation des séquences d'araignées Diguetidae (Diguetia spp), Eresidae (Stegodyphus mimosarum), Plectreuridae (Kibramoa guapa et Plectreurys spp) et Theridiidae (Parasteatoda tepidariorum): malgré leur appartenance au même sous-ordre Araneomorphae, chaque subdivision des HSP70 C est spécifique à une seule famille. Globalement, ces analyses montrent l'existence de 2 à 4 groupes différents de HSP70 chez les chélicérates, exception faite de Mesobuthus martensii (Scorpiones) qui ne semble en présenter qu'un seul type. La présence des formes AB et C chez les Araneae, Ixodida et Xiphosura confirme l'hypothèse d'une première duplication d'un gène ancestral ABC avant l'émergence des chélicérates. Les formes AB ou C ont certainement été perdues par plusieurs taxa au cours de l'évolution, n'ayant pas été détectées dans les génomes séquencés (Mesostigmata, Prostigmata, Scorpiones et certaines espèces d'araignées). Cependant, la diversité des HSP70 cytosolique semble avoir été maintenue par des duplications supplémentaires tardives, durant l'émergence des différentes familles (chez les Araneomorphae et Tetranychidae) ou de genres (HSP70 ABII et ABIII chez *Tetranychus* spp).

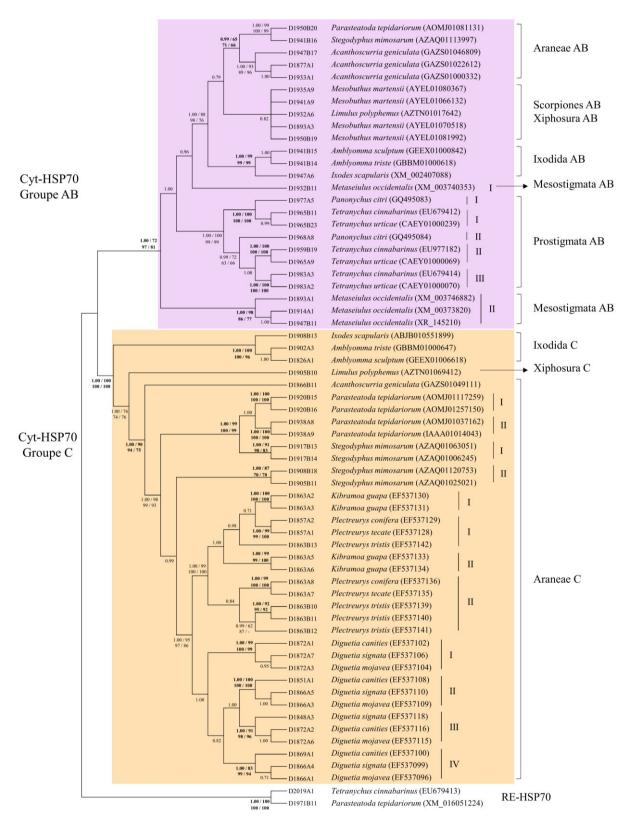


Figure 3.5 : Arbre phylogénétique des HSP70 cytosoliques de Chelicerata. Les valeurs de probabilités postérieures (IB) et de bootstraps issues de 500 réplications (ML, NJ et MP), apparaissent dans cet ordre au niveau de chaque embranchement délimitant les différents groupes. Seules les valeurs supérieures ou égales à 60 ont été retenues. Les principaux groupes AB et C sont mis en évidence par des encadrés violet et orange, respectivement.

Diversité des HSP70 cytosoliques d'Hexapoda (Figure 3.6). La plupart des ordres étudiés sont représentés dans le groupe AB et dans le groupe C, à l'exception des Hymenoptera et Odonata qui possèdent néanmoins plusieurs formes de HSP70 AB. Chaque subdivision des groupes AB et C sont significativement soutenues par les 4 méthodes d'analyses phylogénétiques. De la même façon que chez les chélicérates, ces subdivisions sont annotées dans la figure en chiffres romains à partir du moment ou elles sont partagées par les mêmes espèces. Par exemple, les différentes séquences de HSP70 C relevées chez les coléoptères n'ont pas été annotées comme faisant partie de subdivisions dictinctes dans l'organisation des HSP70 cytosoliques. En effet, ces séquences appartiennent à des espèces différentes invasives et/ou nuisibles (Colaphellus borwringi, Harmonia axyridis et Tribolium castaneum). L'éloignement de ces séquences pourrait être du à une plasticité génétique particulière à ces espèces, plutôt qu'à la formation de nouvelles formes de HSP70. La plupart des ordres étudiés présentent 2 formes de HSP70. Les quelques espèces *Acyrthosyphon pisum* (Hemipera), *Bombyx mori* (Lepidoptera) et Formica exsecta (Hymenoptera) possèdent 3 formes de HSP70, tandis que les diptères (Culex quinquefasciatus et Drosophila melanogaster) en présentent au moins 4 groupes distincts. Les différentes HSP70 cytosoliques décrites chez les hexapodes semblent être issues de duplications respectives des gènes codant les formes AB et C, lors de l'émergence de chaque ordre d'insectes. Cependant, des phénomènes de duplications supplémentaires peuvent également avoir eu lieu plus tardivement, à l'instar des drosophiles qui présentent un nombre de copies variables de HSP70 cytosolique en fonction des espèces et de leur milieu de vie (cf. partie 1.1.3).

L'ensemble des taxa d'arthropodes étudiés présentent plusieurs types de HSP70 cytosoliques. Les formes AB et C sont conservées chez de nombreuses espèces parmi les chélicérates et les hexapodes. Néanmoins, la forme C semble avoir disparu chez les différents types de crustacés (Branchiopoda, Malacostraca et Maxillopoda) et certains ordres appartenant aux chélicérates (Mesostigmata, Prostigmata, Scorpiones) et aux hexapodes (Hymenoptera et Odonata). Cette perte pourrait avoir été compensée par de nouvelles duplications de gènes de HSP70 cytosoliques.

La prochaine partie de ce manuscrit s'intéressera aux particularités structurales des séquences nucléiques et protéiques des différentes formes de HSP70 cytosoliques. Cette étude permettra de déterminer en quoi cette diversité peut refléter des fonctionnalités distinctes pour chaque forme.

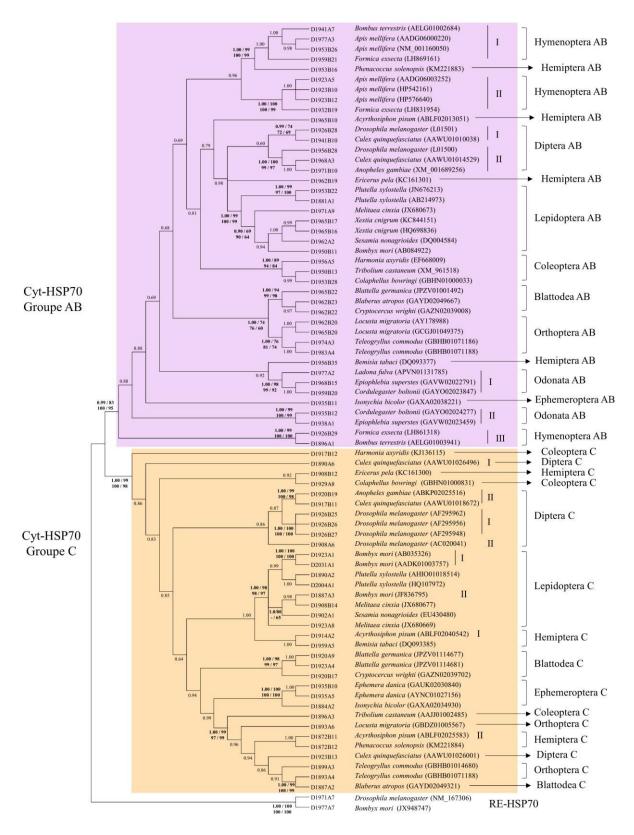


Figure 3.6: Arbre phylogénétique des HSP70 cytosoliques d'Hexapoda. Les valeurs de probabilités postérieures (IB) et de bootstraps issues de 500 réplications (ML, NJ et MP), apparaissent dans cet ordre au niveau de chaque embranchement délimitant les différents groupes. Seules les valeurs supérieures ou égales à 60 ont été retenues. Les principaux groupes AB et C sont mis en évidence par des encadrés violet et orange, respectivement.

### 3.3 COMPARAISONS STRUCTURALES ENTRE LES DIFFERENTES SOUS FAMILLES

## 3.3.1 Structures géniques des HSP70 identifiées

### 3.3.1.1 Comparaison des longueurs des séquences complètes

L'analyse comparative des séquences nucléotidiques complètes de hsp70 a permis de constater une grande variabilité de longueur de 1866 à 2055 pb. Cette variation ne semble pas spécifique aux différents groupes AB et C mis en évidence chez les arthropodes. En effet, chez les hexapodes la forme AB est représentée par des séquences de 1896 à 1968 pb (*Bombus terrestris* et *Epiophlebia superstes*), tandis que la forme HSP70 C regroupe des séquences de taille tout aussi variables allant de 1890 et 2031 pb (*Culex quinquefasciatus* et *Bombyx mori*) (**Figure 3.6**). De même, chez les chélicérates, on constate des tailles variables au sein des groupes AB (de 1893 pb pour *Mesobuthus martensii*, à 1968 pb pour *Panonychus citri*) et C (de 1902 pb pour *Amblyomma triste*, à 1938 pb pour *Parasteatoda tepidariorum*) (**Figure 3.5**). De plus, cette variabilité de taille est mise en évidence au sein d'une seule espèce, comme chez *Daphnia pulex* (Branchiopoda) dont les séquences appartenant au groupe HSP70 AB sont comprises entre 1869 et 1950 pb (**Figure 3.3**).

En revanche, les séquences caractérisées chez les malacostracés présentent des tailles similaires au sein de chaque forme A et B (**Figure 3.4**). Les séquences associées aux formes HSP70 A1 et A3 sont globalement les plus longues, de taille supérieure ou égale à 1950 pb, tandis que celles appartenant aux groupes B1 et B2 sont globalement plus courtes (entre 1905 pb pour *Cancer borealis* et 1947 pb pour *Astacus astacus*).

### 3.3.1.2 Présence et localisation des introns

Les séquences génomiques codant les HSP70 cytosoliques présentent des formes avec et sans introns pour la majorité des taxa étudiés. Parmi les arthropodes, le nombre d'introns (1 à 8), leur taille (44 à 8864 pb) et leurs localisations dans la séquence codante ne sont pas conservés dans les différents ordres taxonomiques étudiés (**Tableau 3.2**). La présence ou l'absence d'intron n'apparait spécifique ni au groupe AB, ni au groupe C.

Tableau 3.2 : Tableau récapitulatif des introns observés pour chaque groupe taxonomique et chaque type de HSP70 cytosolique. Le nombre d'intron(s) relevé(s) dans les séquences partielles est indiqué par le symbole « + » pour marquer la possibilité d'un plus grand nombre d'introns dans la séquence complète. L'absence d'intron est notée « Abs. ». Le symbole « - » représente l'absence de séquence génomique pour le groupe de HSP70 et le taxon concerné.

Classe	Ordre	Groupe AB	Groupe C
Arachnida	Araneae	Abs.	Abs.
	Ixodida	3	Abs.
	Mesostigmata	Abs. / 1 / 4	-
	Prostigmata	Abs.	-
	Scorpiones	5	-
Branchiopoda	Diplostraca	2/7	-
•	Notostraca	Abs. / 2	-
Chilopoda	Geophilomorpha	3	Abs.
Diplopoda	Julida	2	-
Insecta	Blattodea	2	Abs.
	Coleoptera	1	Abs. / 1+/3
	Diptera	Abs. / 1	Abs. / 1 / 2
	Ephemeroptera	-	Abs. / 1
	Hemiptera	Abs. / 2 / 3	Abs. / 1+ / 5
	Hymenoptera	1/2/6	-
	Lepidoptera	Abs. / 1 / 7	Abs. / 1 / 4+
	Odonata	2	-
	Orthoptera	1/3	-
Maxillopoda	Calanoida	Abs. / 8	-
Merostomata	Xiphosura	4/5	Abs.

La localisation des introns sur la séquence est hautement variable d'un taxon à l'autre, ou au sein de chaque groupe de HSP70 cytosolique (**Figure 3.7**). Par exemple, les 3 espèces de lépidoptères (*Bombyx mori*, *Plutella xylostella* et *Xestia cnigrum*) appartennant au même infraordre Neolepidoptera, présentent des introns localisés à des positions différentes, laissant supposer des évènements évolutifs d'acquisitions indépendants.

Toutefois, la présence d'un intron unique, localisé à la 170ème pb, est conservée pour les 4 espèces de diptères appartenant à 2 infraordres distincts Culicomorpha (*Anopheles gambiae* et *Culex quinquefasciatus*) et Muscomorpha (*Drosophila melanogaster* et *Drosophila virilis*). De même, la présence d'un intron unique à la même position a été constatée spécifiquement dans le groupe HSP70 B1 décrit chez les malacostracés. Cette caractéristique est représentée par plusieurs séquences issues d'une espèce d'anomoure, 3 espèces d'astacidés et 12 espèces de brachyoures. Le manque de données génomiques dans les infraordres Caridea et Dendrobranchiata et dans l'ordre Euphausiacea ne permet toutefois aucune conclusion générale à l'échelle des malacostracés.

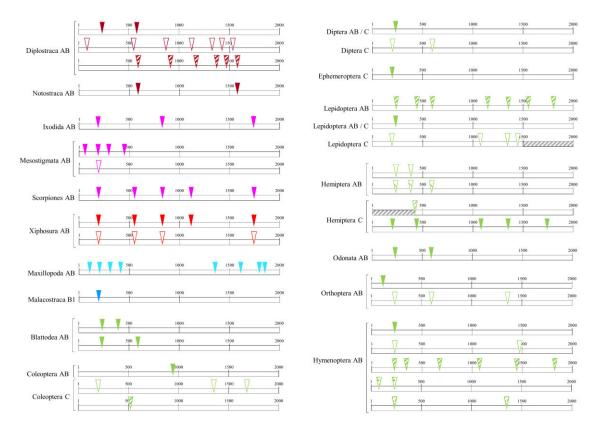


Figure 3.7: Localisation des introns dans la séquence codante des gènes de HSP70 cytosoliques. Chaque type de séquence est associée à son groupe et au taxon dont elle est issue. Les taxa sont représentés par le même code couleur que dans la rosace (Figure 3.2): Arachnida (rose), Branchiopoda (bordeaux), Insecta (vert), Malacostraca (bleu), Maxillopoda (bleu clair), Xiphosura (rouge). Les introns sont localisés sur une séquence schématique d'une longueur arbitraire de 2000 pb.

### 3.3.1.3 Comparaison des séquences régulatrices

Mis à part les modèles biologiques communément étudiés, les HSP70 cytosoliques sont généralement classées dans la littérature en fonction de leur modalité d'expression constitutive (HSC70) ou inductible (HSP70). Dans certaines études, le caractère constitutif ou inductible des HSP70 est même déduit *a priori* à partir de similarité entre séquences appartenant à des infraordres distincts, considérant ainsi que les HSC70 et HSP70 forment deux sous-familles distinctes (Liu et al., 2004; Mestre et al., 2015; Qian et al., 2012). Cependant, les modalités d'expression de la HSP70 semblent relever avant tout de la structure de leur promoteur ou plus largement de leur séquence régulatrice, et aucune corrélation générale n'a encore été mise en évidence entre la structure des HSP70 et leur expression. Cette partie s'intéressera donc à la structure des séquences régulatrices pour les différents groupes de HSP70, afin de déterminer si les promoteurs sont conservés au sein des différents groupes de HSP70 cytosolique décrits.

Les séquences choisies pour ces analyses ont été sélectionnées parmi les données de génomes séquencés de chélicérates (*Ixodes scapularis* et *Tetranychus urticae*) et d'hexapodes (*Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* et *Plutella xylostella*). En effet, aucun assemblage de génome de malacostracé n'est encore suffisamment aboutit pour ce type d'analyse structurale (faible taille des fragments assemblés).

Les analyses ont été effectuées à partir de séquences remontant sur 3000 pb maximum en amont de l'ORF (*Open Reading Frame*). Les séquences régulatrices ont été soumises à la plateforme AliBaba2 (Grabe, 2002) pour identifier les sites de fixation de facteurs de transcriptions, répertoriés dans la base de données TRANSFAC 4.0 (Wingender et al., 1996). Les recherches se sont limitées à la détection des boîtes CCAAT, des sites de fixation des HSF (*Heat Shock Factor*), correspondant aux HSE (*Heat Shock Element*), et des facteurs de transcription NFkB (*Nuclear factor kappa B*), impliqués dans l'induction des gènes de HSP70 (Chuang et al., 2007).

Les recherches ont tout d'abord été effectuées sur les promoteurs associés aux HSP70 cytosoliques de *Drosophila melanogaster*, dont la diversité et les profils d'expression ont été largement étudiés. Les HSC70-1 et HSC70-4 sont constitutives et rassemblées dans le groupe AB, tandis que les différentes HSP70 et la HSP68, groupées avec les HSP70 C, sont induites par une augmentation de la température (Palter et al., 1986). Cette première analyse a eu pour objectif de comparer les structures régulatrices des gènes constitutifs et inductibles de HSP70 (**Figure 3.8**). Les gènes inductibles de *D. melanogaster* présentent 2 à 3 HSE dans les 600 pb en amont de l'ATG. Le groupe de HSP70 annotées Ba, Bb et Bc possède également 1 à 2 sites de fixation de NFκB (en position -660 à -956), un facteur de transcription impliqué dans de nombreuses voies de communication cellulaire dont les réponses au stress, les réponses immunitaires et l'apoptose (signal pro-apoptotique). Néanmoins, les sites de fixation de NFκB, ainsi que les boîtes CCAAT ne semblent pas indispensables au caractère inductible de la HSP70 Ab. Le promoteur du gène de la HSP68 possède également 2 sites de fixation NFκB mais uniquement un HSE dans les 1000 pb en amont de l'ATG.

Les promoteurs des gènes de HSC70 présentent également de nombreux éléments inducteurs de l'expression, mais plus éloignés du codon initiateur. La présence d'un HSE proche de l'ATG (position -384) a d'ailleurs été constatée dans la région promotrice de la HSC70-1. Cet unique HSE ne semble cependant pas suffisant pour l'induction du gène. La présence et la localisation des éléments régulateurs plus éloignés, au-delà de -1000 pb, sont particulièrement variables d'une séquence à l'autre. Des expériences de fonctionnalité pour chaque promoteur sont donc nécessaires pour évaluer leur degré d'implication dans l'expression des gènes associés.

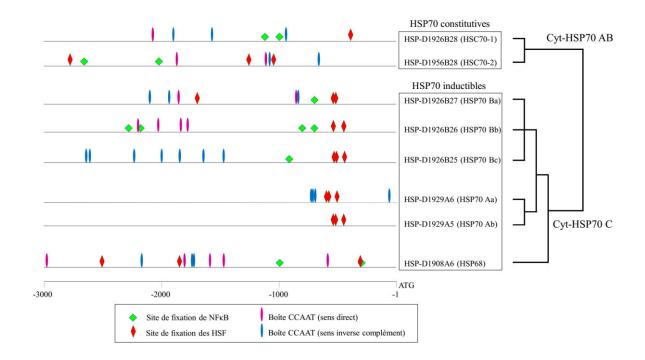


Figure 3.8 : Schéma des régions régulatrices pour les différents gènes de HSP70 de Drosophila melanogaster. Les liens de parenté entre chaque séquence protéique correspondante ont été déduits des analyses phylogénétiques de HSP70 chez les arthropodes (Figure 3.3) et les hexapodes (Figure 3.6).

Les séquences régulatrices associées à différents gènes de chélicérates et d'hexapodes ont ensuite été analysées, afin de détecter d'éventuelles particularités structurales communes pour chaque groupe de HSP70 et comparables à celles des promoteurs constitutifs ou inductibles des gènes de D. melanogaster. Les séquences des trois formes de HSP70 : AB I, AB II et AB III de Tetranychus urticae ont été choisies car elles semblent être apparues tardivement dans l'évolution (cf. partie 3.2.2.3), et leur promoteur pourrait donc être conservé pour ces différentes formes. Les analyses ont également été réalisées sur des séquences de Bombyx mori et Plutella xylostella, afin d'évaluer si les séquences régulatrices peuvent être conservés pour un même type de HSP70 au sein d'un même infraordre (Neolepidoptera). De même, plusieurs séquences appartenant au même groupe de HSP70 ont été analysées afin d'évaluer la variabilité des séquences régulatrices au sein d'une espèce. Enfin, les séquences de HSP70 AB et HSP70 C d'Ixodes scapularis ont été ajoutées à l'analyse pour observer une éventuelle conservation des structures promotrices associées aux HSP70 AB et C dans le phylum Arthropoda. Les relations de parenté entre les différentes séquences utilisées sont représentées dans un arbre, définit à partir des analyses phylogénétiques chez les arthropodes, chélicérates et hexapodes (cf. partie 3.2.2). Les structures des séquences régulatrices et les relations de parenté des séquences associées sont représentées Figure 3.9.

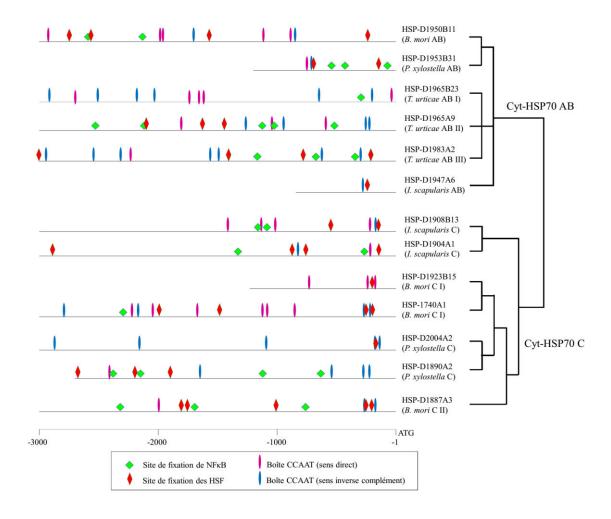


Figure 3.9: Schéma des structures des régions régulatrices pour les différents gènes de HSP70 décrits chez les chélicérates et hexapodes. Les espèces étudiées sont Ixodes scapularis et Tetranychus urticae (Chelicerata) ainsi que Bombyx mori et Plutella xylostella (Hexapoda). Les liens de parenté entre chaque séquence protéique correspondante ont été déduits des analyses phylogénétiques de HSP70 chez les arthropodes (Figure 3.3), les chélicérates (Figure 3.5) et les hexapodes (Figure 3.6).

A l'instar des structures observées chez *D. melanogaster*, seules les séquences du groupe C présentent plusieurs HSE dans les 500 pb en amont de l'ORF. Cependant, le promoteur de la séquence HSP-D1890A2 (groupe C) ne présente aucun HSE à proximité de l'ATG, caractéristique de l'inductibilité des gènes de HSP70 chez la drosophile. Dans le groupe AB, une des séquences promotrices (HSP-D1965B23) ne présente aucun HSE. La présence de ces éléments conditionne l'induction des gènes de HSP70 (Shopland and Lis, 1996), on pourrait alors supposer que HSP-D1965B23 est constitutive. A l'opposé, les séquences HSP-D1953B31 et HSP-D1983A2 présentent à la fois un HSE et un site de fixation de NFκB à proximité de l'ORF, structure également retrouvée dans la région promotrice de la HSP68 inductible de drosophile. Ces différentes structures promotrices ne permettent donc pas de présupposer d'un caractère constitutif ou inductible commun aux HSP70 AB ou aux HSP70 C.

Chez *T. urticae*, aucune HSP70 C n'a été mise en évidence, les séquences étant divisées en 3 groupes parmi les HSP70 AB. Bien que leurs séquences régulatrices présentent toutes des boîtes CCAAT et des sites de fixation de NFkB dans les 1000 pb en amont de l'ATG, chaque groupe se

distingue nettement par leurs HSE. La séquence régulatrice associée aux HSP70 AB III présente 2 HSE à proximité de l'ORF, celle associée aux HSP70 AB II présente des HSE éloignés, au-delà de la position -1000 (par rapport à l'ATG), tandis que celle des gènes de HSP70 AB I n'en possède aucun. Ces différences importantes de structure permettent de supposer que ces 3 formes, relatives au même groupe AB, pourraient également avoir des modalités d'expressions distinctes. De plus, les séquences de HSP70 C issues d'espèces proches (*B. mori* et *P. xylostella*, Neolepidoptera), comme les séquences « en doublon », (issues d'une seule espèce et classées dans le même groupe de HSP70), présentent également des variations notables de structure dans leurs séquences régulatrices. Les régions régulatrices des gènes de HSP70 diffèrent donc chez des organismes appartenant au même infraordre ou à la même espèce.

L'analyse structurale du promoteur n'est pas suffisante pour déduire le caractère constitutif ou inductible d'un gène. L'intervention de régions régulatrices distales et de nombreux autres éléments non relevés dans ces analyses, comme l'élément GAGA (Shopland et al., 1995), les boîtes TATA et GATA (Lee et al., 2003), ou la richesse en AT des séquences séparant les HSE (Chen et al., 2011) peuvent également influencer l'expression des gènes de HSP70.

De plus, l'étude précise de fonctionnalité d'un promoteur nécessite des expérimentations, comme par exemple l'analyse de l'expression du gène avec des portions tronquées de sa région régulatrice. Cependant, les structures promotrices observées ne sont pas suffisamment conservées dans chaque groupe pour supposer *a priori* du caractère constitutif ou inductible des gènes associés aux HSP70 AB et HSP70 C. Bien au contraire, la variabilité de leurs régions régulatrices favoriserait l'hypothèse de modalités d'expression diversifiées au sein de chaque groupe de HSP70.

# 3.3.2 Structure protéique des HSP70 identifiées

### 3.3.2.1 Comparaison des structures primaires

Pour la comparaison des séquences protéiques, des alignements multiples ont été effectués en utilisant la plateforme MAFFT (<a href="http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/">http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/</a>; (Katoh and Standley, 2013). Les pourcentages d'identité ont été calculés pour chaque paire de séquences *via* le logiciel Genedoc (Nicholas et al., 1997). Les profils d'hydrophobicité ont été réalisés avec l'outil *protscale* (Gasteiger et al., 2005) avec la méthode Kyte et Doolittle (1982) *via* la plateforme d'Expasy (http://web.expasy.org/protscale/).

Une sélection de 35 séquences représentatives des HSP70 AB et C (chélicérates et hexapodes), ainsi que des HSP70 A et B (malacostracés) a été utilisée pour la comparaison des pourcentages d'identité des séquences protéiques (**Tableau 3.3**). Globalement, les différentes HSP70 cytosoliques présentent un minimum de 65 % d'identité entre elles, pour l'ensemble des espèces étudiées. Les séquences appartenant au groupe C sont aussi proches de celles constituant le groupe AB que le groupe A (67 à 73 % d'identité). Les séquences des groupes A et B présentent logiquement plus d'identité avec le groupe AB (71 à 86%) qu'avec le groupe C (65 à 73%).

A l'intérieur de chaque groupe, les HSP70 C semblent aussi diversifiées que les HSP70 AB avec respectivement 72 et 74 % d'identité minimum entre séquences. En revanche, chez les malacostracés, le groupe A est plus conservé que le groupe B avec respectivement 82 et 76 % d'identité minimum entre séquences. L'étude plus précise des pourcentages d'identité parmi les HSP70 d'astacidés montre que les séquences du groupe B1 sont aussi proches des HSP70 A1 et A2 (77 à 79%) que des HSP70 B2 (76 à 78%). Pourtant le groupe B est particulièrement bien soutenu par les analyses phylogénétiques, et la

proche parenté des groupes B1 et B2 ne fait aucun doute. La diversité des HSP70 cytosoliques ne peut donc pas être uniquement expliquée par de simples identités de séquences.

Tableau 3.3 : Comparaison des pourcentages d'identité des séquences protéiques de HSP70 pour différents groupes décrits. Les séquences ont été sélectionnées parmi les HSP70 AB et C de chélicérates (Tetranychus urticae et Ixodes scapularis) et d'hexapodes (Bombyx mori, Drosophila melanogaster et Plutella xylostella), ainsi que les HSP70 A1, A2, A3, B1 et B2 de malacostracés (Astacus astacus, Cancer borealis, Euphausia crystallorophias et Homarus americanus).

							HS7	0 C									HSP	70 AB							I	ISP70 A							HSF	P70 B		
		D. melanogaster (HSP68) D1908A6	D. melanogaster (HSP70 Bc) D1926B25	D. melanogaster (HSP70 Bb) D1926B26	D. melanogaster (HSP70 Ba) D1926B27	D. melanogaster (HSP70 Ab) D1929A5	D. melanogaster (HSP70 Aa) D1929A6	P. xylostella D2004A1	P. xylostella D1890A2	B. mori (C1) D2031A1	B. mori (C1) D1923A1	B. mori (C II) D1887A3	l. scapularis D1908B13	D. melanogaster (HSC70-1) D1926B28	D. melanogaster (HSC70-2) D1956B28	P. xylostella D1953B22	B. mori D1950B11	I. scapularis D1947A6	T. urticae (AB I) D1965B23	T. urticae (AB II) D1965A9	T. urticae (AB III) D1983A2	4. astacus (A1) D1977A6	H. americanus (A1) D1971A1	C. borealis (A1) D1962B24	E. crystallorophias (A1) D1974A2	E. crystallorophias (A1) D2007A1	A. astacus (A2) D1920B11	H. americanus (A2) D1929A9	C. borealis (A3) D1968B14	E. crystallorophias (A3) D1977A4	A. astacus (B1) D1908A9	H. americanus (B1) D1901A1	C. borealis (B1) D1905A9	E. crystallorophias (B2) D1905A1	A. astacus (B2) D1947B10	H. americanus (B2) D1917A1
D. melanogaster (HSP68) D. melanogaster (HSP70 Bc) D. melanogaster (HSP70 Ba) D. melanogaster (HSP70 Ba) D. melanogaster (HSP70 Ab) D. melanogaster (HSP70 Ab) P. xylostella B. mori (C I) B. mori (C II) I. scapularis	D1908A6 D1926B25 D1926B26 D1926B27 D1929A5 D1929A6 D2004A1 D1890A2 D2031A1 D1923A1 D1887A3 D1908B13	100 81 81 81 81 81 75 79 76 80 79	100 99 99 98 98 75 78 76 78 78	100 99 98 98 75 78 76 78 78	100 98 98 75 78 76 78 78	100 99 75 79 75 78 78 74	100 76 79 75 78 78	100 82 87 84 8	100 84 88 86 77	100 93 83 72	100 87 76	100 76	100	7	7		7								7	1		/		I				1		
D. melanogaster (HSC70-1) D. melanogaster (HSC70-2) P. xylostella O. E. mori d. I. scapularis T. urticae (AB II) T. urticae (AB III)	D1926B28 D1956B28 D1953B22 D1950B11 D1947A6 D1965B23 D1965A9 D1983A2	70 70 71 70 71 70 70 70	70 73 73 73 74 71 71	70 73 73 73 74 71 71	70 73 73 73 74 71 71	70 72 73 74 74 71 71	70 72 73 74 74 71 71 70	66 70 69 70 72 69 69	69 70 70 70 71 69 68 68	66 69 69 70 69 69 70 70	69 71 71 71 72 71 71 71	68 68 69 68 71 69 69	67 70 70 69 71 70 71 70	100 81 82 82 81 77 75 74	100 90 89 86 82 81 80	100 97 87 83 82 81	100 87 84 82 80	100 85 83 82	100 88 87	100 93	100															
A astacus (A1) H. americanus (A1) C. borealis (A1) E. crystallorophias (A1) E. crystallorophias (A1) A astacus (A2) H. americanus (A2) C. borealis (A3)	D1977A6 D1971A1 D1962B24 D1974A2 D2007A1 D1920B11 D1929A9 D1968B14	70 71 70 71 68 71 70	72 73 72 73 71 73 73 73	72 73 72 73 71 72 73 73	72 73 72 73 71 73 73 73	72 73 72 72 71 73 73 72	72 73 72 72 71 72 73	71 70 69 68 67 69	69 69 70 70 67 71 71 69	72 71 71 70 69 69 68 70	71 72 72 71 68 72 71 71	69 69 70 69 66 71 70	67 68 68 68 66 69 69	79 80 80 78 75 79 79 78	82 82 81 82 80 80 81	85 85 84 86 83 85 83	85 85 84 85 83 84 83	85 85 84 84 82 83 83	82 81 80 81 79 80 80	83 83 82 81 81 80 80	82 81 8 81 79 80 80	100 96 92 89 86 87 87	100 94 89 86 87 87	100 87 85 85 85 87	100 89 87 87 86	100 82 82 82	100 90 85	100 86	100							
E. crystallorophias (A3) A. astacus (B1) H. americanus (B1) C. borealis (B1) E. crystallorophias (B2) A. astacus (B2) H. americanus (B2)	D1977A4 D1908A9 D1901A1 D1905A9 D1905A1 D1947B10 D1917A1	71 70 70 71 68 67 66	73 72 72 71 70 68 68	73 72 72 71 70 68 68	73 72 72 71 70 68 68	73 72 72 71 70 68 68	73 71 72 71 70 68 68	70 69 68 68 65 64 65	69 70 70 71 68 66 66	71 67 67 67 64 64 65	71 70 71 67 67 69	69 71 71 72 70 67 68	69 71 72 71 69 67 68	79 75 75 74 74 72 72	83 77 77 77 74 73 73	86 77 78 78 76 74 74	78 78 78 78 76 74 74	78 78 79 76 74 73	81 77 77 77 74 73 72	76 77 76 73 73 72	82 75 76 76 72 72 71	86 78 78 78 74 73 73	86 78 78 78 78 75 73 73	85 77 78 78 74 73 73	86 77 78 77 76 73 71	84 74 75 75 73 71 69	84 79 79 79 76 74 72	84 78 79 79 76 72 72	89 78 78 78 75 73 73	77 77 78 74 73 73	100 94 90 79 77 76	100 91 79 78 77	100 80 77 77	100 77 78	100 <b>79</b>	100

Des alignements multiples de séquences protéiques de HSP70 cytosoliques ont été réalisés pour chaque taxon, afin de définir des motifs propres aux différentes formes. Ces motifs sont représentés (**Figure 3.10**) et détaillés dans les tableaux (**Annexe 6**). Les régions variables sont principalement localisées dans le NBD (*Nucleotide Binding Domain*), l'*interdomain linker* et le CTD (*C-Terminal Domain*). La plupart des motifs identifiés permettent à la fois la discrimination des groupes A et B des malacostracés (**Figure 3.10 A**) et celle des groupes AB et C de chélicérates et d'hexapodes (**Figure 3.10 B**). Les séquences appartenant aux groupes AB et C sont plus variables. Cela s'explique par le fait qu'ils incluent plus de taxa.

Dans le NBD, le résidu en position 113 présente une tyrosine dans les groupes A1 et A2, et une phénylalanine pour le groupe A3, remplacée par une asparagine dans le groupe B. On retrouve cette distinction avec une tyrosine, une phénylalanine ou une cystéine dans le groupe AB et une alanine, une asparagine ou une sérine à la même position dans le groupe C. Le NBD présente aussi des insertions de 2 acides aminés pour les groupes B1 et AB et de 4 acides aminés pour le groupe B2 en position 188. Une insertion supplémentaire en position 213 est observée dans le groupe C. L'*interdomain linker* est également remanié dans les différents groupes, notamment par le remplacement de 2 leucines par des valines dans le motif DLLLLDV, pourtant très conservé chez les eucaryotes (Alderson et al., 2014).

Le CTD est le domaine présentant la plus grande variabilité intergroupe. En effet, il présente un réarrangement d'acides aminés chargés (position 561 à 575). De plus, l'extrémité C-terminale des HSP70 du groupe A est caractérisée par une zone riche en glycine, méthionine et proline, caractérisée par un motif GGXP répété. Dans le groupe AB les répétitions GGXP apparaissent dans une majorité de séquences, alors qu'elles sont beaucoup plus rares dans le groupe C. La variabilité de la longueur des HSP70 (cf. partie 3.3.1.1) est directement liée à la structure du CTD, pouvant inclure le motif GGXP répété jusqu'à 13 fois (**Figure 3.11**).

Les motifs discriminants entre les différentes formes de HSP70 sont localisés dans la première moitié du NBD, au niveau de l'*interdomain linker* et tout au long du CTD. Le SBD, zone de fixation des protéines cibles, est quant à lui bien conservé pour chaque forme de HSP70. On peut donc supposer que les différentes HSP70, malgré leur diversité, agissent sur un même ensemble de protéines clientes.

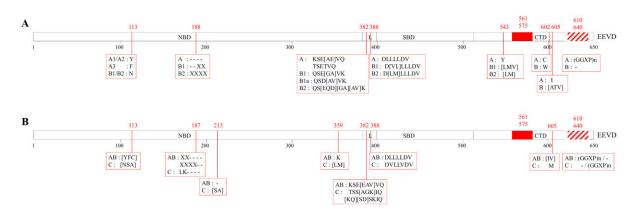


Figure 3.10 : Localisation des motifs discriminants pour les différents groupes de HSP70. Les motifs discriminants des groupes A et B de malacostracés sont présentés figure A, tandis que ceux des groupes AB et C des chélicérates et hexapodes sont présenté figure B.

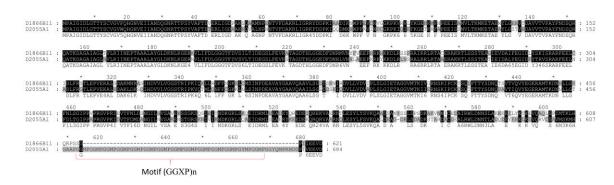


Figure 3.11: Alignement de deux séquences de longueurs extrêmes, la plus courte et la plus longue, parmi les HSP70 du jeu de données. La séquence la plus courte, de 620 acides aminés est codée par un gène de 1866 pb (Acanthoscurria geniculata), tandis que la séquence la plus longue, de 685 acides aminés est codée par un gène de 2055 pb (Bombyx mori). Ces différences de longueur sont dues à une variabilité du CTD et à l'absence/présence du motif GGXP répété ici 13 fois.

Afin de déterminer l'impact de ces motifs discriminants, des profils d'hydrophobicité ont été réalisés à partir des HSP70 de l'écrevisse *Astacus astacus*, espèce pour laquelle chaque forme est représentée par une séquence complète (**Figure 3.12**). Les profils d'hydrophobicité semblent similaires pour les HSP70 A1 et A2. Cependant, les formes A, B1 et B2 montrent des variabilités sensibles d'hydrophobicité au niveau de leurs CTD. En effet, même si les profils des HSP70 A et B2 semblent identiques, l'hydrophobicité du CTD de B2 fluctue de façon plus importante le long du domaine. La première flèche indique une diminution inférieure à -2,5, alors qu'elle est de -2,25 environ pour les formes A. Entre les 520ème et 600ème acides aminés, l'hydrophobicité augmente jusqu'à atteindre 0 pour la forme B2 (deuxième flèche), alors qu'elle n'atteint qu'un maximum de -0,5 chez les HSP70 A. De plus, les 50 résidus de l'extrémité terminale de la forme B2 (troisième flèche) sont globalement plus hydrophobes (-0,5 à -1) que celles des formes A1 et A2 (0 à -0,5). Pour la HSP70 B1, on observe un profil très différent des autres types de HSP70 dans le CTD. Un pic est observé aux environs de la position 550, représentant une zone particulièrement hydrophobe (maximum de +0,5). De plus, les 50 derniers acides aminés de la HSP70 B1 maintiennent une hydrophobicité globalement plus importante au niveau de l'extrémité C-terminale que les HSP70 A.

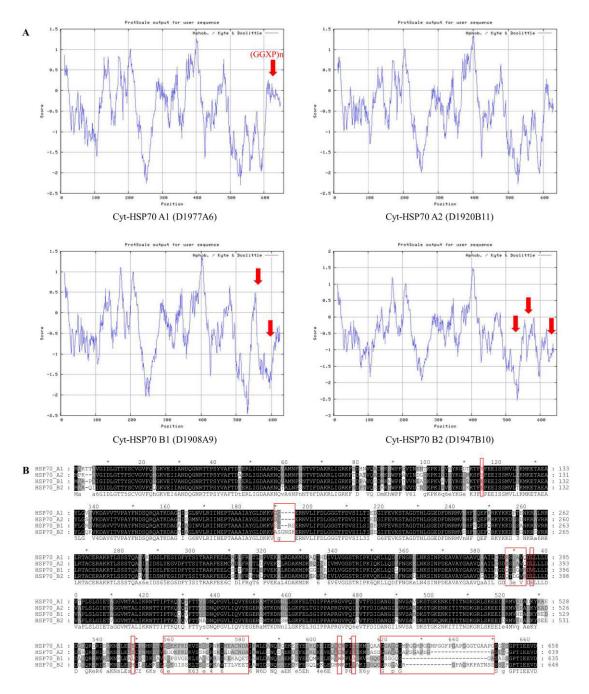


Figure 3.12 : Profils d'hydrophobicité (A) et alignement (B) des formes HSP70 A1, A2, B1 et B2 d'Astacus astacus. Les profils d'hydrophobicité sont représentés par des scores en fonction de la longueur de la séquence analysée. Les zones discriminantes sont indiquées par des flèches (A) ou encadrées en rouge (B).

En conclusion, les sites discriminants des différentes formes de HSP70 n'ont pas tous le même impact sur leurs profils d'hydrophobicité. Alors que chaque type de HSP70 présente des profils équivalents pour le NBD et l'*interdomain linker*, les valeurs d'hydrophobicité du CTD sont très variables d'une forme à l'autre. Les formes HSP70 A possèdent une extrémité C-terminale globalement plus hydrophobe, due à la répétition du motif GGXP ou plus largement à une forte concentration de glycines et de prolines dans cette partie de la séquence primaire. La localisation des motifs discriminants au niveau des structures secondaires et tertiaires permettra, dans la partie suivante, d'associer ces particularités structurales aux conformations tridimensionnelles des différents types de HSP70.

### 3.3.2.2 Comparaison des structures secondaires et tertiaires

L'étude des structures secondaires et tertiaires a été effectuée *in silico*, à partir des séquences protéiques correspondant à chaque groupe de HSP70 (A1, A2, B1 et B2) chez *Astacus astacus*. Les analyses ont été réalisées avec l'interface Phyre2 (<a href="http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/">http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/</a>), développée par (Kelley et al., 2015), avec l'option « *intensive mode* ». Ce programme aligne les séquences primaires avec celles de modèles préexistants afin de déterminer les différentes structures secondaires de chaque région de la séquence. Les structures protéiques tridimensionnelles sont ensuite modélisées en fonction des contraintes appliquées par chaque structure secondaire. Les modélisations 3-D ont été visualisées et modifiées avec le programme UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) afin de mettre en évidence les différents domaines et les motifs discriminants de chaque forme de HSP70.

Les rapports récapitulatifs des structures secondaires mises en évidence par Phyre2 sont présentés en Annexe 7. Le nombre et la localisation des hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$  sont très conservés pour chaque forme de HSP70 étudiée. Les acides aminés variables dans les différentes formes de HSP70 sont représentés en rouge sur la modélisation de la HSP70 A1 de *A. astacus* (**Figure 3.13**). Les motifs discriminants sont principalement localisés entre les structures secondaires du NBD et à l'extrémité de la dernière hélice  $\alpha$  proche de l'*interdomain linker*. Les acides aminés variables localisés dans le domaine C-terminal ne semblent pas modifier la structure des hélices  $\alpha$ . La région riche en glycine, méthionine et proline, constituée de répétitions du motif GGXP, n'a été associée à aucune structure secondaire par Phyre2.

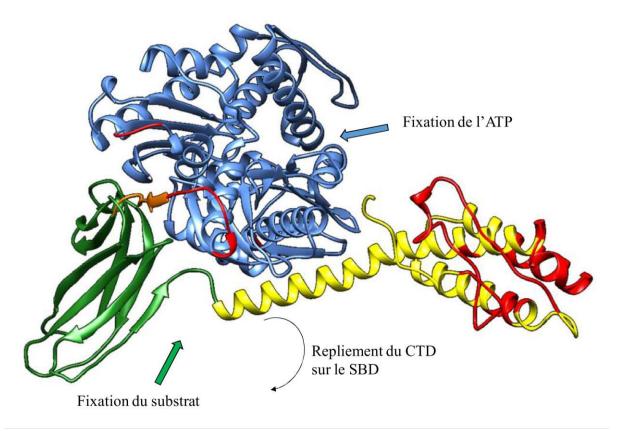


Figure 3.13 : Modélisation de la structure 3-D de la HSP70 A1 d'Astacus astacus (D1977A6). Le NBD est représenté en bleu, l'interdomain linker en orange le SBD en vert et le CTD en jaune. Les motifs discriminants pour chaque forme de HSP70 sont localisés en rouge sur la figure.

Les différentes modélisations réalisées ont montré des conformations 3-D globalement identiques pour chaque forme de HSP70, avec une forte conservation des différentes structures secondaires, tout le long de la protéine. Ces modélisations ont également permis de localiser les motifs discriminants sur des parties de la protéine exposées vers le milieu extérieur. On peut donc émettre l'hypothèse que ces acides aminés variables n'entrainent pas de modification directe des domaines d'interaction des HSP70 avec l'ATP ou leurs protéines substrat. Ces motifs discriminants pourraient néanmoins impacter les interactions des HSP70 avec différentes co-chaperonnes. Les protéines à domaine J et les protéines BAG se lient au NBD de la HSP70 au niveau du site de fixation de l'ATP, qui ne semble pas être modifié pour les différentes formes. En revanche, les protéines Hip, Hop et CHIP se fixent sur l'extrémité C-terminale du CTD, particulièrement variable pour les différents types de HSP70 décrits. De plus, les motifs variables situés sur l'*interdomain linker* sont susceptibles d'affecter les communications entre le NBD et le SBD, modifiant ainsi l'efficacité des HSP70 (Mayer and Bukau, 2005).

### 3.4 DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les 735 séquences de HSP70 cytosoliques du jeu de données ont été utilisées pour une analyse de classification agrégative. Cette première approche a permis de mettre en évidence de nombreux groupes de HSP70 au sein du phylum Arthropoda, et de sélectionner plusieurs jeux de données plus restreints (Arthropoda, Chelicerata, Hexapoda et Malacostraca) pour différentes méthodes d'analyses phylogénétiques. Les arbres obtenus ont confirmé la grande diversité des HSP70 cytosoliques et ont abouti à une nouvelle classification au sein du phylum avec deux principaux groupes annotés HSP70 AB et HSP70 C, ainsi que plusieurs subdivisions propres à certains ordres parmi les chélicérates et les hexapodes. Chez les malacostracés plus particulièrement, on distingue les HSP70 A et HSP70 B, subdivisés respectivement en sous-groupes A1, A2, A3 et B1, B2.

L'hypothèse évolutive privilégiée pour expliquer l'existence de ces différents groupes commence par une duplication d'un gène ancestral commun à toutes les HSP70 cytosoliques. Les deux gènes résultants auraient évolué, avant l'émergence des arthropodes, en deux formes distinctes codant les HSP70 AB et HSP70 C. De nombreux phénomènes de pertes des gènes de HSP70 sont supposés au cours de l'évolution, du fait de l'absence de l'un ou l'autre de ces principaux groupes chez certains ordres appartenant aux Chelicerata ou aux Hexapoda. Plus particulièrement, aucune séquence du groupe C n'a été observée dans les classes Branchiopoda, Malacostraca et Maxillopoda. Cependant, l'existence de plusieurs groupes de HSP70 a été constatée pour l'ensemble des taxa étudiés et ces pertes semblent donc compensées par de nouvelles duplications. Les groupes A et B ont ainsi été définis dans le superordre Eucarida, et semblent issus de la duplication d'un gène ancestral, commun aux actuels groupes AB des chélicérates et des hexapodes. Le groupe A semble s'être différencié peu après en sous-groupes A1 et A3, présents chez des taxa éloignés d'eucaridés (Brachyura et Euphausiacea).

Malgré la grande conservation des HSP70 cytosoliques dans le vivant, les séquences codantes d'arthropodes présentent des longueurs pouvant varier de 150 pb. Ces différences de taille sont prinncipalement observées dans les deux principaux groupes HSP70 AB et HSP70 C. Chez les malacostracés, les séquences associées au groupe A sont globalement plus longues que celles du groupe B. Ces différences de taille sont reflétées par la présence de motifs particuliers dans les séquences protéiques des HSP70 A, qui sont absentes des séquences du groupe B.

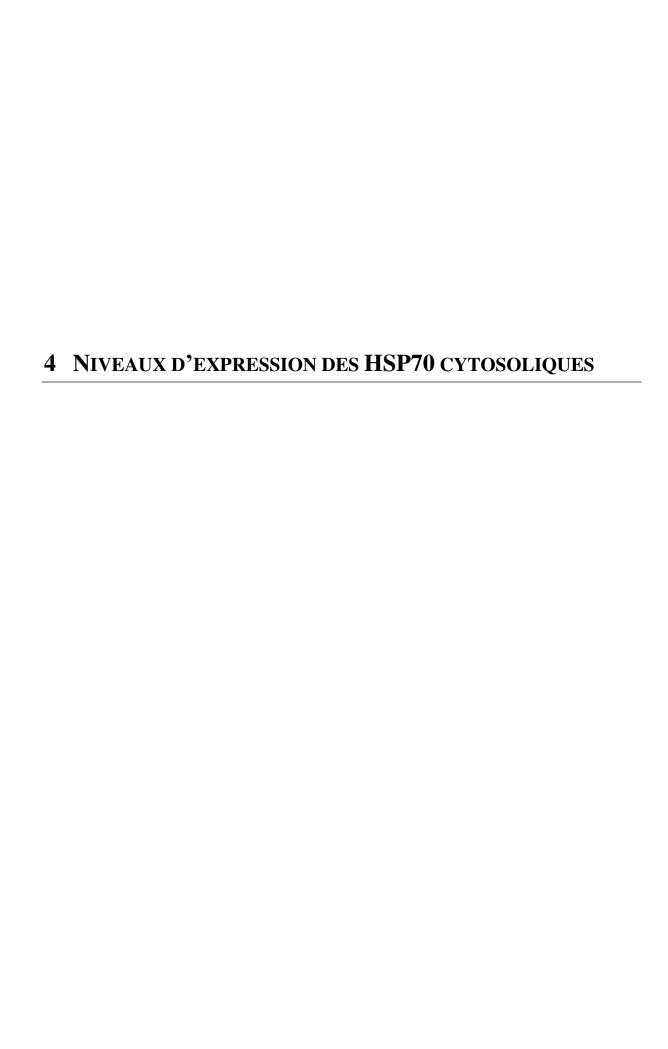
En effet, les séquences appartenant à ces différents groupes se distinguent par des motifs protéiques discriminants, situés principalement au niveau du NBD de l'*interdomain linker* et du CTD. Le motif le plus notable est une répétition GGXP, retrouvée dans les séquences de HSP70 A et absente

des HSP70 B chez les malacostracés. La présence de ce motif est responsable d'une certaine variabilité de la longueur des HSP70, et change sensiblement le profil d'hydrophobicité de leur CTD. Ces motifs variables ne semblent pas impacter directement l'activité ATPase des HSP70 ou leur action de chaperonne sur les protéines cibles. Cependant, ils pourraient être responsables d'une modification des interactions entre le CTD des HSP70 et les co-chaperonnes CHIP, Hip et Hop. De plus, la variation de séquence observée dans l'*interdomain linker* pourrait également affecter la communication entre le NBD et le SBD de la HSP70, et donc modifier son efficacité.

Les principales formes de HSP70 décrites dans cette partie (AB et C) ne peuvent être associées à la présence ou au nombre d'introns présents dans les gènes. En effet, cette caractéristique semble plutôt dépendante des espèces étudiées, laissant supposer des évènements évolutifs d'acquisition indépendants. Cependant, dans la classification plus fine définie pour les HSP70 de malacostracés, les séquences appartenant au groupe B1 possèdent un intron unique au niveau du nucléotide en position 171.

La diversité des HSP70 est souvent associée dans la littérature à leurs profils d'expression constitutif (HSC70) ou inductible (HSP70). Une analyse structurale des régions régulatrices a été effectuée sur plusieurs gènes de chélicérates et d'hexapodes associés aux HSP70 AB et HSP70 C. La comparaison de ces séquences régulatrices à celles des HSC70 et des HSP70 de *Drosophila melanogaster*, ne suggère aucune corrélation entre les différents groupes de HSP70 et des modalités particulières d'expression de leurs gènes. Les résultats présentés dans cette partie ont été valorisés par la publication d'un article de recherche (Baringou et al., 2016).

L'analyse structurale des régions régulatrices proximales ne suffisant pas pour tirer des conclusions sur l'expression des différentes formes de HSP70. La prochaine partie s'intéressera donc à l'étude directe des niveaux d'expression des gènes correspondant aux différents types de HSP70 décrits.



# 4.1 EXPERIENCES DE CHOCS THERMIQUES

Des expérimentations animales ont été réalisées chez plusieurs espèces de décapodes afin de déterminer les niveaux d'expression des différentes formes de HSP70 en conditions de stress thermique. Cependant, cette démarche n'a pas abouti à des résultats exploitables en raison de problèmes d'efficacité des amorces de qPCR et de temps. Cette partie détaillera donc les expérimentations entreprises et exposera également une revue de la littérature abordant l'expression des gènes de HSP70, associée à la nouvelle classification définie au cours de cette étude.

### 4.1.1 Protocoles d'expérimentation animale

Les modèles d'études ont été choisis en fonction des résultats obtenus au cours du séquençage des fragments associés aux différentes formes de HSP70, de l'accessibilité des espèces et de leur impact écologique. Les espèces *Procambarus clarkii* et *Carcinus maenas* ont été sélectionnées pour leur caractère invasif et donc leur capacité à supporter d'importantes variations de température (Hobbs et al., 1989; Leignel et al., 2014). L'espèce *Necora puber* appartient à la même superfamille que *C. maenas* (Portunoidea), mais s'avère beaucoup plus sensible à une augmentation de la température. En effet, les CTmax (*Critical Thermal maximum*) mesurée en hiver et en été sont de 31,9 à 34,1°C pour *C. maenas* et 26,4 à 29,5°C pour *N. puber* (Hopkin et al., 2006). Chez *P. clarkii*, la CTmax estimée est de 37,5 à 41°C pour une température d'acclimatation comprise entre 20 et 30°C (Bückle et al., 1996). L'objectif de cette étude était donc de comparer l'expression des HSP70 chez ces espèces invasives et « sensibles ». L'hypothèse initiale étant l'existence d'une corrélation entre les niveaux d'expression des différentes formes et la résistance (ou la sensibilité) de ces organismes aux variations de température (cf. partie 1.1.3).

Environ 90 individus de chaque espèce ont été achetés à un détaillant au Mans (*N. puber*, *P. clarkii*, provenant respectivement de Normandie et des Pays de la Loire). Les organismes ont été acclimatés dans de l'eau de mer artificielle pendant 2 semaines à  $20 \pm 1$  °C et nourris avec des sardines tous les 2 jours. L'eau de mer a été reconstituée avec de l'Instant Ocean<sup>TM</sup> (32 g.L<sup>-1</sup>) et renouvelée au minimum 2 fois par semaine.

Dans la littérature, la surexpression des gènes de HSP70 a été observée dans différents tissus (branchies, cœur, glandes antennales, estomac, hépatopancréas ou muscle), après 1 à 6 heures de choc thermique chez *Litopenaeus vannamei* et *P. clarkii* (Sun et al., 2009; Wu et al., 2008) et après 12 heures de stress chez *Macrobrachium nipponense* (Xiu et al., 2014).

Au cours de nos expériences, les crabes ont été exposés à différentes températures (10, 15, 25 et 30°C) pendant 3 et 6 heures pour *C. maenas* et uniquement 3 heures pour *N. puber* (en raison de la mortalité importante des individus au-delà de cette durée d'exposition). Les animaux ont ensuite été plongés dans un coma thermique par immersion rapide dans l'azote liquide, et disséqués immédiatement après. Les organes prélevés (branchies, estomac, hépatopancréas et muscle abdominal) ont été transférés dans des tubes stériles, exempts de DNAse et RNAse, et conservés à -80°C jusqu'à extraction des ARN. Les écrevisses quant à elles été exposées à des températures de 10 et 30°C pendant 2, 12 et 24 heures. Les organes de *P. clarkii* (branchies, glandes antennales, muscle abdominal) ont été prélevés et conservés dans les mêmes conditions que celles décrites pour les crabes.

# 4 NIVEAUX D'EXPRESSION DES HSP70 CYTOSOLIQUES

### 4.1.2 Protocole de quantification des transcrits

L'extraction des ARN totaux, le traitement DNase et la transcription inverse ont été réalisées selon le protocole décrit en partie 2.1.3.1.

La quantification des transcrits a été envisagée par PCR quantitative (qPCR). Les gènes de référence ont été choisis dans la littérature : pour *P. clarkii* les gènes de la β-actine (Sun et al., 2009) et du 18S (Nicosia et al., 2014) et pour *C. maenas*, les gènes de la β-actine (Fu et al., 2013; Yang et al., 2013) et du facteur d'élongation EF2 (Abuhagr et al., 2014; McDonald et al., 2011). Les amorces décrites dans les publications citées précédemment ont été commandées, ou définies à l'aide de la plateforme Primer3Plus (<a href="http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi">http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi</a>), en respectant les exigences de la qPCR selon les recommandations de (Thornton and Basu, 2011).

Les tests d'efficacité pour chaque couple d'amorces ont été effectués sur deux réplicats, à partir de mélanges d'ADNc dilués en cascade (1/10, 1/100, 1/1000, 1/1000). Les mélanges réactionnels ont été réalisés dans un volume final de 25  $\mu$ L, avec le fluorochrome SYBR Green et les autres réactifs du kit GoTaq ® qPCR master mix, selon les recommandations du fabriquant. Les réactions ont été mesurées avec le thermocycleur Applied Biosystems Step One<sup>TM</sup> sur des plaques 96 puits. Le programme d'amplification a été paramétré avec une étape initiale de dénaturation (95°C, 2 min), suivie de 50 cycles de dénaturation (95°C, 15 s) et d'hybridation/élongation (60°C, 60 s).

Cependant, les efficacités mesurées pour chaque couple d'amorces se sont avérées inférieures à 80 %, en dessous du seuil acceptable en qPCR. Après diverses vérifications (telles que la modification des amorces, l'utilisation d'autres échantillons d'ADNc et des tests d'échantillons non traités à la DNase), ces faibles valeurs d'efficacité ont été imputées à une mauvaise qualité des ARN extraits. Le protocole n'a pu être modifié dans le temps imparti pour ces travaux de recherche. A défaut de résultats expérimentaux, l'étude de l'expression des différentes formes de HSP70 a été réalisée à travers une revue de la bibliographie.

## 4.2 REVUE: APPROCHE COMPARATIVE DE L'EXPRESSION DES HSP70

### 4.2.1 Etudes d'expression en réponse aux stress thermiques chez les malacostracés

Une revue de la bibliographie a permis de regrouper les séquences utilisées pour les études d'expression des HSP70 chez les malacostracés lors de stress thermiques. Les résultats sont présentés dans l'Annexe 8A et reportés dans l'arbre phylogénétique des HSP70 de malacostracés (Figure 4.1). Afin de déterminer si les différentes formes de HSP70 peuvent être associées à des profils constitutifs ou inductibles, les données d'expression ont été classées en 3 groupes : induction statistiquement non significative (NS), inférieure (+) ou supérieure (++) à 9 fois le niveau d'expression de la condition témoin. En effet, ces niveaux d'expression caractérisent les HSC70 et les HSP70 respectivement, dans la publication de (Luan et al., 2010).

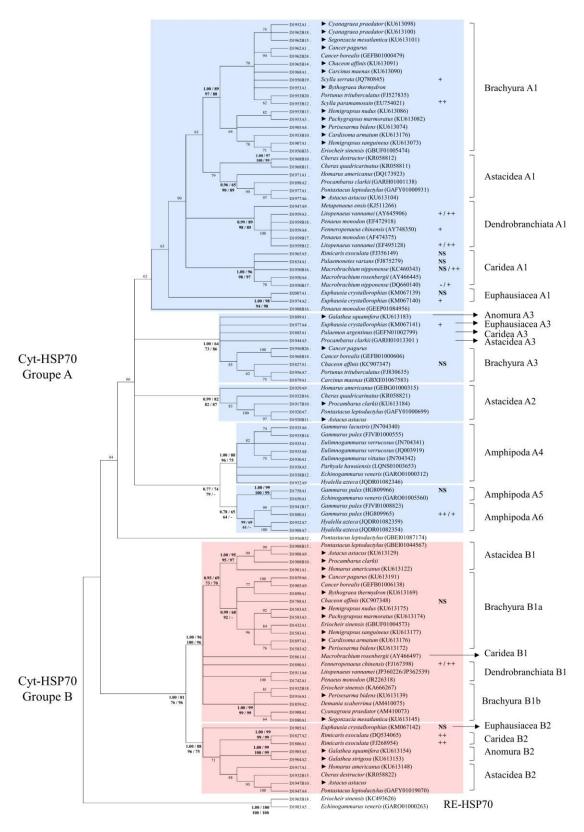


Figure 4.1: Phylogénie des HSP70 associées à leur capacité d'induction lors de stress thermiques (Malacostraca). Seules les valeurs d'inductions obtenues par qPCR sont présentées. Les publications d'où sont issues ces données sont listées Annexe 8A. Les niveaux d'induction sont représentés par l'abréviation NS (Non Significatifs) ou par les symboles + (induction inférieure à 9 fois le niveau témoin), ++ (induction supérieure à 9 fois le niveau témoin) ou – (sous-expression). Les valeurs seuils d'induction ont été définies à partir des résultats obtenus par (Luan et al., 2010).

# 4 NIVEAUX D'EXPRESSION DES HSP70 CYTOSOLIQUES

La plupart des séquences utilisées pour les études d'expression se groupent avec les HSP70 A1. Les séquences étudiées montrent des expressions variables en réponse aux stress thermiques, avec des profils constitutifs (*Palaemonetes varians*, *Rimicaris exoculata*, (Cottin et al., 2010) ou des inductibles jusqu'à 23,3 fois le niveau d'expression témoin (*Scylla paramamosain*, (Yang et al., 2013). Ces différents profils d'expression peuvent également être observés pour les gènes issus d'un même taxa. Par exemple, plusieurs séquences groupées parmi les HSP70 A1, DQ660140 et KC460343, présentent des surexpressions respectives de 2,2 et 11,67 fois le niveau témoin, dans les branchies de *Macrobrachium nipponense* (Xiu et al., 2014). De même, deux gènes appartenant au même groupe des HSP70 A1 présentent des niveaux d'expression distincts (9,5 ou 3,7 fois la condition témoin) dans l'hépatopancréas de *Litopenaeus vannamei* (Qian et al., 2012). Les expressions des séquences appartenant aux HSP70 A2, A3, B1 et B2 sont quant à elles peu ou pas représentées dans la littérature. Cependant, les données disponibles montrent également des capacités d'induction très variables d'une séquence à l'autre. Par exemple, parmi les HSP70 B1 le gène d'*Euphausia crystallorophias* n'est pas significativement surexprimé, tandis que ceux de *Rimicaris exoculata* présentent des inductions supérieures à 100 fois le niveau témoin (Cascella et al., 2015; Cottin et al., 2010).

Le type de tissu étudié influence grandement l'expression des gènes de HSP70, et pourrait expliquer en partie l'hétérogénéité des résultats. Par exemple, la séquence de *Macrobrachium nipponense* KC460343 est surexprimée dans les branchies mais ne présente pas d'induction significative dans l'hépatopancréas, pour des conditions expérimentales identiques (Xiu et al., 2014).

De plus, les gènes de HSP70 présentent des profils d'expression variables en fonction des conditions de stress thermique testées. En effet, la séquence de HSP70 B1 de *Fenneropenaeus chinensis* (FJ167398) est fortement induite après 2 heures de stress (100 fois le niveau témoin), mais son niveau d'expression chute radicalement après 6 heures (Luan et al., 2010).

Enfin, la population étudiée peut également influencer le niveau d'expression des gènes de HSP70. En effet, pour deux populations de gammares (Nord et Sud de la vallée du Rhône, France), le gène associé aux HSP70 A6 est globalement moins exprimé dans la population du Sud (Cottin et al., 2015).

### 4.2.2 Extensions de l'étude aux HSP70 d'hexapodes et de chélicérates

Chez *Drosophila melanogaster*, les HSP70 AB sont constitutives, tandis que les HSP70 C semblent être induites par une élévation de la température (Palter et al., 1986). Cependant, les études d'expression menées sur d'autres espèces de chélicérates et d'hexapodes ont montré des profils d'induction plus complexes **Annexe 8B**. Chez *Ericerus pela* (Hemiptera), le gène correspondant à la HSP70 AB est effectivement peu ou pas surexprimé en réponse à des stress thermiques de différentes intensités, tandis que le gène associé au groupe HSP70 C est fortement induit par ces stress chez les femelles (x 55 ou x 145 en fonction des conditions expérimentales). Cependant ce dernier est faiblement surexprimé chez les individus mâles, avec des niveaux d'expression inférieurs à 2 fois le niveau témoin (Liu et al., 2014b). Chez le coléoptère *Tribolium castaneum*, le gène de la HSP70 C est également faiblement induit (3 fois le niveau basal d'expression) en réponse à un stress thermique. Pourtant, le niveau d'expression de ce même gène augmente de 50 fois le niveau témoin après un choc septique (Altincicek et al., 2008).

Aucune HSP70 C n'a été observée pour plusieurs ordres appartenant aux chélicérates, et l'analogie avec les capacités d'induction des différentes formes de HSP70 de *D. melanogaster* semble donc peu réaliste. En effet, chez la mite *Panonychus citri*, les gènes associés aux deux seules formes de

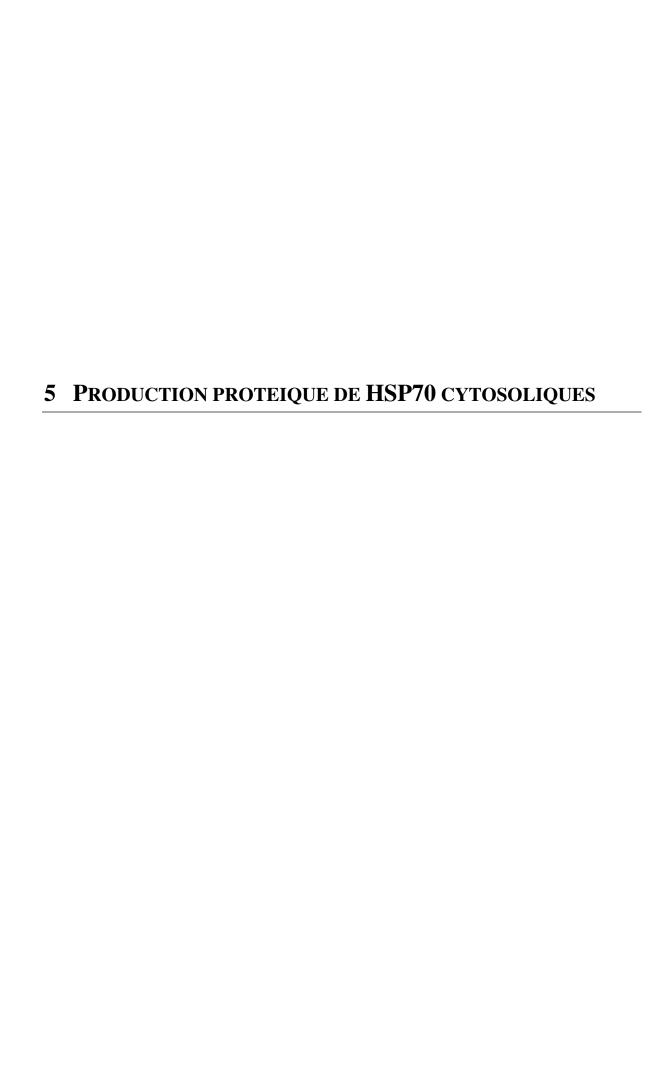
HSP70 cytosoliques connues, AB I et AB II, montrent des profils d'induction très différents malgré leur proximité de séquence. La forme HSP70 AB I n'est pas induite significativement par un stress thermique et semble donc être constitutive. En revanche, pour les mêmes conditions expérimentales, le gène correspondant à la HSP70 AB II est surexprimé plus de 28 fois, par rapport au niveau témoin (Yang et al., 2012). Chez *Tetranychus cinnabarinus*, l'expression des gènes de HSP70 AB I et AB III sont quant à eux faiblement surexprimés (respectivement 2 et 3 fois le niveau basal) et paraissent donc constitutifs (Li et al., 2009).

## 4.3 DISCUSSION ET CONCLUSION

Les études d'expression publiées traitent principalement des HSP70 associées au groupe A1 chez les malacostracés. Dans plusieurs études, les niveaux d'expression observés en conditions normales s'avèrent étroitement liés à l'espèce étudiée (Cui et al., 2010; Fu et al., 2013; Gao et al., 2016; Rungrassamee et al., 2010; Xiu et al., 2014; Yang et al., 2013). De plus, les profils d'expression mis en évidence en réponse à des stress thermiques sont également variables d'un tissu à l'autre (Xiu et al., 2014). Le caractère constitutif ou inductible des gènes étudiés semble également dépendant de plusieurs autres facteurs, tels que l'intensité du stress thermique et le temps d'exposition (Cottin et al., 2015; Luan et al., 2010), ou encore de l'origine géographique de la population étudiée (Cascella et al., 2015; Cottin et al., 2015). De plus, leurs profils d'expression peuvent être variable, même pour des séquences proches issues d'une même espèce, d'un même tissu et soumises à des conditions expérimentales similaires (Qian et al., 2012). Chez les chélicérates et les hexapodes, différentes modalités d'expression ont également été observées pour les gènes associés aux groupes HSP70 AB ou HSP70 C (Liu et al., 2014b; Yang et al., 2012). Dans ces taxa, l'inductibilité des HSP70 cytosoliques en réponse aux stress thermiques peut être corrélée au sexe des individus étudiés (Liu et al., 2014b) ou encore à des capacités de résistance à certains pesticides (Zhang et al., 2015).

Les caractères constitutifs et inductibles des HSP70 cytosoliques peuvent également dépendre du type de stress étudié. En effet, chez les malacostracés les stress biotiques ou anthropiques entraînent une surexpression des HSP70 d'environ 9 fois la condition témoin (Fu et al., 2013; Qian et al., 2012; Yang et al., 2013), ces dernières seraient alors considérées comme constitutives dans ces contextes, selon les critères de Luan et al. (2010). A l'opposé, le gène associé à la HSP70 C de *T. castaneum* est faiblement surexprimé lors d'un stress thermique, et pourrait donc être considéré comme constitutif, alors que sa forte induction lors d'un stress biotique le classerait dans la catégorie des HSP70 inductibles (Altincicek et al., 2008).

En tenant compte de l'ensemble de ces données, il semble nécessaire d'associer précisément les annotations « HSC70 » ou « HSP70 » à l'espèce, au tissu et aux conditions expérimentales étudiées, plutôt qu'à une séquence particulière. De plus, Krenek et al. (2013), suggèrent une acquisition d'inductibilité des gènes HSP70 à plusieurs reprises dans l'évolution des eucaryotes. Cette même hypothèse a été formulée par McCallister et al. (2015), basée sur une absence de corrélation directe entre le caractère inductible et l'évolution des HSP70. Ces phénomènes pourraient être expliqués par la variabilité importante des régions régulatrices, permettant ainsi la transition réciproque d'un caractère constitutif à inductible de ces gènes.



Le troisième volet de cette thèse s'est intéressé à la production des différentes formes de HSP70 cytosoliques. Les protocoles de vectorisation, de clonage et de production ont été mis au point au cours de cette étude, afin d'envisager des tests ultérieurs d'efficacité, en présence de différents cofacteurs.

# 5.1 MATERIEL ET METHODE: PROTOCOLE DE VECTORISATION ET DE PRODUCTION PROTEIQUE

Après plusieurs essais, les espèces *Astacus astacus* et *Procambarus clarkii* ont été choisis comme modèles d'étude. En effet, les alignements multiples des séquences obtenues lors de cette étude et de celles disponibles dans les bases de données internationales ont permis l'élaboration de différents couples d'amorces spécifiques à plusieurs formes de HSP70 décrites. Ces amorces, définies au niveau du codon initiateur et du codon STOP, ont été utilisées pour l'amplification des ORF complets en une seule réaction PCR, à partir d'une matrice d'ADNc afin de s'affranchir de la présence d'introns.

#### 5.1.1 Protocole de vectorisation

Les amplifications PCR ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 1% afin de s'assurer de la taille des fragments obtenus. Les séquences amplifiées ont ensuite été découpées, clonées dans des vecteurs pGEMt et transformées dans des bactéries *E. coli* compétentes, selon les protocoles décrits dans la partie 2.1.3.2. Cinq clones positifs ont été sélectionnés pour chaque séquence et chaque espèce, puis mis en culture dans 50 mL de milieu LB liquide additionné d'ampicilline (2,5 mg.mL-1) durant 16 heures, afin de multiplier les vecteurs de clonage contenant les inserts d'intérêts. Les plasmides ont été extraits avec le kit *Wizard*® *Plus SV Minipreps DNA Purification System* de Promega®, selon les recommandations du fabriquant. Une partie des extractions de plasmide (50 µL) a été séquencée pour vérifier l'intégrité de l'ORF présent dans l'insert et de son cadre de lecture, avant de poursuivre les manipulations.

Le vecteur d'expression pRB493 (Catanzariti et al., 2004) a été recommandé et fournit par le Dr Marcel Koken (LABOCEA-CNRS, Plouzané, France). Son système d'induction comprend le promoteur fort du phage T7, contrôlé par la T7 ARN polymérase produite par la souche bactérienne, et un promoteur bactérien Lac O dédoublé, et inductibles par l'IPTG (<u>I</u>sopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside). Le pRB493 permet la synthèse d'une protéine de fusion comprenant l'étiquette hexa-histidine et une ubiquitine qui seront utilisés pour la purification des HSP70 (**Figure 5.1**).

Les vecteurs de clonage contenant les séquences d'intérêt ont servi de matrice pour les inserts du pRB. Les amorces utilisées sont spécifiques des séquences de HSP70 et additionnées des sites de restriction des enzymes *Sac II* (en amont de l'ATG) et *Hind III* (en aval du codon STOP), qui sont absents des gènes de HSP70 (cf. **Annexe 1**). La séquence en aval de l'ATG code également les trois derniers acides aminés de l'ubiquitine. Après vérification sur gel d'électrophorèse, ces amplifications PCR ont été découpées, liguées dans le vecteur pGEMt et clonées selon le protocole précédemment décrit (partie 2.1.3.2). Un clone positif par séquence a été sélectionné et mis en culture dans 50 mL de milieu LB liquide en présence d'ampicilline (2,5 mg.mL<sup>-1</sup>), pour l'extraction des plasmides contenant les constructions. Les vecteurs de clonage ont ensuite subi une double digestion avec les enzymes de restriction *Sac II* et *Hind III*, pour libérer les inserts. Les mélanges réactionnels de 30 μL, ont été réalisés avec 1,5 μg de plasmide, 3 μL de tampon 10X 4-CORE®-C Buffer system (Promega®), 0,3 μL de BSA (bovine serum albumin) et 7,5 unités de chaque enzyme (Promega®) et incubés 8 heures à 37°C. Les produits de digestions ont été séparés du plasmide pGEMt sur gel d'électrophorèse 1 %, puis découpés et élués avec le kit *QIAEX II gel extraction kit* (QIAGEN®). Chaque éluat (3 μL) a été ligué

#### 5 PRODUCTION PROTEIQUE DE HSP70 CYTOSOLIQUES

immédiatement pendant 1 heure à température ambiante, en présence de 50 ng de pRB493 ouvert, 3 unités de T4 DNA ligase et 5 µL de tampon de ligation 2X (Promega®).

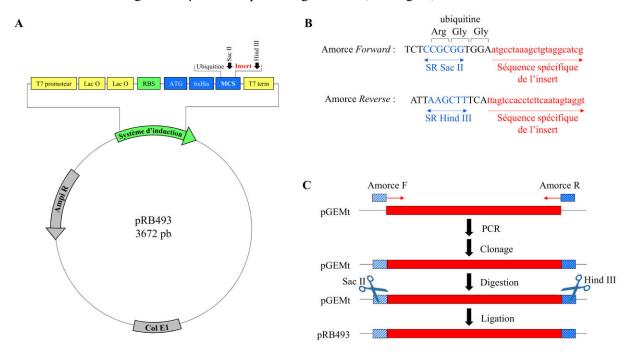


Figure 5.1: Structure du vecteur pRB493 et démarche de vectorisation. Le vecteur d'expression pRB493 (A) présente un site de réplication Col E1 et un gène de résistance à l'ampicilline. Le système d'induction comprend le promoteur du phage T7 et deux promoteurs bactériens Lac O, inductibles à l'IPTG (en jaune). Ces cassettes sont suivies du site de fixation des ribosomes (RBS) ainsi que de la séquence à traduire (en bleu), composée de l'étiquette hexa-histidine et du site multiple de clonage (MCS). Ce dernier inclut une séquence d'ubiquitine et les sites de restriction des enzymes Sac II et Hind III. Les amorces utilisées pour amplifier l'insert du pRB493 sont détaillées figure 5.1B. Elles sont constituées d'une partie spécifique au gène d'intérêt (en rouge), des sites de restriction de Sac II et Hind III (en bleu) et des 3 derniers codons de l'ubiquitine. La démarche expérimentale est schématisée figure 5.1C: une PCR permet l'amplification de l'insert pour le vecteur d'expression. Après clonage, le pGEMt est digéré avec les enzymes de restriction Sac II et Hind III et liguées dans le pRB493 ouvert.

#### 5.1.2 Protocole de production et purification protéique

Les constructions de pRB493 ont été clonées dans la souche bactérienne d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen), qui possède la gène de la T7 polymérase nécessaire à l'expression des gènes de HSP70 recombinés. La production des protéines de fusion par les bactéries recombinantes a été induite par addition d'IPTG dans le milieu de culture (**Figure 5.2**).

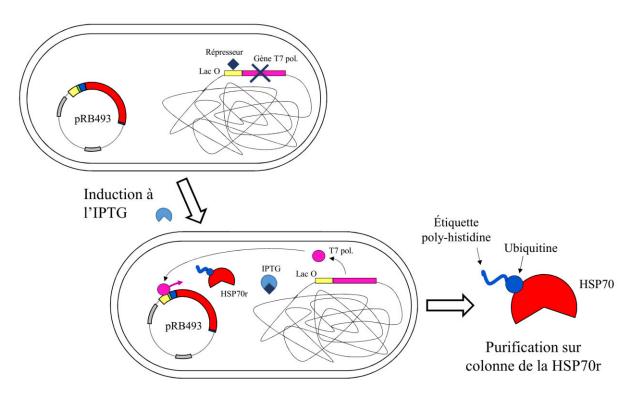


Figure 5.2: Principe de l'induction du pRB493 à l'IPTG. La souche BL21 (DE3) d'Escherichia coli possède le gène de la T7 polymérase (T7pol.) dans son génome, sous contrôle du promoteur Lac O. En conditions normales, l'expression du gène est inhibée en continu par le répresseur de Lac O, Lac I. L'ajout d'IPTG dans le milieu de culture va entrainer la rétention du répresseur et ainsi permettre la synthèse de la T7 polymérase. Cette dernière se fixera à la séquence régulatrice du pRB pour exprimer la séquence de l'insert et permettre la synthèse de la HSP70 recombinante (HSP70r). L'étiquette poly-histidine et l'ubiquitine permettent la purification de la protéine produite.

La compétence bactérienne a été réalisée par prélèvement stérile d'une colonie, transférée dans 100 μL de CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) refroidi à 4°C, puis vortexée 10 à 15 s. Chaque culture de bactéries compétentes a été incubée 20 min dans la glace, avant et après l'ajout de 5 μL de pRB493 ligué. Deux clonages ont été effectués pour chaque séquence. Les transformations ont été réalisées par un choc thermique de 1 min à 42°C, puis transfert dans la glace pendant 5 min. Après addition de 500 μL de milieu LB, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 1 heure sous agitation douce. Pour chaque transformation, 2 boîtes de pétri contenant du milieu LB agar et imprégné de 50 μL d'ampicilline (50 mg.mL<sup>-1</sup>) ont été inoculées avec 100 et 200 μL de culture, puis incubées à 37°C pendant 16 heures. Cinq clones positifs ont été sélectionnés pour chaque séquence et inoculés dans 5 mL de milieu Terrific Broth (TB, Annexe 3), en présence d'ampicilline (25 mg.mL<sup>-1</sup>).

Le protocole a été mis au point à partir de 2 clones pour chaque séquence étudiée, sur de faibles volumes de culture (5 mL) et pour différents temps d'induction à l'IPTG. Il a ensuite été reproduit sur de plus grand volume afin de produire une quantité importante de HSP70.

Chacun des clones sélectionnés pour la mise au point a été repiqué dans 5 mL de culture et mis à incuber à 37°C sous agitation douce, jusqu'à obtention d'une  $DO_{595}$  de 0,8 (fin de phase exponentielle de croissance). Des prélèvements de 500  $\mu$ L ont été réalisés juste avant induction ( $T_0$ ) et à différents temps après l'ajout d'IPTG (concentration finale de 1 mM):  $T_1$ =1 h,  $T_2$ =3 h et  $T_3$ =16 h. Chaque prélèvement a ensuite été centrifugé à 15000 g pendant 5 min, puis les culots bactériens ont été resuspendu dans 50  $\mu$ L de tampon de charge *Laemmli Sample Buffer* 2X (Bio-rad®). Les mélanges ont

#### 5 PRODUCTION PROTEIQUE DE HSP70 CYTOSOLIQUES

été incubés dans un bain sec pendant 5 min à 100°C pour rompre les parois bactériennes et dénaturer les protéines, puis analysés par SDS-PAGE après migration sur gels d'acrylamide 8-16% (GeBA). Les poids moléculaires des protéines visualisées ont été comparées au marqueur Precision Plus Protein<sup>TM</sup> All Blue Prestained Protein Standards (Bio-rad ®) Afin de révéler les protéines des gels obtenus, une coloration a été réalisée pendant 1 h avec une solution de Coomassie sous agitation, suivie par une décoloration pendant 16 h (composition des solutions en **Annexe 3**).

Au regard des résultats, les productions protéiques ont été réitérées sur des volumes de 500 mL de culture en milieu TB additionné d'ampicilline (25 mg.mL<sup>-1</sup>) et avec des temps d'induction de 16 h. Pour ces volumes plus importants, les culots bactériens ont été repris avec 20 mL de tampon de liaison froid (**Annexe 3**). La lyse bactérienne a été réalisée avec un sonicateur (ThermoFisher) dans la glace fondante. Le mélange a ensuite été centrifugé à 5000 g pendant 5 min, pour éliminer les débris cellulaires du lysat bactérien contenant les HSP70 recombinantes.

Les solutions protéiques obtenues ont été filtrées sur un filtre de 5 µm (Pall, Inc.) pour enlever les débris cellulaires, puis purifiées par chromatographie d'affinité, à l'aide d'une *HisLink Protein Purification Resin* (Promega®). Cette résine contient des ions nickel (Ni²+), sur lesquels se fixent l'étiquette histidine des protéines recombinantes. Les colonnes ont été préparées dans des seringues de 1 mL avec 800 µL de résine, et la solution de préservation a été enlevée à l'aide d'un vacuum manifold (Promega). La colonne a ensuite été équilibrée avec 3 volumes de tampon de liaison, avant application du lysat bactérien. Après écoulement du lysat, la colonne a été lavée avec 10 volumes de tampon de liaison afin d'éliminer les protéines liées non-spécifiquement. Pour terminer, la résine a été incubée avec une *ubiquitin protease* à température ambiante pendant 16 h, dans un tampon constitué de Tris.HCl pH8.2 (50mM), de NaCl (150mM) et de DTT (Dithiothreitol, 1mM). Cette enzyme permet de cliver les étiquettes histidine-ubiquitine fixée sur la colonne et d'éluer uniquement les HSP70. Les protéines purifiées ont été additionnées de 10 µL de *Laemmli sample buffer* (2X), puis déposées sur gel d'acrylamide coloré au Coomassie et analysées par SDS-PAGE, comme décrit précédemment. Une coloration au nitrate d'argent avec le *Silver Staining Kit Protein* (PlusOne) a également été réalisée conformément au protocole du fournisseur.

#### 5.2 RESULTATS

Les constructions de pRB493 ont été réalisées avec des séquences appartenant aux groupes HSP70 A et HSP70 B. La présence et la taille des inserts dans les différents clones de BL21 (DE3) obtenus ont été vérifiées par une double digestion supplémentaire sur les vecteurs préalablement extraits (**Figure 5.3**). Les 7 clones sélectionnés pour la production de HSP70 correspondent à 4 ORF complets issus des espèces *Astacus astacus* et *Procambarus clarkii*, parmi les groupes HSP70 A2, B1 et B2 (**Tableau 5.1**).

Les productions protéiques ont été réalisées en collaboration avec le Dr Marcel Koken (LABOCEA-CNRS, Plouzané, France). Dans un preimer temps, les extraits de protéines totales issus des premières expérimentations (mise au point du protocole) ont été analysés par SDS-PAGE. La **Figure 5.4** présentent les résultats obtenus pour la condition témoin T<sub>0</sub> (pas d'induction) et pour la condition T3 (induction de 16 h), après coloration du gel d'acrylamide au Coomassie. L'ensemble des cultures induites présente une bande supplémentaire estimée à 70 kDa, par rapport à la condition témoin.

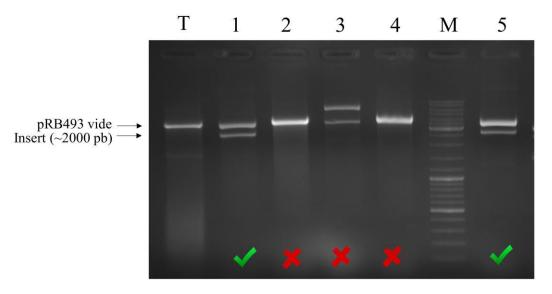


Figure 5.3 : Electrophorèse des doubles digestions de pRB493 pour la sélection des clones de E. coli BL21 (DE3). Les électrophorèses ont été réalisées sur gel d'agarose 1 %. Les longueurs des fragments ont été estimées par comparaison au marqueur de taille (M) GeneRuler<sup>TM</sup> Ladder mix (ThermoFisher®). Chaque double digestion a été réalisée sur du pRB493 vide comme témoin négatif (T). Les clones sélectionnés (marques vertes) ont présenté deux bandes distinctes d'environ 3500 pb (pRB digéré vide) et 2000 pb (insert de taille attendue). Les clones présentant des profils différents n'ont pas été sélectionnés (marques rouges).

Tableau 5.1 : Détails des séquences pour les protéines de HSP70 produites chez A. astacus et P. clarkii.

Espèce	Séquence	Classification	Noms des clones utilisés
Astacus astacus	HSP-D1920B11	HSP70 A2	Aa70 A2
	HSP-D1947B10	HSP70 B2	Aa70 B2_1 / Aa70 B2_2
Procambarus clarkii	HSP-D1917B10	HSP70 A2	Pc70 A2_1 / Pc70A2_2
	HSP-D1908B10	HSP70 B1	Pc70 B1_1 / Pc70B1_2

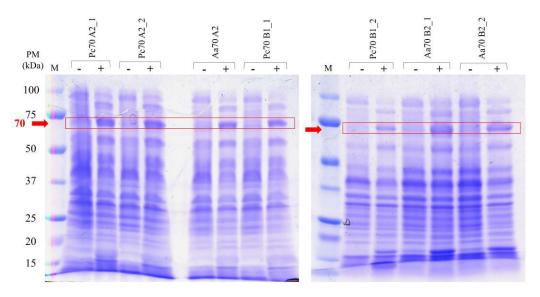


Figure 5.4: Vérification préalable des profils protéiques non purifiés pour chaque construction avant et après induction, par SDS-PAGE. Pour chaque type de clone, les profils correspondent aux cultures (5 mL) non induites (-) et après 16 h d'induction avec de l'IPTG (+). Les protéines induites sont mises en évidence par les encadrés rouges. Leurs poids moléculaires (PM) a été estimé à 70 kDa, par comparaison avec un marqueur de référence (M). Les gels ont été colorés au Coomassie brilliant blue.

#### 5 PRODUCTION PROTEIQUE DE HSP70 CYTOSOLIQUES

La production de HSP70 en plus grande quantité (500 mL) a ensuite été réalisée avec l'ensemble des 7 clones utilisés pour la mise au point du protocole, et des temps d'induction de 16 h à l'IPTG. L'échantillon témoin est issu d'un clone porteur d'une construction plasmidique équivalente avec le gène de l'agarase MK. Les extraits protéiques de chaque échantillon ont été vérifiés par SDS-PAGE et révélés par coloration au nitrate d'argent (Error! Reference source not found.). Après purification des protéines recombinantes pour chaque échantillon, la qualité des produits purifiés a été vérifiée par une dernière analyse SDS-PAGE. La production de protéines de 70 kDa a ainsi été confirmée, et permettent de supposer que la production des différentes formes de HSP70 recombinantes a été réalisée avec succès. Néanmoins, quelques bandes parasites minoritaires de 20, 30, 40 et 45 kDa sont visibles pour certains échantillons (Aa70A2, Pc70B2\_1, Pc70B2\_2, Aa70 B2\_1), ce qui nécessiterait une mise au point plus fine du protocole de purification protéique (Figure 5.6).

Ces résultats encourageants permettent globalement de valider l'utilisation de ces protocoles pour la production des HSP70, en vue de réaliser des tests d'efficacité pour les différentes formes décrites dans cette étude.

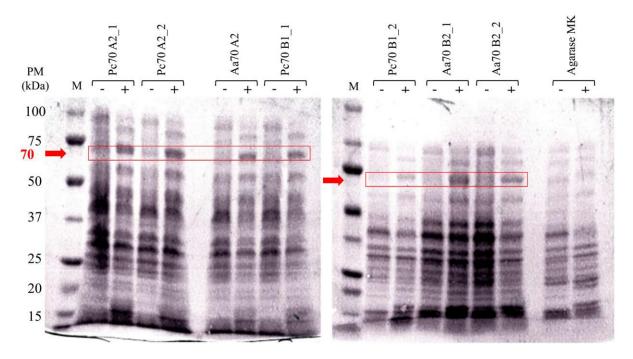


Figure 5.5: Analyse SDS-PAGE des profils protéiques non purifiés pour chaque échantillon, avant et après induction. Pour chaque type de clone, les profils correspondent aux cultures de 500 mL non induites (-) et après 16 h d'induction avec de l'IPTG (+). Les protéines induites sont mises en évidence par les encadrés rouges. Leurs poids moléculaires (PM) est estimé à 70 kDa, par comparaison avec un marqueur de référence (M). Les gels ont été colorés au nitrate d'argent.

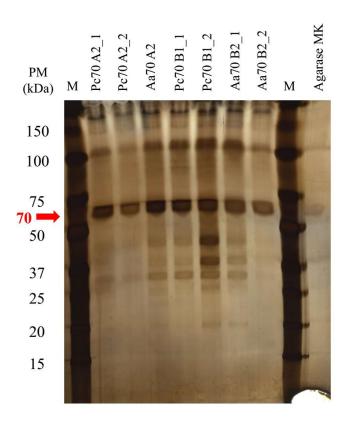
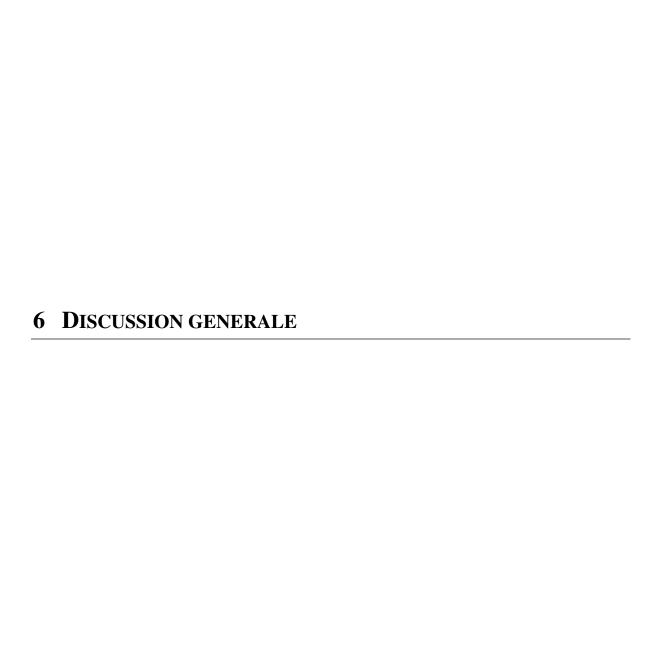


Figure 5.6: Analyse SDS-PAGE des extraits purifiés de protéines produites pour chaque type de clone. Le poids moléculaire (PM) des bandes majoritaires a été estimé à 70 kDa. Le gel a été coloré au nitrate d'argent.

#### 5.3 DISCUSSION ET CONCLUSION

Les expérimentations effectuées ont permis de produire des protéines de poids moléculaire attendu, correspondant à celui des HSP70. Un *Western Blot* pourrait néanmoins être réalisé avec des anticorps spécifiques aux HSP70, afin de vérifier la nature des protéines produites. Quelques bandes minoritaires ont été détectées dans certains échantillons purifiés, indiquant que le protocole de purification nécessiterait d'être optimisé; par exemple en modifiant le temps d'élution ou la composition des solutions tampon.

Ces travaux préliminaires pourraient être poursuivis par la production des HSP70 correspondant aux formes A1 et A3 décrites dans cette étude. Cependant, la quantité et la diversité des protéines de HSP70 obtenues sont suffisantes pour envisager des tests d'efficacité. Les expérimentations envisagées sont des mesures indirectes d'activité de la β-galactosidase dénaturée et mise en présence de HSP70 et de différents cofacteurs (Freeman et al., 1996; Takayama et al., 1997). Ces expérimentations pourraient ainsi permettre d'évaluer l'impact de la présence de différents co-chaperons sur l'efficacité des différentes formes de HSP70. En effet, ces informations seraient des arguments supplémentaires pour confirmer ou infirmer l'hypothèse que la diversité des HSP70 décrite dans cette étude pourrait être liée à l'évolution de l'affinité des HSP70 pour leurs co-chaperonnes.



Les HSP70 cytosoliques sont des protéines chaperonnes ubiquistes et particulièrement conservées dans le monde vivant, car elles sont essentielles au bon fonctionnement cellulaire et à l'adaptation des organismes à leur environnement. Elles sont donc particulièrement étudiées dans de nombreux domaines, comme l'adaptation évolutive, l'écotoxicologie ou en médecine. La diversité de la famille des HSP70 cytosoliques est bien décrite chez quelques espèces modèle, telles que *Drosophila melanogaster* (Maside et al., 2002; Rubin et al., 1993), *Homo sapiens* (Brocchieri et al., 2008; Daugaard et al., 2007; Kampinga et al., 2009) ou *Saccharomyces cerevisiae* (Boorstein and Craig, 1990a, 1990b; Verghese et al., 2012), mais reste largement sous-estimée car méconnue pour la plupart des organismes. Dans la littérature, les HSP70 d'arthropodes sont communément classées en deux catégories en fonction de leur mode d'expression constitutif (HSC70) ou inductible (HSP70). Pourtant, aucune particularité structurale n'a pu être mise en évidence jusqu'alors dans l'un ou l'autre de ces groupes. Cette étude a donc permis de donner un aperçu de la diversité et des relations de parenté des HSP70 cytosoliques au sein du phylum Arthropoda, qui est le plus vaste du règne animal (Koenemann et al., 2010).

Les HSP70 cytosoliques possèdent des domaines très conservés, notamment au sein du NBD (Nucleotide Binding Domain) où se fixent les molécules d'ATP. Des amorces universelles aux gènes de HSP70 cytosoliques d'invertébrés marins (HS0, HS2 et HS3) ont pu être définies au niveau du NBD, et ont ainsi permis l'amplification de fragments correspondants aux différentes formes de HSP70. Dans un premier temps, ces amorces ont permis l'obtention de plusieurs séquences de 800 à 1000 pb, à partir de plusieurs modèles d'étude appartenant aux infraordres Anomura, Astacidea et Brachyura. Ces fragments étant trop courts pour effectuer des comparaisons entre les différents types de séquences, ils ont été utilisés pour définir des amorces spécifiques à chaque forme de HSP70, afin de générer des séquences plus longues par 3' RACE-PCR. L'utilisation des amorces universelles pourrait avoir favorisé la formation de séquences chimériques. Ce phénomène a notamment été décrit pour différentes méthodes d'amplification de séquences d'ARN 16S (Haas et al., 2011). Ce biais d'amplification représenterait 3 à 14 % des produits de PCR, en fonction des conditions d'amplification et des réactifs utilisés (Zhang et al., 2010). Contrairement aux résultats obtenus par Zhang et al. (2010), les séquences de hsp70 chimériques ne se sont pas avérées reproductibles au cours de ces travaux. La présence de séquences chimériques a également été soupconnée pour certaines hsp70 issues des bases de données internationales, et un programme de détection de chimères a été utilisé afin d'écarter les séquences suspectes de cette étude. Cependant, ces programmes semblent mieux adaptés aux résultats de séquençage haut débit ou à un grand nombre de séquences conservées et issues d'espèces proches. La quantité de séquences de HSP70 disponibles pour chaque espèce étant trop limitée, ce programme n'a donc pas permis de différencier les faux positifs des séquences chimériques avec certitude.

Des recherches complémentaires ont été effectuées directement dans les assemblages des génomes disponibles pour compléter le jeu de données. Les informations génomiques sont abondantes chez les insectes, et en pleine expansion chez les chélicérates, cependant elles demeurent rares chez les différentes classes de crustacés. D'ailleurs, aucun assemblage de génome n'a encore été publié pour les malacostracés, et des formes supplémentaires de HSP70 pourraient être décrites à cette occasion. Dans la littérature, la caractérisation de différentes formes de HSP70 est souvent réalisée à partir de données de séquençage de transcriptomes (Cascella et al., 2015; Chen et al., 2015; Liu et al., 2014b; Rhee et al., 2009). Cependant, cette méthodologie permet uniquement la description des séquences de HSP70 exprimées pour chaque condition expérimentale étudiée, et les résultats obtenus sont alors partiels. Cette différence de méthodologie pourrait également expliquer que le nombre de groupes de HSP70 décrits dans cette étude est plus élevé que ceux retrouvés dans la littérature. En effet, 4 types de HSP70 cytosoliques ont été caractérisés chez les euphausiacés (Cascella et al., 2015), et seulement 2 types dans les taxa Brachyura, Caridea et Dendrobranchiata (Cottin et al., 2010; Luan et al., 2010; Mestre et al., 2015; Qian et al., 2012; Xiu et al., 2014). Les séquences de malacostracé issues de la littérature sont

#### 6 DISCUSSION GENERALE

principalement groupées avec les HSP70 A1, bien qu'elles puissent être décrites comme des formes distinctes au sein de la famille multigénique des HSP70 cytosoliques (Xiu et al., 2014). Néanmoins, quelques études antérieures ont permis de caractériser des séquences appartenant aux formes B1 et B2 chez les brachyoures, caridés, les dendrobranchiates et les euphausiacés (Cascella et al., 2015; Cottin et al., 2010; Luan et al., 2010; Mestre et al., 2015). L'ensemble des résultats obtenus dans ces travaux a pourtant permis de mettre en évidence une diversité des HSP70 cytosolique insoupçonnée dans la plupart de ces taxa. Ces différentes formes de HSP70 ont également été confirmées par des séquences issues d'ADNc, et sont donc transcrites chez les organismes étudiés. Au moins 4 formes de HSP70 ont été décrites dans les infraordres Brachyura (A1, A3, B1a et B1b) et Caridea (A1, A3, B1 et B2), et 5 formes pour le groupe Astacidea (A1, A2, A3, B et, B2). Plusieurs fragments obtenus chez les anomoures se sont avérés trop courts pour être utilisés dans les analyses phylogénétiques, et seulement 2 formes distinctes de HSP70 ont donc été mises en évidence par ces analyses (A3 et B2). Cependant, les résultats de classification agrégative permettent de supposer l'existence de HSP70 A1 pour cet infraordre (Annexe 5). Chez les amphipodes, aucune HSP70 B n'a été détectée. De plus, certaines analyses phylogénétiques (IB et ML) placent les séquences d'amphipodes à l'extérieur des groupes HSP70 A et HSP70 B, ce qui pourrait signifier que ces groupes sont apparus après l'émergence des eucaridés. Ainsi, les HSP70 A4, A5 et A6 pourraient être assimilées à des subdivisions du groupe AB, décrit chez les séquences de Branchiopoda, Chelicerata, Hexapoda et Maxillopoda.

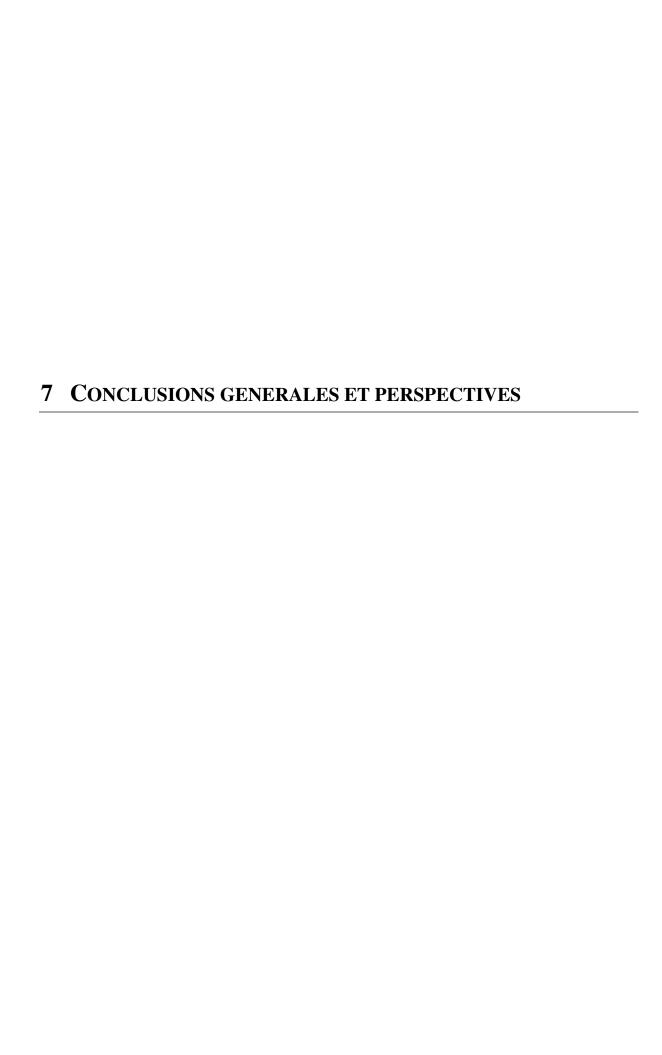
La comparaison des séquences protéiques de HSP70 a permis de mettre en évidence des motifs conservés pour les groupes A et B (Malacostraca) d'une part, et pour les groupes AB et C (Chelicerata et Hexapoda) d'autre part. Cependant, de telles distinctions n'ont pu être établies pour toutes les subdivisions au sein de chacun de ces groupes. Les différences observées sont globalement semblables à celles retrouvées dans la famille des HSP70 cytosoliques humaines (Brocchieri et al., 2008). Parmi les motifs relevés, plusieurs insertions/délétions ont été constatées dans le NBD, et pourraient impliquer différentes dynamiques de fixation ou de libération des molécules d'ADP et d'ATP sur ce domaine. La localisation de ces différents motifs ne parait cependant pas affecter les sites de fixation des cochaperons de type NEF, ni les sites de dimérisation de la HSP70 (Arakawa et al., 2010; Mayer, 2010; Sarbeng et al., 2015). Les variations constatées au niveau de l'interdomain linker pourraient également modifier la dynamique de repliement des HSP70, car cette partie de la protéine est un élément clé dans la communication allostérique entre les différents domaines NBD, SBD et CTD (Alderson et al., 2014; Aprile et al., 2013; Mayer, 2010; Mayer and Bukau, 2005; Mayer and Kityk, 2015). Le CTD reste néanmoins le domaine le plus variable entre les différentes formes de HSP70, avec la présence ou l'absence de motifs (GGXP)<sub>n</sub> répétés. Ces variations conditionnent les différences de tailles (622 à 685 acides aminés) et de poids moléculaires de 68,2 à 74,2 kDa au sein de la famille des HSP70 cytosoliques. Ces sites variables permettent la fixation de nombreux co-chaperons, dont les molécules de type Hip, Hop et CHIP qui permettent de réguler l'efficacité des HSP70 (Ballinger et al., 1999; Freeman et al., 1996; Irmer and Höhfeld, 1997; Mayer and Bukau, 2005; Nollen et al., 2001; Prapapanich et al., 1998).

Les séquences génomiques ont également été comparées, afin de déterminer si la présence et le nombre d'intron, ainsi que la structure des séquences régulatrices sont représentatives des différents groupes de HSP70. Les différentes caractéristiques introniques observées présentent une grande variabilité pour chaque taxa étudié et pour chaque forme de HSP70. Cependant, ces observations ont été effectuées à partir de séquences représentant un faible nombre d'espèces pour chaque taxa. Chez les malacostracés, et plus particulièrement les infraordres Anomura, Astacidea et Brachyura, la présence d'un unique intron à la position conservée semble spécifique aux gènes relatifs au groupe HSP70 B1. Ces analyses nécessiteraient sans doute d'être approfondies à partir d'un plus grand nombre d'espèces et à des niveaux taxonomiques inférieurs (infraordre ou superfamille).

Les séquences régulatrices (-1000 pb) se sont également avérées très variables pour les gènes correspondant à chaque groupe de HSP70. Cette étude a été effectuée sur des séquences issues des assemblages de génomes disponibles dans les bases de données internationales, et n'a donc pas pu être réalisée avec les HSP70 appartenant aux Malacostraca. Chez les chélicérates et les hexapodes, les séquences régulatrices analysées ont montré une grande variabilité structurale, et ce, pour des séquences appartenant au même groupe de HSP70 et issues d'une même espèce. De nombreux éléments, autres que les HSE, les boîtes CCAAT et les sites de fixation de NFκB, sont responsables du caractère constitutif ou inductible des HSP70, tels que l'élément GAGA (Shopland et al., 1995), les boîtes TATA et GATA (Lee et al., 2003), ou la richesse en AT des séquences séparant les HSE (Chen et al., 2011). Il est donc encore difficile, à l'heure actuelle, de présupposer de l'expression de ces gènes en fonction des particularités structurales de leurs régions régulatrices. Ces données n'ont pas pu être reliées à des études d'expression des gènes, mais permettent de supposer que les différentes modalités d'expression constatées dans la famille des HSP70 cytosoliques ne sont pas particulières aux différents groupes définis au cours de cette étude.

Les expérimentations animales de stress thermique menées au cours de cette thèse n'ont pas pu aboutir à des résultats d'expression exploitables. En effet, la qualité les échantillons obtenus n'a pas été suffisante pour la quantification des transcrits par qPCR, et nécessitent sans doute des modifications des protocoles d'extraction d'ARN et de préparation des échantillons d'ADNc, qui n'ont pas pu être effectuées au cours de cette thèse. Les données d'expression disponibles dans la littérature concernent principalement le groupe des HSP70 A1, et les résultats observés sont donc souvent partiels. Néanmoins, l'analyse de la bibliographie a mis en évidence des profils d'expression très variables pour les diverses formes de HSP70 décrites dans cette étude. Le caractère constitutif ou inductible des gènes codant les HSP70 dépend de nombreux facteurs, tels que le type de tissu étudié ou les conditions de stress thermiques (Cui et al., 2010; Fu et al., 2013; Gao et al., 2016; Xiu et al., 2014; Yang et al., 2013). De ce fait l'annotation *a priori* des séquences en tant que HSC70 ou HSP70 en fonction de leur classification n'est donc pas pertinente. De plus, l'étude d'une séquence unique de HSP70 en réponse à des stress environnementaux est devenue obsolète, au regard de la diversité existant au sein de cette famille multigénique.

Les analyses d'efficacité et de fonctionnalité des protéines de HSP70 présentées dans la littérature traitent d'une unique forme de HSP70 à la fois, et aucune comparaison de fonctionnalité entre plusieurs formes issues d'une même espèce n'a encore été effectuée, à notre connaissance. De plus, les études publiées s'intéressent essentiellement aux HSP70 humaines (Freeman et al., 1996; Takayama et al., 1997). C'est pourquoi, ces travaux de thèse se sont intéressés à la production de différentes formes de HSP70 pour plusieurs espèces d'astacidés, dont l'espèce invasive *Procambarus clarkii*. Les tests d'efficacité n'ont pu être menés au cours de cette thèse, mais la mise au point du protocole de production protéique permettra d'effectuer prochainement ces tests.



L'étude de (Leignel et al., 2007) a mis en évidence une diversité insoupçonnée des HSP70 cytosoliques chez quelques espèces appartenant aux familles Bythograeidae et Xanthidae (Brachyura). Il est donc apparu intéressant d'étudier la diversité et la fonctionnalité des HSP70 cytosoliques chez un plus large panel d'espèces, en bornant les recherches au phylum Arthropoda. Cette étude a été articulée autour de trois objectifs. 1) L'acquisition d'un large jeu de données a été entreprise par la caractérisation de nombreuses séquences de malacostracés par biologie moléculaire, et complétée par des séquences d'arthropodes issues de recherches bioinformatiques dans les bases de données internationales (génomes, transcriptomes, ADNc et gènes). Ce jeu de données a permis d'établir une classification des HSP70 cytosoliques au sein du phylum Arthropoda, et de réaliser des analyses phylogénétiques pour entrevoir leur diversité et leur évolution. 2) Des études d'expression ont ensuite été envisagées, afin de vérifier une potentielle corrélation entre les différents types de HSP70 cytosoliques et des capacités d'induction particulières en réponse aux stress. 3) Enfin, la dernière partie de cette étude s'est intéressée à la mise en place d'un protocole de production de protéines recombinantes, afin d'envisager des tests d'efficacité pour les divers types de HSP70.

La démarche d'amplification choisie pour cette étude a permis d'isoler 142 fragments de HSP70 cytosoliques issus de 37 espèces appartenant aux Malacostraca (Anomura, Astacidea et Brachyura). Différentes méthodes de recherches bioinformatiques ont permis de compléter ce jeu de données avec des séquences non annotées, présentes dans les génomes et transcriptomes disponibles pour diverses espèces d'arthropodes. Des recherches complémentaires ont également été effectuées dans les séquences de la base de données *nucleotide* de NCBI. Au total, le jeu de données élaboré a comporté 735 séquences de HSP70 cytosoliques, représentatives de 195 espèces d'arthropodes. Les données disponibles ont restreint les analyses aux sous-embranchements Chelicerata, Hexapoda et Myriapoda (8 séquences uniquement), et aux classes Branchiopoda, Malacostraca et Maxillopoda. Une première analyse de ce jeu de données a mis en évidence la formation de séquences chimériques parmi les fragments amplifiés au cours de cette étude. Ce biais d'amplification PCR est peu décrit dans la littérature, et semble directement lié à la méthode et aux réactifs employés (Haas et al., 2011; Zhang et al., 2010).

L'ensemble des séquences nucléotidiques retenu a ensuite été analysé par une méthode de classification agrégative UPGM-VM, qui autorise l'utilisation de fragments de tailles variables. Les résultats obtenus ont révélé une forte diversité des séquences de HSP70 chez les arthropodes, et l'existence de nombreux groupes distincts. La mise en évidence de ces différents groupes a servi de support pour l'élaboration de plusieurs jeux de données plus restreints, destinés aux analyses phylogénétiques des séquences traduites in silico. Les démarches de phylogénie ont été conduites avec des méthodologies distinctes, représentatives des approches cladistiques, phénétiques et probabilistes. Les relations de parenté des HSP70 cytosoliques ont tout d'abord été examinées dans le phylum Arthropoda, afin d'avoir une vue d'ensemble de l'organisation de la famille multigénique. Ces diverses approches ont abouti aux mêmes conclusions, c'est-à-dire l'existence de deux principaux groupes de HSP70 cytosoliques chez les arthropodes, nommés AB et C. Le groupe C est représenté uniquement par des séquences appartenant aux Chelicerata et Hexapoda. Les reconstitutions des liens de parenté entre ces taxa a permis de supposer que la forme HSP70 C a été perdue à plusieurs reprises au cours de l'évolution, lors de l'émergence des différentes classes de crustacés (Branchiopoda, Malacostraca et Maxillopoda) (Koenemann et al., 2010; Oakley et al., 2013; Regier et al., 2010). En contrepartie, ces classes de crustacés ont présenté plusieurs formes de HSP70 apparentées au groupe AB, dont les groupes A et B mis en évidence chez les malacostracés. Les analyses phylogénétiques ont aussi montré l'existence de plusieurs sous-groupes au sein des HSP70 A (notées A1 à A6) et des HSP70 B (B1, B1a, B1b et B2). Ces différentes subdivisions ne sont pas présentes pour les infraordres étudiés ; révélant d'une part les limites des séquences disponibles dans les bases de données internationales, et d'autre part, la possibilité de plusieurs phénomènes de duplications et de pertes de certaines formes de HSP70

au cours de l'évolution. Plusieurs subdivisions des groupes AB et C ont également été mises en évidences, et semblent spécifiques de chaque ordre, voire de certaines espèces pour les chélicérates. Ces résultats ont donc révélé une forte diversité et l'existence de nombreux groupes de HSP70 chez les arthropodes. Le nombre d'études s'intéressant à différentes formes de HSP70 est actuellement en pleine expansion (Chen et al., 2015; Lu et al., 2016; Luo et al., 2015; Metzger et al., 2016). L'acquisition continue de nouvelles données par les séquençages de nouveaux génomes et trancriptomes devrait permettre, dans un futur proche, d'affiner et compléter les connaissances sur l'organisation de la famille des HSP70 cytosoliques.

La comparaison des gènes et des protéines de HSP70 a permis de valider des caractéristiques discriminantes pour les différentes formes de cette famille multigénique.

Les séquences protéiques partagent des motifs particuliers à chaque forme impliquant des insertions/délétions ponctuelles dans le NBD, des réarrangements de l'*interdomain linker*, et surtout l'absence ou la présence de motifs GGXP répétés dans le CTD. Ces distinctions semblent impacter la communication entre les différents domaines des HSP70, ainsi que l'affinité du CTD pour ses co-chaperons (Arakawa et al., 2010; Karlin and Brocchieri, 1998; Mayer and Bukau, 2005). Elles pourraient affecter les changements de conformation liés à leur activité ATPase et leur dynamique de fixation/libération des protéines cibles (Alderson et al., 2014; Aprile et al., 2013). Cependant, les études disponibles dans la littérature sont appliquées à un seul type de HSP70 et nécessiteraient d'être complétées par une comparaison des différentes formes connues.

La majorité des espèces appartenant aux d'arthropodes présente des gènes de HSP70 avec et sans intron. Cependant, la présence de ces introns ne peut être utilisée pour distinguer l'une ou l'autre des principales formes décrites (AB et C). De la même façon, le nombre (de 0 à 8) et la position des introns observés varient d'une espèce à l'autre, suggérant des évènements évolutifs d'acquisition indépendants. Néanmoins, les anomoures, les astacidés et les brachyoures présentent un unique intron en position conservée, dans les gènes associés à la forme HSP70 B1. Aucune autre conclusion ne peut être émise pour l'ensemble des malacostracés, car il n'existe que très peu de données génomiques dans les autres taxa appartenant à cette classe. En effet, la majorité des études concernant les HSP70 porte uniquement sur des séquences d'ADNc, délaissant ainsi les caractéristiques des séquences génomiques. Cependant, si les séquences introniques semblent présenter une source d'informations limitée, l'étude des caractéristiques structurales des régions régulatrices serait pertinente en complément des analyses d'expression de ces différents types de gènes. En effet, les caractéristiques structurales des promoteurs sont parfois associées aux caractère constitutif ou inductible des HSP70 (Chen et al., 2011; Chuang et al., 2007; Lee et al., 2003), mais demeurent encore mal comprises. Les analyses des régions régulatrices effectuées lors de ces travaux de recherche ont mis en évidence une grande variabilité des structures en amont des différents types de gène de HSP70. Ces résultats suggèrent des modes d'expression variés au sein de chaque groupe de HSP70 mis en évidence. Cependant, aucun assemblage de génome de malacostracés n'est encore disponible, et ses analyses n'ont pu porter que sur les séquences de chélicérates et d'hexapodes. De plus, ces données n'étant pas associées à des analyses d'expression, aucune correspondance entre les structures régulatrices et les caractères constitutifs ou inductibles de chaque séquence n'a pu être établie avec certitude. L'expression des gènes de HSP70 en réponse à divers stress environnementaux biotiques et physico-chimiques est décrite plus précisément dans la classe Malacostraca. Il serait donc intéressant de caractériser les régions régulatrices qui y sont associées, de la même façon que chez *Litopenaeus vannamei* (Chuang et al., 2007).

Les données d'expression présentes dans la littérature ont permis de constater une absence de corrélation entre les groupes de HSP70 décrits et le mode d'expression des gènes associés. La classification proposée ici va donc au-delà de la simple distinction HSC70/HSP70 régulièrement

proposée dans la littérature (Chuang et al., 2007; Cottin et al., 2010; Luan et al., 2010; Mestre et al., 2015; Xiu et al., 2014). De plus, le caractère constitutif ou inductible des HSP70 ne semble pas uniquement inhérent au type de séquence étudiée, mais également à de nombreuses caractéristiques telles que l'espèce, la population, et à la nature du stress et du tissu étudiés (Cottin et al., 2015; Cui et al., 2010; Fu et al., 2013; Gao et al., 2016; Rungrassamee et al., 2010; Xiu et al., 2014; Yang et al., 2013). Des études récentes ont également mis en évidence que les particularités fonctionnelles des HSP70, y compris leur capacité d'induction, ont pu être acquises à plusieurs reprises au cours de l'évolution (Krenek et al., 2013; McCallister et al., 2015). Ces différentes données confirment que les analyses fonctionnelles de HSP70 nécessitent d'être réalisées sur chacune des formes décrites et sans *a priori* sur leurs liens de parenté ou leur proximité avec des séquences préalablement étudiées.

Pour terminer, les recherches effectuées au cours de cette thèse se sont intéressées à la mise au point d'un protocole pour la production de différentes formes protéiques de HSP70. Ces travaux préliminaires permettent d'envisager des études d'efficacité pour les différents groupes décrits. En effet, des analyses indirectes ont déjà été mises au point pour évaluer la capacité des HSP70 à restaurer l'activité de la  $\beta$ -galactosidase (Freeman et al., 1996; Takayama et al., 1997). En perspective de cette thèse, de telles expérimentations pourraient donc être réalisées à court terme et fournir des informations essentielles pour expliquer l'évolution des HSP70 dans le phylum Arthropoda.

A plus long terme, l'avancée des connaissances sur la diversité des HSP70 cytosoliques permettrait d'améliorer son utilisation dans plusieurs domaines de recherche. En effet, l'étude des diverses formes de HSP70 pourrait améliorer la compréhension globale des phénomènes d'adaptation des organismes à leur environnement. De plus, le ciblage de certaines formes HSP70 pourrait être envisagé comme biomarqueur plus spécifique à certains types de stress. Enfin, les études des différentes formes de HSP70 d'arthropodes pourraient aboutir à la découverte de molécules chaperonnes plus efficaces, et ainsi élargir le spectre des cibles thérapeutiques contre les maladies neurodégénératives et les cancers.

Ces travaux de doctorat ont été valorisés par des publications, présentations en congrès et évènements de diffusion scientifiques listés en Annexe 9.

Annexe 1 : Récapitulatif des amorces fonctionnelles utilisées pour les différentes amplifications par PCR. Pour chaque amorce, la température d'hybridation (Tm) a été calculée en suivant la formule :  $Tm = 0.41 \ x$  (%GC) + 69,3 - (650/longueur).

Séquences amplifiées	Nom de l'amorce	Sens	Séquence (sens 5'→ 3')	Tm (°C)
hsp70	g1F1	Forward	GCGAGWCDAARACCTTCAAYC	58,6
	g1F2		CAGCTCCAGCTATCGGCATC	61,4
	g1R1		GTACTGYTCRGCCTCRTTSAC	60,9
	g2F3		CAMGRCASSTGCAGTGGCATTG	64
	g4F1		GAAACAGTAATTGGTATTGACCTGGG	61,6
	g3R2		CCTCAAGCCTGTTCTTGACTTC	60,3
	UnivF	Forward	CTGYGAGAGVGCCAAGMGHAC	62
	UnivR		TTARTCGACYTCCTCGAYKGTG	60,3
	UnivR2		GAYTTRACRCTGAARCAGAGTGC	60,6
	HS0		GTGTTGGWGTNTCCAGCATG	58,3
	HS3		TKGGWGGBGARGAYTTYGAC	58,8
	HS2		CCCTCRAASARAGAGTCRATC	58,9
	BtF1		GATGCTACGATCCAGGCGGA	61,4
	BtR1		TGGATCGCTTCTCGTCGACG	61,4
	BtR2		TGACCATCCTTTCGATCTCC	57,3
	ATGcrabe		ATGKCHAAGGGAGCWGCWGT	58
	ATGPonta		ATGGCAGCTCCGGCTATCGGCATC	67,8
	STOPProc	Reverse	CCACAGTCGAGGAGGTCGACTAG	66
	ponATGF1	Forward	ATGCCTAAAGCTGTAGGCATCG	60,3
	ponATGF2		ATGGCAGCTCAAATAATTGGTATCG	59,7
	ponTAAR12	Reverse	TTAGTCCMCCTCTTCAATAGTWGG	60,1
	ponATGF3	Forward	ATGGCAAAGACTACTGCAGTGG	60,3
	ponTAAR3	Reverse	TTAATCTACTTCCTCAATGGTAGGTC	60
ORF hsp70	Aa70A2ExpF	Forward	tctccgcggtggaATGCCTAAAGCTGTAGGCATCG	60,3
•	Aa70A2ExpR	Reverse	attaagettteaTTAGTCCACCTCTTCAATAGTAGGT	59,7
	Aa70B2ExpF		tctccgcggtggaATGGCAGCTCAAATAATTGGTATCGA	
	Aa70B2ExpR	Reverse	attaagettteaTTAGTCCACCTCTTCAATAGTTGGT	59,7
	Pc70A2ExpF		tctccgcggtggaATGCCTAAAGCTGTAGGCATCG	60,3
	Pc70A2ExpR	Reverse	attaagctttcaTTAGTCAACTTCTTCAATGGTAGGTC	60,1
	Pc70B1ExpF		tctccgcggtggaATGGCAGCTCCGGCTATCG	61
	Pc70B1ExpR		attaagctttcaTTAGTCGACCTCCTCGATTGTG	60,3
-	RACE-P		GTCGACATCGATACGCGTGGTC	64
_	dT-RACE		GACCACGCGTATCGATGTCGAC(Tx17)	_
Ubiquitine	UBI-1		GCAGATYTTYGTCAARACCCTC	59,4
	UBI-2		CCACCTCKCAGWCKRAGGAC	62,4
Insert pGEMt	T7	Forward	TAATACGACTCACTATAGGG	53,2
	SP6		ATTTAGGTGACACTATAG	46,9
16S	Anomura16S-F		CYGTGCRAAGGTRGCATA	53,7
	Anomura16S-R		CAACATCGAGGTCRCAAAC	55,6
	Asta16S-F		GTGCDAAGGTAGCATARTC	54
	Asta16S-R		CGGTYTGAACTCAAATCATGT	55
	Bytho16S-F		GWTATAAANGGTCTRRCCTGC	57
	Bytho16S-R		GAACAGACCTTCTYWTATAACG	55,6
			GTGCDAAGGTAGCATAATM	51,8
	•		CAACATCGAGTCRCAADC	53,1
Sondes hsp70	•	-	TTCCAGCATGGCAAGGTGGAGAT	-
Somes hop to	HSmid		CAGAAACTGCTGCAGGACTTCTTCAA	_
		- or mara	CCCACCATCGAGGAGGTCGACTAA	

Annexe 2 : Listes des espèces représentées dans cette étude et classification taxonomique. Les espèces sont listées en fonction des différents sous-embranchements : Chelicerata (tableau A), Hexapoda (tableau B) et Myriapoda (tableau C). Le taxon polyphylétique des crustacés est représenté tableau D.

Tableau A : Liste des espèces de Chelicerata dont sont issues les séquences de HSP70

Classe	Ordre (Infra-ordre)	Espèce	Nombre de séquences
Arachnida	Araneae (Araneomorphae)	Diguetia canities	4
		Diguetia mojavea	9
		Diguetia signata	5
		Diguetia sp.	5
		Kibramoa guapa	5
		Parasteatoda tepidariorum	8
		Pholcus phalangioides	4
		Physocyclus sp.	2
		Plectreurys conifera	3
		Plectreurys tecate	2
		Plectreurys tristis	5
		Stegodyphus lineatus	1
		Stegodyphus mimosarum	7
		Stegodyphus tentoriicola	2
	Araneae (Mygalomorphae)	Acanthoscurria geniculata	9
	Ixodida	Amblyomma parvum	1
		Amblyomma sculptum	2
		Amblyomma triste	3
		Haemaphysalis flava	1
		Ixodes scapularis	4
		Psilochorus sp.	3
	Mesostigmata	Metaseiulus occidentalis	6
	-	Neoseiulus cucumeris	1
	(Prostigmata)	Panonychus citri	2
		Tetranychus cinnabarinus	4
		Tetranychus urticae	4
	Scorpiones	Mesobuthus martensii	4
Merostomata	Xiphosura	Limulus polyphemus	4

Tableau B : Liste des espèces d'Hexapoda dont sont issues les séquences de HSP70

Classe	Ordre (Infra-ordre)	Espèce	Nombre de séquences
Insecta	Blattodea	Blaberus atropos	3
		Blattella germanica	5
		Cryptocercus wrighti	4
	Coleoptera	Colaphellus bowringi	4
		Dendroctonus ponderosae	4
		Harmonia axyridis	2
		Tribolium castaneum	7
	Diptera	Aedes aegypti	1
		Anopheles atroparvus	1
		Anopheles gambiae	5

	Anopheles quadriannulatus	1
	Culex pipiens	1
	Culex quinquefasciatus	5
	Delia antiqua	1
	Drosophila ananassae	1
	Drosophila biarmipes	1
	Drosophila bipectinata	1
	Drosophila elegans	1
	Drosophila erecta	1
	Drosophila ficusphila	1
	Drosophila kikkawai	1
	Drosophila melanogaster	15
	Drosophila montana	1
	Drosophila rhopaloa	1
	Drosophila simulans	1
	Drosophila takahashii	1
	Drosophila virilis	15
	Liriomyza huidobrensis	1
	Liriomyza sativae	1
	Musca domestica	1
	Oxycera pardalina	1
Ephemeroptera	Ephemera danica	11
1 1	Isonychia bicolor	4
Hemiptera	Acyrthosiphon pisum	10
1	Bemisia tabaci	3
	Diuraphis noxia	9
	Ericerus pela	2
	Phenacoccus solenopsis	2
	Trialeurodes vaporariorum	1
Hymenoptera	Apis mellifera	6
	Bombus ignitus	1
	Bombus impatiens	1
	Bombus terrestris	4
	Camponotus floridanus	2
	Dinoponera quadriceps	1
	Formica exsecta	3
	Macrocentrus cingulum	1
	Microplitis demolitor	1
	Polyrhachis vicina	1
	Pteromalus puparum	1
	Vespula squamosa	1
Lepidoptera	Bombyx mori	16
	Carposina sasakii	1
	Chilo suppressalis	1
	Grapholita molesta	1
	Mamestra brassicae	1
	Melitaea cinxia	3
	Ostrinia furnacalis	2
	Ostrinia nubilalis	1
	Plutella xylostella	12
	Sesamia nonagrioides	2
	Spodoptera litura	1

	Xestia cnigrum	2
Odonata	Calopteryx splendens	1
	Cordulegaster boltonii	3
	Epiophlebia superstes	2
	Ladona fulva	2
Orthoptera	Locusta migratoria	6
	Stenobothrus lineatus	3
	Teleogryllus commodus	6
Thysanoptera	Frankliniella occidentalis	1

Tableau C : Liste des espèces de Myriapoda dont sont issues les séquences de HSP70

Classe	Ordre (Infra-ordre)	Espèce	Nombre de séquences
Chilopoda	Lithobiomorpha	Lithobius forficatus	1
	Geophilomorpha	Strigamia maritima	2
Diplopoda	Julida	Tachypodoiulus niger	2
	Symphyla	Symphylella vulgaris	3

Tableau D : Liste des espèces appartenant aux différents taxa de crustacés dont sont issues les séquences de HSP70

Classe	Ordre (Infra-ordre)	Espèce	Nombre de séquences
Branchiopoda	Anostraca	Artemia franciscana	1
		Artemia sinica	1
	Diplostraca (Anomopoda)	Daphnia magna	5
		Daphnia pulex	3
		Moina macrocopa	1
	Notostraca	Triops cancriformis	2
Malacostraca	Amphipoda (Gammarida)	Echinogammarus veneris	7
		Eulimnogammarus cyaneus	2
		Eulimnogammarus verrucosus	2
		Eulimnogammarus vittatus	1
		Gammarus lacustris	1
		Gammarus locusta	1
		Gammarus pulex	5
		Niphargus rhenorhodanensis	1
		Niphargus virei	1
	Amphipoda (Hadziida)	Melita plumulosa	2
	Amphipoda (Talitrida)	Hyalella azteca	6
		Parhyale hawaiensis	4
	Decapoda (Achelata)	Panulirus japonicus	1
	Decapoda (Anomura)	Galathea squamifera	5
		Galathea strigosa	4
		Munida rugosa	1

	Datus linds an aire ation as	2
	Petrolisthes cinctipes Pisidia longicornis	2
Decapoda (Astacidea)	Astacus astacus	15
Decapoda (Astacidea)	Cherax cainii	2
	Cherax cumu Cherax destructor	2
	Cherax quadricarinatus	3
	Enoplometopus debelius	1
	Homarus americanus	9
	Homarus gammarus	1
	Nephrops norvegicus	1
	Pacifastacus leniusculus	13
	Pontastacus leptodactylus	17
	Procambarus alleni	1
	Procambarus clarkii	16
Decapoda (Brachyura)	Allograea tomentosa	3
Decapoda (Braenyara)	Atelecyclus undecimdentatus	5
	Austinograea rodriguezensis	2
	Bythograea thermydron	13
	Calappa granulata	2
	Callinectes sapidus	5
	Cancer antennarius	6
	Cancer borealis	3
	Cancer magister	2
	Cancer pagurus	13
	Cancer productus	5
	Carcinus maenas	9
	Cardisoma armarum	7
	Chaceon affinis	3
	Charybdis japonica	1
	Cyanagraea praedator	4
	Demania scaberrima	1
	Dromia personnata	1
	Eriocheir sinensis	12
	Gandalfus puia	1
	Hemigrapsus nudus	4
	Hemigrapsus sanguineus	2
	Maia squinado	3
	Necora puber	8
	Ocypoda quadrata	3
	Pachygrapsus marmoratus	11
	Paromola bathyalis	2
	Perisesarma bidens	5
	Portunus trituberculatus	4
	Potamon potamios	2
	Scylla olivacea	9
	Scylla paramamosain	3
	Scylla serrata	1
	Segonzacia mesatlantica	7
	Uca pugilator	2
	Xantho pilipes	1
Decapoda (Caridea)	Exopalaemon carinicauda	1
	Macrobrachium amazonicum	1

		Macrobrachium nipponense	10
		Macrobrachium rosenbergii	9
		Mirocaris fortunata	1
		Palaemon argentinus	5
		Palaemonetes varians	2
		Rimicaris exoculata	3
	Decapoda (Dendrobranchiata)	Fenneropenaeus chinensis	2
		Litopenaeus vannamei	10
		Marsupenaeus japonicus	3
		Metapenaeus ensis	2
		Penaeus monodon	12
	Euphausiacea	Euphausia crystallorophias	4
		Euphausia superba	4
Maxillopoda	Calanoida	Calanus finmarchicus	6
		Eurytemora affinis	7
		Pseudodiaptomus annandalei	1
	Cyclopoida	Paracyclopina nana	2
	Harpacticoida	Tigriopus californicus	8
		Tigriopus japonicus	1
	Sessilia	Balanus amphitrite	1
	Siphonostomatoida	Lepeophtheirus salmonis	6

Annexe 3 : Composition des milieux de culture (tableau A) et des solutions tampon pour la production protéique (tableau B).

#### Milieux de culture **Concentration finale** A Composant 10 g.L<sup>-1</sup> Milieu LB agar Bactotryptone 5 g.L<sup>-1</sup> Extrait de bactérie et de levure 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl 3.10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> 15 g.L<sup>-1</sup> NaOH (10M) Agar-agar Milieu LB liquide 10 g.L<sup>-1</sup> Bactotryptone 5 g.L<sup>-1</sup> Extrait de bactérie et de levure 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl 3.10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> 12 g.L<sup>-1</sup> 24 g.L<sup>-1</sup> NaOH (10M) Milieu TB Bactotryptone Extrait de bactérie et de levure Glycérol 1 % (v/v) 0,1 mol.L<sup>-1</sup> Solution de PO<sub>4</sub>

Solutions tampon	Composant	Concentration finale
Tampon de liaison	HEPES	20.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup>
	NaCl	0,5 mol.L <sup>-1</sup>
	Imidazole	20.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup>
Solution de coomassie	Bleu de coomassie	2,5 g.L <sup>-1</sup>
	Ethanol absolu	45 %
	Acide acétique	1,61 mol.L <sup>-1</sup>
Solution de décoloration	Ethanol absolu	25 %
	Acide acétique	1,75 mol.L <sup>-1</sup>

Annexe 4: Liste des génomes et transcriptomes séquencés étudiés pour la recherche de HSP70 cytosoliques. En cas d'absence de numéro d'assemblage, l'identifiant NCBI du Bioproject (BP) est précisé. Les références sont suivies des indications G pour génome et T pour transcriptome. Les références suivies du symbol \* ont été analysés une seconde fois par la 2ème méthode de recherche décrite partie 2.2.2. Le nombre de résultats référencé correspond aux séquences identifiées commes de HSP70 cytosoliques, par un ou plusieurs motifs signatures. Les séquences de pseudogènes avec des décallages de cadre de lecture n'ont pas été repeertoriées.

Classe	Ordre (Infra-ordre)	Espèce	Référence de l'assemblage	Nombre de résultats
Arachnida	Araneomorphae	Parasteatoda tepidariorum	AOMJ01000000 (G)	5
		Stegodyphus mimosarum	AZAQ01000000 (G)	7
	Ixodida	Amblyomma parvum	GBBL01000000 (T)	1
		Amblyomma sculptum	GEEX01000000 (T)	4
		Amblyomma triste	GBBM01000000 (T)	3
		Ixodes scapularis	ABJB01000000 (G) *	4
	Mesostigmata	Metaseiulus occidentalis	AFFJ01000000 (G)	6
	Mygalomorphae	Acanthoscurria geniculata	GAZS01000000 (T)	9
	Prostigmata	Tetranychus urticae	CAEY01000000 (G) *	3
	Scorpiones	Mesobuthus martensii	AYEL01000000 (G)	4
Merostomata	Xiphosura	Limulus polyphemus	AZTN01000000 (G) *	4
Chilopoda	Geophilomorpha	Strigamia maritima	AFFK01000000 (G) *	2
		Symphillela vulgaris	GAKX01000000 (T)	3
		Lithobius forficatus	GBKE01000000 (T)	1
Insecta	Blattodea	Blaberus atropos	GAYD02000000 (T)	3
		Blattella germanica	JPZV01000000 (G) *	5
		Cryptocercus wrighti	GAZN02000000 (T)	4
	Coleoptera	Colaphellus bowringi	GBHN01000000 (T)	4
		Dendroctonus ponderosae	GAFX01000000 (T)	4
		Tribolium castaneum	AAJJ01000000 (G) *	7
	Ephemeroptera	Ephemera danica	AYNC01000000 (G) *	4
			GAUK02000000 (T)	7
		Isonychia bicolor	GAXA02000000 (T)	4
	Diptera	Anopheles gambiae	ABKP02000000 (G)	3
		Culex quinquefasciatus	AAWU01000000 (G)	6
		Drosophila melanogaster	JAQD01000000 (G) *	7
		Drosophila virilis	AAIN01000000 (G)	12
	Hemiptera	Acyrthosiphon pisum	ABLF02000000 (G) *	11
		Diuraphis noxia	LMYM01000000 (G)	9
	Hymenoptera	Apis mellifera	AADG06000000 (G) *	2
	•	Bombus terrestris	AELG01000000 (G)	3
		Camponotus floridanus	AEAB01000000 (G)	2
	Lepidoptera	Plutella xylostella	AHIO01000000 (G)	4
		Bombyx mori	BABH01000000 (G) *	6
		•	BAAB01000000 (G)	6
	Odonata	Ladona fulva	APVN01000000 (G) *	2
		Epiophlebia superstes	GAVW02000000 (T)	2
		Cordulegaster boltonii	GAYO02000000 (T)	3
	Orthoptera	Locusta migratoria	AVCP01000000 (G) *	4

		Stenobothrus lineatus	GAUZ02000000 (T)	3
		Teleogryllus commodus	GBHB01000000 (T)	6
Branchiopoda	Diplostraca	Daphnia pulex	ACJG01000000 (G) *	3
		Daphnia magna	GDIQ01000000 (T)	4
	Notostraca	Triops cancriformis	BAYF01000000 (G)	2
Malacostraca	Amphipoda	Echinogammarus veneris	GARO01000000 (T)	6
		Hyalella azteca	JQDR01000000 (T) *	6
		Melita plumulosa	GAKD01000000 (T)	4
		Parhyale hawaiensis	LQNS01000000 (T)	4
	Decapoda	Astacus astacus	GEDF01000000 (T)	7
		Cancer borealis	GEFB01000000 (T)	3
		Carcinus maenas	GBXE01000000 (T)	5
		Eriocheir sinensis	GBUF01000000 (T)	4
		Homarus americanus	GEBG01000000 (T)	3
		Litopenaeus vannamei	BP: PRJNA73443 (T)	11
		Macrobrachium nipponense	GCVG00000001 (T)	9
		Macrobrachium rosenbergii	BP: PRJNA73259 (T)	9
		Pacifastacus leniusculus	GBYW01000000 (T)	13
		Palaemon argentinus	GEFN01000000 (T)	6
		Penaeus monodon	GEEP01000000 (T)	9
		Pontastacus leptodactylus	GAFS01000000 (T) *	2
			GAFY01000000 (T) *	4
			GBEI01000000 (T)	11
		Procambarus clarkii	GARH01000000 (T)	5
			GBEV01000000 (T)	5
		Scylla olivacea	GDRN01000000 (T)	9
Maxillopoda	Calanoida	Calanus finmarchicus	GAXK01000000 (T)	5
		Eurytemora affinis	AZAI01000000 (G) *	7
	Harpacticoida	Tigriopus californicus	BP: PRJNA158547 (T)	8
	Siphonostomatoida	Lepeophtherus salmonis	ADND02000000 (G) *	5

Annexe 5 : Liste de l'ensemble des séquences du jeu de données dans l'ordre de la classification automatique. Chaque séquence est associée à ses caractéristiques : code, numéro d'accession, auteurs, espèce, état (complète ou partielle), type de molécule (C : ADNc et/ou G : ADNg) et nombre d'intron. Le type d'analyse effectué (Agr. : agrégative, PhyA : phylogénie Arthropoda, PhyC : phylogénie Chelicerata, PhyH : phylogénie Hexapoda, PhyM : phylogénie Malacostraca) et la classification déduite des analyses phylogénétiques sont spécfiées à droite du tableau. Les séquences personnelles obtenues pour cette étude apparaissent en rouge.

Ordre rosace	Codes séquence	Numéros d'accession	Auteurs	Espèces	Etats	Mol.	Nombre d'introns	Analyses réalisées	Classification
	HSP-B75A1	GBEI01046914	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
2	HSP-D1881A4	GBEV01047272	Tom et al. (2014)	Procambarus clarkii	Partielle	C		Agr.	MalaB2
3	HSP-D1932B15	KR058822	Ali et al. (2015)	Cherax destructor	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaB2
4	HSP-C568A1	CN853515	Towle et Smith (2006)	Homarus americanus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
5	HSP-D1917A1	KU613148	Baringou et al. (2016)	Homarus americanus	Partielle	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyM	MalaB2
6	HSP-D1917A8	KU613149	Baringou et al. (2016)	Homarus gammarus	Partielle	G	INTRON=Free	Agr.	MalaB2
7	HSP-D1917A9	KU613150	Baringou et al. (2016)	Nephrops norvegicus	Partielle	G	INTRON=Free	Agr.	MalaB2
8	HSP-D1902A2	KU613151	Baringou et al. (2016)	Enoplometopus debelius	Partielle	G	INTRON=Free	Agr.	MalaB2
9	HSP-C289A1	GBYW01046304	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
10	HSP-D1231A1	GAFS01010061	Tom et al. (2013)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
11	HSP-D1737A1	GBEI01023770	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
12	HSP-D1000A1	GEDF01031915	Theissinger (2016)	Astacus astacus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
	HSP-D1947A4	GAFY01019070	Manfrin et al. (2013)	Pontastacus leptodactylus	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaB2
	HSP-D1947B14	GBEI01023769	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus	Complète	C		Agr.	MalaB2
15	HSP-D1947B10		Baringou (non publiée)	Astacus astacus	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaB2
	HSP-D1947B15	GEDF01031913	Theissinger (2016)	Astacus astacus	Complète	C		Agr.	MalaB2
	HSP-C361A1	GBYW01056816	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
	HSP-C146A1	GEDF01002132	Theissinger (2016)	Astacus astacus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
	HSP-C666A1	GEDF01018562	Theissinger (2016)	Astacus astacus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
	HSP-C868A1	KU613152	Baringou et al. (2016)	Munida rugosa	Partielle	G	INTRON=Free	Agr.	MalaB2
	HSP-D1904A2	KU613153	Baringou et al. (2016)	Galathea strigosa	Partielle	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaB2
	HSP-D1905A5	KU613154	Baringou et al. (2016)	Galathea squamifera	Partielle	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyM	MalaB2
	HSP-D1905A6	KU613187	Baringou et al. (2016)	Galathea squamifera	Partielle	C		Agr.	MalaB2
	HSP-C211A1	JP351710	Mohd-Shamsudin et al. (2013)	Macrobrachium rosenbergii	Partielle	C		Agr.	MalaA3
	HSP-D1488A1	AY466445	Liu et al. (2004)	Macrobrachium rosenbergii	Partielle	C		Agr.	MalaA3
	HSP-D1950B17	DQ660140	Xie et al. (2011)	Macrobrachium nipponense	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA3
	HSP-D1222A1	JP353900	Mohd-Shamsudin et al. (2013)	Macrobrachium rosenbergii	Partielle	C		Agr.	MalaA3
	HSP-D1956B34	GCVG01027753	Sun et al. (2016)	Macrobrachium nipponense	Complète	C		Agr.	MalaA3
	HSP-C266A1	JP358760	Li et al. (2012)	Litopenaeus vannamei	Partielle	C		Agr.	MalaA3
	HSP-D1889A1	KU613183	Baringou et al. (2016)	Galathea squamifera	Partielle	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA3
	HSP-C406A3	JP420630	Li et al. (2012)	Litopenaeus vannamei	Partielle	C	numb out o	Agr.	MalaA3
	HSP-C813A1	KU613118	Baringou et al. (2016)	Paromola bathyalis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
	HSP-C795A1	KU613112	Baringou et al. (2016)	Atelecyclus undecimdentatus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
	HSP-C795A2	KU613113	Baringou et al. (2016)	Atelecyclus undecimdentatus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
	HSP-C821A2	KU613114	Baringou et al. (2016)	Necora puber	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
	HSP-C821A3	KU613115	Baringou et al. (2016)	Necora puber	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
	HSP-D1879A1	GBXE01067583	Verbruggen et al. (2015)	Christian Christian	Partielle	C		Agr. / PhyM	MalaA3
	HSP-D1827A1 HSP-C943A1	KC907347 GDRN01076174	Mestre et al. (2015)	Chaceon affinis	Partielle Partielle	C C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA3 MalaA3
			Ikhwanuddin et al. (2015)	Scylla olivacea				Agr.	
40	HSP-C943A2	GDRN01076178	Ikhwanuddin et al. (2015)	Scylla olivacea	Partielle	C		Agr.	MalaA3

	HSP-C870A1	KU613116	Baringou et al. (2016)	Calappa granulata	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
	HSP-C818A1	KU613117	Baringou et al. (2016)	Maia squinado	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
43		KU613119	Baringou et al. (2016)	Galathea squamifera	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
	HSP-C820A1	KU613182	Baringou et al. (2016)	Galathea squamifera	Partielle	C	nymp ovy o	Agr.	MalaA3
	HSP-C813A2	KU613120	Baringou et al. (2016)	Galathea strigosa	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
	HSP-C243A2	GBEI01065610	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaB1
47		KU613128	Baringou et al. (2016)	Astacus astacus	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalaB1
	HSP-D1799A1	GAFS01001189	Tom et al. (2013)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaB1
49	HSP-D1908A9	KU613129	Baringou et al. (2016)	Astacus astacus	Complète	G	INTRON=1	Agr. / PhyM	MalaB1
	HSP-D1908B15	GBEI01044567	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr. / PhyM	MalaB1
51		KU613123	Baringou et al. (2016)	Procambarus alleni	Partielle	G	INTRON=Free	Agr.	MalaB1
	HSP-C826A1	KU613125	Baringou et al. (2016)	Procambarus clarkii	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalaB1
53		KU613124	Baringou et al. (2016)	Procambarus clarkii	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalaB1
	HSP-D1523A1	KU613126	Baringou et al. (2016)	Procambarus clarkii	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalaB1
55		KU613127	Baringou et al. (2016)	Procambarus clarkii	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalaB1
	HSP-D1779A1	GBEV01008565	Tom et al. (2014)	Procambarus clarkii	Partielle	C		Agr.	MalaB1
	HSP-D1908A5	GARH01039178	Manfrin et al. (2015)	Procambarus clarkii	Complète	C		Agr. / PhyA	MalaB1
58			Baringou (non publiée)	Procambarus clarkii	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaB1
59			Baringou (non publiée)	Homarus americanus	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalaB1
60		KU613121	Baringou et al. (2016)	Homarus americanus	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalaB1
61	HSP-D1901A1	KU613122	Baringou et al. (2016)	Homarus americanus	Partielle	G	INTRON=1	Agr. / PhyA / PhyM	MalaB1
	HSP-D1905B12	GEBG01037473	Christie et al. (2016)	Homarus americanus	Complète	C		Agr.	MalaB1
63	HSP-C381A1	GBUF01005150	Li et al. (2015)	Eriocheir sinensis	Partielle	C	nump on total	Agr.	MalB1b
64		KU613138	Baringou et al. (2016)	Perisesarma bidens	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalB1b
65		KU613139	Baringou et al. (2016)	Perisesarma bidens	Partielle	G	INTRON=1	Agr. / PhyA / PhyM	MalB1b
	HSP-C456A1	GBUF01005149	Li et al. (2015)	Eriocheir sinensis	Partielle	C		Agr.	MalB1b
67	HSP-D1082A1	JR728443	He et al. (2013)	Eriocheir sinensis	Partielle	C		Agr.	MalB1b
68		KA666267	He et al. (2013)	Eriocheir sinensis	Complète	C	DIED ON 1	Agr. / PhyM	MalB1b
69	HSP-C803A2	KU613137	Baringou et al. (2016)	Cardisoma armarum	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalB1b
70		KU613135	Baringou et al. (2016)	Carcinus maenas	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalB1b
71		KU613136	Baringou et al. (2016)	Pachygrapsus marmoratus	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalB1b
	HSP-C815A1	KU613141	Baringou et al. (2016)	Potamon potamios	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalB1b
73			Leignel (non publiée)	Potamon potamios	Partielle	G G	INTRON=1	Agr.	MalB1b
	HSP-C816A1		Leignel (non publiée)	Allograea tomentosa	Partielle		INTRON=1	Agr.	MalB1b
75		VIIC12146	Leignel (non publiée)	Allograea tomentosa	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalB1b
76		KU613146	Baringou et al. (2016)	Segonzacia mesatlantica	Partielle	G G	INTRON=1	Agr.	MalB1b
77		KU613144	Baringou et al. (2016)	Segonzacia mesatlantica	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalB1b
	HSP-D1841A3 HSP-D1880A1	AM410074 KU613145	Leignel et al. (2006)	Segonzacia mesatlantica	Partielle Partielle	G	INTRON=1 INTRON=1	Agr.	MalB1b MalB1b
79		AM410073	Baringou et al. (2016)	Segonzacia mesatlantica		G	INTRON=1 INTRON=1	Agr. / PhyM	MalB1b MalB1b
	HSP-D1908A1		Leignel et al. (2006)	Cyanagraea praedator	Complète	G		Agr. / PhyM	
	HSP-D1859A2	AM410075	Leignel et al. (2006)	Demania scaberrima	Partielle	G	INTRON=1	Agr. / PhyM	MalB1b
	HSP-D1477A1	KU613142	Baringou et al. (2016)	Bythograea thermydron	Partielle	C	INTRON=0	Agr.	MalB1b
	HSP-D1477A2	KU613186	Baringou et al. (2016)	Bythograea thermydron	Partielle	C		Agr.	MalB1b
	HSP-C705A2 HSP-C705A3	GDRN01076177 GDRN01076176	Ikhwanuddin et al. (2015)	Scylla olivacea Scylla olivacea	Partielle	C		Agr.	MalB1a MalB1a
			Ikhwanuddin et al. (2015)	3	Partielle	C		Agr. / Dhy A / Dhy M	
	HSP-D1788A1 HSP-C807A1	KC907348 KU613133	Mestre et al. (2014)	Chaceon affinis <mark>Necora pube</mark> r	Partielle Partielle	G	INTRON=1	Agr. / PhyA / PhyM	MalB1a MalB1a
88	HSP-C827A3	KU613185	Baringou et al. (2016)	Necora puber Carcinus maenas	Partielle Partielle	C	INTRON=I	Agr.	MalB1a
	HSP-C827A3 HSP-C827A4	KU613134	Baringou et al. (2016)	Carcinus maenas Carcinus maenas	Partielle Partielle	G	INTRON=1		MalB1a
09	1151°-C02/A4	KU013134	Baringou et al. (2016)	Careinus maenas	raitiene	U	INTRON-I	Agr.	Maibia

00	HCD D124241	CDVE01007120	V	Carrierra	D4:-11-	C		A	M-ID1-
	HSP-D1242A1	GBXE01097139	Verbruggen et al. (2015)	Carcinus maenas	Partielle	C	DUTTO ONL 1	Agr.	MalB1a
91	HSP-C826A3	KU613130	Baringou et al. (2016)	Paromola bathyalis	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalB1a
	HSP-C821A1	KU613132	Baringou et al. (2016)	Maia squinado	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalB1a
	HSP-C349A1	GEEP01044581	Ms et al. (2016)	Penaeus monodon	Partielle	C		Agr.	MalaB1
	HSP-C665A1	JP360226	Li et al. (2012)	Litopenaeus vannamei	Partielle	C	THE CALL O	Agr.	MalaB1
	HSP-C689A2	KU613147	Baringou et al. (2016)	Pisidia longicornis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
	HSP-C422A1	GEEP01044870	Ms et al. (2016)	Penaeus monodon	Partielle	C		Agr.	MalaA3
	HSP-C819A1	KU613131	Baringou et al. (2016)	Galathea strigosa	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalaA3
	HSP-C456A2	GCVG01048961	Sun et al. (2016)	Macrobrachium nipponense	Partielle	C		Agr.	MalaA3
99	HSP-D1861A1	AY466497	Liu et al. (2004)	Macrobrachium rosenbergii	Partielle	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaB1
	HSP-D1608A1		Stillman (non publiée)	Petrolisthes cinctipes	Partielle	C		Agr.	MalaA3
101	HSP-C841A1	GCVG01004458	Sun et al. (2016)	Macrobrachium nipponense	Partielle	C		Agr.	MalaB1
	HSP-C223A1	GBEI01013780	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
103	HSP-C950A1	GBYW01036886	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
	HSP-D1129A1	GBYW01036889	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
105	HSP-D1252A1	GBYW01036887	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
106	HSP-D1326A1	GBYW01036888	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
107	HSP-D1343A1	GBYW01036891	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
108	HSP-D1977A1	GAFY01000931	Tom et al. (2013)	Pontastacus leptodactylus	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA1
109	HSP-D1977A6	KU613104	Baringou et al. (2016)	Astacus astacus	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA1
110	HSP-D1977A8	GEDF01002984	Theissinger (2016)	Astacus astacus	Complète	C		Agr.	MalaA1
111	HSP-D1980A3	GBYW01036890	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Complète	С		Agr.	MalaA1
111	1131-D1900A3	GBYW01036892	Bullikis et Soueman (2013)	1 acijasiacus tentuscutus	Complete	C		Agi.	MaiaAi
112	HSP-C423A1	GEDF01041356	Theissinger (2016)	Astacus astacus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
113	HSP-D1956B29	KR058813	Ali et al. (2015)	Cherax cainii	Complète	C		Agr. / PhyA	MalaA1
114	HSP-D1968B10	KR058812	Ali et al. (2015)	Cherax destructor	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA1
115	HSP-D1968B11	KR058811	Ali et al. (2015)	Cherax quadricarinatus	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA1
116	HSP-C346A1	GBEI01070119	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
117	HSP-D1634A1	GBEV01001009	Tom et al. (2014)	Procambarus clarkii	Partielle	C		Agr.	MalaA1
118	HSP-D1898A2	GARH01001138	Manfrin et al. (2015)	Procambarus clarkii	Partielle	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
119	HSP-D1971A1	DQ173923	Jayasundara et al. (2005)	Homarus americanus	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
120	HSP-D1971B12	GEBG01000304	Christie et al. (2016)	Homarus americanus	Complète	C		Agr.	MalaA1
121	HSP-C257A1	GEDF01004585	Theissinger (2016)	Astacus astacus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
122	HSP-C340A1	EV248505	Lin et al. (2007)	Uca pugilator	Partielle	C		Agr.	MalaA1
123	HSP-C564A1	EV249571	Lin et al. (2007)	Uca pugilator	Partielle	C		Agr.	MalaA1
124	HSP-C497A1	FL574449	Gay et al. (2009)	Eriocheir sinensis	Partielle	C		Agr.	MalaA1
125	HSP-C553A1	FG359503	Jiang et al. (2009)	Eriocheir sinensis	Partielle	C		Agr.	MalaA1
	HSP-D1907A1	KU613073	Baringou et al. (2016)	Hemigrapsus sanguineus	Partielle	G	INTRON=0	Agr. / PhyM	MalaA1
127	HSP-D1956B33	GBUF01005474	Li et al. (2015)	Eriocheir sinensis	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA1
128	HSP-D1905A4	KU613074	Baringou et al. (2016)	Perisesarma bidens	Partielle	G	INTRON=0	Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
129	HSP-D1950A1	KU613075	Baringou et al. (2016)	Cardisoma armatum		G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
	HSP-D1950B18	KU613076	Baringou et al. (2016)	Cardisoma armatum	1	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
	HSP-D1953B27		Baringou (non publiée)	Cardisoma armatum	- I	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA	MalaA1
	HSP-D1953B10	KU613077	Baringou et al. (2016)	Cardisoma armatum	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA1
	HSP-C869A1	KU613079	Baringou et al. (2016)	Pachygrapsus marmoratus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
	HSP-C869A2	KU613080	Baringou et al. (2016)	Pachygrapsus marmoratus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
	HSP-D1943A3	KU613081	Baringou et al. (2016)	Pachygrapsus marmoratus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
	HSP-D1953A3	KU613082	Baringou et al. (2016)	Pachygrapsus marmoratus	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA1
	HSP-D1953A4	KU613083	Baringou et al. (2016)	Pachygrapsus marmoratus		G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
	222 21,0011.		= <i>530                                    </i>		zompiete	Ŭ		0	

138	HSP-D1953A5	KU613084	Baringou et al. (2016)	Pachygrapsus marmoratus	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
139	HSP-D1953B11	DQ173922	Jayasundara et al. (2005)	Pachygrapsus marmoratus	Complète	C	INTROPERIE	Agr.	MalaA1
140		AM410078	Leignel et al. (2006)	Pachygrapsus marmoratus	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
141	HSP-D1944A1	KU613085	Baringou et al. (2016)	Hemigrapsus nudus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
142		KU613086	Baringou et al. (2016)	Hemigrapsus nudus	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA1
143	HSP-D1946A1	KU613078	Baringou et al. (2016)	Ocypoda quadrata	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
	HSP-C713A1	GEEP01003323	Ms et al. (2016)	Penaeus monodon	Partielle	C	IVIKOIV=0	Agr.	MalaA1
145	HSP-C916A1	GEEP01079387	Ms et al. (2016)	Penaeus monodon	Partielle	C		Agr.	MalaA1
146		GEEP01014002	Ms et al. (2016)	Penaeus monodon	Partielle	C		Agr.	MalaA1
147	HSP-D1959A3	AY645906	Wu et al. (2011)	Litopenaeus vannamei	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
148	HSP-D1959B12	EF495128	Wu et al. (2008)	Litopenaeus vannamei	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
149	HSP-D1959B13	JO736788	Zhao et al. (2012)	Litopenaeus vannamei	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
	HSP-D1959A4	AY748350	Jiao et al. (2005)	Fenneropenaeus chinensis	Complète	C	I VIIIOI VIII CC	Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
151		KJ746596	Nayak et al. (2014)	Penaeus monodon	Complète	C		Agr.	MalaA1
	HSP-D1959B18	EF472918	Chuang et al. (2007)	Penaeus monodon	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
153	HSP-D1959B17	AF474375	Lo et Song (2003)	Penaeus monodon	Complète	C	IVIROIV-FICE	Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
	HSP-D1550A1	DQ663761	Xie et Yong (2006)	Marsupenaeus japonicus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
155	HSP-D1959A2	AB520826	Danwattananusorm et al. (2011)	Marsupenaeus japonicus	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA1
	HSP-D1959A6	EF091692	Zhang et Zhang (2008)	Marsupenaeus japonicus	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA1
157	HSP-D1947A8	DQ486134	Xie et al. (2008)	Metapenaeus ensis	Complète	C		Agr.	MalaA1
	HSP-D1947A9	KJ511266	Chan et al. (2014)	Metapenaeus ensis	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA1
159	HSP-C547A1	CV086394	Shafer et al. (2004)	Callinectes sapidus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
160		GQ385972	Cui et al. (2010)	Portunus trituberculatus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
161	HSP-D1953B20	FJ527835	Cui et al. (2010)	Portunus trituberculatus	Complète	C	ITTROIT=0	Agr. / PhyM	MalaA1
	HSP-D1953B18	DQ663760	Xie (2006)	Callinectes sapidus	Complète	C		Agr.	MalaA1
163	HSP-C560A1	FG310435	Phillips et al. (2008)	Cancer magister	Partielle	C		Agr.	MalaA1
	HSP-D1015A1	KU613092	Baringou et al. (2016)	Atelecyclus undecimdentatus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
165	HSP-D1094A1	KU613093	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
	HSP-D1913A1	KU613094	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
167	HSP-D1913A2	KU613095	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
168	HSP-D1950A2	KU613096	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
169	HSP-D1962A1	110013090	Baringou (non publiée)	Cancer pagurus	Complète	C	II VIII OI VIII C	Agr. / PhyM	MalaA1
	HSP-D1962B24	GEFB01000479	Schulz et al. (2016)	Cancer pagaras Cancer borealis	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA1
171	HSP-D1943A1	KU613097	Baringou et al. (2016)	Bythograea thermydron	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
	HSP-D1943A2	KU613181	Baringou et al. (2016)	Bythograea thermydron	Partielle	C	I (IIIOI)	Agr.	MalaA1
173	HSP-D1953A1	110013101	Baringou (non publiée)	Bythograea thermydron	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA1
	HSP-D1953A2		Baringou (non publiée)	Bythograea thermydron		G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
175	HSP-D1952A1	KU613098	Baringou et al. (2016)	Cyanagraea praedator	Partielle	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA1
	HSP-D1962B17	KU613099	Baringou et al. (2016)	Xantho pilipes		G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
177	HSP-D1962B18	KU613100	Baringou et al. (2016)	Cyanagraea praedator		G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA1
178		KU613101	Baringou et al. (2016)	Segonzacia mesatlantica		G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA1
179	HSP-D1962B16	110015101	Baringou (non publiée)	Segonzacia mesatlantica	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
	HSP-C618A1	CV526939	Shafer et al. (2004)	Litopenaeus vannamei	Partielle	C		Agr.	MalaA1
181	HSP-C787A2	JO864185	Zhang et al. (2013)	Scylla paramamosain	Partielle	C		Agr.	MalaA1
	HSP-D1953B12	EU754021	Liu et al. (2008)	Scylla paramamosain	Complète	Č		Agr.	MalaA1
183	HSP-D1953B17	JX913782	Yang (2012)	Scylla paramamosain	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
	HSP-D1953B29	GDRN01007620	Ikhwanuddin et al. (2015)	Scylla olivacea	Complète	C		Agr.	MalaA1
185	HSP-D1956B19	JQ780845	Fu et al. (2013)	Scylla serrata	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
	HSP-D1953B19	KM277361	Xu (2014)	Charybdis japonica		Č		Agr.	MalaA1
			<b>( - )</b>	. J J . g		-		3	

						_			
	HSP-C740A2	KU613087	Baringou et al. (2016)	Necora puber	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
	HSP-D1250A2	KU613088	Baringou et al. (2016)	Necora puber	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
189	HSP-D1250A3	KU613089	Baringou et al. (2016)	Necora puber	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
	HSP-D1959B15		Baringou (non publiée)	Necora puber	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA1
191	HSP-D1917A4	KU613179	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	C		Agr. / PhyA	MalaA1
	HSP-D1917A6	KU613180	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
193	HSP-D1968A1	KU613090	Baringou et al. (2016)	Carcinus maenas	Partielle	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA1
194	HSP-D1965A1		Baringou (non publiée)	Carcinus maenas		C		Agr.	MalaA1
195	HSP-D1965B24	GBXE01023497	Verbruggen et al. (2015)	Carcinus maenas	Complète	C		Agr.	MalaA1
196	HSP-D1965B14	KU613091	Baringou et al. (2016)	Chaceon affinis	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA1
197	HSP-D1908A4	KU613102	Baringou et al. (2016)	Maia squinado	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
198	HSP-C705A4	LQNS01959670	Kao et al. (2016)	Parhyale hawaiensis	Partielle	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA4
199	HSP-D1938B11	LQNS01003653	Kao et al. (2016)	Parhyale hawaiensis	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA4
200	HSP-D1932A9	JQDR01082346	Murali et al. (2014)	Hyalella azteca	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyM	MalaA4
201	HSP-D1084A1	GAKD01017952	Hook et al. (2013)	Melita plumulosa	Partielle	C		Agr.	MalaA4
202	HSP-D1941B18	GAKD01007005	Hook et al. (2013)	Melita plumulosa	Complète	C		Agr.	MalaA4
203	HSP-D1749A1	JO003918	Bedulina et al. (2013)	Eulimnogammarus cyaneus	Partielle	C		Agr.	MalaA4
204	HSP-D1930A1	JN704342	Pavlichenko et al. (2014)	Eulimnogammarus vittatus	Partielle	C		Agr. / PhyM	MalaA4
205	HSP-D1935A8	JO003919	Bedulina et al. (2013)	Eulimnogammarus verrucosus	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyM	MalaA4
	HSP-D1935A1	JN704341	Pavlichenko et al. (2014)	Eulimnogammarus verrucosus	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA4
207	HSP-D1935A7	JN704343	Pavlichenko et al. (2014)	Eulimnogammarus cyaneus	Complète	Č		Agr. / PhyA	MalaA4
208	HSP-D1935A6	JN704340	Pavlichenko et al. (2014)	Gammarus lacustris	Complète	Č		Agr. / PhyM	MalaA4
209	HSP-D1935B14	FJVI01000555	Gismondi (2016)	Gammarus pulex	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA4
	HSP-D1938A5	GARO01000333	Cattonaro (2014)	Echinogammarus veneris	Complète	C	II VIII OI VIII C	Agr. / PhyM	MalaA4
211	HSP-D1329A1	GARO01000312	Cattonaro (2014)	Echinogammarus veneris	Partielle	C		Agr.	MalaA5
	HSP-D1800A1	HG809965	Cottin et al. (2015)	Gammarus pulex	Partielle	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA5
213	HSP-D1941B17	FJVI01008823	Gismondi (2016)	Gammarus putex Gammarus putex	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA5
	HSP-C735A2	ABKP02023319	Lawniczak et al. (2008)	Anopheles gambiae	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexaAB
	HSP-D1971A4	APCH01008644	Neafsey et al. (2013)	Anopheles quadriannulatus	Complète	G	INTRON=6	Agr.	HexaAB
	HSP-D1971B10	XM 001689256	Mongin et al. (2011)	Anopheles gambiae	Complète	C/G	INTRON=Free	Agr. / PhyH	HexaAB
217	HSP-D1971B10	AXCP01001880	Neafsey et al. (2011)	Anopheles atroparvus	Complète	G	INTRON=Free	0	HexaAB
	HSP-D1956B20	DO440299	Ribeiro et al. (2008)	Anopheies arroparvus Aedes aegypti	Complète	C	INTRON-Pice	Agr. Agr. / PhyA	HexaAB
			` ,	0.11			INTRON E		
219	HSP-D1968A3	AAWU01014529	Atkinson et al. (2008)	Culex quinquefasciatus	Complète	C/G	INTRON=Free	Agr. / PhyH	HexaAB
220	HSP-D1953B14	AFFE02007267	Richards et al. (2011)	Drosophila bipectinata	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexaAB
221	HSP-D1953B23	XM_001965914	Clark et al. (2008)	Drosophila ananassae	Complète	C	DIED ON E	Agr.	HexaAB
	HSP-D1956B11	AFFH02007913	Richards et al. (2013)	Drosophila kikkawai	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexaAB
223	HSP-D1956B12	AFFI02007228	Richards et al. (2013)	Drosophila takahashii	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexaAB
	HSP-D1956B14	AC020041	Richards et al. (2013)	Drosophila biarmipes	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexaAB
225	HSP-D1959B10	AFFF02000718	Richards et al. (2013)	Drosophila elegans	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexaAB
	HSP-D1965A8	AFPP02033013	Richards et al. (2013)	Drosophila rhopaloa	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexaAB
227	HSP-D1959B11	AFFG02008670	Richards et al. (2013)	Drosophila ficusphila	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexaAB
228	HSP-D1956B16	JSAE01000284	McCoy (2014)	Drosophila melanogaster	Complète	C/G	INTRON=Free	Agr.	HexaAB
229	HSP-D1956B28	L01500	Perkins et al. (2002)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
230	HSP-D1956B21	XM_001979980	Clark et al. (2008)	Drosophila erecta	Complète	C		Agr.	HexaAB
231	HSP-D1959B24	AANI01017153	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexaAB
232	HSP-D1956A1	GU289399	Tang et al. (2012)	Musca domestica	Complète	C		Agr.	HexaAB
233	HSP-D1956B37	GAUK02026118	Misof et al. (2016)	Ephemera danica	Complète	C		Agr.	HexaAB
234	HSP-C797A1	BAAB01139692	Mita et al. (2015)	Bombyx mori	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexaAB

		BABH01011152							
235	HSP-D1950B11	GBJR01002652	Lee et al. (2002)	Bombyx mori	Complète	C/G	INTRON=1	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
236	HSP-D1881A1	AB214973	Sonoda et al. (2006)	Plutella xylostella	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
237	HSP-D1953B22	JN676213	Zhang et al. (2012)	Plutella xylostella	Complète	C/G	INTRON=1	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
238	HSP-D1953B31	AHIO01023104	You et al. (2013)	Plutella xylostella	Complète	G	INTRON=1	Agr.	HexaAB
239	HSP-D1962A7	GAVD01003314	Al-Wathiqui et al. (2014)	Ostrinia nubilalis	Complète	C		Agr.	HexaAB
240	HSP-D1962A8	GAQJ01032238	Liu et An (2014)	Ostrinia furnacalis	Complète	C		Agr.	HexaAB
241	HSP-D1962B14	HQ434763	Yang et al. (2011)	Ostrinia furnacalis	Complète	C		Agr.	HexaAB
242	HSP-D1962A9	GADL01000109	Park et Oh (2012)	Carposina sasakii	Complète	C		Agr.	HexaAB
243	HSP-D1956B15	GADK01000099	Park et Oh (2014)	Grapholita molesta	Complète	C		Agr.	HexaAB
244	HSP-D1959A1	AB206478	Sonoda et al. (2006)	Chilo suppressalis	Complète	C		Agr.	HexaAB
245	HSP-D1962A2	DQ004584	Gkouvitsas et al. (2009)	Sesamia nonagrioides	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
246	HSP-D1965B13	AB251896	Liu et al. (2013)	Mamestra brassicae	Complète	C		Agr.	HexaAB
247	HSP-D1965B16	HQ698836	Wang et al. (2015)	Xestia cnigrum	Complète	C/G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
248	HSP-D1965B17	KC844151 KF731994	Wang et al. (2015)	Xestia cnigrum	Complète	C/G	INTRON=7	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
249	HSP-D1971A9	JX680673	Luo et al. (2015)	Melitaea cinxia	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
250		KM221883	Fang (2014)	Phenacoccus solenopsis	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
251	HSP-D1968A6	EU340838	Wang et al. (2008)	Pteromalus puparum	Complète	G	INTRON=2	Agr.	HexaAB
252	HSP-D1956B13	GANS01000412	Torres et al. (2014)	Dinoponera quadriceps	Complète	Č	11,111,011, 2	Agr.	HexaAB
253	HSP-D1959B21	LH869161	Morandin et al. (2016)	Formica exsecta	Complète	Č		Agr. / PhyH	HexaAB
	HSP-D1968A4	AEAB01018549	Bonasio et al. (2010)	Camponotus floridanus	Complète	Ğ	INTRON=1	Agr.	HexaAB
255	HSP-D1968A7	KC184398	Liu et al. (2013)	Polyrhachis vicina	Complète	Č	1111011	Agr.	HexaAB
256	HSP-D1962B10	EU585780	Xu et al. (2010)	Macrocentrus cingulum	Complète	Č		Agr.	HexaAB
257	HSP-D1950A3	AY150182	Cheng et al. (2008)	Balanus amphitrite	Complète	Č		Agr. / PhyA	MaxiAB
258	HSP-D1941B10	AAWU01010038	Atkinson et al. (2008)	Culex quinquefasciatus	Complète	G	INTRON=1	Agr. / PhyH	HexaAB
259	HSP-D2029A1	ABKP02014061	Lawniczak et al. (2008)	Anopheles gambiae	Complète	G	INTRON=1	Agr.	HexaAB
260	HSP-D1941A3	GBBL01000955	Garcia et al. (2013)	Amblyomma parvum	Complète	C	IVIROIV-I	Agr.	AracAB
261	HSP-D1941B15	GEEX01000842	Barcelos et al. (2016)	Amblyomma sculptum	Complète	C		Agr. / PhyC	AracAB
262	HSP-D1941B14	GBBM01000618	Garcia et al. (2014)	Amblyomma triste	Complète	C		Agr. / PhyC	AracAB
263	HSP-D1947A5	KM111606	Yang et al. (2014)	Haemaphysalis flava	Complète	C		Agr.	AracAB
		XM_002407088							
264	HSP-D1947A6	ABJB010058922	Nene (2007)	Ixodes scapularis	Complète	C/G	INTRON=3	Agr. / PhyA / PhyC	AracAB
265	HSP-C531A1	JP422260	Li et al. (2012)	Litopenaeus vannamei	Partielle	C		Agr.	MalaA3
266	HSP-D1908B16	GEEP01084956	Ms et al. (2016)	Penaeus monodon	Partielle	C		Agr.	MalaA3
267	HSP-C583A1	CV161104	Shafer et al. (2004)	Callinectes sapidus	Partielle	C		Agr.	MalaA3
268	HSP-D1956A7	FJ830635	Zhang et al. (2009)	Portunus trituberculatus	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA3
269	HSP-D1008A1	GDRN01076182	Ikhwanuddin et al. (2015)	Scylla olivacea	Partielle	C		Agr.	MalaA3
270	HSP-D1241A1	GDRN01076181	Ikhwanuddin et al. (2015)	Scylla olivacea	Partielle	C		Agr.	MalaA3
271	HSP-D1548A1	KU613106	Baringou et al. (2016)	Cardisoma armatum	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
272	HSP-D1149A1	KU613107	Baringou et al. (2016)	Atelecyclus undecimdentatus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
273	HSP-D1161A1	KU613108	Baringou et al. (2016)	Atelecyclus undecimdentatus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
274	HSP-D1884A1	KU613109	Baringou et al. (2016)	Cancer productus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
275	HSP-D1956B18		Baringou (non publiée)	Cancer productus	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA3
276	HSP-D1956B24		Baringou (non publiée)	Cancer productus	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA3
277	HSP-D1968B14	GEFB01000606	Schulz et Marder (2016)	Cancer borealis	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA3
278	HSP-D1907A2	KU613110	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	G	INTRON=0	Agr. / PhyA	MalaA3
279	HSP-D1956B26		Baringou (non publiée)	Cancer pagurus	Complète	Ğ	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA3
280	HSP-D1908A8	KU613111	Baringou et al. (2016)	Cancer antennarius	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA3
	HSP-D1956A3		Baringou (non publiée)	Cancer antennarius		Ğ	INTRON=Free	Agr.	MalaA3
			9 ()		F-500	_		<i>6</i> ·	

282	HSP-D1956B25		Baringou (non publiée)	Cancer antennarius	Complète		INTRON=Free	Agr.	MalaA3
283	HSP-D1944A5	GARH01013301	Manfrin et al. (2015)	Procambarus clarkii	Complète	C		Agr.	MalaA3
284	HSP-D1959B16	JQ655740	Wang et Li (2013)	Frankliniella occidentalis	Complète	C		Agr.	HexaAB
285	HSP-D1932B11	XM_003740353 AFFJ01002769	Hoy et al. (2014)	Metaseiulus occidentalis	Complète	C/G	INTRON=4	Agr. / PhyC	AracAB
286	HSP-D1929A1	EU514494	Ho et al. (2008)	Daphnia magna	Partielle	C		Agr.	BranAB
287	HSP-D1947A7	ACJG01001177 GL732541	Colbourne et al. (2015)	Daphnia pulex	Complète	G	INTRON=2	Agr. / PhyA	BranAB
288	HSP-D1941A8	BAYF01007016	Ikeda-Takane et al. (2014)	Triops cancriformis	Complète	G	INTRON=2	Agr.	BranAB
289	HSP-D1947B12	BAYF01001628	Ikeda-Takane et al. (2014)	Triops cancriformis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	BranAB
290	HSP-D1950A5	EU514495	Ho et al. (2008)	Moina macrocopa	Complète	C		Agr.	BranAB
291	HSP-D1926B30	GAUK02025652	Misof et al. (2016)	Ephemera danica	Complète	C		Agr.	HexaAB
292	HSP-D1935B11	GAXA02038221	Misof et al. (2016)	Îsonychia bicolor	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
293	HSP-D1944A3	AFFJ01003736 XM 003746600	Hoy et al. (2014)	Metaseiulus occidentalis	Complète	C/G	INTRON=1	Agr. / PhyA	AracAB
294	HSP-C784A2	JW525760	Schoville et al. (2014)	Tigriopus californicus	Partielle	C		Agr.	MaxiAB
295	HSP-D1456A1	JW525772	Schoville et al. (2014)	Tigriopus californicus	Partielle	C		Agr.	MaxiAB
296	HSP-D1961A1	JW519142	Schoville et al. (2014)	Tigriopus californicus	Complète	C		Agr. / PhyA	MaxiAB
297	HSP-D1959A7	EU162749	Rhee et al. (2008)	Tigriopus japonicus	Complète	C		Agr. / PhyA	MaxiAB
298	HSP-D1953B24	KF516629	Kim et al. (2014)	Paracyclopina nana	Complète	C		Agr.	MaxiAB
299	HSP-D1956B22	HQ115581	Lee (2012)	Paracyclopina nana	Complète	C		Agr.	MaxiAB
300	HSP-D1913A3	JW519350	Schoville et al. (2014)	Tigriopus californicus	Complète	C		Agr. / PhyA	MaxiAB
301	HSP-D1714A1	GAXK01205881	Lenz et al. (2016)	Calanus finmarchicus	Partielle	C		Agr.	MaxiAB
302	HSP-D1971B13	GAXK01205880	Lenz et al. (2016)	Calanus finmarchicus	Complète	C		Agr.	MaxiAB
303	HSP-D1971A5	GBFB01162455	Tarrant et al. (2014)	Calanus finmarchicus	Complète	C		Agr.	MaxiAB
304	HSP-D1953B25	JX624124	Jiang et al. (2013)	Pseudodiaptomus annandalei	Complète	C		Agr.	MaxiAB
305	HSP-D1106A1	JW526653	Schoville et al. (2014)	Tigriopus californicus	Complète	C		Agr.	MaxiAB
306	HSP-D1925A1	JW506905	Schoville et al. (2014)	Tigriopus californicus	Complète	C		Agr. / PhyA	MaxiAB
307	HSP-D1953B30	AZAI01048984	Murali et al. (2014)	Eurytemora affinis	Complète	G	INTRON=8	Agr.	MaxiAB
308	HSP-D1920B22	AANI01017475	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis	Complète	G	INTRON=1	Agr.	HexaAB
309	HSP-D1926B14	JAQD01000151	McCoy (2014)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRON=1	Agr.	HexaAB
310	HSP-D1926B28	L01501	Rubin et al. (1993)	Drosophila melanogaster	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
311	HSP-C319A1	JP351964	Mohd-Shamsudin et al. (2013)	Macrobrachium rosenbergii	Partielle	C		Agr.	MalaA3
312	HSP-D1885A1	GEFN01002799	Pedrini et al. (2016)	Palaemon argentinus	Partielle	C		Agr.	MalaA3
313	HSP-D1284A1	KM067146	Cascella et al. (2014)	Euphausia superba	Partielle	C		Agr.	MalaA3
314	HSP-D1977A4	KM067141	Cascella et al. (2014)	Euphausia crystallorophias	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA3
315	HSP-C541A1	GCVG01046057	Sun et al. (2016)	Macrobrachium nipponense	Partielle	C		Agr.	MalaA1
316	HSP-D1965B12	KM067145	Cascella et al. (2014)	Euphausia superba	Partielle	C		Agr.	MalaA1
317	HSP-D1974A2	KM067140	Cascella et al. (2014)	Euphausia crystallorophias	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
318	HSP-D2007A1	KM067139	Cascella et al. (2014)	Euphausia crystallorophias	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
319	HSP-D2007A2	KM067144	Cascella et al. (2014)	Euphausia superba	Complète	C		Agr.	MalaA1
320	HSP-C547A2	GBYW01021121	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaA2
321	HSP-D1920A7	GAFY01000699	Manfrin et al. (2013)	Pontastacus leptodactylus	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA2
322	HSP-D1920B11		Baringou (non publiée)	Astacus astacus	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA2
323	HSP-D1920B14	GEDF01006865	Theissinger (2016)	Astacus astacus	Complète	C		Agr.	MalaA2
324	HSP-D1920B13	GBEI01000624	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaA2
325	HSP-D1587A1	GARH01030305	Manfrin et al. (2015)	Procambarus clarkii	Partielle	C		Agr.	MalaA2
326	HSP-D1917B10	KU613184	Baringou et al. (2016)	Procambarus clarkii	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA2
327	HSP-D1917B15	GBEV01001373	Tom et al. (2014)	Procambarus clarkii	Complète	C		Agr.	MalaA2

220	HGD G011 1 1	CD1/11/01/020/10	D 31 + G 1 1 H (2015)	D 16	D 2 11	<u> </u>			361.40
328	HSP-C811A1	GBYW01022610	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaA2
329	HSP-D1932B14	KR058823	Ali et al. (2015)	Cherax cainii	Complète	C		Agr.	MalaA2
330	HSP-D1932B16	KR058821	Ali et al. (2015)	Cherax quadricarinatus	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA2
331	HSP-D1959A8	HM800921	Fang et al. (2012)	Cherax quadricarinatus	Complète	C		Agr.	MalaA2
332	HSP-D1929A9	GEBG01000315	Christie et al. (2016)	Homarus americanus	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA2
333	HSP-D1950B14	AF427596	Chen et MacRae (2001)	Artemia franciscana	Complète	C		Agr.	BranAB
334	HSP-D1956B36	KF683905	Liu et al. (2015)	Artemia sinica	Complète	C		Agr.	BranAB
335	HSP-C530A1	GCVG01012727	Sun et al. (2016)	Macrobrachium nipponense	Partielle	C		Agr.	MalaA1
336	HSP-D1128A1	JX948079	Blanck et al. (2013)	Macrobrachium amazonicum	Partielle	C		Agr.	MalaA1
337	HSP-D1950A4	AY466445	Liu et al. (2004)	Macrobrachium rosenbergii	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
338	HSP-D1830A1	GEFN01023459	Pedrini et al. (2016)	Palaemon argentinus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
339	HSP-C559A1	GEFN01007591	Pedrini et al. (2016)	Palaemon argentinus	Partielle	C	numb out #	Agr.	MalaA1
340	HSP-D1869A5	EFX71770	Colbourne et al. (2015)	Daphnia pulex	Complète	G	INTRON=7	Agr. / PhyA	BranAB
341	HSP-D1947B18	GDIQ01242000	Gilbert (2015)	Daphnia magna	Complète	C		Agr.	BranAB
342	HSP-D1947B19	GDIQ01216529	Gilbert (2015)	Daphnia magna	Complète	C		Agr.	BranAB
343	HSP-D1947B20	GDIQ01111620	Gilbert (2015)	Daphnia magna	Complète	C		Agr.	BranAB
344	HSP-D1950B23	ACJG01004295	Colbourne et al. (2015)	Daphnia pulex	Complète	G	INTRON=6	Agr. / PhyA	BranAB
345	HSP-C543A1	AM502906	Knigge et al. (2007)	Tachypodoiulus niger	Partielle	C		Agr.	MyriAB
346	HSP-C543A2	AM502907	Knigge et al. (2007)	Tachypodoiulus niger	Partielle	G	INTRON=2	Agr.	MyriAB
347	HSP-D1935B12	GAYO02024277	Misof et al. (2016)	Cordulegaster boltonii	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
348	HSP-D1935B13	GAYO02024278	Misof et al. (2016)	Cordulegaster boltonii	Complète	C		Agr.	HexaAB
349	HSP-D1938A1	GAVW02023459	Misof et al. (2016)	Epiophlebia superstes	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
350	HSP-D1950B22	GAYM02019893	Misof et al. (2016)	Calopteryx splendens	Complète	C		Agr.	HexaAB
351	HSP-D1938B12	APVN01013778	Qu et al. (2013)	Ladona fulva	Complète	G	INTRON=2	Agr.	HexaAB
352	HSP-D1908B17	GAUZ02041748	Misof et al. (2016)	Stenobothrus lineatus	Complète	C		Agr.	HexaAB
353	HSP-D1962B20	AY178988	Qin et al. (2003)	Locusta migratoria	Complète	G	INTRON=3	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
354	HSP-D1965B20	GCGJ01049375	Wang et al. (2015)	Locusta migratoria	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
355	HSP-D1971A6	AVCP010233322	Wang et al. (2014)	Locusta migratoria	Complète	G	INTRON=3	Agr.	HexaAB
256	HCD D10(010	AVCP010233323			•				11 A.D.
356	HSP-D1968A9	AY299637	Wang et Kang(2005)	Locusta migratoria	Complète			Agr.	HexaAB
357	HSP-D1962B22	GAZN02039008	Misof et al. (2016)	Cryptocercus wrighti	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
358	HSP-D1962B23	GAYD02049667	Misof et al. (2016)	Blaberus atropos	Complète	C	DUTTO ON A	Agr. / PhyH	HexaAB
359	HSP-D1965B22	JPZV01001492	Murali et al. (2014)	Blattella germanica	Complète	G	INTRON=2	Agr. / PhyH	HexaAB
360	HSP-D1974A3	GBHB01071186	Kasumovic et al. (2014)	Teleogryllus commodus	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
361	HSP-D1974A6	GBHB01036048	Kasumovic et al. (2014)	Teleogryllus commodus	Complète	C		Agr.	HexaAB
362	HSP-D1974A5	GBHB01027335	Kasumovic et al. (2014)	Teleogryllus commodus	Complète	C		Agr.	HexaAB
363	HSP-D1974A4	GBHB01012439	Kasumovic et al. (2014)	Teleogryllus commodus	Complète	C		Agr.	HexaAB
364	HSP-D1983A4	GBHB01071188	Kasumovic et al. (2014)	Teleogryllus commodus	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
365	HSP-D1956B35	DQ093377	Wang et Lei (2007)	Bemisia tabaci	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
366	HSP-D1072A1	GAKX01032695	Meusemann et Misof (2014)	Symphylella vulgaris	Partielle	C		Agr.	MyriAB
367	HSP-D1388A1	GAKX01013304	Meusemann et Misof (2014)	Symphylella vulgaris	Partielle	C		Agr.	MyriAB
368	HSP-D1409A1	GAKX01053665	Meusemann et Misof (2014)	Symphylella vulgaris	Partielle	C		Agr.	MyriAB
369	HSP-D1101A1	GAZS01034083	Bechsgaard (2014)	Acanthoscurria geniculata	Partielle	C		Agr.	AracAB
370	HSP-D1313A1	GAZS01034082	Bechsgaard (2014)	Acanthoscurria geniculata	Partielle	C		Agr.	AracAB
371	HSP-D1534A2	GAZS01034085	Bechsgaard (2014)	Acanthoscurria geniculata	Partielle	C		Agr.	AracAB
372	HSP-D1877A1	GAZS01022612	Bechsgaard (2014)	Acanthoscurria geniculata	Partielle	C		Agr. / PhyC	AracAB
373	HSP-D1933A1	GAZS01000332	Bechsgaard (2014)	Acanthoscurria geniculata	Partielle	C		Agr. / PhyC	AracAB
374	HSP-D1947B17	GAZS01046809	Bechsgaard (2014)	Acanthoscurria geniculata	Complète	C		Agr. / PhyC	AracAB
3/5	HSP-D1941B11	GAZR01001483	Bechsgaard et al. (2012)	Stegodyphus mimosarum	Complète	C		Agr.	AracAB

376	HSP-D1941B16	AZAQ01113997	Bechsgaard (2014)	Stegodyphus mimosarum	Complète		INTRON=Free	Agr. / PhyC	AracAB
377	HSP-D1941B12	JT043427	Bechsgaard et al. (2012)	Stegodyphus tentoriicola		C		Agr.	AracAB
378	HSP-D1941B13	JT024434	Bechsgaard et al. (2012)	Stegodyphus lineatus		C		Agr.	AracAB
379	HSP-D1950B20	AOMJ01081131	Richards et al. (2013)	Parasteatoda tepidariorum	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	AracAB
380	HSP-D1935A9	AYEL01080367	Cao et al. (2013)	Mesobuthus martensii	Complète	G	INTRON=5	Agr. / PhyC	AracAB
381	HSP-D1941A9	AYEL01066132	Cao et al. (2013)	Mesobuthus martensii		G	INTRON=5	Agr. / PhyC	AracAB
382	HSP-D1950B19	AYEL01081992	Cao et al. (2013)	Mesobuthus martensii	Complète	G	INTRON=5	Agr. / PhyC	AracAB
383	HSP-D1383A1	AZTN01017642	Wilson et al. (2013)	Limulus polyphemus	Partielle	G	INTRON=3	Agr.	MeroAB
384	HSP-D1932A6	AZTN01017642	Wilson et al. (2013)	Limulus polyphemus	Complète	G	INTRON=4	Agr. / PhyC	MeroAB
		AZTN01093181	, ,	1 21				2 ,	
385	HSP-D1932B20	AZTN01078264	Wilson et al. (2013)	Limulus polyphemus	Complète		INTRON=5	Agr.	MeroAB
386	HSP-D1956B32	GBEI01087174	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus		C		Agr.	MalaA3
387	HSP-D1959B19	EU977182	Ming et al. (2008)	Tetranychus cinnabarinus		C		Agr. / PhyC	AracAB
388	HSP-D1965A9	CAEY01000069	Grbic et al. (2011)	Tetranychus urticae	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyC	AracAB
389	HSP-D1965A4	DQ310791	Shim et al. (2006)	Tetranychus urticae		C		Agr.	AracAB
390		CAEY01000070	Grbic et al. (2011)	Tetranychus urticae	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	AracAB
391	HSP-D1983A3	EU679414	Li et al. (2009)	Tetranychus cinnabarinus	Complète			Agr. / PhyA / PhyC	AracAB
392	HSP-D1968A8	GQ495084	Yang et al. (2012)	Panonychus citri	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyC	AracAB
393	HSP-D1965B11	EU679412	Li et al. (2009)	Tetranychus cinnabarinus	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyC	AracAB
394	HSP-D1965B23	CAEY01000239	Grbic et al. (2011)	Tetranychus urticae	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	AracAB
395	HSP-D1977A5	GQ495083	Yang et al. (2012)	Panonychus citri	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyC	AracAB
396		LMYM01024995	Botha et al. (2015)	Diuraphis noxia	Partielle	G	INTRON=2	Agr.	HexaAB
397	HSP-D1965B10	ABLF02013051	Jiang et al. (2008)	Acyrthosiphon pisum	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
398	HSP-D1959B25	LMYM01005772	Botha et al. (2015)	Diuraphis noxia	Complète	G	INTRON=2	Agr.	HexaAB
399	HSP-C677A1	LMYM01045967	Botha et al. (2015)	Diuraphis noxia	Partielle	G	INTRON=2	Agr.	HexaAB
400		ABLF02026083	Jiang et al. (2010)	Acyrthosiphon pisum	Complète	G		Agr.	HexaAB
401	HSP-C903A1	LMYM01016678	Botha et al. (2015)	Diuraphis noxia	Partielle	C		Agr.	HexaAB
402	HSP-D1998A2	LMYM01000369	Botha et al. (2015)	Diuraphis noxia	Complète	G	INTRON=2	Agr.	HexaAB
403	HSP-D1950B13	AAJJ01001581	Denell et al. (2008)	Tribolium castaneum	Complète	C/G	INTRON=1	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
		XM_961518	, ,				11110111		
404	HSP-D1953B28	GBHN01000033	Tan et al. (2015)	Colaphellus bowringi	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
405	HSP-D1956A5	EF668009	Yang et al. (2007)	Harmonia axyridis	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
406	HSP-D1962B19	KC161301	Liu et al. (2013)	Ericerus pela	Complète	G	INTRON=3	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
407	HSP-C478A1	EE605391	Kim et al. (2006)	Bombus ignitus	Partielle	C		Agr.	HexaAB
408	HSP-C637A3	AELG01002684	Sadd et al. (2010)	Bombus terrestris	Partielle	C/G	INTRON=1	Agr.	HexaAB
400		FN621502		D 1		~		, and the second	
409	HSP-D1737A2	XM_003397415		Bombus terrestris	Partielle	C		Agr.	HexaAB
410	HSP-D1941A7	AELG01002684	Sadd et al. (2015)	Bombus terrestris	Complète	C/G	INTRON=1	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
411	HGD D1052D26	XM_003397414	W. 1 (2014)	4 . 11:0					TT 4.D
411	HSP-D1953B26	NM_001160050	Williams et al. (2014)	Apis mellifera	Complète	C	nymp oxy 4	Agr. / PhyH	HexaAB
412	HSP-D1977A3	AADG06000220	Zhang et al. (2003)	Apis mellifera	Complète	G	INTRON=1	Agr. / PhyH	HexaAB
413	HSP-C550A1	EG326637	Hoffman et Goodisman (2007)	Vespula squamosa	Partielle	C		Agr.	HexaAB
414	HSP-D1962B11	AZMT01016994	Burke et al. (2014)	Microplitis demolitor	Complète	C/G	INTRON=2	Agr.	HexaAB
415	HGD D1050D20	XM_008553068	Nr. 6 . 1 (2016)						11 A.D.
415	HSP-D1959B20	GAY002023847	Misof et al. (2016)	Cordulegaster boltonii	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
416	HSP-D1968B15	GAVW02022791	Misof et al. (2016)	Epiophlebia superstes	Complète	C	INTERION O	Agr. / PhyH	HexaAB
417	HSP-D1977A2	APVN01131785	Qu et al. (2013)	Ladona fulva	Complète	G	INTRON=2	Agr. / PhyH	HexaAB
418	HSP-D1923A5	AADG06003252	Williams et al. (2014)	Apis mellifera	Complète	C/G	INTRON=2	Agr. / PhyH	HexaAB
		NM_001160072	•	•	•			- ,	

419	HSP-D1923B11	HP535900	Elsik et al. (2014)	Apis mellifera	Complète			Agr.	HexaAB
420	HSP-D1923B12	HP576640	Elsik et al. (2014)	Apis mellifera	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
421	HSP-D1923B10	HP542161	Elsik et al. (2014)	Apis mellifera	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
422	HSP-D1932B19	LH831954	Morandin et al. (2016)	Formica exsecta	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
423	HSP-D1932B22	AEAB01004007	Bonasio et al. (2010)	Camponotus floridanus	Complète	G	INTRON=2	Agr.	HexaAB
424	HSP-D1236A1	GBKE01003655	Rehm et al. (2014)	Lithobius forficatus	Partielle	C		Agr.	MyriAB
425	HSP-D1950B25	AFFK01019647	Richards et al. (2011)	Strigamia maritima	Complète	G	INTRON=3	Agr.	MyriAB
426	HSP-D1227A1	JQDR01082353	Murali et al. (2014)	Hyalella azteca	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA5
427	HSP-D1932A8	JODR01082349	Murali et al. (2014)	Hyalella azteca	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA5
428	HSP-D1932A7	JQDR01082359	Murali et al. (2014)	Hyalella azteca	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyM	MalaA5
429	HSP-D1908A7	JODR01082354	Murali et al. (2014)	Hyalella azteca	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyM	MalaA5
430	HSP-D1920A8	JODR01033640	Murali et al. (2014)	Hyalella azteca	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA5
431	HSP-D1944A4	LONS01000626	Kao et al. (2016)	Parhyale hawaiensis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA5
432	HSP-D1950B24	LONS01008121	Kao et al. (2016)	Parhyale hawaiensis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MalaA5
	HSP-C413A1	GQ324988	Colson-Proch et al. (2010)	Niphargus virei	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA5
434	HSP-C580A2	GQ324982	Colson-Proch et al. (2010)	Niphargus rhenorhodanensis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA5
435	HSP-D1650A1	GARO01005560	Cattonaro (2014)	Echinogammarus veneris	Partielle	C	ITTIOIT-0	Agr. / PhyM	MalaA5
436	HSP-D1758A1	HG809966	Cottin et al. (2015)	Gammarus pulex	Partielle	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA5
437	HSP-C522A2	GARO01018042	Cattonaro (2014)	Echinogammarus veneris	Partielle	C		Agr. Agr.	MalaA5
438	HSP-D1926B23	FM165078	Hauton et al. (2008)	Gammarus locusta	Complète	C		_	MalaA5
436	HSF-D1920B23	AFFJ01003773	Hauton et al. (2008)	Gammarus tocusta	Complete	C		Agr.	MaiaAS
439	HSP-D1893A1	XM_003746882	Hoy et al. (2012)	Metaseiulus occidentalis	Complète	C/G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	AracAB
440	HSP-D1914A1	AFFJ01001917	Hoy et al. (2012)	Metaseiulus occidentalis	Complète	C/G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	AracAB
440	1131 -D1714A1	XM_00373820	110y et al. (2012)	metasetutus occiaentatis	Complete	C/G	INTRON-FICE	Agi. / TilyC	AlaCAD
441	HSP-D1941A6	AFFJ01001941	Hoy et al. (2012)	Metaseiulus occidentalis	Complète	C/G	INTRON=Free	Agr. / PhyA	AracAB
441	1131 -D1941A0	XM_003738243	110y et al. (2012)	metasetutus occidentatis	Complete	C/G	INTRON-FICE	Agi. / TilyA	AlaCAD
442	HSP-D1947B11	AFFJ01001917	Hoy et al. (2012)	Metaseiulus occidentalis	Complète	C/G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	AracAB
442	ПЗГ-D194/D11	XR_145210	Hoy et al. (2012)	Metasetutus occidentatis			INTRON-FICE	Agi. / FilyC	AlacAb
443	HSP-D1944A2	KC335213	Zhang et al.(2013)	Neoseiulus cucumeris	Complète	C		Agr. / PhyA	AracAB
444	HSP-D1896A1	AELG01003941 XM_003396727	Sadd et al. (2015)	Bombus terrestris	Complète	G	INTRON=6	Agr. / PhyA / PhyH	HexaAB
		AELG01003941							
445	HSP-D1896A2	XM_003487055	Sadd et al. (2015)	Bombus impatiens	Complète	G	INTRON=6	Agr.	HexaAB
446	HSP-D1926B29	LH861318	Morandin et al. (2016)	Formica exsecta	Complète	C		Agr. / PhyH	HexaAB
447	HSP-D1959B23	GDIQ01156063	Gilbert (2015)	Daphnia magna	Complète	C		Agr.	BranAB
448	HSP-D1905A1	KM067142	Cascella et al. (2014)	Euphausia crystallorophias	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaB2
449	HSP-D1920B10	KM067147	Cascella et al. (2014)	Euphausia crystatiorophias Euphausia superba	Complète	C		Agr. Agr.	MalaB2
450	HSP-D1233A1	ADND02014326	Yasuike et al. (2010)	Lepeophtheirus salmonis	Partielle	G	INTRON=0		MaxiAB
	HSP-D1233A2	ADND02014320 ADND02098087	Yasuike et al. (2011)	Lepeophtheirus salmonis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MaxiAB
451	HSP-D1255A2 HSP-D1950B15	ADND02098087 ADND02016522	` /	Lepeophineirus salmonis Lepeophtheirus salmonis	Complète	G	INTRON=0 INTRON=Free	Agr.	MaxiAB
			Yasuike et al. (2011)	* *		G		Agr.	
	HSP-D1554A1	ADND02047900	Yasuike et al. (2011)	Lepeophtheirus salmonis	Partielle		INTRON=0	Agr.	MaxiAB
454	HSP-D1574A1	ADND02047900	Yasuike et al. (2010)	Lepeophtheirus salmonis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MaxiAB
	HSP-D1947B13	ADND02036210	Yasuike et al. (2011)	Lepeophtheirus salmonis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MaxiAB
456	HSP-D1263A1	GAXK01205914	Lenz et al. (2016)	Calanus finmarchicus	Partielle	C		Agr.	MaxiAB
	HSP-D1353A1	JW526652	Schoville et al. (2014)	Tigriopus californicus	Partielle	C		Agr.	MaxiAB
458	HSP-D1934A1	JW506226	Schoville et al. (2014)	Tigriopus californicus	Complète	C		Agr. / PhyA	MaxiAB
459	HSP-D1908B19	GAXK01205933	Lenz et al. (2016)	Calanus finmarchicus	Complète	C		Agr.	MaxiAB
460	HSP-D1920B21	GAXK01205932	Lenz et al. (2016)	Calanus finmarchicus	Complète	C	DIED ON E	Agr.	MaxiAB
461	HSP-D1932B21	AZAI01020705	Murali et al. (2014)	Eurytemora affinis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MaxiAB

462	HSP-D1935A4	AZAI01097825	Murali et al. (2014)	Eurytemora affinis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MaxiAB
463	HSP-D1935B17	AZAI01097822	Murali et al. (2014)	Eurytemora affinis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MaxiAB
464	HSP-D1935A3	AZAI01091068	Murali et al. (2014)	Eurytemora affinis		G	INTRON=Free	Agr.	MaxiAB
465	HSP-D1935B15	AZAI01091062	Murali et al. (2014)	Eurytemora affinis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MaxiAB
466	HSP-D1935B16	AZAI01090274	Murali et al. (2014)	Eurytemora affinis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MaxiAB
467	HSP-C273A2	GBYW01008380	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
468	HSP-C885A1	GBEI01028995	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaB2
469	HSP-D1277A1	GEDF01027245	Theissinger (2016)	Astacus astacus	Complète	C		Agr.	MalaB2
470	HSP-C787A3	GCVG01023673	Sun et al. (2016)	Macrobrachium nipponense	Partielle	C		Agr.	MalaB2
471	HSP-D1687A1	FJ875280	Cottin et al. (2011)	Palaemonetes varians	Partielle	C		Agr.	MalaB2
472	HSP-D1806A1	FJ268954	Cottin et al. (2011)	Rimicaris exoculata	Partielle	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaB2
473	HSP-D1827A2	DQ534065	Ravaux et al. (2008)	Rimicaris exoculata	Partielle	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaB2
474	HSP-C634A1	KU613155	Baringou et al. (2016)	Cancer productus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
475	HSP-C634A2	KU613156	Baringou et al. (2016)	Cancer antennarius	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
476	HSP-D1105A3	KU613188	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	C		Agr.	MalB1a
477	HSP-D1105A4	KU613189	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	C		Agr.	MalB1a
478	HSP-D1859A5	KU613190	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	C		Agr.	MalB1a
479	HSP-D1859A6	KU613191	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalB1a
480	HSP-D1905A9	GEFB01006138	Schulz et Marder (2016)	Cancer borealis	Complète	C		Agr. / PhyM	MalB1a
481	HSP-C833A4	KU613157	Baringou et al. (2016)	Cancer antennarius	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
482	HSP-C833A5	KU613158	Baringou et al. (2016)	Cancer antennarius	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
483	HSP-C833A6	KU613159	Baringou et al. (2016)	Cancer magister	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
484	HSP-C833A9	KU613160	Baringou et al. (2016)	Hemigrapsus nudus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
485	HSP-C833A7	KU613192	Baringou et al. (2016)	Cancer pagurus	Partielle	C		Agr.	MalB1a
486	HSP-C833A8	KU613161	Baringou et al. (2016)	Cancer productus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
487	HSP-C832A1	KU613162	Baringou et al. (2016)	Necora puber	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
488	HSP-C833A1	KU613163	Baringou et al. (2016)	Bythograea thermydron	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
489	HSP-C833B10	KU613164	Baringou et al. (2016)	Segonzacia mesatlantica	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
490	HSP-C833A2	KU613165	Baringou et al. (2016)	Cyanagraea predator	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
491	HSP-C855A1	KU613166	Baringou et al. (2016)	Bythograea thermydron	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
492	HSP-D1105A1	KU613167	Baringou et al. (2016)	Bythograea thermydron	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
493	HSP-D1331A1	KU613193	Baringou et al. (2016)	Bythograea thermydron	Partielle	C		Agr.	MalB1a
494	HSP-D1333A1	KU613168	Baringou et al. (2016)	Bythograea thermydron	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
495	HSP-D1898A1	KU613169	Baringou et al. (2016)	Bythograea thermydron	Partielle	G	INTRON=1	Agr. / PhyM	MalB1a
496	HSP-D1859A1		Leignel (non publiée)	Allograea tomentosa	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
497	HSP-D1859A7		Leignel (non publiée)	Gandalfus puia	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	MalB1a
498	HSP-D1859A3		Leignel (non publiée)	Austinograea rodriguezensis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
499	HSP-D1859A4		Leignel (non publiée)	Austinograea rodriguezensis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
500	HSP-C681A1	CV463237	Shafer et al. (2004)	Callinectes sapidus	Partielle	C		Agr.	MalB1a
501	HSP-D1202A1	GDRN01076180	Ikhwanuddin et al. (2015)	Scylla olivacea	Partielle	Č		Agr.	MalB1a
502	HSP-C969A1	GDRN01076183	Ikhwanuddin et al. (2015)	Scylla olivacea	Partielle	Č		Agr.	MalB1a
503	HSP-C773A1	KU613170	Baringou et al. (2016)	Ocypoda quadrata	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
504	HSP-D1105A2	KU613171	Baringou et al. (2016)	Perisesarma bidens	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
505	HSP-D1583A2	KU613172	Baringou et al. (2016)	Perisesarma bidens	Partielle	G	INTRON=0	Agr. / PhyM	MalB1a
506	HSP-D1238A2	KU613173	Baringou et al. (2016)	Pachygrapsus marmoratus	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
507	HSP-D1583A3	KU613174	Baringou et al. (2016)	Pachygrapsus marmoratus	Partielle	G	INTRON=0	Agr. / PhyM	MalB1a
508	HSP-D1583A5	KU613175	Baringou et al. (2016)	Hemigrapsus nudus	Partielle	G	INTRON=0	Agr. / PhyM	MalB1a
509	HSP-D1897A1	KU613176	Baringou et al. (2016)	Cardisoma armatum	Partielle	G	INTRON=1	Agr. / PhyA / PhyM	MalB1a
	HSP-D1090A1	JR726132	He et al. (2013)	Eriocheir sinensis	Partielle	C	1,11011-1	Agr. Agr.	MalB1a
510	1101 1010/0/11	010, 20102	110 00 411 (2015)	2. Concer direction	- un trotto	J		16	

511	HSP-D1432A1	GBUF01004573	Li et al. (2015)	Eriocheir sinensis	Partielle	С		Agr. / PhyM	MalB1a
512		KU613177	Baringou et al. (2016)	Hemigrapsus sanguineus	Partielle	G	INTRON=0	Agr. / PhyM	MalB1a
513	HSP-D1362A1	GBUF01004572	Li et al. (2015)	Eriocheir sinensis	Partielle	C	INTRON-0	Agr. / FllyWl	MalB1a
	HSP-C690A1	GBUF01004372 GBUF01003228	Li et al. (2015) Li et al. (2015)	Eriocheir sinensis Eriocheir sinensis	Partielle	C		Agr.	MalB1a
515	HSP-D1238A1	KU613140	Baringou et al. (2016)	Ocypoda quadrata	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalB1a
	HSP-C855A2	KU613178	Baringou et al. (2016)	Dromia personnata	Partielle	G	INTRON=0		MalB1a
517	HSP-C980A1	GEEP01074185	Ms et al. (2016)	Penaeus monodon	Partielle	C	INTRON-0	Agr.	MalaB1
						C		Agr.	
	HSP-D1890A1	FJ167398	Luan et al. (2011)	Fenneropenaeus chinensis	Complète			Agr. / PhyA / PhyM	MalaB1
519	HSP-C995A1	GEEP01056878	Ms et al. (2016)	Penaeus monodon	Partielle	C C		Agr.	MalaB1
520		JR226318	Robinson et al. (2014)	Penaeus monodon	Partielle			Agr. / PhyA / PhyM	MalaB1
521	HSP-D1275A1	JP362539	Li et al. (2012)	Litopenaeus vannamei	Partielle	C		Agr.	MalaB1
522		JP360226/JP362539	Li et al. (2012)	Litopenaeus vannamei	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaB1
523	HSP-C341A1	EH275069	Sambles et al. (2006)	Gammarus pulex	Partielle	C		Agr.	MalaA5
	HSP-D1781A1	GARO01006899	Cattonaro (2014)	Echinogammarus veneris	Complète	C		Agr.	MalaA5
525	HSP-D1965B25	GARO01007511	Cattonaro (2014)	Echinogammarus veneris	Complète	C	DIED ON E	Agr.	MalaA5
	HSP-D1893A3	AYEL01070518	Cao et al. (2013)	Mesobuthus martensii	Complète	G	INTRON=5	Agr. / PhyC	AracAB
527	HSP-C217A1	JP351712	Mohd-Shamsudin et al. (2013)	Macrobrachium rosenbergii	Partielle	C		Agr.	MalaA1
528	HSP-C302A1	GEFN01008241	Pedrini et al. (2016)	Palaemon argentinus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
529	HSP-D1881A3	DQ534064	Ravaux et al. (2007)	Mirocaris fortunata	Partielle	C		Agr.	MalaA1
	HSP-D1965A5	FJ356149	Cottin et al. (2011)	Rimicaris exoculata	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
531	HSP-C383A1	JP354636	Mohd-Shamsudin et al. (2013)	Macrobrachium rosenbergii	Partielle	C		Agr.	MalaA1
	HSP-C661A2	FL589696	Wu et al. (2009)	Macrobrachium nipponense	Partielle	C		Agr.	MalaA1
533	HSP-D1950B16	KC460343	Xiu et al. (2014)	Macrobrachium nipponense	Complète	C		Agr.	MalaA1
	HSP-D1950B21	GCVG01033923	Sun et al. (2016)	Macrobrachium nipponense	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA1
535	HSP-C736A1	GEFN01023591	Pedrini et al. (2016)	Palaemon argentinus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
536	HSP-D1834A1	FJ875279	Cottin et al. (2011)	Palaemonetes varians	Partielle	C		Agr. / PhyA / PhyM	MalaA1
537	HSP-D1953B21	KC430921	Lai et Gao (2013)	Exopalaemon carinicauda	Complète	C		Agr. / PhyM	MalaA1
538	HSP-C471A1	FE746153	Lucas et al. (2008)	Petrolisthes cinctipes	Partielle	C		Agr.	MalaA1
539	HSP-D1292A1	KU613105	Baringou et al. (2016)	Galathea strigosa	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	MalaA1
540	HSP-C519A1	DC449842	Pisuttharachai et al. (2009)	Panulirus japonicus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
541	HSP-C541A2	JP375824	Li et al. (2012)	Litopenaeus vannamei	Partielle	C		Agr.	MalaA1
542	HSP-C489A1	GBYW01005009	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
543	HSP-C837A1	JP352681	Mohd-Shamsudin et al. (2013)	Macrobrachium rosenbergii	Partielle	C		Agr.	MalaA1
544	HSP-D1947B16	JP351958	Mohd-Shamsudin et al. (2013)	Macrobrachium rosenbergii	Complète	C		Agr.	MalaA1
545	HSP-D1959B22	GBXE01127241	Verbruggen et al. (2015)	Carcinus maenas	Complète	C		Agr.	MalaA1
546	HSP-D1398A1	GAFY01021103	Manfrin et al. (2013)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
547	HSP-D1962B21	GBEI01011245	Mosco et al. (2015)	Pontastacus leptodactylus	Partielle	C		Agr.	MalaA1
548	HSP-C457A1	BABH01038891	Mita et Xia (2015)	Bombyx mori	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
549	HSP-C566A1	BABH01076311	Mita et Xia (2015)	Bombyx mori	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
550	HSP-C567A2	BAAB01086853	Mita et al. (2015)	Bombyx mori	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
551	HSP-C770A1	BABH01054924	Mita et Xia (2015)	Bombyx mori	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
552	HSP-D1740A1	BABH01038889	Mita et Xia (2007)	Bombyx mori	Partielle	G	INTRON=1	Agr.	HexapC
		XM_004926929	` ′	•					•
553	HSP-D1780A1	BAAB01102061	Mita et al. (2015)	Bombyx mori	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
554	HSP-D1923A1	AB035326	Moribe et al. (2010)	Bombyx mori	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
	HSP-D1923A7	JF836794	Lin et Wang (2011)	Bombyx mori	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
556	HSP-D1923B15	BAAB01079949	Mita et al. (2015)	Bombyx mori	Complète	G		Agr.	HexapC
557	HSP-D2031A1	AADK01003757 DQ311189	Niu et al. (2006)	Bombyx mori	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyH	HexapC

550	HGD D2055 4.1	D 4 4 D 01 05 5 1 2 0	NC: 1 (2015)	P. 1	G 15:	<u> </u>	DIED ON E		
558		BAAB01055120	Mita et al. (2015)	Bombyx mori		G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
559	HSP-D1932A3	HQ012004	Shen et al. (2012)	Spodoptera litura	Complète	C		Agr. / PhyA	HexapC
560	HSP-D1923A8	JX680669	Luo et al. (2015)	Melitaea cinxia	Complète	C	TA LETTO CANA O	Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
561	HSP-D1472A1	AHIO01032757	You et al. (2013)	Plutella xylostella	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
562	HSP-D1899A2	HM212645	Zhang et al. (2015)	Plutella xylostella	Complète	C	DIED ON E	Agr.	HexapC
563	HSP-D1890A2	AHIO01018514	You et al. (2013)	Plutella xylostella	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
564	HSP-D1890A5	HM370511	Wang et al. (2010)	Plutella xylostella	Complète	C		Agr. / PhyA	HexapC
565	HSP-D1890A3	HM370509	Wang et al. (2010)	Plutella xylostella	Complète	C		Agr. / PhyA	HexapC
566	HSP-D1890A4	HM370510	Wang et al. (2010)	Plutella xylostella	Complète	C		Agr. / PhyA	HexapC
567	HSP-D2004A1	HQ107972	Wang et Wu (2010)	Plutella xylostella	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
568	HSP-D2010A1	HQ107971	Wang et al. (2010)	Plutella xylostella	Complète	C	DIED ON E	Agr. / PhyA	HexapC
569	HSP-D2004A2	AHIO01007712	You et al. (2013)	Plutella xylostella	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
570	HSP-D1902A1	EU430480	Gkouvitsas et al. (2009)	Sesamia nonagrioides	Complète	C		Agr. / PhyH	HexapC
571		JX680677	Luo et al. (2015)	Melitaea cinxia	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
572	HSP-D1433A1	GAUK02026125	Misof et al. (2016)	Ephemera danica	Partielle	C	nump over o	Agr.	HexapC
573		AYNC01008133	Qu et al. (2013)	Ephemera danica	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
574	HSP-D1935A5	AYNC01027156	Qu et al. (2013)	Ephemera danica	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
575	HSP-D1935B10	GAUK02030840	Misof et al. (2016)	Ephemera danica	Complète	C		Agr. / PhyH	HexapC
576	HSP-D1944A6	AYNC01080932	Qu et al. (2013)	Ephemera danica	Complète	G	INTRON=1	Agr.	HexapC
577	HSP-D1944A7	GAUK02030839	Misof et al. (2016)	Ephemera danica	Complète	C		Agr.	HexapC
578	HSP-D1944A8	GAUK02030841	Misof et al. (2016)	Ephemera danica	Complète	C		Agr.	HexapC
579	HSP-D1884A2	GAXA02034930	Misof et al. (2016)	Isonychia bicolor	Complète	C		Agr. / PhyH	HexapC
580	HSP-D1926B31	GAXA02034931	Misof et al. (2016)	Isonychia bicolor	Complète	C		Agr.	HexapC
581	HSP-D1926B32	GAXA02034932	Misof et al. (2016)	Isonychia bicolor	Complète	C		Agr.	HexapC
582	HSP-D1642A1	GAUZ02039280	Misof et al. (2016)	Stenobothrus lineatus	Partielle	C		Agr.	HexapC
583	HSP-D1893A6	GBDZ01005567	Liu et al. (2015)	Locusta migratoria	Complète	C		Agr. / PhyH	HexapC
584	HSP-D1899A3	GBHB01014680	Kasumovic et Chen (2014)	Teleogryllus commodus	Complète	C		Agr. / PhyH	HexapC
585	HSP-D1923B13	AAWU01026001	Atkinson et al. (2008)	Culex quinquefasciatus	Complète	G	INTRON=2	Agr. / PhyH	HexapC
586	HSP-D1920A3	HM141536	Garbuz et al. (2011)	Oxycera pardalina	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
587	HSP-C963A1	AANI01016656	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
588	HSP-D1195A1	AANI01016657	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
589	HSP-D1817A1	AANI01000206	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
590	HSP-D1887A4	AANI01017935	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
591	HSP-D1926A2	AY445084	Evgenev et al. (2004)	Drosophila virilis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
592	HSP-D1926B33	AANI01014661	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
593	HSP-D1926A5	AY445090	Evgenev et al. (2004)	Drosophila virilis	Complète	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
594	HSP-D1926A3	AY445085	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
595	HSP-D1926A4	AY445087	Evgenev et al. (2004)	Drosophila virilis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
596	HSP-D1926B34	AANI01014657	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
597	HSP-D1926B35	AANI01014660	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
598	HSP-D1926A6	EU523047	Garbuz et al. (2009)	Drosophila montana	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
599	HSP-D1926B17	JAQD01000468	McCoy (2014)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
600	HSP-D1926B26	AF295956	Bettancourt et Feder (2002)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
601	HSP-D1926B27	AF295948	Bettancourt et Feder (2002)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
602	HSP-D1926B18	JAQD01005015	McCoy (2014)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRTON=Free	Agr.	HexapC
603	HSP-D1926B25	AF295962	Bettancourt et Feder (2002)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
604	HSP-D1932A1	AF295973	Bettencourt et Feder (2002)	Drosophila simulans	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
605	HSP-D1929A3	JAQD01003500	McCoy (2014)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
		JAQD01002968		7 3	- · · ·	-		<i>5</i> ·	

606	HSP-D1929A6	AF295934	Bettancourt et Feder (2002)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA	HexapC
607	HSP-D1929A5	AF295940	Bettancourt et Feder (2002)	Drosophila melanogaster		G	INTRON=Free	Agr. / PhyA	HexapC
608	HSP-D1935B18	AANI01014393	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis		G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
609	HSP-D1908A6	JAQD01001202	McCoy (2014)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyH	HexapC
610	HSP-D1310A1	JPZV01114675	Murali et al. (2014)	Blattella germanica	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
611	HSP-D1920A9	JPZV01114677	Murali et al. (2013)	Blattella germanica	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
612	HSP-D1923A4	JPZV01114681	Murali et al. (2013)	Blattella germanica	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyH	HexapC
613	HSP-D1875A1	GAYD02048992	Misof et al. (2016)	Blaberus atropos	Complète	C		Agr.	HexapC
614	HSP-D1920B17	GAZN02039702	Misof et al. (2016)	Cryptocercus wrighti	Complète	C		Agr. / PhyH	HexapC
615	HSP-D1917B12	KJ136115	Tang et al. (2014)	Harmonia axyridis	Complète	C		Agr. / PhyH	HexapC
616	HSP-D1215A1	XM_001688415	Mongin et al. (2011)	Anopheles gambiae	Partielle	C		Agr.	HexapC
617	HSP-D1920B19	ABKP02025516	Lawniczak et al. (2014)	Anopheles gambiae	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyH	HexapC
618	HSP-D1917A3	AY974355	Rinehart et al. (2006)	Culex pipiens	Complète	C		Agr.	HexapC
	HSP-D1917B11	AAWU01018672	Atkinson et al. (2008)	Culex quinquefasciatus	Complète	Ğ	INTRON=Free	Agr. / PhyH	HexapC
	HSP-D1950A8	EU934244	Yu et Wan (2008)	Trialeurodes vaporariorum	Complète	C		Agr.	HexapC
621	HSP-D1959A5	DQ093385	Wang et Lei (2009)	Bemisia tabaci	Complète	Č		Agr. / PhyH	HexapC
622	HSP-D1962A4	EU934240	Yu et Wan (2008)	Bemisia tabaci	Complète	Č		Agr.	HexapC
	HSP-D1164A1	GBBM01001348	Garcia et al. (2014)	Amblyomma triste	Partielle	Č		Agr.	ArachC
624	HSP-D1826A1	GEEX01006618	Barcelos et al. (2016)	Amblyomma sculptum	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
	HSP-D1902A3	GBBM01000647	Garcia et al. (2014)	Amblyomma triste	Complète	C		Agr. / PhyC	ArachC
		ABJB01055189	· · ·	ž					
626	HSP-D1842A1	XM_002415881	Nene et al. (2009)	Ixodes scapularis	Partielle	C/G	INTRON=Free	Agr.	ArachC
627	HSP-D1908B13	ABJB010551899	Nene (2008)	Ixodes scapularis	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA / PhyC	ArachC
	HSP-D1904A1	ABJB01033310	Nene (2007)	Ixodes scapularis		G	INTRON=Free	Agr. / PhyA	ArachC
629	HSP-D1902A4	JAQD010133312	McCoy (2014)	Drosophila melanogaster	Complète	G	INTRON=1	Agr. Agr.	HexapC
	HSP-D1902A4	AANI01014617	Clark et al. (2006)	Drosophila virilis		G	INTRON=1	Agr.	HexapC
631	HSP-C776A1	ABLF02039216	Jiang et al. (2000)	Acyrthosiphon pisum	Partielle	G	INTRON=1 INTRON=0		HexapC
	HSP-D1923B14	ABLF02055563	Jiang et al. (2010)	Acyrthosiphon pisum Acyrthosiphon pisum		G	INTRON=0 INTRON=Free	Agr.	HexapC
633	HSP-D1923B14 HSP-D1914A5	LMYM01000351	Botha et al. (2015)	Diuraphis noxia	Complète	G	INTRON=Free	Agr. Agr.	HexapC
634	HSP-D1506A1	ABLF02064920	. ,	*	Partielle	G	INTRON=11ee INTRON=0		
034	HSP-D1300A1		Jiang et al. (2010)	Acyrthosiphon pisum	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
635	HSP-D1914A2	ABLF02040542	Jiang et al. (2008)	Acyrthosiphon pisum	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyH	HexapC
(2)	HGD D151041	XM_001945751	D 1 (2015)	D: 1:	75 - 2 - 21		DIED ON 1	,	
	HSP-D1518A1	LMYM01009116	Botha et al. (2015)	Diuraphis noxia	Partielle	G	INTRON=1+	Agr.	HexapC
637	HSP-D1914A6	LMYM01000020	Botha et al. (2015)	Diuraphis noxia		G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
	HSP-D1926B12	ABLF02020829	Jiang et al. (2008)	Acyrthosiphon pisum	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
639	HSP-D1926B13	ABLF02018139	Jiang et al. (2008)	Acyrthosiphon pisum	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
640	HSP-C876A1	ABLF02039228	Jiang et al. (2010)	Acyrthosiphon pisum	Partielle	G	INTRON=0	Agr.	HexapC
641	HSP-D1872B11	ABLF02025583	Jiang et al. (2008)	Acyrthosiphon pisum	Complète	G	INTRON=5	Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
		XM_001949802	-		-			118117 1117117 111711	-
	HSP-D1872B13	LMYM01000127	Botha et al. (2015)	Diuraphis noxia	Complète		INTRON=5	Agr.	HexapC
643	HSP-D1872B12	KM221884	Fang et al. (2014)	Phenacoccus solenopsis		C		Agr. / PhyH	HexapC
644	HSP-D1878A1	GBHN01002328	Tan et al. (2015)	Colaphellus bowringi	Complète	C		Agr.	HexapC
		AAJJ01002485							
645	HSP-D1896A3	AAJJ02000502	Denell et al. (2008)	Tribolium castaneum	Complète	C/G	INTRON=3	Agr. / PhyH	HexapC
		XM_968428							
646	HSP-D1884A3	GAFX01011992	Keeling et al. (2013)	Dendroctonus ponderosae	Complète			Agr.	HexapC
647	HSP-D1887A2	GAYD02049321	Misof et al. (2016)	Blaberus atropos	Complète	C		Agr. / PhyH	HexapC
648	HSP-D1893A4	GAZN02046920	Misof et al. (2016)	Cryptocercus wrighti	Complète	C		Agr. / PhyH	HexapC

		D 4 D 11010 42070							
649	HSP-D1887A3	BABH01042878 JF836795	Lin et Wang (2011)	Bombyx mori	Complète	C/G	INTRON=Free	Agr. / PhyH	HexapC
650	HSP-D1917A2	AY842477	Huang et Kang (2007)	Liriomyza sativae	Complète	C		Agr.	HexapC
651	HSP-D1929A7	AY842476	Huang et Kang (2007)	Liriomyza huidobrensis	Complète	C		Agr.	HexapC
652	HSP-D1932A2	DQ017057	Chen et al. (2006)	Delia antiqua	Complète	C		Agr.	HexapC
653	HSP-D1923B16	AVCP010044002	Wang et al. (2014)	Acyrthosiphon pisum	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
654	HSP-D1027A1	GBHN01007880	Tan et al. (2015)	Colaphellus bowringi	Partielle	C		Agr.	HexapC
655	HSP-D1929A8	GBHN01000831	Tan et al. (2015)	Colaphellus bowringi	Complète	C		Agr. / PhyH	HexapC
		AAJJ02002611	- 1111 21 311 (= 2 - 2 )					1 -8-17 - 1-7-1	
656	HSP-D1938A6	AAJJ01000101	Kim et al. (2012)	Tribolium castaneum	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
		NM 001170729	()			_		8	
		NM 001170728				~			
657	HSP-D1938A7	AAJJ01000101	Denell et al. (2008)	Tribolium castaneum	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	HexapC
		AAJJ02002711							
658	HSP-D1941A5	XM 969349	Richards et al. (2008)	Tribolium castaneum	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyA	HexapC
659	HSP-D1920B18	GAFX01008152	Keeling et al. (2013)	Dendroctonus ponderosae	Complète	C		Agr.	HexapC
660	HSP-D1965B21	GAFX01011859	Keeling et al. (2013)	Dendroctonus ponderosae	Complète	Č		Agr.	HexapC
661	HSP-D1448A1	AAJJ02002861	Richards et al. (2016)	Tribolium castaneum	Partielle	G	INTRON=1+	Agr.	HexapC
		NM_001170627							•
662	HSP-D1893A2	AAJJ01005609	Kim et al. (2014)	Tribolium castaneum	Complète	C/G	INTRON=1+	Agr.	HexapC
663	HSP-D1893A5	GAFX01012030	Keeling et al. (2013)	Dendroctonus ponderosae	Complète	C		Agr.	HexapC
664	HSP-C661A3	GAUZ02045913	Misof et al. (2016)	Stenobothrus lineatus	Partielle	C		Agr.	HexapC
	HSP-D1890A6	AAWU01026496	Atkinson et al. (2008)	Culex quinquefasciatus	Complète	G	INTRON=1	Agr. / PhyH	HexapC
666	HSP-D1947B21	AYNC01006128	Ou et al. (2013)	Ephemera danica		G	INTRON=1	Agr.	HexapC
667	HSP-D1947B22	GAUK02026450	Misof et al. (2016)	Ephemera danica	Complète	C	1111011-1	Agr.	HexapC
668	HSP-C749A1	JT046106	Bechsgaard et al. (2012)	Stegodyphus tentoriicola	Partielle	C		Agr.	ArachC
669	HSP-D1917B13	AZAQ01063051	Bechsgaard (2014)	Stegodyphus mimosarum	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	ArachC
670	HSP-D1419A1	JT034359	Bechsgaard et al. (2012)	Stegodyphus mimosarum	Partielle	C	II TIKOI I – I ICC	Agr.	ArachC
671		AZAQ01006245	Bechsgaard (2014)	Stegodyphus mimosarum	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	ArachC
672	HSP-D1923A9	AOMJ01215376	Richards et al. (2013)	Parasteatoda tepidariorum		G	INTRON=Free	Agr.	ArachC
	HSP-D1920B15	AOMJ01213370 AOMJ01117259	Richards et al. (2013)	Parasteatoda tepidariorum		G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	ArachC
674	HSP-D1920B16	AOMJ01257150	Richards et al. (2013)	Parasteatoda tepidariorum	1	G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	ArachC
		AOMJ01237160 AOMJ01037162	Richards et al. (2013)	Parasteatoda tepidariorum	- · · · · ·	G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	ArachC
676	HSP-D1938A9	IAAA01014043	Kono et al. (2015)	Parasteatoda tepidariorum	Complète	C	INTROIN-FIEC	Agr. / PhyC	ArachC
677		IAAA01014043 IAAA01014044	Kono et al. (2015)	Parasteatoda tepidariorum	Complète	C		Agr. Agr.	ArachC
678	HSP-D1905B11	AZAQ01014044 AZAQ01025021	Bechsgaard (2014)	Stegodyphus mimosarum	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	ArachC
679	HSP-D1908B18	AZAQ01023021 AZAQ01120753	Bechsgaard (2014)	Stegodyphus mimosarum	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	ArachC
680	HSP-D1648A1	GAZS01063522	Bechsgaard (2014)	Acanthoscurria geniculata	Partielle	C	INTRON-FICE	Agr. / Thyc	ArachC
681	HSP-D1771A1	GAZS01003322 GAZS01003339	Bechsgaard (2014)	Acanthoscurria geniculata	Partielle	C		Agr.	ArachC
682	HSP-D1838A1	EF537097	Starrett et Waters (2013)	Diguetia mojavea	Partielle	C		Agr.	ArachC
683	HSP-D1866A1	EF537096	Starett et Waters (2013)	Diguetia mojavea Diguetia mojavea	Partielle	C		Agr. / PhyA / PhyC	ArachC
684	HSP-D1866A2	EF537098	Starett et Waters (2013) Starett et Waters (2013)	0	Partielle	C			ArachC
	HSP-D1866A4	EF537098 EF537099		Diguetia mojavea	Partielle	C		Agr.	ArachC
685 686	HSP-D1866A6	EF537101	Starrett et Waters (2013)	Diguetia signata	Partielle Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
687	HSP-D1869A1	EF537101 EF537100	Starrett et Waters (2013) Starett et Waters (2013)	Diguetia sp. Diguetia canities	Partielle Partielle	C		Agr. Agr. / PhyC	ArachC
	HSP-D1848A1	EF537114	Starett et Waters (2013) Starett et Waters (2013)	0	Partielle Partielle	C			ArachC
688 689		EF537114 EF537113	` /	Diguetia mojavea	Partielle Partielle	C		Agr.	
690	HSP-D1848A2 HSP-D1848A4	EF537113 EF537112	Starett et Waters (2013)	Diguetia signata	Partielle Partielle	C		Agr.	ArachC
	HSP-D1848A4 HSP-D1872A5	EF537112 EF537107	Starrett et Waters (2013)	Diguetia sp. Diguetia mojavea	Partielle Partielle	C		Agr.	ArachC ArachC
091	1131-D10/4A3	E1 55 / 10 /	Starett et Waters (2013)	Бізиени тојичей	i ai iiciie	C		Agr.	Araciic

692	HSP-D1851A1	EF537108	Starett et Waters (2013)	Diguetia canities	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
693	HSP-D1866A5	EF537110	Starett et Waters (2013)	Diguetia signata	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
694	HSP-D1866A7	EF537111	Starrett et Waters (2013)	Diguetia sp.	Partielle	C		Agr.	ArachC
695	HSP-D1866A3	EF537109	Starett et Waters (2013)	Diguetia mojavea	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
696	HSP-D1848A3	EF537118	Starett et Waters (2013)	Diguetia signata	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
697	HSP-D1872A2	EF537116	Starett et Waters (2013)	Diguetia canities	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
698	HSP-D1872A9	EF537117	Starrett et Waters (2013)	Diguetia sp.	Partielle	C		Agr.	ArachC
699	HSP-D1872A6	EF537115	Starett et Waters (2013)	Diguetia mojavea	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
700	HSP-D1872A1	EF537102	Starett et Waters (2013)	Diguetia canities	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
701	HSP-D1872A8	EF537103	Starrett et Waters (2013)	Diguetia sp.	Partielle	C		Agr.	ArachC
702	HSP-D1872A7	EF537106	Starett et Waters (2013)	Diguetia signata	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
703	HSP-D1872A3	EF537104	Starett et Waters (2013)	Diguetia mojavea	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
704	HSP-D1872A4	EF537105	Starett et Waters (2013)	Diguetia mojavea	Partielle	C		Agr. / PhyA	ArachC
705	HSP-D1851A2	EF537138	Starrett et Waters (2013)	Plectreurys tristis	Partielle	C		Agr.	ArachC
706	HSP-D1863B10	EF537139	Starrett et Waters (2013)	Plectreurys tristis	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
707	HSP-D1863B11	EF537140	Starrett et Waters (2013)	Plectreurys tristis	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
708	HSP-D1863B12	EF537141	Starrett et Waters (2013)	Plectreurys tristis	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
709	HSP-D1863A7	EF537135	Starrett et Waters (2013)	Plectreurys tecate	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
710	HSP-D1863A8	EF537136	Starrett et Waters (2013)	Plectreurys conifera	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
711	HSP-D1863A9	EF537137	Starrett et Waters (2013)	Plectreurys conifera	Partielle	C		Agr.	ArachC
712	HSP-D1857A1	EF537128	Starrett et Waters (2013)	Plectreurys tecate	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
713	HSP-D1857A2	EF537129	Starrett et Waters (2013)	Plectreurys conifera	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
714	HSP-D1863B13	EF537142	Starrett et Waters (2013)	Plectreurys tristis	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
715	HSP-D1863A2	EF537130	Starrett et Waters (2013)	Kibramoa guapa	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
716	HSP-D1863A3	EF537131	Starrett et Waters (2013)	Kibramoa guapa	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
717	HSP-D1863A4	EF537132	Starrett et Waters (2013)	Kibramoa guapa	Partielle	C		Agr.	ArachC
718	HSP-D1863A5	EF537133	Starrett et Waters (2013)	Kibramoa guapa	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
719	HSP-D1863A6	EF537134	Starrett et Waters (2013)	Kibramoa guapa	Partielle	C		Agr. / PhyC	ArachC
720	HSP-D1860A2	EF537124	Starrett et Waters (2013)	Pholcus phalangioides	Partielle	C		Agr. / PhyA	ArachC
721	HSP-D1869A2	EF537125	Starrett et Waters (2013)	Pholcus phalangioides	Partielle	C		Agr.	ArachC
	HSP-D1869A3	EF537126	Starrett et Waters (2013)	Pholcus phalangioides	Partielle	C		Agr.	ArachC
723	HSP-D1869A4	EF537127	Starrett et Waters (2013)	Pholcus phalangioides	Partielle	C		Agr. / PhyA	ArachC
724	HSP-D1863A1	EF537123	Starrett et Waters (2013)	Psilochorus sp.	Partielle	C		Agr.	ArachC
725	HSP-D1866A9	EF537121	Starrett et Waters (2013)	Psilochorus sp.	Partielle	C		Agr.	ArachC
726	HSP-D1866B10	EF537122	Starrett et Waters (2013)	Psilochorus sp.	Partielle	C		Agr.	ArachC
727	HSP-D1866A8	EF537119	Starrett et Waters (2013)	Physocyclus sp.	Partielle	C		Agr.	ArachC
728	HSP-D1872B10	EF537120	Starrett et Waters (2013)	Physocyclus sp.	Partielle	C		Agr.	ArachC
729	HSP-D1866B11	GAZS01049111	Bechsgaard (2014)	Acanthoscurria geniculata	Complète	C		Agr. / PhyC	ArachC
730	HSP-D1905B10	AZTN01069412	Wilson et al. (2014)	Limulus polyphemus	Complète	G	INTRON=Free	Agr. / PhyC	MerosC
731	HSP-D1422A1	BAAB01080855	Mita et al. (2015)	Bombyx mori	Partielle	G	INTRON=3+	Agr.	HexapC
732	HSP-D1908B12	KC161300	Liu et al. (2013)	Ericerus pela	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyH	HexapC
733	HSP-C996A1	GAZN02035571	Misof et al. (2016)	Cryptocercus wrighti	Partielle	C		Agr.	HexapC
734	HSP-D1899A4	JPZV01082824	Murali et al. (2014)	Blattella germanica	Complète	G	INTRON=2	Agr.	HexapC
735	HSP-D1953B15	AFFK01019481	Richards et al. (2011)	Strigamia maritima	Complète	G	INTRON=Free	Agr.	MyriaC
736	HSP-D1965B18	KC493626	Li et al. (2014)	Eriocheir sinensis	Complète	C		Agr. / PhyM	RETMal
737	HSP-D1965B19	GARH01034389	Manfrin et al. (2015)	Procambarus clarkii	Complète	C		Agr.	RETMal
738	HSP-D1971A7	NM_167306	Hoskins et al. (2014)	Drosophila melanogaster	Complète	C		Agr. / PhyA / PhyH	RETHex
739	HSP-D1983A5	GARO01000263	Cattonaro (2014)	Echinogammarus veneris	Complète	C		Agr. / PhyM	RETMal
/40	HSP-D1977A7	JX948747	Xi et Ma (2012)	Bombyx mori	Complète	C		Agr. / PhyH	RETHex

## 8 ANNEXES

741	HSP-D1971B11	XM_016051224 NW_015465286	Lowe et Eddy (2016)	Parasteatoda tepidariorum	Complète	C	Agr. / PhyC	RETAra
742	HSP-D2019A1	EU679413	Li et al. (2009)	Tetranychus cinnabarinus	Complète	C	Agr. / PhyC	RETAra
743	HSP-C256A1	GBYW01045688	Bunikis et Soderhall (2015)	Pacifastacus leniusculus	Partielle	C	Agr.	MITMal
744	HSP-D1932B17	GEDF01004455	Theissinger (2016)	Astacus astacus	Complète	C	Agr.	MITMal
745	HSP-D2034A1	GBEV01001505	Tom et al. (2014)	Procambarus clarkii	Complète	C	Agr.	MITMal

### 8 ANNEXES

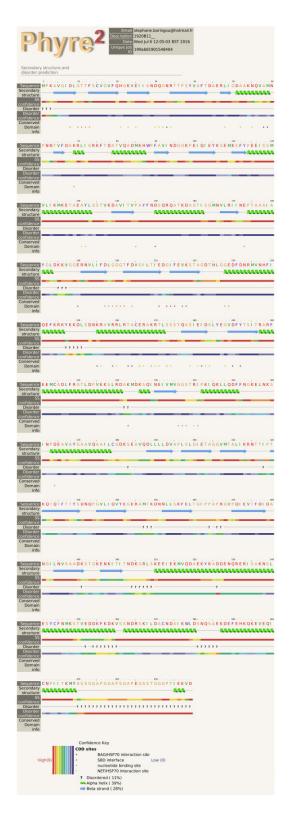
Annexe 6 : Tableau des motifs discriminants pour les différents groupes de HSP70 cytosoliques de malacostracés (A et B), de chélicerates et d'hexapodes (AB et C).

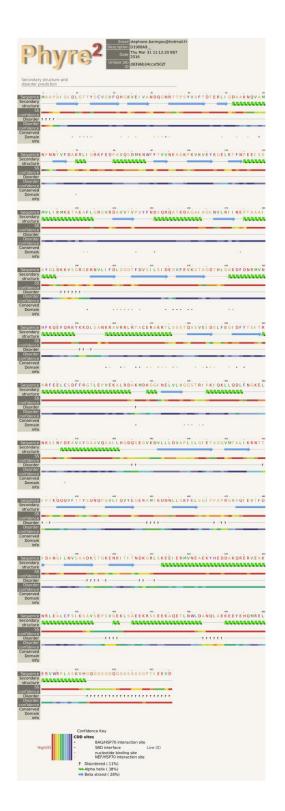
				NBD			Lin	ker	SBD		CTD			
		N	motif 1	motif 2 187-189	motif 3 213//214	motif 4 359	motif 5 382-387	motif 6 388-393	motif 7 543	motif 8 552-557	motif 9 561-575	motif 10 599-602	motif 11 605	motif 12 610 - 640
	Brachyura A1	49	Y	VGG	-	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	EE[ED]KFK	S[ED]EDRNKI[LM]EACN[ED][AT]	QICN	I	GGAP (x2) GGMP (x1-2) GGFP (x1)
	Astacidea A1	8	Y	VGG	±.	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	EE[ED]KFK	SEEDRNKI[LM]EACNDA	QI[IV]CN	I	GGAP (x1) GGMP (x2) GGFP (x1)
	Anomura A1*	2				K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	EEEKFK	SEEDRTKIM[ED]ACNDA	QICN	I	GGAP (x2) GGMP (x2-3) GGFP (x1)
	Dendrobranchiata A1	12	Y	VGG	-	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	EDEKFK	SEEDRNKILETCNET	QVCN	I	GGAP (x1-2) GGMP (x1-2) GGFP (x1)
P70 A	Caridea A1	8	F Y	VGG	-	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	E[DE][DE]KFK	[SP]E[DE]DR[NT]KI[LM]EACNDA	QICN	I	GGAP (x1) GGMP (x1-3) GGFP (x0-2)
cyt-HSP70	Euphausiacea A1	4	F	VGG	e e	K	KSE[AV]VQ	DLLLLDV	Y	ED[DE]KFK	PEEDRTKI[LM]EACNDA	Q[IL]CN	I	GGAP (x1) GGMP (x3-5) GGFP(x1)
3	Astacidea A2	5	Y	VGG	-	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	ED[DE]KFK	S[SG][TE]D[RC]SKILDACN[ED]A	QICN	I	GGAP (x1) GGMP (x2)
	Brachyura A3	16	F	[VI]GG	ш	K	KSEEVQ	DLLLLDV	Y	DD[ED]KFK	PESDR[NT][SA]IL[ED]KCNET	KVCN	I	GGAP (x1) GGMP (x3)
	Anomura A3	1	F	VGG	-	K	TSETVQ	DLLLLDV	Y	EDDKVK	PEAERDQVAQACREC			GGSP (x1) GGFP (x1)
	Euphausiacea A3	2	F	VGG	-	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	EDEKFK	PDSDRQTI[IL]EKCNET	KVCS	I	GGAP (x1) GGMP (x3)
	Amphipoda A4 / AB1	10	T	VGG	-	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	EDDKVK	SE[ED]DRKKIMEACDEA	KVCT	I	GGAG (x2)
	Amphipoda A5 / AB2-AB3	16	S	ADG [TSG]GG GTGAG	F	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	DDVKMK EDDKLK EDEKVK	SEDDRKKIMNACDEA PEEERKKALDACSEA ADGDRKKVADACDDA	KVCA KICS KICA	I	GGAP (x0-2) GGMP (x1-3)
	Brachyura B1a	16	N	AGSGG-[NAE] AGASG V[SGA]SRG	-	K	QSD[AV]VK	D[VL]LLLDV	[LM]	SEPAVA	S[AV]DEKRSIEEK[AV]QE[TI]	QAWR	А	-
_	Astacidea B1	13	N	VGGRG	-	K	QSEGVK	DVLLLDV	L	SEPSV[AG]	[TS]A[DE]EKRS[IV]EEKAQ[EQ]T	QAWR RVWR	A	-3
B	Brachyura B1b	32	N	VGG[RH]G	-	K	QSEGVK	DLLLLDV	L	SEPSVA	SADEKRSIEEKAEQT	Q[ATV]WR	A	GGAP (x0-1)
cyt-HSP70	Dendrobranchiata B1	2	N	TGGKG SVGKA	-	K	QSEGVK QSEAVK	DVLLLDV	L	NESSVA SDTAVA	SADEKRSVEEKADET PSDEKRLVEEKAEET	QVWR	A	-
4S	Caridea B1	1	N	VGLRG	-	K	QSEGVK	DVLLLDV	V	CDPSVA	SADEKRCVEQKAEET	KVWR	A	-
	Anomura B1*	4	N	VG[GR]KG	-	K	QSDTVK	DVLLLDV	L	SEPSVA	SADEKRSIEEKAEQT	QTWR	A	-
1 %	Euphausiacea B2	2	N	TGSTGQG	-	K	QSEG[VA]K	DLLLLDV	L	[GD]DEAV[SC]	TEEEKGSISSQIEQT	SSWS	A	-
`	Caridea B2	3	N	KAGSGTG ASGSAGS	-	K	QSEGVK	DLLLLDV	L	SEEAVS [RS]EEAIA	NDQEKSNVKQLIEQT NE[ED][DE]KDN[MI]KQQ[VL]EET	[GM]SWK	A	-
	Anomura B2	4	N	VG[VI]G[IG]S[KQ]	-	R	QSQAVK	DMLLLDV	L	[SG]EEGVA	TEEER[QK]RMSTQVEET	ATWR	Т	GGAP (x1)
	Astacidea B2	8	N	SVATHNQ	-	R	QSDGVK	DLLLLDV	[LM]	REEGVS	T[QE]EEK[KQ][GSA]VTDLV[ED][HE]T	DHWR	A V	-

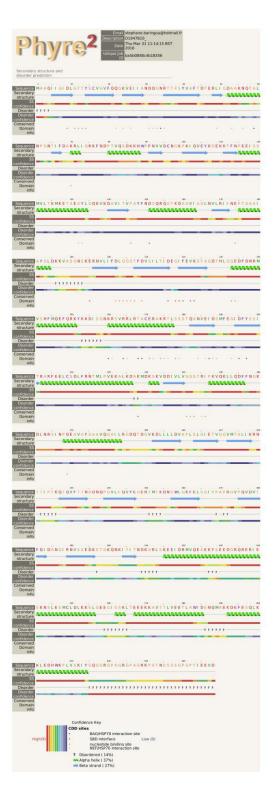
	Too and a some		S	VTG	1				550		PESDROTVLDKCSEA	GVCK		GGAP (x1)
	Branchiopoda AB	5	F	VGG	-	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	EDDKVK	SDA[ED]R[QT]TVLDKCNE[IA]	[KA]VC[NK]	I	GGMP (x2)
			Т	NCGIGGI IVAI			TCELAENTICCI			EDENU EIN	PEGDRKIIMDKCNEI			CCAR(-12)
	Maxillopoda AB	13	N N	KGS[SG][KA]	- 1	K	TSE[AE]V[SG]	DLLLLDV	Y	EDEK[LF]K	EETDRKVI[TN]DKCDEA	[SG][IV]CN	I	GGAP (x1-2)
			IN	KGA[KA]			QHESVS			EDAQLK	S[DE][AS]DRK[TIL]I[TSA][DQ][KT]CD[DE]A	GICS		GGMP (x2-4)
	Branchiopoda AB	3	F	VGG	-	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	EDEK[FL]K	SDADKTTI[LM]DKCNE[IV]	R[VL]CN	V	GGAP (x1)
	Lawidantana AD	12 1	F	G[SG]G GT		K	KSEEVO	DLLLLDV	Y	ED[EA][KN]LK	[TS]D[AS]DKQTILDKCNDT	GICN	,	GGMP (x1-3)
	Lepidoptera AB	12 1	Y	G	-	K	KSEEVQ	DLLLLDV	Y	EDEKVK	SDSERTSIMDKCNEV	NLCN	1	GGAP (x1-2)
	Hemiptera AB	1	F	GHG	-	K	KSEEVQ	DLLLLDV	Y	EDEKLK	TEADKTLILDKCNET	STFN	I	GGFP (x2) GGMP (x2)
	C-1	2	F	VGG		K	KSE[AE] VQ	DLLLLDV	Y	EDEKFK	SDADKTTILDKCNEV	RVCN	V	GGMP (x1-2)
AB	Coleoptera AB	2	Y	ATG	-	K	KSE[AE] VQ	DLLLLDV	Y	EDENLK	SETDKTTIMEKCNEV	NICK	I	GGFP (x0-1)
A	Diptera AB	15	F	AVG		K	KSQEVQ	DLLLLDV	Y	DEDNLK	[AS]DSDRT[TV]I[LM]DKCNET	GVCN		GGAP (x0-1)
0	Приста АВ	13	г	TAG		N.	KSEEVQ	DLLLLDV	1	EDDKLK	TDSDKTL[IV][ML]DKCNDT	SVCN	1	GGMP (x2-3)
cyt-HSP70				GHG				,						GGAP (x0-1)
$\mathbf{S}$	Orthoptera AB	3	F	VSGHG	-	K	KSEEVQ	DLLLLDV	Y	EDEKLK	SDSDKQTILDKCNEV	QICN	I	GGMP (x2)
Η				VSUNU										GGFP (x2)
7-				TT (CT)										GGMP (x3-5)
S	Hymenoptera AB	12	F	TT[ST]	-	K	KSE[EA]VQ	DLLLLDV	Y	EDEK[LI]K	S[AS][ST]DKQ[VT][VI]LDKCN[DE]I	[AG]ICN	V	GGFP (x0-1)
	(5 8			A[VT]G										GGAP (x0-1)
				66. 6			KDEMIK			EECD A DAW	DEED DATA OF THE PROPERTY OF	FILON		GGAP (x1-3)
	Prostigmata AB	6	C F	GGG	-	K	KDETVK	DLLLLDV	Y	EE[PA]NIK	PEEDRKKV[IA]DKV[ED]E[VT]	ELCN	[IV]	GGMP (x1-5)
		2	F	GAG			KDESVQ			EE[PS]S[VA]G	SEDDKKKIMDKVDEV	[DE]VCN		GGFP (x0-1)
	Ixodida AB	4	F	GTG	-	K	KSEQVQ	DLLLLDV	Y	EDEKLK	S[DE][DE]DR[KQ]K[VI]L[ED]KVQET	[QA][IV]CN	[IV]	GGMP (x1) GGFP (x1)
									Y		TDAERKTCVDAIDDA	NLCK	V	GGAP (x1-2)
	Mesostigmata AB	2	F	[AG]QG	-	K	[SQ]SEAVQ	DLLLLDV	F	ED[DE]K[VL]K	SADDLKTVTDSIEDC	KICN	I	GGMP (x1-2)
	Hymenoptera AB	2	F	GRG	-	K	KSEAVQ	DLLLLDV	Y	EDENIKA	AEGDR[NK]LIA[DN]KC[ND]EI	KVCK	F	-
	170			KVTSG							PESEKNSVLERIRET			<u> </u>
	Mesostigmata AB	5	Y	ESDFG	-	K	KSE[AV]VQ	DLLLLDV	Y	DYDKIK	SESDRNSVLSKIRET	QFCR	[VI]	1-1
														•
											SASDKAKVKECCDGT	SEL[SA]		GGMP (x0-2)
	Araneae C	47	N	LKG	S	M	[TS]S[ED][NVS]	DVLLVDV	Y	ES[AV]P-[EDT]	SASDKAKAKDCCERI	AEL[TM]	M	GGMF (x0-2)
											SA[SGA]DKAKVKECC[DE][GS][TIV]	AEL[IM]		GGAF (XU-1)
	Ixodida C	3	N	LKG	S	L	[TA]SE[NA]	DVLLVDV	Y	EEAG	[TS][PS]SDK[DQ][AS]VLDKCK[ED]T	Q[AH]CS	M	-
$\mathcal{C}$											PETDKKTILESCKAV	KECS		GG1 (D (= 0.5)
33,455	Hemiptera C	7	[NA]	LKG	S	L	TSS[AQ]IQ	DVLLVDV	Y	[ED]EAG	PESDKQLV[RH][DE]CQ[AE]A	KKCS	M	GGMP (x0-5)
20											TESE[KR]N[AT][GV]K[KQ]EC[DE]AV	[NK]SCS		GGFP (x0-1)
P		-					QSGKIQ			EQA-[PS][PA]				
IS	Diptera C	11	Α	LKG	S	L	K[DS]EKIQ	DVLLVDV	Y	E[ST]AG	[SD][DE][SA]DK[SN]SVLDKC[NS]ET	[RQ]HCS	M	-
cyt-HSP70	Hemiptera C	1	S	LKG	S	L	TRSAIQ	DVLLVDV	Y	DEAG	PESEKSSCRLECENM	RICA	M	-
X	Blattodea C	2	Α	LKG	S	L	TSSQIQ	DVLLVDV	Y	DEAG	DD[LQ]DKTSVRTQCDNT	KFCS	M	-
၁		-		IV C	C	,		DVILLUDY	37	S[ED][ACQ]G	S[SA][AE]DKET[IV]TRECDSC	[QK]ICS		
	Coleoptera C	5	A	LKG	S	L	T[DS]SKIQ	DVLLVDV	Y	EDA-PA	TEDDKKIIREKCSAA	KDCS	M	-
	Ephemeroptera C	2	A	LKG	S	L	[TK]SSQIQ	DVLLVDV	Y	D[DE]AG	[TS]QADKD[ST]AR[GT]KCDE[AT]	R[AT]CA	M	-
	Lanidantana C	15	Α.	IV C	[SA]	L	[TQ][DH]SKIQ	DVLLVDV	Y	[DE][DE][AS]G	SDADKSTARDACDEA	RVCS	М	GGMP (x0-11)
	Lepidoptera C	15	A	LKG	: INAL						SD[SDQ]DK[TG][AT]AR[RK]ECE[DE]A			: UTUTALE (XU-11)

Annexe 7 : Rapports Phyre2 de prédiction des structures secondaires pour les quatre types de HSP70 recensés chez les Astacus astacus. Les HSP70 étudiées appartiennent aux groupes A1, A2, B









#### 8

Annexe 8 : Niveaux d'induction des gènes de HSP70 répertoriés dans la littérature, en réponse à des stress thermiques. Chaque séquence étudiée est associée à sa classification : HSP70 A ou HSP70 B (tableau A) et HSP70 AB ou HSP70 C (tableau B). Les conditions expérimentales pour chaque type de stress incluent la différence de température appliquée par rapport au témoin, le temps d'exposition et le temps de rétablissement, avant quantification des transcrits par PCR quantitative. Les résultats non significatifs sont annotés NS. Les valeurs d'inductions présentées sont citées ou déduite graphiquement dans les articles correspondants. Les valeurs d'induction suivies des symboles \* et \*\* indiquent des données issues de populations différentes. Abréviations : Haemo. : haemocytes Hépato. : hépatopancréas.

Δ	

	_	Stress thermique Tissu		HS	P70 A		HSP	70 B	_
Espèces	Reference	(T°C / expo. / retab.)	Tissu	Numéro d'accession (annotation)	Classification	Induction	Numéro d'accession (annotation)	Classification	Induction
Chaceon affinis	Mestre et al. (2015)	+ 14°C (1 h / 2 h)	Muscles	KC907347 (hsp70 form 1)	HSP70 A3	NS	KC907348 (hsp70 form 2)	HSP70 B1b	NS
Gammarus pulex	Cottin et al. (2015)	$+ 10^{\circ}$ C $(1 \text{ h} / 4 \text{ h})$	Tous	HG809965 (hsp70 form 1)	HSP70 A6	x 27*/x 3**			
		"	"	HG809966 (hsc70 form 2)	HSP70 A5	NS			
		$+ 13^{\circ}C (1 h / 4 h)$	Tous	HG809965 (hsp70 form 1)	HSP70 A6	x 123*/x 44*	*		
		"	"	HG809966 (hsc70 form 2)	HSP70 A5	NS			
Fenneropenaeus chinensis	Luan et al. (2010)	+10°C (2 h / - )	Cephalot.	AY748350 (hsc70)	HSP70 A1	x 5	FJ167398 (hsp70)	HSP70 B1	x 100
		+10°C (6 h / - )	"	"	"	x 5			x 5
Euphausia crystallorophias	Cascella et al. (2015)	+6°C (3 h/-)	Abdomen	KM067139 (hsp70 form A)	HSP70 A1	NS	KM067142 (hsp70 form E)	HSP70 B2	NS
		"	"	KM067140 (hsp70 form B)	HSP70 A1	x 2,5			
		"	"	KM067141 (hsp70 form C)	HSP70 A3	x 2,5			
Litopenaeus vannamei	Wu et al. (2008)	+10°C (6 h / 1 h)	Branchies	EF495128 (hsc70)	HSP70 A1	x 11			
	Qian et al. (2012)	+10°C (1 h/-)	Hépato.	AY645906 (hsp70)	HSP70 A1	x 9,5			
		"	"	EF495128 (hsc70)	"	x 3,7			
		+10°C (6 h / - )	"	AY645906 (hsp70)	"	x 3,5			
		"	"	EF495128 (hsc70)	"	x 3			
Macrobrachium nipponense	Xiu et al. (2014)	+10°C (12 h / 48 h)	Branchies	DQ660140 (hsc70-1)	HSP70 A1	x 2,2			
		"	"	KC460343 (hsc70-2)	HSP70 A1	x 11,67			
		"	Hépato.	DQ660140 (hsc70-1)	"	négative			
		"	"	KC460343 (hsc70-2)	"	NS			
Palaemonetes varians	Cottin et al. (2010)	+18°C (1 h / 2 h)	Abdomen	FJ875279 (hsc70 form 2)	HSP70 A1	NS	FJ875280 (hsp70 form 1)	HSP70 B2	x 15
Rimicaris exoculata	Cottin et al. (2010)	+20°C (1 h / 2 h)	Abdomen	FJ356149 (hsc70 form 3)	HSP70 A1	NS	DQ534065 (hsp70 form 1)	HSP70 B2	x 373
	` '	"		•			FJ268954 (hsp70 form 2)	HSP70 B2	x 132
Scylla paramamosain	Yang et al. 2013	+11°C (6 h / - )	Haemo.	EU754021 (hsp70)	HSP70 A1	x 23,3			
Scylla serrata	Fu et al. (2013)	+10°C (2 h / - )	Branchies	JQ780845 (hsp70)	HSP70 A1	x 2,5			
-	` '	+15°C (2 h / - )	"	" ' ' '	"	x 4,8			

_		Stress thermique Tis		HS	SP70 AB		HSP70 C		
Espèces	Reference	(T°C / expo. / retab.)	<sup>c</sup> Tissu	Numéro d'accession (annotation)	Classification	Induction	Numéro d'accession (annotation)	Classification	Induction
Panonychus citri	Yang et al. (2012)	+ 16°C (1 h / - )	Tous	GQ495083 (hsp70-1)	HSP70 AB I	NS			
		"	"	GQ495084 (hsp70-2)	HSP70 AB II	x 28,4			
<i>Ericerus pela</i> (♀)	Liu et al. (2014)	+8°C (1 h / - )	Tous	KC161301 (hsc70)	HSP70 AB	NS	KC161300 (hsp70)	HSP70 C	x 145,31
		+14°C (1 h/-)	"	"	"	x 3,5	"	"	x 55
Ericerus pela (♂)	"	+8°C (1 h / - )	Tous	KC161301 (hsc70)	HSP70 AB	NS	KC161300 (hsp70)	HSP70 C	x 1,9
		+14°C (1 h/-)	"	"	"	négative	"	"	x 1,2
Tetranychus cinnabarinus	Li et al. (2009)	+11°C (1 h / 30 min)	Tous	EU679412 (hsp70-1)	HSP70 AB I	x 2			
		"	"	EU679414 (hsp70-3)	HSP70 AB III	x 3			
Tribolium castaneum	Altincicek et al. (200	08) + 11°C (20 min / 16 h)	Tous			•	XM_969349 (hsp68)	HSP70 C	x 3

Annexe 9 : Valorisations des travaux réalisés au cours de la thèse.

#### <u>Publications</u>:

- Baringou S, Rouault J-D, Koken M, Hardivillier Y, Hurtado L, Leignel V. 2016. Diversity of cytosolic HSP70 Heat shock protein from decapods and their phylogenetic placement within Arthropoda. Gene, *in press*. doi: 10.1016/j.gene.2016.06.061
- Leignel V, Stillman JH, Baringou S, Thabet R, Metais I. 2014. Overview on the European green crab Carcinus spp. (Portunidae, Decapoda), one of the most famous marine invaders and ecotoxicological models. Environmental Science and Pollution Research 21:9129–9144. doi: 10.1007/s11356-014-2979-4

#### Communications en congrès :

- « Crustaceans HEAt shock Proteins (CHEAP), a new HSP70 subfamily: Diversity, Evolution and functionality within the arthropods »
  - S. Baringou, J.-D. Rouault, Y. Hardivillier, V. Leignel

**18th Evolutionary Biology Meeting** – Marseille, Septembre 2014 (présentation et poster)

« Diversité des HSP70 cytosoliques chez les crabes hydrothermaux Bythograeidae »
 <u>S. Baringou</u>, J.-D. Rouault, Y. Hardivillier, V. Leignel
 CONNECCT 2015 – Le Mans, Mai 2015 (présentation)

#### Diffusion scientifique:

- « Les crabes ont des super-pouvoirs... »
   <u>S. Baringou</u>, V. Leignel
   **Doctoriales** Le Croisic, Mars 2014 (présentation de poster)
- « Diversité et fonctionnalité de nouveaux types de Heat Shock Protein-70 kDa chez les arthropodes »
  - S. Baringou, J.-D. Rouault, Y. Hardivillier, V. Leignel

Forum Jeune Recherche – Le Mans, Novembre 2014 (présentation de poster)

**Journées Scientifiques de l'école doctorale VENAM** – Le Mans, Décembre 2014 (présentation de poster)

« Quand la science fait voyager : Mission océanographique BioBaz au large des Açores »
 S. Baringou, Y. Hardivillier

Sciences sur le pouce – Le Mans, Mai 2015 (présentation)

FISEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

#### Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene



#### Research paper

# Diversity of cytosolic HSP70 Heat Shock Protein from decapods and their phylogenetic placement within Arthropoda



Stephane Baringou <sup>a,\*</sup>, Jacques-Deric Rouault <sup>b,e</sup>, Marcel Koken <sup>c</sup>, Yann Hardivillier <sup>a</sup>, Luis Hurtado <sup>d</sup>, Vincent Leignel <sup>a</sup>

- <sup>a</sup> Université du Maine, Laboratoire Mer-Molécules-Santé FR-CNRS 3473 IUML, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans, France
- <sup>b</sup> Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR9034, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France
- <sup>c</sup> LABOCEA-CNRS, 29280 Plouzané, France
- d Department of Wildlife and Fisheries, Texas A&M University, Old Heep Building 110E, TAMU College Station, TX 77843-2258, USA
- <sup>e</sup> Université Paris, Sud 11, 91405, Orsay, France

#### ARTICLE INFO

#### Article history: Received 3 February 2016 Received in revised form 25 May 2016 Accepted 29 June 2016 Available online 1 July 2016

Keywords: HSP70 family Molecular evolution Phylogeny Arthropods Crustacea

#### ABSTRACT

The 70 kDa heat shock proteins (HSP70) are considered the most conserved members of the HSP family. These proteins are primordial to the cell, because of their implications in many cellular pathways (e. g., development, immunity) and also because they minimize the effects of multiple stresses (e.g., temperature, pollutants, salinity, radiations). In the cytosol, two ubiquitous HSP70s with either a constitutive (HSC70) or an inducible (HSP70) expression pattern are found in all metazoan species, encoded by 5 or 6 genes (Drosophila melanogaster or yeast and human respectively). The cytosolic HSP70 protein family is considered a major actor in environmental adaptation, and widely used in ecology as an important biomarker of environmental stress. Nevertheless, the diversity of cytosolic HSP70 remains unclear amongst the Athropoda phylum, especially within decapods. Using 122 new and 311 available sequences, we carried out analyses of the overall cytosolic HSP70 diversity in arthropods (with a focus on decapods) and inferred molecular phylogenies. Overall structural and phylogenetic analyses showed a surprisingly high diversity in cytosolic HSP70 and revealed the existence of several unrecognised groups. All crustacean HSP70 sequences present signature motifs and molecular weights characteristic of non-organellar HSP70, with multiple specific substitutions in the protein sequence. The cytosolic HSP70 family in arthropods appears to be constituted of at least three distinct groups (annotated as A, B and C), which comprise several subdivisions, including both constitutive and inducible forms. Group A is constituted by several classes of Arthropods, while group B and C seem to be specific to Malacostraca and Hexapoda/ Chelicerata, respectively. The HSP70 organization appeared much more complex than previously suggested, and far beyond a simple differentiation according to their expression pattern (HSC70 versus HSP70). This study proposes a new classification of cytosolic HSP70 and an evolutionary model of the distinct forms amongst the Arthropoda phylum. The observed differences between HSP70 groups will probably have to be linked to distinct interactions with co-chaperones or other co-factors.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

E-mail addresses: stephane.baringou@univ-lemans.fr (S. Baringou), jacques-deric.rouault@orange.fr (J.-D. Rouault), mhmkoken@gmail.com (M. Koken), yann.hardivillier@univ-lemans.fr (Y. Hardivillier), lhurtado@tamu.edu (L. Hurtado), vincent.leignel@univ-lemans.fr (V. Leignel).

#### 1. Introduction

Heat shock proteins (HSPs) are known as major actors of the heat shock response (Ritossa, 1962; Tissiéres et al., 1974), and as proteins, generally involved in eukaryotic development and stress response (Craig and Schlesinger, 1985; Lindquist, 1986). Many HSPs types have been described and constitute a superfamily of proteins ranging from 15 to 110 kDa. Their functions include mainly the correct folding of newly synthesized or translocated proteins, denatured protein refolding, and aggregate solubilisation (Feder and Hofmann, 1999; Fink, 1999; Lindquist and Craig, 1988).

The 70 kDa heat shock protein (HSP70) is considered one of the most ubiquitous and conserved proteins ever described (Gupta and

Abbreviations: HSP70, heat shock protein 70 kDa; HSC70, cognate heat shock protein 70 kDa; Cyt-HSP70, cytosolic heat shock protein 70 kDa; ER-HSP70, endoplasmic reticulum heat shock protein 70 kDa; HSP90, heat shock protein 90 kDa; NCBI, National Center of Biotechnology Information; NEF, nucleotide exchange factor; gDNA, genomic DNA; cDNA, complementary DNA; PCR, Polymerase Chain Reaction; ML, Maximum Likelihood; MP, Maximum Parsimony; NJ, Neighbour-Joining; NBD, Nucleotide-Binding Domain; SBD, Substrate-Binding Domain; CTD, C-Terminal Domain.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

Singh, 1994). Within eukaryotes, the HSP70 family includes distinct members, located in various cellular compartments (Craig et al., 1993; Karlin and Brocchieri, 1998). The cytosolic, endoplasmic reticulum (ER), mitochondrial and plastid HSP70s share identical signature patterns, but can be discriminated by distinct C-terminal motifs (Boorstein et al., 1994; Rensing and Maier, 1994). Even prokaryotic and eukaryotic HSP70s appear to have evolved from a common ancestor, and have at least 47% amino acid sequence identity (Boorstein et al., 1994).

HSP70s are constituted of an N-terminal ATPase domain (Nucleotide Binding Domain, NBD, 44 kDa), a Substrate Binding Domain (SBD, 18 kDa) and a variable C-Terminal Domain (CTD, 10 kDa) (Kiang and Tsokos, 1998). The interactions of the SBD with the substrate are regulated by the NBD status: the HSP70 ATP hydrolysis activity converts the ATP-bound state to the ADP-bound state. In an ATP-bound state, the SBD substrate affinity is low, with a high association-dissociation rate. At the opposite, the ADP-bound or nucleotide-free state induces high substrate affinity and a low association-dissociation rate (Arakawa et al., 2010; Bukau and Horwich, 1998; Palleros et al., 1991; Swain et al., 2007). HSP70 chaperone activity is regulated through ATPase cycle modulations, by interactions with co-chaperones and Nucleotide Exchange Factors (NEFs) on specific sites, principally located in the NBD and the CTD (Demand et al., 1998; Mayer, 2010). Furthermore, it was recently demonstrated that a conserved fragment of 10-15 amino acids, named interdomain-linker (located between the NBD and the SBD), also appears to be involved in ATPase activity stimulation, chaperone complex stabilization and HSP70 oligomerization (Alderson et al., 2014; Aprile et al., 2013; Swain et al., 2007; Vogel et al., 2006).

Besides being involved in basic cellular processes such as correct protein folding, HSP70s are also implicated in cell proliferation and development, apoptosis, senescence and the immune response (Feder and Hofmann, 1999; Kiang and Tsokos, 1998). These fundamental functions led medical research to consider HSP70s as targets for cancer therapies (Meng et al., 2014; Rodina et al., 2013; Schlecht et al., 2013; Sherman and Gabai, 2015) or for neurodegenerative disease (Abisambra et al., 2011; Fontaine et al., 2015; Lim and Yue, 2015; Manna, 2014).

HSP70s are also considered as major ecological and physiological biomarkers for stress, owing to their involvement in adaptation and survival of organisms to varying environmental conditions (Bedulina et al., 2013; Colson-Proch et al., 2010; De Pomerai, 1996; Franzellitti and Fabbri, 2005; Kelley et al., 2011). Within decapods, overexpression of cytosolic HSP70 genes was observed facing various stressors, such as heat and cold shocks (Fu et al., 2013; Luan et al., 2010; Madeira et al., 2012; Oian et al., 2012; Yang et al., 2013), salinity and pH variations (Fu et al., 2013; Qian et al., 2012; Spees et al., 2002), metal exposure (Luan et al., 2010; Qian et al., 2012) and bacterial challenges (Cui et al., 2010; Xiu et al., 2014; Zhang et al., 2013; Zhou et al., 2010). Nevertheless, different expression profiles of cytosolic HSP70 members led to suspect multiple functions for different members of the subfamily. The cyt-HSP70 multigene family is well known in model organisms, including 6 homologs in human and yeast (Daugaard et al., 2007; Werner-Washburne and Craig, 1989) and 5 genes in Drosophila melanogaster (Bettencourt and Feder, 2001). Basal expression levels of each cyt-HSP70 form vary in different types of tissues (Daugaard et al., 2007) and present distinct sensitivities to heat stress leading to repression or induction of expression (Boorstein et al., 1994; Werner-Washburne and Craig, 1989). In this way, a distinction was made between the inducible HSP70, which in general presents very low basal levels and high stress-induction; and the constitutive HSC70 (heat shock cognate protein), evenly transcribed under normal or stress conditions (Ingolia and Craig, 1982; Krenek et al., 2013).

Within decapods, occasional HSC70 over-expression, however, was also described during environmental stresses (Lo et al., 2004; Qian et al., 2012), but at much lower induction levels (2–8 folds) than the inducible HSP70 (9–100 folds) (Luan et al., 2010). The complexity of

HSC70 and HSP70 discrimination is reinforced by variable tissue-specific modality of expression, depending on the stress (Liu et al., 2004; Lo et al., 2004; Xiu et al., 2014; Yamuna et al., 2000). Although physiological significance of these differences is not well understood, synthesis of HSP/HSC70 may be linked to cellular damages and tissues vulnerability facing to distinct stressors (e. g., temperature, contaminants). Diversity of cytosolic HSP70 was observed within several decapods species (Cottin et al., 2010; Leignel et al., 2007; Liu et al., 2004; Luan et al., 2010) and an especially high complexity was suspected in the brachyuran infra-order (Cui et al., 2010; Leignel et al., 2007). The links between different HSP70 subfamily members, and most importantly, their inducible or constitutive features remain a real point of discussion (Leignel et al., 2007; Liu et al., 2004; Mestre et al., 2015).

In this study, we characterize nucleotide sequences of cytosolic HSP70 from 23 brachyuran (16 families), 5 anomuran and 7 astacidean species to investigate the HSP70 diversity and phylogeny. Screening of the international databases allowed us to also perform several phylogenetic and aggregative analyses within decapods, and extend our classification to the whole arthropod phylum. Our analyses present a new hypothesis for the cytosolic-type HSP70 subfamily organization, based on aggregative methodology and multiple phylogenetical analyses, and propose an evolutionary model amongst the Arthropoda phylum. Biological relevance of the HSP/HSC70 classification is also discussed in view of our results.

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. HSP70 data collection and sequence analyses

#### 2.1.1. International database searches

Nucleotide collection, Whole-genome shotgun contigs (WGS), Expressed sequence tags (EST) and Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) available at NCBI were screened with the BLASTn program. Due to the large quantity of matches and in order to increase the clearness of the results, one to four representative species amongst hexapod and chelicerate orders were retained for phylogenetic analyses within Arthropoda. Sequences used for expression analyses from the literature were preferentially selected. Several preliminary phylogenetic analyses were performed to remove redundant sequences from the same species and appearing grouped together.

#### 2.1.2. Biological materials

In this study HSP70 genes or cDNAs were isolated from a large panel of organisms. The crabs, Carcinus maenas, Necora puber, Pachygrapsus marmoratus and Xantho pilipes were collected in Noirmoutier (GPS: 47.026073, -2.250086) and Saint-Gildas-de-Rhuys (GPS: 47.488567, -2.819185) whereas the anomurans (Galathea squamifera, Galathea strigosa, Munida rugosa and Pisidia longicornis) originated from Saint-*Enogat* (GPS: 48.642000, -2.074227). The crabs, *Cancer antennarius* and Cancer productus were found at Bolinas beach in California (GPS: 37.907478, -122.681650). Several species were also bought in fish shops (Astacidea: Astacus astacus, Enoplometopus debelius, Homarus americanus, Homarus gammarus, Nephrops norvegicus, Procambarus aleni and Procambarus clarkii; Brachyura: Cancer pagurus, Maia squinado, and Perisesarma bidens). Hydrothermal crabs Bythograea thermydron, Cyanagraea praedator and Segonzacia mesatlantica, as well as Chaceon affinis, were collected during the oceanographic campaigns BIOBAZ (36°N, 2013) and HOPE (9 and 13°N, 1999). Fresh samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for genomic DNA (gDNA) or RNA extractions. Samples stored in ethanol were only used for gDNA isolation.

#### 2.1.3. Nucleic acids extractions

Tissues were ground using a sterile pestle and mortar in liquid nitrogen. DNA was isolated from 0.1 to 2 g of tissue (whole animal, muscle or

gill) using a standard phenol-chloroform extraction procedure and stored at 4 °C to avoid frosting-defrosting damage). Total RNA was isolated from 10 to 50 mg of gill tissue with Tri-Reagent® solution (Ambion®) according to the manufacturer's instructions. 1 µg of each RNA sample was treated with the RQ1 RNase-Free DNase kit (Promega®), according to the manufacture's recommendations, to remove a potential gDNA contamination. A total of 0.5 µL of random primers (252.5 µM) and 1 µL of oligo-dT<sub>18N</sub> (100 µM) were added to DNAse-treated total RNA and reverse transcription was performed with the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega®) according to the manufacturer's instructions. Resulting cDNA samples were stored at  $-20\ ^{\circ}$ C.

#### 2.1.4. DNA amplifications, cloning and sequencing

Specific primer pairs for each putative cyt-HSP70 subgroup (Table 1) were deduced from multiple sequence alignments (Genedoc version 2.7, Nicholas et al., 1997). Genomic DNA (gDNA) was PCR amplified using GoTaq® G2 flexi DNA polymerase (Promega®). Reaction mixtures contained dNTPs (0.2 mM), 1.25  $\mu$ M of each primer, and 150 ng of DNA. Amplifications were performed with the following regime: 5′ 94 °C; 35× (45″, 94 °C; 45″, 55 to 66 °C (according to primer sequences); 2′ 30″, 72 °C) and an additional extension step for 5′ at 72 °C. The PCR products were cloned into the pGEM®-T vector (Promega) and transformed into competent *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Positive colonies were identified by a white/blue screen. Extracted plasmids from two clones (Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System, Promega®) were systematically sequenced (Beckman Coulter Genomics, UK) using SP6, T7 and custom primers.

#### 2.1.5. Sequences analyses

HSP70 sequences were translated in silico with the Expasy translate tool (http://web.expasy.org/translate/). Multiple sequence alignment was performed using MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform, Katoh and Standley, 2013) to investigate the presence of the cytosolic HSP70-associated patterns reported in the literature (Rensing and Maier, 1994). Alignment inconsistencies led to the suspicion of the existence of chimeric sequences probably due to a specificity failure of some primers. Therefore, the "uchime\_ref command" from the USEARCH program (Edgar et al., 2011) was launched on our dataset. Chimera detection was based on a reference dataset, which we constituted of well-represented sequences, confirmed with two more clones from two different PCR amplification of long sequences (1500 bp and more), according to their patterns and finding them reproducibly within multiple species. Suspicious sequences were removed from our final dataset. Introns were detected using alignments and in silico translations (http://web.expasy.org/translate/). Secondary structures and 3D conformation of complete HSP70s were predicted using Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0; Kelley et al., 2015).

Table 1
Primers used for cytosolic-HSP70 molecular characterization.
Primers were designed by aligning the cytosolic-HSP70 available in the public databases, based on variable or conserved sequence regions, specific to non-organellar HSP70. Amplifications were obtained by combining different forward and reverse primers.

Direction	Sequences (5'->3')
Forward	GCGAGWCDAARACCTTCAAYC
Forward	CAMGRCASSTGCAGTGGCATTG
Forward	GAAACAGTAATTGGTATTGACCTGGG
Forward	CTGYGAGAGVGCCAAGMGHAC
Forward	ATGKCHAAGGGAGCWGCWGT
Forward	GTGTTGGWGTNTTCCAGCATGS
Forward	TKGGWGGBGARGAYTTYGAC
Reverse	GTACTGYTCRGCCTCRTTSAC
Reverse	CCTCAAGCCTGTTCTTGACTTC
Reverse	TTARTCGACYTCCTCGAYKGTG
Reverse	CCCTCRAASARAGAGTCRATC
	Forward Forward Forward Forward Forward Forward Reverse Reverse Reverse

Models were visualized and analysed with UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

Relevant sequences were named according to their nucleotide length, and introduced into our database to investigate cytosolic-type HSP70 relationships. Expasy tools were used to calculate molecular weights (http://web.expasy.org/compute\_pi/).

#### 2.2. Relationship analyses of cytosolic HSP70 within the arthropods

#### 2.2.1. Phylogenetic analyses

The longest representative HSP70 sequences from each Malacostraca taxon (Amphipoda, Astacidea, Anomura, Brachyura, Caridea, Dendrobranchiata and Euphausiacea) were selected through one-toone alignments, and subsequently used for our phylogenetic analyses. 84 translated sequences ranging from 530 to 560 amino acids (on a total protein length of 640 to 670 amino-acids) were aligned with MAFFT using the default parameters and submitted to the ProtTest 2.4 server (http://darwin.uvigo.es/software/prottest2\_server.html; Abascal et al., 2005) to define the best fit-model of protein evolution. Molecular evolutionary analyses were conducted using four approaches (Bayesian inference, Maximum Likelihood, Maximum Parsimony and Neighbour-Joining). Bayesian inferences were calculated using respectively MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012). Support for Maximum Likelihood trees was calculated using the RAxML server (http://embnet.vital-it.ch/raxml-bb/; Stamatakis et al., 2008), with a bootstraps analysis (100 bootstrap pseudoreplicates); only node values equal to 100 are shown in the tree. Maximum Parsimony and Neighbour-Joining analyses were performed using MEGA, version 6 (Tamura et al., 2013); nodal support was evaluated by nonparametric bootstrap analysis with 1000 replicates (Fig. 1).

A supplementary phylogenetic analysis was made to confirm the placement of cyt-HSP70 classification within Arthropoda (Supplementary Fig. S1). Bayesian inference, Maximum Likelihood, Maximum Parsimony and Neighbour-Joining were performed on 101 representative HSP70 amino acid sequences from each group, as previously defined amongst Malacostraca (Fig. 1), and presented by the aggregative analysis within Arthropoda (Fig. 2).

#### 2.2.2. Aggregative methodology

Larger investigations on cytosolic HSP70 relationships, within the arthropods, required a classification procedure that allows the analysis of a large heterogeneous dataset with variable sequence lengths, located at different positions in the ORF. Therefore, we used the Automatic Classification Program developed by Rouault et al. (2009) based on aggregative methodology.

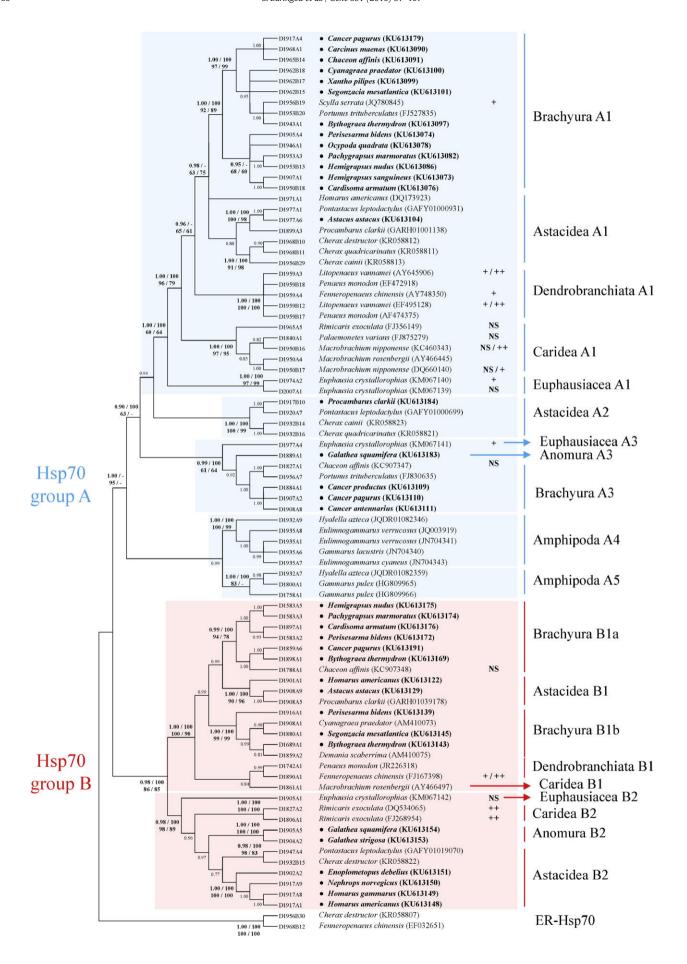
Analysis was performed using 428 cytosolic-HSP70 nucleotide sequences from Chelicerata, Crustacea, and Hexapoda, (with 2 ER-HSP70 and 2 HSP90 out-group sequences) of variable lengths ranging from 327 to 2007 nucleotides. Introns were removed from the sequences prior to analysis. Resulting clusters included full-length HSP70s, as well as shorter fragments, as there is only a marginal impact of sequence length in this type of approach (Fig. 2). Groups were defined according to the results obtained from the phylogenetic analyses.

#### 3. Results and discussion

#### 3.1. Sequence analysis

#### 3.1.1. HSP70 fragments isolated and characterized in this study

122 HSP70s fragments ranging from 634 to 1977 bp were amplified from genomic and complementary DNAs of 35 crustacean's species (23 brachyurans, 7 astacideans and 5 anomurans). Amplicons were located at various positions inside the complete gene sequences, highlighting mostly conserved blocks with few polymorphic loci of 4 to 10 bp and a GC-rich 3' end of highly variable length. USEARCH analyses for chimera detection revealed several chimerical PCR amplifications, probably caused by the high sequence similarities between different HSP70



homologs. For this reason, 16 suspicious sequences have been removed from the sequence dataset used in this study (data not shown). Accession numbers of the sequences isolated in this study are listed in "Supplementary Table S1" with NCBI annotation details (matrix used, intron presence, literature references), with group affiliations, protein lengths and molecular weights of the complete sequences. *In silico*-translated complete sequences are between 635 and 658 amino-acid long with molecular weights ranging from 69.6 to 72 kDa. All sequences present the highly HSP70-specific patterns: signature I: G-I-D-L-G-T-T-[YF]-S, signature II: D-L-G-G-G-T-F-D, signature III: T-V-P-A-Y-F-N, signature IV: N-E-P-T-A-A, signature V: R-A-R-F-E-E-[LM] and the C-terminal end sequence G-P-[TN]-[IV]-E-E-V-D typical for the cytosolic HSP70s (Karlin and Brocchieri, 1998; Rensing and Maier, 1994).

#### 3.1.2. Sequences extracted from the international databases

310 cytosolic HSP70 sequences present in the Genbank™ database, were used to extend our dataset to 162 Arthropoda species: Hexapoda (58 species), Chelicerata (20 species), Crustacea (83 species) and Myriapoda (1 species). Each extracted sequence was carefully screened for the presence of the characteristic cytosolic HSP70 signatures. ER-HSP70 and HSP90 sequences were used as out-groups for the phylogenetic and aggregative analyses. All these accession numbers and annotation details are also presented in "Supplementary Table S1".

#### 3.2. Cytosolic-HSP70 relationship analyses

# 3.2.1. Phylogenetic analyses and classification of cytosolic HSP70 within Malacostraca

Results are summarized in the phylogenetic tree shown in Fig. 1. Analyses revealed two well-defined groups of cytosolic HSP70s (referred as A and B). This division within the cytosolic HSP70s (cyt-HSP70) have been described before in the literature (Cascella et al., 2015; Cui et al., 2010; Leignel et al., 2007; Luan et al., 2010; Ravaux et al., 2007). However, beside these two groups, our results suggest an even more intricate structure of cyt-HSP70 subfamily. Within cyt-HSP70 cluster A, five subgroups can be observed (noted A1 to A5), whereas two distinct subdivisions were detected in cluster B (noted B1 and B2). A third subdivision level was noticed in the brachyurans cytosolic HSP70s (B1a and B1b). Each group is represented by at least three distinct infraorders, except for group A2 (specific for astacideans). Amphipods sequences gathered in two groups named HSP70 A4 and A5, according to the distribution of sequences from Hyalella Azteca and Gammarus sp. Maximum parsimony analyses did not support the HSP70 A5 group, but similar topologies of all phylogenetic trees suggest that these sequences are related to HSP70 A. Nevertheless, phylogenetic analysis and variability of amino acid sequences lead to the suspicion of a more complex evolutionary scenario for HSP70 in amphipods, which may consist of supplementary subdivisions within the HSP70 A5 group, and could be resolved by increasing the datasets.

Thus, our results revealed a completely unexpected presence of four cyt-HSP70 subtypes within the Astacidea and Brachyura, three in Caridea and Euphausiacea, and at least two in Amphipoda and Dendrobranchiata.

# 3.2.2. Aggregative and phylogenetic analyses of cytosolic HSP70 within the Arthropoda

In order to confirm these cyt-HSP70 affiliations and extend the analysis to the whole arthropods phylum, aggregative methods were

performed on our nucleotide dataset. Results are presented in Fig. 2 and the sequence-list in "Supplementary Table S1". The aggregative method approach confirmed the phylogenetic analysis within Malacostraca, suggesting two major cyt-HSP70 groups: A and B, each containing several subdivisions. The Malacostraca cyt-HSP70 group A is well delimited, in contrast to group B that is split in 2 parts. Branchiopoda HSP70s are separated in 2 groups (both annotated A/B), each including sequences from Daphnia sp., whereas the 2 subdivisions of sequences from maxillopods comprising distinct orders and could be explained by the distance between organisms. Amongst the other Arthropoda subphyla, a third well-delimited group, annotated as group C, gathers only HSP70 sequences from the chelicerates and hexapods. Other sequences from these two subphyla are also present amongst the A and B form of crustacean sequences (named HSP70 A/B). Complementary phylogenetic analyses (Supplementary Fig. S1) confirmed the aggregative results, with well-defined HSP70 form A and B for Malacostraca and a form C clustering sequences from chelicerates and hexapods. However, the A/B group remains ambiguous with no clear relation with either of HSP70 A or HSP70 B, observed within Malacostraca. These results suggest the hypothesis that HSP70 group A and B may have appeared after emergence of Malacostraca, and could derive from the same common HSP70 ancestor as the A/B group. The HSP70 group C is totally absent from Malacostraca and seems to have been lost before their emergence.

# 3.3. Comparison and discrimination determinants of different cytosolic-HSP70 forms

#### 3.3.1. Intron characteristics

The cyt-HSP70 sequence details are presented in "Supplementary Table S1". A single intron can only be found in the HSP70 genes of form B1 in Decapoda, located around the nucleotide 174 to 180 from the ATG; whereas HSP70 form A and B2 seem to be intron-free. Amphipod HSP70 genes appear also intron-free. The relative lack of genomic data in Caridea and Euphausiacea did not allow any general conclusions. Genomic sequences from Branchiopoda and different orders within the Chelicerata and Hexapoda phyla present multiple introns (until 7) at various locations. However, no clear correlation was found between these forms, with or without intron, and HSP70 classification. In conclusion, intron presence in HSP70 genes seems particular to the B1 group in Anomura, Astacidea and Brachyura, and absence of an intron does not seem a valid criterion for HSP70 classification.

#### 3.3.2. Protein sequence comparison

Complete cyt-Hsp70 sequences from our data collection present ORF lengths ranging from 1869 to 2031 nucleotides, corresponding to translated sequences of 623 to 677 amino acids and calculated molecular weights of 68.2 to 73.6 kDa (theoretical molecular weight, average). The rather variable length of the C-terminal region explains these differences. Comparison of ORFs helps HSP70 classification, and suggests that short sequences from anomurans (unsuitable for phylogenetical analyses) may belong to the cyt-HSP70 A1 and B1 group. Distinctive features in each of the HSP70 forms are reported in supplementary data (Table S2). Most discriminating patterns are located in the C-Terminal Domain (CTD), a few others in the Nucleotide Binding Domain (NBD) and a single one in the Substrate Binding Domain (SBD) that seems to be highly conserved between the different cyt-HSP70 groups (Fig. 3). Four major amino acid variations can be observed in the discriminating patterns: presence/absence of amino acids (motifs 2 and 3), significant

Fig. 1. Phylogenetic relationships between the Malacostraca cytosolic-HSP70 proteins. Analyses were performed on 84 translated-sequences of 530 to 560 amino-acid length, including the C-terminal region, with four statistical methods. Phylogenetic tree was rooted using Endoplasmic Reticulum HSP70 (ER-HSP70) sequences. The Jones-Taylor-Thornton model was defined as the best-fitting, for our dataset. Node support values for Bayesian inference, Maximum Likelihood, Neighbour-Joining and Maximum Parsimony analyses are indicated between brackets. The phylogenetic tree was based on Bayesian inference, calculated with 3,000,000 generations until the standard deviation of split frequencies was below 0.01. Results were consolidated by Neighbour-joining and Maximum Parsimony analyses (1000 bootstrap replicates), only node values higher than 60 are presented. Sequences from this study were bold and highlighted with the symbol • Distinct cyt-HSP70 forms were numbered and boxed according to the corresponding groups, A (blue) and B (red). Heat stress induction-fold values are mapped, according to Table 2, into three categories: NS (statistically not significant changes), \* (inferior to 9-fold induction) and \*\* (superior to 9-fold induction).

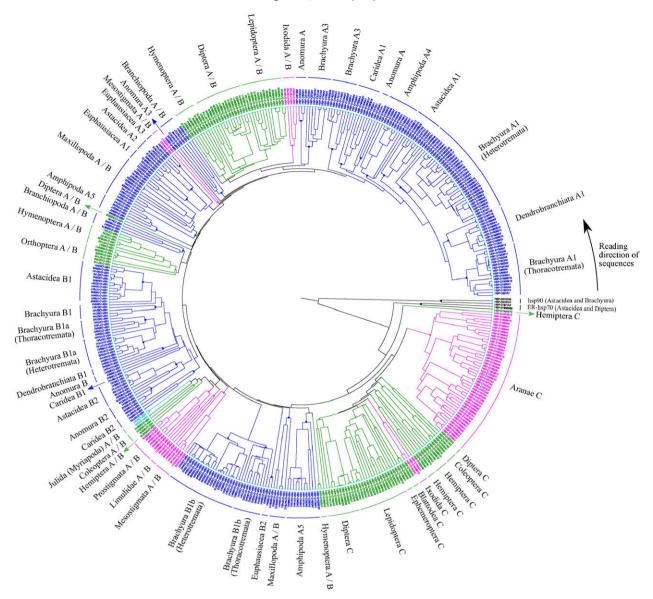


Fig. 2. Arthropod cytosolic-HSP70s classification using aggregative methodology. Analysis was performed on 426 sequences (327 to 2010 nucleotides in length). Sequences of each major subphylum are represented in different colours: Crustacea (blue), Chelicerata (pink), Hexapoda (green) and Myriapoda (cyan). Resulting sequence order can be read as a trigonometric circle, beginning in the middle of the right part of the rose (see also supplementary Table S1). ER-HSP70 and HSP90 coding sequences were included in the analysis, to confirm HSP family relationships. Groups were annotated according to the phylogenetic analysis results. Ambiguous sequences of A and B groups are annotated A / B.

residue changes (aromatic to small, or modification of steric hindrance) (motifs 1, 7, 10 and 11), different charge repartitions (motifs 4, 5, 8 and 9), or presence/absence of tetrapeptide patterns GGAP, GGMP or GGFP (motifs 12). The leucine-rich pattern in the interdomain-linker, annotated as motif 6, presents an apparently slight residue change from leucine to valine, but could still be relevant due to the typically extreme conservation of this fragment. Discrimination of cyt-HSP70 A and B group sequences can be done in the region from amino acid 100 to 200, in the NBD and SBD with motif 1, 2 and 7, respectively. Motif 1 and 7 contain an aromatic residue in the HSP70 A group, whereas HSP70 B presents an asparagine (motif 1) or a leucine (motif 7) at the same position. The motif 2 in the NBD has an insertion of 2 amino acids (including a positively charge residue) in HSP70 B1, and 4 variable amino acids in the HSP70 B2 group. The HSP70 group A and B can also be discriminated through the interdomain-linker and the CTD: motifs 5, 9 and 10 present distinct charge repartitions in each HSP70 group, whereas motif 8 presents a functional significant hyper-charged run (Karlin and Brocchieri, 1998) in HSP70 A, and mostly small neutral residues in the HSP70 B group. One of the more discriminating patterns found between HSP70 group A and B is the (GGXP)<sub>n</sub> motif, which is repeated 2 to 6 times in HSP70 A1, A2 and A3, and totally lacking in a large majority of sequences belonging to HSP70 B group. Comparison of sequences from HSP70 A/B and HSP70 C group from Chelicerata and Hexapoda revealed other discriminating motifs. The HSP70 C group presents an insertion of a serine (motif 2) and a change of the positively charged lysine to a neutral leucine (motif 3) or a change of valine/leucine to methionine (motif 11) in HSP70 A/B and HSP70 C respectively. According to motifs 1, 8 and 12, sequences from the HSP70 A/B share common features with HSP70 A group, whereas HSP70 C features seem to be related to the HSP70 B group. These results suggest the hypothesis of a convergent evolution of HSP70 sequences toward two specific structures, as previously formulated in bacterial and yeast models (Karlin and Brocchieri, 1998; Krenek et al., 2013).

The NBD surface and the CTD are known as binding regions for a wide range of co-chaperones which modulate HSP70 activity (Arakawa et al., 2010; Brehmer et al., 2001; Demand et al., 1998). The

# Nucleotide-Binding Domain (NBD) Substrate-Binding Domain (SBD) Linker C-Terminal Domain (CTD)

>D1917B10 KU613184

MPKAVGIDLGTTFSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDAERLIGDAAKNQVAMNPNNTVFDAKRLIGRKFNDASVQADMK
HWPFTVISDGGKPKIQIEYKGETKSFYPEEISSMVLIKMKETAEAYLGSTVKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGMNVLRIIN
EPTAAAIAYGLDKKVGGERNVFIFDLGGGTFDVSILPIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVTHFIQEFKRKYKKDMSDNKRAV
RRLRTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRARFEEMCADLFRGALDPVEKSLRDAKMDKSQINEIVMVGGSTRIPKI
QKLLQDFFNGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILCGDKSEAVQDLLLLDVAPLSLGIETAGGVMTALIKRNTTIPTKQTQTFTTYS
DNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVSAADKSTGKENKITITNDKGRLSKEEIEKM
VQDAEKYKADDENQRERIAAKNSLESYCFNMKSTVEDEKFKDKVSSTDRSKILDACNEAIKWLDSNQSAEKDEFEHKQKEVEQICN
PIITKMYASSGGAPGAPGGAPEGASTGGGPTIEEVD

Fig. 3. 3-Dimensional representation of cytosolic-HSP70 A-2, from *Procambarus clarkii* (KU613184), with associated sequence. 3-D model was constructed with Phyre2 and visualized with the UCSF chimera program. Colours are attributed for the different domains: NBD (blue), Linker (yellow), SBD (green) and CTD (magenta). Discriminating patterns are highlighted in red and indicated with stars.

NBD binds Nucleotide Exchange Factors (NEFs) that are involved in the ATP hydrolysis activity (Arakawa et al., 2010; Mayer, 2010; Palleros et al., 1991), whereas the CTD harbours binding sites for co-chaperones involved in HSP70-complex stability and oligomerization (Aprile et al., 2013; Demand et al., 1998). In this way, the (GGXP)<sub>n</sub> motif, is suspected to be a binding-site for the Hip-cofactor (Demand et al., 1998; Nollen et al., 2001; Prapapanich et al., 1998). The interdomain-linker ensures two distinct roles: it binds the NBD to stimulate ATPase activity, and is involved in HSP70 oligomerization and co-chaperone binding, to stabilize the substrate in the chaperone complex (Alderson et al., 2014; Aprile et al., 2013; Kumar et al., 2011; Swain et al., 2007; Vogel et al., 2006).

3.3.3. Discussion of the correlation between phylogenetic position and the absence/presence of induction capacity

The relationship between the different HSP70 subgroups that we define in this study was examined in light of their constitutive (HSC70) or inducible (HSP70) expression reported in the literature and summarized in Table 2 and Fig. 1. The assignment of a gene/cDNA/protein to either the HSC70 or HSP70 "group" appears to be often rather subjective. Some authors support a relation between expression pattern and some structure specificities (Liu et al., 2004; Luan et al., 2010; Qian et al., 2012; Ravaux et al., 2007), which they claim can be used for an *a priori* annotation (Mestre et al., 2015), whereas others remain sceptical about such a correlation (Bedulina et al., 2013; Cui et al., 2010; Leignel et al., 2007; Rhee et al., 2009).

In Malacostraca, the HSC70-annotated sequences isolated from shrimps (*Palaemonetes varians* and *Rimicaris exoculata*) and prawn (*Fenneropenaeus chinensis*), showed a constitutive expression pattern and were all clustered into the HSP70 A1 group. The HSP70-annotated sequences from the same species were falling into our HSP70 groups

B1 (F. chinensis) and B2 (P. varians, R. exoculata), and showed a high and significant induction after heat shock (Cottin et al., 2010; Luan et al., 2010). However, HSP70 A1 also include heat-inducible sequences from the shrimp Litopennaeus vannamei, the prawn Macrobrachium nippponense, and the crab Scylla paramamosain, with 9.5 to 23.3-fold induction, compared to their respective control group (Qian et al., 2012; Xiu et al., 2014; Yang et al., 2013). In the same way, sequences gathered in HSP70 B1 and B2 isolated from crab, Chaceon affinis, and the krill, Euphausia crystallorophias, do not present significant heat-inducible profiles (Cascella et al., 2015; Mestre et al., 2015). Consequently, correlations between HSP70 sequence similarity and their expression features could lead to mistakes or annotation inconsistencies. Several debatable suggestions have been found in the literature: 11 to 12-fold induced genes are assigned to the constitutive form (HSC70) (Wu et al., 2008; Xiu et al., 2014), whereas genes showing no significant induction are assigned to the inducible forms (HSP70) (Mestre et al., 2015) (Table 2A).

No obvious HSC70 or HSP70 features could be discerned in either HSP70 group A/B or C in chelicerates or hexapods. For example, studies on the red mite *Panonychus citri* revealed that two HSP70 forms that gathered both in the same A/B group, but present either a constitutive or an inducible expression profile facing heat shock (Yang et al., 2012). In the HSP70 C group, hexapods sequences also showed variable expression profiles after heat stress: constitutive in *Tribolium castaneum* (Liu et al., 2014) and inducible in *Plutella xylostella* (Zhang et al., 2015). Conversely, HSC70 and HSP70 sequences from the scale insect *Ericerus pela*, gathered in the A/B and C groups respectively, and present very variable gene expression profiles: with a high over-expression in females (55 to 145-fold) but only a slight induction in males (Liu et al., 2014) (Table 2B).

According to the literature, the HSP70 gene response closely depends on the type of tissue analysed (Liu et al., 2004; Wu et al., 2008;

Table 2
Gene induction data of cytosolic hsp70 in response to heat shocks. Expression profiles were obtained by quantitative PCR experiments and stress inductions are presented as relative over-expression, compared to the control condition. Induction-fold values were reported from the text when possible or graphically deduced (NS: statistically not significant change). Heat shock temperature, time of exposure, time of recovery and tissue analysed, have been reported for each experiment. GenBank accession numbers were associated with sequence annotation (HSP70 or HSC70) and group classification. HSP70 forms considered as heat inducible in the literature appear in red. Sequences from Malacostraca gathered in HSP70 A and B (Table 2A) and sequences from chelicerates and hexapods belong to HSP70 A/B and C (Table 2B).

Species	Reference	Heat shock	Tissue	HSP	70 A sequences			HSP70 B sequences		
		(expo./recov.)			ession number notation)	Classification	on Induction	Accession number (annotation)	Classification	Induction
Palaemonetes varians Rimicaris exoculata	Cottin et al. (2010) Cottin et al. (2010)	+18 °C (1 h/2 h) +20 °C (1 h/2 h)	Abdomen Abdomen	3	75279 (hsc70 form 2) 66149 (hsc70 form 3)	HSP70 A1 HSP70 A1	NS NS	FJ875280 (hsp70 form 1) DQ534065 (hsp70 form 1) FJ268954 (hsp70 form 2)	HSP70 B2 HSP70 B2 HSP70 B2	15-fold 373-fold 132-fold
Macrobrachium nipponen	Xiu et al. (2014)	+10 °C (12 h/48 h)	Gill " Hepatopan	KC4 icreas DQ6	660140 (hsc70-1) 660343 (hsc70-2) 660140 (hsc70-1) 660343 (hsc70-2)	HSP70 A1 HSP70 A1 "	2.2-fold 11.67-fold Down regulat NS			
Litopenaeus vannamei	Wu et al. (2008) Qian et al. (2012)	+ 10 °C (6 h/1 h) + 10 °C (1 h/none) " + 10 °C (6 h/none)	Gill Hepatopan "	EF49 AY6 EF49 AY6	95128 (hsc70) 45906 (hsp70) 95128 (hsc70) 45906 (hsp70) 95128 (hsc70)	HSP70 A1 HSP70 A1 "	11-fold 9.5-fold 3.7-fold ~3.5-fold ~3-fold			
Fenneropenaeus chinensis	Luan et al. (2010)	+10 °C (2 h/none) +10 °C (6 h/6 h)	Cephalotho		748350 (hsc70)	HSP70 A1	~5-fold ~5-fold	FJ167398 (hsp70)	HSP70 B1	~100-fold ~4-fold
Scylla serrata	Fu et al. (2013)	+10 °C (2 h/none) +15 °C (2 h/none)	Gill "	JQ78 "	80845 (hsp70)	HSP70 A1	~2.5-fold ~4.8-fold			
Scylla paramamosain Chaceon affinis Euphausia crystallorophia	Yang et al., 2013 Mestre et al. (2015) SC Cascella et al. (2015)	. , ,	Haemocyte Muscle Abdomen "	KC9 KM0 KM0	754021 (hsp70) 107347 (hsp70 form 1) 1067139 (hsp70 form A 1067140 (hsp70 form B 1067141 (hsp70 form C	HSP70 A1 HSP70 A1	23.3-fold NS NS ~2.5-fold ~2.5-fold	KC907348 (hsp70 form 2) KM067142 (hsp70 form E)	HSP70 B1b HSP70 B2	NS NS
Species	Reference	Heat shock (expo./recov.)	Tissue	HSP70 A / B s	sequences			HSP70 C sequences		
				Accession nu	ımber (annotation)	Classification	Induction	Accession number (annotation)	Classification	Induction
Panonychus citri	Yang et al. (2012)	+16 °C (1 h/none)	Whole	GQ495083 (1 GQ495084 (1		HSP70 A /B	NS 28.4-fold			
Ericerus pela (female)	Liu et al. (2014)	+ 8 °C (1 h/None) + 14 °C (1 h/none)	Whole	KC161301 (h		HSP70 A /B	NS ~3.5-fold	KC161300 (hsp70)	HSP70 C	145.31-fold ~55-fold
Ericerus pela (male)	Liu et al. (2014)	+ 8 °C (1 h/none) + 14 °C (1 h/none)	Whole	KC161301 (h	ısc70)	HSP70 A /B	NS Down regulation	KC161300 (hsp70)	HSP70 C	~1.9-fold ~1.2-fold
Tribolium castaneum	Altincicek et al. (2008)	+ 11 °C (20 min/16 h)	Whole					XM_969349 (hsp68)	HSP70 C	~3-fold

Xiu et al., 2014), the populations (Cottin et al., 2015), or between male and female within the same species (Liu et al., 2014). Furthermore, induction of HSP70s is tightly connected to the stress type, with distinct expression patterns in response to heat-shock, bacterial challenges (Altincicek et al., 2008; Yang et al., 2013), metal exposure (Luan et al., 2010; Qian et al., 2012), or osmotic stress (Fu et al., 2013; Yang et al., 2013); and in function of exposure time and recovery period (Liu et al., 2014; Luan et al., 2010; Qian et al., 2012).

#### 4. Conclusions

This study presents 122 new HSP70 sequences from 35 decapods species. Comprehensive analyses of all these arthropod HSP70s (based on 432 sequences) highlight a thus far unsuspected diversity of the cytosolic-HSP70 isoforms (A, B and C groups). We demonstrate the existence of, at least, four paralogous cyt-HSP70s in astacideans, brachyurans, and probably the anomurans. The cyt-HSP70 groups defined in this study do not seem to be directly correlated to any ecological feature. The organism's adaptation to stressful and variable environment may be more related to the level plasticity in the expression response of the gene (Papot et al., 2016).

According to our knowledge, HSP70 sequences in the B1 group are the only one to harbour a single intron. The lack of genomic data for Caridea and Dendrobranchiata did not allow us to draw conclusions about intron characteristics for the cyt-HSP70 types in these groups (Supplementary Table S1). The cyt-HSP70 A, B and C groups can be discriminated through eleven amino acid motifs, and the presence or absence of GGXP repeats (Supplementary Table S2). These differences appear to involve distinct co-chaperone interactions (Brehmer et al., 2001; Demand et al., 1998; Nollen et al., 2001), and may influence chaperone complex stability (Aprile et al., 2013; Swain et al., 2007), rather than directly regulate inducible or constitutive expression.

Indeed, the cyt-HSP70 classification proposed in our study is not at all consistent with the constitutive or inducible features detected for these genes. Therefore *a priori* annotation only based on protein structural features is clearly not possible, and should thus be avoided (Chuang et al., 2007; Mestre et al., 2015; Qian et al., 2012; Wu et al., 2008; Xiu et al., 2014). The differential expression of HSP70 genes is thus probably regulated through promoter elements like transcription factor recognition sites (Heat Shock Element, CCAT box: (Bienz, 1986; Chuang et al., 2007; Zhao et al., 2013)), AT richness (Chen et al., 2011) or transposable element insertion (Haney and Feder, 2009).

The existence of HSP70 A and B forms was clearly demonstrated in the Malacostraca class, but whereas this distinction was not quite possible in the other arthropods (HSP70 A/B group). Thus, HSP70 forms belonging to A and B groups have probably resulted from several duplication events of an ancestral gene, common to the HSP70 A/B group. The last duplication seems to have occurred on the cyt-HSP70 B1 gene, during the Brachyura emergence (Porter et al., 2005; Tsang et al., 2014), leading to B1a and B1b formation (Fig. 1). None of HSP70 C forms was found within the Malacostraca and this led to the hypothesis of a putative loss of this form before the formation of the Multicrustacea clade (Oakley et al., 2013; Regier et al., 2010; Shen et al., 2013). The classification supported in this study provides new insights in HSP70 organization in Arthropoda, and more particularly in Malacostraca. Regarding to these results, further investigations could improve understandings about molecular adaptation process, facing to environment stressors.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.061.

#### Acknowledgements

This work was supported by a doctoral grant provided by the French Ministry of Higher Education and Research. The authors thank François Lallier, chief scientist of the HOPE (9 and 13°N, 1999) and the BIOBAZ

(36°N, 2013) cruises and Richard Cosson for allowing us to get samples of several hydrothermal crustaceans. We express thanks to the captain and crew of the R/V *Pourquoi pas*? and especially the *Victor 6000* ROV team (*Remotely Operated Vehicle*) for their assistance in this work.

#### References

- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformation Oxf. England 21, 2104–2105. http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti263.
- Abisambra, J.F., Jinwal, U.K., Jones, J.R., Blair, L.J., Koren, J., Dickey, C.A., 2011. Exploiting the diversity of the heat-shock protein family for primary and secondary tauopathy therapeutics. Curr. Neuropharmacol. 9, 623–631. http://dx.doi.org/10.2174/157015911798376226
- Alderson, T.R., Kim, J.H., Cai, K., Frederick, R.O., Tonelli, M., Markley, J.L., 2014. The specialized Hsp70 (HscA) interdomain linker binds to its nucleotide-binding domain and stimulates ATP hydrolysis in both *cis* and *trans* configurations. Biochemistry (Mosc) 53, 7148–7159. http://dx.doi.org/10.1021/bi5010552.
- Altincicek, B., Knorr, E., Vilcinskas, A., 2008. Beetle immunity: identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. Dev. Comp. Immunol. 32, 585–595. http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2007.09.005.
- Aprile, F.A., Dhulesia, A., Stengel, F., Roodveldt, C., Benesch, J.L.P., Tortora, P., Robinson, C.V., Salvatella, X., Dobson, C.M., Cremades, N., 2013. Hsp70 oligomerization is mediated by an interaction between the interdomain linker and the substrate-binding domain. PLoS One 8, e67961. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067961.
- Arakawa, A., Handa, N., Ohsawa, N., Shida, M., Kigawa, T., Hayashi, F., Shirouzu, M., Yokoyama, S., 2010. The C-terminal BAG domain of BAG5 induces conformational changes of the Hsp70 nucleotide-binding domain for ADP-ATP exchange. Structure 18, 309–319. http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2010.01.004.
- Bedulina, D.S., Evgen'ev, M.B., Timofeyev, M.A., Protopopova, M.V., Garbuz, D.G., Pavlichenko, V.V., Luckenbach, T., Shatilina, Z.M., Axenov-Gribanov, D.V., Gurkov, A.N., Sokolova, I.M., Zatsepina, O.G., 2013. Expression patterns and organization of the hsp70 genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (Eulimogammarus cyaneus and E. verrucosus) from Lake Baikal. Mol. Ecol. 22, 1416–1430. http://dx.doi.org/10.1111/mec.12136.
- Bettencourt, B.R., Feder, M.E., 2001. Hsp70 duplication in the *Drosophila melanogaster* species group: how and when did two become five? Mol. Biol. Evol. 18, 1272–1282.
- Bienz, M., 1986. A CCAAT box confers cell-type-specific regulation on the Xenopus hsp70 gene in oocytes. Cell 46, 1037–1042. http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(86)90703-8.
- Boorstein, W.R., Ziegelhoffer, T., Craig, E.A., 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. J. Mol. Evol. 38, 1–17. http://dx.doi.org/10.1007/BF00175490.
- Brehmer, D., Rüdiger, S., Gässler, C.S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, M.P., Bukau, B., 2001. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. Nat. Struct. Mol. Biol. 8, 427–432. http://dx.doi.org/10.1038/87588.
- Bukau, B., Horwich, A.L., 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 92, 351–366. http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80928-9.
- Cascella, K., Jollivet, D., Papot, C., Léger, N., Corre, E., Ravaux, J., Clark, M.S., Toullec, J.-Y., 2015. Diversification, evolution and sub-functionalization of 70 kDa heat-shock proteins in two sister species of Antarctic krill: differences in thermal habitats, responses and implications under climate change. PLoS One 10, e0121642. http://dx.doi.org/10. 1371/journal.pone.0121642.
- Chen, B., Jia, T., Ma, R., Zhang, B., Kang, L., 2011. Evolution of hsp70 gene expression: a role for changes in AT-richness within promoters. PLoS One 6, e20308. http://dx.doi.org/ 10.1371/journal.pone.0020308.
- Chuang, K.-H., Ho, S.-H., Song, Y.-L., 2007. Cloning and expression analysis of heat shock cognate 70 gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Gene 405, 10–18. http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2007.08.016.
- Colson-Proch, C., Morales, A., Hervant, F., Konecny, L., Moulin, C., Douady, C.J., 2010. First cellular approach of the effects of global warming on groundwater organisms: a study of the HSP70 gene expression. Cell Stress Chaperones 15, 259–270. http://dx. doi.org/10.1007/s12192-009-0139-4.
- Cottin, D., Shillito, B., Chertemps, T., Thatje, S., Léger, N., Ravaux, J., 2010. Comparison of heat-shock responses between the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* and the related coastal shrimp *Palaemonetes varians*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 393, 9–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2010.06.008.
- Cottin, D., Foucreau, N., Hervant, F., Piscart, C., 2015. Differential regulation of hsp70 genes in the freshwater key species *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) exposed to thermal stress: effects of latitude and ontogeny. J. Comp. Physiol. B. 185, 303–313. http://dx.doi.org/10.1007/s00360-014-0885-1.
- Craig, E.A., Schlesinger, M.J., 1985. The heat shock response. CRC Crit. Rev. Biochem. 18, 239–280. http://dx.doi.org/10.3109/10409238509085135.
- Craig, E.A., Gambill, B.D., Nelson, R.J., 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. Microbiol. Rev. 57, 402–414.
- Cui, Z., Liu, Y., Luan, W., Li, Q., Wu, D., Wang, S., 2010. Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70 gene in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). Fish Shellfish Immunol. 28, 56–64. http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.09.018.
- Daugaard, M., Rohde, M., Jäättelä, M., 2007. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. FEBS Lett. 581, 3702–3710. http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.039.
- De Pomerai, D.I., 1996. Review: heat-shock proteins as biomarkers of pollution. Hum. Exp. Toxicol. 15, 279–285.
- Demand, J., Lüders, J., Höhfeld, J., 1998. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. Mol. Cell. Biol. 18, 2023–2028. http://dx.doi.org/10.1128/MCB.18.4.2023.

- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformation Oxf. England 27, 2194–2200. http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. 61, 243–282. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243.
- Fink, A.L., 1999. Chaperone-mediated protein folding. Physiol. Rev. 79, 425-449.
- Fontaine, S.N., Rauch, J.N., Nordhues, B.A., Assimon, V.A., Stothert, A.R., Jinwal, U.K., Sabbagh, J.J., Chang, L., Stevens, S.M., Zuiderweg, E.R.P., Gestwicki, J.E., Dickey, C.A., 2015. Isoform-selective genetic inhibition of constitutive cytosolic Hsp70 activity promotes client tau degradation using an altered co-chaperone complement. J. Biol. Chem. 290, 13115–13127. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.637595.
- Franzellitti, S., Fabbri, E., 2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 1157–1163. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.244.
- Fu, W., Zhang, F., Liao, M., Liu, M., Zheng, B., Yang, H., Zhong, M., 2013. Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic heat shock protein 70 gene from mud crab Scylla serrata. Fish Shellfish Immunol. 34, 1306–1314. http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi. 2013.07.027
- Gupta, R.S., Singh, B., 1994. Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. Curr. Biol. 4, 1104–1114. http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00249-9.
- Haney, R.A., Feder, M.E., 2009. Contrasting patterns of transposable element insertions in *Drosophila* heat-shock promoters. PLoS One 4, e8486. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008486.
- Ingolia, T.D., Craig, E.A., 1982. *Drosophila* gene related to the major heat shock-induced gene is transcribed at normal temperatures and not induced by heat shock. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 525–529.
- Karlin, S., Brocchieri, L., 1998. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. J. Mol. Evol. 47, 565–577. http://dx.doi.org/10.1007/PL00006413.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 30, 772–780. http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst010.
- Kelley, A.L., de Rivera, C.E., Buckley, B.A., 2011. Intraspecific variation in thermotolerance and morphology of the invasive European green crab, *Carcinus maenas*, on the west coast of North America. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 409, 70–78. http://dx.doi.org/10. 1016/j.jembe.2011.08.005.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat. Protoc. 10, 845–858. http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.053.
- Kiang, J.G., Tsokos, G.C., 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. Pharmacol. Ther. 80, 183–201. http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00028-X.
- Krenek, S., Schlegel, M., Berendonk, T.U., 2013. Convergent evolution of heat-inducibility during subfunctionalization of the Hsp70 gene family. BMC Evol. Biol. 13, 49. http:// dx.doi.org/10.1186/1471-2148-13-49.
- Kumar, D.P., Vorvis, C., Sarbeng, E.B., Cabra Ledesma, V.C., Willis, J.E., Liu, Q., 2011. The four hydrophobic residues on the Hsp70 inter-domain linker have two distinct roles. J. Mol. Biol. 411, 1099–1113. http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.001.
- Leignel, V., Cibois, M., Moreau, B., Chénais, B., 2007. Identification of new subgroup of HSP70 in Bythograeidae (hydrothermal crabs) and Xanthidae. Gene 396, 84–92. http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2007.02.025.
- Lim, J., Yue, Z., 2015. Neuronal aggregates: formation, clearance, and spreading. Dev. Cell 32, 491–501. http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.02.002.
- Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. Annu. Rev. Biochem. 55, 1151–1191. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005443.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins. Annu. Rev. Genet. 22, 631–677. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215.
- Liu, J., Yang, W.-J., Zhu, X.-J., Karouna-Renier, N.K., Rao, R.K., 2004. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Cell Stress Chaperones 9, 313. http://dx.doi.org/10.1379/CSC-40R.1.
- Liu, W.-W., Yang, P., Chen, X.-M., Xu, D.-L., Hu, Y.-H., 2014. Cloning and expression analysis of four eat shock protein genes in *Ericerus pela* (Homoptera: Coccidae). J. Insect Sci. 14, 142. http://dx.doi.org/10.1093/jisesa/ieu032.
- Lo, W.-Y., Liu, K.-F., Liao, I.-C., Song, Y.-L., 2004. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Cell Stress Chaperones 9, 332. http://dx.doi.org/10.1379/CSC-47R.1.
- Luan, W., Li, F., Zhang, J., Wen, R., Li, Y., Xiang, J., 2010. Identification of a novel inducible cytosolic Hsp70 gene in Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis and comparison of its expression with the cognate Hsc70 under different stresses. Cell Stress Chaperones 15, 83–93. http://dx.doi.org/10.1007/s12192-009-0124-y.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2012. HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures. J. Sea Res. 73, 137–147. http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2012.07.003.
- Manna, J., 2014. Activation of heat shock proteins by Nanocurcumin to prevent neurodegenerative diseases. Brain Disord. Ther. 03. http://dx.doi.org/10.4172/2168-975X.1000139.
- Mayer, M.P., 2010. Gymnastics of molecular chaperones. Mol. Cell 39, 321–331. http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.012.
- Meng, C., Zhu, H., Song, H., Wang, Z., Huang, G., Li, D., Ma, Z., Ma, J., Qin, Q., Sun, X., et al., 2014. Targets and molecular mechanisms of triptolide in cancer therapy. Chin. J. Cancer Res. 26, 622. http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2014.09.01.
- Mestre, N.C., Cottin, D., Bettencourt, R., Colaço, A., Correia, S.P.C., Shillito, B., Thatje, S., Ravaux, J., 2015. Is the deep-sea crab *Chaceon affinis* able to induce a thermal stress response? Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 181, 54–61. http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.11.015.

- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.J., Deerfield, D.W., 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. Embnew News 4, 1–4.
- Nollen, E.A.A., Kabakov, A.E., Brunsting, J.F., Kanon, B., Hohfeld, J., Kampinga, H.H., 2001. Modulation of *in vivo* HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1. J. Biol. Chem. 276, 4677–4682. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M009745200.
- Oakley, T.H., Wolfe, J.M., Lindgren, A.R., Zaharoff, A.K., 2013. Phylotranscriptomics to bring the understudied into the fold: monophyletic Ostracoda, fossil placement, and Pancrustacean phylogeny. Mol. Biol. Evol. 30, 215–233. http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mss216.
- Palleros, D.R., Welch, W.J., Fink, A.L., 1991. Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 5719–5723.
- Papot, C., Cascella, K., Toullec, J.-Y., Jollivet, D., 2016. Divergent ecological histories of two sister Antarctic krill species led to contrasted patterns of genetic diversity in their heat-shock protein (hsp70) arsenal. Ecol. Evol. 6, 1555–1575. http://dx.doi.org/10. 1002/ece3 1989
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. J. Comput. Chem. 25, 1605–1612. http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084.
- Porter, M.L., Pérez-Losada, M., Crandall, K.A., 2005. Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergence times. Mol. Phylogenet. Evol. 37, 355–369. http:// dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2005.06.021.
- Prapapanich, V., Chen, S., Smith, D.F., 1998. Mutation of Hip's carboxy-terminal region inhibits a transitional stage of progesterone receptor assembly. Mol. Cell. Biol. 18, 944–952. http://dx.doi.org/10.1128/MCB.18.2.944.
- Qian, Z., Liu, X., Wang, L., Wang, X., Li, Y., Xiang, J., Wang, P., 2012. Gene expression profiles of four heat shock proteins in response to different acute stresses in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 156, 211–220. http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.06.001.
- Ravaux, J., Toullec, J.-Y., Léger, N., Lopez, P., Gaill, F., Shillito, B., 2007. First hsp70 from two hydrothermal vent shrimps, *Mirocaris fortunata* and *Rimicaris exoculata*: characterization and sequence analysis. Gene 386, 162–172. http://dx.doi.org/10.1016/j.gene. 2006.09.001.
- Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, J.W., Cunningham, C.W., 2010. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. Nature 463, 1079–1083. http://dx.doi.org/10.1038/nature08742.
- Rensing, S.A., Maier, U.-G., 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. J. Mol. Evol. 39, 80–86. http://dx.doi.org/10.1007/BF00178252.
- Rhee, J.-S., Raisuddin, S., Lee, K.-W., Seo, J.S., Ki, J.-S., Kim, I.-C., Park, H.G., Lee, J.-S., 2009. Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 149, 104–112. http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.009.
- Ritossa, F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in dro-sophila. Experientia 18, 571–573. http://dx.doi.org/10.1007/BF02172188.
- Rodina, A., Patel, P.D., Kang, Y., Patel, Y., Baaklini, I., Wong, M.J.H., Taldone, T., Yan, P., Yang, C., Maharaj, R., Gozman, A., Patel, M.R., Patel, H.J., Chirico, W., Erdjument-Bromage, H., Talele, T.T., Young, J.C., Chiosis, G., 2013. Identification of an allosteric pocket on human Hsp70 reveals a mode of inhibition of this therapeutically important protein. Chem. Biol. 20, 1469–1480. http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.10.008.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61, 539–542. http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sys029.
- Rouault, J.-D., Casse, N., Chénais, B., Hua-Van, A., Filée, J., Capy, P., 2009. Automatic classification within families of transposable elements: application to the mariner family. Gene 448, 227–232. http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2009.08.009.
- Schlecht, R., Scholz, S.R., Dahmen, H., Wegener, A., Sirrenberg, C., Musil, D., Bomke, J., Eggenweiler, H.-M., Mayer, M.P., Bukau, B., 2013. Functional analysis of Hsp70 inhibitors. PLoS One 8, e78443. http://dx.doi.org/10.1371/annotation/5a7961d9-a7ea-4b10-9b48-5b106c405b02.
- Shen, H., Braband, A., Scholtz, G., 2013. Mitogenomic analysis of decapod crustacean phylogeny corroborates traditional views on their relationships. Mol. Phylogenet. Evol. 66, 776–789. http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.11.002.
- Sherman, M.Y., Gabai, V.L., 2015. Hsp70 in cancer: back to the future. Oncogene 34, 4153-4161. http://dx.doi.org/10.1038/onc.2014.349.
- Spees, J.L., Chang, S.A., Snyder, M.J., Chang, E.S., 2002. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. Biol. Bull. 203, 331–337. http://dx.doi.org/10.2307/1543575.
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J., 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. Syst. Biol. 57, 758–771. http://dx.doi.org/10.1080/10635150802429642.
- Swain, J.F., Dinler, G., Sivendran, R., Montgomery, D.L., Stotz, M., Gierasch, L.M., 2007. Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. Mol. Cell 26, 27–39. http://dx.doi.org/10.1016/ i.molcel.2007.02.020.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729. http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197.
- Tissiéres, A., Mitchell, H.K., Tracy, U.M., 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol. 84, 389–398. http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(74)90447-1.
- Tsang, L.M., Schubart, C.D., Ahyong, S.T., Lai, J.C.Y., Au, E.Y.C., Chan, T.-Y., Ng, P.K.L., Chu, K.H., 2014. Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. Mol. Biol. Evol. 31, 1173–1187. http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msu068.

- Vogel, M., Mayer, M.P., Bukau, B., 2006. Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker. J. Biol. Chem. 281, 38705–38711. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M609020200.
- Werner-Washburne, M., Craig, E.A., 1989. Expression of members of the Saccharomyces cerevisiae hsp70 multigene family. Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can. 31, 684–689. http://dx.doi.org/10.1139/g89-125.
- Wu, R., Sun, Y., Lei, L.M., Xie, S.T., 2008. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (HSC70) in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Mol. Biol. 42, 234–242. http://dx.doi.org/10.1134/S002689330802009X.
  Xiu, Y., Feng, J., Lu, W., Liu, D., Wu, T., Zhu, H., Liu, P., Li, W., Ren, Q., Gu, W., Meng, Q.,
- Xiu, Y., Feng, J., Lu, W., Liu, D., Wu, T., Zhu, H., Liu, P., Li, W., Ren, Q., Gu, W., Meng, Q., Wang, W., 2014. Identification of a novel cognate cytosolic Hsp70 gene (MnHsc70-2) from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and comparison of its expressions with the first cognate Hsc70 (MnHsc70-1) under different stresses. Cell Stress Chaperones 19, 949–961. http://dx.doi.org/10.1007/s12192-014-0519-2.
- Yamuna, A., Kabila, V., Geraldine, P., 2000. Expression of heat shock protein 70 in freshwater prawn Macrobrachium malcolmsonii (H. Milne Edwards) following exposure to Hg and Cu. Indian I. Exp. Biol. 38, 921–925.
- Yang, L.-H., Jiang, H.-B., Liu, Y.-H., Dou, W., Wang, J.-J., 2012. Molecular characterization of three heat shock protein 70 genes and their expression profiles under thermal stress

- in the citrus red mite. Mol. Biol. Rep. 39, 3585–3596. http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-1132-4.
- Yang, Y., Ye, H., Huang, H., Li, S., Liu, X., Zeng, X., Gong, J., 2013. Expression of Hsp70 in the mud crab, *Scylla paramamosain* in response to bacterial, osmotic, and thermal stress. Cell Stress Chaperones 18, 475–482. http://dx.doi.org/10.1007/s12192-013-0402-6.
- Zhang, F., Jiang, K., Sun, M., Zhang, D., Ma, L., 2013. Multiplex immune-related genes expression analysis response to bacterial challenge in mud crab, *Scylla paramamosain*. Fish Shellfish Immunol. 34, 712–716. http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.029.
- Zhang, L.J., Wu, Z.L., Wang, K.F., Liu, Q., Zhuang, H.M., Wu, G., 2015. Trade-off between thermal tolerance and insecticide resistance in *Plutella xylostella*. Ecol. Evol. 5, 515–530. http://dx.doi.org/10.1002/ece3.1380.
- Zhao, C., Zhang, X., Li, F., Huan, P., Xiang, J., 2013. Functional analysis of the promoter of the heat shock cognate 70 gene of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 34, 397–401. http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.022.
- Zhou, J., Wang, W.-N., He, W.-Y., Zheng, Y., Wang, L., Xin, Y., Liu, Y., Wang, A.-L., 2010. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. J. Invertebr. Pathol. 103, 170–178. http://dx.doi.org/10.1016/j. jip.2009.12.006.

#### **REVIEW ARTICLE**

# Overview on the European green crab *Carcinus* spp. (Portunidae, Decapoda), one of the most famous marine invaders and ecotoxicological models

V. Leignel • J. H. Stillman • S. Baringou • R. Thabet • I. Metais

Received: 11 February 2014 / Accepted: 23 April 2014 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Green crabs (Carcinus, Portunidae) include two species native to Europe—Carcinus aestuarii (Mediterranean species) and Carcinus maenas (Atlantic species). These small shore crabs (maximal length carapace, approximately 10 cm) show rapid growth, high fecundity, and long planktonic larval stages that facilitate broad dispersion. Carcinus spp. have a high tolerance to fluctuations of environmental factors including oxygen, salinity, temperature, xenobiotic compounds, and others. Shipping of *Carcinus* spp. over the past centuries has resulted in its invasions of America, Asia, and Australia. Classified as one of the world's 100 worst invaders by the International Union for Conservation of Nature, Carcinus spp. are the most widely distributed intertidal crabs in the world. Their voracious predatory activity makes them strong interactors in local communities, and they are recognized as a model for invasiveness in marine systems as well as a sentinel species in ecotoxicology. This review shows an exhaustive analysis of the literature on the life cycle, diversity, physiological tolerance, genomic investigations, ecotoxicological use, historical invasion, control programs, and putative economical valorization of shore crabs.

**Keywords** Carcinus · Ecotoxicology · Indicator · Invader · Review · Pollution

Responsible editor: Philippe Garrigues

Published online: 06 May 2014

V. Leignel (☑) · S. Baringou · R. Thabet Laboratoire Mer-Molécules-Sante, Université du Maine, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans, France e-mail: vincent.leignel@univ-lemans.fr

#### I H Stillman

Romberg Tiburon Center and Department of Biology, San Francisco State University, Tiburon, CA 94920, USA

#### I Metais

Laboratoire Mer-Molécules-Sante, Université Catholique de l'Ouest, 3 Place André Leroy, 49008 Angers, France

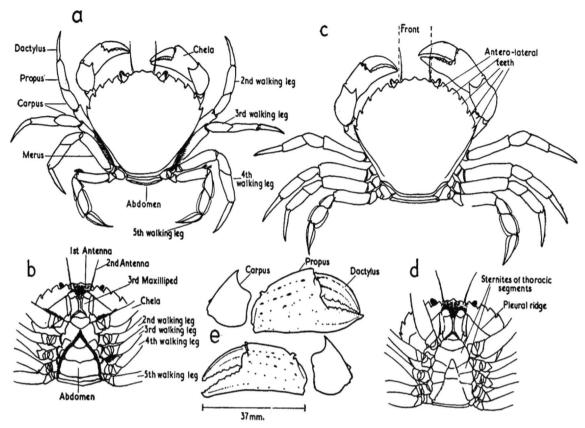
#### Introduction

Description of Carcinus species

In 1814, Leach defined the Carcinus genus, including a unique species Carcinus maenas, previously described as Cancer maenas (Linneaus 1758), and sometimes written as Carcinoides maenas or Carcinides maenas. The morphological characters of C. maenas that allows easy identification include five teeth on the anterolateral margin of the carapace, a slight projection of the front of the carapace with a rounded rostral area, orbit with a dorsal fissure, and a fifth leg with a wider unspatulated dactyl (Fig. 1). The abdomen has three to five fused somites; its form is triangular for males, but circular for females (Squires 1990). Two major color morphs existgreen and red (Crothers 1968)—which represents different stages in the molt cycle. Though C. maenas are commonly observed in estuary and rocky zones, they are able to colonize a broad range of habitat types (salt marshes, woody debris, rocky substrate, and seagrass). Postlarval and adult crabs are abundant in the intertidal and subtidal zones, occurring as deep as 60 m (Elner 1980). C. maenas is distributed from Northern Europe (Baltic Sea, Iceland, and Central Norway) to the North African coasts (Morocco and Mauritania) and the Mediterranean Sea.

Nevertheless, in 1847, Nardo established morphological distinction between Atlantic and Mediterranean green crabs, describing the species *Carcinus aestuarii* (also known as *C. mediterranae* or *C. mediterranius*) which presents a restrictive geographical distribution in the Mediterranean and Black Seas (Behrens Yamada and Hauck 2001). Although the two species are highly similar, Cohen et al. (1995) and Behrens Yamada and Hauck (2001) confirmed the discrimination of *C. aestuarii/C. maenas* using morphological criteria. Characters used to differentiate these species include carapace parameters as follows: width/length ratio, width/depth ratio,





**Fig. 1** Anatomy and morphological criteria of *Carcinus maenas*, published by Crothers (1967). *a, b* Female, dorsal, and ventral view; *c, d* male, dorsal, and ventral view, *e* chelae of the male

appearance of dorsal surface, margin of frontal area between the eyes, and segmentation of first and second antennae; for C. maenas, pleopods of male are crescent-shaped and curves outward with the center of the crescents touching, whereas for C. aestuarii, they are straight and parallel. For C. aestuarii, the frontal area is flat without distinct bumps that are not protruding, and it is bordered by three scalloped-shaped lobes with bumps that are not protruding (Behrens Yamada and Hauck 2001). In contrary, based on crabs (n=20) from the Atlantic, Mediterranean, and Pacific collection sites, Clark et al. (2001) found morphological overlap of individuals among Atlantic and Mediterranean sites suggesting lack of complete separation of European shore crabs, with potential hybridization zone in southwestern Iberian which was confirmed by Carlton and Cohen (2003).

Analyses of ribosomal (16S) and mitochondrial (cytochrome oxidase subunit I) gene sequences confirmed the status of the two species (Geller et al. 1997; Roman and Palumbi 2004) with hybridization in Japan and South Africa (Darling 2011a). This genetic distinction was also demonstrated in the plankton larvae (Darling and Tepolt 2008). Cytochrome oxidase I (COI) sequence variation revealed the existence of three genetic *C. aestuarii* groups (Adriatic, Ionian, and Tyrrhenian and West Mediterranean Sea), explained by Mediterranean Sea topography, convection, and

counterclockwise circulations that form physical barriers, favoring local larval retention (Patarnello et al. 2007; Marino et al. 2011). In *C. maenas*, COI sequence also revealed three genetic groups (off-shelf, Northern Europe, and Western Europe) according to regional current patterns causing local larval retention associated with seasonal circulation in the North Sea (Roman and Palumbi 2004; Darling et al. 2008; Domingues et al. 2010; Marino et al. 2011).

Sexual dimorphism exists in both *Carcinus* species. The length, convexity, and width of the carapace are clearly distinct between the two sexes of *C. maenas* where female carapaces are more convex to accommodate gonadal tissue (Ledesma et al. 2010; Ozbek et al. 2012). It was also demonstrated that the number of eggs is correlated with the carapace width of the *C. aestuarii* females (Ozbek et al. 2012). Adult males are always larger than females in both *Carcinus* species (Koçak et al. 2011; Matozzo et al. 2013).

Life cycle of Carcinus spp.

Green crabs have planktonic larvae, and benthic adults inhabit estuaries and rocky shores. These iteroparous crabs live up to 7 years (Klassen and Locke 2007). Individual crabs can mate multiple times within a single year, but females probably produce eggs only once per year (Klassen and Locke 2007).



Histological analysis showed that the ovarian development occurred biannually, correlating to two seasonal breeding groups—a primary winter cycle and secondary summer cycle (Lyons et al. 2012). Color changes in Carcinus from green (premolt crab) to red indicating sexual maturation (Styrishave et al. 2004). Molting occurs primarily in spring and summer; in Northern Hemisphere sites (e.g., Maine, USA), egg laying occurs between May and July (Berrill 1982). In comparison, male C. maenas in the Southern Hemisphere (e.g., Argentina) molt in November and females molt in January-March (Vinuesa 2007). After copulation, female crabs move to lower littoral levels where they remain through the fall and winter. Embryos develop from May to September along the Argentinean coasts (Vinuesa 2007). For C. aestuarii, the reproductive period seems to be from November to February, with maximum ovigerous females in January in the Homa Lagoon (Turkey) (Ozbek et al. 2012) whereas it was noted from November to early May, with maximum in February, in San Teodoro (Italy) (Mori et al. 1990). Females produce up to 370,000 embryos/brood (Grosholz and Ruiz 2002; Lovell et al. 2007), which hatch during the summer or winter. The larval pelagic duration of ~90 days is comprised of four planktonic zoeal stages, which display vertical migration behavior in pelagic environments, and one megalopal stage, which settles into benthic habitats before metamorphosis to the first crab stage (Rice and Ingle 1975; Dos Santos et al. 2008). Larval growth and development depend upon temperature, salinity, and food availability. C. maenas larvae eat mainly phytoplankton (Harms et al. 1994; Gimenez 2010). The daily mortality rate of larvae was estimated at 7 %, which is equivalent to that of other decapod larvae (Rumrill 1990). Megalopal cohorts are localized along coasts with high dispersal capacity, estimated from 57 to 198 km (Domingues et al. 2010, 2011, 2012). Sexual maturity occurs within 1 or 2 years (3–4 cm carapace length), but exact times are variable among geographical regions (Berrill 1982; Mori et al. 1990; Grosholz and Ruiz 2002; Vinuesa 2007; Coelho et al. 2008; Lyons et al. 2012; Ozbek et al. 2012).

Carcinus adults are voracious omnivores, aggressive competitors, and have a high impact on the populations of annelids, gastropods, bivalves, fish, algae, and other crustaceans (shrimp, crab); cannibalism is also common (Moknes 2004; Baeta et al. 2007). Green crab adults consume at least 104 distinct families of marine organisms included in 14 animal phyla (Ameyaw-Akumfi and Hughes 1987; Klassen and Locke 2007; Mowles et al. 2011). Their primary mode of foraging is chemosensory, not visual (Robinson et al. 2011).

# Physiological capacities of *Carcinus* spp. to cope with major environmental factors

Carcinus spp. are known for high tolerance to varying environmental abiotic conditions (Fehsenfeld et al. 2011), including air exposure, temperature, and salinity (Behrens Yamada

and Hauck 2001). They are also tolerant to food deprivation. Starvation during molting periods (ecdysis) induced no major physiological performance decline in *C. aestuarii*, but did influence the crab immune system (Matozzo et al. 2011a). The ability for *C. maenas* adults to survive without food for over 3 months was also demonstrated by Wallace (1973). *C. maenas* shows acclimation responses in muscle membrane lipid composition and fluidity (Cuculescu et al. 1999) and modest plasticity in thermal tolerance.

#### Temperature acclimation

Temperature is one of the most important environmental factor affecting the physiology, behavior, phenotypic traits, reproduction, distribution, and metabolic rate of aquatic ectotherms (Somero 2002; Atkinson 1994). Temperature impacts an organism's fitness through its pervasive effects on most biological processes. Green crabs are eurythermic, able to survive temperatures from freezing to 35 °C, and to mate from 18 to 26 °C (Klassen and Locke 2007; Tepolt and Somero 2013). Kelley et al. (2013) demonstrated that C. maenas may be maintained at or below 5 °C during 18 weeks of experiments without behavioral disturbance. In laboratory conditions, the critical thermal maximum (CTMax) of C. maenas has been estimated at 35.1±0.8 °C (Madeira et al. 2012), a heat tolerance higher than in most subtidal decapods (Hopkin et al. 2006; Tepolt and Somero 2013). CTMax values are influenced by collection time, collection location, and thermal history, including temperature acclimation or acclimatization across thermal (latitudinal) gradients (Tepolt and Somero 2013). For example, Cuculescu et al. (1988) estimated that CTMax may be higher (35.8±0.11 °C) if the crabs were caught in autumn and pre-acclimated from 8 to 22 °C (Table 1). Winter-caught crabs had lower CTMax values than summer- and autumn-caught crabs that were acclimated to winter temperatures (Table 1; Hyde et al. 2012). Kelley et al. (2011) demonstrated that green crabs (C. maenas) collected in

Table 1 Critical thermal maxima of *Carcinus maenas* extracted from Cuculescu et al. (1988) demonstrating effects of season and acclimation. Mean values  $\pm$  SEM, significantly different groups (P<0.05) are denoted with different symbols. Crabs were acclimated for 3 weeks at 8 °C before their CTMax was determined. They were then transferred to 15 °C for a further week after which they were kept at 22 °C for 3 weeks and their CTMax was determined. Water was heated at a constant rate of 0.28 °C per min

Acclimation Temperature (°C)	Summer caught CTMax	Autumn caught CTMax	Winter caught CTMax
8	31.8±0.27	33.5±0.50	31.3±0.24
15		$34.2 \pm 0.12$	$32.5 \pm 0.20$
22	35.4±0.26	35.8±0.11	



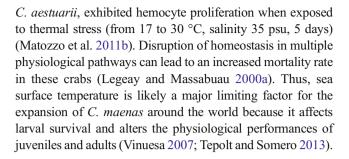
southern (Stinson Beach, California, CA, USA) and northern (Vancouver Island, British Columbia, BC) zones in North America did not show the same CTMax after experimental acclimation (Table 2), suggesting local population differentiation and/or developmental plasticity in heat tolerance. Variation in CTMax may be correlated to heat shock protein synthesis. Crabs (*C. maenas*) living in Southern USA (CA, California group) synthesized more heat shock protein 70 (HSP70) than Northern crabs (BC, British Columbia group) when they were acclimated to 6 °C (Kelley et al. 2011).

Larvae exhibited higher physiological tolerances to temperature fluctuations than adults (DeRivera et al. 2006). For example, successful metamorphosis from C. maenas larvae to juveniles occurred at temperatures between 9 and 22.5 °C (Dawirs et al. 1986), whereas molting, growth, and feeding of C. maenas adults are affected by seasonal temperature fluctuation (Berrill 1982; Cohen et al. 1995; Eriksson and Edlund 1977; Behrens Yamada et al. 2005). C. maenas juveniles were found to be more tolerant to temperature and salinity variations than older individuals, influencing their distribution in estuary and coastal zones (McKnight et al. 2000; Baeta et al. 2005; Todd et al. 2005). Thus, larvae and juveniles are the primary stages for geographic spread, suggesting that C. maenas has high capacity to establish populations in latitudinal ranges outside the geographical range where adults breed (DeRivera et al. 2006). Accordingly, temperature increases predicted in global climate change scenarios may promote the global spread of C. aestuarii and C. maenas (Compton et al. 2010).

Temperature variation alters response to an array of physiological performance parameters, including oxygen consumption rates, immunity, and digestion. McGaw and Whiteley (2012) showed that a temperature increase (from 10 to 20 °C) increased contraction in the foregut and food transit rate through the gut, and, as a result, reduced nutrient absorption efficiency for *C. maenas*. Truscott and White (1990) demonstrated in *C. maenas* that a gradual temperature variation (from 10 to 20 °C) after 5 days is related to an increase of circulating hemocytes which are involved in wound repair and defense mechanisms against parasites, viruses, and bacteria. This observation was confirmed in

**Table 2** Critical thermal maxima of *Carcinus maenas* according to the geographic localization and acclimation (modified from Kelley et al. 2011)

	CTMax			
	Acclimation 6 °C	Acclimation 23 °C		
California	34.7 °C	36.2 °C		
British Columbia	31.7 °C	35.5 °C		



#### Salinity acclimation

Carcinus spp. are euryhaline osmoregulators that inhabit a broad range of salinities (1.4–54 psu) during annual migration from estuaries (in spring) to marine zones (in summer) (Zanders 1980). Larval stages are less tolerant to salinity fluctuation than juveniles, which are in turn more tolerant than adults (McKnight et al. 2000; Reid et al. 1989; McGaw et al. 1992; Lee et al. 2003; Baeta et al. 2005). Zoeae larvae tolerate salinity ranges from 20 to 35 psu (Edgell and Hollander 2011). Carcinus development is directly influenced by salinity. For example, C. maenas zoea larvae did not fully develop at salinities <15 psu (Anger et al. 1998; Dawirs 1985). Adults shift rapidly between osmoconforming and osmoregulating (Henry et al. 2003; Rainbow and Black 2005), though the kinetics may differ depending on environmental shifts in salinity. Jillette et al. (2011) reported that hemolymph osmolarity from C. maenas adults transferred from low (15 psu) to high (32 psu) salinity rapidly increased and stabilized twice as fast as during transitions from high to low salinity. Three posterior gills, numbers 7-9, have been found to be involved in osmotic and acid-base regulation, while the anterior six gill pairs function in respiratory gas exchange, as is the case in other decapod crustaceans (Fehsenfeld et al. 2011). The neurotransmission is also altered by both hypo- and hypersalinity (Rodrigues et al. 2012).

Molecular investigations identified distinct genes implicated in osmoregulation in gills. Towle et al. (1997, 2011) detected the global transcription responses during salinity stress (from 32 to 10 or 15 psu) on C. maenas gills. Their investigation showed that transcripts encoding Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and cytoplasmic carbonic anhydrase were mainly upregulated between 6 and 24 h post-transfer. Transport proteins showing little transcriptional response included a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter, and a V-type H<sup>+</sup>-ATPase B subunit, all of which have been implicated in osmoregulatory ion transport across crustacean gills. Mitochondrial proliferation was noted, reflected by the upregulated expression of mitochondrial genes between 4 and 7 days post-transfer (Towle et al. 2011). Carbonic anhydrase, γ-amino butyric acid, dopamine receptors, sodium/glucose cotransporter, and chloride/bicarbonate exchanger upregulated expressions were also shown by Henry et al. (2003, 2006) and Towle et al.



(2008). Increase of a Na $^+$ /K $^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit and carbonic anhydrase mRNA synthesis was also confirmed during salt stress (15 and 32 psu) by Jillette et al. (2011).

#### Hypoxia effects in Carcinus

Shore crabs are tolerant to low oxygen conditions and can survive at least 1 week out of water (Darbyson 2006). Anoxia induces acid-base disturbances, and these crabs use metabolic depression as a survival strategy (Durand and Regnault 1998) as evidenced by hemolymph urate increasing drastically in response to hypoxic exposure (Lallier et al. 1987). Alanine and fumarate were accumulated in C. maenas tissues during anoxia, and L-lactate appears as the major end-product of anaerobic metabolism (Hill et al. 1991). This observation confirms the importance of anaerobic glycolysis for energy production in crabs during environmental hypoxia (Hill et al. 1991). Hypoxia decreased competitive ability and increased mortality during combat between crabs (Legeay and Massabuau 2000a). Hypoxia may induce high embryonic mortality even though females actively aerate their broods by balancing on two periopods and flapping the abdomen, allowing accumulation of air bubbles around the egg mass (Wheatly 1981). Legeay and Massabuau (2000b) studied variation in C. maenas gill hemolymph pO<sub>2</sub> across an annual cycle of environmental oxygen variability. C. maenas appeared less tolerant to hypoxia during winter as water temperature is lowest, and pO<sub>2</sub> ranged from 0.7 to 6 kPa, following a seasonally physiological-dependent pattern. Reid and Aldrich (1989) also demonstrated a variation in response to water oxygenation between green and red crabs. They showed that red individuals start to escape a water body in which pO2 is below 6 kPa whereas green crabs tolerate down to pO2 of 3.5 kPa. Martin (1977) (cited in Legeay and Massabuau 2000a) suggested that the network of phycomycetes on the gill cuticles of red morphs impaired O<sub>2</sub> diffusion.

In *C. aestuarii*, two aggregation forms of the respiratory protein hemocyanin exist—dodecameric 24S accounting for 90 % of total hemocyanin and hexameric 16S accounting for 10 % (Dainese et al. 1998). The hemocyanin of *C. aestuarii* shows a high carbohydrate moiety (1.6 % of protein mass). This carbohydrate content is higher than other arthropod hemocyanins (Dolashka-Angelova et al. 2001). In *C. maenas*, however, only the 24S form has been found (Markl et al. 1979). Truchot (1980) showed that lactate increased the O<sub>2</sub> affinity of crab hemocyanin as confirmed by Weber et al. (2008). Before any appearance of lactate in the blood, the switch from postprandial acidification to postprandial alkalinisation is a preliminary alarm showing that the intracellular medium is becoming hypoxic (Legeay and Massabuau 2000b).

#### Response to hypercapnia

In the short term, hypercapnia, a rapid adjustment of osmoand acid-base regulation, was noted. Fehsenfeld et al. (2011) used a 4,462-feature microarray to identify a significant effect of pCO<sub>2</sub> (53 vs 440 Pa) on gill transcripts, where changes occurred in 26 % of transcripts, including those involved in cellular stress and osmoregulation. Elevated seawater pCO<sub>2</sub> modified the membrane of gill epithelial cells, through gene expression changes of tetraspanin, integrin-alpha7, a calciumactivated chloride channel, and proteins included in a multispanning endomembrane protein of the transmembrane 9 superfamily (protein member 4=TM9SF4) (Fehsenfeld et al. 2011). Hammer et al. (2012) demonstrated that elevated pCO<sub>2</sub> led to some disturbances in intracellular iso-osmotic regulation and a putative amino acid catabolism increase (glycine, proline) to supply the body fluids with protonbuffering ammonia (NH<sub>3</sub>). To understand how C. maenas will acclimate at global climate change reflected by the predicted elevation of pCO<sub>2</sub>, Fehsenfeld et al. (2011) studied transcriptome changes in gill epithelia cells following acclimation to 400 Pa pCO<sub>2</sub>. After 1 week of exposure, significant changes were detected in a calcium-activated chloride channel, a hyperpolarization-activated nucleotide-gated potassium channel, a tetraspanin, an integrin and putative syntaxin-binding protein, a protein of the transmembrane 9 superfamily, and a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub> exchanger of the SLC 4 family.

#### Response to pathogens/infections

Carcinus are susceptible to infection by viruses (Vlak et al. 2005), bacteria (e.g., Vibrio anguillarum in C. maenas (Hauton et al. 1997), Rickettsia like-organism in C. aestuarii (Bonami and Pappalardo 1980) or in C. maenas (Eddy et al. 2007)), dinoflagellates (e.g., Hematodinium perezi in C. maenas (Hamilton et al. 2010)), haplosporidians (e.g., Haplosporidium littoralis in C. maenas (Stentiford et al. 2013)), helminths (Zetlmeisl et al. 2011), nemerteans (e.g., Carcinonemertes epialti in C. maenas (Torchin et al. 1996)), and tremadodes (e.g., the Digenean Microphallus primas in C. maenas (Saville and Irwin 2005)). The most famous parasite studied in *Carcinus* spp. is an endoparasitic barnacle, Sacculina carcini, which possess a planktonic cyprid larva (C. aestuarii (Boschma 1972); C. maenas (Thresher et al. 2000)). Female cyprids parasites the molting crabs and metamorphoses into kentrogon and vermigon that are localized in the hemolymph (Glenner and Hoeg 1995). No host immune response to S. carcini infection is noted, but a significant reduction in serum proteins and hepatopancras necrosis was commonly observed (analysis done for C. aestuarii (Sanviti et al. 1981); examination of C. maenas (Powell and Rowley 2008)). Since 1982, two fractions were identified in the blood of infested crabs demonstrating rapid molecular responses



against *S. carcini* infection (Herberts 1982). Several studies demonstrated that *C. maenas* possess hemocytes containing factors able to attenuate or neutralize the pathogen effects (i.e., 6.5 kDa protein (cf bactenecin) and 11.5 kDa protein (cf crustin)) (Chisholm and Smith 1992, 1995; Relf et al. 1999; Tincu and Taylor 2004). Chilsholm and Smith (1994) demonstrated antibacterial activity in the hemocyte lysate supernatants that was observed across all months, except February and August, following experimental infection with *Psydhrobacter immobilis*.

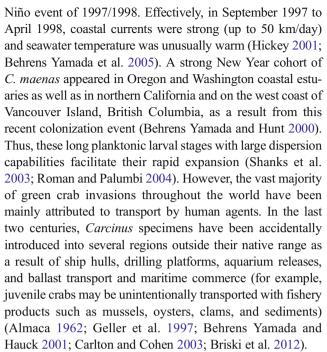
Carcinus seems to possess physiological properties to be most tolerant than other decapod crustaceans for various parasites. For example, Hematodinium (protist, dinoflagellate) reduces the osmoregulatory capacity of C. maenas, but any macroscopical alteration of functionality of gills cells is detected. In comparison, Cancer pagurus showed many physiological perturbations (osmolarity perturbation, muscle tissues reduced, discolouration of exoskeleton, and hemolymph pH increased) (Hamilton et al. 2010). Chisholm and Smith (1995) also showed that C. maenas is most tolerant than Galathea strigosa, Nephrops norvegicus, and Crangon crangon, during Psychrobacter immobilis infection. Therefore, C. maenas revealed a lower susceptibility to viral infection like white spot disease virus when it compared to others European decapods tissues (Bateman et al. 2012; Corbel et al. 2001). So, several authors suggested that their invasion success may be related to minor pressure of the parasites, and probably competitors and predators, in invaded environments. For example, Torchin et al. (2001) demonstrated that the parasite load on C. maenas was higher in their native regions than in invaded area. Zetlmeisl et al. (2011) also analyzed the parasite prevalence in distant geographical populations of C. maenas in the native (Europe) and invasive localizations (South Africa, Australia) confirming that the invasive populations had lower parasite infections than native populations.

#### Carcinus spp. is a marine invader

At present, the shore crab is considered as one of the world's 100 worst invaders by the IUCN Species Survival Commission Invasive species specialist group (Lafferty and Kuris 1996; Grosholz 2005; Towle and Smith 2006; Klassen and Locke 2007; Darling 2011b).

Historical invasion of Carcinus spp.

In natural conditions, larvae have the potential to disperse over considerable distances given that green crab larval stages must develop in open waters. Thus, green crabs can rapidly expand their range once becoming established (Grosholz 1996). For example, Behrens Yamada and Becklund (2004) estimated that larval stages migrated over 50 km during the strong El



Green crabs (C. maenas) were first observed on the east coast of North America in Massachusetts in 1817, and now occur from Newfoundland to Virginia (Grosholz and Ruiz 1996). The range in eastern North America extends over approximately 1,000-1,200 linear kilometer of coast (Jamieson 2000; Kelley et al. 2011). In 1989-1990, green crabs (C. maenas) have been described in San Francisco Bay, California, on the Pacific coast of the USA (Grosholz and Ruiz 1996). This founding population, which probably arrived in the 1980s, likely had no more than 48 individuals (Tepolt et al. 2009). This population started extending its range in 1993 and reached Oregon in 1995-1996, Washington and British Columbia in 1998 (Jamieson 2000; See and Feist 2010; Behrens Yamada and Kosro 2010). Thus, the western North America green crab invasion has undergone a rapid range expansion of over 1,500 km in less than 12 years since the initial colonization (Jamieson et al. 2002). Genetic studies have shown that the west coast populations belong to the lineage that has been present on the east coast of North America since the 1800s (Bagley and Geller 2000). The first report of green crabs (C. maenas) in Canadian waters was in 1950 at the Bay of Fundy (Hart 1955). Now, they occupy the five Atlantic Canadian provinces (Rossong et al. 2012).

C. aestuarii have also been reported in Australia since the nineteenth century, in Port Phillip Bay, Victoria, and have since spread along the coast of Victoria, reaching New South Wales in 1971, South Australia in 1976, and Tasmania in 1993 (Thresher et al. 2003; Ross et al. 2004; Ahyong 2005). C. maenas reached South Africa in 1983, near Cape Town (Joska and Branch 1986; Le Roux et al. 1990). Green crabs (C. aestuarii and C. maenas) invaded the Japanese coast in 1984 from Atlantic and Mediterranean Europe (Darling



2011b), and a simulation predicted that they will be present all over the country by 2205 (Koike and Iwasaki 2011). In 1999 and 2003, green crabs were also recorded from the Atlantic coast of South America in Patagonia (Argentina); these mostly likely arrived from Australia via ballast water (Hidalgo et al. 2005; Vinuesa 2007; Darling 2011b).

Green crabs (*C. aestuarii* and *C. maenas*) have also been recorded, but apparently did not successfully establish populations, in waters of the Red Sea (before 1817), Brazil (Rio de Janeiro in 1857 and Pernambuco before 1899), Panama (Pacific coast, 1866), Sri Lanka (1866–1867), Hawaii (1873), Madagascar (1922), Myanmar (1933), Australia (Perth, 1965), and Pakistan (1971) (Boschma 1972; Carlton and Cohen 2003).

#### Impact of the Carcinus invaders

Green crabs have high fecundity, rapid growth, and predate upon many organisms (e.g., bivalves, gastropods, and crustaceans). It is evident that they have multiple significant effects on the alteration of community and ecosystem processes. Their impacts on natural ecosystems and commercial fisheries have been well established (Ruiz et al. 1997; Grosholz 2002; Kulhanek and Ricciardi 2011). C. maenas was the first marine organism to be designated as an aquatic nuisance species by the Aquatic Nuisance Species Task Force (ANSTF) (Grosholz and Ruiz 2002). Lafferty and Kuris (1996) have estimated that the potential losses due to green crab (C. maenas) predation on commercial fisheries species in the USA could be as high as \$44 million per year (all values in USD). However, The Oregon Dungeness Crab Commission defined the potential impact of C. maenas on Dungeness crab population in 2005 at \$50 million, whereas the annual values in sales of farmed bivalves just in Washington State were \$77 million (PCSGA 2003). On the East Coast, Lovell et al. (2007) showed that the estimated average annual losses to shellfisheries attributed to green crab predation are \$22.6 million. The potential economic impact of green crabs (C. maenas) on bivalve and crustacean fisheries and aquaculture in the Gulf of St. Lawrence was estimated between \$42 and \$109 million (Colautti et al. 2006). A wide range of commercial bivalves species along the North American coast are clearly at risk since Carcinus colonization (Jamieson et al. 1998). In eastern North America, green crabs have been shown to significantly reduce populations of commercial shellfish species including soft shell clams (Mya arenaria; Glude 1955; Ropes 1968; Whitlow et al. 2003) and scallops (Argopecten irradians; Morgan et al. 1980). MacPhail et al. (1955) reported mortalities of planted soft shell clams (M. arenaria) as high as 57 % over a 3-day period following the arrival of green crabs, compared to estimated background mortalities of ~10 % per month. Crab predation on scallops (A. irradians) in Connecticut was as high as 70 % (Morgan et al. 1980). In California, C. maenas significantly reduces densities of the most abundant taxa, including the bivalves@@ Ostreola conchaphila, Transennella confuse, Transennella tantilla, Nutricola tantilla, and Nutricola confusa, the crab Hemigrapsus oregonensis, the cumacean Cumella vulgaris, and the amphipod Corophium sp. (Grosholz and Ruiz 1995; Grosholz et al. 2000; Kimbro et al. 2009). C. maenas is a potential competitor of native crabs including the estuarine blue crab Callinectes sapidus (American native species) and Cancer irroratus (indigenous rock crab from Newfoundland and Labrador, Canada) (MacDonald et al. 2007; Ramey et al. 2009; Roudez et al. 2007; Matheson and Gagnon 2012a, b).

MacPhail et al. (1955) stated: "It must be concluded that the green crab is one of the worst, if not the worst, clam predators that we know. Its ability to multiply rapidly, to feed on many varieties of shellfish other than commercial species, and its large appetite for commercially important shellfish, all suggest that it can do enormous damage" (Grosholz and Ruiz 2002). Finger (1998) has reported losses of cultured Ruditapes philippinarum as high as 50 % in Tomales Bay, which he attributes to C. maenas. This heavy predation pressure exerted by green crabs was also observed on native mollusks and crabs from America, Tasmania, and South of Africa (Grosholz and Ruiz 1995, 2002; Griffiths et al. 1992). Thus, several native species have declined by more than 90 % as the direct result of green crab predation (Grosholz et al. 2000). In Europe, predation by green crabs (C. maenas) is considered an important source of mortality for different commercial species (like Crassostrea gigas, C. crangon, Mercenaria mercenaria, Mytilus edulis, Ostrea edulis, Palaemon elegans, Ruditapes decussates, R. philippinarum) and also for noncommercial species (Ebling et al. 1964; Dare and Edwards 1976; Moksnes 2002).

#### Control of Carcinus populations

Control by management plan The European green crab (C. maenas) is now recognized as one of the most ecologically potent and economically damaging predators in coastal communities (Lowe et al. 2000). Following this designation in November 1998, the ANSTF called for development of a Management Plan to prevent, eradicate, and control C. maenas in the USA. Prior to colonization, prevention measures can be used to reduce the probability of transfer from any one of multiple transport vectors. Once a site is colonized, control measures, including a rapid response network (coordinated by professional and public outreach), are established to limit the invasion or to eradicate the population (Grosholz and Ruiz 2002). Control efforts including fencing, trapping, and poisoning have partially reduced the abundance of green crabs.

Control by predators Carcinus populations may be naturally limited by their predators like birds, crustaceans, fish, and



mammals. For example, some fish (sculpins, gobies, gadids, flatfish, ray, and shark) are predators of green crabs in the Atlantic (Kelley 1987; Cohen et al. 1995; Nelson et al. 2003). Predation pressure by native rock crabs (*Cancer* spp. and *C. sapidus*) may influence the habitat preference of *Carcinus* (Hunt and Behrens Yamada 2003; DeRivera et al. 2005; Jensen et al. 2007). Coastal mammals such as otters also consume green crabs in high quantity (Dunstone and Birks 1987; Mason and MacDonald 1980). Birds (sandpipers, heron, cormorants, and ducks) are likewise major predators of *Carcinus* (Cohen et al. 1995).

Control by other invasive species In the Gulf of Maine, Asian shore crab (Hemigrapsus sanguinaeus), first discovered on the Atlantic coast in the 1980s, impacts C. maenas densities. Griffen et al. (2008) noted that H. sanguinaeus predation on mussel populations altered C. maenas diet and induced a lower growth rate in the latter species. These observations confirmed those established along the Southern New England coast (Lohrer and Whitlatch 2002).

Control by parasites Several parasite species have been proposed as potential biological control agents of green crabs, such as S. carcini (parasitic crustacean castrator) (Minchin 1997), Portunion maenadis (isopoda) and Carcinonemertes carcinophila (nemertean), and Fecampia erythrocephala (flatworm) (Kuris 1997, 2002). The nemathelminth parasites do not induce significant effects on Carcinus population (Zetlmeisl et al. 2011). The parasitic barnacle S. carcini is considered as promising potential biological control agent because it impacts fitness (reducing spermatogenesis), inhibits molting and growth, and may induce mortality (Rubiliani 1983; Høeg 1995; Thresher et al. 2000; Goddard et al. 2005). Torchin et al. (2001) found that parasite load on green crabs (juvenile, young adult) was significantly higher in their native habitat than in invaded habitats (prevalence of 96 versus 8 %, respectively). The major problem for their control methods using parasites proposed for Carcinus spp. is that they could have negative consequences for native species too.

Is rapid evolution of *Carcinus* observed in invasive populations?

Carcinus spp. revealed a high genetic plasticity, and rapid modifications may be noted in recent invasive populations. Observable divergences in both morphology and physiological responses to heat stress have occurred in the invasive *C. maenas* populations on the west coast of North America within a relatively recent time span (~20 years) (Kelley et al. 2011). Temperature is a selective agent which affects morphological (body size) and physiological (metabolism, growth rate) characters in marine ectotherms (Atkinson 1994; Partridge and French 1996). In cold sites, the larvae show

longer larval duration (Queiroga et al. 1994; Gaylord and Gaines 2000).

#### Carcinus as a model organism in ecophysiology

Carcinus as a model in ecotoxicology

Presently, Carcinus species are the most widely studied intertidal crabs in the world. Bamber and Depledge (1997) and Stewart et al. (2010) showed that green crabs may be used as biological monitors to test the impact of toxicants, and they were recommended as indicator species especially in the monitoring of heavy metal contaminations (Jennings and Rainbow 1979; Chan et al. 1992; Pedersen et al. 1994, 1998; Rainbow et al. 1999; Brown et al. 2004; Camus et al. 2004; Martin-Diaz et al. 2004a, b, 2005; Bjerregaard et al. 2005; Brian 2005; Stentiford and Feist 2005; Moreira et al. 2006; Klassen and Locke 2007; Ben-Khedher et al. 2013a). Indeed, C. maenas has demonstrated its ability as a physiological model crustacean to assess the potential impact of metals (Cd, Cu, Co, Hg, Zn, andPb), industrial contaminants such as polyaromatic hydrocarbon (PAH) (Locatello et al. 2009; Dissanayake et al. 2008, 2010; Dissanayake and Bamber 2010; Ben-Khedher et al. 2013a, 2013b; Rodrigues et al. 2013a), and pesticide ecotoxicants (Pedersen et al. 1997; Brown et al. 2004; Galloway et al. 2004, 2006; Martin-Diaz et al. 2004a, b, 2008; Elumalai et al. 2007; Coelho et al. 2008; Maria et al. 2009; Montes Nieto et al. 2010; Rodrigues et al. 2013a). C. aestuarii was also used for ecotoxicological investigations to detect the impacts of various environmental toxicants such as tributyltin/dibutyltin biocids, dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and hexachlorobenzene (Locatello et al. 2009) or benzo(a)pyrene (Fossi et al. 2000). This species, along with clams, was a useful biomonitor in multispecies approaches to assess the impact of potential exposure to xenoestrogens on animals from different sites of the Lagoon of Venice (Munari et al. 2010) or exposed to 4nonylphenol, a well-known xenoestrogen (Ricciardi et al. 2008). An integrated biological-chemical approach was also evaluated by Ricciardi et al. (2010) on C. aestuarii demonstrating its value to detect environmental pollution stress. As with other decapod crustaceans, C. maenas maintains its tissue concentrations of the essential metal zinc at approximately constant levels upon exposure to a wide range of ambient dissolved zinc concentration, whereas non-essential metals (e.g., cadmium (Cd)) are accumulated in proportion to dissolved metal exposure (Rainbow and White 1989). Bjerregaard et al. (2005) and Pereira et al. (2006) demonstrated high Cd concentration specifically in muscle and hepatopancreas tissues. Thus, C. maenas is commonly used for characterization and study of molecular biomarkers to give an integrated view of the toxic effects of single or multiple contaminant exposure on the organism at biochemical, cellular, and physiological levels (Pedersen and



Lundebye 1996; Pedersen et al. 1994, 1997; Vedel and Depledge 1995; Legras et al. 2000; Rainbow and Black 2005; Hagger et al. 2009). Biomarkers have been therefore investigated to study C. maenas-specific contamination of zinc (Legras et al. 2000), cadmium (Pedersen et al. 1994, 1998), and copper (Brown et al. 2004). Living on sediments and eating prey that burrow into sediments, C. maenas has been described as a suitable sentinel to assess the quality of estuary ecosystems. Bioaccumulation and bioamplification are the main processes which could transform C. maenas as a vector of contamination between polluted marine ecosystems and humans through consumption. Gills and hepatopancreas are the most significant tissues from the ecotoxicological viewpoint (Maria et al. 2009). As the primary organs in contact to environmental contamination, gills are the main entrance site of contaminants, particularly metals, and operate as a temporary store for metal accumulation. Traits including locomotion, heart rate, molt-related N-acetyl-β-glucosaminidase (NAGase), immune function (hemocyte phagocytic capability), endocrine systems (vitellogenin), and biochemical biomarkers, including combined defense and damage molecular biomarkers (i.e. acetylcholinesterase for exposure to neurotoxic compounds, catalase for antioxidant response, ethoxyresorufine-O-deethylase glutathione peroxidase, glutathione reductase, and glutathione-Stransferase for detoxification of organic compounds, isocitrate dehydrogenase and lactate dehydrogenase for energy metabolism, metallothioneins for detoxification of metal contamination, DNA damages) were successfully used on C. maenas showing its sensitivity to contaminants and its suitability to classify sites in relation to contamination levels (Legras et al. 2000; Galloway et al. 2004, 2006; Martin-Diaz et al. 2004a, b; Morales-Caselles et al. 2008; Martin-Diaz et al. 2008, 2009; Hagger et al. 2009; Maria et al. 2009; Pereira et al. 2009; Montes Nieto et al. 2010; Munari et al. 2010; Dissanayake et al. 2011; Mesquita et al. 2011; Ben-Khedher et al. 2013a; Rodrigues et al. 2013b). Hagger et al. (2008, 2009) and Jebali et al. (2011) demonstrated that biomarker-based indices may be useful in coastal health monitoring using C. maenas as a sentinel species. Recently, the search of new biomarkers led Jebali et al. (2014) to use proteomics approach to assess the toxic effects of contaminants in C. maenas. Proteins implied in different biological functions (chitin catabolism, proteolysis, exoskeleton biosynthesis, protein folding, stress response, and transport) were presented as new biomarkers that may be combined to the present battery of molecular biomarkers to develop for C. maenas an integrative tool for biomonitoring aquatic environment contamination.

New molecular tools to study diversity and ecophysiology in *Carcinus* 

Microsatellite loci have provided useful genetic markers (Bagley and Geller 2000), allowing evaluation of *C. maenas* diversity in Portugal (Pascoal et al. 2009), in Canada (Blakeslee et al. 2010), in the USA (Tepolt et al. 2006), or

for the global structure populations (Darling et al. 2008). Combinations of microsatellite and classical DNA markers (mitochondrial, ribosomal genes) will be useful for studying population genetic parameters at a range of spatial scales of *Carcinus* throughout its expanding species range.

A transcriptome developed by Towle and Smith (2006) identified 12,401 *C. maenas* expressed sequence tags (ESTs). This study allowed the characterization of several genes implicated in distinct mechanisms—antioxidant activity (12), binding activity (395), catalytic activity (578), chaperone activity (35), enzyme regulatory activity (55), motor activity (16), nutrient reservoir activity (5), signal transduction activity (89), structure activity (141), transcription regulatory activity (91), translation regulatory activity (30), and transporter activity (148) (Towle and Smith 2006).

The role of peptides in ecophysiology

Peptides have been isolated from C. maenas displaying antimicrobial proprieties and/or neuropeptide functions. In 1996, Schnapp et al. (1996) isolated a protein of 11.53 kDa produced by circulating hemocytes in C. maenas. Purified and characterized by Relf et al. (1999), this protein is similar to defensin of other invertebrates. This peptide, designated "Carcinin" by Smith and Chisholm (2001), presents antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (Chisholm and Smith 1992; Relf et al. 1999). Carcinin is included in "crustin" groups because homologous sequences have been found in various crustaceans such as shrimp (Macrobrachium rosenbergii, ACL15396), prawns (Fenneropenaeus chinensis, EU500912; Marsupenaeus japonicas, BAD15066...), lobster (Pacifastacus leniusculus, ABP88043; Palinurus japonicas, ACU25385), and other crabs (Hyas araneus, ACJ06764; Scylla paramamosain, ABY20727...). The first complete carcinin cDNA (AJ427538, 333 bp) and genomic sequences (four exons and three introns) have been described by Brockton et al. (2007). At least six putative isoforms exist resulting from the transcription of different alleles and/or single-point mutations of the transcript at up to four loci in the gene (AJ237947, AJ427538, AJ821886, AJ821887, AJ821888 and AJ821889) (Brockton et al. 2007). The expression of carcinin was evaluated by real-time PCR during Grampositive bacterium challenge in C. maenas and it appeared that its expression was modulated by temperature, especially when the animal is close to the edges of its physiological-tolerated thermal range (Brockton and Smith 2008).

In 1991, Leu- and Met-enkephalin from thoracic ganglia of the shore crab *C. maenas* have been purified (Luschen et al. 1991). Enkephalins in *C. maenas* confirmed the presence of an opioid system in crustaceans which has been reported for pigment regulation, locomotion and escape responses, and glucose mobilization (Luschen et al. 1991). In 1997, 20 neuropeptides included in allatostatin superfamily (regulatory



substances that inhibit the biosynthesis of iuvenile hormone and may indirectly influence muscular activity) were isolated from extracts of cerebral and thoracic ganglia of the shore crab C. maenas. These substances designated carcinustatins are the shortest and longest allatostatins characterized from arthropods (Duve et al. 1997). More recently, global peptidomic analysis allowed the identification of 122 peptides and paracrines/hormones from the C maenas central nervous system and neuroendocrine organs. This neuropeptidome obtained by mass spectrometry revealed notably high variability of allatostatins (25 peptides) and 42 new peptides de novo sequenced (e.g., the pyrokinins TSFAFSPRLamide and DTGFAFSPRLamide) (Ma et al. 2009). These authors suggested that this study extended our understanding of hormonal control in C. maenas, including factors that contribute to its extreme adaptability.

#### Conclusion

This review shows that *Carcinus* species (*C. aestuarii* and *C. maenas*) are good models for ecotoxicological investigations. These small common shore crabs (maximal size, 10 cm), are easily identified, and are highly tolerant to various environmental changes (temperature, salinity, xenobiotics...). Their broad tolerance combined with the genomics resources already available makes them an attractive model for physiological genomics. Their recent and rapid expansion around the world makes them a central model for marine invasion.

**Acknowledgments** Kali Esancy (University of Washington, USA) and Sylvia Anton (Université d'Angers, France) are gratefully acknowledged for English corrections on this article.

#### References

- Ahyong ST (2005) Range extension of two invasive crab species in eastern Australia: *Carcinus maenas* (Linnaeus) and *Pyromaia tuberculata* (Lockington). Mar Pollut Bull 50:460–462
- Almaca C (1962) Sur la distribution géographique du genre *Carcinus* Leach (Crust. Dec. Brach.). Rev Fac Cienc Lisb 10:109–113
- Ameyaw-Akumfi C, Hughes RN (1987) Behaviour of *Carcinus maenas* feeding on large *Mytilus edulis*. How do they assess the optimal diet? Mar Ecol 38:213–218
- Anger K, Spivak E, Luppi T (1998) Effects of reduced salinities on development and bioenergetics of early larval shore crab, *Carcinus maenas*. J Exp Mar Biol Ecol 220:287–304
- Atkinson D (1994) Temperature and organism size—a biological law for ectotherms? Adv Ecol Res 25:1–58
- Baeta A, Cabral HN, Neto JM, Marques JC, Pardal MA (2005) Biology, population dynamics and secondary production of the green crab *Carcinus maenas* (L.) in a temperate estuary. Estuar Coast Shelf Sci 65:43–52
- Baeta A, Cabral HN, Marques JC, Pardal MA (2007) Feeding ecology of the green crab, *Carcinus maenas* (L., 1758) in temperate estuary. Portugal Crustaceana 79(10):1181–1193

- Bagley MJ, Geller JB (2000) Microsatellite DNA analysis of native and invading populations of European Green crabs. In: Pederson J (ed)
   Marine bioinvasions: Proceedings of the first national conference.
   MIT Seagrant College Program, Cambridge, MA, pp 241–243
- Bamber SD, Depledge MH (1997) Evaluation of changes in the adaptive physiology of shore crabs (*Carcinus maenas*) as an indicator of pollution in estuarine environments. Mar Biol 129:667–672
- Bateman KS, Tew I, French C, Hicks RJ, Martin P, Munro J, Stentiford GD (2012) Susceptibility to infection and pathogenicity of White Spot Disease (WSD) in non-model crustacean host taxa from temperate regions. J Invert Pathol 110:340–351
- Behrens Yamada S, Becklund M (2004) Status of the European green crab invasion. J Shellfish Res 23:651
- Behrens Yamada S, Hauck L (2001) Field identification of the European green crab species *Carcinus maenas* and *Carcinus aestuarii*. J Shellfish Res 20(3):905–912
- Behrens Yamada S, Hunt C (2000) The arrival and spread of the European green crab, *Carcinus maenas* in the Pacific Northwest. Dreissena 11:1–7
- Behrens Yamada S, Kosro PM (2010) Linking ocean conditions to year class strength of the invasive European green crab, *Carcinus maenas*. Biol Invasions 12:1791–1804
- Behrens Yamada S, Dumbauld BR, Kalin A, Hunt CE, Figlar-Barnes R, Randall A (2005) Growth and persistence of a recent invader *Carcinus maenas* in estuaries of the northeastern Pacific. Biol Invasions 7:309–321
- Ben-Khedher S, Jebali J, Houas Z, Naweli H, Jrad A, Bousseta H (2013a) Metals bioaccumulation and histopathological biomarkers in *Carcinus maenas* crab from Bizerta lagoon, Tunisia. Environ Sci Pollut Res 21(6):4343–47357
- Ben-Khedher S, Jebali J, Kamel N, Banni M, Rameh M, Jrad A, Bousseta H (2013b) Biochemical effects in crabs (*Carcinus maenas*) and contamination levels in the Bizerta Lagoon: an integrated approach in biomonitoring of marine complex pollution. Environ Sci Pollut Res 20:2616–2631
- Berrill M (1982) The life cycle of the green crab *Carcinus maenas* at the northern end of its range. J Crust Biol 2:31–39
- Bjerregaard P, Bjorn L, Norum U, Pedersen KL (2005) Cadmium in the shore crab *Carcinus maenas*: seasonal variation in cadmium content and uptake and elimination of cadmium after administration via food. Aquat Toxicol 72:5–15
- Blakeslee AMH, McKenzie CH, Darling JA, Byers JE, Pringles JM, Roman JA (2010) Hitchhiker's guide to the Maritimes: anthropogenic transport facilitates long-distance dispersal of an invasive marine crab to Newfoundland. Divers Distrib 16:879–891
- Bonami JR, Pappalardo R (1980) Rickettsial infection in marine crustacean. Experientia 36(2):180–181
- Boschma H (1972) On the occurrence of *Carcinus maenas* (Linnaeus) and its parasite *Sacculina carcini* Thompson in Burma, with notes on the transport of crabs to new localities. Zool Med 47(11):145–155
- Brian JV (2005) Inter-population variability in the reproductive morphology of the shore crab (*Carcinus maenas*): evidence of endocrine disruption in a marine crustacean? Mar Pollut Bull 50:410–416
- Briski E, Ghabooli S, Bailey SA, MacIsaac HJ (2012) Invasion risk posed by macroinvertebrates transported in ships' ballast tanks. Bio Invasions 14:1843–1850
- Brockton V, Smith VJ (2008) Crustin expression following bacterial injection and temperature change in the shore crab, *Carcinus maenas*. Dev Comp Immunol 32(9):1027–1033
- Brockton V, Hammond JA, Smith VL (2007) Gene characterisation, isoforms and recombinant expression of carcinin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*. Mol Immunol 44: 943–949
- Brown RJ, Galloway TS, Lowe D, Browne MA, Dissanayake A, Jones MB, Depledge MH (2004) Differential sensitivity of three marine



- invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. Aquat Toxicol 66:267-278
- Camus L, Davies PE, Spicer JI, Jones MB (2004) Temperature-dependent physiological response of *Carcinus maenas* exposed to copper. Mar Environ Res 58:781–785
- Carlton JT, Cohen AN (2003) Episodic global dispersal in shallow water marine organisms: the case history of the European shore crabs *Carcinus maenas* and *C. aestuarii*. J Biogeogr 30:1809–1820
- Chan HM, Bjerregaard P, Rainbow PS, Depledge MH (1992) Uptake of zinc and cadmium by two populations of shore crabs *Carcinus maenas* at different salinities. Mar Ecol Prog Ser 86:91–97
- Chilsholm JR, Smith VJ (1994) Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. J Mar Biol Assoc U K 74:949–982
- Chisholm JR, Smith VJ (1992) Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab *Carcinus maenas*. J Mar Biol Assoc UK 72:529–542
- Chisholm JR, Smith VJ (1995) Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. Comp Biochem Physiol A 110(1):39–45
- Clark PF, Neale M, Rainbow PS (2001) A morphometric analysis of regional variation in *Carcinus* Leach, 1814 (Brachyura: Portunidae: Carcininae) with particular reference to the status of the two species *C. maenas* (Linnaeus, 1758) and *C. aestuarii* (Nardo, 1847). J Crust Biol 21:288–303
- Coelho JP, Reis AT, Ventura S, Pereira ME, Duarte AC, Pardal MA (2008) Pattern and pathways for mercury lifespan bioaccumulation in *Carcinus maenas*. Mar Pollut Bull 56:1104–1110
- Cohen AN, Carlton JT, Fountain MC (1995) Introduction, dispersal and potential impacts of the green crab *Carcinus maenas* in San Francisco Bay, California, Mar Biol 122:225–237
- Colautti RI, Bailey SA, van Overjijk CDA, Amundsen K, MacIsaac HJ (2006) Characterised and projected costs of nonindigenous species in Canada. Biol Invasions 8:45–59
- Compton TJ, Leathwick JR, Inglis GJ (2010) Thermogeography predicts the potential global range of the invasive European green crab (*Carcinus maenas*). Div Distrib 16:243–255
- Corbel V, Zuprisal Z, Shi C, Huang I, Sumartono C, Arcier JM, Bonami JR (2001) Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). J Fish Dis 24:377–382
- Crothers JH (1967) The biology of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) 2. The life of the adult crab. Field Stud 2:579–614
- Crothers JH (1968) The backround—anatomy, grot and life history. Field Stud 2(4):407–434
- Cuculescu M, Hyde D, Bowler K (1988) Thermal tolerance of two species of marine crab, Cancer pagurus and Carcinus maenas. J Therm Biol 23(2):107–110
- Cuculescu M, Pearson T, Hyde D, Bowler K (1999) Heterothermal acclimation: an experimental paradigm for studying the control of thermal acclimation in crabs. Proc Natl Acad Sci U S A 96:6501–6505
- Dainese E, Di Muro P, Beltramini M, Salvato B, Decker H (1998) Subunits composition and allosteric control in *Carcinus aestuarii* hemocyanin. Eur J Biochem 256:350–358
- Darbyson EA (2006) Local vectors of spread of the green crab (*Carcinus maenas*) and the clubbed tunicate (*Styela clava*) in the southern Gulf of St. Lawrence, Canada. M.Sc. Thesis, University of Halifax, NS
- Dare PJ, Edwards DB (1976) Experiments on the survival, growth, and yield of relaid seed mussels (*Mytilus edulis* L.) in the Menai Strait, North Wales. J Cons Int Explor Mer 37:16–28
- Darling JA (2011a) Interspecific hybridization and mitochondrial introgression in invasive Carcinus shore crabs. Plos ONE 6(3):e17828
- Darling JA (2011b) More than one way to invade: lessons from genetic studies of *Carcinus* shore crabs. In: Galil BS et al. (eds). The wrong place—alien Marine Crustaceans: distribution, biology and impacts. Invading nature. New York. Springer. pp 25
- Darling JA, Tepolt CK (2008) Highly sensitive detection of invasive shore crab (*Carcinus maenas* and *Carcinus aestuarii*) larvae in

- mixed plankton samples using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP). Aquat Invasions 3(2):141–152
- Darling JA, Bagley MJ, Roman J, Tepolt CK, Geller JB (2008) Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*. Mol Ecol 17:4992–5007
- Dawirs RR (1985) Temperature and larval development of *Carcinus maenas* (Decapoda) in the laboratory; predictions of larval dynamics in the sea. Mar Ecol Prog Ser 24:297–302
- Dawirs RR, Pueschel C, Schorn F (1986) Temperature and growth in Carcinus maenas L. (Decapoda: Portunidae) larvae reared in the laboratory from hatching through metamorphosis. J Exp Mar Biol Ecol 100:47–74
- DeRivera CE, Ruiz GM, Hines AH, Jivoff P (2005) Biotic resistance to invasion: native predator limits abundance and distribution of an introduced crab. Ecol 86:3364–3376
- DeRivera CE, Gray Hitchcock N, Teck SJ, Steves BP, Hines AH, Ruiz GM (2006) Larval development rate predicts range expansion of an introduced crab. Mar Biol 10(6):1275–1288
- Dissanayake A, Bamber SD (2010) Detecting polyaromatic hydrocarbon (PAH) exposure in the Bay of Gibraltar, using fluorescence spectrophotometry as a biomonitoring tool of environmental contamination. Mar Environ Res 70:65–72
- Dissanayake A, Galloway TS, Jones MB (2008) Physiological responses of juvenile and adult shore crabs *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda) to pyrene exposure. Mar Environ Res 66:445–450
- Dissanayake A, Piggott C, Baldwin C, Sloman KA (2010) Elucidating cellular and behavioural effects of contaminant impact (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) in both laboratory-exposed and field-collected shore crabs, *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). Mar Environ Res 70:368–373
- Dissanayake A, Galloway TS, Jones MB (2011) Seasonal differences in the physiology of *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda) from estuaries with varying levels of anthropogenic contamination. Estuar Coast Shelf Sci 93:320–327
- Dolashka-Angelova P, Beltramini M, Dolashki A, Salvato B, Hristova R, Voelter W (2001) Carbohydrate composition of *Carcinus aestuarii* hemocyanin. Arch Biochem Biophys 389:153–158
- Domingues CP, Creer S, Taylor MI, Queiroga H, Carvalho GR (2010) Genetic structure of *Carcinus maenas* within its native range: larval dispersal and oceanographic variability. Mar Ecol Prog Ser 410: 111–123
- Domingues CP, Creer S, Taylor MI, Queiroga H, Carvalho GR (2011) Temporal genetic homogeneity among shore crab (*Carcinus maenas*) larval events supplied to an estuarine system on the Portuguese northwest coast. Heredity 106:832–840
- Domingues CP, Nolasco R, Dubert J, Queiroga H (2012) Model-derived dispersal pathways from multiple source populations explains variability of invertebrate larval supply. Plos ONE 7(4):e35794
- Dos Santos A, Santos AMP, Conway DVP, Bartilotti C, Lourenco P (2008) Diel vertical migration of decapod larvae in the Portuguese coastal upwelling ecosystem: implications for offshore transport. Mar Ecol Prog Ser 359:171–183
- Dunstone N, Birks JDS (1987) The feeding ecology of mink (*Mustela vison*). J Zool 212:69–83
- Durand F, Regnault M (1998) Nitrogen metabolism of two portunid crabs, *Carcinus maenas* and *Necora puber*, during prolonged air exposure and subsequent recovery: a comparative study. J Exp Biol 201:2515–2528
- Duve H, Johnsen AH, Maestro J-L, Scott AG, Jaros PP, Thorpe A (1997) Isolation and identification of multiple neuropeptides of the allatostatin superfamily in the shore crab *Carcinus maenas*. Eur J Biochem 250:727–734
- Ebling FG, Kitching JA, Muntz L, Taylor CM (1964) The ecology of Lough Ine: XIII. Experimental observations of the destruction of Mytilus edulis and Nucella lapillus by crabs. J Anim Ecol 33:73–82



- Eddy F, Powell A, Gregory S, Nunan LM, Lightner DV, Dyson PJ, Rowley AF, Shields RJ (2007) A novel bacterial disease of the European shore crab, *Carcinus maenas*—molecular pathology and epidemiology. Microbiology 153:2839–2849
- Edgell C, Hollander J (2011) The evolutionary ecology of European green crab, *Carcinus maenas*, in North America. In: Galil BS et al. (eds.). The wrong place—alien Marine Crustaceans: distribution, biology and impacts. Invading nature. New York: Springer. pp 25
- Elner RW (1980) The influence of temperature, sex and chela size on the foraging strategy of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). Mar Behav Physiol 7:15–24
- Elumalai M, Antunes C, Guilhermino L (2007) Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho River estuary (NW, Portugal) exposed to zinc and mercury. Chemosphere 66:1249–1255
- Eriksson S, Edlund A-M (1977) On the ecological energetics of group *Carcinus maenas* (L.) from a shallow sandy bottom in Gullmar Fjord, Sweden. J Exp Mar Biol Ecol 30:233–248
- Fehsenfeld S, Kiko R, Appelhnsa Y, Towle DW, Zimmer M, Melner F (2011) Effects of elevated seawater pCO<sub>2</sub> on gene expression patterns in the gills of the green crab, *Carcinus maenas*. BMC Genomics 12(488):2–17
- Finger J (1998) Concerns for the molluscan shellfish industry. Green crab workshop sponsored by Oregon/Washington Sea Grant, Vancouver, WA
- Fossi MC, Casini S, Savelli C, Corbelli C, Franchi E, Mattei N, Sanchez-Hernandez JC, Corsi I, Bamber S, Depledge MH (2000) Biomarker responses at different levels of biological organization in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to benzo(*a*)pyrene. Chemosphere 40:861–874
- Galloway T, Brown RJ, Browne M, Dissanayake A, Lowe D, Jones M, Depledge M (2004) A multibiomarker approach to environmental assessment. Environ Sci Technol 38:1723–1731
- Galloway T, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Depledge MH, Jones MB (2006) The ECOMAN project: a novel approach to defining sustainable ecosystem function. Mar Pollut Bull 53:186–194
- Gaylord B, Gaines SD (2000) Temperature or transport? Range limits in marine species mediated solely by Xow. Am Nat 155:769–789
- Geller JB, Walton ED, Grosholz ED, Ruiz GM (1997) Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. Mol Ecol 6:901–906
- Gimenez L (2010) Relationship between habitat conditions, larval traits, and juvenile performance in a marine invertebrate. Ecology 91(5): 1401–1413
- Glenner H, Hoeg JT (1995) A new motile, multicellular stage involved in host invasion by parasitic barnacles (Rhizocephala). Nature 377: 147–149
- Glude JB (1955) The effects of temperature and predators on the abundance of the soft-shell clam, *Mya arenaria*, in New England. Trans Am Fish Soc 84:13–26
- Goddard JHR, Torchin ME, Kuris AM, Lafferty KD (2005) Host specificity of Sacculina carcini, a potential biological control agent of the introduced European green crab Carcinus maenas in California. Biol Invasions 7:895–912
- Griffen BD, Guy T, Buck JC (2008) Inhibition between invasives: a newly introduced predator moderates the impacts of a previously established invasive predator. J Anim Ecol 77:32–40
- Griffiths CL, Hockey PAR, Van Erkom SC, LeRoux PJ (1992) Marine invasive aliens on South Australian shores: implications for community structure and trophic functioning. S Afr J Mar Sci 12:713–722
- Grosholz ED (1996) Contrasting rates of spread for introducted species in terrestrial and marine systems. Ecology 77:1680–1686
- Grosholz ED (2002) Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. Trends Ecol Evol 17:22–27
- Grosholz ED (2005) Recent biological invasion may hasten invasional meltdown by accelerating historical introductions. Proc Natl Acad Sci U S A 102:1088–1091

- Grosholz ED, Ruiz GM (1995) Spread and potential impact of the recently introduced European green crab, Carcinus maenas, in Central California. Mar Biol 122:239–247
- Grosholz ED, Ruiz GM (1996) Predicting the impact of introduced marine species: lessons from the multiple invasions of the European green crab *Carcinus maenas*. Biol Conserv 78:59–66
- Grosholz ED, Ruiz GM (2002) Management plan for the European green crab. Submitted to the Aquatic Nuisance Species Task Force November 13, pp 55
- Grosholz ED, Ruiz GM, Dean CA, Shirley KA, Maron JL, Connors PG (2000) The impacts of a nonindigenous marine predator in a California bay. Ecology 81:1206–1224
- Hagger JA, Jones MB, Lowe D, Leonard DRP, Owen R, Galloway TS (2008) Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. Mar Pollut Bull 56:1111–1118
- Hagger JA, Galloway TS, Langston WJ, Jones MB (2009) Application of biomarkers to assess the condition of European Marine Sites. Environ Pollut 157:2003–2010
- Hamilton KM, Shaw PW, Morritt D (2010) Physiological responses of three crustacean species to infection by the dinoflagellate like protest *Hematodinium* (alveolata: Syndinea). J Invertebr Pathol 105(2): 194–196
- Hammer KM, Pedersen SA, Storseth TR (2012) Elevated seawater levels of CO<sub>2</sub> change the metabolic fingerprint of tissues and hemolymph from the green shore crab *Carcinus maenas*. Comp Biochem Physiol Part D 7:292–302
- Harms J, Meyer-Harms B, Dawirs RR, Anger K (1994) Growth and physiology of *Carcinus maenas* (Decapoda, Portunidae) larvae in the field and in laboratory experiments. Mar Ecol Prog Ser 108:107– 118
- Hart JL (1955) The green crab—a shellfish enemy. Fisheries Research Board of Canada, Report of the Atlantic Biological Station, St. Andrews, N.B. pp 11
- Hauton C, Williams JA, Hawkins LE (1997) The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.). J Experiment Mar Biol Ecol 211:115–128
- Henry RP, Gehnrich S, Weihrauch D, Towle DW (2003) Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*. Comp Biochem Physiol Part A 136: 243–258
- Henry RP, Thomason KL, Towle DW (2006) Quantitative changes in branchial carbonic anhydrase activity and expression in the Euryhaline green crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. J Exp Zool 305A:842–850
- Herberts C (1982) Host-parasite relation between the shore crab *Carcinus* maenas and *Sacculina carcini* (Rhizocephala): identification and characterization of a specific fraction correlated with parasitism. J Invert Pathol 39:60–65
- Hickey BM (2001) Coastal ocean-estuary coupling. In: Parrish JK and Little K (eds) PNCERS 2000 Annual Report, pp 77–84. Coastal Oceans Program, NOAA
- Hidalgo FJ, Barón PJ, Orensanz JM (2005) A prediction comes true: the green crab invades the Patagonian coast. Biol Invasions 7:547–552
- Hill AD, Taylor AC, Strang RHC (1991) Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maenas* L. during environmental anoxia and subsequent recovery. J Exp Mar Biol Ecol 150:31–50
- Høeg JT (1995) The biology and life cycle of the rhizocephala (cirripedia). J Mar Biol Assoc UK 75:517–550
- Hopkin RS, Qari S, Bowler K, Hyde D, Cuculescu M (2006) Seasonal thermotolerance in marine crustacean. J Mar Biol Ecol 331:74–81
- Hunt CE, Behrens Yamada S (2003) Biotic resistance experienced by an invasive crustacean in a temperate estuary. Biol Invasions 5:33–43
- Hyde D, Qari S, Hopkin RS, Bowler K (2012) Thermal acclimation, heat shock and photoperiod: do these factors interplay in the adaptive

- responses of crab neuromusculary system to temperature? J Therm Biol 37:164-170
- Jamieson GS (2000) European green crab, Carcinus maenas, introductions in North America: differences between the Atlantic and Pacific experiences. Proceedings of the 10th International Aquatic Nuisance Species and Zebra Mussel Conference, Toronto, pp. 307–312
- Jamieson GS, Armstrong DA, Grosholz ED, Elner RW (1998) Potential ecological implications from the introduction of the European green crab, *Carcinus maenas*, to British Columbia, Canada, and Washington, USA. J Nat Hist 32:1587–1598
- Jamieson GS, Foreman MGG, Cherniawsky JY, Levings CD (2002) European green crab (*Carcinus maenas*) dispersal: The Pacific experience. In: Paul AJ, Dawe EG, Elner R, Jamieson GS, Kruse GH, Otto RS, Sainte-Marie B, Shirley TC and Woodby D (eds.). Crabs in cold water regions: Biology, management and economics. University of Alaska Sea Grant College Program AK-SG-02-01. pp. 561–576
- Jebali J, Ben-Khedher SB, Ghedira J, Kamel N, Boussetta H (2011) Integrated assessment of biochemical responses in Mediterranean crab (*Carcinus maenas*) collected from Monastir Bay, Tunisia. J Env Sci 23(10):1714–1720
- Jebali J, Chicano-Galvez E, Fernandez-Cisnal R, Banni M, Chouba L, Boussetta H, Lopez-Barea J, Alhama J (2014) Proteomic analysis in caged Mediterranean crab (*Carcinus maenas*) and chemical contaminant exposure in Teboulba Harbour. Tunisia Ecotoxicol Environ Saf 100:15–26
- Jennings JR, Rainbow PS (1979) Studies on the uptake of cadmium by the crab *Carcinus maenas* in the laboratory. I. Accumulation from seawater and a food source. Mar Biol 50:131–139
- Jensen GC, McDonald PS, Armstrong DA (2007) Biotic resistance to green crab, *Carcinus maenas*, in California bays. Mar Biol 151: 2231–2243
- Jillette N, Cammack L, Lowenstein M, Henry RP (2011) Downregulation of activity and expression of three transport-related proteins in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*, in response to high salinity acclimation. Comp Biochem Physiol Part A 158:189–193
- Joska MAP, Branch GM (1986) The European shore-crab—another alien invader? Afr Wildlife 40:63–65
- Kelley DF (1987) Food of bass in U.K. waters. J Mar Biol Assoc UK 67: 275–286
- Kelley A, De Rivera CE, Buckley BA (2011) Intraspecific variation in thermotolerance and morphology of the invasive European green crab, *Carcinus maenas*, on the west coast of North America. J Exp Mar Biol Ecol 409:70–78
- Kelley A, De Riviera CE, Buckley BA (2013) Cold tolerance of the invasive *Carcinus maenas* in the east Pacific: molecular mechanisms and implications for range expansion in a changing climate. Biol Invasions. doi:10.1007/s10530-013-0454-7
- Kimbro DL, Grosholz ED, Baukus AJ, Nesbitt N, Travis N, Attoe S, Coleman-Hulbert C (2009) Invasive species cause large-scale loss of native California oyster habitat by disrupting trophic cascades. Oecologia 160:563–575
- Klassen G, Locke A (2007) A biological synopsis of the European green crab, Carcinus maenas. Can Manuscr Rep Fish Aquat Sci no 2818, pp. 75
- Koçak C, Acarli D, Katagan T, Ozbek M (2011) Morphometric characters of the Mediterranean green crab (*Carcinus aestuarii* Nardo, 1847) (Decapoda, Brachyura), in Homa Lagoon, Turkey. Turk J Zool 35: 551–557
- Koike F, Iwasaki K (2011) A simple range expansion model of multiple pathways: the case of nonindigenous green crab Carcinus aestuarii in Japanese waters. Biol Invasions 13:459–470
- Kulhanek SA, Ricciardi A (2011) Is invasion history a useful tool for predicting the impacts of the world's worst aquatic invasive species? Ecol Appl 21(1):189–202

- Kuris A (1997) Nemertean egg predators as potential biocontrol agents for *Carcinus maenas*. In: Thresher RE (ed) Proceedings the first international workshop on the demography, impacts and management of introduced populations of the European crab, *Carcinus maenas*. CRIMP Tech. Rep. 11. Centre for Research on Introduced Marine Pests. CSIRO Marine Laboratories, Hobart, pp 88–90
- Kuris AM, Torchin ME, Lafferty KD (2002) Fecampia erythrocephala rediscovered: prevalence and distribution of a parasitoid of the European shore crab, Carcinus maenas. J Mar Biol Assoc UK 82: 955–960
- Lafferty KD, Kuris AM (1996) Biological control of marine pests. Ecology 77:1989–2000
- Lallier F, Boitel F, Truchot JP (1987) The effect of ambient oxygen and temperature on haemolymph L-lactate and urate concentrations in the shore crab *Carcinus maenas*. Comp Biochem Physiol Part A 86: 255–260
- Le Roux PJ, Branch GM, Joska MAP (1990) On the distribution, diet and possible impact of the invasive European shore crab *Carcinus maenas* (L.) along the South African coast. Afr J Mar Sci 9:85–92
- Ledesma FM, Van Der Molen S, Baron PJ (2010) Sex identification of *Carcinus maenas* by analysis of carapace geometrical morphometry. J Sea Res 63:213–216
- Lee KT, McKnight A, Kellogg K, Juanes F (2003) Salinity tolerance in color phases of female green crabs *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758). Crustaceana 76:247–253
- Legeay A, Massabuau JC (2000a) Effect of salinity on hypoxia tolerance of resting green crabs, *Carcinus maenas*, after feeding. Mar Biol 136:387–396
- Legeay A, Massabuau J-C (2000b) The ability to feed in hypoxia follows a seasonally dependent pattern in shore crab *Carcinus maenas*. J Exp Mar Biol Ecol 247:113–129
- Legras S, Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C (2000) Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. J Exp Mar Biol Ecol 246:259–279
- Locatello L, Matozzo V, Marin MG (2009) Biomarker responses in the crab *Carcinus aestuarii* to assess environmental pollution in the Lagoon of Venice (Italy). Ecotoxicology 18:869–877
- Lohrer AM, Whitlatch RB (2002) Interactions among aliens: apparent replacement of one exotic species by another. Ecology 83:710–732
- Lovell S, Besedin E, Grosholz E (2007) Modeling economic impacts of the European green crab. Paper presented at American Agricultural Economics Association annual meeting, Portland, July 29–Aug 1. pp. 40
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M (2000) 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the Global Invasive Species database. The Invasive Species Specialist Group (ed). A specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN). Pp. 12
- Luschen W, Buckt F, Willig A, Jaros PP (1991) Isolation, sequence analysis, and physiological properties of enkephalins in the nervous tissue of the shore crab *Carcinus maenas* L. (crustacean neuropeptides/release-inhibiting neurohormone/neurosecretion/opioids). Proc Natl Acad Sci U S A 88:8671–8675
- Lyons LJ, O'Riordan RM, Cross TF, Culloty SC (2012) Reproductive biology of the shore crab *Carcinus maenas* (Decapoda, Portunidae): a macroscopic and histological view. Invert Reprod Dev 56:144– 156
- Ma M, Bors EK, Dickinson ES, Kwiatkowski MA, Sousa GL, Henry RP, Smith CM, Towle DW, Christie AE, Li L (2009) Characterization of the *Carcinus maenas* neuropeptidome by mass spectrometry and functional genomics. Gen Comp Endocrinol 161(3):320–334
- MacDonald JA, Roudez R, Glover T, Weis JS (2007) The invasive green crab and Japanese shore crab: behavioral interactions with a native crab species, the blue crab. Biol Invasions 9:837–848



- MacPhail JS, Lord EI, Dickie LM (1955) The green crab—a new clam enemy. Fish Res Board Can Progr Rep Atl Biol Sta 1:1–16
- Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Vinagre C, Diniz MS (2012) HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures. J Sea Res 73:137–147
- Maria VL, Santos MA, Bebianno MJ (2009) Contaminant effects in shore crabs (*Carcinus maenas*) from Ria Formosa Lagoon. Comp Biochem Physiol Part C 150:196–208
- Marino IAM, Pujolar JM, Zane L (2011) Reconciling deep calibration and demographic history: Bayesian inference of post glacial colonization patterns in *Carcinus aestuarii* (Nardo, 1847) and *C. maenas* (Linnaeus, 1758). Plos ONE 6(12):e28567
- Markl J, Hofer A, Bauer G, Markl A, Kempter B, Brenzinger M, Linzen B (1979) Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. II. Crustacea J Comp Physiol 133:167–175
- Martin JL (1977) Relations entre le développement d'un phycomycète et l'accumulation de fer sur la surface branchiale de Carcinus maenas (Crustacé Décapode) au cours du cycle d'intermue. Vie Milieu 27: 91–100
- Martin-Diaz ML, Bamber S, Casado-Martinez C, Sales D, Del Valls TA (2004a) Toxicokinetics of heavy metals from a mining spill using *Carcinus maenas*. Mar Environ Res 58:833–837
- Martin-Diaz ML, Sales D, DelValls TA (2004b) Influence of salinity in hemolymph vitellogenin of the shore crab *Carcinus maenas*, to be used as a biomarker of contamination. Bull Environ Contam Toxicol 73:870–877
- Martin-Diaz ML, Villena-Lincoln A, Bamber S, Blasco J, DelValls TA (2005) An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. Chemosphere 58:615–626
- Martin-Diaz ML, Sales D, DelValls TA (2008) Toxicokinetic approach for the assessment of endocrine disruption effects of contaminated dredged material using female *Carcinus maenas*. Ecotoxicology 17: 495–503
- Martin-Diaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA (2009) The use of a kinetic biomarker approach for in situ monitoring of littoral sediments using the crab Carcinus maenas. Mar Environ Res 68:82–88
- Mason CF, MacDonald SM (1980) The winter diet of otters (*Lutra lutra*) on a Scottish sea loch. J Zool 192:558–561
- Matheson K, Gagnon P (2012a) Temperature mediates non-competitive foraging in indigenous rock (*Cancer irroratus* Say) and recently introduced green (*Carcinus maenas* L.) crabs from Newfoundland and Labrador. J Exp Mar Biol Ecol 414–415:6–18
- Matheson K, Gagnon P (2012b) Effects of temperature, body size, and chela loss on competition for a limited food resource between indigenous rock crab (*Cancer irroratus* Say) and recently introduced green crab (*Carcinus maenas* L.). J Exp Mar Biol Ecol 428: 49–56
- Matozzo V, Gallo C, Marin MG (2011a) Can starvation influence cellular and biochemical parameters to the crab *Carcinus aestuarii*? Mar Environ Res 71:207–212
- Matozzo V, Gallo C, Marin MG (2011b) Effects of temperature on cellular and biochemical parameters in the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). Mar Environ Res 71(5):351–356
- Matozzo V, Boscolo A, Marin MG (2013) Seasonal and gender related differences in morphometric features and cellular and biochemical parameters of *Carcinus aestuarii* from lagoon of Venice. Mar Environ Res 89:21–28
- McGaw IJ, Whiteley NM (2012) Effects of acclimation and acute temperature change on specific dynamic action and gastric processing in the green shore crab, *Carcinus maenas*. J Therm Biol 37:570–578
- McGaw IJ, Kaiser MJ, Naylor E, Hughes RN (1992) Intraspecific morphological variation related to the moult-cycle in colour forms of the shore crab *Carcinus maenas*. J Zool 228:351–359
- McKnight A, Mathews LM, Avery R, Lee KT (2000) Distribution is correlated with color phase in green crabs, *Carcinus maenas*

- (Linnaeus, 1758) in southern New England. Crustaceana 73:763-768
- Mesquita SR, Guilhermino L, Guimarães L (2011) Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. Chemosphere 85:967–976
- Minchin D (1997) The influence of the parasitic cirripede Sacculina carcini on its brachyuran host Carcinus maenas within its home range. In: Thresher, R.E. (ed.) Proceedings of the first international workshop on the demography, impacts and management of introduced populations of the European crab, Carcinus maenas. CRIMP Tech. Rep. 11. Centre for Research on Introduced Marine Pests, CSIRO Marine Laboratories, Hobart, Australia. p 81–86
- Moknes P-O (2004) Self-regulating mechanisms in cannibalistic populations of juvenile shore crabs *Carcinus maenas*. Ecology 85(5): 1343–1354
- Moksnes P-O (2002) The relative importance of habitat-specific settlement, predation, and juvenile dispersal for distribution and abundance of young juvenile shore crabs *Carcinus maenas* L. J Exp Mar Biol Ecol 271:41–73
- Montes Nieto R, Garcia-Barrera T, Gomez-Ariza JL, Lopez-Barea J (2010) Environmental monitoring of Domingo Rubio stream (Huelva Estuary, SW Spain) by combining conventional biomarkers and proteomic analysis in *Carcinus maenas*. Environ Pollut 158: 401–408
- Morales-Caselles C, Martin-Diaz ML, Riba I, Sarasquete C, DelValls TA (2008) Sublethal responses in caged organisms exposed to sediments affected by oil spills. Chemosphere 72:819–825
- Moreira SM, Moreira-Santos M, Guilhermino L, Ribeiro R (2006) An in situ postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations. Environ Pollut 139: 318–329
- Morgan DE, Goodsell J, Mathiessen GC, Garey J, Jacobson P (1980) Release of hatchery-reared bay scallops (*Argopecten irradians*) onto a shallow coastal bottom in Waterfor, Connecticut. Proc World Mariculture Soc 11:247–261
- Mori M, Mancon R, Fancuilli G (1990) Notes on the reproductive biology of *Carcinus aestuarii* Nardo (Crustacea, Decapoda) from the lagoon of San Teodoro (Island of Sardinia, Italy). Riv Idrobiol 29:763–774
- Mowles SL, Rundle SD, Cotton PA (2011) Susceptibility to predation affects trait-mediated indirect interactions by reversing interspecific competition. Plos ONE 6(8):e23068
- Munari M, Matozzo V, Marin MG (2010) Vitellogenin induction in the clam, *Ruditapes philippinarum*, and the crab, *Carcinus aestuarii*, from the lagoon of venice: a comparative study. Freseanius Environ Bull 19:2312–2317
- Nelson GA, Chase BC, Stockwell J (2003) Food habits of striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal waters of Massachusetts. J Northw Atl Fish Sci 3:21–25
- Ozbek M, Koçak C, Acarli D (2012) Reproductive biology of the Mediterranean Green Crab *Carcinus aestuarii* Nardo, 1847 (Crustacea, Brachyura, Portunidae) in Homa Lagoon, Aegean Sea, Turkey. Int J Oceanogr Hydrobiol 41:77–80
- Partridge L, French V (1996) Thermal evolution of ectotherm body size: why get big in the cold? In: Johnston IA, Bennett AF (eds) Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation. Cambridge University Press, Cambridge, pp 265–292
- Pascoal S, Creer S, Taylor MI, Queiroga H, Carvalho G, Mendo S (2009) Development and application of microsatellites in *Carcinus maenas*: genetic differentiation between Northern and Central Portuguese populations. Plos ONE 4(9):e7268
- Patamello T, Volckaert FAM, Castilho R (2007) Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? Mol Ecol 16:4426–4444
- PCSGA (Pacific Coast Shellfish Growers Association) (2003) Shellfish economy: treasure of the tidelands. Olympia, WA. http://www.pcsga.org



- Pedersen SN, Lundebye A-K (1996) Metallothionein and stress protein levels in shore crabs (*Carcinus maenas*) along a trace metal gradient in the Fal Estuary (UK). Mar Environ Res 42(1–4):241–246
- Pedersen KL, Pedersen SN, Hojrup P, Andersen JS, Roepstorff P, Knudsen J, Depledge MH (1994) Purification and characterization of a cadmium-induced metallothionein from the shore crab *Carcinus maenas* (L.). Biochem J 297:609–614
- Pedersen SN, Lundebye A-K, Depledge MH (1997) Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (Carcinus maenas) exposed to trace metals. Aquat Toxicol 37:183–200
- Pedersen SN, Pedersen KL, Hojrup P, Knudsen J, Depledge MH (1998) Induction and identification of cadmium-, zinc- and coppermetallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). Comp Biochem Physiol Part C 120:251–259
- Pereira E, Abreu SN, Coelho JP, Lopes CB, Pardal MA, Vale C, Duarte AC (2006) Seasonal fluctuations of tissue mercury contents in the European shore crab *Carcinus maenas* from low and high contamination areas (Ria de Aveiro, Portugal). Mar Pollut Bull 52:1450–1457
- Pereira P, De Pablo H, Dulce Subida M, Vale C, Pacheco M (2009) Biochemical responses of the shore crab (*Carcinus maenas*) in a eutrophic and metal-contaminated coastal system (Obidos lagoon, Portugal). Ecotoxicol Environ Saf 72:1471–1480
- Powell A, Rowley AF (2008) Tissue changes in the shore crab Carcinus maenas as a result of infection by the parasitic barnacle Sacculina carcini. Dis Aquat Org 80:75–79
- Queiroga H, Costlow JD, Moreira MH (1994) Larval abundance patterns of *Carcinus maenas* (Decapoda, Brachyura) in Canal de Mira (Ria de Aveiro, Portugal). Mar Ecol Prog Ser 111:63–72
- Rainbow PS, Black WH (2005) Cadmium, zinc and the uptake of calcium by two crabs, Carcinus maenas and Eriocheir sinensis. Aquat Toxicol 72:45–65
- Rainbow P, White SL (1989) Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. Hydrobiologia 174:245–262
- Rainbow PS, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Smith BD, Best SL, Nassiri Y, Langston WJ (1999) Trace metal uptake rates in crustaceans (amphipods and crabs) from coastal sites in NW Europe differentially enriched with trace metals. Mar Ecol Prog Ser 183:189–203
- Ramey PA, Teichman E, Oleksiak J, Balci F (2009) Spontaneous alternation in marine crabs: invasive versus native species. Behav Process 82:51–55
- Reid DG, Aldrich JC (1989) Variations in response to environmental hypoxia of different forms of the shore crab, *Carcinus maenas*. Comp Biochem Physiol Part A 29:535–539
- Reid DG, Abelló P, McGaw I, Naylor E (1989) Differential tolerances of desiccation and hypo-osmotic stress in sub- and inter-tidal *Carcinus maenas*. In: Aldrich JC (ed) Phenotypic responses in aquatic ectotherms. Japaga, Dublin, pp 89–96
- Relf JM, Chisholm JRS, Kemp GD, Smith VJ (1999) Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5 kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. Eur J Biochem 264:350–357
- Ricciardi F, Matozzo V, Marin MG (2008) Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction. Mar Pollut Bull 57:365–372
- Ricciardi F, Matozzo V, Binelli A, Marin MG (2010) Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: an integrated approach in biomonitoring estuarine environments. Water Res 44:1725–1736
- Rice AL, Ingle RW (1975) The larval development of Carcinus maenas (L.) and C. mediterraneus Czerniavsky (Crustacea, Brachyura, Portunidae) reared in the laboratory. Bull Br Mus (Zool) 28:103–119
- Robinson EM, Smee DL, Trussell GC (2011) Green crab (*Carcinus maenas*) foraging efficiency reduced by fast flows. Plos ONE 6(6): e21025

- Rodrigues AP, Oliveira PC, Guilhermino L, Guimaraes L (2012) Effects of salinity stress on neurotransmission, energy metabolism, and antioxidant biomarkers of *Carcinus maenas* from two estuaries of the NW Iberian Peninsula. Mar Biol 159:2061–2074
- Rodrigues AP, Gravato C, Guimaraes L (2013a) Involvement of the antioxidant system in differential sensitivity of *Carcinus maenas* to fenitrothion exposure. Environ Sci Process Impacts 15:1938–1948
- Rodrigues AP, Lehtonen KK, Guilhermino L, Guimaraes L (2013b) Exposure of *Carcinus maenas* to waterborne fluoranthene: accumulation and multibiomarker responses. Sci Total Environ 443:454–463
- Roman J, Palumbi SR (2004) A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. Mol Ecol 13:2891–2898
- Ropes JW (1968) The feeding habits of the green crab *Carcinus maenas* (L.). J Exp Mar Biol Ecol 67:183–201
- Ross DJ, Johnson CR, Hewitt CL, Ruiz GM (2004) Interaction and impacts of two introduced species on a soft-sediment marine assemblage in SE Tasmania. Mar Biol 144:747–756
- Rossong MA, Quijo'N PA, Snelgrove PVR, Barrett TJ, McKenzie CH, Locke A (2012) Regional differences in foraging behaviour of invasive green crab (*Carcinus maenas*) populations in Atlantic Canada. Biol Invasions 14:659–669
- Roudez RJ, Glover T, Weis JS (2007) Learning in an invasive and a native predatory crab. Biol Invasions 10:1191–1196
- Rubiliani C (1983) Action of a rhizocephalan on the genital activity of host male crabs: characterization of a parasitic secretion inhibiting spermatogenesis. Int J Invertebr Reprod 6:137–147
- Ruiz GM, Carlton JT, Grosholz ED, Hines AH (1997) Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent, and consequences. Am Zool 37:621–632
- Rumrill SS (1990) Natural mortality of marine invertebrate larvae. Ophelia 32:163–198
- Sanviti G, Romestand B, Trilles JP (1981) Les sacculines (*Sacculina carcini* Thompson, 1836) de *Carcinus mediterraneus* et *Pachygraspus marmoratus*: comparaison immunochemique: étude comparée de leur influence sur la composition protéique de l'hémolymphe des deux hôtes. Parasitol Res 64:243–251
- Saville DH, Irwin SW (2005) A study of the mechanisms by which the cercariae of *Microphallus primas* (Jag, 1909) Stunkard, 1957 penetrate the shore crab, *Carcinus maenas* (L). Parasitology 131(Pt4): 521–529
- Schnapp D, Kemp GD, Smith VJ (1996) Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. Eur J Biochem 240:532–539
- See KE, Feist BE (2010) Reconstructing the range expansion and subsequent invasion of introduced European green crab along the west coast of the United States. Biol Invasions 12:1305–1318
- Shanks AL, Grantham BA, Carr MH (2003) Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. Ecol Appl 13(1):S159–S169
- Smith VJ, Chisholm JRS (2001) Antimicrobial proteins in crustaceans.
  In: Beck G, Sugurmaran M, Cooper EL (eds) Advances in experimental medicine and biology, vol 484. Kluwer, Netherlands, pp 95–112
- Somero GN (2002) Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. Integr Comp Biol 42: 780–789
- Squires HJ (1990) Decapod Crustacea of the Atlantic Coast of Canada. Department of Fisheries and Oceans. pp 22
- Stentiford GD, Feist SW (2005) A histopathological survey of shore crab (*Carcinus maenas*) and brown shrimp (*Crangon crangon*) from six estuaries in the United Kingdom. J Invertebr Pathol 88:136–146
- Stentiford GD, Bateman KS, Stokes NA, Carnegie RB (2013) Haplosporidium littoralis sp. nov. a crustacean pathogen within

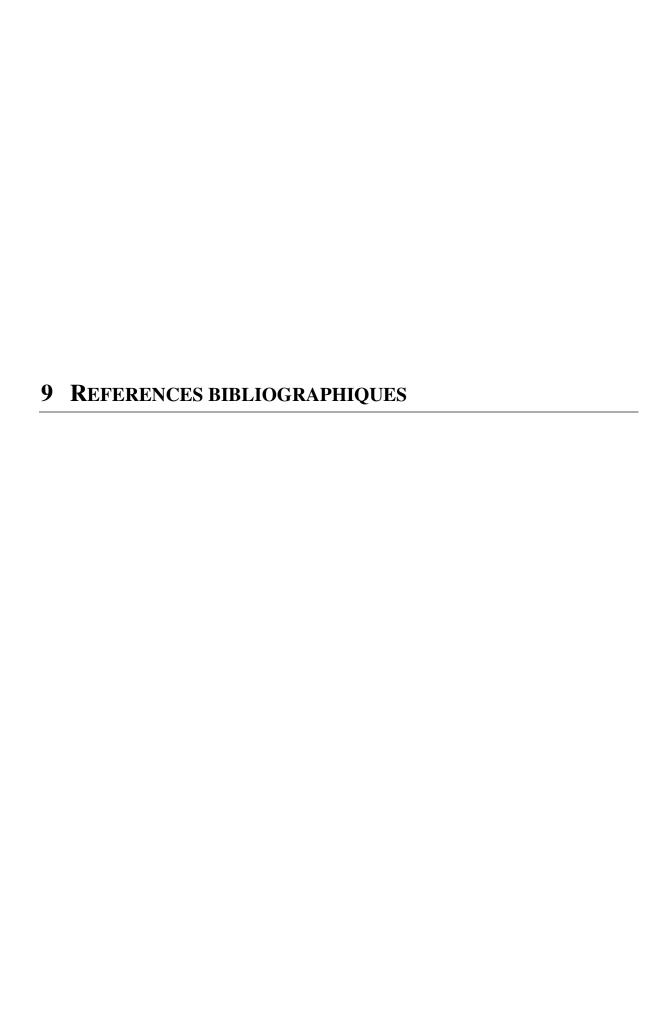


- the Haplosporida (Cercozoa, Ascetosporea). Dis Aquat Org 105: 243–252
- Stewart SC, Dick JTA, Laming PR, Gerhardt A (2010) Assessment of the multispecies freshwater biomonitor (MFB) in a marine context: the Green crab (*Carcinus maenas*) as an early warning indicator. J Environ Monit 12:1566–1574
- Styrishave B, Rewitz K, Andersen O (2004) Frequency of moulting by shore crabs *Carcinus maenas* (L.) changes their colour and their success in mating and physiological performance. J Exp Mar Biol Ecol 313:317–336
- Tepolt CK, Somero GN (2013) Master of all trades: thermal acclimation and adaptation of cardiac function in a broadly distributed marine invasive species, the European green crab, *Carcinus maenas*. J Exp Biol 217:1129–1138
- Tepolt CK, Bagley MJ, Geller JB, Blum MJ (2006) Characterization of microsatellite loci in the European green crab (*Carcinus maenas*). Mol Ecol 6:343–345
- Tepolt CK, Darling JA, Bagley MJ (2009) European green crabs (Carcinus maenas) in the northeastern Pacific: genetic evidence for high population connectivity and current mediated expansion from a single introduced source population. Divers Distrib 15:997–1009
- Thresher RE, Werner M, Høeg T, Svane I, Glenner H, Murphy NE, Wittwer C (2000) Developing the options for managing marine pests: specificity trials on the parasitic castrator, *Sacculina carcini*, against the European crab, *Carcinus maenas*, and related species. J Exp Mar Biol Ecol 25:37–51
- Thresher RE, Proctor C, Ruiz G, Gurney R, MacKinnon C, WaltonW RL, Bax N (2003) Invasion dynamics of the European shore crab, *Carcinus maenas*, in Australia. Mar Biol 142:867–876
- Tincu JA, Taylor SW (2004) Antimicrobial peptides from marine invertebrates. Antimicrob Agents Chemother 48:3645–3654
- Todd PA, Ladle RJ, Briers RA, Brunton A (2005) Quantifying twodimensional dichromatic patterns using a photographic technique: case study on the shore crab (*Carcinus maenas* L.). Ecol Res 20: 497–501
- Torchin ME, Lafferty KD, Kuris AM (1996) Infestation of an introduced host, the European green crab, *Carcinus maenas*, by a symbiotic nemertean egg predator, *Carcinonemertes epialti*. J Parasitol 82(3): 449–453
- Torchin ME, Lafferty KD, Kuris AM (2001) Release from parasites as natural enemies: increased performance of a globally introduced marine crab. Biol Invasions 3:333–345
- Towle DW, Smith CM (2006) Gene discovery in *Carcinus maenas* and *Homarus americanus* via expressed sequence tags. Integr Comp Biol 46(6):912–918

- Towle DW, Rushton ME, Heidysch D, Magnani JJ, Rose MJ, Anstutz A, Jordan MM, Shearer DW, Wu WS (1997) Sodium/proton antiporter in the euryhaline *Carcinus maenas*: molecular cloning, expression and tissue distribution. J Exp Biol 200:1003–1014
- Towle DW, Terwilliger NB, Henry RP (2008) Hypotonic stress alters expression of genes encoding transcription factors, protein homeostasis enzymes, mitochondrial proteins, and transport proteins in gills of the euryhaline green crab (*Carcinus maenas*). Comp Biochem Physiol Part A 151:S37–S43
- Towle DW, Henry RP, Terwilliger NB (2011) Microarray-detected changes in gene expression in gills of green crabs (*Carcinus maenas*) upon dilution of environmental salinity. Comp Biochem Physiol Part D 6: 115–125
- Truchot JP (1980) Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. J Exp Zool 214:205–208
- Truscott R, White KN (1990) The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. Funct Ecol 4:455–461
- Vedel GR, Depledge MH (1995) Stress-70 levels in the gills of *Carcinus maenas* exposed to copper. Mar Pollut Bull 31(1–3):84–86
- Vinuesa JH (2007) Molt and reproduction of the European crab Carcinus maenas (Decapoda: Portunidae) in Patagonia, Argentina. Rev Biol Trop 55:49–54
- Vlak JM, Bonami JR, Flegel TW, Kou GH, Lightner DV, Lo CF, Loh PC, Walker PW (2005) Nimaviridae. In: Fauquet CM, Mayo J, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) Virus Taxonomy Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam, pp 187–192
- Wallace JC (1973) Feeding, starvation and metabolic rate in the shore crab *Carcinus maenas*. Mar Biol 20(4):277–281
- Weber RE, Behrens JW, Malte H, Fago A (2008) Thermodynamics of oxygenation-linked proton and lactate binding govern the temperature sensitivity of O<sub>2</sub> binding in crustacean (*Carcinus maenas*) hemocyanin. J Exp Biol 211:1057–1062
- Wheatly MG (1981) The provision of oxygen to developing eggs by female shore crabs (*Carcinus maenas*). J Mar Biol Assoc UK 61: 117–128
- Whitlow WL, Rice NA, Sweeney C (2003) Native species vulnerability to introduced predators: testing an inducible defense and a refuge from predation. Biol Invasions 6:23–31
- Zanders IP (1980) Regulation of blood ions in *Carcinus maenas* (L.). Comp Biochem Physiol Part A 65:97–108
- Zetlmeisl C, Hermann J, Petney T, Glenner H, Griffiths C, Taraschewski H (2011) Parasites of the shore crab *Carcinus maenas* (L.): implications for reproductive potential and invasion success. Parasitology 138:391–401



		-



- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinforma. Oxf. Engl. 21, 2104–2105. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti263
- Abraham, J.P., Baringer, M., Bindoff, N.L., Boyer, T., Cheng, L.J., Church, J.A., Conroy, J.L., Domingues, C.M., Fasullo, J.T., Gilson, J., Goni, G., Good, S.A., Gorman, J.M., Gouretski, V., Ishii, M., Johnson, G.C., Kizu, S., Lyman, J.M., Macdonald, A.M., Minkowycz, W.J., Moffitt, S.E., Palmer, M.D., Piola, A.R., Reseghetti, F., Schuckmann, K., Trenberth, K.E., Velicogna, I., Willis, J.K., 2013. A review of global ocean temperature observations: Implications for ocean heat content estimates and climate change. Rev. Geophys. 51, 450–483. https://doi.org/10.1002/rog.20022
- Abuhagr, A.M., MacLea, K.S., Chang, E.S., Mykles, D.L., 2014. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling genes in decapod crustaceans: Cloning and tissue expression of mTOR, Akt, Rheb, and p70 S6 kinase in the green crab, *Carcinus maenas*, and blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 168, 25–39. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.11.008
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T.J., Nielsen, M., Hussain, S.M., Rowe, J.J., 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 242, 263–269. https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.10.016
- Akbarzadeh, A., Leder, E.H., 2016. Acclimation of killifish to thermal extremes of hot spring: Transcription of gonadal and liver heat shock genes. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 191, 89–97. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.008
- Alahiotis, S.N., Stephanou, G., 1982. Temperature adaptation of Drosophila populations. The heat shock proteins system. Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem. 73, 529–533.
- Alderson, T.R., Kim, J.H., Cai, K., Frederick, R.O., Tonelli, M., Markley, J.L., 2014. The specialized Hsp70 (HscA) Interdomain Linker binds to its Nucleotide-Binding Domain and stimulates ATP hydrolysis in both *cis* and *trans* Configurations. Biochemistry (Mosc.) 53, 7148–7159. https://doi.org/10.1021/bi5010552
- Altincicek, B., Knorr, E., Vilcinskas, A., 2008. Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. Dev. Comp. Immunol. 32, 585–595. https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.09.005
- Aprile, F.A., Dhulesia, A., Stengel, F., Roodveldt, C., Benesch, J.L.P., Tortora, P., Robinson, C.V., Salvatella, X., Dobson, C.M., Cremades, N., 2013. Hsp70 oligomerization is mediated by an interaction between the Interdomain Linker and the Substrate-Binding Domain. PLoS ONE 8, e67961. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067961
- Arakawa, A., Handa, N., Ohsawa, N., Shida, M., Kigawa, T., Hayashi, F., Shirouzu, M., Yokoyama, S., 2010. The C-Terminal BAG Domain of BAG5 induces conformational changes of the Hsp70 Nucleotide- Binding Domain for ADP-ATP exchange. Structure 18, 309–319. https://doi.org/10.1016/j.str.2010.01.004
- Arrigo, A.-P., Fakan, S., Tissières, A., 1980. Localization of the heat shock-induced proteins in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. Dev. Biol. 78, 86–103. https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90320-6
- Artavanis-Tsakonas, S., Schedl, P., Mirault, M.-E., Moran, L., Lis, J., 1979. Genes for the 70,000 dalton heat shock protein in two cloned *D. melanogaster* DNA segments. Cell 17, 9–18. https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90290-3
- Aruda, A.M., Baumgartner, M.F., Reitzel, A.M., Tarrant, A.M., 2011. Heat shock protein expression during stress and diapause in the marine copepod *Calanus finmarchicus*. J. Insect Physiol. 57, 665–675. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.007

- Ashburner, M., 1970. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila. V. Responses to environmental treatments. Chromosoma 31, 356–376.
- Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.-Y., Patterson, C., 1999. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with Heat Shock Proteins and negatively regulates chaperone functions. Mol. Cell. Biol. 19, 4535–4545.
- Bardwell, J.C., Craig, E.A., 1984. Hsp70 duplication in the *Drosophila melanogaster* species group: how and when did two become five? Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81, 848–852.
- Baringou, S., Rouault, J.-D., Koken, M., Hardivillier, Y., Hurtado, L., Leignel, V., 2016. Diversity of cytosolic HSP70 Heat shock protein from decapods and their phylogenetic placement within Arthropoda. Gene. https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.061
- Bedulina, D.S., Evgen'ev, M.B., Timofeyev, M.A., Protopopova, M.V., Garbuz, D.G., Pavlichenko, V.V., Luckenbach, T., Shatilina, Z.M., Axenov-Gribanov, D.V., Gurkov, A.N., Sokolova, I.M., Zatsepina, O.G., 2013. Expression patterns and organization of the hsp70 genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (*Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*) from Lake Baikal. Mol. Ecol. 22, 1416–1430. https://doi.org/10.1111/mec.12136
- Benhamed, S., Guardiola, F.A., Martínez, S., Sánchez, M.J.M., Sirvent, C.P., Mars, M., Esteban, M.A., 2016. Exposure of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) to sediments contaminated with heavy metals down-regulates the gene expression of stress biomarkers. Toxicol. Rep. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.02.006
- Beristain, P., Gajardo, G., Bossier, P., 2010. Species-specific RFLP pattern in the Heat Shock Protein26 gene (Hsp26): a single-locus tool for species identification and experimental testing of habitat-induced isolation in the New World Artemia species. Mol. Ecol. Resour. 10, 229–231. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02744.x
- Bettencourt, B.R., Feder, M.E., 2001. Hsp70 duplication in the *Drosophila melanogaster* species group: how and when did two become five? Mol. Biol. Evol. 18, 1272–1282.
- Bettencourt, B.R., Hogan, C.C., Nimali, M., Drohan, B.W., 2008. Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of Hsp70 copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for loss of thermotolerance in Hsp70 null flies. BMC Biol. 6, 5. https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-5
- Bluhm, W.F., Martin, J.L., Mestril, R., Dillmann, W.H., 1998. Specific heat shock proteins protect microtubules during simulated ischemia in cardiac myocytes. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 275, H2243–H2249.
- Boone, A.N., Vijayan, M.M., 2002. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 132, 223–233. https://doi.org/10.1016/s1532-0456(02)00066-2
- Boorstein, W.R., Craig, E.A., 1990. Transcriptional regulation of SSA3, an HSP70 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10, 3262–3267. https://doi.org/10.1128/mcb.10.6.3262
- Boorstein, W.R., Ziegelhoffer, T., Craig, E.A., 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. J. Mol. Evol. 38, 1–17. https://doi.org/10.1007/BF00175490
- Boshoff, A., 2015. Chaperonin-co-chaperonin interactions. Subcell. Biochem. 78, 153–178. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11731-7\_8
- Böttinger, L., Oeljeklaus, S., Guiard, B., Rospert, S., Warscheid, B., Becker, T., 2015. Mitochondrial heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp10 cooperate in the formation of Hsp60 complexes. J. Biol. Chem. 290, 11611–11622. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642017

- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. Gene 329, 147–157. https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.12.027
- Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M., Moraga, D., 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Cell Stress Chaperones 8, 76–85. https://doi.org/10.1379/1466-1268(2003)8<76:miaeoh>2.0.co;2
- Boyd, W.A., Smith, M.V., Freedman, J.H., 2012. *Caenorhabditis elegans* as a model in developmental toxicology. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 889, 15–24. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-867-2 3
- Bracher, A., Verghese, J., 2015. GrpE, Hsp110/Grp170, HspBP1/Sil1 and BAG domain proteins: Nucleotide Exchange Factors for Hsp70 molecular chaperones, in: Blatch, G.L., Edkins, A.L. (Eds.), The Networking of Chaperones by Co-Chaperones. Springer International Publishing, pp. 1–33.
- Brocchieri, L., Conway de Macario, E., Macario, A.J., 2008. hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. BMC Evol. Biol. 8, 19. https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-19
- Bross, P., Tanguay, R.M., 2016. Mitochondrial Hsp70 and the troubles of nomenclature: leaving behind tradition to gain intuitiveness and clarity. Cell Stress Chaperones 1–5. https://doi.org/10.1007/s12192-016-0700-x
- Brown, T., Bourne, D., Rodriguez-Lanetty, M., 2013. Transcriptional activation of c3 and hsp70 as part of the immune response of *Acropora millepora* to bacterial challenges. PLoS ONE 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067246
- Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S.A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A.P., Kroemer, G., Solary, E., Garrido, C., 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. Nat. Cell Biol. 2, 645–652. https://doi.org/10.1038/35023595
- Bückle, L.F., Díaz, F., Espina, S., 1996. Thermoregulatory behavior applied to the culture of *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae). Rev. Biol. Trop. J. Trop. Biol. Conserv. 44, 123–126. https://doi.org/10.15517/rbt.v44i1.21564
- Buckley, B.A., Gracey, A.Y., Somero, G.N., 2006. The cellular response to heat stress in the goby *Gillichthys mirabilis*: a cDNA microarray and protein-level analysis. J. Exp. Biol. 209, 2660–2677. https://doi.org/10.1242/jeb.02292
- Buckley, B.A., Hofmann, G.E., 2002. Thermal acclimation changes DNA-binding activity of heat shock factor 1 (HSF1) in the goby *Gillichthys mirabilis*: implications for plasticity in the heat-shock response in natural populations. J. Exp. Biol. 205, 3231–3240.
- Buckley, B.A., Owen, M.E., Hofmann, G.E., 2001. Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus Mytilus) changes as a function of thermal history. J. Exp. Biol. 204, 3571–3579.
- Burdon, R.H., 1986. Heat shock and the heat shock proteins. Biochem. J. 240, 313–324.
- Calderwood, S.K., Mambula, S.S., Gray, P.J., Theriault, J.R., 2007. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. FEBS Lett. 581, 3689–3694. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.044
- Campanella, C., Bucchieri, F., Ardizzone, N.M., Marino Gammazza, A., Montalbano, A., Ribbene, A., Di Felice, V., Bellafiore, M., David, S., Rappa, F., Marasà, M., Peri, G., Farina, F., Czarnecka, A.M., Conway de Macario, E., Macario, A.J.L., Zummo, G., Cappello, F., 2008. Upon oxidative stress, the antiapoptotic Hsp60/procaspase-3 complex persists in mucoepidermoid carcinoma cells. Eur. J. Histochem. EJH 52, 221–228. https://doi.org/10.4081/1220
- Carey, H.V., Sills, N.S., Gorham, D.A., 1999. Stress Proteins in Mammalian Hibernation. Am. Zool. 39, 825–835. https://doi.org/10.1093/icb/39.6.825

- Carra, S., Boncoraglio, A., Kanon, B., Brunsting, J.F., Minoia, M., Rana, A., Vos, M.J., Seidel, K., Sibon, O.C.M., Kampinga, H.H., 2010. Identification of the Drosophila ortholog of HSPB8: implication of HSPB8 loss of function in protein folding diseases. J. Biol. Chem. 285, 37811–37822. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.127498
- Cascella, K., Jollivet, D., Papot, C., Léger, N., Corre, E., Ravaux, J., Clark, M.S., Toullec, J.-Y., 2015. Diversification, evolution and sub-functionalization of 70kDa Heat-Shock Proteins in two sister species of Antarctic krill: Differences in thermal habitats, responses and implications under climate change. PLoS ONE 10, e0121642. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121642
- Catanzariti, A.-M., Soboleva, T.A., Jans, D.A., Board, P.G., Baker, R.T., 2004. An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins. Protein Sci. 13, 1331–1339. https://doi.org/10.1110/ps.04618904
- Cesar, J.R.O., Yang, J., 2007. Expression patterns of ubiquitin, heat shock protein 70, α-actin and β-actin over the molt cycle in the abdominal muscle of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. Mol. Reprod. Dev. 74, 554–559. https://doi.org/10.1002/mrd.20605
- Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Ekinci, D., Erdoğan, O., Çiltaş, A., Kocaman, E.M., 2010. Deltamethrin attenuates antioxidant defense system and induces the expression of heat shock protein 70 in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 152, 215–223. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.04.008
- Cheetham, M.E., Caplan, A.J., 1998. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. Cell Stress Chaperones 3, 28–36. https://doi.org/10.1379/1466-1268(1998)003<0028:sfaeod>2.3.co;2
- Chen, B., Jia, T., Ma, R., Zhang, B., Kang, L., 2011. Evolution of Hsp70 gene expression: A role for changes in AT-Richness within promoters. PLoS ONE 6, e20308. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020308
- Chen, M., Clark, R.S., Kochanek, P.M., Chen, J., Schiding, J.K., Stetler, R.A., Simon, R.P., Graham, S.H., 1998. 72-kDa heat shock protein and mRNA expression after controlled cortical impact injury with hypoxemia in rats. J. Neurotrauma 15, 171–181. https://doi.org/10.1089/neu.1998.15.171
- Chen, W., Li, D., Zhang, M., Zhao, Y., Wu, W., Zhang, G., 2015. Cloning and differential expression of five heat shock protein genes associated with thermal stress and development in the polyphagous predatory mite *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae). Exp. Appl. Acarol. 67, 65–85. https://doi.org/10.1007/s10493-015-9933-0
- Cheng, S.H., So, C.H., Chan, P.K., Cheng, C.W., 2003. Cloning of the HSP70 gene in barnacle larvae and its expression under hypoxic conditions. Mar. Pollut. Bull. 46, 665–671. https://doi.org/10.1016/s0025-326x(03)00059-6
- Chuang, K.-H., Ho, S.-H., Song, Y.-L., 2007. Cloning and expression analysis of heat shock cognate 70 gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Gene 405, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.08.016
- Clarkson, K., Kieffer, J.D., Currie, S., 2005. Exhaustive exercise and the cellular stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 140, 225–232. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.01.009
- Clayton, M.E., Steinmann, R., Fent, K., 2000. Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. Aquat. Toxicol. 47, 213–226. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00022-3
- Colson-Proch, C., Morales, A., Hervant, F., Konecny, L., Moulin, C., Douady, C.J., 2010. First cellular approach of the effects of global warming on groundwater organisms: a study of the HSP70 gene expression. Cell Stress Chaperones 15, 259–270. https://doi.org/10.1007/s12192-009-0139-4

- Cottin, D., Foucreau, N., Hervant, F., Piscart, C., 2015. Differential regulation of hsp70 genes in the freshwater key species *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) exposed to thermal stress: effects of latitude and ontogeny. J. Comp. Physiol. B 185, 303–313. https://doi.org/10.1007/s00360-014-0885-1
- Cottin, D., Shillito, B., Chertemps, T., Thatje, S., Léger, N., Ravaux, J., 2010. Comparison of heat-shock responses between the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* and the related coastal shrimp *Palaemonetes varians*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 393, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.06.008
- Couturier, M., Buccellato, M., Costanzo, S., Bourhis, J.-M., Shu, Y., Nicaise, M., Desmadril, M., Flaudrops, C., Longhi, S., Oglesbee, M., 2009. High affinity binding between Hsp70 and the C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein requires an Hsp40 co-chaperone. J. Mol. Recognit. n/a-n/a. https://doi.org/10.1002/jmr.982
- Craig, E.A., Gambill, B.D., Nelson, R.J., 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. Microbiol. Rev. 57, 402–414.
- Craig, E.A., Ingolia, T.D., Manseau, L.J., 1983. Expression of Drosophila heat-shock cognate genes during heat shock and development. Dev. Biol. 99, 418–426. https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90291-9
- Craig, E.A., Jacobsen, K., 1984. Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature sensitive growth. Cell 38, 841–849. https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90279-4
- Craig, E.A., Schlesinger, M.J., 1985. The Heat Shock Respons. CRC Crit. Rev. Biochem. 18, 239–280. https://doi.org/10.3109/10409238509085135
- Cruz-Rodríguez, L.A., Chu, F.-L.E., 2002. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. Aquat. Toxicol. 60, 157–168. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00008-5
- Cui, Z., Liu, Y., Luan, W., Li, Q., Wu, D., Wang, S., 2010. Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70 gene in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). Fish Shellfish Immunol. 28, 56–64. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.09.018
- Currie, S., Boutilier, R.G., 2001. Strategies of hypoxia and anoxia tolerance in cardiomyocytes from the overwintering common frog, *Rana temporaria*. Physiol. Biochem. Zool. PBZ 74, 420–428. https://doi.org/10.1086/320424
- Daugaard, M., Rohde, M., Jäättelä, M., 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. FEBS Lett. 581, 3702–3710. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.039
- Deane, E.E., 2004. Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). AJP Regul. Integr. Comp. Physiol. 287, R1054–R1063. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00347.2004
- De Pomerai, D.I., 1996. Review: Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. Hum. Exp. Toxicol. 15, 279–285. https://doi.org/10.1177/096032719601500401
- Demand, J., Lüders, J., Höhfeld, J., 1998. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. Mol. Cell. Biol. 18, 2023–2028. https://doi.org/10.1128/MCB.18.4.2023
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 1995. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 33, 245–3.
- Domeneghetti, S., Varotto, L., Civettini, M., Rosani, U., Stauder, M., Pretto, T., Pezzati, E., Arcangeli, G., Turolla, E., Pallavicini, A., Venier, P., 2014. Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro

- lagoon, Italy). Fish Shellfish Immunol., Special Issue: ISFSI 2013 review 41, 37–44. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.023
- Dong, Y., Dong, S., 2008. Induced thermotolerance and expression of heat shock protein 70 in sea cucumber Apostichopus japonicus. Fish. Sci. 74, 573–578. https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01560.x
- Dong, Y., Miller, L.P., Sanders, J.G., Somero, G.N., 2008. Heat-Shock Protein 70 (Hsp70) Expression in four limpets of the genus Lottia: Interspecific variation in constitutive and inducible synthesis correlates with in situ exposure to heat stress. Biol. Bull. 215, 173–181. https://doi.org/10.2307/25470698
- Downs, C.A., Dillon Jr., R.T., Fauth, J.E., Woodley, C.M., 2001. A molecular biomarker system for assessing the health of gastropods (*Ilyanassa obsoleta*) exposed to natural and anthropogenic stressors. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259, 189–214. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00233-7
- Doyle, S.M., Wickner, S., 2009. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. Trends Biochem. Sci. 34, 40–48. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.09.010
- Du Laing, G., Rinklebe, J., Vandecasteele, B., Meers, E., Tack, F.M.G., 2009. Trace metal behaviour in estuarine and riverine floodplain soils and sediments: a review. Sci. Total Environ. 407, 3972–3985. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.025
- Eder, K.J., Leutenegger, C.M., Köhler, H.-R., Werner, I., 2009. Effects of neurotoxic insecticides on heat-shock proteins and cytokine transcription in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 182–190. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.04.020
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinforma. Oxf. Engl. 27, 2194–2200. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381
- Efremova, S.M., Margulis, B.A., Guzhova, I.V., Itskovich, V.B., Lauenroth, S., Müller, W.E.G., Schröder, H.C., 2002. Heat shock protein Hsp70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 57, 267–280. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00209-0
- Ellis, J., 1987. Proteins as molecular chaperones. Nature 328, 378–379. https://doi.org/10.1038/328378a0
- Ellis, R.J., 1990. The molecular chaperone concept. Semin. Cell Biol. 1, 1–9.
- Ellis, R.J., van der Vies, S.M., 1991. Molecular chaperones. Annu. Rev. Biochem. 60, 321–347. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.001541
- Evgen'ev, M.B., Garbuz, D.G., Zatsepina, O.G., 2014. Heat Shock Proteins and whole body adaptation to extreme environments. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Fan, C.-Y., Lee, S., Cyr, D.M., 2003. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. Cell Stress Chaperones 8, 309. https://doi.org/10.1379/1466-1268(2003)008<0309:mfrohf>2.0.co;2
- Farcy, É., Voiseux, C., Lebel, J.-M., Fiévet, B., 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. Cell Stress Chaperones 14, 371–380. https://doi.org/10.1007/s12192-008-0091-8
- Feder, M.E., Bedford, T.B.C., Albright, D.R., Michalak, P., 2002. Evolvability of Hsp70 expression under artificial election for inducible thermotolerance in independent populations of *Drosophila melanogaster*. Physiol. Biochem. Zool. PBZ 75, 325–334. https://doi.org/10.1086/342350
- Feder, M.E., Cartaño, N.V., Milos, L., Krebs, R.A., Lindquist, S.L., 1996. Effect of engineering Hsp70 copy number on Hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. J. Exp. Biol. 199, 1837–1844.

- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. 61, 243–282. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243
- Feder, M.E., Krebs, R.A., 1997. Ecological and evolutionary physiology of heat shock proteins and the stress response in Drosophila: Complementary insights from genetic engineering and natural variation, in: Bijlsma, D.R., Loeschcke, D.V. (Eds.), Environmental Stress, Adaptation and Evolution, Experientia Supplementum. Birkhäuser Basel, pp. 155–173.
- Fink, A.L., 1999. Chaperone-mediated protein folding. Physiol. Rev. 79, 425–449.
- Fontaine, S.N., Martin, M.D., Dickey, C.A., 2016. Neurodegeneration and the Heat Shock Protein 70 Machinery: Implications for Therapeutic Development. Curr. Top. Med. Chem. https://doi.org/10.2174/1568026616666160413140741
- Franzellitti, S., Fabbri, E., 2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 1157–1163. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.244
- Freeman, B.C., Toft, D.O., Morimoto, R.I., 1996. Molecular chaperone machines: Chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. Science 274, 1718–1720. https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1718
- Fu, W., Zhang, F., Liao, M., Liu, M., Zheng, B., Yang, H., Zhong, M., 2013. Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic heat shock protein 70 gene from mud crab *Scylla serrata*. Fish Shellfish Immunol. 34, 1306–1314. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.027
- Gammazza, A.M., Bavisotto, C.C., Barone, R., de Macario, E.C., Macario, A.J.L., 2016. Alzheimer's disease and molecular chaperones: Current knowledge and the future of chaperonotherapy. Curr. Pharm. Des.
- Gao, H., Li, Z., Lai, X., Xue, B., Yan, B., Cheng, H., Pan, Q., 2016. A new heat shock protein 70 gene (HSC70) and its expression profiles in response to cadmium stress and after different post-moulting times in *Exopalaemon carinicauda* (Holthuis, 1950) (Decapoda, Palaemonidae). Crustaceana 89, 321–336. https://doi.org/10.1163/15685403-00003520
- Garbuz, D., Evgenev, M.B., Feder, M.E., Zatsepina, O.G., 2003. Evolution of thermotolerance and the heat-shock response: evidence from inter/intraspecific comparison and interspecific hybridization in the virilis species group of Drosophila. I. Thermal phenotype. J. Exp. Biol. 206, 2399–2408. https://doi.org/10.1242/jeb.00429
- Garbuz, D.G., Yushenova, I.A., Zatsepina, O.G., Przhiboro, A.A., Bettencourt, B.R., Evgen'ev, M.B., 2011. Organization and evolution of hsp70 clusters strikingly differ in two species of Stratiomyidae (Diptera) inhabiting thermally contrasting environments. BMC Evol. Biol. 11, 74. https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-74
- Garrido, C., Paul, C., Seigneuric, R., Kampinga, H.H., 2012. The small heat shock proteins family: The long forgotten chaperones. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44, 1588–1592. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.022
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. 'everine, Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The Proteomics Protocols Handbook 531–552. https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531
- Ghosh, J.C., Dohi, T., Kang, B.H., Altieri, D.C., 2008. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. J. Biol. Chem. 283, 5188–5194. https://doi.org/10.1074/jbc.M705904200
- Girilal, M., Krishnakumar, V., Poornima, P., Mohammed Fayaz, A., Kalaichelvan, P.T., 2015. A comparative study on biologically and chemically synthesized silver nanoparticles induced Heat Shock Proteins on fresh water fish *Oreochromis niloticus*. Chemosphere 139, 461–468. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.005

- Grabe, N., 2002. AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. In Silico Biol. 2, S1-15.
- Gupta, S., Knowlton, A.A., 2005. HSP60, Bax, apoptosis and the heart. J. Cell. Mol. Med. 9, 51–58.
- Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K., 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? Life Sci. 86, 377–384. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.12.015
- Gupta, S.C., Siddique, H.R., Mathur, N., Mishra, R.K., Saxena, D.K., Chowdhuri, D.K., 2007. Adverse effect of organophosphate compounds, dichlorvos and chlorpyrifos in the reproductive tissues of transgenic *Drosophila melanogaster*: 70kDa heat shock protein as a marker of cellular damage. Toxicology 238, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.05.017
- Guven, K., De Pomerai, D.I., 1995. Differential expression of HSP70 proteins in response to heat and cadmium in *Caenorhabditis elegans*. J. Therm. Biol. 20, 355–363. https://doi.org/10.1016/0306-4565(94)00071-P
- Guven, K., Duce, J.A., de Pomerai, D.I., 1994. Evaluation of a stress-inducible transgenic nematode strain for rapid aquatic toxicity testing. Aquat. Toxicol. 29, 119–137. https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)90052-3
- Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M., Feldgarden, M., Ward, D.V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S.K., Sodergren, E., Methe, B., DeSantis, T.Z., The Human Microbiome Consortium, Petrosino, J.F., Knight, R., Birren, B.W., 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. Genome Res. 21, 494–504. https://doi.org/10.1101/gr.112730.110
- Habich, C., Kempe, K., van der Zee, R., Burkart, V., Kolb, H., 2003. Different heat shock protein 60 species share pro-inflammatory activity but not binding sites on macrophages. FEBS Lett. 533, 105–109. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03772-9
- Hallare, A.V., Pagulayan, R., Lacdan, N., Köhler, H.R., Triebskorn, R., 2005. Assessing water quality in a tropical lake using biomarkers in zebrafish embryos: developmental toxicity and stress protein responses. Environ. Monit. Assess. 104, 171–187. https://doi.org/10.1007/s10661-005-1610-z
- Halloran, M.C., Sato-Maeda, M., Warren, J.T., Su, F., Lele, Z., Krone, P.H., Kuwada, J.Y., Shoji, W., 2000. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. Dev. Camb. Engl. 127, 1953–1960.
- Hamer, B., Hamer, D.P., Müller, W.E., Batel, R., 2004. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. Environ. Int. 30, 873–882. https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.008
- Hardilová, Š., Havrdová, M., Panáček, A., Kvítek, L., Zbořil, R., 2015. Hsp70 as an indicator of stress in the cells after contact with nanoparticles. J. Phys. Conf. Ser. 617, 12023. https://doi.org/10.1088/1742-6596/617/1/012023
- Hayward, S.A.L., Rinehart, J.P., Denlinger, D.L., 2004. Desiccation and rehydration elicit distinct heat shock protein transcript responses in flesh fly pupae. J. Exp. Biol. 207, 963–971. https://doi.org/10.1242/jeb.00842
- Hobbs, H.H., Jass, J.P., Huner, J.V., 1989. A Review of global crayfish introductions with particular emphasis on two North American species (Decapoda, Cambaridae). Crustaceana 56, 299–316. https://doi.org/10.1163/156854089X00275
- Hopkin, R.S., Qari, S., Bowler, K., Hyde, D., Cuculescu, M., 2006. Seasonal thermal tolerance in marine Crustacea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 331, 74–81. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.10.007
- Ikeda, T., Abe, K., Ota, A., Ikenoue, T., 1999. Heat shock protein 70 and heat shock cognate protein 70 messenger ribonucleic acid induction in the brains, hearts, and livers of neonatal rats after

- hypoxic stress. Am. J. Obstet. Gynecol. 180, 457–461. https://doi.org/10.1016/s0002-9378(99)70232-2
- Ingolia, T.D., Craig, E.A., 1982. Drosophila gene related to the major heat shock-induced gene is transcribed at normal temperatures and not induced by heat shock. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 525–529.
- Ingolia, T.D., Craig, E.A., McCarthy, B.J., 1980. Sequence of three copies of the gene for the major Drosophila heat shock induced protein and their flanking regions. Cell 21, 669–679. https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90430-4
- Irmer, H., Höhfeld, J., 1997. Characterization of functional domains of the eukaryotic co-chaperone Hip. J. Biol. Chem. 272, 2230–2235. https://doi.org/10.1074/jbc.272.4.2230
- Jackson, S.E., 2012. Hsp90: Structure and function, in: Jackson, S. (Ed.), Molecular Chaperones. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 155–240.
- Janssens, L., Dinh Van, K., Stoks, R., 2014. Extreme temperatures in the adult stage shape delayed effects of larval pesticide stress: A comparison between latitudes. Aquat. Toxicol. 148, 74–82. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.002
- Johnson, J.L., 2012. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res. 1823, 607–613. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.020
- Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., Hightower, L.E., 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. Cell Stress Chaperones 14, 105–111. https://doi.org/10.1007/s12192-008-0068-7
- Kamradt, M.C., Chen, F., Cryns, V.L., 2001. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. J. Biol. Chem. 276, 16059–16063. https://doi.org/10.1074/jbc.C100107200
- Karagöz, G.E., Rüdiger, S.G.D., 2015. Hsp90 interaction with clients. Trends Biochem. Sci. 40, 117–125. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.12.002
- Karch, F., Török, I., Tissières, A., 1981. Extensive regions of homology in front of the two hsp70 heat shock variant genes in *Drosophila melanogaster*. J. Mol. Biol. 148, 219–230. https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90536-2
- Karlin, S., Brocchieri, L., 1998. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. J. Mol. Evol. 47, 565–577. https://doi.org/10.1007/PL00006413
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 30, 772–780. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010
- Kaur, M., Atif, F., Ansari, R.A., Ahmad, F., Raisuddin, S., 2011. The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress responses in *Channa punctata* Bloch. Chem. Biol. Interact. 193, 216–224. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.06.011
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat. Protoc. 10, 845–858. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053
- Kiang, J.G., Tsokos, G.C., 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. Pharmacol. Ther. 80, 183–201. https://doi.org/10.1016/s0163-7258(98)00028-x
- Kijewska, A., Kalamarz-Kubiak, H., Arciszewski, B., Guellard, T., Petereit, C., Wenne, R., 2016. Adaptation to salinity in Atlantic cod from different regions of the Baltic Sea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 478, 62–67. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.02.003

- King, A.M., Toxopeus, J., MacRae, T.H., 2013. Functional differentiation of small heat shock proteins in diapause-destined Artemia embryos. FEBS J. 280, 4761–4772. https://doi.org/10.1111/febs.12442
- Knowlton, A.A., Salfity, M., 1996. Nuclear localization and the heat shock proteins. J. Biosci. 21, 123–132.
- Koenemann, S., Jenner, R.A., Hoenemann, M., Stemme, T., von Reumont, B.M., 2010. Arthropod phylogeny revisited, with a focus on crustacean relationships. Arthropod Struct. Dev. 39, 88–110. https://doi.org/10.1016/j.asd.2009.10.003
- Köhler, H.-R., Knödler, C., Zanger, M., 1999. Divergent kinetics of hsp70 induction in *Oniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (B[a]P, PCB52, γ-HCH, PCP): Suitability and limits of a biomarker. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, 179–185. https://doi.org/10.1007/s002449900458
- Kotoglou, P., Kalaitzakis, A., Vezyraki, P., Tzavaras, T., Michalis, L.K., Dantzer, F., Jung, J.U., Angelidis, C., 2009. Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. Cell Stress Chaperones 14, 391–406. https://doi.org/10.1007/s12192-008-0093-6
- Krenek, S., Schlegel, M., Berendonk, T.U., 2013. Convergent evolution of heat-inducibility during subfunctionalization of the Hsp70 gene family. BMC Evol. Biol. 13, 49. https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-49
- Krivoruchko, A., Storey, K.B., 2010. Regulation of the heat shock response under anoxia in the turtle, *Trachemys scripta elegans*. J. Comp. Physiol. [B] 180, 403–414. https://doi.org/10.1007/s00360-009-0414-9
- Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J.Mol. Biol. 157:105–132.
- Lambert, H., Charette, S.J., Bernier, A.F., Guimond, A., Landry, J., 1999. HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. J. Biol. Chem. 274, 9378–9385. https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9378par
- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., Garrido, C., 2008. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. J. Cell. Mol. Med. 12, 743–761. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00273.x
- Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P., Garrido, C., 2010. Heat shock proteins: cell protection through protein triage. ScientificWorldJournal 10, 1543–1552. https://doi.org/10.1100/tsw.2010.152
- Launay, N., Goudeau, B., Kato, K., Vicart, P., Lilienbaum, A., 2006. Cell signaling pathways to  $\alpha B$ -crystallin following stresses of the cytoskeleton. Exp. Cell Res. 312, 3570–3584. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.07.025
- Le Goff, F., Bonnomet, V., 2004. Rapport technique INERIS: Devenir et comportement des métaux dans l'eau: biodisponibilité et modèles BLM (Rapport Technique No. DRC-03-46822-FLg/JL-03.0693). INERIS.
- Lebeaux, M. O., Jambu, M., (1978) Classification automatique pour l'analyse des données. Tome I : Méthodes et algorithmes. Dunod, Paris
- Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., Vierling, E., 1997. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. EMBO J. 16, 659–671. https://doi.org/10.1093/emboj/16.3.659
- Lee, J.M., Kusakabe, T., Kawaguchi, Y., Yasunaga-Aoki, C., Nho, S.-K., Nakajima, Y., Koga, K., 2003. Molecular characterization of a Heat Shock Cognate 70-4 promoter from the Silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnol. Sericology 72, 33–39. https://doi.org/10.11416/jibs.72.33

- Leignel, V., Cibois, M., Moreau, B., Chénais, B., 2007. Identification of new subgroup of HSP70 in Bythograeidae (hydrothermal crabs) and Xanthidae. Gene 396, 84–92. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.02.025
- Leignel, V., Stillman, J.H., Baringou, S., Thabet, R., Metais, I., 2014. Overview on the European green crab Carcinus spp. (Portunidae, Decapoda), one of the most famous marine invaders and ecotoxicological models. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 9129–9144. https://doi.org/10.1007/s11356-014-2979-4
- Levy-Rimler, G., Viitanen, P., Weiss, C., Sharkia, R., Greenberg, A., Niv, A., Lustig, A., Delarea, Y., Azem, A., 2001. The effect of nucleotides and mitochondrial chaperonin 10 on the structure and chaperone activity of mitochondrial chaperonin 60. Eur. J. Biochem. FEBS 268, 3465–3472. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02243.x
- Lewis, M.J., Pelham, H.R., 1985. Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein. EMBO J. 4, 3137–3143.
- Lewis, S., Handy, R.D., Cordi, B., Billinghurst, Z., Depledge, M.H., 1999. Stress proteins (HSP's): Methods of detection and their use as an environmental biomarker. Ecotoxicology 8, 351–368. https://doi.org/10.1023/A:1008982421299
- Li, J., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Xiao, S., Yu, Z., 2016. Co-expression of heat shock protein (HSP) 40 and HSP70 in *Pinctada martensii* response to thermal, low salinity and bacterial challenges. Fish Shellfish Immunol. 48, 239–243. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.038
- Li, M., Lu, W.C., Feng, H.Z., He, L., 2009. Molecular characterization and expression of three heat shock protein70 genes from the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). Insect Mol. Biol. 18, 183–194. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00869.x
- Lianos, G.D., Alexiou, G.A., Mangano, A., Mangano, A., Rausei, S., Boni, L., Dionigi, G., Roukos, D.H., 2015. The role of heat shock proteins in cancer. Cancer Lett. 360, 114–118. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.026
- Liberek, K., Georgopoulos, C., Zylicz, M., 1988. Role of the *Escherichia coli* DnaK and DnaJ heat shock proteins in the initiation of bacteriophage lambda DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85, 6632–6636. https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6632
- Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. Annu. Rev. Biochem. 55, 1151–1191. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005443
- Lindquist, S., 1980. Varying patterns of protein synthesis in Drosophila during heat shock: Implications for regulation. Dev. Biol. 77, 463–479. https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90488-1
- Lis, J., Neckameyer, W., Mirault, M.-E., Artavanis-Tsakonas, S., Lall, P., Martin, G., Schedl, P., 1981. DNA sequences flanking the starts of the hsp 70 and  $\alpha\beta$  heat shock genes are homologous. Dev. Biol. 83, 291–300. https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90475-9
- Liu, H., He, J., Chi, C., Shao, J., 2014. Differential HSP70 expression in *Mytilus coruscus* under various stressors. Gene 543, 166–173. https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.008
- Liu, J., Yang, W.-J., Zhu, X.-J., Karouna-Renier, N.K., Rao, R.K., 2004. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Cell Stress Chaperones 9, 313. https://doi.org/10.1379/CSC-40R.1
- Liu, T., Pan, L., Cai, Y., Miao, J., 2015. Molecular cloning and sequence analysis of heat shock proteins 70 (HSP70) and 90 (HSP90) and their expression analysis when exposed to benzo (a) pyrene in the clam *Ruditapes philippinarum*. Gene 555, 108–118. https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.10.051
- Liu, W.-W., Yang, P., Chen, X.-M., Xu, D.-L., Hu, Y.-H., 2014. Cloning and Expression Analysis of Four Heat Shock Protein Genes in *Ericerus pela* (Homoptera: Coccidae). J. Insect Sci. 14, 142. https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu032

- Livak, K.J., Freund, R., Schweber, M., Wensink, P.C., Meselson, M., 1978. Sequence organization and transcription at two heat shock loci in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5613–5617. https://doi.org/10.1073/pnas.75.11.5613
- Locarnini, R.A., Mishonov, A.V., Antonov, J.I., Boyer, T.P., Garcia, H.E., Baranova, O.K., Zweng, M.M., Paver, C.R., Reagan, J.R., Johnson, D.R., Hamilton, M., Seidov, D., 2013. World Ocean Atlas 2013, Volume 1: Temperature.
- Lockwood, B.L., Sanders, J.G., Somero, G.N., 2010. Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus Mytilus): molecular correlates of invasive success. J. Exp. Biol. 213, 3548–3558. https://doi.org/10.1242/jeb.046094
- Lu, M.-X., Li, H.-B., Zheng, Y.-T., Shi, L., Du, Y.-Z., 2016. Identification, genomic organization and expression profiles of four heat shock protein genes in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. J. Therm. Biol. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.03.005
- Luan, W., Li, F., Zhang, J., Wen, R., Li, Y., Xiang, J., 2010. Identification of a novel inducible cytosolic Hsp70 gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and comparison of its expression with the cognate Hsc70 under different stresses. Cell Stress Chaperones 15, 83–93. https://doi.org/10.1007/s12192-009-0124-y
- Luo, S., Ahola, V., Shu, C., Xu, C., Wang, R., 2015. Heat shock protein 70 gene family in the Glanville fritillary butterfly and their response to thermal stress. Gene 556, 132–141. https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.11.043
- Madeira, D., Mendonça, V., Dias, M., Roma, J., Costa, P.M., Larguinho, M., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2015. Physiological, cellular and biochemical thermal stress response of intertidal shrimps with different vertical distributions: *Palaemon elegans* and *Palaemon serratus*. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 183, 107–115. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.12.039
- Madeira, D., Mendonça, V., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2016. Is the stress response affected by season? Clues from an in situ study with a key intertidal shrimp. Mar. Biol. 163, 1–12. https://doi.org/10.1007/s00227-015-2803-9
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2012. HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures. J. Sea Res. 73, 137–147. https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.07.003
- Maside, X., Bartolomé, C., Charlesworth, B., 2002. S-element insertions are associated with the evolution of the Hsp70 genes in *Drosophila melanogaster*. Curr. Biol. CB 12, 1686–1691.
- Mayer, M.P., 2010. Gymnastics of molecular chaperones. Mol. Cell 39, 321–331. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.012
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. Cell. Mol. Life Sci. 62, 670–684. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6
- Mayer, M.P., Kityk, R., 2015. Insights into the molecular mechanism of allostery in Hsp70s. Front. Mol. Biosci. 2. https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00058
- McCallister, C., Siracusa, M.C., Shirazi, F., Chalkia, D., Nikolaidis, N., 2015. Functional diversification and specialization of cytosolic 70-kDa Heat Shock Proteins. Sci. Rep. 5, 9363. https://doi.org/10.1038/srep09363
- McCracken, A.A., Brodsky, J.L., 1996. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. J. Cell Biol. 132, 291–298. https://doi.org/10.1083/jcb.132.3.291
- McDonald, A.A., Chang, E.S., Mykles, D.L., 2011. Cloning of a nitric oxide synthase from green shore crab, *Carcinus maenas*: A comparative study of the effects of eyestalk ablation on expression in the molting glands (Y-organs) of *C. maenas*, and blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 158, 150–162. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.013

- Mestre, N.C., Cottin, D., Bettencourt, R., Colaço, A., Correia, S.P.C., Shillito, B., Thatje, S., Ravaux, J., 2015. Is the deep-sea crab *Chaceon affinis* able to induce a thermal stress response? Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 181, 54–61. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.11.015
- Metzger, D.C.H., Hemmer-Hansen, J., Schulte, P.M., 2016. Conserved structure and expression of hsp70 paralogs in teleost fishes. Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics. https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.01.007
- Mikulski, A., Bernatowicz, P., Grzesiuk, M., Kloc, M., Pijanowska, J., 2011. Differential levels of stress proteins (HSPs) in male and female *Daphnia magna* in response to thermal stress: A consequence of sex-related behavioral differences? J. Chem. Ecol. 37, 670–676. https://doi.org/10.1007/s10886-011-9969-5
- Milarski, K.L., Morimoto, R.I., 1986. Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 9517–9521. https://doi.org/10.1073/pnas.83.24.9517
- Millar, D.G., Garza, K.M., Odermatt, B., Elford, A.R., Ono, N., Li, Z., Ohashi, P.S., 2003. Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. Nat. Med. 9, 1469–1476. https://doi.org/10.1038/nm962
- Milne, K.J., Noble, E.G., 2002. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. J. Appl. Physiol. 93, 561–568. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00528.2001
- Mirault, M.E., Southgate, R., Delwart, E., 1982. Regulation of heat-shock genes: a DNA sequence upstream of Drosophila hsp70 genes is essential for their induction in monkey cells. EMBO J. 1, 1279–1285.
- Monari, M., Foschi, J., Rosmini, R., Marin, M.G., Serrazanetti, G.P., 2011. Heat shock protein 70 response to physical and chemical stress in *Chamelea gallina*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 397, 71–78. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.11.016
- Morales, M., Martínez-Paz, P., Martín, R., Planelló, R., Urien, J., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2014. Transcriptional changes induced by in vivo exposure to pentachlorophenol (PCP) in *Chironomus riparius* (Diptera) aquatic larvae. Aquat. Toxicol. 157, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.09.009
- Morales, M., Planelló, R., Martínez-Paz, P., Herrero, O., Cortés, E., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2011. Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 153, 150–158. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.10.003
- Morris, J.P., Thatje, S., Hauton, C., 2013. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. Mol. Ecol. 22, 1494–1502. https://doi.org/10.1111/mec.12216
- Morrow, G., Tanguay, R.M., 2015. Drosophila melanogaster Hsp22: a mitochondrial small heat shock protein influencing the aging process. Front. Genet. 6. https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00103
- Mottier, A., Séguin, A., Devos, A., Pabic, C.L., Voiseux, C., Lebel, J.M., Serpentini, A., Fievet, B., Costil, K., 2015. Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): From molecular to individual levels. Mar. Pollut. Bull. 95, 665–677. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.026
- Multhoff, G., 2007. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. Methods San Diego Calif 43, 229–237. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.06.006
- Myrmel, T., McCully, J.D., Malikin, L., Krukenkamp, I.B., Levitsky, S., 1994. Heat-shock protein 70 mRNA is induced by anaerobic metabolism in rat hearts. Circulation 90, II299-305. https://doi.org/10.3892/mmr.2012.982
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.J., Deerfield, D.W., 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. Embnew News 4, 1–4.

- Nicholl, I.D., Quinlan, R.A., 1994. Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. EMBO J. 13, 945–953.
- Nicosia, A., Celi, M., Vazzana, M., Damiano, M.A., Parrinello, N., D'Agostino, F., Avellone, G., Indelicato, S., Mazzola, S., Cuttitta, A., 2014. Profiling the physiological and molecular response to sulfonamidic drug in *Procambarus clarkii*. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 166, 14–23. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.06.006
- Nikapitiya, C., McDowell, I.C., Villamil, L., Muñoz, P., Sohn, S., Gomez-Chiarri, M., 2014. Identification of potential general markers of disease resistance in American oysters, *Crassostrea virginica* through gene expression studies. Fish Shellfish Immunol., Special Issue: ISFSI 2013 review 41, 27–36. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.015
- Nollen, E.A.A., Kabakov, A.E., Brunsting, J.F., Kanon, B., Hohfeld, J., Kampinga, H.H., 2001. Modulation of in Vivo HSP70 Chaperone Activity by Hip and Bag-1. J. Biol. Chem. 276, 4677–4682. https://doi.org/10.1074/jbc.M009745200
- Nollen, E.A., Morimoto, R.I., 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensingheat shock'proteins. J. Cell Sci. 115, 2809–2816.
- Oakley, T.H., Wolfe, J.M., Lindgren, A.R., Zaharoff, A.K., 2013. Phylotranscriptomics to Bring the Understudied into the Fold: Monophyletic Ostracoda, Fossil Placement, and Pancrustacean Phylogeny. Mol. Biol. Evol. 30, 215–233. https://doi.org/10.1093/molbev/mss216
- Olsvik, P.A., Ørnsrud, R., Lunestad, B.T., Steine, N., Fredriksen, B.N., 2014. Transcriptional responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to deltamethrin, alone or in combination with azamethiphos. Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP 162, 23–33. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.03.005
- Paaijmans, K.P., Heinig, R.L., Seliga, R.A., Blanford, J.I., Blanford, S., Murdock, C.C., Thomas, M.B., 2013. Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. Glob. Change Biol. 19, 2373–2380. https://doi.org/10.1111/gcb.12240
- Palter, K.B., Watanabe, M., Stinson, L., Mahowald, A.P., Craig, E.A., 1986. Expression and localization of *Drosophila melanogaster* hsp70 cognate proteins. Mol. Cell. Biol. 6, 1187–1203. https://doi.org/10.1128/mcb.6.4.1187
- Parcellier, A., Schmitt, E., Gurbuxani, S., Seigneurin-Berny, D., Pance, A., Chantôme, A., Plenchette, S., Khochbin, S., Solary, E., Garrido, C., 2003. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. Mol. Cell. Biol. 23, 5790–5802. https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5790–5802.2003
- Pelham, H., 1985. Activation of heat-shock genes in eukaryotes. Trends Genet. 1, 31–35. https://doi.org/10.1016/0168-9525(85)90012-5
- Pelham, H.R., 1982. A regulatory upstream promoter element in the Drosophila hsp 70 heat-shock gene. Cell 30, 517–528. https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90249-5
- Pelham, H.R.B., 1986. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. Cell 46, 959–961. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90693-8
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J. Comput. Chem. 25, 1605–1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084
- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F., Fabbri, E., 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. Cell Stress Chaperones 7, 250–257. https://doi.org/10.1379/1466-1268(2002)007<0250:heitso>2.0.co;2
- Pinsino, A., Matranga, V., 2015. Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. Dev. Comp. Immunol. 49, 198–205. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.013

- Plant, K.P., LaPatra, S.E., Cain, K.D., 2009. Vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with recombinant and DNA vaccines produced to *Flavobacterium psychrophilum* heat shock proteins 60 and 70. J. Fish Dis. 32, 521–534. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01008.x
- Podrabsky, J.E., Somero, G.N., 2007. An inducible 70 kDa-class heat shock protein is constitutively expressed during early development and diapause in the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. Cell Stress Chaperones 12, 199–204. https://doi.org/10.1379/csc-280
- Polier, S., Dragovic, Z., Hartl, F.U., Bracher, A., 2008. Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. Cell 133, 1068–1079. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.022
- Prapapanich, V., Chen, S., Smith, D.F., 1998. Mutation of Hip's carboxy-terminal region inhibits a transitional stage of progesterone receptor assembly. Mol. Cell. Biol. 18, 944–952. https://doi.org/10.1128/MCB.18.2.944
- Préville, X., Salvemini, F., Giraud, S., Chaufour, S., Paul, C., Stepien, G., Ursini, M.V., Arrigo, A.P., 1999. Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. Exp. Cell Res. 247, 61–78. https://doi.org/10.1006/excr.1998.4347
- Purohit, G.K., Mahanty, A., Suar, M., Sharma, A.P., Mohanty, B.P., Mohanty, S., 2014. Investigating hsp gene expression in liver of *Channa striatus* under heat stress for understanding the upper thermal acclimation. BioMed Res. Int. 2014. https://doi.org/10.1155/2014/381719
- Pyza, E., Mak, P., Kramarz, P., Laskowski, R., 1997. Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. Ecotoxicol. Environ. Saf. 38, 244–251. https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1595
- Qi, R., Sarbeng, E.B., Liu, Q., Le, K.Q., Xu, X., Xu, H., Yang, J., Wong, J.L., Vorvis, C., Hendrickson, W.A., Zhou, L., Liu, Q., 2013. Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. Nat. Struct. Mol. Biol. 20, 900–907. https://doi.org/10.1038/nsmb.2583
- Qian, Z., Liu, X., Wang, L., Wang, X., Li, Y., Xiang, J., Wang, P., 2012. Gene expression profiles of four heat shock proteins in response to different acute stresses in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 156, 211–220. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.06.001
- Qiu, X.-B., Shao, Y.-M., Miao, S., Wang, L., 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 63, 2560–2570. https://doi.org/10.1007/s00018-006-6192-6
- Radlowska, M., Pempkowiak, J., 2002. Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel *Mytilus edulis*. Environ. Int. 27, 605–608. https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00117-9
- Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, J.W., Cunningham, C.W., 2010. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. Nature 463, 1079–1083. https://doi.org/10.1038/nature08742
- Rezazadeh-Reyhani, Z., Razi, M., Malekinejad, H., Sadrkhanlou, R., 2015. Cytotoxic effect of nanosilver particles on testicular tissue: Evidence for biochemical stress and Hsp70-2 protein expression. Environ. Toxicol. Pharmacol. 40, 626–638. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.024
- Rhee, J.-S., Raisuddin, S., Lee, K.-W., Seo, J.S., Ki, J.-S., Kim, I.-C., Park, H.G., Lee, J.-S., 2009. Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 149, 104–112. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.009

- Ribecco, C., Hardiman, G., Sášik, R., Vittori, S., Carnevali, O., 2012. Teleost fish (*Solea solea*): a novel model for ecotoxicological assay of contaminated sediments. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 109, 133–142. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.12.002
- Ritossa, F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. Experientia 18, 571–573. https://doi.org/10.1007/BF02172188
- Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. Aquaculture 172, 125–145. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00439-6
- Rodriguez-Lanetty, M., Harii, S., Hoegh-Guldberg, O., 2009. Early molecular responses of coral larvae to hyperthermal stress: Coral molecular responses to heat stress. Mol. Ecol. 18, 5101–5114. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04419.x
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61, 539–542. https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029
- Rouault, J.D., Capy, P., 2008. Classification of Transposable Elements based upon nucleotidic distances and an aggregation process. Journées Ouvertes Biologie Informatique Mathématiques JOBIM 2008. 30 Juin-2 Juillet 2008. Lille France.
- Rouault, J.-D., Casse, N., Chénais, B., Hua-Van, A., Filée, J., Capy, P., 2009. Automatic classification within families of transposable elements: Application to the mariner Family. Gene 448, 227–232. https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.08.009
- Rubin, D.M., Mehta, A.D., Zhu, J., Shoham, S., Chen, X., Wells, Q.R., Palter, K.B., 1993. Genomic structure and sequence analysis of *Drosophila melanogaster* HSC70 genes. Gene 128, 155–163. https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90558-k
- Rungrassamee, W., Leelatanawit, R., Jiravanichpaisal, P., Klinbunga, S., Karoonuthaisiri, N., 2010. Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol. 34, 1082–1089. https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.05.012
- Saibil, H., 2013. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14, 630–642. https://doi.org/10.1038/nrm3658
- Sanders, B.M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. Crit. Rev. Toxicol. 23, 49–75. https://doi.org/10.3109/10408449309104074
- Sarbeng, E.B., Liu, Q., Tian, X., Yang, J., Li, H., Wong, J.L., Zhou, L., Liu, Q., 2015. A functional DnaK dimer is essential for the efficient interaction with Hsp40 Heat Shock Protein. J. Biol. Chem. 290, 8849–8862. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.596288
- Schedl, P., Artavanis-Tsakonas, S., Steward, R., Gehring, W.J., Mirault, M.E., Goldschmidt-Clermont, M., Moran, L., Tissières, A., 1978. Two hybrid plasmids with *D. melanogaster* DNA sequences complementary to mRNA coding for the major heat shock protein. Cell 14, 921–929. https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90346-x
- Schill, R.O., Steinbrück, G.H.B., Köhler, H.-R., 2004. Stress gene (hsp70) sequences and quantitative expression in *Milnesium tardigradum* (Tardigrada) during active and cryptobiotic stages. J. Exp. Biol. 207, 1607–1613. https://doi.org/10.1242/jeb.00935
- Schlesinger, M.J., Aliperti, G., Kelley, P.M., 1982a. The response of cells to heat shock. Trends Biochem. Sci. 7, 222–225. https://doi.org/10.1016/0968-0004(82)90096-2
- Schlesinger, M.J., Ashburner, M., Tissières, A., 1982b. Heat Shock: from Bacteria to Man. Wiley, Chichester; New York.
- Schmitt, M., Neupert, W., Langer, T., 1995. Hsp78, a Clp homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. EMBO J. 14, 3434–3444.

- Schröder, H.C., Batel, R., Lauenroth, S., Hassanein, H.M.A., Lacorn, M., Simat, T., Steinhart, H., Müller, W.E.G., 1999. Induction of DNA damage and expression of heat shock protein HSP70 by polychlorinated biphenyls in the marine sponge *Suberites domuncula olivi*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 233, 285–300. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00134-8
- Schroth, W., Ender, A., Schierwater, B., 2005. Molecular biomarkers and adaptation to environmental stress in moon jelly (Aurelia spp.). Mar. Biotechnol. 7, 449–461. https://doi.org/10.1007/s10126-004-4095-9
- Schuermann, J.P., Jiang, J., Cuellar, J., Llorca, O., Wang, L., Gimenez, L.E., Jin, S., Taylor, A.B., Demeler, B., Morano, K.A., Hart, P.J., Valpuesta, J.M., Lafer, E.M., Sousa, R., 2008. Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. Mol. Cell 31, 232–243. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.006
- Selvakumar, S., Geraldine, P., 2005. Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: Acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 140, 209–215. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.01.008
- Selvakumar, S., Geraldine, P., Shanju, S., Jayakumar, T., 2005. Stressor-specific induction of heat shock protein 70 in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) exposed to the pesticides endosulfan and carbaryl. Pestic. Biochem. Physiol. 82, 125–132. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.02.003
- Sherman, M.Y., Gabai, V.L., 2015. Hsp70 in cancer: back to the future. Oncogene 34, 4153–4161. https://doi.org/10.1038/onc.2014.349
- Shomura, Y., Dragovic, Z., Chang, H.-C., Tzvetkov, N., Young, J.C., Brodsky, J.L., Guerriero, V., Hartl, F.U., Bracher, A., 2005. Regulation of Hsp70 Function by HspBP1. Mol. Cell 17, 367–379. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.023
- Shopland, L.S., Hirayoshi, K., Fernandes, M., Lis, J.T., 1995. HSF access to heat shock elements in vivo depends critically on promoter architecture defined by GAGA factor, TFIID, and RNA polymerase II binding sites. Genes Dev. 9, 2756–2769. https://doi.org/10.1101/gad.9.22.2756
- Shopland, L.S., Lis, J.T., 1996. HSF recruitment and loss at most Drosophila heat shock loci is coordinated and depends on proximal promoter sequences. Chromosoma 105, 158–171. https://doi.org/10.1007/s004120050171
- Simons, J.F., Ferro-Novick, S., Rose, M.D., Helenius, A., 1995. BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. J. Cell Biol. 130, 41–49. https://doi.org/10.1083/jcb.130.1.41
- Singh, M.P., Reddy, M.M.K., Mathur, N., Saxena, D.K., Chowdhuri, D.K., 2009. Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: role of ROS generation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 235, 226–243. https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.12.002
- Snyder, M.J., Girvetz, E., Mulder, E.P., 2001. Induction of Marine Mollusc Stress Proteins by Chemical or Physical Stress. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41, 22–29. https://doi.org/10.1007/s002440010217
- Song, L., Wu, L., Ni, D., Chang, Y., Xu, W., Xing, K., 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. Fish Shellfish Immunol. 21, 335–345. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.12.011
- Sonoda, S., Ashfaq, M., Tsumuki, H., 2006. Cloning and nucleotide sequencing of three heat shock protein genes (hsp90, hsc70, and hsp19.5) from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and their expression in relation to developmental stage and temperature. Arch. Insect Biochem. Physiol. 62, 80–90. https://doi.org/10.1002/arch.20124

- Sonoda, S., Tsumuki, H., 2007. Induction of heat shock protein genes by chlorfenapyr in cultured cells of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. Pestic. Biochem. Physiol. 89, 185–189. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.06.003
- Spees, J.L., Chang, S.A., Mykles, D.L., Snyder, M.J., Chang, E.S., 2003. Molt cycle–dependent molecular chaperone and polyubiquitin gene expression in lobster. Cell Stress Chaperones 8, 258–264. https://doi.org/10.1379/1466-1268(2003)008<0258:MCMCAP>2.0.CO;2
- Spees, J.L., Chang, S.A., Snyder, M.J., Chang, E.S., 2002a. Thermal acclimation and stress in the American lobster, *Homarus americanus*: equivalent temperature shifts elicit unique gene expression patterns for molecular chaperones and polyubiquitin. Cell Stress Chaperones 7, 97.
- Spees, J.L., Chang, S.A., Snyder, M.J., Chang, E.S., 2002b. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. Biol. Bull. 203, 331–337. https://doi.org/10.2307/1543575
- Starrett, J., Waters, E.R., 2007. Positive natural selection has driven the evolution of the Hsp70s in Diguetia spiders. Biol. Lett. 3, 439–444. https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0159
- Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K.A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M.P., Walker, J.R., Hogenesch, J.B., 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 6062–6067. https://doi.org/10.1073/pnas.0400782101
- Sun, S., Xuan, F., Fu, H., Ge, X., Zhu, J., Qiao, H., Jin, S., Zhang, Y., 2016. Comparative proteomic study of the response to hypoxia in the muscle of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). J. Proteomics. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.023
- Sun, Y., Zhang, L., Li, M.-C., Wu, R., Lei, L.-M., Xie, S.-T., 2009. Cloning and expression analysis of an inducible Heat Shock Protein 70 gene from red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. Acta Hydrobiol. Sin. 33, 627–635. https://doi.org/10.3724/SP.J.1035.2009.40627
- Taipale, M., Jarosz, D.F., Lindquist, S., 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 515–528. https://doi.org/10.1038/nrm2918
- Takayama, S., Bimston, D.N., Matsuzawa, S., Freeman, B.C., Aime-Sempe, C., Xie, Z., Morimoto, R.I., Reed, J.C., 1997. BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. EMBO J. 16, 4887–4896. https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4887
- Tamadaddi, C.A., Sahi, C., 2016. J domain independent functions of J proteins. Cell Stress Chaperones 1–8. https://doi.org/10.1007/s12192-016-0697-1
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., Anderson, R.L., 1996. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. Cell Stress Chaperones 1, 23–28. https://doi.org/10.1379/1466-1268(1996)001<0023:ahsgtt>2.3.co;2
- Teng, Y., Ngoka, L., Mei, Y., Lesoon, L., Cowell, J.K., 2012. HSP90 and HSP70 proteins are essential for stabilization and activation of WASF3 metastasis-promoting protein. J. Biol. Chem. 287, 10051–10059. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.335000
- Tessier, D.J., Komalavilas, P., Panitch, A., Joshi, L., Brophy, C.M., 2003. The small heat shock protein (HSP) 20 is dynamically associated with the actin cross-linking protein actinin1. J. Surg. Res. 111, 152–157. https://doi.org/10.1016/S0022-4804(03)00113-6
- Thornton, B., Basu, C., 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. Biochem. Mol. Biol. Educ. 39, 145–154. https://doi.org/10.1002/bmb.20461
- Tine, M., Bonhomme, F., McKenzie, D.J., Durand, J.-D., 2010. Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural populations of the tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, acclimatised to

- a range of environmental salinities. BMC Ecol. 10, 11. https://doi.org/10.1186/1472-6785-10-11
- Tissiéres, A., Mitchell, H.K., Tracy, U.M., 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol. 84, 389–398. https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90447-1
- Tomanek, L., 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. J. Exp. Biol. 213, 971–979. https://doi.org/10.1242/jeb.038034
- Tomanek, L., Somero, G.N., 2002. Interspecific-and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus Tegula): implications for regulation of hsp gene expression. J. Exp. Biol. 205, 677–685.
- Tomanek, L., Somero, G.N., 2000. Time course and magnitude of synthesis of Heat-Shock Proteins in congeneric marine snails (Genus Tegula) from different tidal heights. Physiol. Biochem. Zool. 73, 249–256. https://doi.org/10.1086/316740
- Triebskorn, R., Adam, S., Casper, H., Honnen, W., Pawert, M., Schramm, M., Schwaiger, J., Köhler, H.-R., 2002. Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. Ecotoxicol. Lond. Engl. 11, 451–465. https://doi.org/10.1023/A:1021009418421
- Tsang, L.M., Ma, K.Y., Ahyong, S.T., Chan, T.-Y., Chu, K.H., 2008. Phylogeny of decapoda using two nuclear protein-coding genes: Origin and evolution of the Reptantia. Mol. Phylogenet. Evol. 48, 359–368. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.04.009
- Tsang, L.M., Schubart, C.D., Ahyong, S.T., Lai, J.C.Y., Au, E.Y.C., Chan, T.-Y., Ng, P.K.L., Chu, K.H., 2014. Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. Mol. Biol. Evol. 31, 1173–1187. https://doi.org/10.1093/molbev/msu068
- Turturici, G., Sconzo, G., Geraci, F., 2011. Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. Biochem. Res. Int. 2011, 1–18. https://doi.org/10.1155/2011/618127
- Tyedmers, J., Mogk, A., Bukau, B., 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 777–788. https://doi.org/10.1038/nrm2993
- Ueda, N., Boettcher, A., 2009. Differences in heat shock protein 70 expression during larval and early spat development in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). Cell Stress Chaperones 14, 439–443. https://doi.org/10.1007/s12192-008-0096-3
- Ulmasov, K.A., Shammakov, S., Karaev, K., Evgen'ev, M.B., 1992. Heat shock proteins and thermoresistance in lizards. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 1666–1670. https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1666
- Van Montfort, R., Slingsby, C., Vierling, E., 2001. Structure and function of the small heat shock protein/α-crystallin family of molecular chaperones. Adv. Protein Chem. 59, 105–156. https://doi.org/10.1016/s0065-3233(01)59004-x
- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M., 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 15452–15457. https://doi.org/10.1073/pnas.0803833105
- Velazquez, J.M., DiDomenico, B.J., Lindquist, S., 1980. Intracellular localization of heat shock proteins in Drosophila. Cell 20, 679–689. https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90314-1
- Velazquez, J.M., Lindquist, S., 1984. hsp70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. Cell 36, 655–662. https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90345-3

- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., Morano, K.A., 2012. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76, 115–158. https://doi.org/10.1128/MMBR.05018-11
- Vogel, M., Mayer, M.P., Bukau, B., 2006. Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker. J. Biol. Chem. 281, 38705–38711. https://doi.org/10.1074/jbc.M609020200
- Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T., Neupert, W., 1994. Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. EMBO J. 13, 5135–5145.
- Wang, L., Yang, S., Han, L., Zhao, K., Ye, L., 2015. Expression Profile of Two HSP70 Chaperone Proteins in Response to Extreme Thermal Acclimation in *Xestia c-nigrum* (Lepidoptera: Noctuidae). Fla. Entomol. 98, 506–515. https://doi.org/10.1653/024.098.0218
- Wang, Z., Wu, Z., Jian, J., Lu, Y., 2009. Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge. Fish Shellfish Immunol. 26, 639–645. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.011
- Webb, D., Gagnon, M.M., 2009. The value of stress protein 70 as an environmental biomarker of fish health under field conditions. Environ. Toxicol. 24, 287–295. https://doi.org/10.1002/tox.20432
- Werner-Washburne, M., Craig, E.A., 1989. Expression of members of the *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 multigene family. Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can. 31, 684–689. https://doi.org/10.1139/g89-125
- Wiens, M., Koziol, C., Hassanein, H.M.A., Batel, R., Schrder, H.C., Mller, W.E.G., 1998. Induction of gene expression of the chaperones 14-3-3 and HSP70 by PCB 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in the marine sponge *Geodia cydonium*: novel biomarkers for polychlorinated biphenyls. Mar. Ecol. Prog. Ser. 165, 247–257. https://doi.org/10.3354/meps165247
- Wilczek, G., 2005. Apoptosis and biochemical biomarkers of stress in spiders from industrially polluted areas exposed to high temperature and dimethoate. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 141, 194–206. https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.06.007
- Wingender, E., Dietze, P., Karas, H., Knüppel, R., 1996. TRANSFAC: A database on transcription factors and their DNA binding sites. Nucleic Acids Res. 24, 238–241. https://doi.org/10.1093/nar/24.1.238
- Wong, S.W.Y., Leung, P.T.Y., Djurišić, A.B., Leung, K.M.Y., 2009. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. Anal. Bioanal. Chem. 396, 609–618. https://doi.org/10.1007/s00216-009-3249-z
- Wu, R., Sun, Y., Lei, L.M., Xie, S.T., 2008. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (HSC70) in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Mol. Biol. 42, 234–242. https://doi.org/10.1134/S002689330802009X
- Wu, X., Tan, J., Cai, M., Liu, X., 2014. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a heat shock protein (HSP) 70 gene from *Paphia undulata*. Gene 543, 275–285. https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.103
- Xanthoudakis, S., Roy, S., Rasper, D., Hennessey, T., Aubin, Y., Cassady, R., Tawa, P., Ruel, R., Rosen, A., Nicholson, D.W., 1999. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. EMBO J. 18, 2049–2056. https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2049
- Xing, H., Li, S., Wang, X., Gao, X., Xu, S., Wang, X., 2013. Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain, kidney and gill of common carp (*Cyprinus carpio L.*). Chemosphere 90, 910–916. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.06.028

- Xiu, Y., Feng, J., Lu, W., Liu, D., Wu, T., Zhu, H., Liu, P., Li, W., Ren, Q., Gu, W., Meng, Q., Wang, W., 2014. Identification of a novel cognate cytosolic Hsp70 gene (MnHsc70-2) from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and comparison of its expressions with the first cognate Hsc70 (MnHsc70-1) under different stresses. Cell Stress Chaperones 19, 949–961. https://doi.org/10.1007/s12192-014-0519-2
- Xu, X.H., Zhu, X.Y., Xu, G.C., Xu, J.T., Tang, Y., Huo, W., 2016. Molecular cloning and expression of the stress gene HSP70 in the marine crab *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards, 1861) (Decapoda: Brachyura: Portunidae) in response to ammonia-N, nitrite-N, and sulfide exposure. Brill. https://doi.org/10.1163/1937240X-00002464
- Yalovsky, S., Paulsen, H., Michaeli, D., Chitnis, P.R., Nechushtai, R., 1992. Involvement of a chloroplast HSP70 heat shock protein in the integration of a protein (light-harvesting complex protein precursor) into the thylakoid membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 5616–5619. https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5616
- Yamuna, A., Kabila, V., Geraldine, P., 2000. Expression of heat shock protein 70 in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) following exposure to Hg and Cu. Indian J. Exp. Biol. 38, 921–925.
- Yang, L., Zha, J., Zhang, X., Li, W., Li, Z., Wang, Z., 2010. Alterations in mRNA expression of steroid receptors and heat shock proteins in the liver of rare minnow (*Grobiocypris rarus*) exposed to atrazine and p,p'-DDE. Aquat. Toxicol. 98, 381–387. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.03.010
- Yang, L.-H., Jiang, H.-B., Liu, Y.-H., Dou, W., Wang, J.-J., 2012. Molecular characterization of three heat shock protein 70 genes and their expression profiles under thermal stress in the citrus red mite. Mol. Biol. Rep. 39, 3585–3596. https://doi.org/10.1007/s11033-011-1132-4
- Yang, Y., Ye, H., Huang, H., Li, S., Liu, X., Zeng, X., Gong, J., 2013. Expression of Hsp70 in the mud crab, *Scylla paramamosain* in response to bacterial, osmotic, and thermal stress. Cell Stress Chaperones 18, 475–482. https://doi.org/10.1007/s12192-013-0402-6
- Yoshidomi, K., Murakami, A., Yakabe, K., Sueoka, K., Nawata, S., Sugino, N., 2014. Heat shock protein 70 is involved in malignant behaviors and chemosensitivities to cisplatin in cervical squamous cell carcinoma cells. J. Obstet. Gynaecol. Res. 40, 1188–1196. https://doi.org/10.1111/jog.12325
- Young, J.C., Moarefi, I., Hartl, F.U., 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. J. Cell Biol. 154, 267–273. https://doi.org/10.1083/jcb.200104079
- Zapata, M., Tanguy, A., David, E., Moraga, D., Riquelme, C., 2009. Transcriptomic response of *Argopecten purpuratus* post-larvae to copper exposure under experimental conditions. Gene 442, 37–46. https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.04.019
- Zatsepina, O.G., Ulmasov, K.A., Beresten, S.F., Molodtsov, V.B., Rybtsov, S.A., Evgen'ev, M.B., 2000. Thermotolerant desert lizards characteristically differ in terms of heat-shock system regulation. J. Exp. Biol. 203, 1017–1025.
- Zhang, F., Jiang, K., Sun, M., Zhang, D., Ma, L., 2013. Multiplex immune-related genes expression analysis response to bacterial challenge in mud crab, *Scylla paramamosain*. Fish Shellfish Immunol. 34, 712–716. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.029
- Zhang, L.J., Wang, K.F., Jing, Y.P., Zhuang, H.M., Wu, G., 2015. Identification of heat shock protein genes hsp70s and hsc70 and their associated mRNA expression under heat stress in insecticide-resistant and susceptible diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Eur. J. Entomol. https://doi.org/10.14411/eje.2015.039
- Zhang, X., Pan, G., Jin, X., Tang, Q., Wang, H., Tu, J., 2010. Analysis of causes for formation of chimeras. Anal. Biochem. 400, 298–300. https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.12.033

# 9 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zhang, Z., Zhang, Q., 2012. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu2+ and malachite green. Gene 497, 172–180. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.058
- Zhou, J., Wang, W.-N., He, W.-Y., Zheng, Y., Wang, L., Xin, Y., Liu, Y., Wang, A.-L., 2010. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. J. Invertebr. Pathol. 103, 170–178. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.12.006
- Zuiderweg, E.R.P., Bertelsen, E.B., Rousaki, A., Mayer, M.P., Gestwicki, J.E., Ahmad, A., 2012. Allostery in the Hsp70 chaperone proteins, in: Jackson, S. (Ed.), Molecular Chaperones. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 99–153.
- Zweng, M.M., Reagan, J.R., Antonov, J.I., Locarnini, R.A., Mishonov, A.V., Boyer, T.P., Garcia, H.E., Baranova, O.K., Johnson, D.R., Seidov, D., Biddle, M.M., 2013. World Ocean Atlas 2013, Volume 2: Salinity.
- Zylicz, M., LeBowitz, J.H., McMacken, R., Georgopoulos, C., 1983. The dnaK protein of *Escherichia coli* possesses an ATPase and autophosphorylating activity and is essential in an in vitro DNA replication system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80, 6431–6435.





# Thèse de Doctorat

# St¶phane BARINGOU

Diversit¶ et fonctionnalit¶ de ĭ nouveaux types ŏ de Heat Shock Protein-70 kDa chez les arthropodes

Diversity and functionality of Heat Shock Protein-70 kDa within Arthropoda

### R¶sum¶

Les Heat Shock Proteins 70 kDa (HSP70) sont consid¶r¶es comme les membres les plus conserv¶s de la superfamille des HSP. Ces prot¶ines chaperonnes sont indispensables ¯ tous les organismes vivants par leur implication dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire et dans la gestion de multiples facteurs de stress environnementaux (temp¶rature, pollution, salinit¶, radiation). Largement utilis¶e en ¶cologie comme biomarqueur de stress, la famille des HSP70 constitue ¶galement une cible th¶rapeutique privil¶gi¶e dans les recherches contre les maladies neurod¶g¶n¶ratives et les cancers. Dans le cytosol, une large vari¶t¶ de HSP70 a ¶t¶ observ¶e chez quelques esp·ces mod·les (drosophile, levure, humain). N¶anmoins, cette diversit¶ reste m¶connue au sein du phylum Arthropoda, et plus particuli·rement chez les d¶capodes.

La diversit¶ des HSP70 cytosoliques a ¶t¶ ¶tudi¶e partir de 735 s¶quences issues 198 esp·ces d'arthropodes, dont 142 s¶quences de d¶capodes obtenues durant ces travaux. Les analyses de phylog¶nie mol¶culaire ont permis la description d'au moins trois groupes distincts de HSP70 cytosoliques chez les arthropodes, comprenant chacun plusieurs subdivisions m¶connues jusqu° pr¶sent. Une nouvelle classification et un mod·le ¶volutif des HSP70 cytosoliques sont propos¶s pour le phylum Arthropoda. Les profils d'expression observ¶s dans ces groupes remettent en cause la cat¶gorisation des HSP70 selon leurs caract·re constitutif (HSC70) ou inductible (HSP70). Les sp¶cificit¶s structurales g¶niques et prot¶iques observ¶es pour chacune de ces formes refl·teraient diff¶rentes capacit¶s d'interaction des HSP70 avec leurs co-chaperons et autres cofacteurs.

Mots cl¶s Biologie mol¶culaire <sup>-</sup> Phylog¶nie <sup>-</sup> Evolution <sup>-</sup> HS P70 <sup>-</sup> Famille multig¶nique <sup>-</sup> Arthropoda

## Abstract

The 70 kDa Heat Shock Proteins (HSP70) are considered the most conserved members of the HSP family. These molecular chaperones are primordial to living beings, because of their implications in many cellular pathways and the management of multiple environmental stress factors (e. g., temperature, pollutants, salinity, radiations). Widely used in ecology as a biomarker of environmental stress, the HSP70 family is also a privileged therapeutic target for neurodegenerative diseases and cancers. In the cytosol, a wide variety of HSP70 is observed in few species (Drosophila, human, Nevertheless, the diversity of cytosolic HSP70 remains unclear amongst the Arthropoda phylum, especially within decapods.

The diversity studies of cytosolic HSP70 were based on 735 sequences from 198 arthropod species, including 142 sequences from decapods obtained during this work. Molecular phylogeny analyses revealed at least three distinct groups of HSP70 within comprising several subdivisions. This study proposes a new classification and an evolutionary model of cytosolic HSP70 amongst the Arthropoda phylum. The expression profiles observed in each group lead to reconsider the HSP70 classification according to their constitutive (HSC70) or inducible (HSP70) features. The observed structural specificities of genes and proteins, relative to each form of HSP70, will probably have to be linked to distinct interactions with co-chaperones or other co-factors.

Key Words Molecular biology <sup>-</sup> Phylogeny <sup>-</sup> Evolution <sup>-</sup> HSP70 <sup>-</sup> Multigenic family <sup>-</sup> Arthropoda