

IRSNINSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

ÉTUDE DE L'IMPACT DES RADIONUCLÉIDES
REJETÉS PAR LES INSTALLATIONS
NUCLÉAIRES DU NORD COTENTIN SUR
L'HUITRE CREUSE *Crassostrea gigas*.
ANALYSE DE L'EXPRESSION DE MARQUEURS
MOLÉCULAIRES DE STRESS.

Emilie FARCY
Novembre 2006
ISRN IRSN - 2006/77 - FR

Laboratoire de Radioécologie de Cherbourg-Octeville

IRSN - Siège social - 77, av. du Général-de-Gaulle - 92140 Clamart
Standard +33 (0)1 58 35 88 88 - RCS Nanterre B 440 546 018



UNIVERSITÉ de CAEN – BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie

Thèse de doctorat
présentée par

Emilie FARCY

en vue de l'obtention du
DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ de CAEN BASSE-NORMANDIE
Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions
(Arrêté du 25 Avril 2002)

**ÉTUDE DE L'IMPACT DES RADIONUCLÉIDES REJETÉS
PAR LES INSTALLATIONS NUCLÉAIRES DU NORD
COTENTIN SUR L'HUITRE CREUSE *Crassostrea gigas*.
ANALYSE DE L'EXPRESSION DE MARQUEURS
MOLÉCULAIRES DE STRESS.**

Thèse dirigée par Jean-Marc Lebel, Université de Caen Basse-Normandie
et Bruno Fiévet, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

Thèse soutenue le 28 novembre 2006 devant un jury composé de :

Pr Michel FOURNIER
Dr. Marc BENDERITTER
Pr. François LÉBOULENGER
Pr. Michel MATHIEU
Pr. Jean-Marc LEBEL
Dr. Bruno FIÉVET

INRS-Institut Armand-Frappier
IRSN
Université du Havre
Université de Caen
Université de Caen
IRSN

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

AVANT-PROPOS

La région Basse-Normandie est une des premières régions de production conchylicole en France (ostréiculture, mytiliculture). L'ostréiculture représente un secteur d'activité important pour l'économie bas-normande. Cette région est également particulièrement concernée par l'impact éventuel de l'industrie nucléaire sur l'environnement puisque, dans le nord Cotentin, sont hébergés l'usine AREVA de retraitement des combustibles usés, la centrale nucléaire EDF de Flamanville, le centre de stockage de la Manche de l'ANDRA et l'Arsenal maritime de Cherbourg, où sont assemblés les sous-marins nucléaires de la Marine Nationale. Parmi ces installations nucléaires, l'usine AREVA et la centrale EDF de Flamanville sont autorisées à rejeter de façon contrôlée des effluents radioactifs liquides en Manche. Les concentrations en radionucléides artificiels qui en résultent dans les différents compartiments du milieu marin sont faibles, en particulier lorsqu'on les compare aux teneurs en radionucléides déjà présents à l'état naturel.

A l'heure actuelle, les connaissances sur l'existence d'effets biologiques radio-induits dans le champ des faibles doses en situation d'exposition chronique sont limitées. En 2001, l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) a initié un programme de recherche, le programme EnvirHom, visant à étudier les effets d'une exposition chronique à des faibles doses de radioactivité chez l'homme et diverses espèces de l'environnement. Cette thèse s'inscrit dans le cadre de ce programme EnvirHom.

Dans ce contexte, ce travail de thèse est dédié à l'étude de l'impact des rejets de l'industrie nucléaire du nord Cotentin en milieu marin, sur l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Un des principaux objectifs de la thèse a consisté à définir des marqueurs moléculaires susceptibles de témoigner avec la plus grande sensibilité possible d'un impact éventuel de la présence de ces radionucléides artificiels dans les huîtres. En réponse à divers types de perturbations du milieu, les cellules des organismes vivants sont susceptibles d'exprimer des molécules qui témoignent de façon très sensible d'un état de stress. La mesure de l'expression de ces marqueurs de stress constitue une méthode très fine, de plus en plus répandue en écotoxicologie, et déjà largement utilisée sur des modèles de vertébrés supérieurs.

Ces travaux de thèse ont été réalisés en cotutelle entre deux laboratoires :

- ✚ Le Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines (LBBM) de l'université de Caen-Basse-Normandie bénéficie du statut d'unité mixte IFREMER (UMR 100 "Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins"). Depuis de nombreuses années, le LBBM se consacre à l'étude de la biologie des espèces marines, et plus précisément, à la physiologie des mollusques marins ainsi qu'à l'étude des microalgues et des macroalgues. Récemment, la montée des préoccupations environnementales a ouvert la voie vers de nouvelles recherches, à l'interface entre la physiologie et l'écotoxicologie marine. L'analyse de l'influence de stress environnementaux sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation du stress cellulaire s'inscrit dans ce contexte de suivi de la qualité environnementale des écosystèmes côtiers (programme PROMESSE¹).
- ✚ Le Laboratoire de Radioécologie de Cherbourg-Octeville (LRC) étudie depuis plusieurs décennies, l'impact des radionucléides rejetés par les installations nucléaires du nord Cotentin sur l'environnement marin. De nombreux travaux ont eu pour objet la compréhension des mécanismes de dispersion et de transfert des radionucléides dans l'environnement : distribution dans les différents compartiments des écosystèmes en Manche (eau de mer, sédiments, algues, animaux jusqu'au niveau cellulaire), évolution des concentrations dans le temps. Entre autres, les travaux qui ont été réalisés ont permis de préciser la localisation de certains radionucléides artificiels au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire. Fort de cette expérience, une nouvelle étape consiste à étudier les conséquences biologiques de la présence de ces radionucléides dans les tissus.

Ce sujet de thèse s'inscrit donc pleinement dans la continuité des travaux du LRC et du LBBM. Il correspond également à une demande sociétale ainsi qu'à des préoccupations de la communauté scientifique relayées par les instances internationales en charge de la radioprotection et fédérées par les programmes cadres de l'Union Européenne (MARINA II², FASSET³, ERICA⁴). Ce travail a bénéficié d'un cofinancement du conseil Régional de la Basse-Normandie et de l'IRSN.

¹ Programme de Recherche sur les Organismes Marins et Estuariens en situation de Stress Environnemental

² Project on the radiological exposure of the European Community from radioactivity in North European marine waters

³ Framework for ASSEssment of Environmental ImpacT

⁴ Environmental Risks from Ionizing ContAminant

ABSTRACT

This thesis explores the potential radiological impact of radionuclide discharges from the nuclear industry on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. One of the major goals of this research was to identify markers that could be used to monitor the effects of low-level chronic irradiation. We decided to focalize on the expression of stress-induced genes involved in the regulation of cellular stress, focusing on transcription. First, homology cloning was used to identify four new cDNAs encoding stress markers. Then data collected at various sites enabled to evidence that mRNA levels for each of the genes of interest naturally vary to a significant degree, based on individual differences and seasonal factors. Comparing oysters from exposed sites with those from a reference site located on the Atlantic coast did not suggest any relationship between mRNA levels changes and the oysters' exposure to liquid radioactive waste from the AREVA reprocessing plant. In the environment, we found that those radionuclide releases resulted in a very small increase in radioactivity in oysters, especially compared with their natural radioactivity. In the laboratory, by exposing the oysters to higher radionuclide concentrations than those found in the environment, we were able to identify two genes as potential candidates for studying the effects of chronic exposure to low doses of ionizing radiations in the oyster: genes encoding MT and MXR. We confirmed that transcriptional induction of these two genes occurs in response to high doses of acute irradiation. Finally, the comparison between environmental results and the laboratory results underlined the complementarity of these two approaches. In particular, it revealed that seasonal variations in mRNA levels probably have a significant effect on the stress response.

RÉSUMÉ

Ce travail de thèse vise à étudier l'impact radiologique potentiel des radionucléides rejetés par les installations nucléaires du nord Cotentin sur l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Un des principaux objectifs de la thèse a consisté à définir des marqueurs susceptibles de témoigner d'un éventuel effet d'une irradiation chronique bas niveau. L'accent a été mis sur l'expression de gènes impliqués dans diverses fonctions de régulation du stress cellulaire, au niveau transcriptionnel. Un premier travail de clonage par homologie a permis l'identification de 4 nouveaux ADNc codant pour des marqueurs de stress chez l'huître creuse et l'ormeau. Dans un deuxième temps, des mesures in situ ont permis de mettre en évidence que le niveau d'ARNm des gènes étudiés est naturellement très variable en fonction des individus et de la saison. La comparaison du niveau d'ARNm entre des sites exposés aux rejets et un site de référence, situé sur la côte atlantique, a révélé que les variations de ces marqueurs ne semblent pas influencées par les rejets de l'industrie nucléaire dans le nord Cotentin. Enfin, la mesure des concentrations en radionucléides dans les tissus d'huître a montré que les concentrations en radionucléides artificiels sont très faibles par rapport à la radioactivité naturelle. En laboratoire, l'exposition des huîtres à des concentrations de radionucléides plus élevées que celles mesurées dans l'environnement a permis de mettre en évidence deux gènes, candidats potentiels pour l'étude des effets des radiations ionisantes en situation de chronicité et faible dose chez l'huître : les gènes codant pour MT et MXR. L'induction transcriptionnelle de ces deux gènes a été confirmée en réponse à des fortes doses d'irradiation aiguë. Finalement, la mise en lien des résultats de l'approche environnementale et des résultats expérimentaux a permis de souligner la complémentarité de ces deux approches. En particulier, au niveau transcriptionnel, il semble que la réponse au stress puisse être fortement influencée par les variations saisonnières "intrinsèques" du niveau d'ARNm.

REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire et la Région Basse-Normandie qui m'ont co-financée pendant ces trois années de thèse.

Je tiens également à remercier les directeurs des deux laboratoires dans lesquels j'ai effectué mes travaux de recherche :

Je remercie Pierre Germain, directeur du laboratoire de Radioécologie de Cherbourg-Octeville, pour avoir toujours veillé à ce que je dispose de bonnes conditions de travail et pour l'intérêt qu'il a porté à cette thèse.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur Michel Mathieu pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines (LBBM) et pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je suis très honorée que le Docteur Marc Benderitter et le Professeur Michel Fournier aient consenti à être rapporteurs de ce travail, avec toute l'autorité scientifique qui les caractérise.

Je remercie vivement le Professeur François Leboulenger, directeur du laboratoire d'Ecotoxicologie-Milieux aquatiques (LEMA, Le Havre), d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

C'est avec une profonde reconnaissance que je remercie mes deux directeurs de thèse : le Professeur Jean-Marc Lebel et le Docteur Bruno Fiévet. Je vous remercie d'avoir toujours fait en sorte que cette cotutelle se déroule dans de bonnes conditions. J'ai eu la chance d'avoir à faire à deux personnes d'une grande qualité scientifique et humaine.

Jean-Marc, un immense merci pour ton soutien et ton enthousiasme. Tu as toujours su me motiver et m'encourager. J'ai beaucoup apprécié notre collaboration.

Bruno, merci beaucoup pour ta grande disponibilité, ton sens de l'organisation et ton immense rigueur. Tu fais partie de ceux "qui mettent les mains dans le cambouis" et qui trouvent ça naturel... Ça a été pour moi un véritable honneur de pouvoir travailler avec toi. Au-delà d'un encadrement de qualité, tu m'as transmis une conception de la recherche et je compte bien m'en inspirer dans les années à venir.

Je tiens à remercier trois personnes qui m'ont particulièrement aidé dans les manips : Claire Voiseux, Christophe Fleury et Antoine Serpentine.

Claire, tu m'as donné bien plus qu'un énorme coup de main. Je te remercie pour ton investissement réel dans la thèse. De la zone surveillée aux plongées dans les eaux cotentinoises..., toutes ces heures passées en ta compagnie ont été un véritable plaisir.

Christophe, merci pour tes conseils de maître Jedi. Heureusement que tu étais là...

Antoine, merci pour tes coups de main et pour ton coup de patte pour disséquer les ormeaux.

Ce travail n'aurait pas pu se faire sans le concours de différents ostréiculteurs. Je les remercie sincèrement de nous avoir toujours accueilli avec sympathie et de nous avoir fait confiance. Un grand merci à :

- la famille Lefèvre, La Tatihou G.A.E.C, à Saint-Vaast la Hougue (la-tatihou.gaec@wanadoo.fr)
- la famille Jénot, Tibidy huitre, à Carnac (www.tibidy-huitres.com)
- la famille Maisons, Huitre Céline Maisons, SCEO Edulis, à Cancale (www.huitresdenysmaisons.com)
- Mr Davoust et toute l'équipe de La Calvadosienne, à Asnelles (www.calvadosienne.fr)

1000 litres d'eau de mer, 4 bourriches d'huîtres, une vingtaine d'ormeaux, trois groupes froids, 1 incubateur à cellules, 2 bonbonnes d'azote liquide, c'est bon on peut y aller !
Direction Fontenay aux roses.

Je remercie :

- Jocelyne Aigueperse pour avoir déclenché cette collaboration et pour avoir fait en sorte qu'elle soit effective.
- Jean-François Bottollier-Depois, chef du Service de dosimétrie externe (IRSN) pour avoir mis à notre disposition le matériel ainsi que le personnel nécessaire à la mise en place des irradiations à forte dose : un grand merci à Isabelle Clairand, chef du Laboratoire de dosimétrie des rayonnements ionisants (IRSN), Ismaël Robbes et François Trompier. Je dois avouer que je reste rêveuse devant vos barres d'erreur.
- Philippe Voisin, chef du Service de radiobiologie et épidémiologie (IRSN) de nous avoir accueilli au sein de ses locaux et d'avoir mis à notre disposition le matériel et l'espace nécessaire à la bonne réalisation de ce projet. Un grand merci à Isabelle Dublineau-Naud pour s'être décarcassée pour nous, ainsi qu'à Christine Linard et Maâmar Souidi.
- Alain Bochet du Laboratoire de Radioécologie de Cherbourg-Octeville de nous avoir épaulé dans cette "périlleuse" aventure.

Je tiens également à remercier Virginie Prévost, Bénédikte Hébert et François Sichel du GRECAN (Groupe Régional d'Etudes sur le CANcer – EA1772) de nous avoir accordé un peu de leur temps pour nous guider dans le développement de la mesure des 8-oxo-dG chez l'huître.

Un grand merci à Béatrice Adeline et Katherine Costil du Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines pour leur aide dans nos essais d'histologie.

Je remercie Christophe Lelong pour ses conseils éclairés en biologie moléculaire.

Je remercie le spectromètre de choc du Laboratoire de Radioécologie de Cherbourg-Octeville, Luc Sollier, ainsi que le Laboratoire de Mesure de la Radioactivité Environnementale (IRSN) pour toutes leurs mesures en spectrométrie.

Au delà de l'aspect technique, ces collaborations ont donné lieu à un échange scientifique et humain très enrichissant.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à ce que cette thèse soit une agréable aventure : les thésards et le personnel du LBBM, le personnel du LRC.

Pour finir, un immense merci à mes proches :

- ma famille : mes parents, Justine et Pierrot ainsi que ma belle-famille : Kiki et Jean, Fafa et Lolo.
- mes amis : Zaz et Sam pour tous les bons moments passés ensemble et leur énorme coup de main dans les travaux de la maison, Anne, Perrine et toute la tribu Nonente 7 : Romain, Nicos et Caro, Nicob et Marie et Nathan, Reuns et Béné et Callian, Sylou... Sans vous, la vie serait certainement moins rigolote.

Celui que je remercie par-dessus tout s'appelle Sébastien. Mon bricoleur fou. Merci d'avoir fait autant de sacrifices pour que les 400 km qui nous séparent ne soient jamais un obstacle. Merci de m'avoir soutenue et encouragée. Merci...

Ce travail a donné lieu à plusieurs communications scientifiques.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- Farcy E., Voiseux C., Lebel J.M., Fiévet B. Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *Sci. Total Environ.* (in press)
- Farcy E., Serpentine A., Fiévet B., Lebel J.M. Identification of cDNA encoding Hsp70 and Hsp90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: transcriptional induction in response to thermal stress in hemocytes primary culture. *Comp. Biochem. Physiol. part B* (in press)
- Farcy E., Voiseux C., Lebel J.M., Fiévet B. Cell stress molecular markers transcriptional level changes in response to ionizing radiations in the oyster *Crassostrea gigas*. (en préparation)
- Farcy E., Voiseux C., Lebel J.M., Fiévet B. Differential mRNA response to heat shock at two period of the annual cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. (en préparation)
- Farcy E., Fleury C., Dubos M.P., Voiseux C., Serpentine A., Lelong C., Fiévet B., Lebel J.M. Molecular cloning of two molluscan cDNA encoding p53 family members in the pacific oyster *Crassostrea gigas* and the abalone *Haliotis tuberculata*. (en préparation)

COMMUNICATIONS A DES CONGRES INTERNATIONAUX

- Farcy E., Voiseux C., Lebel J.M., Fiévet B. Cell Stress Molecular Markers Transcriptional Level Changes in Response to Ionizing Radiations in the Oyster *Crassostrea Gigas*. European International Radiation Protection Association Congress. 15-19 mai 2006 – Paris, France. Présentation orale.
- Farcy E., Voiseux C., Lebel J.M., Fiévet B. Seasonal variation in the Heat Shock response in the oyster *Crassostrea gigas*. SETAC Europe 16th Annual Meeting. 7-11 mai 2006 – La Haye, Pays-Bas. Poster
- Farcy E., Serpentine A., Fiévet B., Lebel J.M. mRNA expression level of HSPs as biomarker of response to thermal stress in haemocytes of *Haliotis tuberculata*. SETAC Europe 15th Annual Meeting. 22-26 mai 2005 - Lille, France. Poster
- Farcy E., Voiseux C., Fiévet B., Serpentine A., Lebel J.M. Environmental monitoring of stress inducible genes at the transcriptional level in the bivalve *Crassostrea gigas*. 8th International Conference on Shellfish Restauration. 2-5 octobre 2005 – Brest, France. Présentation orale.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE ----- 1

I) La radioactivité et les rejets de l'industrie nucléaire.....	3
II) L'huître <i>Crassostrea gigas</i>.....	7
II-1) Biologie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)	7
II-2) Intérêt du modèle huître	11
II-3) Radiosensibilité des mollusques	11
III) Stratégies et choix	14
III-1) Choix d'une étude au niveau sub-cellulaire : ARNm, Protéines, ADN	14
III-2) Modèle In Vitro : Primoculture d'hémocytes d'orveau <i>Haliotis tuberculata</i>	16
III-3) Choix d'une approche conjointe environnement / laboratoire	18
IV) Les effets des radionucléides au niveau sub-cellulaire	19
IV-1) L'ionisation, mécanisme d'interaction de la radioactivité sur la matière	19
IV-2) L'action des radiations sur la cellule et ses composants	19
IV-3) Effets stochastiques et effets déterministes	22
IV-4) Effet chimique et effet radiologique	22
V) Les grandes fonctions cellulaires susceptibles d'être altérées par les radiations ionisantes.....	23
V-1) Protéines chaperonnes	24
V-2) Contrôle du cycle cellulaire	25
V-3) Mécanismes de détoxification cellulaire	29
V-4) Régulation du stress oxydatif	34
VI) Quantification des ARNm en PCR temps réel	39
VI-1) Principe général de la PCR quantitative en temps réel	39
VI-2) Le cycle seuil : Ct (Treshold Cycle)	40
VI-3) Courbe de fusion	41
VI-4) Mise au point des amorces	42
VI-5) Quantification Relative	45
VI-6) Préparation des échantillons et protocole d'amplification	46

PARTIE 1 - CLONAGE PAR HOMOLOGIE DE NOUVEAUX ADNC CODANT POUR DES PROTÉINES INDUCTIBLES PAR LE STRESS ----- 51

I) Méthodologie générale	54
II) Résultats du clonage : Famille Hsp (orveau)	57
III) Résultats du clonage : Famille p53 (orveau et huître).....	58
II-1) Etude bibliographique : structure des protéines de la famille p53	58
II-2) Résultats du clonage de la famille p53 chez l'huître et l'orveau	60
IV) Conclusion de la partie clonage.....	67

PARTIE 2 - VARIABILITÉ DE LA CONCENTRATION EN RADIONUCLÉIDES ET DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS DANS L'ENVIRONNEMENT ----- 69

I) Concentrations en radionucléides	72
I-1) Fluctuations spatio-temporelles de la concentration en radionucléides dans la chair entière	72
I-2) Activité des émetteurs gamma dans les différents tissus de l'huître	76
I-3) Activité de l'émetteur alpha ²¹⁰ Po dans les différents tissus de l'huître	78
II) Variations saisonnières et spatiales du niveau d'ARNm	80
II-1) Matériel et Méthodes	80
II-2) Variations saisonnières de l'expression des gènes inductibles par le stress dans les huîtres de Saint-Vaast	85
II-3) Relation entre les niveaux d'ARNm à Saint-Vaast et la température de l'eau de mer	90
II-4) Comparaison inter-site : variations spatiales du niveau d'ARNm	91
II-5) Site ou saison : quel facteur structure le plus les données ? Analyse en Composantes Principales	98
III) Discussion des résultats de l'approche environnementale	101
III-1) Concentrations en radionucléides	101
III-2) Concentrations en ARNm	103
IV) Conclusion de l'approche environnementale	113

PARTIE 3 - ÉTUDE DE LA RÉPONSE AU STRESS EN LABORATOIRE ----- 115

I) Réponse des huîtres aux rayonnements ionisants	118
I-1) Choix du ⁶⁰ Co	118
I-2) Contamination chronique faible dose : balnéation des huîtres dans du ⁶⁰ Co pendant 6 semaines	118
I-3) Irradiation externe aiguë "forte dose" : ICo 4000 (CEN, Fontenay aux Roses)	144
I-4) Discussion des résultats obtenus en réponse aux irradiations	160
II) Comparaison avec un autre type de stress physique : un choc thermique d'1h à 37°C	162
II-1) Protocole d'exposition	163
II-2) Variations du niveau d'ARNm après un choc thermique d'1h à 37°C	163
II-3) Variations des indicateurs du stress oxydant en réponse au choc thermique	166
II-4) Discussion des résultats des chocs thermiques	170
III) Conclusion de l'approche en laboratoire	175

DISCUSSION GÉNÉRALE ----- 177

I) La problématique des faibles et très faibles doses	179
II) La question de l'impact	180
III) Saisonnalité et réponse aux radiations	186
III-1) radiorésistance induite et radioadaptation : phénomène de sensibilisation qui modifie la réponse aux radiations	186
III-2) Variabilité saisonnière de la réponse aux radiations ?	187

ANNEXE 1 - Identification of cDNA encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: transcriptional induction in response to thermal stress in hemocytes primary culture (article accepté dans Comp. Biochem. Physiol.)

ANNEXE 2 - Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment (article accepté dans Sci. Total. Environ.)

ANNEXE 3 - Ensemble des résultats obtenus en réponse à un choc thermique d'1h à 37°C réalisé en mars 2006

ANNEXE 4 - Ensemble des résultats obtenus en réponse à un choc thermique d'1h à 37°C réalisé en septembre 2005

ANNEXE 5 - Dosimétrie des configurations d'irradiation dans le cadre d'études sur l'huître et l'ormeau
Rapport du Service de Dosimétrie Externe (IRSN/DRPH/SDE)

SOMMAIRE DES MATERIEL ET METHODES

LES MODÈLES D'ÉTUDE

Modèle In Vivo : L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>.....	7
A) Généralités	7
B) Anatomie	8
C) Cycle biologique et reproduction	8
D) Collecte et acclimatation	10
Modèle In Vitro : Primoculture d'hémocytes d'ormeau <i>Haliotis tuberculata</i>	16
A) Biologie de l'ormeau <i>Haliotis tuberculata</i>	17
B) Maintenance / Acclimatation	17
C) Traitement : mise en culture des hémocytes	17

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Quantification des ARNm en PCR temps réel	39
A) Principe général de la PCR quantitative en temps réel	39
B) Le cycle seuil : Ct (Treshold Cycle)	40
C) Courbe de fusion	41
D) Mise au point des amorces	42
E) Gène référent	44
F) Quantification Relative	45
G) Préparation des échantillons et protocole d'amplification	46
a) Extraction et quantification des ARN	
b) Traitement à la DNase I (Sigma-Aldrich)	
c) Transcription inverse des ARN totaux	
d) Quantification en PCR temps réel	
Méthodologie générale du clonage par homologie.....	54

BIOCHIMIE

Dosage de peroxydes aqueux et organiques	136
A) Principe de la mesure	136
B) Extraction des protéines au tampon Phosphate	137
C) Gamme étalon et calcul final	137
a) Détermination des peroxydes aqueux	
b) Détermination des peroxydes organiques	
c) Expression des résultats	
Activité enzymatique de la catalase	140
A) Principe et protocole de mesure	140
B) Choix du tampon d'extraction des protéines	140
C) Dosage des protéines totales	141
D) Calcul final	141

SUIVI ENVIRONNEMENTAL

Concentrations en radionucléides	72
A) Echantillonnage	72
B) Spectrométrie gamma	72
C) Spectrométrie alpha	74
Variations saisonnières et spatiales du niveau d'ARNm.....	80
A) Echantillonnage et traitement des échantillons	80
B) Température de l'eau de mer	80
C) Analyse statistique	81
D) Normalisation du niveau d'ARNm	81

EXPOSITIONS EN LABORATOIRE

Contamination chronique faible dose.....	118
A) Protocole expérimental	118
B) Spectrométrie gamma : activité du ^{60}Co dans les huîtres contaminées	120
C) Estimation de dose	123
a) Protocole	
b) Résultats de la dosimétrie	
D) Analyse des résultats de spectrométrie et dosimétrie	126
Irradiation externe aiguë forte dose	144
A) Protocole expérimental et dosimétrie	144
B) Rapport de dosimétrie	Annexe 5
Choc thermique : protocole d'exposition.....	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Dose seuil et délai d'apparition des effets déterministes pour la peau.	22
Tableau 2 : Séquence et numéro d'accèsion GenBank des amorces utilisées en PCR temps réel pour les tissus d'ormeau et d'huître.	43
Tableau 3 : Homologie (%) entre la séquence d'acides aminés clonée chez l'ormeau et celles de plusieurs représentants de p73 et p53.	61
Tableau 4 : Homologie (%) entre la séquence partielle d'acides aminés clonée chez l'huître et celles de plusieurs représentants de p53.	64
Tableau 5 : Concentrations en émetteurs gamma artificiels dans les tissus mous d'huîtres collectées à Saint-Vaast (STV), exprimées en Bq.kg ⁻¹ de matière sèche ± incertitude métrologique.	73
Tableau 6 : Activité du ⁶⁰ Co et du ¹³⁷ Cs dans les coquilles d'huîtres de Saint-Vaast.	74
Tableau 7 : Concentrations en radionucléides transuraniens dans les tissus mous des huîtres collectées à Carnac (CRC), Cancale (CCL) et Saint-Vaast (STV), exprimées en Bq.kg ⁻¹ de matière sèche ± incertitude métrologique.	76
Tableau 8 : Activité (Bq.kg ⁻¹ sec) en ⁴⁰ K dans les différents tissus de l'huître.	76
Tableau 9 : Activité en Bq.kg ⁻¹ sec de quelques radioémetteurs gamma d'origine artificielle (⁶⁰ Co, ¹³⁷ Cs et ¹²⁹ I) dans les différents tissus de l'huître.	77
Tableau 10 : Activité du ²¹⁰ Po dans les différents organes d'huîtres prélevées en septembre et octobre 2004 à Saint Vaast.	78
Tableau 11 : Coefficient de corrélation entre les niveaux d'ARNm des branchies et des tissus mous. .	90
Tableau 12 : Coefficients de corrélation entre les niveaux d'ARNm à STV et la température de l'eau de mer au port de Goury entre janvier 2004 et septembre 2005.	91
Tableau 13 : Facteurs de dilution des rejets d'AREVA exprimés en Bq.m ⁻³ par TBq.an ⁻¹ , dans les quatre sites d'échantillonnage d'huître.	92
Tableau 14 : Matrice de corrélations sur l'axe 1 et l'axe 2.	99
Tableau 15 : Matrice des valeurs-test pour les paramètres illustratifs.	100
Tableau 16 : Facteurs de concentration (FC) en ⁶⁰ Co dans la chair des huîtres à STV et dans la chair et la coquille des huîtres après 6 semaines d'immersion dans une eau enrichie en ⁶⁰ Co.	122
Tableau 17 : Débit de dose, corrigé du bruit de fond ambiant, dans différentes matrices (tissus mous, coquille, eau de mer) et selon différentes conditions d'exposition.	125
Tableau 18 : Evolution du débit de dose total reçu au niveau des tissus mous de l'huître en fonction du temps.	127
Tableau 19 : Récapitulatif des effets observés dans la littérature à des débits de dose faibles, chez les invertébrés marins.	128
Tableau 20 : Synthèse bibliographique de résultats obtenus pour l'activité de la catalase avec différents stressés chimiques ou physiques chez les mollusques avec des radiations, chez le rat et le tournesol.	159
Tableau 21 : Vue d'ensemble des résultats obtenus en réponse à un choc thermique d'1h à 37°C, réalisé en mars 2006.	164
Tableau 22 : Vue d'ensemble des résultats obtenus en réponse à un choc thermique d'1h à 37°C, réalisé en septembre 2005.	165

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Rejets annuels liquides (en TBq) de l'usine AREVA La Hague entre 1966 et 2000.	4
Figure 2 : Evolution de la dose efficace totale (μSv) pour un adulte moyen entre 1966 et 1996.....	4
Figure 3 : Anatomie interne de l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	8
Figure 4 : Cycle de l'huître creuse <i>C. gigas</i>	9
Figure 5 : Dose létale et radiorésistance chez plusieurs groupes taxonomiques	12
Figure 6 : Les effets des rayonnements ionisants au niveau sub-cellulaire.	20
Figure 7 : Effet direct ou indirect des rayonnements ionisants sur l'ADN.	21
Figure 8 : Schéma illustrant les rôles cellulaires de p53.....	26
Figure 9 : Schéma simplifié de la régulation de la protéine p53.....	27
Figure 10 : Schéma synthétique des mécanismes de détoxication cellulaire de phase I, II et III pouvant être induit en réponse à la génération de molécules toxiques par les radiations ionisantes ..	33
Figure 11 : Suite de réactions monoélectroniques générant des espèces réactives de l'oxygène	34
Figure 12 : Modèle d'organisation des domaines structuraux de CgMT1 et CgMT2.....	37
Figure 13 : Pro-oxydants et anti-oxydants susceptibles d'altérer l'équilibre de la balance oxydative...	38
Figure 14 : Schéma illustrant la propriété du SYBR Green à émettre de la fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin	40
Figure 15 : 96 amplifications différentes avec la même quantité d'ADNc au départ. Les quantités obtenues en fin de PCR sont différentes (plateaux) tandis que le cycle seuil (Ct) est le même.	41
Figure 16 : Courbe de fusion et température de fusion	42
Figure 17 : Validation expérimentale des amorces pour la PCR temps réel.	43
Figure 18 : Schéma synthétique des différentes étapes conduisant au clonage d'un nouvel ADNc.	56
Figure 19 : Représentation schématique de la structure des protéines de la famille p53.....	59
Figure 20 : Alignement protéique des séquences de p73 identifiées chez l'ormeau, la mye et le calamar avec la protéine p53 séquencées chez l'homme. Identification des domaines conservés et caractéristiques.	62
Figure 21 : Alignement entre les protéines p53 identifiées chez les mollusques bivalves <i>Mya arenaria</i> et <i>Mytilus edulis</i> , chez l'homme et le fragment identifié chez l'huître	65
Figure 22 : Alignement protéique de l'ADNc complet du gène p73_like identifié chez l'ormeau et du fragment d'ADNc du gène p53_like identifié chez l'huître	66
Figure 23 : Carte montrant l'usine AREVA de retraitement de combustibles usés et les quatre sites d'échantillonnage situés sur les côtes atlantique (Carnac) et de la Manche (Cancale, Asnelles et Saint- Vaast).	72
Figure 24 : Activité du ^{40}K dans les chairs entières d'huîtres prélevées à Saint-Vaast entre juillet 2002 et février 2005 et Asnelles, Cancale et Carnac entre mars 2004 et janvier 2005.	73
Figure 25 : Variations saisonnières de l'activité du ^{210}Po dans des huîtres prélevées mensuellement à Saint-Vaast et trimestriellement à Asnelles, Cancale et Carnac entre novembre 2003 et octobre 2005.	75
Figure 26 : Répartition (%) par organe de l'activité en ^{129}I ($\text{Bq.kg}^{-1}\text{ sec}$) chez l'huître.	78
Figure 27 : Répartition par organe (%) de l'activité ($\text{Bq.kg}^{-1}\text{ poids sec}$) du ^{210}Po	79
Figure 28 : Valeurs mensuelles de température de l'eau de mer, mesurée au port de Goury, près de Saint-Vaast.	80
Figure 29 : Fluctuation des niveaux d'ARNm de l'actine et de la GAPDH normalisés par rapport à l'ARNr 18S.	83
Figure 30 : Fluctuation du niveau d'ARNm de p53 dans la branchie entre janvier 2004 et juin 2005 normalisé par rapport à l'ARNm de l'actine, l'ARNm de la GAPDH ou l'ARNr 18S.	84
Figure 31 : Niveaux d'ARNm de Hsp70, Hsc72 et Hsp90 dans les branchies et les tissus mous d'huîtres collectées mensuellement à STV entre janvier 2004 et septembre 2005.	86
Figure 32 : Niveaux d'ARNm de CYP450, GST, MXR dans les branchies et les tissus mous d'huîtres collectées mensuellement à STV entre janvier 2004 et septembre 2005.	87
Figure 33 : Niveaux d'ARNm de MT et SOD dans les branchies et les tissus mous d'huîtres collectées mensuellement à STV entre janvier 2004 et septembre 2005.	88
Figure 34 : Niveaux d'ARNm de p53, p21 dans les branchies et les tissus mous d'huîtres collectées mensuellement à STV entre janvier 2004 et septembre 2005.	89
Figure 35 : Extrait d'une simulation MARS de la dispersion des rejets en tritium de l'usine AREVA dans la zone de la manche.....	92

Figure 36 : Niveaux d'ARNm de Hsp70, Hsc72 et Hsp90 dans les tissus mous et les branchies d'huîtres collectées trimestriellement à CRC, CCL, ASN et STV.	94
Figure 37 : Niveaux d'ARNm de CYP450, GST et MXR dans les tissus mous et les branchies d'huîtres collectées trimestriellement à CRC, CCL, ASN et STV.	95
Figure 38 : Niveaux d'ARNm de MT et SOD dans les tissus mous et les branchies d'huîtres collectées trimestriellement à CRC, CCL, ASN et STV.	96
Figure 39 : Niveaux d'ARNm de p53 et p21 dans les tissus mous et les branchies d'huîtres collectées trimestriellement à CRC, CCL, ASN et STV.	97
Figure 40 : Cercle de corrélation des variables (gènes) sur l'axe 1 et 2.	98
Figure 41 : Graphe d'analyse selon les deux premières composantes principales.	100
Figure 42 : Dispositif expérimental dans chaque bac pour les bacs contaminés en ⁶⁰ Co.	119
Figure 43 : Cinétique d'incorporation du ⁶⁰ Co (activité en Bq.g ⁻¹ frais) dans la chair et la coquille d'huîtres immergées dans de l'eau de mer contaminée en ⁶⁰ Co.	120
Figure 44 : Activité du ⁶⁰ Co (Bq.g ⁻¹) par organe après 6 semaines de balnéation.	123
Figure 45 : Répartition (%) par organe de la radioactivité du ⁶⁰ Co dans l'huître.	123
Figure 46 : Cinétique d'augmentation du débit de dose (μGy.h ⁻¹) délivré par les tissus mous et la coquille de l'huître au cours des 6 semaines de balnéation dans de l'eau de mer contaminée en ⁶⁰ Co.	125
Figure 47 : Corrélation entre l'estimation du débit de dose et la mesure d'activité du ⁶⁰ Co dans la coquille et dans les tissus mous.	126
Figure 48 : Evolution du débit de dose total reçu au niveau des tissus mous de l'huître en fonction du temps.	128
Figure 49 : Niveaux d'ARNm de Hsp70, Hsc72 et Hsp90 dans les tissus mous et les branchies d'huîtres balnées dans de l'eau de mer contaminée en ⁶⁰ Co, en ⁵⁹ Co et de l'eau de mer non traitée.	132
Figure 50 : Niveaux d'ARNm de CYP450, GST et MXR dans les tissus mous et les branchies d'huîtres balnées dans de l'eau de mer contaminée en ⁶⁰ Co, en ⁵⁹ Co et de l'eau de mer non traitée.	133
Figure 51 : Niveaux d'ARNm de MT et SOD dans les tissus mous et les branchies d'huîtres balnées dans de l'eau de mer contaminée en ⁶⁰ Co, en ⁵⁹ Co et de l'eau de mer non traitée.	134
Figure 52 : Niveaux d'ARNm de p53 et p21 dans les tissus mous et les branchies d'huîtres balnées dans de l'eau de mer contaminée en ⁶⁰ Co, en ⁵⁹ Co et de l'eau de mer non traitée.	135
Figure 53 : Courbe étalon de H ₂ O ₂	137
Figure 54 : Courbe étalon de tert-Butyl hydroperoxyde.	138
Figure 55 : Concentration en peroxydes aqueux et organiques dans les tissus mous et les branchies d'huîtres balnées dans de l'eau de mer contaminée en ⁶⁰ Co, en ⁵⁹ Co et de l'eau de mer non traitée.	139
Figure 56 : Gamme étalon de BSA obtenue à l'aide du kit de dosage Bio-Rad protein assay.	141
Figure 57 : Activité spécifique de la catalase dans les tissus mous et les branchies d'huîtres balnées dans de l'eau de mer contaminée en ⁶⁰ Co, en ⁵⁹ Co et de l'eau de mer non traitée.	142
Figure 58 : Dispositif expérimental d'irradiation avec l'irradiateur au ⁶⁰ Co Ico4000.	144
Figure 59 : Essais de dosimétrie. Estimation de l'absorption des rayonnements gamma par la coquille, l'eau et le plastique du bac.	146
Figure 60 : Bacs d'acclimatation et de maintenance des animaux.	146
Figure 61 : Niveaux d'ARNm de Hsp70, Hsc72 et Hsp90 dans les tissus mous et les branchies d'huîtres témoins ou irradiées à une dose de 20 Gy.	149
Figure 62 : Niveaux d'ARNm de CYP450, GST et MXR dans les tissus mous et les branchies d'huîtres témoins ou irradiées à une dose de 20 Gy.	150
Figure 63 : Niveaux d'ARNm de MT et SOD dans les tissus mous et les branchies d'huîtres témoins ou irradiées à une dose de 20 Gy.	151
Figure 64 : Niveaux d'ARNm de p53 et p21 dans les tissus mous et les branchies d'huîtres témoins ou irradiées à une dose de 20 Gy.	152
Figure 65 : Niveaux d'ARNm de Hsp70, Hsc72 et Hsp90 dans les tissus mous et les branchies d'huîtres témoins ou irradiées à une dose de 100 Gy.	153
Figure 66 : Niveaux d'ARNm de CYP450, GST et MXR dans les tissus mous et les branchies d'huîtres témoins ou irradiées à une dose de 100 Gy.	154
Figure 67 : Niveaux d'ARNm de MT et SOD dans les tissus mous et les branchies d'huîtres témoins ou irradiées à une dose de 100 Gy.	155
Figure 68 : Niveaux d'ARNm de p53 et p21 dans les tissus mous et les branchies d'huîtres témoins ou irradiées à une dose de 100 Gy.	156

Figure 69 : Concentration en peroxydes aqueux et organiques dans les branchies irradiées et les branchies témoins en réponse à une dose de 20 Gy et 100 Gy chez l'huître creuse.....	157
Figure 70 : Température interne de trois huîtres vivantes entre le 28 juillet 2000 et le 2 août 2000.	162
Figure 71 : Niveaux d'expression relative d'ARNm de Hsp70, Hsc72 et Hsp90 dans les branchies d'huître après un choc thermique d'1h à 37°C à deux périodes de l'année : mars 2006 et septembre 2005.	167
Figure 72 : Niveaux d'expression relative d'ARNm de MT et MXR dans les branchies d'huître après un choc thermique d'1h à 37°C à deux périodes de l'année : mars 2006 et septembre 2005.....	168
Figure 73 : Niveaux d'expression relative d'ARNm de p53 et p21 dans les branchies d'huître après un choc thermique d'1h à 37°C à deux périodes de l'année : mars 2006 et septembre 2005.....	169
Figure 74 : Activation par trimérisation de HSF et liaison au HSE	171
Figure 75 : Schéma illustrant le principe de l'extrapolation à l'aide d'une relation dose-effet linéaire sans seuil.	179
Figure 76 : Représentation schématique des principaux résultats obtenus au cours de la thèse pour les gènes MT et MXR.	182

***INTRODUCTION
GÉNÉRALE***

1) La radioactivité et les rejets de l'industrie nucléaire

La radioactivité a été découverte en 1896 par Henri Becquerel. Malgré les nombreuses applications positives du nucléaire, l'histoire a montré qu'une utilisation, civile ou militaire, déraisonnée de la radioactivité pouvait avoir des conséquences désastreuses : Tchernobyl, Hiroshima, Nagasaki. Ces catastrophes sans précédent ont indéniablement marqué l'inconscient collectif. On ne peut cependant pas négliger les multiples applications du nucléaire dans différents secteurs, comme par exemple :

- la santé : stérilisation du matériel, traitement des cancers par radiothérapie, imagerie médicale,
- l'industrie agro-alimentaire : stérilisation des denrées,
- le bâtiment : gammagraphie,
- l'énergie : électricité, propulsion des sous-marins nucléaires.

Aujourd'hui, la France est engagée dans un programme énergétique résolument axé sur l'énergie nucléaire. En effet, 78% de l'électricité française est d'origine nucléaire. Grâce à son parc de 58 réacteurs, la France atteint un taux d'indépendance énergétique proche de 50%, lui garantissant une grande stabilité d'approvisionnement (source : www.cea.fr). Cependant, on se doit de constater qu'au-delà de toutes les controverses, il subsiste une demande sociétale très forte quant à l'évaluation de l'impact des activités nucléaires sur la santé humaine et sur l'environnement.

La radioactivité naturelle et la radioactivité artificielle sont souvent opposées. Au niveau physique, il n'existe aucune différence entre ces deux phénomènes. C'est seulement l'origine des isotopes radioactifs qui est soit naturelle (par exemple, présente depuis la formation de la Terre dans le sol et l'atmosphère, générée sous l'effet du rayonnement cosmique), soit artificielle (créée depuis les années 1930 dans les réacteurs nucléaires ou les accélérateurs de particules). Ensuite, chaque radionucléide diffère en fonction du type de rayonnement qu'il émet, de son énergie et de sa période radioactive. Quoiqu'il en soit, au niveau radiologique, chaque radionucléide doit être pris en compte qu'il soit d'origine naturelle ou artificielle.

Dans l'environnement, les niveaux de radioactivité artificielle rejetés par l'industrie nucléaire civile ont considérablement diminué depuis la création des premières centrales électronucléaires (années 70), notamment grâce à une amélioration des procédés de retraitement et de filtration. A titre d'exemple, la [figure 1](#) présente l'évolution des rejets de l'usine AREVA La Hague entre 1966 et 2000. D'après cette figure, les activités (quantités en Becquerel) en ^{106}Ru , ^{125}Sb , ^{60}Co , ^{90}Sr , ^{137}Cs et ^{99}Tc dans les rejets liquides de l'usine AREVA

ont diminué au cours des 20 dernières années. Pendant cette même période, les activités rejetées en ^3H , ^{129}I , ainsi qu'en ^{14}C (non présenté) ont augmenté. Ces changements sont dus à une modification des procédés de retraitement des combustibles usés. La figure 2 montre l'évolution de la dose efficace totale pour un adulte moyen entre 1966 et 1996 dans le canton de Beaumont-Hague (GRNC, 1999). La dose efficace totale (pour le scénario moyen) était de $18\ \mu\text{Sv}$ en 1985. En 1996, la dose efficace totale est de $5\ \mu\text{Sv}$.

Figure 1 : Rejets annuels liquides (en TBq) de l'usine AREVA La Hague entre 1966 et 2000.

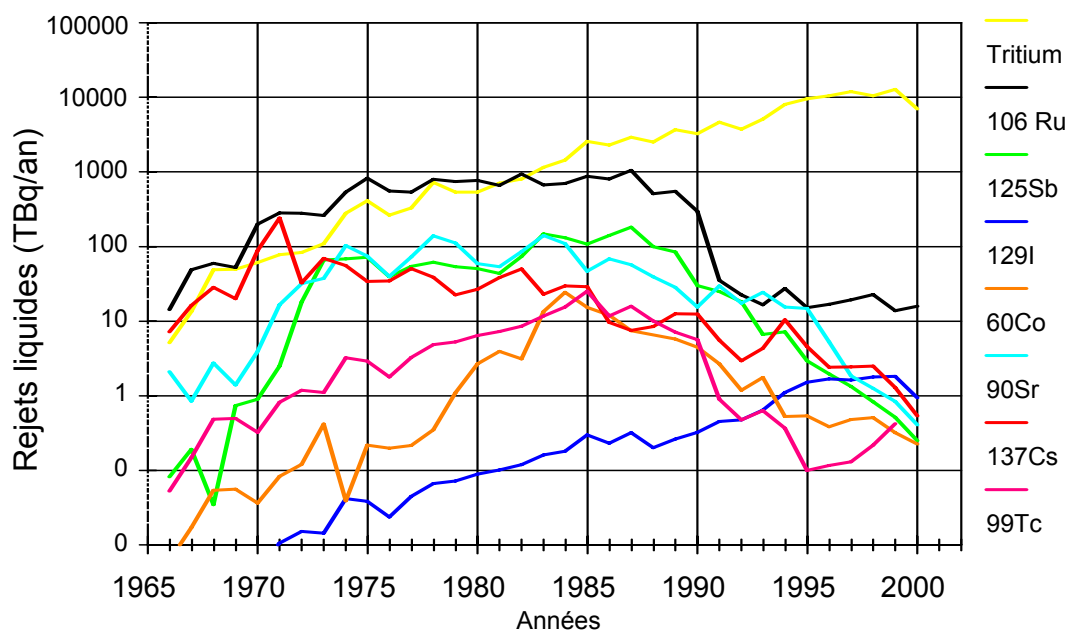
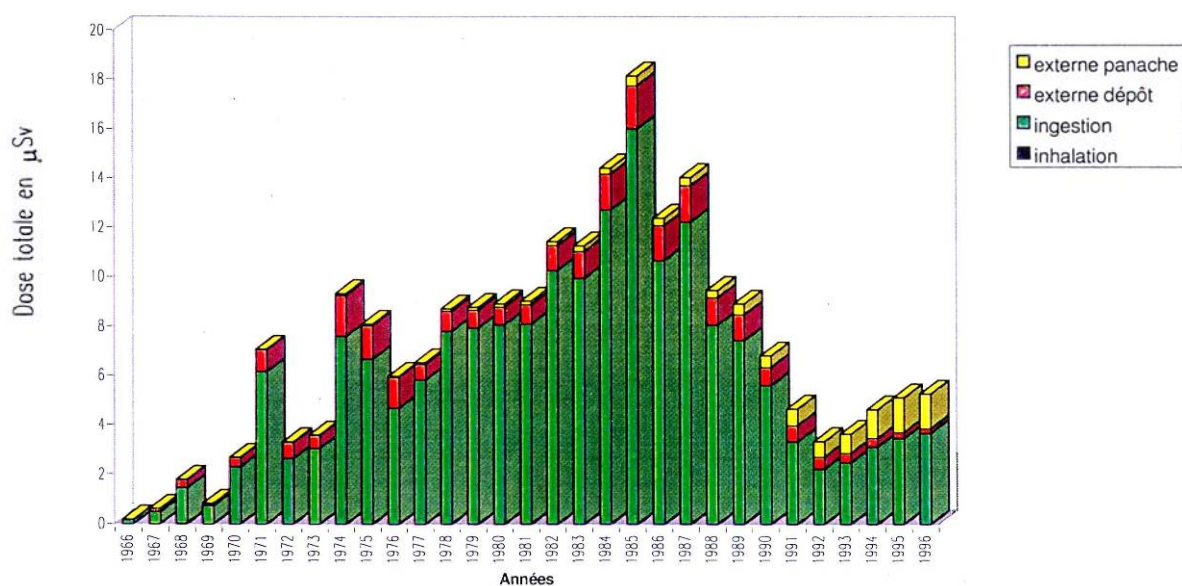


Figure 2 : Evolution de la dose efficace totale (μSv) pour un adulte moyen entre 1966 et 1996 dans le canton de Beaumont-Hague (scénario moyen, extrait de GRNC, 1999).



En outre, la fin des essais atmosphériques, pratiqués au cours des années 60 par plusieurs pays dotés de l'arme atomique, a encore favorisé la diminution de l'émission de radionucléides artificiels dans l'environnement. Des mesures réalisées dans différentes matrices de l'environnement par plusieurs organismes indépendants (entre autres : IRSN, ACRO, CRIIRAD, union européenne) ont confirmé cette diminution globale des niveaux de contamination par des radionucléides artificiels dans l'environnement.

Il n'en demeure pas moins que l'environnement a été enrichi par l'homme en radionucléides artificiels (industrie, militaire) et naturels (forages pétroliers, mines de phosphore). Et même si la tendance actuelle est à la diminution des niveaux de radioactivité générés par les activités humaines, les doutes et les incertitudes subsistent concernant les conséquences de l'exposition chronique à ces faibles doses de radioactivité, qui sont additionnées à la radioactivité naturelle.

Concernant l'environnement, dans les années 70, les instances internationales en charge de la radioprotection considéraient que les règles et les normes appliquées à la protection de l'homme garantissaient implicitement la protection de l'environnement (CIPR, 1977). Cependant, au cours de la dernière décennie, l'absence de démonstration scientifique de cette affirmation et la montée en puissance des préoccupations environnementales, mises en évidence par de nombreuses conférences internationales, ont conduit à réexaminer ce postulat (CIPR, 1991 ; Pentreath, 1998). Aujourd'hui, l'enjeu de la protection de l'environnement contre les rayonnements ionisants consiste plutôt à considérer l'environnement non pas en tant que voie de transfert entre la source d'exposition et l'homme mais en tant qu'écosystèmes où la biodiversité doit être protégée (Whicker & Bedford, 1995 ; Hinton *et al.*, 2004).

La presqu'île du Cotentin est l'une des premières régions de production conchylicole de France (ostréiculture, mytiliculture). Cette région se caractérise également par la présence d'une industrie nucléaire développée avec notamment, l'usine électronucléaire de Flamanville, site de stockage de déchets de faible et moyenne activité à vie courte de l'ANDRA et surtout, la présence du site de retraitement de combustibles usés de AREVA La Hague. Les usines de production et de retraitement sont autorisées à rejeter, de manière contrôlée, des radionucléides artificiels dans le milieu marin. Bien que ces rejets soient en constante diminution, les parcs ostréicoles situés à une centaine de kilomètres de l'émissaire, sont dans la zone d'influence de ces rejets. Des mesures préliminaires ont montré que de faibles concentrations de radionucléides artificiels, proches des limites de détection, sont

parfois mesurables dans les chairs de l'huître (Partie 2, tableau 5). Localement, la presqu'île du Cotentin présente des niveaux de radioactivité environnementale plus élevés que ceux enregistrés dans des régions moins exposées aux activités de l'industrie nucléaire. Cette région constitue donc une zone atelier permettant d'étudier *in situ* l'éventuel impact de ces rejets. A l'heure actuelle, les connaissances sur l'existence d'effets biologiques radio-induits dans le champ des faibles doses en situation d'exposition chronique sont très limitées.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a été dédié à l'étude de l'impact des rejets de l'industrie nucléaire du nord Cotentin en milieu marin, sur une espèce de mollusque bivalve l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Un des principaux objectifs de la thèse consiste à définir des marqueurs moléculaires susceptibles de témoigner avec la plus grande sensibilité possible d'un impact éventuel. En complément du travail réalisé sur l'huître, une étude préliminaire a été réalisée *in vitro* sur des cultures primaires d'hémocytes d'ormeau, un mollusque gastéropode présent dans les eaux du nord Cotentin.

II) L'huître *Crassostrea gigas*

II-1) Biologie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

II-1-1) Généralités

a) Classification



- **Classe :** Bivalvia
- **Ordre :** Ostreoida
- **Famille :** Ostreidae
- **Genre :** *Crassostrea*
- **Espèce :** *gigas*

b) L'ostréiculture

En France, l'ostréiculture débute au XVII^{ème} siècle avec la production de l'huître plate indigène *Ostrea edulis*. L'intensification de l'effort de pêche, des années de faible recrutement et l'apparition des parasites protozoaires (*Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*) ont contribué au déclin du gisement naturel d'huître plate. La production ostréicole reprend progressivement grâce à l'introduction d'une nouvelle espèce, l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata*, qui est décimée à son tour par deux épizooties entre 1970 et 1974. C'est l'huître creuse *Crassostrea gigas*, aussi appelée huître japonaise en raison de son origine géographique, qui est alors importée et cultivée. Cette espèce est encore produite actuellement.

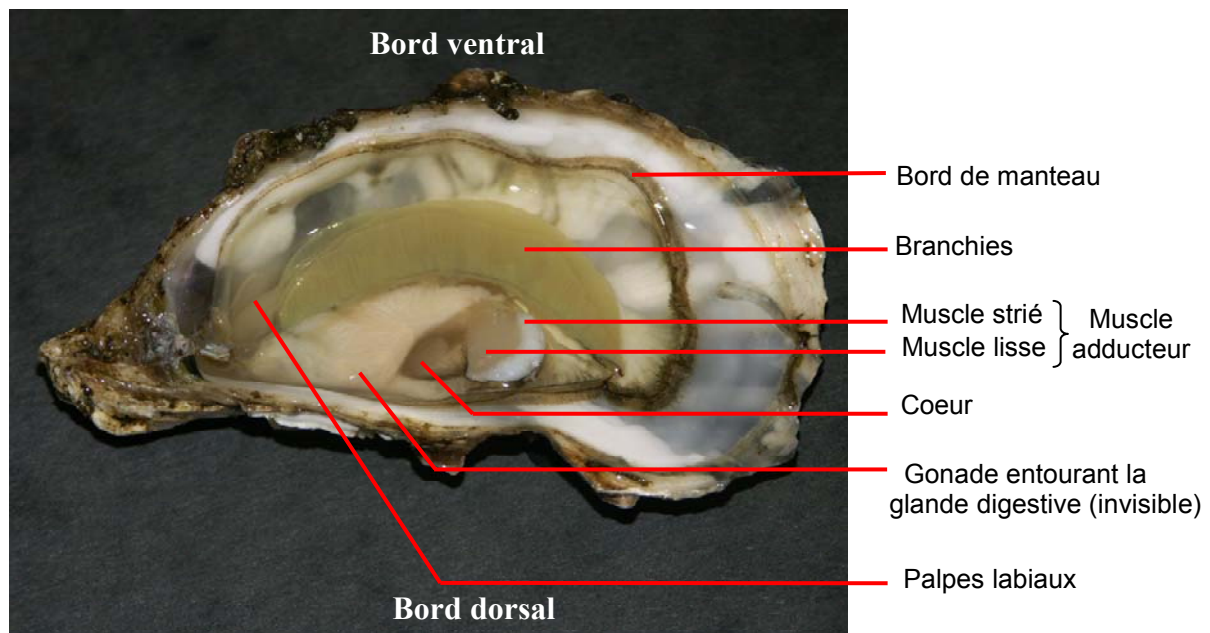
Dans le milieu naturel, le littoral charentais et le bassin d'Arcachon permettent un recrutement annuel régulier. Pendant la période de reproduction, les professionnels disposent sur les parcs ostréicoles des collecteurs (tuiles chaulées, tubes ou coupelles plastiques, coquilles d'huîtres...) afin de procéder au captage des larves. Six à 18 mois après la fixation, les naissains sont "détroqués" (séparés de leur collecteur et individualisés) puis mis en poche ostréicole pour être placés sur l'estran sur des tables surélevées. Une seconde source d'obtention du naissain provient des écloséries privées qui fournissent aux professionnels du

naissain individualisé et calibré. Les huîtres passent entre trois et quatre ans sur des parcs (étape de grossissement). La Normandie et la Bretagne présentent des conditions optimales de croissance et sont donc les bassins privilégiés des ostréiculteurs pour cette étape. Lorsqu'elles ont atteint une taille commerciale (à partir de 40 g), les huîtres sont éventuellement affinées puis vendues.

II-1-2) Anatomie

Au niveau de la charnière, deux lobes soudés l'un à l'autre forment le capuchon céphalique qui recouvre la bouche et les palpes labiaux. Les deux lobes du manteau délimitent la cavité palléale. Celle-ci, est constituée de deux chambres séparées par les branchies : la chambre inhalante du côté ventral et la chambre exhalante du côté dorsal. A maturité, la cavité palléale est majoritairement occupée par la gonade (Fig.3). Chez les bivalves, l'appareil circulatoire est ouvert et lacunaire. Il est formé d'un vaisseau dorsal prolongé par de nombreuses artères. Le cœur, accolé au muscle adducteur, est logé dans une enveloppe péricardique. Il est constitué par un ventricule où aboutissent quatre veines branchiales dont les extrémités renflées forment les oreillettes.

Figure 3 : Anatomie interne de l'huître *Crassostrea gigas* (valve gauche).

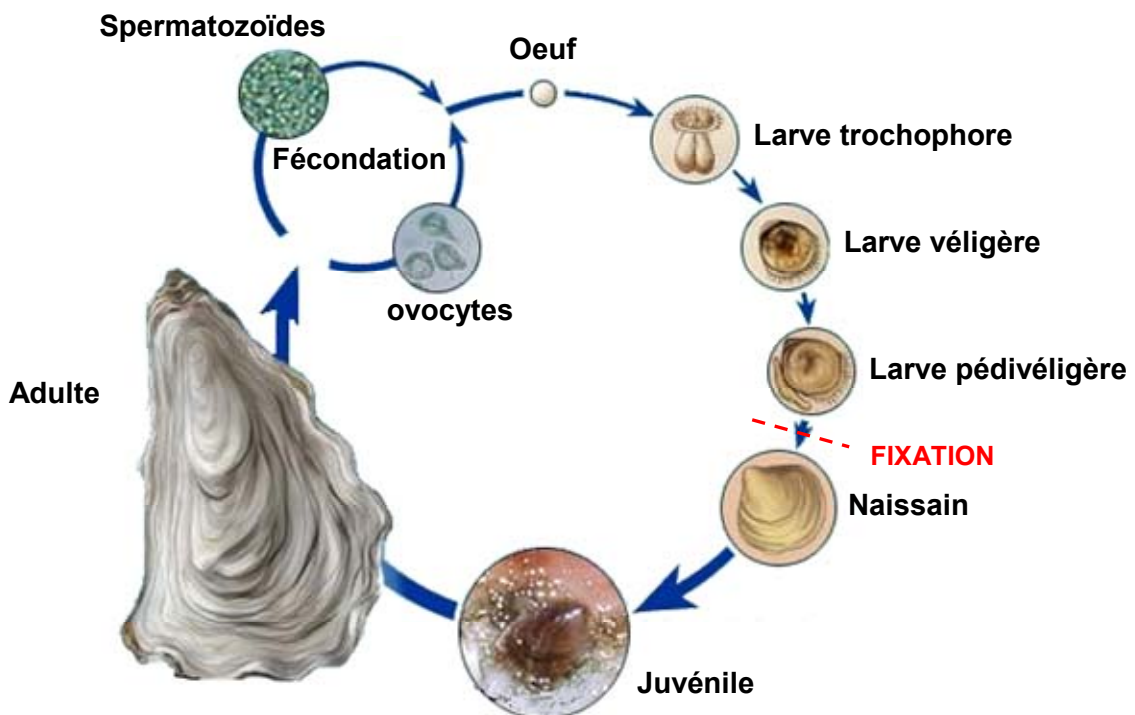


II-1-3) Cycle biologique et reproduction

Bien que le cycle biologique de l'huître soit sous la dépendance de nombreux facteurs

environnementaux, il peut être résumé et décomposé de la façon suivante (Fig.4) : le développement indirect de l'huître donne naissance à une larve pélagique trochophore. Il se poursuit par un stade véligère (formation des deux valves) puis pédivéligère (ébauche des branchies et différenciation du système nerveux). La fixation est suivie d'une étape de métamorphose au cours de laquelle les tissus et organes se réorganisent pour donner le naissain.

Figure 4 : Cycle de l'huître creuse *C. gigas* (d'après <http://www.planete-nature.org/>).



L'huître creuse présente un hermaphrodisme successif : la sexualité est alternative et irrégulière. Les sexes sont donc séparés même si quelques hermaphrodites peuvent être observés. D'après Buroker (1983), il s'agit d'un hermaphrodisme successif protandre : les huîtres sont alternativement mâle puis femelle. Le changement de sexe a lieu en période hivernale (Quayle, 1969). Les huîtres acquièrent leur maturité sexuelle au cours de la première année. Pendant l'hiver, le volume et l'activité de la gonade sont très réduits, et la gamétogenèse (mitoses goniales, prévitellogénèse) se déroule à un rythme très lent. Le développement des lignées germinales, qui correspond à une succession de mitoses puis de méioses goniales, s'accélère progressivement dès la fin de l'hiver jusqu'à la maturité sexuelle en été (Lubet, 1991 ; Lango-Reynoso *et al.*, 2000). En période estivale, l'émission des produits génitaux est fonction des conditions thermiques et trophiques (Mann, 1979 ; Lubet,

1980 ; Deslous-Paoli, 1982 ; Héral *et al.*, 1986 ; Maurer & Borel, 1986 ; Gouletquer, 1995). Elle peut être totale dans les régions où les eaux sont les plus chaudes (région méditerranéenne ou Charente-maritime), alors qu'elle n'est que partielle ou absente dans les régions où les eaux sont les plus froides (Normandie ou Bretagne Nord). Ces émissions partielles expliquent donc les faibles captages observés dans les bassins associés.

D'un point de vue biochimique, ce cycle se caractérise par une phase de stockage en glycogène pendant l'hiver, qui sera métabolisé en lipides (vitellogénèse) avant la ponte (Gabbott, 1975 ; Deslous-Paoli, 1980 ; Maurer & Borel, 1986 ; Heude-Berthelin, 2000). A maturité, le poids des gamètes atteint 7% du poids sec de chair pour des huîtres âgées d'un an, puis cette valeur augmente pour atteindre 60% puis 80% du poids sec à 2 ans et 3 ans respectivement (Deslous-Paoli & Héral, 1988).

II-1-4) Collecte et acclimatation

Pour notre étude, les huîtres sont achetées directement dans des entreprises ostréicoles. Certains aspects ont préalablement été discutés et convenus avec les ostréiculteurs : nous échantillons des huîtres diploïdes, ayant grandi sur le site d'échantillonnage, de calibre homogène (n°4 ou n°3) et les animaux sont sortis des bassins à notre arrivée.

Ensuite, les animaux collectés sont :

- disséqués sur place (branchie, tissus mous) et immédiatement congelés dans de l'azote liquide (-196°C). Une congélation rapide (en moins d'une minute) des tissus dans l'azote liquide permet de stopper toute réaction chimique et ainsi, de garantir une bonne conservation des échantillons jusqu'à leur traitement en laboratoire. En principe, ce traitement rapide permet d'éviter la modification artéfactuelle du niveau d'ARNm liée au stress de la dissection.
- ou ramenés en bourriche au laboratoire où ils sont :
 - acclimatés en prévision d'une expérience ultérieure. Ce conditionnement s'effectue pendant une semaine, à raison d'un maximum de 3 douzaines d'huîtres dans 120 litres d'eau de mer filtrée sur sable, aérée, en circulation et à température contrôlée (correspondant à la température du milieu au moment du conditionnement).

- Disséqués (séparation des tissus mous et de la coquille) et traités pour la mesure des concentrations en radionucléides.

II-2) Intérêt du modèle huître

En 2000, la production ostréicole française se plaçait au 4^{ème} rang mondial derrière la Chine, le Japon et la Corée. La France est également un pays exportateur de produits ostréicoles, essentiellement en Europe : 91 % de la production ostréicole européenne est réalisée en France (Source : rapport annuel Commerce Extérieur 2001-OFIMER). L'huître est donc une espèce d'intérêt économique qui, de surcroît, est consommée par l'homme. Cette espèce constitue donc également une voie de transfert potentielle de radionucléides à l'homme. L'ostréiculture représente une part non négligeable de l'activité économique de la région Basse-Normandie. En 2000, la production normande d'huître creuse représentait 22% de la production ostréicole nationale. L'huître constitue donc une espèce d'intérêt pour la région Basse-Normandie (thèse co-financée par la Région Basse-Normandie).

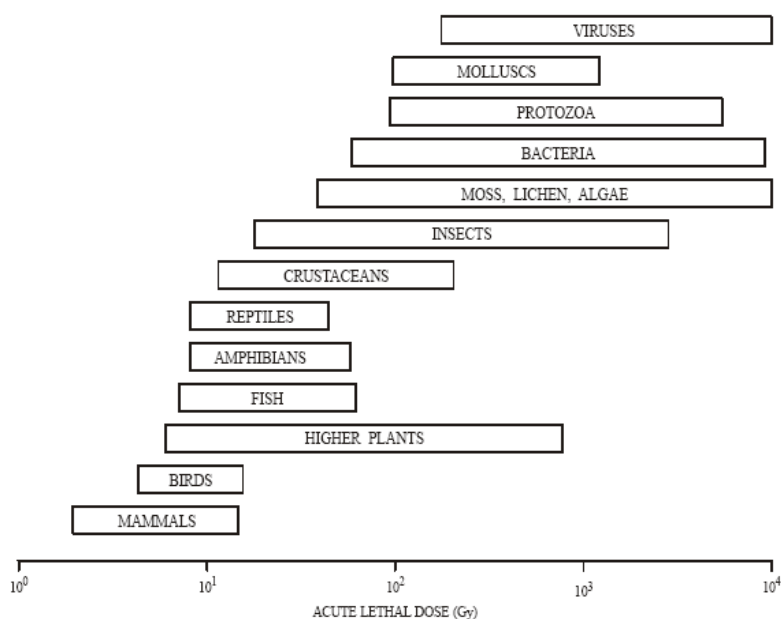
Quantitativement, les mollusques forment l'un des plus grands embranchements du règne animal avec quelques 100 000 espèces vivantes. Il s'agit également d'un taxon important de l'environnement marin. Cet animal présente, en outre, des caractéristiques qui en font un bon modèle pour une étude d'écotoxicologie :

- vie sessile (après une courte phase larvaire mobile),
- aire de répartition assez large,
- mode d'alimentation : suspensivore,
- une relative résistance à des conditions de vie changeantes,
- facilité d'échantillonnage et de maintenance en laboratoire.

II-3) Radiosensibilité des mollusques

Les huîtres présentent une autre caractéristique du point de vue de la radioactivité : elles sont très radiorésistantes (Fig.5). Actuellement, les mécanismes à l'origine de cette forte radiorésistance ne sont pas précisément connus. Classiquement, les études de radioécologie ou de radiobiologie ont tendance à privilégier les espèces (tissus, types cellulaires) radiosensibles. Toutefois, l'étude de la réponse aux rayonnements ionisants chez une espèce radiorésistante peut également fournir des informations essentielles sur le plan fondamental.

Figure 5 : Dose létale et radiorésistance chez plusieurs groupes taxonomiques (UNSCEAR, 1996).



Les données sur les invertébrés marins suggèrent que les LD₅₀ varient de 2,1 Gy (*Palaemonetes pugio*) à 560 Gy (*Callinectes sapidus*) (Anderson & Harrison, 1986). On n'observe généralement d'effets sublétaux chez les mollusques qu'à des doses très fortes.

Les organismes benthiques ou fouisseurs sont les plus susceptibles d'être exposés à cause de l'accumulation des radionucléides dans les sédiments et/ou de la présence naturelle des radionucléides dans le substrat rocheux. Parmi les invertébrés benthiques, les crustacés semblent être plus radiosensibles que les mollusques. En particulier, les embryons d'anatifes (*Pollicipes polymerus*) sont parmi les plus sensibles aux rayonnements ionisants. Une réduction de la mue et de la reproduction a été observée après une exposition de 32 jours à de l'eau tritiée à un débit de dose de 1,7 mGy.j⁻¹ (Abbott & Mix, 1979).

Plusieurs organisations internationales ont tenté de déterminer des limites telles que des "valeur estimée sans effet observé" (IAEA, 1976 ; NCRP, 1991 ; UNSCEAR, 1996). Selon ces travaux, un débit de dose inférieur à 10 mGy.j⁻¹ ne présenterait pas de danger pour les organismes (faune et flore) terrestres et aquatiques en situation d'exposition prolongée (IAEA, 1992). Cette valeur a été récemment réévaluée : la nouvelle "valeur estimée sans effet observé" émise par la commission européenne est de 10 µGy.h⁻¹ (EC, 2005). Cette valeur correspond au débit de dose théorique en dessous duquel, en situation d'exposition chronique, on accepte qu'il n'y a pas d'effet observé sur une population aquatique.

Un bref état de l'art des études concernant les faibles doses de radiations ionisantes chez les mollusques

Une réduction de la production de capsules d'oeufs a été observée chez l'escargot *Physa heterostropha* exposé à un débit de dose d'environ 6 mGy.j⁻¹. Mais cette diminution du nombre de capsules n'était pas associée à une baisse de production totale du nombre d'œufs dans la population irradiée car le nombre d'oeufs par capsule a augmenté dans la population irradiée par rapport à la population témoin (Cooley & Nelson, 1970 ; Cooley & Miller, 1971 ; Cooley, 1973). En laboratoire, un débit de dose de 240 mGy.j⁻¹ délivré avec une source de ⁶⁰Co n'a eu aucun effet significatif sur la reproduction, la mortalité ou la taille des escargots (Cooley & Miller, 1971). Toutefois, un débit de dose dix fois plus fort (2,4 Gy.j⁻¹) a eu des effets significatifs. Les lymnéidés (*Physa acuta*) exposés au stade d'embryon à quatre cellules ont une LD₅₀ de 10,8 Gy (Ravera, 1967). Ces études, anciennes et peu nombreuses, ont principalement considéré les effets des radiations chroniques à un niveau intégré : croissance, reproduction, viabilité. Ces publications confirment la relative radiorésistance des mollusques par rapport aux autres embranchements du règne animal.

Plus récemment, une augmentation significative du nombre de micronoyaux et de cassures à l'ADN a été observée chez des larves de moules *Mytilus edulis* exposées pendant 4 jours dans de l'eau de mer contaminée au tritium à un débit de dose de 0,3 mGy.j⁻¹ (Jha *et al.*, 2005). Hagger *et al.* (2005) ont montré une augmentation des dommages génotoxiques (échange de chromatides soeurs, aberrations chromosomiques) et cytotoxiques (baisse de l'indice de prolifération cellulaire), accompagnée d'une augmentation du nombre d'anomalies développementales chez des larves de *M. edulis* exposées pendant 17 à 23h au ³H à un débit de dose minimum de 30 µGy.j⁻¹. Ces études illustrent le fait que le débit de dose théorique de 10 mGy.j⁻¹, proposé par l'UNSCEAR comme valeur de référence, est probablement à revoir étant donné que les approches au niveau sub-cellulaire permettent de détecter des perturbations radio-induites à des débits de dose et des doses plus faibles. L'approche au niveau sub-cellulaire paraît donc plus sensible que les approches à un niveau plus intégré pour les études sur les faibles doses.

III) Stratégies et choix

III-1) Choix d'une étude au niveau sub-cellulaire : ARNm, Protéines, ADN

Un des débats de la protection de l'environnement concerne le choix de l'échelle à laquelle les effets des radiations ionisantes sont étudiés. Les effets potentiels des radionucléides doivent-ils être considérés au niveau des populations ? D'autres effets éventuellement plus discrets, comme la génotoxicité par exemple, doivent-ils être pris en compte ?

Dans la mesure où notre étude s'intéresse aux conséquences possibles d'une exposition chronique à des faibles débits de doses, très inférieurs aux doses létales, il nous a paru nécessaire d'utiliser les outils les plus fins possible pour être capables de détecter des effets des rayonnements ionisants à un niveau très bas. L'échelle moléculaire permet de se placer au niveau des dommages directs des rayonnements dans les cellules. C'est donc à cette échelle que la probabilité d'observer des effets des radiations ionisantes est la plus grande. Il incombe ensuite de savoir si ces dommages à l'échelle moléculaire ont des conséquences ou non au niveau de la "santé" de l'individu et au niveau de la population : c'est la problématique de l'évaluation de l'impact.

Toutes les cellules vivantes doivent naturellement faire face à des molécules toxiques susceptibles de provoquer des dommages au niveau sub-cellulaire : sous-produits du métabolisme notamment. Les cellules sont armées pour lutter contre ces atteintes moléculaires en conditions de vie normale. C'est l'échec de ces mécanismes de réparation qui va faire que des cellules, des organes ne vont plus pouvoir fonctionner normalement. Les fonctions physiologiques vont être compromises pour finalement aboutir à des désordres visibles au niveau macroscopique (reproduction, croissance, mortalité) pour l'individu voire la population. Entre les effets des radiations au niveau cellulaire ou moléculaire et les effets au niveau reproduction, croissance, mortalité, il y existe toute une gradation des phénomènes. Pour les comprendre, il est nécessaire d'étudier les mécanismes à tous les niveaux, depuis l'échelle moléculaire jusqu'aux fonctions physiologiques qui en sont le résultat. Il est parfaitement possible que des échecs au niveau cellulaire passent totalement inaperçus au niveau de l'individu, les conséquences pouvant se manifester "à retardement" (cancer) ou n'avoir jamais d'incidence durant la vie de l'organisme. Par exemple, l'apoptose d'une cellule permettant d'éviter la propagation de dommages à l'ADN ne sera pas considérée comme un

échec au niveau individuel. *A fortiori*, les effets sur quelques individus peuvent très bien n'avoir aucune incidence sur l'ensemble de la population.

Il est possible d'aborder directement le problème au niveau de l'individu ou de la population. Cependant, si des effets des rayonnements ionisants sont constatés, pour en comprendre les causes, il sera nécessaire de descendre au niveau cellulaire puis moléculaire. En effet, une altération au niveau individuel ou populationnel sera forcément la conséquence d'une atteinte au niveau moléculaire. A l'opposé, une autre stratégie peut consister à se placer, dans un premier temps, au niveau moléculaire puis, dans un second temps, examiner si les effets éventuels se répercutent sur la "santé" de l'organisme et de la population. Les deux approches sont complémentaires et ce sont les contraintes méthodologiques et techniques qui pourront dicter le choix suivant les modèles biologiques utilisés.

Nous avons fait le choix d'étudier les effets des rejets de l'industrie nucléaire du nord Cotentin au niveau sub-cellulaire, ceci pour différentes raisons :

- ⇒ il semble que les outils moléculaires puissent potentiellement nous permettre de détecter des effets à des niveaux de radiations très bas.
- ⇒ les outils moléculaires ont l'avantage de pouvoir être utilisés universellement des bactéries jusqu'à l'homme.

Parmi les fonctions cellulaires mises en jeu par les radiations ionisantes, on peut citer la protection contre le stress oxydatif, les phénomènes de détoxication, le contrôle du cycle cellulaire, etc... La régulation de ces fonctions cellulaires peut être examinée à différents niveaux, par exemple : au niveau de la transcription (expression des gènes), au niveau protéique (quantité, activité enzymatique), au niveau du métabolisme. Des méthodes de mesure mises au point chez les mammifères peuvent être utilisées chez les invertébrés. Entre autres, la quantification des ARNm a fait un grand progrès avec l'apparition de la PCR en temps réel. Certaines séquences des ARNm codant pour des marqueurs des fonctions cellulaires citées précédemment sont disponibles chez l'huître, d'autres peuvent être recherchées (clonage par homologie, par exemple). Notre choix s'est donc porté vers cette approche de biologie moléculaire comme point de départ.

Question de l'extrapolation des résultats obtenus du niveau moléculaire à la population

Cependant, il est bien évident que les résultats de cette approche au niveau moléculaire ne seront pas suffisants pour évaluer le risque écologique au niveau de la population. Une extrapolation des résultats obtenus à l'échelle moléculaire aux niveaux de l'individu et de la population ne pourrait être admissible que dans un seul cas : si aucun effet délétère n'est observé au niveau moléculaire, il n'y aura théoriquement aucun effet délétère à l'échelle de l'individu ou de la population. Bien entendu, une telle extrapolation pourra être faite sous réserve que l'étude couvre tous les paramètres susceptibles d'être affectés au niveau moléculaire, dans tous les types cellulaires.

L'étude que nous avons menée dans le cadre de ce travail de thèse ne remplit pas ces conditions car certains aspects moléculaires ne seront pas (ou peu) envisagés : génotoxicité, immunotoxicité, perturbation endocrinienne... Cependant, nous espérons que les résultats obtenus pourront servir de base dans le choix et la mise en place de recherches futures sur les effets des faibles doses de radiations ionisantes chez l'huître.

III-2) Modèle *In Vitro* : Primoculture d'hémocytes d'orveau *Haliotis tuberculata*

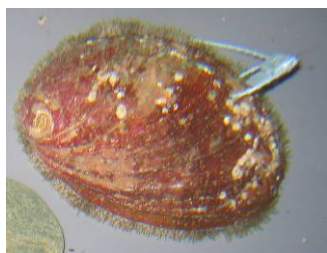
Puisque nous avons choisi de focaliser notre étude au niveau sub-cellulaire, il nous a paru intéressant de travailler sur un modèle *in vitro* (culture cellulaire), parallèlement à notre modèle *in vivo* (l'huître). L'utilisation d'un modèle *in vitro* présente plusieurs avantages :

- possibilité d'étudier plusieurs conditions expérimentales sur les cellules d'un seul et même individu.
- les cellules isolées sont généralement plus radiosensibles.

Il n'existe pas de lignée cellulaire de mollusque marin. En revanche, la culture primaire d'hémocytes est relativement bien maîtrisée chez l'orveau (Lebel *et al.*, 1996 ; Serpentine *et al.*, 2000). La collecte des hémocytes est possible chez l'huître mais elle ne permet d'obtenir qu'un faible nombre de cellules, insuffisant pour réaliser des primocultures chez cette espèce. En laboratoire, nous avons donc voulu utiliser les cultures primaires d'hémocytes d'orveau comme modèle d'étude *in vitro*, en complément des huîtres entières.

III-2-1) Biologie de l'ormeau *Haliotis tuberculata*

Classification



- **Classe :** Gastropoda
- **Ordre :** Haliotoidea
- **Famille :** Haliotidae
- **Genre :** *Haliotis*
- **Espèce :** *tuberculata*

L'ormeau est un mollusque gastéropode. La nacre, caractéristique de la coquille de l'ormeau est un indicateur du caractère primitif de ce gastéropode, par rapport aux autres mollusques. Consommateur d'algues, il se nourrit en "broutant" grâce à une sorte de langue râpeuse : la radula. Les très jeunes ormeaux se nourrissent de diatomées et d'algues microscopiques fixées sur le substrat. Les juvéniles se nourrissent d'algues encroûtantes et les adultes de fragments d'algues brunes. Chez l'ormeau, les sexes sont séparés. La fécondation est externe : les gamètes mâles et femelles sont émis en pleine eau. Les œufs fécondés éclosent en un jour et donnent naissance à des larves mobiles, qui restent planctoniques pendant 2 à 11 jours. Leur établissement sur le fond peut être déclenché par des substances chimiques sécrétées par les algues rouges encroûtantes du genre *Lithothamnion* et d'autres genres proches. Après la métamorphose, les ormeaux juvéniles sont photosensibles ; c'est pourquoi ils recherchent des habitats dans les fissures et sous les rochers. Les ormeaux peuvent vivre jusqu'à 15 ans, et leur coquille peut mesurer jusqu'à 15 cm.

III-2-2) Maintenance / Acclimatation

Des ormeaux adultes (10–12 cm de longueur) ont été pêchés au nord de la presqu'île du Cotentin. Ils ont ensuite été acclimatés pendant un mois minimum, dans une eau de mer aérée en circuit ouvert, à la température du milieu. Les animaux sont régulièrement nourris avec des algues fraîchement collectées (*Palmaria palmata* et *Laminaria digitata*).

III-2-3) Traitement : mise en culture des hémocytes

Après une incision dans la sole pédieuse, l'hémolymphe est prélevée, à raison de 10-15 mL par animal, à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille hypodermique stérile. Cette hémolymphe est transférée dans un tube stérile et simultanément diluée de moitié avec une solution anticoagulante d'Alsever modifié (4°C) (Bachère *et al.*, 1988) (115 mM glucose ; 27

mM sodium citrate ; 11,5 mM EDTA ; 382 mM NaCl). Les hémocytes sont ensuite mis en culture le plus rapidement possible à une concentration de $10 \cdot 10^6$ cellules par flasque de 80 cm². Dans chaque flasque, 3 volumes d'eau de mer artificielle stérile sont ajoutés pour 1 volume d'hémolymphe. Les cellules sont ensuite déposées dans un incubateur (sans CO₂) à 17°C pendant environ 90 min, le temps que les cellules adhèrent à la flasque. Le milieu est ensuite précautionneusement changé. Les hémocytes sont recouverts avec du milieu stérile de Hanks 199 modifié par l'addition de 250 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM MgSO₄, 2,5 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 10 mM L-glutamine, 100 µg.mL⁻¹ streptomycine, 60 µg.mL⁻¹ pénicilline G, le tout ajusté à pH 7,4. Ensuite, les hémocytes sont incubés à 17°C. Lorsque le milieu de culture est renouvelé régulièrement, les hémocytes peuvent être maintenus pendant environ 10 jours en primoculture.

III-3) Choix d'une approche conjointe environnement / laboratoire

Nous avons fait le choix de nous focaliser principalement sur le niveau d'expression transcriptionnel de gènes impliqués dans la réponse au stress cellulaire. Deux stratégies peuvent être envisagées pour étudier les effets des radionucléides d'origine artificielle sur l'expression de ces gènes chez l'huître :

1) comparer des huîtres provenant de sites exposés ou non à une concentration additionnelle en radioactivité artificielle. Cependant, la présence dans le milieu d'autres facteurs susceptibles, eux aussi, d'altérer l'expression des gènes étudiés, fait qu'il sera difficile de discriminer parmi les différents stressseurs.

2) alternativement, il est possible de comparer des huîtres exposées ou non à des radionucléides en laboratoire avec une meilleure maîtrise des conditions du milieu. Une approche en laboratoire permet, en outre, d'exposer des organismes à des concentrations plus élevées que dans le milieu naturel. Cependant, par définition, ces conditions expérimentales reflètent mal la réalité et la complexité environnementale. Pour cette raison, les résultats obtenus en laboratoire doivent impérativement être considérés avec réserve avant d'être extrapolés aux conditions environnementales.

Les deux stratégies présentent leurs avantages et leurs inconvénients et finalement, les deux approches nécessitent d'être menées dans la mesure où elles sont complémentaires. C'est ce que nous nous sommes efforcés de faire au cours de cette thèse.

IV) Les effets des radionucléides au niveau sub-cellulaire

IV-1) L'ionisation, mécanisme d'interaction de la radioactivité sur la matière

Lorsque les rayonnements émis par une source radioactive entrent en contact avec la matière, ils peuvent arracher certains électrons des atomes et ainsi, provoquer la perte de leur neutralité électrique. Ainsi, les atomes se transforment en ions. Ce phénomène d'ionisation est le principal mécanisme par le biais duquel la radioactivité interagit avec la matière. D'où l'expression de "rayonnements ionisants" que l'on utilise pour qualifier les rayonnements dus à la radioactivité.

IV-2) L'action des radiations sur la cellule et ses composants

Lorsque les molécules sont ionisées et excitées, elles forment des ions à radical libre (radical peroxyde ROO° , entre autres) très réactifs du fait de la présence d'électrons non appariés. Elles vont alors réagir entre elles et avec les molécules voisines, ce qui va entraîner une perturbation de l'état chimique des constituants cellulaires. Les constituants cellulaires vont être atteints :

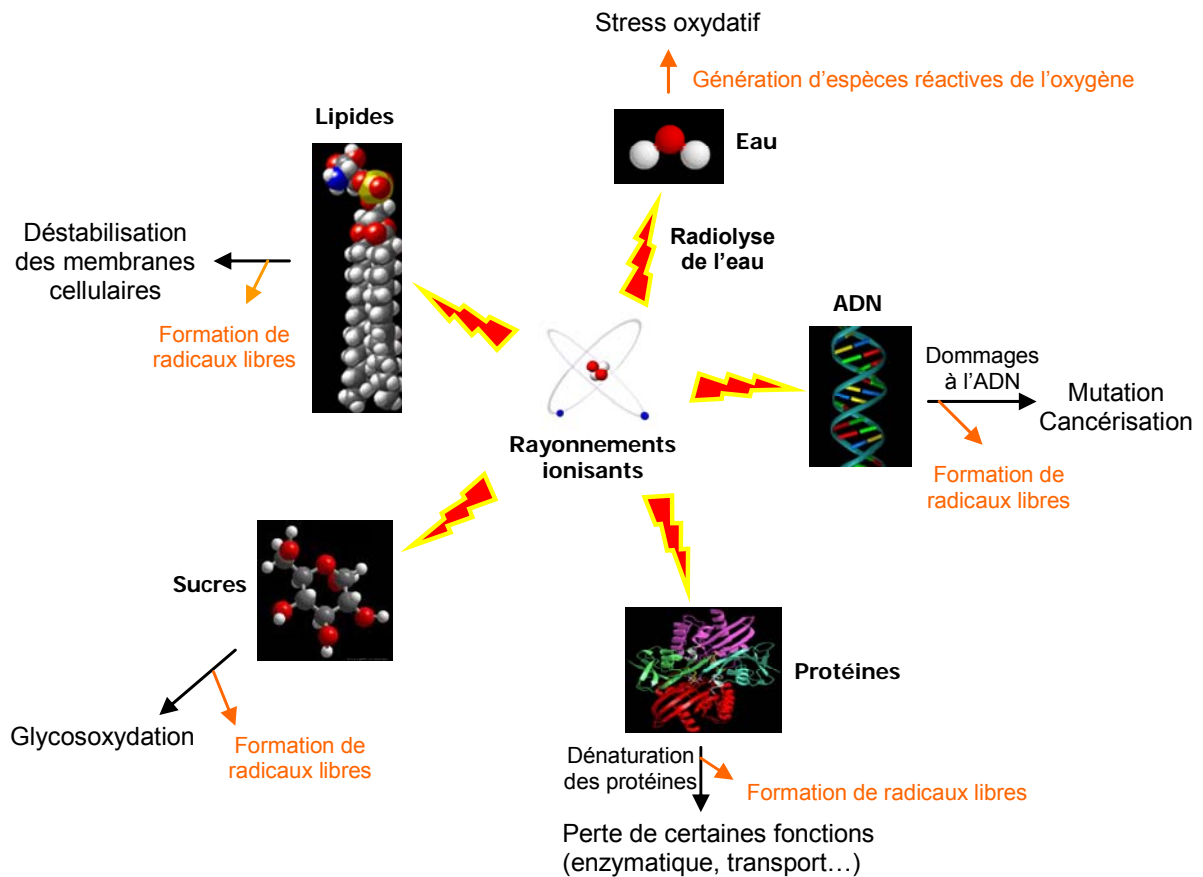
-soit directement par les rayonnements,

-soit indirectement, *via* les radicaux libres issus de l'ionisation directe des constituants cellulaires.

L'effet indirect est principalement le fait d'une attaque des macromolécules par les radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau, constituant majoritaire des cellules. La radiolyse de l'eau va induire la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Parmi ces ERO, le radical hydroxyle OH° , l'anion superoxyde O_2° , l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sont particulièrement réactifs, du fait de leur fort pouvoir oxydant. Une irradiation pratiquée en présence d'oxygène va générer la formation d'un plus grand nombre de molécules d'ERO qu'en conditions hypoxiques : c'est la base de "l'effet oxygène". Cet effet consiste en une augmentation de la radiosensibilité cellulaire testée en présence d'oxygène par rapport à des conditions hypoxiques.

Que ce soit par effet direct ou indirect, les radiations ionisantes altèrent la structure des macromolécules et viennent perturber les principales fonctions de la vie cellulaire (Fig.6). Les conséquences des radiations sur l'organisme sont conditionnées par la dose absorbée, le débit de dose (c'est-à-dire l'étalement de l'irradiation dans le temps), le type de rayonnement reçu, et la nature des cellules irradiées.

Figure 6 : Les effets des rayonnements ionisants au niveau sub-cellulaire.



Action sur les acides nucléiques

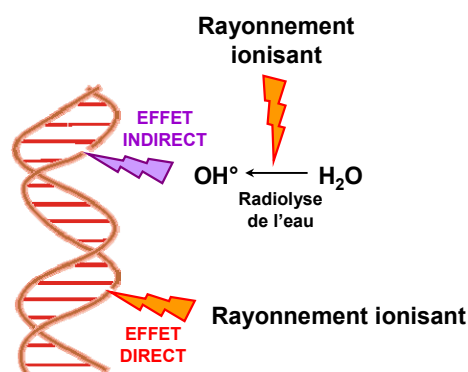
Les radiations ionisantes altèrent la structure de l'ADN directement ou indirectement (Fig.7). Sont alors observées :

- des cassures simple-brin, considérées comme non létales car réparables par des ligases et des polymérases. La réparation nécessite un temps de réparation plus ou moins long selon le type de cassure simple-brin,
- des altérations des bases, non létales mais pouvant être à l'origine d'une mutation en cas de non-réparation ou de réparation fautive. Ces lésions sont réparées par des

mécanismes d'excision-resynthèse faisant intervenir endonucléases, glycosylases, polymérases et ligases,

- des cassures double-brin. Chaque cassure double-brin est létale en cas de non-réparation. L'aptitude à la réparation des cassures double-brin dépend de leur type : elles seront plus difficilement réparables s'il existe une perte associée de matériel chromosomique, en cas de pontage avec des protéines, ou encore si elles sont multiples et rapprochées.

Figure 7 : Effet direct ou indirect des rayonnements ionisants sur l'ADN.



Action sur les protéines

La modification radio-induite de la structure des protéines conduit à une altération de leur fonction (enzymatique, transport, structure, hormonale...). Ces modifications radio-induites entraînent des perturbations de la physiologie cellulaire et peuvent contribuer au processus de létalité.

Action sur les lipides

Les peroxydations lipidiques sont à l'origine d'une diminution de la fluidité membranaire, ayant pour conséquence, là encore, une altération des propriétés du système membranaire de la cellule.

Action sur les sucres

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les espèces réactives de

l'oxygène attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut être oxydé et libérer des cétoaldéhydes, H₂O₂ et OH°. Ce phénomène de glycosoxydation est particulièrement dommageable chez les sujets diabétiques (Favier, 2003).

IV-3) Effets stochastiques et effets déterministes

Selon leur loi d'apparition, on distingue généralement deux types d'effets, pouvant survenir après une irradiation :

- Effets déterministes : prévisibles et quantifiables.
- Effets stochastiques : effet dont on ne peut pas prédire l'apparition (apparition aléatoire).

Certains effets déterministes sont bien décrits chez les modèles de vertébrés supérieurs, en réponse à des fortes doses d'irradiation. Le [tableau 1](#) présente un exemple d'effet déterministe au niveau de la peau.

Tableau 1 : Dose seuil et délai d'apparition des effets déterministes pour la peau (D'après Gambini & Granier, 1992).

Nature des lésions	Dose (Gy)	Délai d'apparition (semaines)
Erythème	3-5	3
Phlyctènes	20	4
Nécrose	50	3

Dans le cas d'un effet stochastique (par exemple, une mutation), il s'agit d'une réponse binaire. L'apparition ou non de cette mutation appartient au domaine des effets stochastiques et n'est pas directement quantifiable. Ce n'est pas la gravité de la mutation qui augmente avec la dose mais sa probabilité d'apparition. En revanche, au niveau sub-cellulaire, des indicateurs fonctionnels peuvent témoigner des dommages à l'ADN et des perturbations du cycle cellulaire : p53, p21. Ils peuvent donc éventuellement servir d'indices précoces pour évaluer, de manière indirecte, la probabilité d'apparition d'une mutation.

IV-4) Effet chimique et effet radiologique

Les radionucléides présentent deux types de toxicité :

- toxicité chimique, liée à la nature de l'élément chimique
- toxicité radiologique, dû à l'effet physique du rayonnement émis.

La distinction entre ces deux effets fait souvent l'objet de débats. Au niveau sub-cellulaire, il y a convergence des deux " types" de toxicité car les mécanismes de défense mis en jeu sont communs. En effet, les dommages provoqués par les polluants chimiques aussi divers soient-ils, sont liés à l'apparition d'ERO, de phénomènes de dénaturation des composants cellulaires, d'altération de l'ADN, etc. et déclenchent les mêmes processus de réparation et détoxification que les radiations. En situation de contamination interne par un radionucléide, il sera donc très difficile de distinguer l'origine chimique ou radiologique des effets observés. Pour distinguer ces deux types de toxicité, il est nécessaire de contaminer le modèle biologique parallèlement avec le radionucléide et son isotope stable afin de comparer les résultats.

V) Les grandes fonctions cellulaires susceptibles d'être altérées par les radiations ionisantes

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi d'analyser les fluctuations de différents gènes au niveau transcriptionnel. Ces gènes codent pour des protéines jouant un rôle dans plusieurs grandes fonctions cellulaires impliquées dans la réponse aux rayonnements ionisants et au stress cellulaire en général. Les molécules toxiques générées par les radiations nécessitent d'être neutralisées, puis éliminées. Les dommages occasionnés (sur l'ADN, les protéines...), par les radiations nécessitent d'être réparés. Ainsi, des gènes intervenant dans quatre grandes fonctions cellulaires seront étudiés:

- régulation du stress oxydatif (MT, SOD)
- contrôle du cycle cellulaire (p53, p21)
- chaperonne (Hsp70, Hsp90)
- détoxification cellulaire (CYP450, GST, MXR)

La plupart de ces gènes appartiennent à des familles de gènes, plus ou moins bien identifiées et décrites chez les mollusques. Au début de cette thèse, nous avons recensé les marqueurs disponibles chez l'huître et sélectionné certains d'entre eux pour notre étude. Cette sélection a été effectuée sur la base des connaissances acquises, en radiobiologie, chez des modèles différents des mollusques et parfois éloignés phylogénétiquement. Il faut préciser que certains gènes ou ADNc utilisés n'ont été que partiellement séquencés chez *C. gigas*. Ces séquences ont été apparentées à des gènes connus sur la base d'une homologie de séquence. Il est généralement admis que si deux séquences présentent une bonne homologie, la fonction qui leur est associée est probablement similaire. Néanmoins, sans plus de tests sur la fonction

physiologique associée aux gènes séquencés chez l'huître, on se doit de rester prudent quant à la fonction précise de ces gènes.

Dans les paragraphes qui suivent, un bref état de l'art est proposé afin de présenter les connaissances dont nous disposons sur les différents gènes et sur la fonction qui leur est associée notamment :

- leur implication dans la réponse au stress chez les mollusques et chez l'huître,
- leur rôle dans la réponse aux rayonnements ionisants.

V-1) Protéines chaperonnes

Les Heat Shock Protéines (Hsp) sont des protéines hautement conservées dont la synthèse est induite en réponse à différents stress cellulaires : augmentation de température, exposition à des métaux lourds, radiations, infection. Les Hsp peuvent également être surexprimées en réponse à des changements cellulaires normaux associés avec le développement ou la différenciation cellulaire (Lindquist & Craig, 1988 ; Schlesinger, 1990). En tant que chaperonnes moléculaires, les Hsp empêchent les protéines de se dénaturer et facilitent soit la renaturation des protéines endommagées, soit leur élimination *via* la protéolyse en cas de dommages irréversibles (Parsell & Lindquist, 1993, 1994 ; Hartl, 1996 ; Sherman & Goldberg, 1996 ; Bukau & Horwich, 1998 ; Morimoto, 1998 ; Frydman, 2001). Les Hsp sont généralement classifiées en différentes familles sur la base de leur poids moléculaire (Hsp90, Hsp70, Hsp20-30, etc ...) (Feder & Hofmann, 1999). Les Hsp ont été étudiées dans de nombreux taxons, y compris des organismes aquatiques, ceci dans différents tissus.

La famille de Hsp la plus étudiée est sans conteste la famille des protéines de 70 kDa, probablement pour leur rôle de chaperonnes (Gething & Sambrook, 1992) et leur implication dans le processus de thermotolérance acquise (Lindquist & Craig, 1988 ; Clegg *et al.*, 1998). Les protéines Hsp de la famille de 90 kDa sont les moins connues des Hsp en terme de fonction. Hsp90 est un dimère qui se lie à différentes protéines cellulaires dont des récepteurs de stéroïdes et des protéines kinases (Pratt, 1993 ; Csermely *et al.*, 1998). De plus, Hsp90 peut s'associer à des protéines du cytosquelette telles que l'actine ou la tubuline (Sanchez *et al.*, 1988 ; Redmond *et al.*, 1989 ; Czar *et al.*, 1996 ; Liang & Macrae, 1997 ; Garnier *et al.*, 1998).

Chez les mollusques, l'implication des Hsp70 dans la réponse au stress a fait l'objet de plusieurs revues (Sanders, 1988, 1993 ; Gourdon *et al.*, 1998 ; Snyder *et al.*, 2001). Chez les huîtres (genre *Crassostrea* et *Ostrea*), on sait que les Hsp sont induites en réponse à :

- un stress thermique (Tirard *et al.*, 1995 ; Clegg *et al.*, 1998 ; Piano *et al.*, 2002 ; Hamdoun *et al.*, 2003 ; Piano *et al.*, 2004, 2005),

- des contaminants chimiques tels que des HAP (Cruz-Rodriguez & Chu, 2002 ; Boutet *et al.*, 2004),

- une infection parasitaire (Encomio & Chu, 2005).

La famille Hsp90 a été relativement peu étudiée chez les mollusques (Tomanek & Somero, 2000 ; Ochoa *et al.*, 2002 ; Tomanek & Somero, 2002) et aucune étude n'est disponible chez l'huître.

Trois gènes appartenant à la famille Hsp, clonés chez *C. gigas*, ont été sélectionnés pour notre étude : Hsp70 (Genbank #AJ305315), Hsc72 (Genbank #AF144646), Hsp90 (Genbank #AJ431681).

Rôle des chaperonnes dans la réponse aux rayonnements ionisants

Les Hsp interviennent dans la réponse aux radiations en exerçant leur rôle de chaperonne : elles renaturent ou éliminent les protéines dont la structure a été modifiée par les radiations. Par ailleurs, de nombreuses études ont également mis en évidence une corrélation entre les effets protecteurs des protéines Hsp et la suppression de l'apoptose (Polla *et al.*, 1998). Par exemple, l'état de thermotolérance est corrélé à la surexpression des Hsp, notamment Hsp70 et Hsp90, mais aussi à l'inhibition de l'apoptose induite par de nombreux stimuli (Samali & Orrenius, 1998 ; Jaattela, 1999) dont les U.V. (Simon *et al.*, 1995). Bien qu'aucun mécanisme précis n'ait été décrit, la prévention de l'apoptose par les Hsp semble s'exercer à la fois grâce à leur action protectrice vis-à-vis des radicaux libres oxygénés et grâce à l'interaction directe avec différentes molécules dont les caspases. Toutefois, il faut noter que le rôle protecteur des Hsp ne semble pas être systématique. En effet, il a été montré que dans certaines conditions, Hsp70 (Lioassis *et al.*, 1997) et Hsp90 (Galea-Lauri *et al.*, 1996) pouvaient induire l'apoptose. Néanmoins, la majorité des données indique que les Hsp exercent une action anti-apoptotique.

V-2) Contrôle du cycle cellulaire

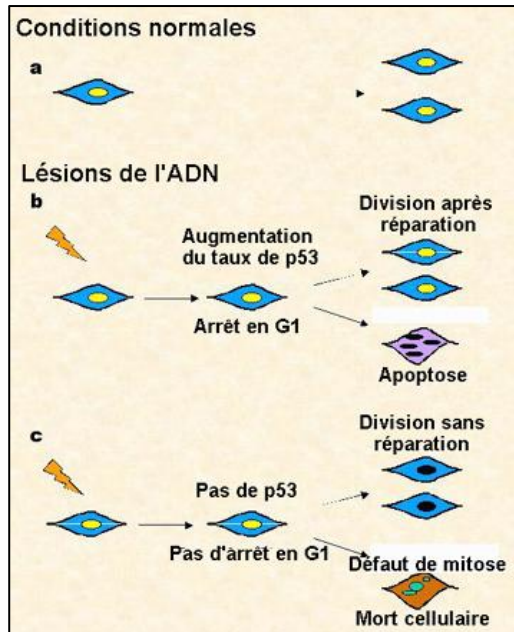
p53 :

La protéine p53 joue un rôle déterminant dans la surveillance de l'intégrité du génome. De manière imagée, p53 peut être comparée au "rond-point" obligatoire du réseau des voies de signalisation impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, la protéine p53 joue plusieurs rôles fondamentaux (Fig.8) :

- l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S,

- la réparation de l'ADN
- la mort cellulaire par apoptose.

Figure 8 : Schéma illustrant les rôles cellulaires de p53 (modifié d'après Lane, 1992).



a. division cellulaire normale, pour laquelle la p53 n'est pas requise.

b. lors de la réponse d'une cellule normale à des lésions de l'ADN, la fonction "gardien du génome" de p53 est induite.

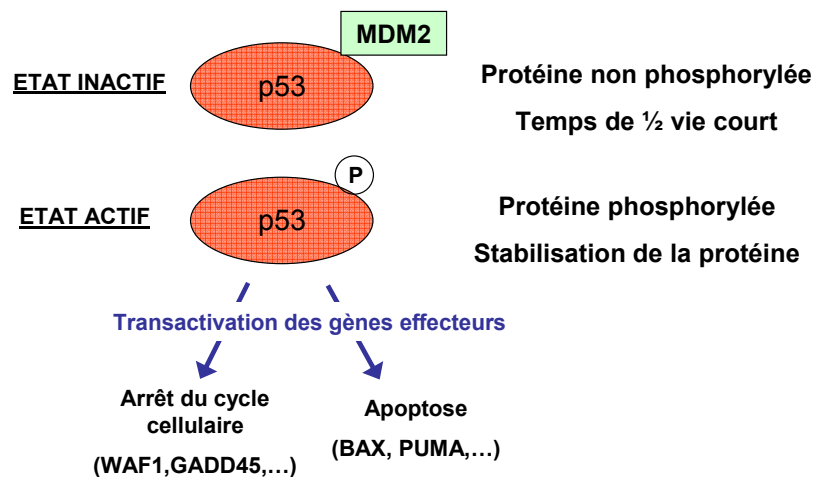
c. les cellules dans lesquelles la p53 est absente ou inactivée par mutation, ou par interaction avec des protéines virales ou cellulaires (MDM2), se divisent alors que l'ADN n'a pas été réparé. Cela aboutit à la présence de mutations, d'aneuploidie, ou à des défauts de mitose entraînant la mort de la cellule. Les cellules qui survivent à ces altérations sont susceptibles de devenir malignes.

La protéine p53 est présente dans toutes les cellules de l'organisme. En l'absence de stress, p53 est présente dans un état inactif et n'est pas phosphorylée (Fig.9). Son temps de demi-vie est court et sa quantité intracellulaire faible. En revanche, lorsqu'une cellule subit un stress, comme des lésions sur l'ADN, une hypoxie, l'activation d'oncogènes, etc., une accumulation de p53 est observée dans le noyau. Cette accumulation est liée à une stabilisation de la protéine par phosphorylation (Fig.9). La régulation du taux de p53 est principalement contrôlée par la protéine MDM2 (*murine double minute 2*). En se fixant à p53 au niveau de sa région amino-terminale, MDM2 inhibe ses fonctions transactivatrices et dirige la protéine p53 vers le protéasome pour y être dégradée. Une phosphorylation rend impossible l'interaction entre p53 et MDM2 et favorise la stabilisation de la p53.

Pour induire l'apoptose d'une cellule connaissant un stress génotoxique, p53 doit d'abord être phosphorylée (Leblanc & May, 2002) puis elle doit adopter sa conformation "active", ce qui lui permet de se fixer sur son ER (élément de réponse). A l'état actif, la protéine p53 joue le rôle de facteur de transcription. Elle active de manière directe l'expression de gènes effecteurs de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose, dont la séquence régulatrice présente des sites de fixation spécifiques à p53. On peut retenir certains gènes cibles de p53 engagés, avec une spécificité avérée, dans l'exécution du choix cellulaire (Fig.9). Pour l'arrêt du cycle, il s'agit

des gènes WAF1 (*Wild Type p53-activated fragment*), GADD45 (*growth arrest and DNA damage gene 45*) pour l'apoptose ce sont PIG3 (*p53-inducible gene 3*), PUMA (*p53 up regulated modulator apoptosis*) et BAX (*BCL2-associated X protein*). Le choix de l'une ou l'autre voie semble dépendre de facteurs tels que la gravité des lésions occasionnées ou le type cellulaire, toutefois, les mécanismes par lesquels il s'effectue n'ont pas encore été identifiés.

Figure 9 : Schéma simplifié de la régulation de la protéine p53.



Chez l'homme, les mutations du gène p53 sont constatées dans environ 50% des cas de cancer et, dans les tumeurs où le gène n'est pas muté, il existe fréquemment une altération de la régulation post-traductionnelle de la protéine (May & May, 1999). Cette altération de p53 compromet l'apoptose habituellement programmée en cas de dommage à l'ADN ou de dérèglement du cycle cellulaire.

p63 et p73

Chez l'homme, deux protéines présentant de fortes homologies de structure avec la p53 ont été récemment découvertes : il s'agit de la p63 et de la p73. Certaines isoformes de p63 et de p73 sont capables de transactiver des gènes comportant des séquences régulatrices répondant à p53, ou d'induire l'apoptose. Comme p53, la p63 et la p73 sont capables de s'associer à MDM2 par leur partie N-terminale : une telle fixation conduit à l'inhibition des fonctions de transcription et d'apoptose mais n'entraîne pas la dégradation de p73 (Stiewe & Pützer, 2002). Malgré quelques propriétés similaires, les fonctions de la p63 et de la p73 semblent différentes de celles de la p53. Des données suggèrent que des voies apoptotiques

indépendantes de p53 pourraient être contrôlées par les autres membres de la famille, et que les propriétés de p63 et p73 pourraient pallier en partie l'absence de p53. En réponse à des dommages génotoxiques, une apoptose dépendante de p53 peut requérir la fonctionnalité à la fois de la p63 et de la p73 (Flores *et al.*, 2002). Dans ce cas, il faut considérer les homologues de p53 comme des cofacteurs et des régulateurs de son activité. A l'issue d'une recherche sur un grand nombre de cancers, il a été mis en évidence que contrairement à p53, p63 et p73 ne sont pas inactivées par mutation dans les cas de cancer.

p21

Le gène WAF1 (*Wild Type p53-activated fragment*) code pour la protéine p21. Il s'agit de l'un des principaux gènes effecteurs de p53 dans l'arrêt de la progression du cycle cellulaire en phase G1→S. Son expression est stimulée par p53. En effet, la protéine p53 agit comme un facteur de transcription en se liant avec une séquence spécifique d'ADN du gène WAF1 dont la protéine p21 se lie aux kinases cdk2, et inhibe leur activité. La cellule arrête alors son cycle avant la synthèse de l'ADN et peut réparer d'éventuels dommages.

Contrôle du cycle cellulaire chez les mollusques

Le contrôle du cycle cellulaire chez l'huître et les mollusques en général a été très peu étudié. A cet égard, il est intéressant de noter que peu de cas de néoplasie cellulaire sont connus chez les mollusques. Seuls des cas de "leucémie" (ou néoplasie hématopoïétique) ont été décrits chez les mollusques bivalves, notamment chez *Mya arenaria* (Barber, 2004 pour une revue). Chez la mye saine, les hémocytes circulants sont présents à faible densité, ressemblent à des fibroblastes et sont adhérents. Chez la mye "leucémique", les hémocytes normaux sont supplantés par une population dense de cellules mitotiques rondes, non adhérentes et agranulaires. Lorsque les myes sont sévèrement atteintes, la maladie touche les tissus conjonctifs et devient létale (Leavitt *et al.*, 1990). Plusieurs études suggèrent l'implication de la famille p53 dans cette maladie. Une mutation du gène p53 a été rapportée dans les cellules "leucémiques" de *M. arenaria* (Barker *et al.*, 1997). Des études ont également montré que, par rapport aux cellules normales, les cellules "leucémiques" présentent un profil d'expression des protéines de la famille p53 qui diffère (Stephens *et al.*, 2001). L'étiologie de cette maladie reste peu connue. Il semble que l'apparition de la maladie soit plus fréquente dans les milieux pollués. Jessen-Eller *et al.* (2002) ont d'ailleurs montré que le niveau d'expression transcriptionnel et protéique de certains membres de la famille p53 (p120 et p97) était affecté

par les PCBs (polychlorobiphényles). Mais il se pourrait également que cette maladie se transmette de manière virale (Oprandy *et al.*, 1981 ; Oprandy & Chang, 1983).

Chez *C. gigas*, aucun représentant de la famille p53 n'était jusqu'alors identifié. Au cours de ce travail de thèse, un fragment d'ADNc homologue de la protéine p53 a été cloné.

Un ADNc homologue du gène codant pour la protéine p21 (Genbank #CB617437) identifié chez l'huître creuse était disponible dans Genbank. Une induction transcriptionnelle de l'expression de ce gène a été observée après 21 jours de contamination avec un mélange d'hydrocarbures (fuel domestique) chez *C. gigas* (Boutet *et al.*, 2004).

Contrôle du cycle cellulaire et rayonnements ionisants

Le contrôle du cycle cellulaire est primordial pour éviter la propagation de cellules radio-lésées potentiellement tumorales (Hussain & Harris, 2006). La protéine p53 présente la propriété d'induire l'apoptose ou de bloquer la cellule en phase G1 de la division cellulaire (*via* un de ses effecteurs p21). Ces mécanismes permettent de réparer des lésions radio-induites de l'ADN ou d'éliminer les cellules trop endommagées (Ishikawa *et al.*, 2006). C'est par ces effets biologiques que p53 protège l'organisme de l'action délétère des radiations ionisantes (Pellegata *et al.*, 1996).

V-3) Mécanismes de détoxification cellulaire

Dans leur environnement, les organismes sont exposés à des substances exogènes d'origines diverses, rassemblées sous le terme de xénobiotiques. Ces composés regroupent des produits naturels et des polluants de l'environnement : toxines végétales et animales, pesticides, hydrocarbures, etc... Généralement hydrophobes, ces molécules ont tendance à s'accumuler dans les phases lipidiques des membranes cellulaires. Sans les systèmes enzymatiques permettant leur élimination, ces xénobiotiques entraîneraient une mort inéluctable des organismes. Le processus de détoxification se déroule selon trois phases regroupant différentes enzymes de biotransformation (phases I et II) et des transporteurs (phase III).

- Les réactions de phase I, dites de fonctionnalisation, permettent l'introduction d'une nouvelle fonction chimique (-OH, NH₂, COOH) rendant la molécule plus polaire.
- Les réactions de phase II, dites de conjugaison, permettent l'ajout d'un radical hydrophile et sont réalisées soit directement sur le xénobiotique, soit sur les métabolites 'fonctionnalisés' générés par la phase I. Ces réactions de conjugaison

augmentent l'hydrophilie de la molécule, facilitent son transport et activent son élimination.

- Les enzymes de phase III permettent l'élimination des conjugués hydrophiles. Ce sont essentiellement des glycoprotéines membranaires permettant le transport actif des xénobiotiques et des conjugués de la phase II hors de la cellule (Silverman, 1999).

CYP450

Chez les eucaryotes, les cytochromes P450 composent une famille multigénique de mono-oxygénases localisées sur la membrane du réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries. Il existe des centaines de protéines cytochrome P450 différentes. Dans la réaction type, le cytochrome P450 transforme un substrat hydrophobe (RH) en produit hydrophile (ROH) souvent par l'introduction d'une fonction hydroxyle :



Outre leur fonction d'hydroxylation des xénobiotiques, les cytochromes P450 de mammifères participent également au métabolisme des substances endogènes (biosynthèse des hormones stéroïdes, des vitamines A et D et des acides biliaires).

Les CYPs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques sont capables de métaboliser de nombreuses espèces chimiques. La spécificité des substrats des cytochromes P450 est relative (un CYP peut métaboliser plusieurs substrats). Malgré la proximité de leurs séquences protéiques, les isoenzymes d'une même sous-famille montrent des activités catalytiques divergentes. Le fait qu'un gène existe chez deux espèces différentes ne garantit pas qu'il ait la même activité spécifique chez ces deux espèces.

Les mécanismes de régulation de P450 sont complexes et différent d'une espèce à l'autre, mais on peut globalement les résumer de la manière suivante. L'expression des P450 est régulée par des facteurs endogènes (régulation hormonale) et exogènes (xénobiotiques). Une des caractéristiques des cytochromes P450 est leur inductibilité au niveau transcriptionnel. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces régulations sont plus ou moins bien connus suivant les gènes considérés. Si l'activation transcriptionnelle est souvent à l'origine de l'induction, une stabilisation de la protéine ou de l'ARNm peut également être impliquée.

Toutefois, le métabolisme des xénobiotiques ne conduit pas toujours à la détoxification de ces composés. Il arrive que la biotransformation subie par la molécule conduise à la formation d'un métabolite toxique. Par exemple, le produit oxydé ou réduit peut manifester une très forte réactivité par attaque électrophile ou nucléophile des macromolécules environnantes (formation d'adduits sur des protéines ou les acides nucléiques).

Chez les mollusques, la réponse du gène CYP1A aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) a été particulièrement étudiée (Solé *et al.*, 1996 ; Canova *et al.*, 1998 ; Akcha *et al.*, 2000 ; Shaw *et al.*, 2000, 2004). Plusieurs ARNm supposés de la famille des CYP450 ont été identifiés chez *C. gigas* : CYP1A1 (Genbank #CX069165), CYP450 pHPah1 (Genbank #CB617404), CYP2E1 (Genbank #AF075692), CYP4Y1 (Genbank #CX739646). Nous avons choisi d'étudier le gène homologue de CYP2E1 (Genbank #AF075692) chez l'huître car l'induction de ce gène par les rayonnements gamma a déjà été montré chez le rat au niveau ARNm et protéine (Chung *et al.*, 2001). Cette induction a été attribuée à un changement de l'énergie métabolique dû à un dysfonctionnement mitochondrial consécutif à l'irradiation gamma.

GST

Les glutathion-S-transférases représentent une superfamille multigénique d'enzymes essentiellement cytosoliques, impliquées dans des opérations diverses de transports et de biosynthèses intracellulaires (George & Buchanan, 1990 ; Hayes *et al.*, 2005 pour une revue). Quantitativement, les glutathion-S-transférases sont les enzymes les plus importantes des réactions enzymatiques de la phase II du métabolisme de détoxification cellulaire. Elles catalysent la conjugaison entre un peptide, le glutathion réduit, et des molécules réactives comportant des sites électrophiles. La catalyse de cette conjugaison du glutathion avec certains substrats réactifs permet la formation de composés qui seront moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules de départ, facilitant ainsi leur élimination de la cellule (Chatterjee & Bhattacharya, 1984). Globalement, les GST catalysent les réactions de substitution ou d'addition nucléophile. Mais elles peuvent également agir comme des peroxydases, des isomérases ou simplement en se liant à des protéines séquestrant des molécules hydrophobes. Les GST contribuent potentiellement à la régulation du stress oxydant (Hayes & Strange, 1995a). Les substrats des GST sont variés : molécule xénobiotique ou sous-produit du métabolisme cellulaire (Hayes & Strange, 1995b). Les substrats sont électrophiles et souvent hydrophobes. Chez les mammifères, les GST se divisent en différentes classes d'enzymes évolutivement reliées mais dont les propriétés structurales, immunologiques et biochimiques diffèrent quelque peu : Sigma (Alpha, Mu, Pi), Theta, Kappa et Omega (Sheehan *et al.*, 2001). Dans chaque classe, différents variants alléliques ont été identifiés. Les GST cytosoliques sont les mieux décrites chez les mammifères, grâce

notamment de leur structure cristallographique. Dans l'état actuel de nos connaissances, toutes les isoenzymes de la famille des GST n'ont pas encore été individualisées (comme c'est le cas pour les cytochromes P450) et chacune de leurs activités spécifiques demeure mal connue.

Chez les mollusques bivalves, l'induction de GST a été mise en évidence au niveau enzymatique en réponse à divers stress : contaminants chimiques benzo[a]pyrène (Akcha *et al.*, 2000 ; Canova *et al.*, 1998), furadan (Alves *et al.*, 2002), métaux (Serafim *et al.*, 2002) et stress oxydatif (Livingstone, 2001, 2003). Chez l'huître creuse, plusieurs ADNc de GST ont été identifiés : certains codent pour des homologues de protéines appartenant à la classe sigma (alpha, mu, pi) : GST sigma pi (Genbank #AJ557140), GST sigma mu (Genbank #CB617447), GST sigma mu (Genbank #CB617513), GST sigma pi (Genbank #CB617512) et d'autres à la classe omega (Genbank #CB617406). Les protéines des classes sigma et omega sont cytosoliques. Les fluctuations de ces GST en réponse au stress n'ont jamais été étudiées au niveau ARNm chez *C. gigas*. Pour ces gènes, on ne dispose donc d'aucune information fonctionnelle, autre que l'homologie de séquence.

Nous avons choisi d'étudier les fluctuations du niveau d'ARNm de la séquence #AJ557140 correspondant théoriquement à un homologue d'une GST de la classe sigma (sous-classe pi). Il s'agit de la séquence de GST la plus complète chez l'huître et d'après la littérature, cette classe présente un intérêt du point de vue de la réponse aux radiations ionisantes au niveau ARNm (Stammler *et al.*, 1995, 1996)

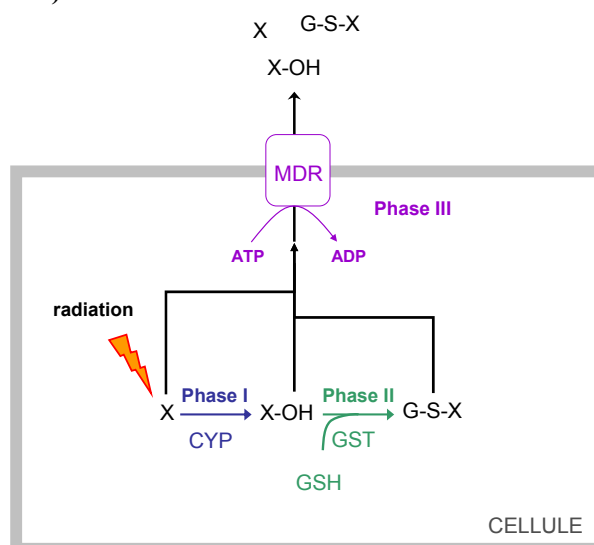
MXR

Les protéines de transport du système MXR appartiennent à une famille extrêmement vaste de protéines, que l'on retrouve dans tout le règne vivant: la famille ABC (ATP binding cassette). Chez les mammifères, le produit des gènes MDR est une protéine membranaire glycosylée de 170 kDa, couramment appelée Pgp pour P-glycoprotéine (Endicott & Ling, 1989). Le transport des composés substrats est précédé d'une étape de liaison des molécules sur un ou plusieurs sites spécifiques des Pgps. Le transport des substrats par les Pgps est un mécanisme dépendant de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Les Pgps présentent une activité ATPasique intrinsèque, qui est amplifiée par la liaison des substrats sur le transporteur (Shapiro & Ling, 1994). Les nombreux travaux concernant la résistance MDR chez les mammifères ont montré que les Pgps peuvent transporter une très grande variété de composés organiques de structures et de propriétés chimiques très différentes (Endicott & Ling, 1989).

Par analogie avec le système de résistance MDR (*Multi-Drug Resistance*) identifié chez les mammifères, le mécanisme identifié chez les mollusques a été appelé MXR pour MultiXenobiotic Resistance ou résistance multixénobiotique. Le système MXR est défini comme un mécanisme de défense global, qui réagit face à un cumul de composés organiques, comprenant aussi bien des contaminants anthropiques que des substances naturelles. Si les connaissances acquises chez les mammifères permettent d'utiliser la notion de résistance dans le cas des cellules cancéreuses, trop peu de données sont disponibles chez les organismes aquatiques pour avancer l'existence d'une résistance au sens strict (Pain & Parant, 2003a, 2003b). Le système MXR a fait l'objet de plusieurs revues (Kurelec, 1992 ; Bard, 2000 ; Pain & Parant, 2003a). Chez les bivalves, l'induction protéique du système MXR a souvent été corrélée à une contamination organique du milieu (Minier *et al.*, 1993 ; Minier & Moore, 1996a ; Keppler & Ringwood, 2001a, 2001b) mais également, à un stress thermique et une efflorescence algale (Keppler, 1997). Chez *C. gigas*, Minier *et al.* (2002) ont montré que le système MXR apparaît au cours du développement larvaire et que le système MXR devient pleinement fonctionnel après la métamorphose. Une séquence partielle d'ARNm a été clonée chez *C. gigas* (Genbank #CGI422120) : elle correspond à un gène nommé MDR1 en raison de son homologie avec le gène MDR1 identifié chez les vertébrés.

Mécanismes de détoxication cellulaire et radiations ionisantes

Figure 10 : Schéma synthétique des mécanismes de détoxication cellulaire de phase I, II et III pouvant être induit en réponse à la génération de molécules toxiques par les radiations ionisantes (Modifié d'après Bard, 2000).

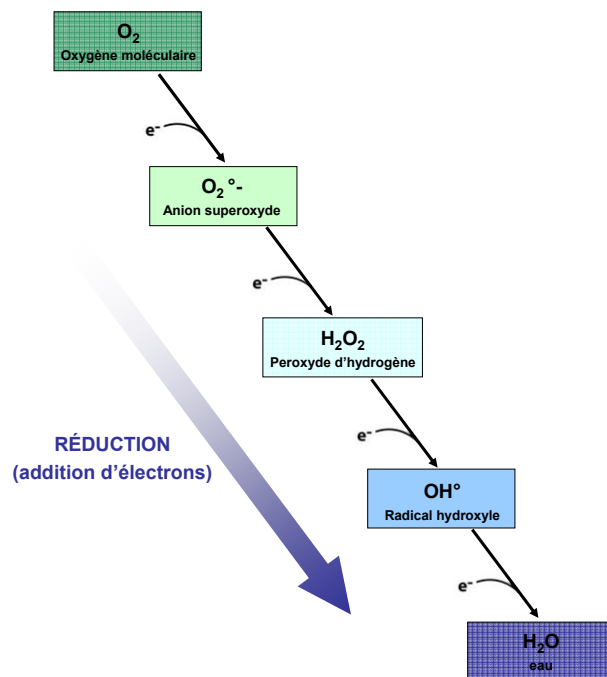


Les rayonnements ionisants provoquent la génération de molécules réactives (Fig.10, composé X) qui nécessitent d'être neutralisées (phase I et II), puis éliminées (phase III). C'est grâce aux mécanismes de détoxification cellulaire que l'intégrité des macromolécules cellulaires est préservée.

V-4) Régulation du stress oxydatif

Des espèces réactives de l'oxygène sont naturellement produites par le métabolisme (par exemple : phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries, métabolisme du glucose, catabolisme des purines, etc...). Les radicaux libres sont d'ailleurs indispensables car ils peuvent servir de moyen de transport des électrons dans certains processus enzymatiques. La molécule d'oxygène ne peut intervenir dans les réactions métaboliques que par une suite de réactions monoélectroniques générant des radicaux libres ou du peroxyde d'hydrogène (Fig.11). Néanmoins, la balance oxydative doit rester équilibrée. En cas de déséquilibre de cette balance, les radicaux libres attaquent les molécules voisines et provoquent des dommages biologiques graves.

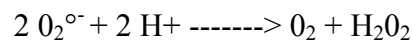
Figure 11 : Suite de réactions monoélectroniques générant des espèces réactives de l'oxygène (modifié d'après <http://biology.plosjournals.org>).



La lutte contre les radicaux libres fait appel à des systèmes non enzymatiques piégeant les radicaux libres (métallothionéine, glutathion, vitamines C, E, Q, caroténoïdes, polyphénols) et à des systèmes enzymatiques. Trois enzymes participent à la régulation du stress oxydatif : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT).

SOD

La superoxyde dismutase (SOD) est ubiquiste dans les organismes aérobies. Il existe plusieurs enzymes à activité SOD variant par leur séquence protéique et leurs cofacteurs métalliques. Le cuivre et le zinc caractérisent généralement les SOD cytosoliques et le manganèse, les SOD mitochondriales. La superoxyde dismutase catalyse la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :



Les anions superoxydes $O_2^{\circ-}$ (oxygène moléculaire ionisé par addition d'un électron supplémentaire) sont générés, entre autres, par diverses enzymes du métabolisme : NADPH oxydase des macrophages, xanthine oxydase, cytochrome oxydase, etc... Ces radicaux libres de durée de vie très brève, sont très toxiques pour les molécules biologiques, en particulier les acides gras polyinsaturés, sur lesquels ils produisent des peroxydations en chaîne. En liant deux anions superoxydes à deux protons hydrogène pour produire de l'oxygène moléculaire et de l'eau oxygénée, la SOD génère des composés neutres et moins toxiques. Cependant, l' H_2O_2 reste un composé toxique qui nécessitera lui aussi, d'être neutralisé.

Trois séquences sont disponibles chez l'huître creuse. L'une d'elle code pour une protéine fortement homologue à une Cu-Zn SOD (Genbank #AJ496219). Chez *C. gigas*, une étude a montré que ce gène était induit transcriptionnellement par un mélange d'hydrocarbures (Boutet *et al.*, 2004). Chez les vertébrés, ce gène est connu pour être inductible par les radiations ionisantes (Yamaoka *et al.*, 1994 ; Yamaoka & Ishii, 1995 ; Shimizu *et al.*, 1998 ; Vartanyan *et al.*, 2000)

CAT

Les organismes aérobies possèdent une catalase qui leur permet d'éliminer le peroxyde d'hydrogène formé au cours de certaines de leurs réactions métaboliques. L'équation bilan de la réaction catalysée par la catalase est : $2 H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + O_2$

Le mécanisme d'action de cette oxydo-réductase correspond à un transfert d'électrons entre deux molécules d'H₂O₂. On parle de dismutation. Les catalases sont des enzymes constituées de 4 sous-unités identiques. Chaque sous-unité renferme un ion fer III logé dans un noyau hémique (proche de celui de l'hémoglobine).

Aucune séquence d'ADN n'est disponible chez l'huître creuse. En revanche, l'activité enzymatique de la catalase a souvent été mesurée chez les mollusques bivalves (Viarengo *et al.*, 1991 ; Eertman *et al.*, 1995 ; Solé *et al.*, 1995 ; Power & Sheehan, 1996 ; Doyotte *et al.*, 1997 ; Akcha *et al.*, 2000 ; Niyogi *et al.*, 2001 ; Alves *et al.*, 2002 ; Cavaletto *et al.*, 2002 ; Orbea *et al.*, 2002 ; Damiens *et al.*, 2004 ; Bebianno *et al.*, 2005 ; Zaccaron da Silva *et al.*, 2005).

MT

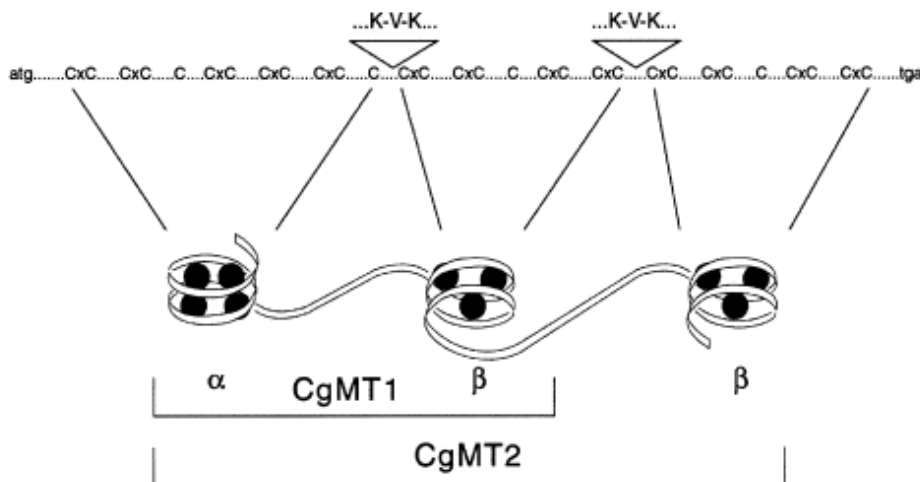
Les métallothionéines sont de petites protéines de faible poids moléculaire riches en cystéine, capables de se lier aux cations divalents métalliques tels que le cadmium, le cuivre, l'argent, le mercure et le zinc grâce à leurs nombreux ponts disulfures portés par l'acide aminé cystéine. Les MT sont impliquées dans l'homéostasie des métaux essentiels. Dans les conditions normales de fonctionnement des cellules, les MT sont chargées d'assurer la régulation des métaux essentiels intracellulaires (zinc et cuivre) (Kojima & Kägi, 1978 ; Cano-Gauci & Sarkar, 1996 ; Maret *et al.*, 1997 ; Palmiter, 1998). Elles jouent également un rôle dans la détoxification des ions métalliques. Elles agissent comme des agents de séquestration des métaux toxiques afin de limiter leur fixation sur les sites actifs d'autres protéines, limitant ainsi leur dénaturation ou leur inactivation.

Des travaux récents tendent à montrer le rôle des MT dans la protection contre les radicaux oxygénés. Plusieurs études *in vitro* ont montré que les MT sont capables de fixer les ERO (superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyl ou oxyde nitrique) de façon plus efficace que les glutathiones, la SOD ou la catalase (Thornalley & Vasák, 1985 ; Quesada *et al.*, 1996 ; Kumari *et al.*, 1998 ; Kang, 1999). La surexpression de MT dans des lignées cellulaires augmentent leur résistance au stress oxydatif alors que les cellules déficientes en MT y sont sensibles (Schwarz *et al.*, 1994 ; Lazo *et al.*, 1995 ; Schwarz *et al.*, 1995). Le niveau cellulaire de MT augmente en présence d'oxydants (Bauman *et al.*, 1991). Cette protection des MT contre les dommages oxydatifs a également été observée *in vivo* en soumettant des rats à des stress, connus pour induire la synthèse de MT (cadmium, zinc,

lipopolysaccharides, interleukines, facteur de nécrose tumorale). Ces animaux présentaient alors une augmentation de leur résistance au stress oxydatif et une diminution de peroxydation des lipides dans leur foie et leurs reins (Du & Yang, 1994 ; Iszard *et al.*, 1995 ; Sato *et al.*, 1995).

Chez les mollusques, l'implication des MT dans la régulation du stress oxydant a également été étudiée (Roesijadi *et al.*, 1997 ; Anderson *et al.*, 1999 ; Leung & Furness, 2001). Chez *C. gigas*, trois gènes de la famille MT ont été identifiées : CgMT1 (Genbank #AJ243263), CgMT2 (Genbank #AJ242657), CgMT3 (Genbank #AJ295157) (Tanguy *et al.*, 2001 ; Tanguy & Moraga, 2001). Les gènes CgMT1 et CgMT2 ont été entièrement caractérisés, tandis que pour le gène CgMT3, seul l'ADNc est disponible. Les gènes CgMT1 et CgMT2 possèdent une structure quasiment similaire et peuvent être différenciés grâce à leur organisation moléculaire. En effet, le gène codant pour CgMT2 présente une caractéristique très rare : une duplication du troisième exon (Tanguy & Moraga, 2001). Le gène CgMT1 possède un domaine d'organisation classique en $\alpha\beta$ (Fig.12). Le gène CgMT2 présente un domaine β additionnel. Chez les mammifères, le domaine α peut lier 4 ions métalliques et le domaine β , 3 (Chan *et al.*, 2002). Ainsi, la présence de ce deuxième domaine β pourrait permettre à la protéine MT2 de *C. gigas* de lier 3 ions métalliques de plus que MT1. D'après Tanguy & Moraga (2001), la capacité de détoxification des métaux de MT2 est 50% supérieure à celle de MT1. D'après Marie *et al.* (2006), le niveau d'ARNm de CgMT2 est constitutivement 3 à 4 fois plus fort que celui de CgMT1 chez *C. gigas*.

Figure 12 : Modèle d'organisation des domaines structuraux de CgMT1 et CgMT2 (d'après Tanguy & Moraga, 2001).



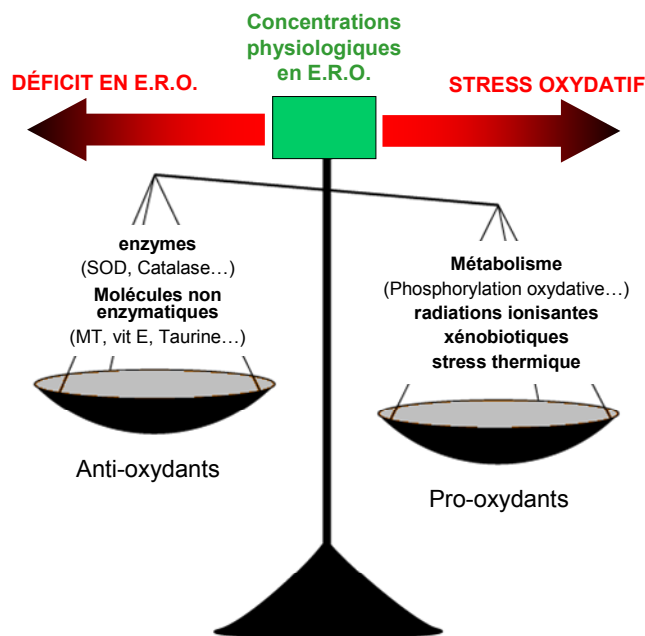
Le gène CgMT3 ne possède pas d'intron et présente une structure proche du gène MT de la levure. D'après Marie *et al.* (2006), ce gène est 10^6 fois moins exprimé que CgMT1 et CgMT2 au niveau transcrit et il n'est faiblement induit qu'en réponse au zinc (aucune réponse n'a été enregistrée avec le Cd ou le Zn). Par conséquent, l'implication physiologique de CgMT3 en réponse à une contamination métallique n'est probablement pas significative comparée à celle exercée par CgMT1 et CgMT2.

Pour cette raison, un choix a été fait de n'étudier que les variations des ARNm de CgMT1 et CgMT2.

Régulation du stress oxydant et rayonnements ionisants

Nous avons vu qu'une part importante des lésions radio-induites est indirectement due au stress oxydatif consécutif à une irradiation. Les enzymes du stress oxydatif sont donc directement impliquées dans la réponse aux radiations ionisantes pour rétablir l'équilibre de la balance oxydative (Fig.13).

Figure 13 : Pro-oxydants et anti-oxydants susceptibles d'altérer l'équilibre de la balance oxydative. ERO : espèces réactives de l'oxygène.



VI) Quantification des ARNm en PCR temps réel

La régulation des différentes fonctions cellulaires qui viennent d'être citées peut être étudiées à différents niveaux entre l'ADN et la protéine :

- 1) entre le gène (ADN) et l'ARNm : contrôle de l'expression transcriptionnelle, maturation de l'ARN en ARNm.
- 2) de l'ARNm à la protéine : contrôle du transport de l'ARNm du noyau vers le cytosol et de sa localisation dans le cytosol, contrôle de la traduction de l'ARNm en protéine
- 3) régulation post-traductionnelle : contrôle de l'activité protéique (activité enzymatique, conformation active / inactive, adressage).

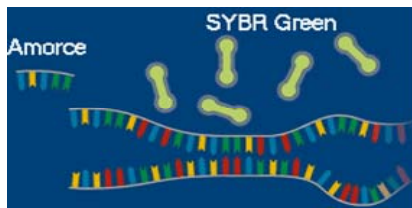
La quantification d'ARNm en PCR temps réel permet de se placer au niveau d'une des régulations les plus précoces : la régulation transcriptionnelle. Bien entendu, la molécule fonctionnelle reste la protéine et la réponse protéique devra nécessairement être abordée. Le travail de cette thèse constitue une étape préliminaire qui vise à réaliser un premier criblage, au niveau de l'ARNm, de différentes fonctions cellulaires radio-induites afin de cibler le gène ou la fonction la plus réactive à faible dose, chez l'huître.

Au cours de ce travail, certains indicateurs ont également été évalués au niveau protéique. Le protocole de leur mesure sera décrit ultérieurement (lors de leur utilisation).

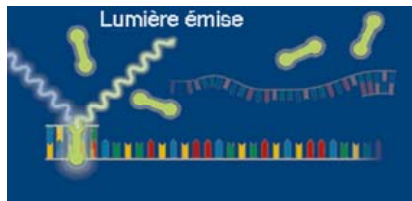
VI-1) Principe général de la PCR quantitative en temps réel

La réaction d'amplification de la séquence d'ADN cible suit les mêmes étapes qu'une PCR classique c'est-à-dire dénaturation, hybridation, extension. A la différence d'une PCR classique, la PCR en temps réel repose sur l'utilisation d'une sonde fluorescente, dans le cas présent : le SYBR Green. En solution, le SYBR Green n'est pas fluorescent lorsqu'il est sous sa forme libre, alors qu'il est très fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN double brin (Fig.14). En s'insérant entre les deux brins de l'amplicon formé, le SYBR Green permet sa quantification en temps réel. Le SYBR Green est très stable : au bout de 30 cycles d'amplification, seulement 6% de son activité est perdue. Un microspectrofluorimètre couplé au thermocycler permet de lire cette fluorescence.

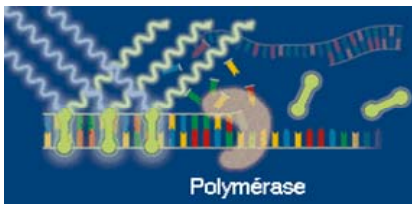
Figure 14 : Schéma illustrant la propriété du SYBR Green à émettre de la fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin (modifié d'après www.thaiscience.com).



1 - Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorophore non lié.



2 - Après le couplage des amorces, le fluorophore se lie à l'ADN double brin. La liaison à l'ADN se traduit par une augmentation de la fluorescence.

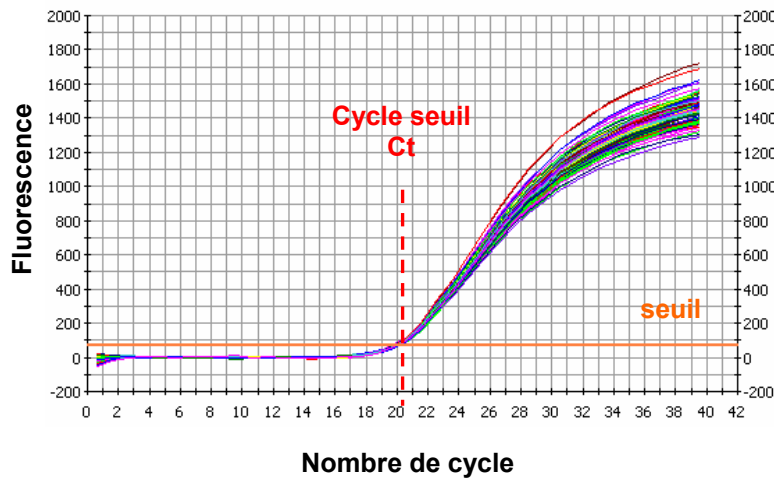


3 - Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules de fluorophore lié à l'ADN synthétisé augmente ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle.

VI-2) Le cycle seuil : Ct (Threshold Cycle)

La PCR quantitative en temps réel repose sur un nouveau principe de quantification : la question n'est plus "combien" mais "quand". En effet, le nombre de copies obtenu à la fin d'une PCR n'est pas parfaitement reproductible, seule la phase exponentielle est représentative du nombre de copies initiales (Fig.15). C'est le moment où le signal sort du bruit de fond qui est significatif. Ce moment correspond à un certain nombre de cycles appelé Ct (Threshold Cycle). Pour cela, on définit un seuil (threshold) correspondant à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle mais suffisamment élevé pour être au dessus du bruit de fond.

Figure 15 : 96 amplifications différentes avec la même quantité d'ADNc au départ. Les quantités obtenues en fin de PCR sont différentes (plateaux) tandis que le cycle seuil (Ct) est le même.



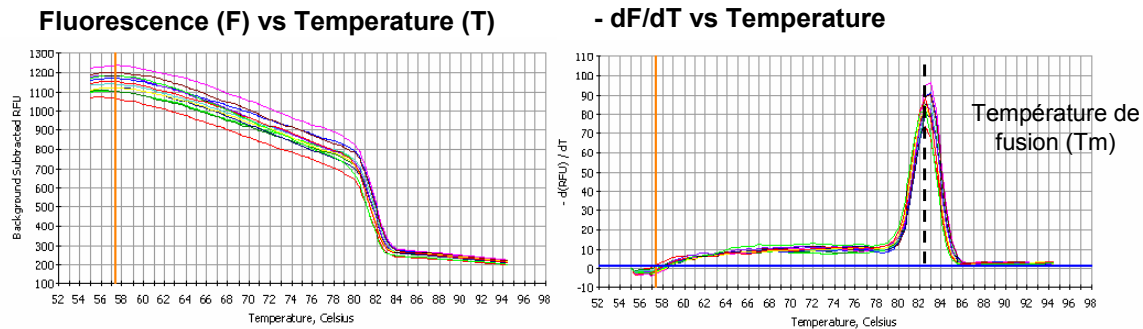
VI-3) Courbe de fusion

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (T_m) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin (Fig.16). Après le dernier cycle de PCR, la température est élevée à 95°C afin de dénaturer l'ADN double brin en ADN simple brin, puis elle est abaissée à la température de couplage ce qui provoque la reformation d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement par palier jusqu'à 95°C. La fluorescence est lue en continu pendant cette remontée :

- 1- le SYBR Green est fluorescent tant qu'il est lié à l'ADN double brin,
- 2- quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, ce qui entraîne la libération du SYBR Green dans le milieu et une diminution progressive de la fluorescence,
- 3- lorsque 50 % de l'ADN double brin est dissocié, la fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que correspond à la température de fusion du produit synthétisé.

La température de fusion est obtenue en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température : elle correspond au maximum de la courbe (Fig.16).

Figure 16 : Courbe de fusion et température de fusion



VI-4) Mise au point des amorces

Des amorces spécifiques du gène d'intérêt sont définies *in silico* (Primer3 : http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Une première analyse bioinformatique de la structure secondaire des amorces (DNA mFold) permet d'écarter les amorces présentant un risque de multimérisation, pouvant entraîner une mauvaise amplification. Ensuite, la qualité des amorces est validée expérimentalement en effectuant une série de dilutions d'ADNc (Fig.17). L'efficacité de l'amplification d'un gène dépend essentiellement du couple d'amorces utilisé, plus précisément de la qualité de l'hybridation de ces amorces sur le brin d'ADN matrice. L'efficacité de la PCR se calcule de manière suivante :

$$\text{Efficacité (\%)} = 100 * (10^{(-1/\text{pente})} - 1)$$

pente : pente de la droite d'équation $Ct = f(\log(\text{quantité d'ADNc au départ}))$

Une efficacité de 100 % (correspondant à une pente de -3.30) signifie qu'il y a bien un doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle de PCR. Pour être validé, nous avons défini qu'un couple d'amorces devait présenter une efficacité égale à $100\% \pm 5\%$, et ceci sur une gamme de concentration en ADNc supérieure à 3 log. Enfin, la courbe de fusion permet de vérifier s'il y a eu multimérisation des amorces. Si tel est le cas, un nouveau couple d'amorces devra être choisi. Le [tableau 2](#) recense les amorces utilisées lors des différentes quantifications qui seront présentées dans ce manuscrit.

***RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES***

- Abbott DT, Mix MC. 1979. Radiation Effects of Tritiated Seawater on Development of the Goose Barnacle, *Pollicipes Polymerus*. *Health Phys.* 36:283-287
- Agrawal A, Chandra D, Kale RK. 2001. Radiation induced oxidative stress: II studies in liver as a distant organ of tumor bearing mice. *Mol. Cell. Biochem.* 224:9-17
- Akcha F, Izuel C, Venier P, Budzinski H, Burgeot T, Narbonne JF. 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 49:269-287
- Alves SRC, Severino PC, Ibbotson DP, da Silva AZ, Lopes FRAS, Saenz LA, Bainy ACD. 2002. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Mar. Environ. Res.* 54:241-245
- Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76:160-202
- Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. 1986 Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232:522-524
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* 64:5245-5250
- Anderson SL, Harrison FL. 1986. Effects of Radiation on Aquatic Organisms and Radiobiological Methodologies for Effects Assessment., US. Environmental Protection Agency
- Anderson RS, Patel KM, Roesijadi G. 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev. Comp. Immunol.* 23:443-449
- Bachère E, Chagot D, Grizel H. 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* 12:549-559
- Bailly du Bois P, Guéguéniat P. 1999. Quantitative assessment of dissolved radiotracers in the English Channel : sources, average impact of la Hague reprocessing plant and conservative behaviour (1983, 1986, 1988 and 1994). *Continental Shelf Research* 19:1977-2002
- Bailly du Bois P, Dumas F. 2002. Dissolved radionuclide measurements used for qualitative and quantitative calibration of hydrodynamic models in the English Channel and the North Sea; validation of the "TRANSMER" model. *Tracer Methods in Geophysical Fluid Dynamics*. Liège
- Bailly du Bois P, Dumas F. 2005. Fast hydrodynamic model for medium- and long-term dispersion in seawater in the English Channel and southern North Sea, qualitative and quantitative validation by radionuclide tracers. *Ocean Modelling* 9:169-210
- Bain LJ, McLachlan JB, LeBlanc GA. 1997. Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein. *Environ. Health Perspect.* 105:812-818
- Barber BJ. 2004. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquat. Living Resour.* 17:449-466
- Bard SM. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48:357-389
- Barker CM, Calvert RJ, Walker CW, Reinisch CL. 1997. Detection of mutant p53 in clam leukemia cells. *Exp. Cell Res.* 232:240-245

- Baudrimont M, Lemaire-Gony S, Ribeyre F, Métivaud J, Boudou A. 1997. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 118:361-367
- Bauman JW, Liu J, Liu YP, Klaassen CD. 1991. Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110:347-354
- Bebianno MJ, Company R, Serafim A, Camus L, Cosson RP, Fiala-Medoni A. 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiulus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* 75:354-373
- Bellmann K, Jaattela M, Wissing D, Burkart V, Kolb H. 1996. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett.* 391:185-188
- Bodin N, Burgeot T, Bocquené G, Menard D, Stanisière JY, Minier C, Boutet I, Amat A, Chérel Y, Budzinski H. 2004. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 138:411-427
- Boutet I, Tanguy A, Moraga D. 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329:147-157
- Bravard A, Luccioni C, Moustacchi E, Rigaud O. 1999. Contribution of antioxidant enzymes to the adaptive response to ionizing radiation of human lymphoblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* 75:639-645
- Bukau B, Horwich AL. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351-366
- Buroker NE. 1983. Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia* 23:271-279
- Bustamante P, Germain P, Leclerc G, Miramand P. 2002. Concentration and distribution of ²¹⁰Po in the tissues of the scallop *Chlamys varia* and the mussel *Mytilus edulis* from the coasts of Charente-Maritime (France). *Mar. Pollut. Bull.* 44:997-1002
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25:169-193
- Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29:23-39
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 34:597-601
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat J-L. 1997. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131:1-87
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL, Sauvaigo S. 2002. Les lésions radio-induites de l'ADN. *Médecine Nucléaire* 26:119-125
- Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian MG. 1999. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 132:85-98
- Cano-Gauci DF, Sarkar B. 1996. Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS Lett.* 386:1-4
- Canova S, Degan P, Peters LD, Livingstone DR, Voltan R, Venier P. 1998. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.* 399:17-30
- Carvalho F. 1987. Comparative uptake from sea water and tissue distribution of ⁶⁰Co in marine mollusks. *Health Phys.* 53:73-81
- Cavaletto M, Ghezzi A, Burlando B, Evangelisti V, Ceratto N, Viarengo A. 2002. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 131:447-455

- Chan J, Huang Z, Merrifield ME, Salgado MT, Stillman MJ. 2002. Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modeling techniques. *Coord. Chem. Rev.* 233-234:319-339
- Chapple JP, Smerdon GR, Berry RJ, Hawkins AJS. 1998. Seasonal changes in stress-70 protein levels reflect thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 229:53-68
- Chatterjee S, Bhattacharya S. 1984. Detoxication of industrial pollutants by the glutathione S-transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (bloch). *Toxicol. Lett.* 22:87-198
- Chin K-V, Tanaka S, Darlington G, Pastan I, Gottesman MM. 1990. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 265:221-226
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. 2003. Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology* 193:3-34
- Chubatsu LS, Meneghini R. 1993. Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem. J.* 291 193-198
- Chung HC, Kim SH, Lee MG, Cho CK, Kim TH, Lee DH, Kim SG. 2001. Mitochondrial dysfunction by γ -irradiation accompanies the induction of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in rat liver. *Toxicology* 161:79-91
- CIPR 1977. International Commission on Radiological Protection (ICRP). "1977 Recommendations". (ICRP Publication 26) Ann. ICRP. 1 (1). Oxford : Pergamon Press. 1977.
- CIPR 1991. International Commission on Radiological Protection (ICRP). "1990 Recommendations". (ICRP Publication 60) Ann. ICRP. 21 (1/3). Oxford : Pergamon Press. 1991.
- Clairborne A. 1985. Catalase activity. In *CRC handbook of methods in oxygen radical research*, ed. RA Greenwald, pp. 283-284: CRC press
- Clegg JS, Uhlinger KR, Jackson SA, Cherr GN, Rifkin E, Friedman CS. 1998. Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 7:21-30
- Collis SJ, Schwaninger JM, Ntambi AJ, Keller TW, Nelson WG, Dillehay LE, DeWeese TL. 2004. Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* 279:49624-49632
- Connan O, Solier L, Gouret G, Germain P. 2006 (soumis à Journal of Environmental Radioactivity) Geographical and seasonal variations of ^{210}Po in various marines organisms from Western English Channel : contribution to the natural radiation dose.
- Cooley JL, Nelson DJ. 1970. Effects of chronic irradiation and temperature on population of the aquatic snail *Physa heterostropha*, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn.
- Cooley JL, Miller Jr FL. 1971. Effects of chronic irradiation on laboratory populations of the aquatic snail *Physa heterostropha*. *Radiat. Res.* 47:716-724
- Cooley JL. 1973. Effects of chronic environmental radiation on a natural population of the aquatic snail *Physa heterostropha*. *Radiat. Res.* 54:130-140
- Cornwall R, Toomey BH, Bard S, Bacon C, Jarman WM, Epel D. 1995. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquat. Toxicol.* 31:277-296
- Costil K, Royer J, Ropert M, Soletchnik P, Mathieu M. 2005. Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Helgoland Marine Research* 59:286-300

- Cruz-Rodriguez LA, Chu FL. 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
- Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 79:129-168
- Czar MJ, Welsh MJ, Pratt WB. 1996. Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur. J. Cell Biol.* 70:322-330
- Dabrio M, Rodriguez AR, Bordin G, Bebianno MJ, De Ley M, Sestakova I, Vasak M, Nordberg M. 2002. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J. Inorg. Biochem.* 88:123-134
- Dalton TP, Palmiter RD, Andrews GK. 1994. Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic Acids Res.* 22:5016-5023
- Dalton TP, Li Q, Bittel D, Liang L, Andrews GK. 1996. Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity. *J. Biol. Chem.* 271:26233-26241
- Damiens G, His E, Gnassia-Barelli M, Quiniou F, Romeo M. 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 138:121-128
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Lambert C, Quere C, Miner P, Choquet G, Paillard C, Samain JF. 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206:3053-3064
- Deslous-Paoli JM. 1980. Contribution à l'étude de la biologie de l'huître *C. gigas* Thunberg dans le bassin et les claires de Marennes-Oléron. *Thèse de doctorat*, Université d'Aix Marseille II. 121 pp.
- Deslous-Paoli JM. 1982. Croissance et qualité de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg en élevage dans le bassin de Marennes-Oléron. *Tethys* 10:365-371
- Deslous-Paoli JM, Héral M. 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat. Living Resour.* 1:239-249
- Dikomey E, Brammer I. 2000. Relationship between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied for different growth states, dose rates and plating conditions in a normal human fibroblast line. *Int. J. Radiat. Biol.* 76:773-781
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin M-C, Babut M, Vasseur P. 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* 39:93-110
- Du XH, Yang CL. 1994. Mechanism of gentamicin nephrotoxicity in rats and protective effective of zinc-induced metallothionein synthesis. *Nephrol. Dial. Transplant* 9 Suppl 4:135-140
- Durand JP, Goudard F, Barbot C, Pieri J, Fowler SW, Cotret O. 2002. Ferritin and hemocyanin: ²¹⁰Po molecular traps in marine fish, oyster and lobster. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 233:199-205
- Eertman RHM, Groenink CLFMG, Sandee B, Hummel H, Smaal AC. 1995. Response of the blue mussel *Mytilus edulis* L. following exposure to PAHs or contaminated sediment. *Mar. Environ. Res.* 39:169-173

- Encomio VG, Chu F-LE. 2005. Seasonal variation of heat shock protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (Dermo). *J. Shellfish Res.* 24:167-175
- Endicott JA, Ling V. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 58:137-171
- Eufemia NA, Epel D. 1998. The multixenobiotic defense mechanism in mussels is induced by substrates and nonsubstrates: implications for a general stress response. *Mar. Environ. Res.* 46:401-405
- Eufemia NA, Epel D. 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquat. Toxicol.* 49:89-100
- European Commission, 2005. ERICA, deliverable D5: Derivation of Predicted No Effect Dose Rate values for ecosystems (and their sub organisational levels) exposed to radioactive substances. Contract number FI6R-CT-2004-508847.
- Fantappie O, Lodovici M, Fabrizio P, Marchettia S, Fabbroni V, Solazzo M, Lasagna N, Pantaleo P, Mazzanti R. 2004 Vitamin E protects DNA from oxidative damage in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Free Radic. Res.* 38:751-759
- Favier A. 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual. Chim.* novembre-décembre:108-115
- Feder ME, Hofmann GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61:243-282
- Fiévet B, Plet D. 2003. Estimating biological half-lives of radionuclides in marine compartments from environmental time-series measurements. *J. Environ. Radioact.* 65:91-107
- Fiévet B, Germain P. 2004. Observatoire Marin Atlantique - Manche Bilan des résultats de mesure par spectrométrie gamma entre 1993 et 2003. *Rep. DEI/SECRE n° 2004-18*, IRSN
- Fiévet B, Voiseux C, Rozet M, Masson M, Bailly du Bois P. 2006. Transfer of radiocarbon liquid releases from the AREVA La Hague spent fuel reprocessing plant in the English Channel. *J. Environ. Radioact.* 90:173-196
- Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, Jacks T. 2002. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 416:560-564
- Fourie AM, Hupp TR, Lane DP, Sang BC, Barbosa MS, Sambrook JF, Gething MJ. 1997. HSP70 binding sites in the tumor suppressor protein p53. *J. Biol. Chem.* 272:19471-19479
- Frydman J. 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 70:603-649
- Fuse T, Yamada K, Asai K, Kato T, Nakanishi M. 1996. Heat shock-mediated cell cycle arrest is accompanied by induction of p21 CKI. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:759-763
- Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY. 1997. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *Biol. Bull.* 272:18033-18037
- Gabbott PA. 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism gametogenesis. *9th Europ. Mar. Biol. Symp.* , pp. 191-211
- Galea-Lauri J, Richardson AJ, Latchman DS, Katz DR. 1996. Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937

- following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. *J. Immunol.* 157:4109-4118
- Gambini D-J, Granier R. 1992. *Manuel pratique de radioprotection*: Broché. 432 pp.
- Garnier C, Barbier P, Gilli R, Lopez C, Peyrot V, Briand C. 1998. Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250: 414-419
- Gaudaire JM. 1999. Etude de la spéciation du ^{60}Co dans les effluents de l'usine de retraitement de combustibles irradiés de La Hague ; devenir après rejet dans les eaux de la Manche. *Thèse de doctorat*, Univ. Paris XI. 152 pp.
- Geffard A, Amiard J-C, Amiard-Triquet C. 2002. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 7:123-137
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard J-C. 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61:209-220
- George GS, Buchanan G. 1990. Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish Physiol. & Biochem.* 8:437-449
- Germain P, Masson M, Baron Y. 1979. Etude de la répartition de radionucléides émetteurs gamma chez des indicateurs biologiques littoraux des côtes de la Manche et de la mer du Nord de février 1976 à février 1978, Commissariat à l'Energie Atomique, Gif-sur-Yvette, France
- Germain P, Baron Y, Masson M, Calmet D. 1988. Répartition de deux traceurs radioactifs (^{106}Ru -Rh, ^{60}Co) chez deux espèces indicatrices (*Fucus serratus*, L., *Mytilus edulis*, L.) le long du littoral français de la Manche. In *Radionuclides: A tool for oceanography.*, ed. J-C Guary, P Guéguéniat, JR Pentreath, pp. 312-320: Elsevier Applied Science Publishers
- Germain P, Masson M, Baron Y. 1990. Contribution aux recherches sur les mouvements des éléments à l'état de traces dans les eaux côtières de la Manche par l'étude de la distribution spatiale de traceurs radioactifs industriels dans les moules et les Fucus, Commissariat à l'Energie Atomique, Gif-sur-Yvette, France
- Germain P, Leclerc G, Simon S. 1995. Transfer of polonium-210 into *Mytilus edulis* (L.) and *Fucus vesiculosus* (L.) from the baie de Seine (Channel coast of France). *Sci. Total Environ.* 164:109-123
- Gething MJ, Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45
- Goidin D, Mamessier A, Staquet M-J, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. 2001. Ribosomal 18S RNA Prevails over Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and [beta]-Actin Genes as Internal Standard for Quantitative Comparison of mRNA Levels in Invasive and Noninvasive Human Melanoma Cell Subpopulations. *Anal. Biochem.* 295:17-21
- Goodhead DT. 1994 Initial events in the cellular effects of ionizing radiation: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65:7-17
- Gouletquer P. 1995. Cycle de reproduction naturelle de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer
- Gourdon I, Guérin MC, Torreilles J. 1998. Cellular and molecular mechanisms of the stress response from marine bivalvia. . *C.R. Soc. Biol.* 192:749-774
- Greenstock CL, Jinot CP, Whitehouse RP, Sargent MD. 1987 DNA radiation damage and its modification by metallothionein. *Free radical research communications* 2 233-239
- GRNC. 1999. Estimation des niveaux d'exposition aux rayonnements ionisants et des risques de leucémies associés de populations du Nord Cotentin. Pp. 374. Groupe Radioécologie Nord Cotentin.

- Hagger JA, Atienzar FA, Jha AN. 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 74:205-217
- Hamdoun A, Cheney D, Cherr G. 2003. Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biol. Bull.* 205:160-169
- Hartl FU. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-580
- Hayes JD, Strange RC. 1995a. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res* 22:193-207
- Hayes JD, Pulford DJ. 1995b. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:445-600
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45:51-88
- Héral M, Deslous-Paoli JM, Prou J, Razet D. 1986. Relations entre la nourriture disponible et la production de mollusques en milieu estuarien : variabilité temporelle de la colonne d'eau. *Haliotis* 16:149-158
- Heude-Berthelin C. 2000. Etude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. *Thèse de doctorat*, Univ. de Caen/Basse-Normandie, Caen. 156 pp.
- Heude-Berthelin C, Fiévet B, Leclerc G, Germain P, Kellner K, Mathieu M. 2003. *In vivo* and *in vitro* approaches to the analysis of glycogen metabolism in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22:715-720
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680
- Hinton TG, Bedford JS, Congdon JC, Whicker FW. 2004. Effects of radiation on the environment: A need to question old paradigms and enhance collaboration among radiation biologists and radiation ecologists. *Radiation Research* 162:332-338
- Hofmann G, Somero G. 1995. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J. Exp. Biol.* 198:1509-1518
- Hofmann GE, Buckley BA, Place SP, Zippay ML. 2002. Molecular chaperones in ectothermic marine animals: Biochemical function and gene expression. *Integr. Comp. Biol.* 42:808-814
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6:279-284
- Hussain SP, Harris CC. 2006. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. *J. Nippon Med. Sch.* 73:54-64
- Huvet A, Herpin A, Degremont L, Labreuche Y, Samain JF, Cunningham C. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343:211-220
- IAEA. 1976. Effects of ionizing radiation on aquatic organisms and ecosystems, International Atomic Energy Agency, Vienna
- IAEA. 1992. Effects of ionizing radiation on plants and animals at levels implied by current radiation protection standards, International Atomic Energy Agency, Vienna
- ICRP. 1977. Recommendation of the International Commission on Radiological Protection, Publication 26, International Commission on Radiological Protection, New York

- ICRP. 1990. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, Publication 60, International Commission on Radiological Protection
- Ifremer. 2005a. Résultats de la Surveillance de la Qualité du Milieu Marin Littoral, Edition 2005. Haute et Basse-Normandie, Ifremer, Laboratoires Environnement et Ressources de Normandie
- Ifremer. 2005b. Résultats de la Surveillance de la Qualité du Milieu Marin Littoral, Edition 2005. Ille et Vilaine et Côtes d'Armor, Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources de Saint-Malo
- Ifremer. 2005c. Résultats de la Surveillance de la Qualité du Milieu Marin Littoral, Edition 2005. Morbihan, Loire-Atlantique, Vendée nord, Ifremer, Laboratoire côtier Morbihan et Pays de Loire
- Ikawa S, Weinberg RA. 1992. An interaction between p21ras and heat shock protein hsp60, a chaperonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89:2012-2016
- Irato P, Santovito G, Cassini A, Piccinni E, Albergoni V. 2003. Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis*, and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44:476-484
- Ishikawa K, Ishii H, Saito T. 2006. DNA Damage-Dependent Cell Cycle Checkpoints and Genomic Stability. *DNA Cell Biol* 25:406-411
- Iszard MB, Liu J, Klaassen CD. 1995. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104:25-33
- Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. 1998. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* 17:6124-6134
- Jaattela M. 1999. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 248:30-43
- Jessen-Eller K, Kreiling JA, Begley GS, Steele ME, Walker CW, Stephens RE, Reinisch CL. 2002. A new invertebrate member of the p53 gene family is developmentally expressed and responds to polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Perspect.* 110:377-385
- Jha AN, Dogra Y, Turner A, Millward GE. 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutat. Res.* 586:47-57
- Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ. 1999. P-Glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* 93:1075-1085
- Kang YJ. 1999. The Antioxidant Function of Metallothionein in the Heart *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:263-273
- Kang CM, Park KP, Cho CK, Seo JS, Park WY, Lee SJ, Lee YS. 2002. Hspa4 (HSP70) is involved in the radioadaptive response: results from mouse splenocytes. *Radiat. Res.* 157:650-655
- Keppler C. 1997. Expression of multixenobiotic resistance proteins and total protein in the gills of the oyster, *Crassostrea virginica*. PhD Thesis, University of Charleston, South Carolina, Charleston, SC.
- Keppler C, Ringwood AH. 2001a. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: Seasonal and pollutant related effects. *Aquat. Toxicol.* 54:195-204
- Keppler CJ, Ringwood AH. 2001b. Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 52:81-96
- Keppler CJ, Hogue J, Smith K, Ringwood AH, Lewitus AJ. 2005. Sublethal effects of the toxic alga *Heterosigma akashiwo* on the southeastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae* 4:275-285

- Kim B-R, Nam H-Y, Kim S-U, Kim S-I, Chang Y-J. 2003. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol. Lett.* 25:1869-1872
- Kirchin MA, Wiseman A, Livingstone DR. 1992. Seasonal and sex variation in the mixed-function oxygenase system of digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 101:81-91
- Kojima Y, Kägi JHR. 1978. Metallothionein. *Trends Biochem. Sci.* 3:90-93
- Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M. 1998 Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radic. Res.* 29:93-101
- Kurelec B, Pivcevic B. 1991. Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 19:291-301
- Kurelec B. 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22:23-43
- Kurelec B, Smital T, Pivcevic B, Eufemia N, Epel D. 2000. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9:307-327
- Lane D. 1992 p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16
- Lango-Reynoso F, Chavez-Villalba J, Cochard JC, Le Pennec M. 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190:183-199
- Lazo JS, Kundo Y, Dellapiazza D, Michalska AE, Choo KHA, Pitt BR. 1995. Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J. Biol. Chem.* 270:5506-5510
- Le Roux F, Gay M, Lambert C, Waechter M, Poubalanne S, Chollet B, Nicolas JL, Berthe F. 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.* 15:251-258
- Leavitt DF, McDowell-Capuzzo J, Smolowitz RM, Miosky DL, Lancaster BA, Reinisch CL. 1990. Incidence of hematopoietic neoplasia in *Mya arenaria*: Monthly monitoring of prevalence and indices of physiological condition. *Mar. Biol.* 105:313-321
- Lebel JM, Giard W, Favrel P, Boucaud-Camou E. 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biol. Cell.* 86:67-72
- Leblanc V, May P. 2002. Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN. *Med. Sci.* 18:577-584
- Legendre P, Legendre L. 1998. *Numerical Ecology* Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company. 853 pp.
- Leung KM, Furness RW. 2001. Metallothionein induction and condition index of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) exposed to cadmium and hydrogen peroxide. *Chemosphere* 44:321-325
- Li GC, Werb Z. 1982 Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 79:3218-3222
- Li ZH, Zhu YJ, Lit XT. 1997. Wild-type p53 gene increases MDR1 gene expression but decreases drug resistance in an MDR cell line KBV200. *Cancer Lett.* 119:177-184
- Liang P, Macrae TH. 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* 110:1431-1440
- Lindquist S, Craig EA. 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22:631-677
- Liossis SN, Ding XZ, Kiang JG, Tsokos GC. 1997. Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 158:5668-5675

- Livingstone DR. 1981. Induction of enzymes as a mechanism for the seasonal control of metabolism of marine invertebrates: glucose 6-phosphate dehydrogenases from the mantle and hepatopancreas of the common mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol. B* 69:147-156
- Livingstone DR. 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42:656
- Livingstone DR. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)* 154:427-430
- Longwell AC, Stiles SS. 1970. The genetic system and breeding potential of the commercial American oyster. *Endeavour* 29:94-99
- Lubet P. 1980. Influences des facteurs externes sur la reproduction des Lamellibranches gâtéropodes. *Océanis* 6:469-489
- Lubet P. 1991. *Reproduction des mollusques*: Lavoisier, Tech. et Doc. 500 pp.
- Luedeking A, Koehler A. 2004. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 69:1-10
- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher B. 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 70:83-93
- Mann R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 59:546-559
- Maret W, Larsen KS, Vallee BL. 1997. Coordination dynamics of biological zinc "clusters" in metallothioneins and in the DNA-binding domain of the transcription factor Gal 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94:2233-2237
- Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Boutet I, Moraga D, Bourdineaud J-P, Boudou A. 2006. Metallothionein gene expression and protein levels in triploid and diploid oysters *Crassostrea gigas* after exposure to cadmium and zinc. *Environ. Toxicol. Chem.* 25:412-418
- Masson M. 2004 Carbone 14 et tritium le long des côtes de l'Atlantique et de la Manche. Convention IRSN-EDF
- Maurer D, Borel M. 1986. Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon: comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis* 15:125-134.
- May P, May E. 1999 Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18:7621-7636
- Minier C, Akcha F, Galgani F. 1993. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp. Biochem. Physiol. B* 106:1029-1036
- Minier C, Moore MN. 1996a. Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142:165-173
- Minier C, Moore MN. 1996b. Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells. *Mar. Environ. Res.* 43:389-392
- Minier C, Borghi V, Moore MN, Porte C. 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 50:167-176
- Minier C, Lelong C, Djemel N, Rodet F, Tutundjian R, Favrel P, Mathieu M, Leboulenger F. 2002. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 54:455-459

- Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K. 1992. Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J. Biol. Chem.* 267:21987-21990
- Morimoto RI. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes Dev.* 12:3788-3796
- Mosser DD, Martin LH. 1992. Induced thermotolerance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line. *J. Cell. Physiol.* 151:561-570
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17:5317-5327
- Moustacchi E. 2000. DNA damage and repair: Consequences on dose-responses. *Mutat. Res.* 464:35-40
- Muttray AF, Cox RL, St-Jean S, van Poppelend P, Reinisch CL, Baldwin SA. 2005. Identification and phylogenetic comparison of p53 in two distinct mussel species (*Mytilus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 140:237-250
- Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe KK, Todo S, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawara A. 2002. Autoinhibitory regulation of p73 by delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the delta Np73 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 22:2575-2585
- NCRP. 1991. Effects of Ionizing Radiation on Aquatic Organisms, National Council on Radiation Protection and Measurements, Bethesda, MD
- Nitta M, Okamura H, Aizawa S, Yamaizumi M. 1997. Heat shock induces transient p53-dependent cell cycle arrest at G1/S. *Oncogene* 15:561-568
- Niyogi S, Biswas S, Sarker S, Datta AG. 2001. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *Sci. Total Environ.* 281:237-246
- Ochoa GH, Clark YM, Matsumoto B, Torres-Ruiz JA, Robles LJ. 2002. Heat shock protein 70 and heat shock protein 90 expression in light- and dark-adapted adult octopus retinas. *J. Neurocytol.* 31:161-174
- Oprandy JJ, Chang PW, Pronovost AD, Cooper KR, Brown RS, Yates VJ. 1981. Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 38:45-51
- Oprandy J, Chang P. 1983. 5-bromodeoxyuridine induction of hematopoietic neoplasia and retrovirus activation in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 42:196-206
- Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Sole M, Porte C, Cajaraville MP. 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.* 58:75-98
- Pain S, Parant M. 2003a. Le mecanisme de defense multixenobiotique (MDMX) chez les bivalves: Multixenobiotic defence mechanism (MXDM) in bivalves. *C. R. Biol.* 326:659-672
- Pain S, Parant M. 2003b. Response of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress. *Chemosphere* 52:1105-1113
- Palmiter RD. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95:8428-8430
- Pannunzio TM, Storey KB. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221:277-292

- Park SH, Lee SJ, Chung HY, Kim TH, Cho CK, Yoo SY, Lee YS. 2000. Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response. *Radiat. Res.* 153:318-326
- Parsell DA, Lindquist S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27:437-496
- Parsell DA, Lindquist S. 1994. Heat shock proteins and stress tolerance. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, ed. RI Morimoto, A Tissieres, C Georgopoulos, pp. 457-494. Cold Spring Harbor N.Y Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Pelham HR. 1982 A regulatory upstream promoter element in the Drosophila hsp 70 heat-shock gene. *Cell* 30:517-528
- Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, Stanbridge EJ. 1996 DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93:15209-15214
- Pentreath RJ. 1998. Radiological protection criteria for the natural environment. *Radiat. Prot. Dosimetry* 75:175-179
- Pfaffl MW. 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45
- Pfaffl MW, Hageleit M. 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol. Lett.* 23:275-282
- 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
- Piano A, Valbonesi P, Fabbri E. 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones* 9:134-142
- Piano A, Franzellitti S, Tinti F, Fabbri E. 2005. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Gene* 361:119-126
- Polla BS, Banzet N, Dall'Ava J, Arrigo AP, Vignola AM. 1998. Les mitochondries, carrefour entre vie et mort cellulaire : rôles des protéines de stress et conséquences sur l'inflammation. *Med. Sci.* 14:18-25
- Power A, Sheehan D. 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 114:99-103
- Pratt WB. 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 268:21455-21458
- Quayle DB. 1969. Pacific oyster culture in British Columbia, Fish. Res. Bd. of Canada, Ottawa
- Quesada AR, Byrnes RW, Krezoski SO, Petering DH. 1996. Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: Zinc-metallothionein and other sites. *Arch. Biochem. Biophys.* 334:241-250
- Ravera O. 1967. The effect of X-rays on the demographic characteristics of *Physa acuta* (Gastropoda: Basommatophora). *Malacologia* 5:95-109
- Redmond T, Sanchez ER, Bresnick EH, Schlesinger MJ, Toft DO, Pratt WB, Welsh MJ. 1989. Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur. J. Cell Biol.* 50:66-75
- Regoli F, Principato G. 1995 Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: Implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31:143-164

- Rigaud O, Moustacchi E. 1996. Radioadaptation for gene mutation and the possible molecular mechanisms of the adaptive response. *Mutat. Res.* 358:127-134
- Rigaud O. 1999. The adaptive response to ionizing radiation: Low dose effects unpredictable from high dose experiments. *Hum. Exp. Toxicol.* 18:443-446
- Riley JP, Skirrow G. 1965. *Chemical oceanography*. London: Academic press. 712 pp.
- Ringwood AH, Connors DE, DiNovo A. 1998. The effects of copper exposures on cellular responses in oysters. *Mar. Environ. Res.* 46:591-595
- Ringwood AH, Hoguet J, Kepler CJ. 2002. Seasonal variation in lysosomal destabilization in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 54:793-797
- Roberts DA, Hofmann GE, Somero GN. 1997. Heat-shock protein expression in *Mytilus californianus*: Acclimatization (seasonal and tidal-height comparisons) and acclimation effects *Biol. Bull.* 192:309-320
- Roesijadi G, Brubacher LL, Unger ME, Anderson RS. 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. C* 118:171-176
- Ropenga A, Chapel A, Vandamme M, Griffiths NM. 2004. Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: A caveat. *Radiat. Res.* 161:597-602
- Rothkamm K, Löbrich M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100:5057-5062
- Ruth AC, Roninson IB. 2000. Effects of the multidrug transporter P-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation. *Cancer Res.* 60:2576-2578
- Samali A, Cotter TG. 1996. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp. Cell Res.* 223:163-170
- Samali A, Orrenius S. 1998. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 3:228-236
- Sanchez ER, Redmond T, Scherrer LC, Bresnick EH, Welsh MJ, Pratt WB. 1988. Evidence that the 90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells. *Mol. Endocrinol.* 2:756-760
- Sanders BM. 1988. The role of the stress proteins response in physiological adaptation of marine molluscs. *Mar. Environ. Res.* 24:207-210
- Sanders BM. 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol* 23:49-75
- Sato M, Bremner I. 1993 Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.* 14:325-337
- Sato M, Sasaki M, Oguro T, Kuroiwa Y, Yoshida T. 1995. Induction of Metallothionein Synthesis by Glutathione depletion after trans- and cis-stilbene oxide administration in rats. *Chem. Biol. Interact.* 98:15-25
- Schlesinger MJ. 1990. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265:12111-12114
- Schultz J, Ponting CP, Hofmann K, Bork P. 1997. SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci.* 6:249-253
- Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Reynolds I, Kagan VE, Tyurin V, Kim YM, Watkins SC, Pitt BR. 1994. Cytoplasmic metallothionein overexpression protects NIH 3T3 cells from tert-butyl hydroperoxide toxicity. *J. Biol. Chem.* 269:15238-15243
- Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Lancaster JRJ. 1995. Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:4452-4456

- Serafim MA, Company RM, Bebianno MJ, Langston WJ. 2002. Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Mar. Environ. Res.* 54:361-365
- Serpentini A, Ghayor C, Hebert V, Galéra P, Pujol JP, Boucaud-Camou E, Lebel JM. 2000. De novo synthesis and identification of collagen transcripts in hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool.* 287:275-284
- Shapiro AB, Ling V. 1994. ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells *J. Biol. Chem.* 269:3745-3754
- Shaw JP, Large AT, Chipman JK, Livingstone DR, Peters LD. 2000. Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay). *Mar. Environ. Res.* 50:405-409
- Shaw JP, Donkin P, Evans SV, Staff FJ, Livingstone DR, Peters LD, Large AT, Chipman JK. 2004. Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 67:325-336
- Sheehan D, Power A. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. C* 123:193-199
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360:1-16
- Sherman MYS, Goldberg AL. 1996. Involvement of molecular chaperones in intracellular protein breakdown. In *Stress-Inducible Cellular Responses*, ed. U Feige, RI Morimoto, I Yahara, B Polla, pp. 57–78. Basel: Birkhäuser Verlag
- Shimizu T, Iwanaga M, Yasunaga A, Urata Y, Goto S, Shibata S, Kondo T. 1998 Protective role of glutathione synthesis on radiation-induced DNA damage in rabbit brain. *Cell. Mol. Neurobiol.* 18:299-310
- Shumway SE, Koehn RK. 1982. Oxygen consumption in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 9:59-68
- Silar P, Butler G, Thiele DJ. 1991. Heat shock transcription factor activates transcription of the yeast metallothionein gene. *Mol. Cell. Biol.* 11:1232-1238
- Silverman JA. 1999. Multidrug-resistance transporters. *Pharm. Biotechnol.* 12:353-386
- Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jaattela M, Schwarz T. 1995. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J. Clin. Invest.* 95:926-933
- Smital T, Kurelec B. 1997. Inhibitors of the multixenobiotic resistance mechanism in natural waters: In vivo demonstration of their effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:2164-2170
- Smital T, Kurelec B. 1998 The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. *Mutat Res.* 399:43-53
- Smital T, Sauerborn R, Pivcevic B, Krca S, Kurelec B. 2000. Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C* 126:175-186
- Smyth MJ, Krasovskis E, Sutton VR, Johnstone RW. 1998. The drug efflux protein P-glycoprotein additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95
- Snyder MJ, Girvetz E, Mulder EP. 2001. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41:22-29
- Solé M, Porte C, Albaiges J. 1995. The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Science of The Total Environment* 159:147-153

- Solé M, Porte C, Biosca X, Mitchelmore CL, Chipman JK, Livingstone DR, Albaiges J. 1996. Effects of the "Aegean Sea" oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comp. Biochem. Physiol. C* 113:257-265
- Soletchnik P, Lambert C, Costil K. 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J. Shellfish Res.* 24:197-207
- Sorger PK. 1991 Heat shock factor and the heat shock response. *Cell Cycle* 65:363-366
- Soussi T, May P. 1996. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J. Mol. Biol.* 260:623-637
- Stammler G, Pommerenke EW, Mattern J, Volm M. 1995 Effects of single doses of irradiation on the expression of resistance-related proteins in murine NIH 3T3 and human lung carcinoma cells. *Carcinogenesis* 16:2051-2055
- Stammler G, Pommerenke EW, Masanek U, Mattern J, Volm M. 1996. Messenger RNA expression of resistance factors in human tumor cell lines after single exposure to radiation. *J. Exp. Ther. Oncol.* 1:39-48
- Stephens RE, Walker CW, Reinisch CL. 2001. Multiple protein differences distinguish clam leukemia cells from normal hemocytes: evidence for the involvement of p53 homologues. *Comp. Biochem. Physiol. C* 129:329-338
- Stiewe T, Pützer BM. 2002. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ.* 9:237-245
- Sturzbecher HW, Chumakov P, Welch WJ, Jenkins JR. 1987 Mutant p53 proteins bind hsp 72/73 cellular heat shock-related proteins in SV40-transformed monkey cells. *Oncogene* 1:201-211
- Swaileh KM. 1996. Seasonal variations in the concentrations of Cu, Cd, Pb and Zn in *Arctica islandica* L. (Mollusca: Bivalvia) from Kiel Bay, Western, Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 32:631-635
- Tanguy A, Moraga D. 2001. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene* 273:123-130
- Tanguy A, Mura C, Moraga D. 2001. Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquat. Toxicol.* 55:35-47
- Tchénié T, Havard M, Martinez LA, Dautry F. 2006 Heat shock-independent induction of multidrug resistance by heat shock factor 1 *Mol. Cell. Biol.* 26:580-591
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 75:291-295
- Thornalley PJ, Vasák M. 1985 Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 827:36-44
- Tirard CT, Grossfeld RM, Levine J, Kennedy-Stoskopf S. 1995. Effect of hyperthermia in vitro on stress protein synthesis and accumulation in oyster hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 5:9-25
- Tomanek L, Somero GN. 1999. Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography. *J. Exp. Biol.* 202:2925-2936
- Tomanek L, Somero GN. 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

- Tomanek L, Somero GN. 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
- Trott KR, Rosemann M. 2000. Molecular mechanisms of radiation carcinogenesis and the linear, non- threshold dose response model of radiation risk estimation. *Radiat. Environ. Biophys.* 39:79-87
- Tubiana M, Aurengo A. 2006. Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionising radiation: The Joint Report of the Académie des Sciences (Paris) and of the Académie Nationale de Médecine. *International Journal of Low Radiation* 2:135-153
- UNSCEAR. 1996. Effects of radiation on the environment, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, United Nations, New York
- Vartanyan LS, Gurevich SM, Kozachenko AI, Nagler LG, Lozovskaya EL, Burlakova EB. 2000 Changes in superoxide production rate and in superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in subcellular organelles in mouse liver under exposure to low doses of low-intensity radiation. *Biochemistry* 65:442-446
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR. 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100:187-190
- Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J. 1999 Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.* 277:R1612-1619
- Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I. 2000 Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46:407-417
- Wacher VJ, Silverman JA, Zhang Y, Benet LZ. 1998. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral adsorption of peptides and peptidomimetics. *J. Pharm. Sci.* 87:1322-1330
- Wang HP, Long XH, Sun ZZ, Rigaud O, Xu QZ, Huang YC, Sui JL, Bai B, Zhou PK. 2006. Identification of differentially transcribed genes in human lymphoblastoid cells irradiated with 0.5 Gy of gamma-ray and the involvement of low dose radiation inducible CHD6 gene in cell proliferation and radiosensitivity. *Int J Radiat Biol* 82:181-190
- Werner I, Hinton DE. 1999. Field validation of hsp70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*): Is downregulation an indicator of stress? *Biomarkers* 4:473-484
- Whicker FW, Bedford JS. 1995. Protection of the natural environment from the ionising radiation. Are specific criteria needed? *International Symposium on Environmental Impact of Radioactive Releases*, pp. 561-567
- Wong ML, Medrano JF. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39:75-85
- Yamaoka K, Sato EF, Utsumi K. 1994. Induction of two species of superoxide dismutase in some organs of rats by low dose X-irradiation. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 26:205-214
- Yamaoka K, Ishii K. 1995. Effects of low-dose gamma-irradiation to the chest regions on the blood pressure of spontaneous hypertensive rats. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 27:161-165
- Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. 2002. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet.* 18:90-95

- Yannarelli GG, Noriega GO, Batlle A, Tomaro ML. 2006. Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta* Epub ahead of print
- You HJ, Oh DH, Choi CY, Lee DG, Hahm KS, Moon AR, Jeong HG. 2002. Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* 1573:33-38
- Zaccaron da Silva A, Zanette J, Fernando Ferreira J, Guzenski J, Marques MRF, Bainy ACD. 2005. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62:376-382
- Zhang Y, Guo X, Lin ET, Benet LZ. 1998. Overlapping substrate specificities of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein for a novel cysteine protease inhibitor. *Drug Metab. Dispos.* 26:360-366

ANNEXE 1

(article sous presse dans Comp. Biochem. Physiol.)

Identification of cDNA encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: transcriptional induction in response to thermal stress in hemocytes primary culture.

FARCY Emilie^{1,2}, SERPENTINI Antoine¹, FIÉVET Bruno² and LEBEL Jean-Marc¹.

¹Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines - UMR 100 Ifremer, Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France.

²Laboratoire de Radioécologie de Cherbourg-Octeville, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire/SECRE, Cherbourg-Octeville, France.

ABSTRACT

Heat shock proteins are a multigene family of proteins whose expression is induced by a variety of stress factors. This work reports the cloning and sequencing of HSP70 and HSP90 cDNA in the gastropod *Haliotis tuberculata*. The deduced amino acid sequences of both HSP70 and HSP90 from *H. tuberculata* shared a high degree of homology with their homologues in other species, including typical eukaryotic HSP70 and HSP90 signature sequences. We examined their transcription expression pattern in abalone hemocytes exposed to thermal stress. Real time PCR analysis indicated that both HSP70 and HSP90 mRNA were expressed in control animals but rapidly increased after heat shock.

KEYWORDS

cDNA cloning, Heat Shock Protein, mRNA induction, thermal stress, *Haliotis tuberculata*

1. Introduction

Heat shock proteins (HSP) are highly conserved proteins whose synthesis is enhanced in response to cellular stress, including temperature elevation, tissue trauma, heavy metal toxicity, radiation and infection, or as a result of normal changes associated with cellular development or differentiation (Lindquist and Craig, 1988; Schlessinger, 1990). As molecular chaperones, HSP protect proteins from denaturation and facilitate either the refolding of damaged proteins or, in the case of irreversible damage, their removal through proteolysis (Parsell and Lindquist, 1993, 1994; Sherman and Goldberg, 1996; Hartl, 1996; Bukau and Horwich, 1998; Morimoto, 1998; Frydman, 2001). Heat shock proteins are generally classified in different families on the basis of their molecular mass. e.g., HSP90, HSP70, HSP20-30, and so on. (Feder and Hofmann, 1999). They have been characterized in a range of metazoans, including many aquatic organisms. In molluscs, their involvement in stress response was reviewed by Sanders (1988, 1993), Gourdon *et al.* (1998) and Snyder *et al.* (2001).

The best studied of the HSP are the 70-kD protein family (HSP70) because of their role in protein chaperoning (Gething and Sambrook, 1992) and in processes of acquired tolerance (Lindquist and Craig, 1988; Clegg *et al.*, 1998). The HSP70 family includes both heat-inducible (Ingolia and Craig, 1982; Craig *et al.*, 1983) and constitutive proteins. Constitutive and inducible isoforms of the HSP70 family were first reported in mammals but also in non-mammalian organisms such as fish (Gornati *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2004) and molluscs (Tirard *et al.*, 1995; Laursen *et al.*, 1997, Clegg *et al.*, 1998; Gourdon *et al.*, 2000; Piano *et al.*, 2002; Boutet *et al.*, 2003a, 2003b; Piano *et al.*, 2004, 2005). In molluscs, both isoforms belonging to the HSP70 family are more or less heat-inducible (Piano *et al.*, 2002). The constitutive HSP are expressed under normal conditions and appear to be essential for protein folding or trafficking and regulated proteolysis in unstressed cells, under normal conditions (Craig *et al.*, 1983; Lindquist and Craig, 1988; Hightower, 1993). These proteins are faintly or not induced by heat stress. On the other hand, inducible forms are expressed at very low level under normal conditions and over-expressed following stress. For example, heat stress induced the over-expression of a 70 kD isoform that was already present, at very low but detectable level, in the gill and mantle of unstressed *Mytilus edulis* (Chapple *et al.*, 1997). Similarly, temperatures up to 40 °C provoked an over-expression of endogenous HSP70

isoforms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* and in the clams *Tapes philippinarum* and *Scapharca inaequalvis*, without the appearance of any new isoform (Piano *et al.*, 2004).

Conversely, HSP90 was much less investigated in molluscs (Tomanek and Somero, 2000; Ochoa *et al.*, 2002; Tomanek and Somero, 2002). The members of the 90-kD HSP family are the least understood of the major HSP in terms of their cellular function. HSP90 is a dimer and binds to several cellular proteins including steroid receptors and protein kinases (Pratt, 1993; Csermely *et al.*, 1998). In addition, HSP90 is also found associated with cytoskeleton proteins such as actin and tubulin (Sanchez *et al.*, 1988; Redmond *et al.*, 1989; Czar *et al.*, 1996; Liang and Macrae, 1997; Garnier *et al.*, 1998). In eukaryotic cells, both 70-kD and 90-kD families exhibited specific homologues in the cytosol and the endoplasmic reticulum (Pelham, 1989; Boorstein *et al.*, 1994; Gupta and Singh, 1994).

The abalone, *Haliotis tuberculata* is a gastropod mollusc with a geographic range in the Eastern Atlantic extending from the English Channel down to the west coast of Africa. Molluscan circulating cells have an important role in defence mechanisms and in tissue repair, and are of major interest in the fields of Ecotoxicology. In this study, we cloned *Haliotis tuberculata* HSP70 and HSP90 cDNA from hemocyte cDNA library. Then we used real time PCR to investigate the expression of HSP70 and HSP90 mRNA in the primary culture of abalone hemocytes exposed *in vitro* to thermal stress.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Adult wild abalones (*H. tuberculata*), 10–12 cm in shell length, were gathered from the northern Cotentin peninsula (France). They were acclimatised to laboratory conditions for at least 1 month before experimentation in continuously aerated natural running seawater (15°C). They were fed with freshly collected local algae (*Palmaria palmata* and *Laminaria digitata*). After an incision in the foot, hemolymph was collected (10-15 ml per animal) using a 20-ml syringe fitted with a 2-gauge hypodermic needle.

2.2 HSP cDNA cloning

2.2.1 Search for a specific fragment using degenerate oligonucleotide

Total RNA was extracted from freshly collected hemocytes using TRI REAGENT (Sigma,-Aldrich) and used for purification of polyadenylated-RNA (Dynabeads® mRNA DIRECT Kit

from Dynal Biotech.) Poly-A mRNA (100 ng) were reverse transcribed using 150 ng oligo(dT) primer, 300 U moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Sigma-Aldrich), RNase free dNTP and 40 u RNAsin (Promega).

The cDNA obtained was used for polymerase chain reaction (PCR) cycling with degenerated primers. These degenerate oligonucleotides were designed on the basis of conserved amino acids of HSP70 and HSP90 from various eukaryotic organisms. The sequences of the forward primers were: *degHSP70_S1*: 5'-CCN GCN TAY TTY AAY GA-3'; *degHSP90_S1*: 5'-AAR ACN AAR CCN ATH TGG AC-3' and the sequences of the reverse primers were: *degHSP70_A1*: 5'-TTR TCR AAR TCY TCN CCN CC-3'; *degHSP90_A1*: 5'-GCV TGN GCV TTC ATD AT-3'. The primers were purchased from EUROBIO. PCR amplifications with these degenerated primers were carried out in a Stratagene Thermocycler. Using primers *degHSP70_S1* and *degHSP70_A1*, the PCR for HSP70 was performed with 50µl of a mixture containing 5µl of 10X buffer (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM and 1.0% Triton[®] X-100, Promega), 4 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Promega) and 1 µM of each primer. For HSP70, this mixture was subjected to 40 cycles of amplification (denaturation for 1 min at 95 °C, annealing for 2 min at 44 °C and extension for 1 minute at 72 °C). The PCR for HSP90 was performed with the same mixture but with degenerated primers *degHSP90_S1* and *degHSP90_A1* and the annealing temperature was set at 46°C.

The PCR products were separated on a TAE 1% agarose gel. A single band of approximately 300 bp was obtained for HSP70 and a single band of approximately 1000 bp for HSP90. These PCR products were purified (Wizard SV gel and PCR clean-up system, Promega), and inserted into the PCR[®] II Topo[®] vector (TOPO TA cloning kit, Invitrogen) which was used to transform XL1-blue MRF' competent cells. The HSP70 and HSP90 cDNA fragment inserts were sequenced (both strands) by Genome Express.

2.2.2 Construction of cDNA library from abalone hemocytes

Total RNA was isolated from *Haliotis tuberculata* hemocytes by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction methods (Chomczynski and Sacchi, 1987). Poly-A RNA was prepared with a mRNA isolation kit (Dynabeads[®] mRNA DIRECT Kit from Dynal Biotech.) according to the manufacturer's instructions. cDNA expression library was constructed by starting with 5µg of poly-A RNA. First-strand synthesis was performed using an oligo(dT) primer with an internal Xho I site and 5-methyl-CTP. cDNA was ligated to

EcoRI adaptors and digested with Xho I. cDNA fragments were cloned directionally into the bacteriophage expression vector λ -ZAPII (Stratagene), packaged into phage particles by using a Gigapack III packaging system (Stratagene) and transfected to the host bacterial strain *Escherichia coli* XL-1MRF' according to the manufacturer's instructions (Stratagene). A total of 3.2×10^6 independent clones were recovered.

2.2.3 Amplification of 5' and 3' ends by PCR screening of the cDNA library

To amplify the 5' and 3' ends of fragments, PCR was performed on phage lysate of the cDNA library with specific primers coupled with primers located on the pBluescript phagemid (Table 1). The PCR was performed with 1 μ l of the phage lysate containing 5 μ l of 10X High Fidelity Buffer (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM and 1.0% Triton[®] X-100, Promega), 2 mM MgSO₄, 0.2 mM of each dNTP, 1 U of Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 0.6 μ M of the phagemid-located primer and 0.2 μ M of the gene-specific primer.

Suggested position for Table 1

The following touchdown amplification cycle was applied using an Eppendorf cyclor: a first run of 5 cycles of amplification (denaturation for 30 sec at 94 °C, annealing for 1 min at 65 °C and extension for 4 minutes at 68°C), was followed by 5 cycles of amplification with annealing temperature set at 60 °C, and 25 cycles of amplification with annealing temperature set at 55 °C. The amplification products obtained from this first PCR run were then used for a second nested PCR using the same amplification program and the following primers (Table 2).

Suggested position for Table 2

The fragments obtained, respectively 800 bp for HSP70 5'-end, 1750 bp for HSP70 3'-end, 1200 bp for HSP90 5'-end and 1750 bp for HSP90 3'-end, were purified on a TAE 1% agarose gel and inserted into the plasmid PCR[®]II Topo[®] (Invitrogen) as described previously. Plasmid inserts were sequenced (both strands) by Genome Express.

2.3 Primary cell cultures

Hemocytes were cultured as previously described (Lebel *et al.*, 1996; Serpentine *et al.*, 2000). Briefly, after collection, the hemolymph was transferred to a sterile tube and simultaneously diluted 1:2 in cooled, sterile, modified Alsever's anti-coagulant solution (Bachère *et al.*, 1988)

(115 mM glucose; 27 mM sodium citrate; 11.5 mM EDTA; 382 mM NaCl). Hemocytes were rapidly plated at $10 \cdot 10^6$ cells per 80cm^2 flask (for mRNA extraction) or at $1.5 \cdot 10^6$ cells in 6-wells plate (for MTT assay) in which three volumes of sterile artificial seawater were added. The cultures were maintained at 17°C in an incubator (CO_2 free). After 90 min of incubation, the cells were covered with Hank's 199 sterile medium, modified by the addition of 250 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM MgSO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , 10mM HEPES, 10mM L-glutamine, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin; 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin G, at final pH 7.4. The cells were then kept at 17°C for 24h before the experiments. Primary culture of hemocytes can be maintained in such conditions up to ten days.

2.4 Induction test: Heat shock performance

First, primary culture of hemocytes from the gastropod *Haliotis tuberculata* were exposed to a 37°C acute thermal stress in order to study the response kinetics of the HSP70 and HSP90 mRNA levels over a one-hour period. In a subsequent experiment, hemocytes primocultures were subjected to a one-hour thermal stress at 25 and 37°C . The control hemocytes were cultured at 17°C .

2.5 MTT assay

The cell viability was evaluated by MTT (3-[4,5-Dimethyl-2-thiazol]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) reduction assay (Mosmann, 1983) adapted to molluscan cell cultures (Domard-Coulon *et al.*, 1994, Lebel *et al.*, 1996, Poncet *et al.*, 2002). The MTT assay is a colorimetric metabolic assay based on mitochondrial dye conversion to assess viability. Briefly, 10% (v/v) of the MTT stock solution (5 mg MTT/ml of PBS) was added to the culture dishes. After 24h of incubation, an equal volume of isopropanol containing 0.04 N HCl was added to each culture in order to dissolve the converted formazan. Absorbance was then measured at a wavelength of 570 nm with a 630 nm reference.

2.6 mRNA quantification

Total RNA was extracted with TRI REAGENT according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). The amount and quality of RNA was quantified by measurement of absorbance at 260 and 280 nm in a UV-spectrophotometer. To discard genomic DNA contamination, the total RNA was digested with DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich) and an aliquot of DNase-treated RNA was subjected to a PCR with actin primers to check for the absence of genomic DNA.

Reverse transcription was carried out using 500 ng of total RNA treated with DNase I, 0.5 µg random primers (Promega), 200 U moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Promega), 12.5 µmoles RNase-free dNTP, 25 U recombinant RNAsin (Promega). The sequences of the forward and reverse primers for HSP70 and HSP90 mRNA quantification were designed using Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) and synthesized by Eurogentec (Table 3). Their efficiency was tested using the standard curve method. A dilution range was performed for each pair of primers to obtain a standard curve by plotting the Cycle threshold as a function of the log of the total amount of reverse-transcribed initial RNA. The primers that show a good level of efficiency ($100 \pm 5\%$) on a range of 4 orders of magnitude of cDNA concentrations were conserved for quantification.

Suggested position for Table 3

Real-time PCR was performed in a MiQ Cyclor (Biorad). All determinations were carried out in duplicate. Controls of no template cDNA were included in the PCR experiments. Amplification was carried out in 96-well plates, in a total volume of 15µl containing 7.5µl of 2X iQ SYBR[®] Green supermix (Biorad), each primer (500 nM final) and cDNA samples obtained from reverse transcription of 5 ng of total RNA. The amplification conditions were 40 cycles of 15 sec at 95 °C and 45 sec at 60 °C, followed by the protocol for the melting curve: 80 cycles of 10 sec with an increase of 0.5°C between each cycle from 55°C to 95°C. The melting curve was used to check if the amplification products had the expected T_m. The mRNA encoding for the cytoskeleton protein actin was used as a reference to normalize HSP mRNA. The expression levels of HSP70 and HSP90 were quantified as the ratios between their mRNA level and actin mRNA. Although actin is often used as a reference, its expression was already shown to be affected under certain experimental conditions such as radiation exposure (Ropenga, 2004). The protocol used from RNA quantification to cDNA synthesis was correctly standardized (resulting in a reproducible amount of cDNA). As a result, in the given experimental conditions and tissue, cycle threshold (Ct) for actin, i.e. the number of cycles at which the fluorescence rises appreciably above the background fluorescence, was supposed to be constant if actin was constantly expressed. We checked that the actin variation coefficient Ct was below 10%. This variation is very low compared to the differential Ct between target mRNA and reference mRNA. Consequently, we can discard the possibility that the observed variation pattern in HSP expression is due to the variation of the

reference actin mRNA itself.

2.7 Data analysis

The sequences were analyzed using Infobiogen online tools TRADUC, BLASTP, CLUSTALW, FORPUB (<http://www.infobiogen.fr/services/analyse/analyse.php>) and the software Bioedit Sequence Alignment Editor v.7.0.4.1 (Hall, 1999).

The statistical analysis was carried out using Statgraphics Centurion XV software (StatPoint, Inc., <http://www.statgraphics.com/>). Values were expressed as means \pm SD. Statistically significant differences between two samples were determined using parametric t-test, provided the homoscedasticity of the variances; $p \leq 0.05$ was accepted as significant and indicated by the symbol * ; ** indicated $p \leq 0.01$.

3. Results

3.1 Abalone HSP cloning

The nucleotide sequences of HSP70 and HSP90 cDNA from the gastropod *Haliotis tuberculata* are presented in figures 1 and 2 respectively. The complete Ht_HSP70 and Ht_HSP90 cDNA sequences are available in the EMBL databank (GenBank accession no. [AM283516](#) and [AM283515](#), respectively). For HSP70, a 1953 bp open reading frame which encoded a predicted 651 amino acid polypeptide with a calculated molecular mass of 71 kD cDNA was obtained (Fig. 1). For HSP90, the cDNA corresponded to a 2145 bp open reading frame which encoded a predicted 736 amino acid polypeptide with a calculated molecular mass of 84 kD. Nucleic acid sequence analysis revealed the presence of typical ATG start and TAA or TGA stop codons, a putative polyadenylation signal starting at nucleotide 2235 or 2202 for HSP70 or HSP90 cDNA respectively (Figure 1 and 2).

Suggested position for Figure 1

Suggested position for Figure 2

The deduced amino acid sequences of both Ht_HSP70 and Ht_HSP90 exhibited the characteristic motifs of their respective families. For HSP70, the signature sequences are IDLGTTYs, TVPAYFND, NEPTAA according to Rensing and Maier (1994), and DLGGG according to Gupta and Golding (1993). The consensus pattern GPTIEEVD at the C-terminal

end is a specific sequence for cytosolic HSP70 (Boorstein *et al.*, 1994; Demand *et al.*, 1998). The sequence RARFEEL is a signature to eukaryotic non-organelle stress-70 protein according to Rensing and Maier (1994). The Ht_HSP90 protein exhibits the sequences NKEIFLRELISNSSDALDKIR, LGTIAKSGT, IGQFGVGFYSAYLVAE, IKLYVRRVFI, GVVDSIDLPLNISRE characteristic of the HSP90 family according to Gupta (1995). It also contains the C-terminal MEEVD sequence, which is a characteristic motif of cytosolic HSP members.

The alignments of the deduced amino acid sequence of *H. tuberculata* HSP70 and HSP90 with metazoan HSP families are shown in figure 3 and figure 4 respectively. A Clustal-Wallis alignment performed on the newly identified HSP proteins indicated that HSP70 and HSP90 proteins from *Haliothis tuberculata* shared high homology with other identified sequences, including higher vertebrates HSP. Indeed, the HSP70 and HSP90 proteins from abalone presented 87% homology with human HSC71 and 80% homology with human HSP90AB1 protein respectively. The highly conserved region in both HSP70 and HSP90 is the amino-terminus (N-term), where an ATP binding domain is located. The carboxy-terminus (C-term) is more divergent as it contains the substrate binding domains that recognize a vast array of proteins.

Suggested position for Figure 3

Suggested position for Figure 4

3.2 mRNA over-expression following thermal stress in hemocyte primary culture

3.2.1 Determination of cell viability (MTT assay)

The MTT viability test (Figure 5) indicated that the cell viability was kept for 2 hours at 37°C and then decreased, confirming that one hour at 37°C is a sub-lethal heat shock. From this result, the viability after one hour at 17°C and 25°C was assumed to be correct.

Suggested position for Figure 5

3.2.2 Messenger RNA expression

In the first step, the kinetics of the HSP70 and HSP90 mRNA level changes was investigated. As shown in figure 6, HSP mRNA levels were significantly elevated in response to an acute thermal stress. A significant increase of mRNA occurs from 30 min onwards ($n=4$, $p<0.05$, t -

test). After one hour at 37°C, induction factors between heat-shocked and control cells maintained at 17°C were about 4-fold for HSP70 and 11-fold for HSP90 (n=4, $p < 0.01$, t-test).

Suggested position for Figure 6

Repeating the experiment with a heat shock at 25°C showed that there is a direct positive correlation between the temperature and the HSP mRNA level (Figure 7). After 1 hour of incubation at 25°C, the HSP90 mRNA level was significantly increased (2 fold) compared to the control.

Suggested position for Figure 7

4. Discussion

In the present work, the deduced amino acid sequences from the HSP cDNA cloned in abalone hemocytes showed high homology with HSP amino acid sequences from other organisms, including higher vertebrates. Additional lines of evidence supporting their belonging to the HSP family include the identification of several eukaryotic HSP70 and HSP90 signature amino acid sequences (Gupta and Golding, 1993; Gupta and Singh, 1994; Rensing and Maier, 1994; Gupta, 1995). The presence of consensus motifs characteristic of cytoplasmic HSP (Boorstein *et al.*, 1994; Demand *et al.*, 1998) suggests that both identified *Haliotis tuberculata* HSP70 and HSP90 have a cytosolic localization.

Studies in molluscs emphasized the existence of inducible or constitutive HSP70 isoforms, especially in oysters: *Crassostrea gigas* (Clegg *et al.*, 1998; Gourdon *et al.*, 2000; Boutet *et al.*, 2003b), *Ostrea edulis* (Piano *et al.*, 2002; Boutet *et al.*, 2003a; Piano *et al.*, 2004, 2005) and *Crassostrea virginica* (Tirard *et al.*, 1995). The heat-induced expression of HSP70 isoforms that are absent in control conditions seems to be an original feature of oysters, not reported in other bivalves. Actually, it is more likely that these heat inducible isoforms are not detectable than completely absent from control. In our study, real time PCR measurements showed that the cloned HSP70 and HSP90 cDNA from *Haliotis tuberculata* are constitutively expressed at baseline temperatures, and are transcriptionally up regulated when the temperature is increased. This heat-inducible property of these genes confirms that they belong to the HSP family. The question as to whether the sequenced cDNA corresponds to a constitutive or an inducible isoform remains open.

The relation between the HSP70 multigene family and heat stress has been well documented in molluscs. [Laursen et al. \(1997\)](#) subjected a molluscan cell line, originally derived from embryos of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, to temperature stress and showed the induction of synthesis of several proteins, including one of approximately 70 kD, belonging to the HSP70 gene family. Hemocytes of the oyster *Crassostrea virginica* exhibit a strong heat-shock response when subjected to acute temperature elevation, characterized by enhanced synthesis of several proteins, especially one with a molecular mass of 70 kD ([Tirard et al., 1995](#)). An increase in HSP70 was observed in heat-shocked oysters *C. gigas*, *C. virginica* and *O. edulis* ([Clegg et al., 1998](#); [Gourdon et al., 2000](#); [Rathinam et al., 2000](#); [Hamdoum et al., 2003](#)) and abalones, *Haliotis rufescens* ([Snyder et al., 2001](#)) and *Haliotis rubra* ([Drew et al., 2001](#)). Our results showed a relationship between the HSP70 mRNA level and the increase of temperature which is in agreement with those studies.

Conversely, the involvement of HSP90 in heat shock response has not been studied well. Although there exist few detailed molecular analyses of the genes or mRNA transcripts encoding these proteins, 90-kD stress protein responses in molluscan cells have not been reported. However in octocoral, the expression of the HSP90 gene is up-regulated by thermal stress. Treatment of the animals for 2 hrs at 4°C below or above the ambient temperature resulted in a 4.5-fold increase of the mRNA compared to steady-state level ([Wiens et al., 2000](#)). This latter result is in accordance with the transcriptional changes of HSP90 expression level observed in this study.

It is known that natural fluctuation in environmental temperatures and several other physical and chemical parameters can result in the induction of some of the cellular stress responses in mussels and marine snails, in which the HSP family plays an important role. ([Hofmann and Somero, 1995](#); [Chapple et al., 1998](#); [Tomanek and Somero, 1999](#); [Minier et al., 2000](#); [Hofmann et al., 2002](#)) But, the HSP level is not only an indicator of thermal exposure. Subtidal mussels (*Mytilus spp.*) expressed higher levels of HSP70 in winter than in summer ([Roberts et al., 1997](#)). Similarly, [Encomio and Chu \(2005\)](#) observed that total amounts of HSP70 did not correlate positively with seasonal variations in temperature in the oyster *C. virginica*. We monitored the seasonal pattern of HSP family members (HSP70, HSC72, HSP90) at the transcriptional level in *Crassostrea gigas*. We found strong seasonal variations mainly characterized by a high HSP mRNA level in winter, between January and March, and a smaller increase in summer between June and August ([Farcy et al., revised manuscript](#)

submitted). Other factors such as neuroendocrine signaling (Lacoste *et al.*, 2001) or salinity (Werner and Hinton, 2000; Drew *et al.*, 2001) may alter expression of HSP70. Indeed, variable salinity could have a significant effect on the heat shock response in oysters. In oysters acclimated to lower salinities, temperature effects were more pronounced than in oysters acclimated to higher salinities (Shumway and Koehn, 1982). Kuhl *et al.* (1992) demonstrated that heat shock, glucose deprivation, or serotonin exposure in the marine gastropod *Aplysia californica* trigger the synthesis of several nervous system proteins including two HSP70s. An increase in HSP70 concentration was also observed in the cadmium-contaminated mussels, *M. edulis*, and limpets, *Collisella pelta* (Sanders, 1988). Conversely, Veldhuizen-Tsoerkan *et al.* (1991) found no variation in HSP70 levels in sea mussels, *M. edulis*, caged in seawater with various concentrations of cadmium. Snyder *et al.* (2001) reported significant increase of HSP90 protein in response to heptachlor exposure in the abalone *Haliotis rufescens*. As reviewed by Kregel (2002), in mammals, it has been noted that HSPs can also play a role in apoptosis. HSP27, HSP70 and HSP90 proteins are predominantly anti-apoptotic, whereas HSP60 is proapoptotic. Moreover, it appears that these HSPs function at multiple points in the apoptotic signalling pathway to elicit this response (Garido *et al.*, 2001).

Although numerous studies have used HSP protein levels as a biomarker, to our knowledge, there are few reports showing relative levels of the biomarker transcript (Laursen *et al.*, 1997; Piano *et al.*, 2004, 2005). As underlined by Kregel (2002) in higher vertebrate models, an important consideration regarding HSP70 regulation involves the apparent discordance between transcription of the message and HSP70 translation. There is evidence suggesting that transcriptional activation of the HSP70 gene may be not paralleled by protein synthesis. For instance, in cell culture experiments, HSP70 mRNA can increase in response to a stress challenge, although there is little HSP70 protein produced (Bruce *et al.*, 1993; Hensold *et al.*, 1990). A follow up of this work on the characterization of abalone HSP family members will be to investigate the response of hemocytes to thermal stress at the protein level.

Acknowledgements

This work was in part supported by a fellowship from the "Région Basse-Normandie" (Lower Normandy Region).

References

- Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* 12, 549-559.
- Boorstein, W.R., Ziegelhoffer T., Craig, E.A., 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evol.* 38, 1-17.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2003a. Organization and nucleotide sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes. *Aquat. Toxicol.* 65, 221-225.
- Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M., Moraga, D., 2003b. 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.
- Bruce J.L., Price B.D., Coleman N., Calderwood S.K., 1993. Oxidant injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins. *Cancer Res.* 53, 12–15.
- Bukau, B., Horwich, A.L., 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351–366.
- Chapple, J.P., Smerdon, G.R., Hawkins, A.J.S., 1997. Stress-70 protein induction in *Mytilus edulis*: tissue-specific responses to elevated temperature reflect relative vulnerability and physiological function. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 217, 225–235.
- Chapple, J.P., Smerdon, G.R., Berry, R.J., Hawkins, A.J.S., 1998. Seasonal changes in stress-70 protein levels reflect thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 229, 53-68.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Clegg, J.S., Uhlinger, K.R., Jackson, S.A., Cherr, G.N., Rifkin, E., Friedman, C.S., 1998. Induced thermotolerance and heat shock protein-70 family in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7, 21–30.
- 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.
- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., Nardai, G., 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 79, 129–168.
- Czar, M. J., Welsh, M. J., Pratt, W. B., 1996. Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur. J. Cell Biol.* 70, 322–330.
- 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.
- Domart-Coulon, I., Doumenc, D., Auzoux-Bordenave, S., Le Fichant, Y., 1994. Identification of media supplements that improve the viability of primarily cell cultures of *Crassostrea gigas* oysters. *Cytotechnology* 16, 109–120.
- Drew, B., Miller, D., Toop, T., Hanna, P., 2001. Identification of expressed Hsp's in blacklip abalone (*Haliotis rubra*, Leach) during heat and salinity stresses. *J. Shellfish Res.*, 20, 695-703.

- Encomio, V.G., Chu, F.L.E., 2005. Seasonal variation of heat shock protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (Dermo). *J. Shellfish Res.* 24, 167-175.
- Farcy, E., Voiseux, C., Lebel, J.M., Fiévet B., (submitted: current status = revised manuscript submitted). Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *Aquat. Toxicol.*
- 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.
- Frydman, J., 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 603–649.
- Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G., 2001. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 433–442.
- Garnier, C., Barbier, P., Gilli, R., Lopez, C., Peyrot, V., Briand, C., 1998. Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 414–419.
- Gething, M.J., Sambrook, J., 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33–45.
- Gornati, R., Papis, E., Rimordi, S., Trova, G., Sbroglia, M., Bernardini, G., 2004. Rearing density influences the expression of the stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene* 341, 111–118.
- Gourdon, I., Guérin, M.C., Torreilles, J., 1998. Cellular and molecular mechanisms of the stress response from marine bivalvia. *C.R. Soc. Biol.* 192, 749–774.
- Gourdon, I., Gricourt, L., Kellner, K., Roch, P., Escoubas, J.M., 2000. Characterization of a cDNA encoding a 72 kDa heat shock cognate protein (Hsc72) from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *DNA Seq.* 11, 265–270.
- Gupta, R.S., Golding, G.C., 1993. Evolution of Hsp70 gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 37, 573–582.
- 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.
- Gupta R.S., 1995. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol. Biol. Evol.* 12, 1063-73.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Hartl, F. U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571–580.
- Hamdoun, A., Cheney, D., Cherr, G., 2003. Phenotypic plasticity of Hsp70 and Hsp70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. 205, 160-169.
- Hensold, J.O., Hunt, C.R., Calderwood, S.K., Housman, D.E., Kingston, R.E., 1990. DNA binding of heat shock factor to the heat shock element is insufficient for transcriptional activation in murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 41, 1600–1608.
- Hightower, L.E., 1993. A brief perspective on the heat-shock response and stress proteins. *Mar. Environ. Res.* 35, 79–83.
- Hofmann, G., Somero, G., 1995. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and Hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J. Exp. Biol.* 198, 1509-1518.

- Hofmann, G.E., Buckley, B.A., Place, S.P., Zippay, M.L., 2002. Molecular chaperones in ectothermic marine animals: Biochemical function and gene expression. *Integr. Comp. Biol.* 42, 808-814.
- 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. U S A* 79, 525–529.
- Kregel, K.C., 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92, 2177-2186.
- Kuhl, D., Kennedy, T.E., Barzilai, A., Kandel, E.R., 1992. Long-term sensitization training in *Aplysia* leads to an increase in the expression of BiP, the major protein chaperon of the ER. *J. Cell Biol.* 119, 1069–1076.
- Lacoste, A., De Cian, M.C., Cuff, A., Poulet, S.A., 2001. Noradrenaline and alpha-adrenergic signalling induce the Hsp70 gene promoter in mollusc immune cells. *J. Cell. Sci.* 114, 3557-3564.
- Laursen, J.R., Liu, H., Wu, X.J., Yoshino, T.P., 1997. Heat-shock response in a molluscan cell line: characterization of the response and cloning of an inducible Hsp70 cDNA. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 226–233.
- Lebel, J.M., Giard, W., Favrel, P., Boucaud-Camou, E., 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biol. Cell.* 86, 67-72.
- Liang, P., Macrae, T.H., 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* 110, 1431–1440.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631–677.
- Minier, C., Borghi, V., Moore, M.N., Porte, C., 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 50, 167-176.
- Morimoto, R.I., 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes Dev.* 12, 3788–3796.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Ochoa, G.H., Clark, Y.M., Matsumoto, B., Torres-Ruiz, J.A., Robles, L.J., 2002. Heat shock protein 70 and heat shock protein 90 expression in light- and dark-adapted adult octopus retinas. *J. Neurocytol.* 31, 161-174.
- Parsell, D.A., Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437–496.
- Parsell, D.A., Lindquist, S., 1994. Heat shock proteins and stress tolerance. In : Morimoto, R. I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (Eds.), *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, vol. 26, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor N.Y, pp. 457–494.
- Pelham, H.R.B., 1989. Control of protein exit from endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 1-23.
- 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.
- Piano, A., Valbonesi, P., Fabbri, E., 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones* 9, 134.

- Piano, A., Franzellitti, S., Tinti, F., Fabbri, E., 2005. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Gene* 361 119-126.
- Poncet, J.M., Serpentine, A., Boucaud-Camou, E., Lebel, J.M., 2002. Cryopreservation of mantle dissociated cells from *Haliotis tuberculata* (Gastropoda) and post-thawed primary cells cultures. *Cryobiol.* 44, 38-45.
- Pratt, W.B., 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 21455-21458.
- Rathinam, A.V., Chen, T.T., Grossfeld, R.M., 2000. Cloning and sequence analysis of a cDNA for an inducible 70kDa heat shock protein (Hsp70) of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *DNA Seq.* 11, 261-264.
- Redmond, T., Sanchez, E.R., Bresnick, E.H., Schlesinger, M.J., Toft, D.O., Pratt, W.B., Welsh, M.J., 1989. Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur. J. Cell Biol.* 50, 66-75.
- Rensing, S.A., Maier, U.G., 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *J. Mol. Evol.* 39, 80-86.
- Roberts, D.A., Hofmann, G.E., Somero, G.N., 1997. Heat-shock protein expression in *Mytilus californianus*: Acclimatization (seasonal and tidal-height comparisons) and acclimation effects. *Biol. Bull.* 192, 309-320.
- Sanchez, E.R., Redmond, T., Scherrer, L.C., Bresnick, E.H., Welsh, M.J., Pratt, W.B., 1988. Evidence that the 90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells. *Mol. Endocrinol.* 2, 756-760.
- Sanders, B.M., 1988. The role of the stress proteins response in physiological adaptation of marine molluscs. *Mar. Environ. Res.* 24, 207-210.
- Sanders, B.M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 49-75.
- Schlesinger, M.J., 1990. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 12111-12114.
- Serpentine, A., Ghayor, C., Hebert, V., Galéra, P., Pujol, J.P., Boucaud-Camou, E., Lebel, J.M., 2000. *De novo* synthesis and identification of collagen transcripts in hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool.* 287, 275-284.
- Sherman, M.Y.S., Goldberg, A.L., 1996. Involvement of molecular chaperones in intracellular protein breakdown. In: Feige, U., Morimoto, R. I., Yahara, I., Polla, B. (Eds.), *Stress-Inducible Cellular Responses*, Basel: Birkhäuser Verlag, pp. 57-78.
- Shumway, S.E., Koehn, R.K., 1982. Oxygen consumption in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 9, 59-68.
- 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.
- Tirard, C.T., Grossfeld, R.M., Levine, J., Kennedy-Stoskopf, S., 1995. Effect of hyperthermia in vitro on stress protein synthesis and accumulation in oyster hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 9-25.
- Tomanek, L., Somero, G.N., 1999. Evolutionary and acclimation induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography. *J. Exp. Biol.* 202, 2925-2936.
- 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.

- 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.
- Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A., De Bont, A.M.T., Smaal, A.C., Zandee, D.I., 1991. A field study on stress indices in the sea mussel, *Mytilus edulis*: application of the stress approach in biomonitoring. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 497-504.
- Werner, I., Hinton, D.E., 2000. Spatial profiles of Hsp70 proteins in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*) in northern San Francisco Bay may be linked to natural rather than anthropogenic stressors. *Mar. Environ. Res.* 50, 3379-3384.
- Wiens, M., Ammar, M., Nawar, A., Koziol C., Hassanein, H., Eisinger, M., Müller, I., Müller, W. 2000. Induction of heat-shock (stress) protein gene expression by selected natural and anthropogenic disturbances in the octocoral *Dendronephthya klunzingeri*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 245, 265-276.
- Yamashita, M., Hirayoshi, K., Nagata, K., 2004. Characterization of multiple members of the Hsp70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of stress protein Hsp70 in vertebrates. *Gene* 336, 207-218.

Captions to figures

Table 1: Primers used for Polymerase Chain Reaction.

Table 2: Primers used for nested PCR.

Table 3: Sequences of the primers used for real time PCR and accession number.

Figure 1: Nucleotide sequence of HSP70 cDNA from *Haliotis tuberculata* and predicted amino acid sequence (GenBank accession no. **AM283516**). Start and stop codons are in bold. The characteristic motifs of the HSP70 family are underlined. 3' and 5'UTR are in lower case. The characteristic motifs of cytosolic protein are boxed in grey. The nucleotide sequence of forward and reverse primers used to quantify Ht_HSP70 mRNA is underlined in dotted line.

Figure 2: Nucleotide sequence of HSP90 cDNA from *Haliotis tuberculata* and predicted amino acid sequence (GenBank accession no. **AM283515**). Start and stop codons are in bold. The characteristic motifs of the HSP90 family are underlined. 3' and 5'UTR are in lower case. The characteristic motifs of cytosolic protein are boxed in grey. The nucleotide sequence of forward and reverse primers used to quantify Ht_HSP90 mRNA is underlined in dotted line.

Figure 3: Sequence alignments (ClustalW v 1.83). *Haliotis tuberculata* HSP71 protein (**CAK95236**) shares 87% homology with human (**P11142**) and mouse HSC71 protein (**P63017**), 88% with *Crassostrea gigas* HSC71 (**BAD15287**), 88% with *Mytilus galloprovincialis* HSC71 (**CAH0410**) and 96% with *Haliotis discus hannai* HSP70 (**ABC54952**). The characteristic motifs of the HSP70 family are underlined. The characteristic motifs of cytosolic protein are boxed in grey.

Figure 4: Sequence alignments (ClustalW v 1.83). *Haliotis tuberculata* HSP90 protein (**CAK95235**) shares 80% homology with human HSP90-beta (**AAH09206**), 78% with chicken HSP90-beta (**Q04619**) and 82% with *Chlamys farreri* HSP90 (**AAR11781**). The characteristic motifs of the HSP90 family are underlined. The characteristic motifs of cytosolic protein are boxed in grey.

Figure 5: MTT viability test on primary cultures of hemocytes maintained at 37°C for a period of 24 hours (n=3, mean ± SD). ** indicates a significant difference compared to control at time zero (p<0.01, t-test). ***: p<0.001.

Figure 6: HSP70 (left) and HSP90 (right) mRNA induction kinetics during a one-hour heat shock at 37°C (n=4; mean ± SD). Full line: heat-shocked hemocytes, dotted line: control hemocytes maintained at 17°C. * indicates a significant difference between heat-shocked hemocytes and control hemocytes (p<0.05, t-test). **: p<0.01.

Figure 7: HSP70 (left) and HSP90 (right) mRNA induction after one hour at 17°C (control temperature), 25°C and 37°C (n=4; mean ± SD). * indicates a significant difference between heat-shocked hemocytes and control hemocytes (p<0.05, t-test).

Table 1: Primers used for Polymerase Chain Reaction.

	Hsp70	Hsp90
Gene-specific Forward primer	QS1_HSP70 5' CGGTGAGCGCAATGTTTC 3'	QS1_HSP90 5' CCAGGAAGAATATGCCGAGT 3'
Gene-specific Reverse primer	QA2_HSP70 5' CCGCCAAGTGGGTGTCT 3'	QA2_HSP90 5' CACGGAACTCCAACGACC 3'
Phagemid-located Forward primer	Zap 5N 5' CCGCTCTAGAACTAGTGGAT 3'	Zap 5N 5' CCGCTCTAGAACTAGTGGAT 3'
Phagemid-located Reverse primer	T7 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'	T7 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

Table 2: Primers used for nested PCR.

	Hsp70	Hsp90
Gene-specific Forward nested primer	QS2_HSP70 5' CATCTTTGATCTCGGTGGTG 3'	HSP90SEQ1S 5' ACTGTGAGGACCTCATTC 3'
Gene-specific Reverse nested primer	QA1_HSP70 5' GCCAAGTGGGTGTCTCCA 3'	QA2_HSP90 5' CACGGAACTCCAAGTACC 3'
Phagemid-located Forward nested primer	OPH 5' GCTCTAGAAGTGGATCCC 3'	OPH 5' GCTCTAGAAGTGGATCCC 3'
Phagemid-located Reverse nested primer	ZAP3 5' ACTCACTATAGGGCGAATTG 3'	ZAP3 5' ACTCACTATAGGGCGAATTG 3'

Table 3: Sequences of the primers used for real time PCR and accession number.

Gene	GenBank accession no.	Forward Primer	Reverse Primer
*actin	<u>AM236595</u>	5' GGGTGTGATGGTCGGTAT 3'	5' ACCGTGTTGATGGGGTA 3'
Ht_HSP70	<u>AM283516</u>	5' CGGTGAGCGCAATGTTC 3'	5' CCAAGTGGGTGTCTCCA 3'
Ht_HSP90	<u>AM283515</u>	5' CCAGGAAGAATATGCCGAGT 3'	5' CACGGAACTCCAAGTACC 3'

* used to normalize mRNA

Figure 1: Nucleotide sequence of HSP70 cDNA from *Haliotis tuberculata* and predicted amino acid sequence (GenBank accession no. **AM283516**). Start and stop codons are in bold. The characteristic motifs of the HSP70 family are underlined. 3' and 5'UTR are in lower case. The characteristic motifs of cytosolic protein are boxed in grey. The nucleotide sequence of forward and reverse primers used to quantify Ht_HSP70 mRNA is underlined in dotted line.

```

ggcacgaggacgag -73
ttggaagcggagggcagagaagacattcgcgcttctttaaactctcacagacaaacttactcaaggacc -1
M A K A P A I G I D L G T T Y S C V 18
ATG GCC AAG GCA CCA GCT ATT GGT ATA GAT CTG GGG ACC ACC TAC TCA TGT GTA 54
G V F Q H G K V E I I A N D Q G N R 36
GGC GTG TTT CAA CAC GGA AAG GTA GAA ATC ATT GCC AAT GAC CAA GGT AAC AGA 108
T T P S Y V A F T D T E R L I G D A 54
ACA ACA CCT AGC TAT GTT GCC TTC ACT GAC ACA GAA CGT CTC ATT GGT GAT GCT 162
A K N Q V A M N P E N T I F D A K R 72
GCA AAG AAC CAG GTT GCC ATG AAC CCT GAG AAC ACC ATC TTC GAT GCC AAA CGT 216
L I G R R F E E A N V Q S D M K H W 90
CTA ATT GGT AGA AGA TTT GAA GAG GCA AAT GTT CAA TCA GAC ATG AAG CAC TGG 270
P F N V L S D G G K P K I Q V N Y K 108
CCA TTC AAT GTG TTG AGT GAT GGA GGC AAA CCC AAG ATC CAA GTA AAT TAC AAA 324
D E P K T F Y P E E I S S M V L T K 126
GAT GAA CCA AAA ACT TTC TAC CCT GAA GAG ATT TCA TCC ATG GTG CTA ACA AAG 378
M K E T A E Q Y L G K T I T D A V V 144
ATG AAG GAA ACT GCA GAA CAG TAT CTG GGA AAG ACT ATA ACA GAT GCT GTT GTA 432
T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G 162
ACA GTC CCA GCT TAC TTC AAC GAC TCT CAA CGG CAG GCC ACT AAA GAT GCA GGG 486
T I S G L N V L R I I N E P T A A A 180
ACA ATC TCT GGC CTC AAT GTT TTA CGT ATC ATC AAT GAG CCA ACT GCT GCA GCT 540
I A Y G L D K K V G G E R N V L I F 198
ATT GCA TAT GGT CTT GAC AAA AAG GTT GGC GGT GAG CGC AAT GTT CTC ATC TTT 594
D L G G G T F D V S I L T I E D G I 216
GAT CTT GGT GGT GGC ACA TTT GAT GTG TCT ATC CTG ACA ATC GAA GAT GGT ATT 648
F E V K S T A G D T H L G G E D F D 234
TTT GAG GTG AAA TCT ACA GCT GGA GAC ACC CAC TTG GGT GGT GAG GAC TTT GAC 702
N R M V N H F I Q E F K R K H K K D 252
AAT CGT ATG GTG AAC CAC TTT ATC CAG GAA TTC AAA AGA AAA CAC AAG AAG GAT 756
I S D N K R A V R R L R T A C E R A 270
ATC TCT GAT AAC AAG AGG GCT GTG AGA CGT CTG AGA ACT GCC TGC GAG AGA GCA 810
K R T L S S S T Q A S I E I D S L F 288
AAG AGG ACA CTT TCC TCC AGC ACC CAG GCC AGC ATC GAG ATC GAC TCC TTG TTT 864
E G V D Y Y T S I T R A R F E E L N 306
GAG GGA GTA GAT TAC TAC ACC AGC ATT ACT AGA GCC AGA TTT GAG GAG CTC AAT 918
A D L F R G T L E P V E K S L R D A 324
GCA GAT CTT TTC CGT GGC ACA CTT GAG CCA GTT GAG AAA TCT TTG CGT GAT GCC 972
K Q D K V S I H D I V L V G G S T R 342
AAA CAA GAC AAG GTC TCC ATC CAT GAC ATA GTG CTG GTT GGA GGA TCT ACA CGT 1026

```

I	P	K	I	Q	K	L	L	Q	D	F	F	N	G	K	E	L	C	360
ATC	CCC	AAG	ATC	CAG	AAA	CTC	CTC	CAG	GAC	TTC	TTC	AAC	GGC	AAG	GAG	CTA	TGC	1080
K	S	I	N	P	D	E	A	V	A	Y	G	A	A	V	Q	A	A	378
AAG	AGC	ATC	AAC	CCT	GAT	GAG	GCT	GTT	GCT	TAT	GGT	GCG	GCT	GTC	CAG	GCT	GCC	1134
I	L	H	G	D	K	S	E	E	V	Q	D	L	L	L	L	D	V	396
ATC	CTC	CAT	GGT	GAC	AAG	TCC	GAG	GAA	GTC	CAG	GAC	CTG	CTA	CTG	TTG	GAT	GTC	1188
T	P	L	S	L	G	I	E	T	A	G	G	V	M	T	V	L	I	414
ACT	CCA	CTG	TCA	CTT	GGT	ATT	GAG	ACA	GCT	GGC	GGT	GTG	ATG	ACT	GTC	CTC	ATC	1242
K	R	N	T	T	I	P	T	K	Q	T	Q	T	F	T	T	Y	S	432
AAG	AGG	AAC	ACC	ACC	ATC	CCC	ACC	AAA	CAG	ACC	CAG	ACC	TTC	ACA	ACA	TAC	TCT	1296
D	N	Q	P	G	V	L	I	Q	V	F	E	G	E	R	A	M	T	450
GAC	AAT	CAA	CCC	GGT	GTG	CTG	ATT	CAG	GTA	TTT	GAG	GGT	GAG	AGA	GCC	ATG	ACA	1350
K	D	N	N	I	L	G	K	F	E	L	T	G	I	P	P	A	P	468
AAG	GAC	AAC	AAC	ATC	TTG	GGC	AAG	TTT	GAG	CTG	ACT	GGA	ATT	CCC	CCA	GCA	CCG	1404
R	G	V	P	Q	I	E	V	T	F	D	I	D	A	N	G	I	L	486
AGA	GGT	GTA	CCA	CAG	ATT	GAA	GTA	ACC	TTT	GAC	ATT	GAT	GCC	AAT	GGT	ATC	CTC	1458
N	V	S	A	V	D	K	S	T	M	K	E	N	K	I	T	I	T	504
AAT	GTA	TCT	GCT	GTG	GAC	AAG	AGC	ACC	ATG	AAA	GAG	AAC	AAG	ATC	ACC	ATC	ACA	1512
N	D	K	G	R	L	S	K	E	E	I	E	R	M	V	N	E	A	522
AAT	GAC	AAA	GGT	CGT	TTG	TCG	AAG	GAA	GAG	ATT	GAG	CGT	ATG	GTT	AAT	GAG	GCC	1566
E	N	Y	K	A	E	D	E	K	Q	K	D	R	I	Q	A	K	N	540
GAG	AAC	TAC	AAG	GCT	GAA	GAT	GAG	AAG	CAG	AAA	GAT	CGT	ATC	CAG	GCC	AAG	AAT	1620
G	L	E	S	Y	A	F	N	M	K	S	T	V	E	D	E	K	L	558
GGA	CTG	GAA	AGC	TAT	GCC	TTC	AAC	ATG	AAG	TCA	ACA	GTT	GAG	GAT	GAG	AAA	TTG	1674
K	D	K	I	S	E	D	D	K	K	T	I	T	D	K	C	N	D	576
AAA	GAC	AAG	ATC	AGT	GAA	GAT	GAC	AAG	AAG	ACC	ATC	ACT	GAC	AAA	TGC	AAC	GAT	1728
V	I	S	W	L	D	S	N	Q	L	A	E	K	D	E	F	E	H	594
GTC	ATC	AGC	TGG	TTA	GAT	TCT	AAC	CAA	TTG	GCC	GAG	AAG	GAT	GAG	TTT	GAA	CAC	1782
K	Q	K	E	L	E	G	V	C	N	P	I	I	T	K	L	Y	Q	612
AAG	CAG	AAG	GAG	CTG	GAG	GGT	GTG	TGT	AAC	CCA	ATC	ATC	ACC	AAG	CTG	TAC	CAG	1836
A	A	G	G	A	G	G	M	P	N	F	N	P	G	A	A	G	A	630
GCA	GCT	GGA	GGT	GCT	GGC	GGT	ATG	CCC	AAC	TTC	AAC	CCC	GGT	GCT	GCT	GGT	GCC	1890
G	G	A	G	G	A	P	T	G	G	S	S	G	G	P	T	I	E	648
GGC	GGT	GCA	GGA	GGA	GCT	CCA	ACA	GGC	GGT	AGC	TCC	GGA	GGC	CCC	ACC	ATC	GAG	1944
E	V	D	*															652
GAG	GTT	GAT	TAA															2011
																		2083
																		2155
																		2227
																		2273

Figure 2: Nucleotide sequence of HSP90 cDNA from *Haliotis tuberculata* and predicted amino acid sequence (GenBank accession no. **AM283515**). Start and stop codons are in bold. The characteristic motifs of the HSP90 family are underlined. 3' and 5'UTR are in lower case. The characteristic motifs of cytosolic protein boxed are in grey. The nucleotide sequence of forward and reverse primers used to quantify Ht_HSP90 mRNA is underlined in dotted line.

```

ggcacgagcgaca -73
ggtgaacagcaagtcgaagaacgtctaagaactttgtgatttttctctatcataccactgaatttagttaag -1
M P E P Q E A Q M D E G E V E T F A 18
ATG CCA GAA CCT CAG GAA GCC CAG ATG GAT GAG GGC GAG GTT GAA ACC TTT GCC 54
F Q A E I A Q L M S L I I N T F Y S 36
TTC CAG GCA GAA ATT GCC CAA CTG ATG AGC TTG ATC ATC AAC ACT TTC TAC TCT 108
N K E I F L R E L I S N S S D A L D 54
AAC AAG GAA ATT TTC TTG AGA GAA CTG ATT TCC AAT TCC TCT GAT GCT TTG GAC 162
K I R Y E S L T D P S K L D G N K D 72
AAG ATT CGT TAC GAA TCT CTC ACT GAT CCA TCC AAA CTG GAT GGC AAC AAA GAT 216
M Q I R I V P D K E N K T L V I E D 90
ATG CAG ATC CGA ATT GTT CCT GAC AAG GAG AAC AAG ACC CTC GTT ATT GAG GAT 270
S G I G M T K A D L V N N L G T I A 108
AGC GGT ATT GGT ATG ACC AAA GCT GAT CTT GTC AAC AAC CTT GGT ACT ATT GCC 324
K S G T K A F M E A L Q A G A D I S 126
AAG TCT GGA ACA AAA GCT TTC ATG GAG GCC CTG CAG GCA GGT GCT GAT ATC TCT 378
M I G Q F G V G F Y S A Y L V A E R 144
ATG ATT GGA CAG TTT GGT GTG GGT TTC TAC TCC GCC TAC CTT GTT GCA GAG AGG 432
V V V E S K H N D D E Q Y I W E S S 162
GTG GTT GTT GAG TCA AAA CAC AAT GAT GAT GAA CAG TAC ATC TGG GAG TCG TCA 486
A G G S F T I K T S N D P T L G R G 180
GCC GGA GGG TCT TTC ACG ATC AAA ACT TCA AAT GAT CCC ACC CTC GGC CGT GGA 540
T R I T L Y M K E D Q V E Y L E E R 198
ACT CGA ATC ACC CTT TAC ATG AAG GAA GAC CAA GTC GAA TAT CTG GAG GAA CGC 594
R V K E I V K K H S Q F I G Y P I K 216
CGT GTC AAG GAG ATC GTG AAG AAG CAC TCC CAG TTC ATT GGC TAC CCA ATC AAG 648
L M V E K E R D K E V S D D E E E E 234
CTG ATG GTT GAG AAA GAG AGG GAC AAG GAG GTG TCT GAT GAT GAA GAA GAG GAG 702
K K E D E E K K D D E E E S E D K P 252
AAG AAG GAA GAT GAA GAG AAG AAA GAT GAT GAG GAA GAG AGT GAG GAT AAA CCC 756
K V E D L D E D E D E D K S K D K K 270
AAG GTA GAG GAT CTT GAT GAG GAT GAG GAT GAA GAC AAA AGC AAA GAC AAG AAA 810
K K K K I K E K Y T E D E E L N K T 288
AAG AAG AAG AAG ATC AAG GAA AAA TAC ACA GAA GAT GAA GAG CTG AAC AAG ACC 864
K P L W T R N A D D I T Q E E Y A E 306
AAA CCA CTG TGG ACC AGA AAT GCA GAT GAT ATC ACC CAG GAA GAA TAT GCC GAG 918
F Y K S L T N D W E D H L A V K H F 324
TTC TAC AAG TCC TTG ACC AAT GAT TGG GAG GAC CAT CTT GCT GTC AAG CAC TTC 972
S V E G Q L E F R A L L F L P K R A 342
TCA GTG GAA GGT CAG TTG GAG TTC CGT GCA TTG CTG TTC CTG CCC AAG AGA GCT 1026

```


P F D M F E N K K K K N N I K L Y V 360
CCA TTT GAC ATG TTT GAG AAC AAG AAG AAG AAG AAT AAC ATC AAG CTG TAT GTG 1080

R R V F I M D N C E D L I P E Y L N 378
AGA CGT GTG TTT ATC ATG GAC AAC TGT GAG GAC CTC ATT CCG GAG TAC TTG AAC 1134

F V R G V V D S E D L P L N I S R E 396
TTT GTG CGT GGT GTT GTA GAC TCT GAG GAT CTT CCC CTC AAT ATA TCC AGA GAG 1188

M L Q Q S K I L K V I R K N L V K K 414
ATG TTG CAA CAG AGC AAA ATT CTG AAG GTT ATC CGT AAG AAT CTG GTG AAG AAA 1242

C M E L F D D I M E D K D N F K K F 432
TGC ATG GAA CTG TTT GAT GAC ATC ATG GAA GAC AAA GAC AAC TTC AAG AAA TTC 1296

Y E Q F S K N L K L G I H E D S T N 450
TAC GAA CAG TTC AGC AAG AAC CTC AAG CTT GGT ATC CAT GAA GAC TCC ACC AAC 1350

R R K L S D L L R Y Y T S Q S G D E 468
AGA AGG AAG CTG TCT GAC CTG TTG AGA TAC TAC ACT TCC CAG TCA GGA GAT GAG 1404

V T S L K E Y V S R M K E N Q K S I 486
GTG ACC TCT CTG AAG GAA TAT GTG TCT CGC ATG AAG GAA AAC CAG AAG AGC ATA 1458

Y Y I T G E S K D S V Q N S A F V E 504
TAC TAC ATC ACA GGT GAA AGC AAG GAT TCT GTC CAG AAC TCT GCT TTT GTT GAG 1512

R V K K R G F E V I Y M T D P I D E 522
AGA GTG AAG AAG AGG GGA TTT GAG GTG ATC TAC ATG ACA GAC CCT ATC GAT GAG 1566

Y C V Q Q L K E Y D G K T L V C V T 540
TAC TGT GTT CAG CAG CTG AAA GAG TAT GAT GGC AAG ACT TTA GTG TGC GTC ACC 1620

K E G L E L P E D E E E K K K L E E 558
AAG GAA GGT CTG GAA CTG CCA GAG GAT GAG GAA GAG AAG AAG AAA CTG GAG GAG 1674

A K A Q F E G L C K V M K E I L D K 576
GCC AAG GCT CAG TTT GAA GGA CTG TGC AAG GTC ATG AAA GAG ATC CTT GAC AAG 1728

K V E K V V V S N R L V T S P C C I 594
AAA GTG GAA AAG GTT GTG GTT TCC AAT CGC CTG GTT ACC TCC CCT TGC TGC ATT 1782

V T S Q Y G W S A N M E R I M K A Q 612
GTC ACA AGT CAG TAT GGC TGG TCG GCC AAC ATG GAG AGA ATC ATG AAG GCC CAG 1836

A L R D T S T M G Y M A A K K H L E 630
GCT CTG CGA GAT ACC AGC ACT ATG GGC TAC ATG GCA GCT AAG AAA CAC TTG GAG 1890

I N P D H P I V K T L K E K A D A D 648
ATC AAT CCA GAC CAT CCC ATT GTG AAG ACC CTG AAG GAG AAG GCT GAT GCT GAC 1944

K N D K A V K D L C M L L F E T S L 666
AAG AAT GAC AAG GCA GTG AAA GAT CTG TGC ATG CTG CTG TTT GAA ACC TCC CTC 1998

L A S G F S L E D P T S H A N R I H 684
CTT GCC TCT GGC TTC TCC CTG GAA GAC CCA ACT TCA CAT GCC AAC AGG ATA CAC 2052

R M I K L G L G I D E D D I P T E A 702
AGG ATG ATC AAA CTG GGT CTA GGA ATT GAT GAA GAT GAT ATC CCA ACA GAA GCT 2106

T A E S A T D E M P P L E G D E D D 720
ACA GCG GAA TCT GCC ACA GAT GAG ATG CCA CCA CTG GAA GGT GAT GAA GAC GAT 2160

A S R M E E V D * 729
GCA TCA AGG ATG GAG GAA GTT GAC **TGA** gcaactgtttgtggaatataaaaagactctttact 2222

gtcattgtgaaacgtatctccgcatgtgtacatgaaatggtgtacttttgtggaagtgtattttattgtgat 2294

cacaaaacaactttcatccatggttctattccaagaaattgctgaaagagaattattgcagatttctttacg 2366
ttcatttcaccaccttagttgtaatttctgaaaggtacaatttaaagccatttgtatgtttttgaaggcaa 2438
ctatgtacatcattatatgtaccattaacactttcgttgaaaaataaaatcatttttcataaaaaaaaaaaa 2510
aaaa 2514


```

          370      380      390      400      410      420
HSP7C_human      ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
HSP7C_mouse      .....N.....S.....N.....
HSC71_Crassostrea_gig  ....N.....S.....N...
HSC71_Mytilus_gal  ....N.....S.....A..
HSP70_Haliotis_dis  .....
HSP71_Haliotis_tub  NGKELCKSINPDEAVAYGA AVQAAILHGDKSEEVQDLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLI

```

```

          430      440      450      460      470      480
HSP7C_human      ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
HSP7C_mouse      .....Y.....L.....
HSC71_Crassostrea_gig  .....Y.....L.....
HSC71_Mytilus_gal  .....Y.....L.....
HSP70_Haliotis_dis  .....Y.....
HSP71_Haliotis_tub  KRNTTIPTKQTQTFTTYS DNQPGVLIQVFEGERAMTKDNNILGKFELTGIPPAPRGVPOI

```

```

          490      500      510      520      530      540
HSP7C_human      .....G.....D.....Q...K.....R.
HSP7C_mouse      .....G.....D.....Q...K.....R.
HSC71_Crassostrea_gig  .....G.....D..D.....K..Q.....RE
HSC71_Mytilus_gal  .....G.....D.....K.....
HSP70_Haliotis_dis  .....
HSP71_Haliotis_tub  EVTFDIDANGILNVSAVDKSTMKENK I TITNDKGRLSKEEIERMVNEAENYKAEDEKQKD

```

```

          550      560      570      580      590      600
HSP7C_human      KVSS..S.....A.....QG..NDE..QK.L...EI.N..K..T..E...
HSP7C_mouse      KVSS..S.....A.....QG..NDE..QK.L...EI...K..T..E...
HSC71_Crassostrea_gig  ..A.....D.....G.....L...EEI.K.M.Q...D.E...
HSC71_Mytilus_gal  ..T..S...S...Q.....S...E.M...DEI.K..A.N...E...
HSP70_Haliotis_dis  .....
HSP71_Haliotis_tub  RIQAKNGLESYAFNMKSTVEDEK LKDKI SEDDKKTI TDKCNDVISWLDSNQLAEKDEFEH

```

```

          610      620      630      640      650      660
HSP7C_human      Q....K.....S...MP-...GG-F...-G..P-----S..A.S...
HSP7C_mouse      Q....K.....S...MP-...GG-F...-G..P-----S..A.S...
HSC71_Crassostrea_gig  .....S...PG...-GGMPNFGG..P.G.AP---G...G...
HSC71_Mytilus_gal  .....S...PG...GGA.GAPG..P.S...-...-...
HSP70_Haliotis_dis  .....--...GG-M..GMPG...LP.GADGQ.....
HSP71_Haliotis_tub  KQKELEGVCNPIITKLYQAAGGA--GGMPNF-NPG--AAGAGGAGG---APTGGSSGPT

```

```

HSP7C_human      ....|
HSP7C_mouse      .....
HSC71_Crassostrea_gig  .....
HSC71_Mytilus_gal  .....
HSP70_Haliotis_dis  .....
HSP71_Haliotis_tub  IEEVD

```

Figure 4: Sequence alignments (ClustalW v 1.83). *Haliotis tuberculata* HSP90 protein (**CAK95235**) shares 80% homology with human HSP90-beta (**AAH09206**), 78% with chicken HSP90-beta (**Q04619**) and 82% with *Chlamys farreri* HSP90 (**AAR11781**). The characteristic motifs of the HSP90 family are underlined. The characteristic motifs of cytosolic protein are boxed in grey.

```

          10      20      30      40      50      60
Hsp90B_human  --M.E.VHHG.E.....A.....
Hsp90B_chicken --M.EQV.HG.D.....A.....
Hsp90_Chlamys_far  ...EGQA.ED.....G.....C.....
Hsp90_Haliotis_tub MPEPQEAQMDEGEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYES

          70      80      90      100     110     120
Hsp90B_human  .....SG.ELK.D.I.NPQER..TLV.T.....I.....
Hsp90B_chicken .....TG..LK.D...NPRDP..TLL.T.....
Hsp90_Chlamys_far  .....SG.ELE.K...N.DDN..S.M.T.....R.....
Hsp90_Haliotis_tub LTDP SKLDGNKDMQIRIVPDKENKTLVIEDSGIGMTKADLVNNLGTIARSGTKAFMEALQ

          130     140     150     160     170     180
Hsp90B_human  .....K...IT.....A.....VRADHGEPI...
Hsp90B_chicken .....K...IT.....A.....VR.DHGEPI...
Hsp90_Chlamys_far  .....D...T.N...H.....VR-.G.GSFIL.
Hsp90_Haliotis_tub AGADISMIGQFGVGFYSAYLVAERVVESKHNDDEQYIWESSAGGSFTIKTSNDPTLGRG

          190     200     210     220     230     240
Hsp90B_human  .KVI.HL...T.....V.....T.YL...E..I...A..E.G--.
Hsp90B_chicken .KVI..L...T.....V.....T.Y...E...A..E.V--.
Hsp90_Chlamys_far  ...H...A...KK.....Q.....V.....E.K...
Hsp90_Haliotis_tub TRITLYMKEDQVEYLEERRVKEIVKKHSQFIGYPIKLMVEKERDKEVSDDEEEEKKEDE

          250     260     270     280     290     300
Hsp90B_human  .EEDKDD.E...I..VGSDE..DSG-...K.T.....IDQ.....I...P..
Hsp90B_chicken .EEE.SKD.E...I..VGSDE.E.EGE.S..K.T.....IDQ.....I...P..
Hsp90_Chlamys_far  D..A.KSED.....D..D.....-...-...G..I.....I...P..
Hsp90_Haliotis_tub KKDDEEESEDKPKVEDLD-EDEDEDKSKDKK-KKKKIKEKYTEDEELNKTKPLWTRNADD

          310     320     330     340     350     360
Hsp90B_human  .....G.....I.R...L.....
Hsp90B_chicken .....G.....I.R...L.....
Hsp90_Chlamys_far  .....G.....V.R...L.....
Hsp90_Haliotis_tub ITQEYAEFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFLPKRAPFDMFENKKKKNNIKL

          370     380     390     400     410     420
Hsp90B_human  .....S.DE.....I.....I...L..
Hsp90B_chicken .....S.DE.....I.....I...L..
Hsp90_Chlamys_far  .....NEV.....
Hsp90_Haliotis_tub YVRRVFIMDNCEDLIPEYLNFVRGVVDSEDLPLNISREMLQSKILKVIRKNLVKKCMEL

          430     440     450     460     470     480
Hsp90B_human  .SELA...E.Y...A.....R..E...H...M...S...
Hsp90B_chicken .TELA...E.Y...A.....KR..E...H...M...S...
Hsp90_Chlamys_far  ...A...E.Y...A.....T...K.IA.F...H...M...F...
Hsp90_Haliotis_tub FDDIMEDKDNFKFYEQFSKNLKLGIHEDSTNRRKLSDLLRYYTSQSGDEVTSLKEYVSR

```

```

          490      500      510      520      530      540
Hsp90B_human      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Hsp90B_chicken    ...T.....EQ.A.....R.....V...E.....F...S..S
Hsp90_Chlamys_far .....EQ.A.....R.....V...E.....F.....S
Hsp90_Haliotis_tub MKENQKSIYYITGESKDSVQNSAFVERVKKRGFEVIYMTDPIDEYCVQQLKEYDGTLCV

          550      560      570      580      590      600
Hsp90B_human      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Hsp90B_chicken    .....M.S.K.N..L.....TI.....S.....T
Hsp90_Chlamys_far .....NM.S.K.T..L.....TI.....S.....T
Hsp90_Haliotis_tub VTKEGLELPEDEEEKKLEEAKAQFEGGLCKVMKEILDKKVEKVVVSNRLVTSPPCIVTSQ

          610      620      630      640      650      660
Hsp90B_human      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Hsp90B_chicken    ...T.....N..M.....E..RQ..E.....V
Hsp90_Chlamys_far .....S...C.....A..I.S...GL...S...V
Hsp90_Haliotis_tub YGWSANMERIMKAQALRDTSTMGYMAAKKHLEINPDHPVKTLEKADADKNDKAVKDL

          670      680      690      700      710      720
Hsp90B_human      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Hsp90B_chicken    V.....A..S.....QT.S...Y.....EVAA.EPNAAVP..I.....
Hsp90_Chlamys_far L.....M.....E.GT.....D..SGAPE.SDENVE.P.....
Hsp90_Haliotis_tub MLLFETSLLASGFSLEDPTSHANRIHRMIKLGIGIDEDDIPTEATAESATDEMPPLEGDE

          730
Hsp90B_human      ....|....|
Hsp90B_chicken    .-.....
Hsp90_Chlamys_far .....
Hsp90_Haliotis_tub DDASRMEEVD

```

Figure 5: MTT viability test on primary cultures of hemocytes maintained at 37°C during 24 hours (n=3, mean ± SD). ** indicates a significant difference compared to control 0min (p<0.01, t-test). ***: p<0.001.

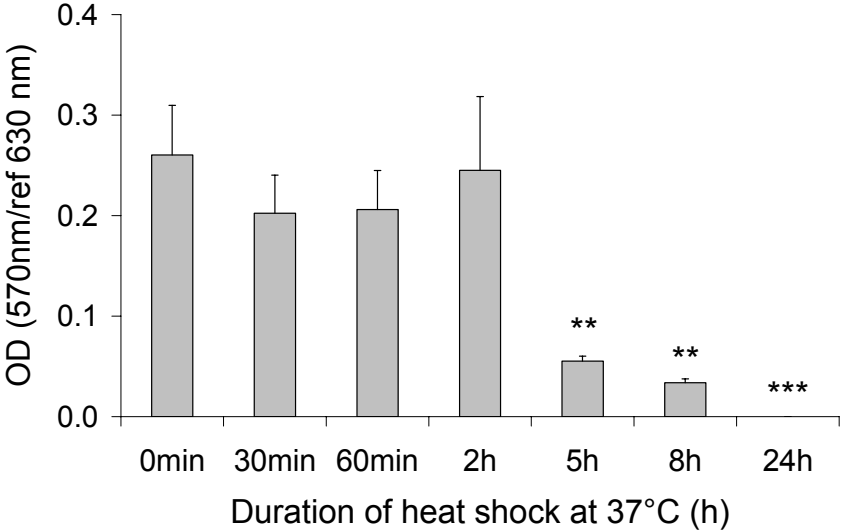


Figure 6: HSP70 (top) and HSP90 (bottom) mRNA induction kinetics during a one-hour heat shock at 37°C (n=4; mean ± SD). Full line: heat-shocked hemocytes, dotted line: control hemocytes maintained at 17°C. * indicates a significant difference between heat-shocked hemocytes and control hemocytes (p<0.05, t-test). **: p<0.01.

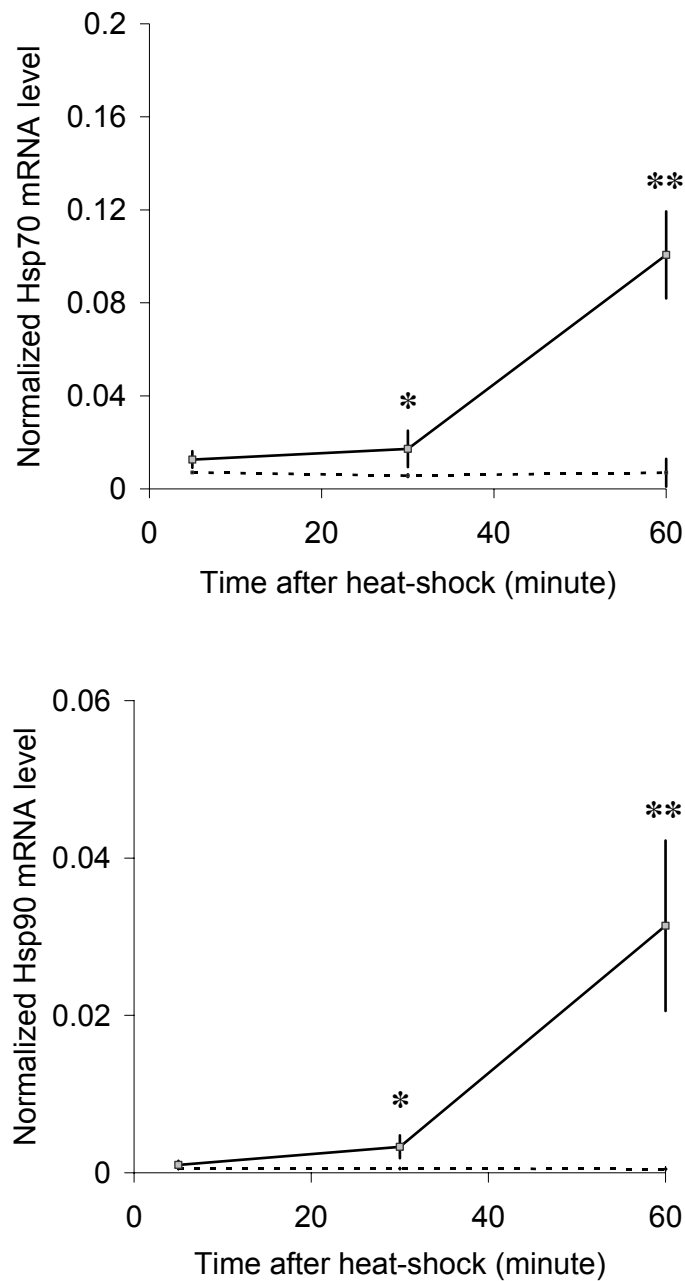
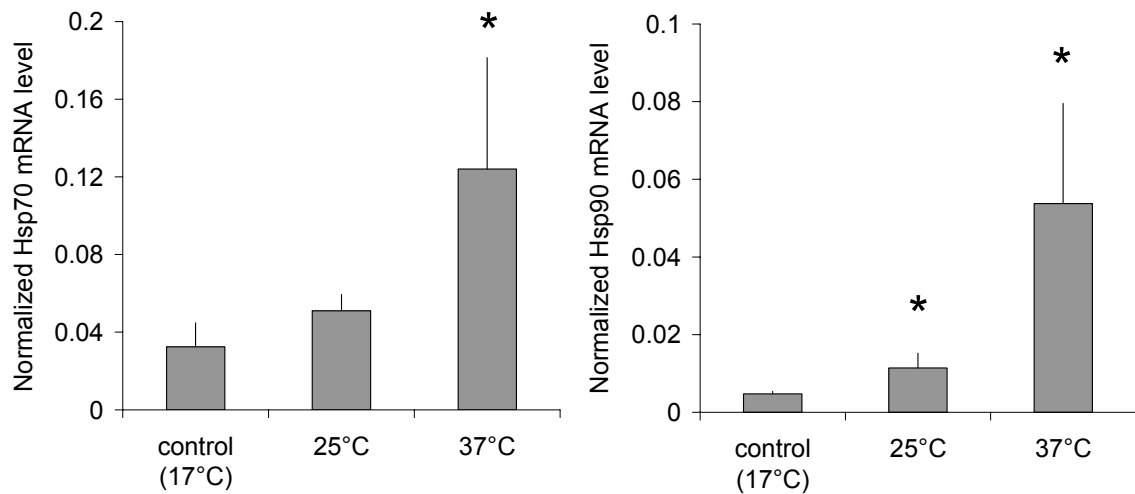


Figure 7: HSP70 (left) and HSP90 (right) mRNA induction after one hour at 17°C (control temperature), 25°C and 37°C (n=4; mean \pm SD). * indicates a significant difference between heat-shocked hemocytes and control hemocytes ($p < 0.05$, t-test).



ANNEXE 2

(*article sous presse dans Sci. Total. Environ.*)

Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster Crassostrea gigas exposed to radioactive discharges in their natural environment

FARCY Emilie^{1,2}, VOISEUX Claire¹, LEBEL Jean-Marc² and FIEVET Bruno¹

¹Laboratoire de Radioécologie de Cherbourg-Octeville. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire/DEI/SECRE. Cherbourg-Octeville, France.

²Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines. Université de Caen Basse-Normandie. UMR 100 Ifremer. Caen, France.

ABSTRACT

The North Cotentin area (Normandy, France) hosts several nuclear facilities among which the AREVA reprocessing plant of La Hague is responsible for controlled discharges of liquid radioactive wastes in the marine environment. The resulting increase in radioactivity is very small compared to natural radioactivity. However, concerns about environment protection prompted the scientific community to focus on the effects of the chronic exposure to low concentrations of radionuclides in non-human biota. This study was devoted to the evaluation of possible impact of radioactive discharges on the oyster Crassostrea gigas in the field. Real-time polymerase chain reaction was used to quantify the expression levels of genes involved in cell stress in the oyster. They included members of the heat shock protein family (Hsp70, Hsc72, Hsp90), superoxide dismutase (SOD) and metallothionein (MT). Times series measurements were built from periodic samplings in the natural environment in order to characterize the natural variability as well as possible seasonal fluctuations. The studied genes exhibited a general seasonal expression pattern with a peak value in winter. The data inversely correlated with seawater temperature and the nature of the relationship between genes expression and temperature is discussed. In parallel, oysters were collected in four locations on the French shores, exposed or not to radioactive liquid wastes from nuclear facilities hosted in the North-Cotentin. The comparison of data obtained in the reference location on the Atlantic coast (not exposed) and data from oysters of the English Channel (exposed) gave no evidence for any statistical difference. This dense set of data is a basis for the use of the expression levels of those genes as biomarkers to address the question of the possible effects of chronic exposure of oyster to low concentrations of radionuclides in controlled laboratory experimental conditions.

Keywords: Radioactive discharges, Seasonal variations, mRNA, heat shock protein, metallothionein, superoxide dismutase, Crassostrea gigas

1. INTRODUCTION

The North Cotentin area (Normandy, France) hosts several nuclear facilities, including the AREVA reprocessing plant in La Hague, which is responsible for controlled discharges of liquid radioactive waste into the marine environment. These discharges result in measurable amounts of a few artificial radionuclides in the vicinity of the input source. Their concentrations decrease with distance from the outlet due to dispersion into the various compartments of the environment and radioactive decay. The resulting increase in radioactivity is small compared to natural radioactivity (see discussion). However, oyster farms are located in this area and the oysters may be slightly labelled. Recently, concerns about environmental protection have prompted the scientific community to focus on the effects of ionizing radiation on non-human biota. This study evaluates the possible impact of radioactive discharges on the oyster Crassostrea gigas in the field. Since oyster physiology is known to be strongly influenced by the reproductive cycle, its response to a given stress is likely to fluctuate seasonally. In this context of chronic exposure, it was necessary to address the question of possible seasonal fluctuations in the oysters' responses.

We monitored seasonal changes in the expression of genes involved in the response to cell stress in different locations, which either were or were not exposed to artificial radionuclides released by the nuclear industry. We focussed on mRNA levels of particular genes, known to be involved, on the basis of radiobiology literature, in the response to ionizing radiation. The genes dealt with in this study are involved in the chaperone protein function: the heat shock protein family (Hsp70, Hsc72, Hsp90) (Ehrhart et al., 1988; Davidoff et al., 1992; Sierra-Rivera et al., 1993; Matsumoto et al., 1995; Kang et al., 2002; Calini et al., 2003); and in regulation of oxidative stress: superoxide dismutase (SOD), metallothionein (MT) (Greenstock et al., 1987; Yamaoka et al., 1994; Otero et al., 1996; Cai et al., 1999; Cai and

[Cherian, 2003](#); [Guo et al., 2003](#)). Measurement at transcriptional level was chosen, the underlying thinking being that such a parameter could reflect sensitive regulation of the processes. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to quantify mRNA encoding for these markers in comparison with mRNA encoding for actin, as a reference gene. A key issue in this technique is the choice of the housekeeping gene taken as a reference ([Thellin et al., 1999](#); [Goidin et al., 2001](#); [Kim et al., 2003](#); [Andersen et al., 2004](#); [Ropenga et al., 2004](#); [Bustin et al., 2005](#); [Huggett et al., 2005](#); [Wong and Medrano, 2005](#)). One of the initial steps in this work specifically addressed this question. RNA was extracted from whole oyster soft part homogenates as well as from isolated gills. Samples were collected monthly and quarterly on the French coast on the Atlantic Ocean and the English Channel in order to build time series measurements of radionuclide labelling and gene expression. Statistical analysis of these data was performed, first to characterize the ranges of fluctuations in these markers in the natural environment, as well as possible seasonal variations, and secondly, to compare populations that either were or were not exposed to radioactive discharges by the AREVA reprocessing plant.

2. METHODS

2-1 Sampling

Animals were obtained from oyster farms located in the sampling sites. Attention was paid to ensure that all of the oysters were diploid, 3-4 years-old, had spent their entire growing life in the farm and had been removed from seawater just before sampling.

For radionuclide concentration measurements, oysters were purchased monthly in St-Vaast (STV) from July 2002 to February 2005, and quarterly in Asnelles (ASN), Cancale (CCL) and

Carnac (CRC) (Fig. 1) from March 2004 to January 2005. The whole soft parts were separated from the shell and dried at 90°C to a constant dry weight and then ground into fine powder. The dry material was conditioned in a suitable geometry for gamma spectrometry analysis. On a few samples only, another aliquot of dry material was calcined at 450°C and the ash was sent for americium, curium and plutonium radiochemistry and alpha spectrometry analysis by the Environmental Radioactivity Measurement Laboratory (IRSN, Orsay, France).

For gene expression experiments, oysters were collected monthly in St-Vaast and quarterly in Asnelles, Cancale and Carnac between January 2004 and September 2005. At these four locations, the gills of 20 oysters and the whole soft parts of 20 other oysters were immediately dissected on the spot after sampling. After dissection, the samples were immediately frozen in liquid nitrogen. Back at the laboratory, the oyster extracts were crushed in a ball crusher, in buckets cooled in liquid nitrogen. After this step, five individuals were pooled together as one.

2-2 RNA extraction

Total RNA was extracted with TRI REAGENT according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). The amount and quality of RNA was quantified by measurement of absorbance at 260 and 280 nm in a UV-spectrophotometer. To discard genomic DNA contamination, total RNA was digested with DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich) and an aliquot of DNase-treated RNA was then subjected to a PCR with actin primers to check the absence of genomic DNA.

2-3 Real- time PCR and Analysis

Reverse transcription (RT) was carried out using 500 ng of total RNA treated with DNase I, 500 ng random primers (Promega), 200 U Moloney murine leukaemia virus (M-MLV)

reverse transcriptase (Promega), 12.5 μ moles RNase-free dNTP, and 25 U recombinant RNAsin (Promega). The sequences of the forward and reverse primers were designed using Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) and synthesized by Eurogentec (Table 1). Their efficiency was tested using the standard curve method. A dilution range was performed for each pair of primers to obtain a standard curve by plotting the cycle threshold as a function of the log of the total amount of starting RNA (reverse-transcribed). Primer pairs showing a good efficiency ($100 \pm 5\%$) on a range of cDNA concentrations of four orders of magnitude were kept for quantification.

Real-time PCR was performed in a MiQ Cycler (Biorad). All determinations were carried out in duplicates. Controls of no template cDNA were included in PCR experiments. Amplification was carried out in 96-well plates, in a total volume of 15 μ l containing 7.5 μ l of 2X iQ SYBR[®] Green supermix (Biorad), each primer (500 nM final) and cDNA samples obtained from reverse transcription of 5 ng of total RNA. For the analysis of reference gene stability, cDNA amounts corresponded to the reverse transcription of 0.05 ng total RNA. Amplification conditions were 40 cycles of 15 sec at 95°C and 45 sec at 60°C, followed by the protocol for the melting curve: 80 cycles of 10 sec with an increase of 0.5°C between each cycle from 55°C to 95°C. The melting curve was used to check whether the amplification products had the expected T_m .

2-4 Seawater temperature measurements

The English Channel is characterized by exceptionally strong tidal currents and low depth, so the water column is considered homogenous. Temperature was measured up-tide from the shore monthly with a digital thermometer (precision: 0.1°C). The measurements were performed in Goury, near the St-Vaast sampling site.

2-5 Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using Statgraphics Centurion XV software ([StatPoint, Inc., http://www.statgraphics.com/](http://www.statgraphics.com/)). Values were expressed as means \pm SE of four pooled oyster extracts from 5 individuals. Statistically significant differences between two samples were determined using a Mann-Whitney non-parametric rank test; * $p \leq 0.05$ was accepted as significant. Linear regression analysis was performed to estimate correlations (r) between various parameters: mRNA levels in gills versus whole soft part homogenates; water temperature versus mRNA fluctuations.

A principal component analysis was carried out, using SPAD 6.0 software ([SPAD TEST&GO, http://www.testandgo.com/](http://www.testandgo.com/)), to characterize the main trends of the data set with respect to all descriptors: gene, month, type of extract and location.

3. RESULTS

3-1 Radionuclide concentrations

Gamma spectrometry analysis of all four locations of oyster samples (whole soft parts) showed the presence of natural ^{40}K every month, in the range 316-452 Bq.kg^{-1} dry weight (dw). In CCL, ASN (remote from AREVA reprocessing plant liquid waste input) and CRC (Atlantic coast, unexposed to discharges from AREVA), no artificial radionuclides were detected by gamma spectrometry. In STV, ^{60}Co was detected 9 times and ^{137}Cs was detected 3 times, out of 32 monthly samplings between Jul-02 and Feb-05 (Table 2). Months when no artificial radionuclides were detected by gamma spectrometry were not shown in Table 2.

Radiochemistry of transuranic elements and alpha spectrometry analysis was performed on

one sample from CRC (Atlantic coast), one sample from CCL and three samples from STV. The results expressed in $\text{Bq.kg}^{-1}\text{dw}$ are presented in table 3 and though there were very few data, it can be noted that, compared to the background level in CRC (Atlantic coast), a slight labelling could be detected in the Cotentin locations.

3-2 Normalization of mRNA

A preliminary task specifically addressed the choice of the reference gene by quantifying, in parallel ratios between actin mRNA, GAPDH mRNA, a gene involved in glycolysis often used as reference, and 18S ribosomal RNA, which accounted for total RNA. Figure 2 presents the variations of actin and GAPDH mRNA levels normalized to 18S rRNA measured in oysters sampled monthly from January 2004 to June 2005. When normalized to 18S, the expression levels of actin and GAPDH were not strictly constant along the studied period. The ranges of fluctuations were $\text{mean} \pm 43\%$ (relative Standard Error) for actin and $\text{mean} \pm 48\%$ for GAPDH, respectively. For seasonal expression analysis of stress-inducible genes, mRNA levels were normalized to actin mRNA, GAPDH mRNA and 18S rRNA in order to check the influence of the reference gene. Seasonal expression patterns were found to be very similar (data not shown) and actin mRNA was finally used for all subsequent normalization.

3-3 Water temperature

Seawater temperature was measured in the North Cotentin area, close to the AREVA reprocessing plant. Maximum water temperatures were reached during the summer period (August-September) with values around 18°C , while minimum values of 7°C were observed in February. Note that the period with water temperature below 10°C (grey bands) was shifted by one month between 2004 and 2005. These cold periods (below 10°C) were outlined in figures 4 and 5.

3-4 Seasonal variations of stress-inducible genes' expression

Monthly recorded values of mRNA levels in gills (dotted line) and whole soft parts (solid line) in oysters from STV between January 2004 and September 2005 are shown in figures 4 and 5. Genes involved in protein refolding are Hsp70 (Fig. 4a), Hsc72 (Fig. 4b) and Hsp90 (Fig. 4c), and those involved in oxidative stress regulation are SOD (Fig. 5a) and MT (Fig. 5b).

For all five stress-inducible genes, animals collected monthly in STV showed seasonal fluctuations in mRNA level in both isolated gills and whole soft parts. Firstly, it appears that the mRNA level peaked in the winter period: January-February-March 2004 and February-March-April 2005. It is noteworthy that there was a one-month shift in the winter peak between 2004 and 2005. For each gene studied and for both gills and soft part homogenate, the Mann-Whitney test was performed on pairs of maximal (winter, summer) and minimal (September) values. In figures 4 and 5, paired values were linked with a solid line in whole parts and a dotted line in gills. Symbol *, meaning a statistically significant difference ($p < 0.05$), was associated with the ratio between the two paired values.

Another critical period of the annual cycle was found in the summer between June and August, during which whole soft parts values exhibited a significant increase compared to May and September mRNA levels. The lowest mRNA levels were generally observed in May and September in both gills and soft part homogenate. The ratio of this summer mRNA level increase was generally smaller than the ratio of winter increase, except for SOD and Hsc72, which exhibited particularly strong increases in the summer. The latter genes showed a 4-fold significant increase ($p < 0.05$) of mRNA level in June-July-August 2004 and June-July 2005 in

the whole soft parts compared to May and September of the same year. This summer increase in mRNA level was not observed in gills.

The correlation between data observed in the whole soft parts and isolated gills was tested by linear regression analysis. The variations in gills and soft part homogenate, extracted from different oysters, were generally well correlated (Table 4), with the exception of genes exhibiting a marked increase in the summer in whole soft parts, namely SOD ($r=0.44$) and Hsc72 ($r=0.27$).

3-5 Relationship with temperature

The foregoing results showed that mRNA levels of stress-inducible genes apparently exhibited a temperature-related pattern. Indeed, the temperature hit its low-point below 10°C when mRNA levels were at their highest. In addition, if one examines the period with water temperature below 10°C in detail, one can see that there was a one-month shift between 2004 and 2005. Interestingly, the same was previously said about the winter peak in mRNA levels. In order to study whether stress-induced genes' mRNA levels are related to temperature, a linear regression analysis between mRNA levels in STV and water temperature was performed and the correlation coefficients were calculated in both whole soft parts and gills (Table 5).

The inverse correlation between seawater temperature and mRNA levels in STV was generally better in the gills than in the whole soft parts. This was expected to be due to the summer increase observed in whole soft parts and not in gills. To illustrate: whole soft parts mRNA levels of SOD are not well correlated with temperature fluctuations in STV ($r=-0.18$), whereas they are quite well correlated in gills ($r=-0.68$). Surprisingly, the Hsp family genes did not show the best correlation with temperature (Table 5).

3-6 Comparison between locations

In order to compare populations that either are or are not exposed to radioactive discharges by the AREVA reprocessing plant, we studied the differences between CRC (reference site) and the other locations at four periods of the year: January, March, June and September. Values of mRNA levels of stress-inducible genes in whole soft parts of oyster from the four sampling sites (CRC, CCL, ASN, STV) are shown in figures 6 and 7 for January, March, June, September 2004 and January, March, June 2005: Hsp70 (Fig. 6a), Hsc72 (Fig. 6b), Hsp90 (Fig. 6c), SOD (Fig. 7a) and MT (Fig. 7b). For each gene studied, a Mann-Whitney test was performed between the values for CRC and each of the other three sampling locations (CCL, STV and ASN). In figures 6 and 7, the symbol * placed over the CCL, ASN and STV bars means a statistically significant difference ($p < 0.05$) to the value for CRC.

In animals collected in CCL, ASN and STV, the whole soft parts mRNA levels were most often closely similar to those measured in the oysters from CRC. Data obtained on the same studied genes, in isolated gills from different oysters, sampled at the same time, in the four locations, were similar (data not shown). Only very few statistically significant differences could be found between the four locations. These significant differences pointed to either higher or lower values in one of the three locations (CCL, ASN and STV), compared to the unexposed site of CRC. For the genes considered, the ratios between the lowest mRNA level in September and highest in January or March were similar in the four sites. The previously described seasonal pattern in STV was confirmed in CCL, ASN and CRC. However, the summer increase, previously described in the whole soft parts in STV, could not be observed in the three other locations with the current quarterly sampling frequency.

3-7 Principal Component Analysis

The purpose of the Principal Component Analysis (PCA) is to represent the data in a reduced number of orthogonal axes, constructed in such a way that they outline, in decreasing order, the data's main trends. This analysis was performed on the mean values of mRNA levels obtained in gills and whole soft parts for the five genes studied, the four sampling locations and the six months (March-04, June-04, September-04, January-05, March-05 and June-05).

The principal axes are constructed from the dispersion of the data for the quantitative parameters (gene expression). The correlation circle (Fig. 8) showed that all variables were negatively correlated to the first axis (size effect). The first two components represented 79% of the total variance. It was interesting to examine the correlation of these components with the genes (Table 6). The correlation among descriptors is given by the angle between descriptor axes. The closer to unity (unsigned value), the stronger the correlation. This correlation revealed that all genes explained component one well.

The illustrative parameters (location and month) are positioned a posteriori according to the existing principal axis. For each axis and each illustrative parameter, the test value expresses the statistical significance of the parameter's coordinate on this axis. The matrix of the test values is given in table 7 for the illustrative parameters (location, month). One can see that the parameter "month" was well represented on axis 1 (absolute test value > 2), whereas the parameter "location" was not (absolute test-value < 2). This means that, unlike the locations, the sampling months were significantly linked to the first axis, except for March 2004. Finally, axis 1 clearly separated data as a function of time and this first axis showed a strong contrast between winter and summer (Fig. 9). In table 7, axis 2 also revealed an opposition between September 2004 (test-value = -2.9) and June 2005 (test-value = 2.4). However, on this axis 2, the test values did not allow one to interpret the "location" parameter.

4. DISCUSSION

The main goal of this study was to compare oysters from locations that either are or are not exposed to liquid radioactive waste discharges in the marine environment. Research was carried out in the Cotentin area in France because the AREVA reprocessing plant in La Hague is there and it is a typical example of the potential impact of the nuclear industry on the natural environment. Dispersion of radioactive liquid discharges from the Cotentin area into the English Channel is well documented with respect to hydrodynamics and it has been shown to move towards the North Sea (see [Bailly du Bois and Dumas, 2005](#) for a review). Among the four sampling locations, Carnac, located on the Atlantic coast, was thus used as the reference site. Concentrations of radionuclides in different biological compartments of the marine environment on the French coast in the Atlantic and the English Channel between 1993 and 2003 were recently reviewed ([Fiévet and Germain, 2004](#)). Other data are available from AREVA (France) and also from CEFAS (Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science, U.K.) and RPII (Radiological Protection Institute of Ireland, Ireland), more specifically around the coasts of those countries. Radionuclide concentrations measurements from the present study were in agreement with those available data. Regarding gamma emitter radionuclides, we should point out that ^{40}K was found in oyster soft parts from all four sampling locations at around $400 \text{ Bq.kg}^{-1}\text{dw}$. This is a natural radionuclide, present at background level. Labelling by AREVA liquid radioactive waste was detectable in St-Vaast, which is downstream of the plant discharge dispersal, with the presence of ^{60}Co and ^{137}Cs at concentrations generally less than $0.2 \text{ Bq.kg}^{-1}\text{dw}$ and $0.5 \text{ Bq.kg}^{-1}\text{dw}$, respectively. However, one should recall that part of the ^{137}Cs present in oysters in the Cotentin area is a result of atmospheric nuclear weapon tests which lasted up to the 70s ([Fiévet and Germain, 2004](#)). In any case, these artificial gamma emitter radionuclide concentrations are at least 3 orders of

magnitude lower than natural ^{40}K . A few analyses of transuranic elements in oyster samples were performed in this work and the results showed that these alpha emitter radionuclides were detected on the Atlantic coast (Carnac). Their presence in the reference site in the $1\text{ }10^{-3}\text{Bq.kg}^{-1}\text{dw}$ range is also a consequence of past atmospheric nuclear weapon tests. Labelling in oysters around the Cotentin Peninsula was clearly detected with higher concentrations than in Carnac, up to c.a. $30\text{ }10^{-3}\text{Bq.kg}^{-1}\text{dw}$. One should recall that the marine environment is also characterized by the presence of ^{210}Po , another element of natural origin (the result of natural ^{238}U decay). This natural alpha emitter radionuclide was analysed in the oysters in this present study, from all four sampling locations, and concentrations in soft parts were found in the $100\text{-}1000\text{ Bq.kg}^{-1}\text{dw}$ range (Connan, personal communication). Here again, the ratio of several orders of magnitude between artificial and natural alpha emitter radionuclide concentrations should be pointed out. Concerning beta emitter radionuclides, recent data on labelling in the English Channel by nuclear industry are available on ^{14}C (Fiévet et al., in press) and ^3H (Masson, 2004). Both radionuclides are also present naturally in the environment. However in the English Channel, their ratio between the artificial and natural sources of contribution is greater than that for gamma and alpha emitter radionuclides. The fluctuations of radionuclide concentrations in seawater in the English Channel are well documented. Many measurements and accurate models have been developed and fine-tuned to account for dispersion of liquid waste (Bailly du Bois and Dumas, 2005). At the distance from the source of input where St-Vaast is located, radionuclide concentrations are quite stable compared to the vicinity of the AREVA pipe where sharp changes reflect the kinetics of releases by the plant (Fiévet and Plet, 2003; Fiévet et al., in press). In Cancale and Asnelles, because of detection limits, present gamma spectrometry data provided no evidence for the labelling of oysters by radioactive discharges from the AREVA plant. However, in past decades, radioecology studies in the English Channel, considering other marine indicators

and/or other radionuclides, have shown that these two locations are in the area of influence of these discharges. On the basis of this brief overview of radioecology, the impact of the nuclear industry on oysters in the English Channel is expected to be fairly constant and most probably low, especially considering natural radioactivity. Extremely sensitive tools are thus required to conduct research into any possible impact.

Most literature available on the effects of radiations on cellular functions is devoted to mammals, exposed to high and acute doses. Few studies have conducted research into the effects of chronic exposure of lower vertebrate and invertebrate species to low doses of ionizing radiation (Cooley, 1973; Baptist et al., 1975; Woodhead, 1977, Rackham and Whoodhead, 1984; Theodorakis and Shugart, 1998; Hinton, 2000; Mihok, 2004; Hagger et al., 2005; Jha et al., 2005) and none into mRNA. However, on the basis of radiobiological knowledge, one can focus on a number of cellular functions, expected to be involved in the response to ionizing radiation. Ionizing radiation results in radiolysis of water molecules, which produces reactive oxygen species (ROS), and more generally damage to potentially all molecules present, altering their functions. Cell responses to this damage involves chaperone proteins and defence against oxidative stress, among others. Many molecular markers of those cell functions have been identified, mainly in mammals, and used in research into the effects of ionizing radiation. They include markers of chaperone proteins (Ehrhart et al., 1988; Davidoff et al., 1992; Sierra-Rivera et al., 1993; Matsumoto et al., 1995; Kang et al., 2002; Calini et al., 2003) and regulation of oxidative stress (Greenstock et al., 1987; Yamaoka et al., 1994; Otero et al., 1996; Cai et al., 1999; Cai and Cherian, 2003; Guo et al., 2003). The recent development of the real-time PCR technique following reverse-transcription makes it possible to quantify messenger RNA precisely and thus determine the expression level of specific genes. One key issue of using the real-time PCR technique is the choice of the reference RNA

(Thellin et al., 1999; Goidin et al., 2001; Kim et al., 2003; Andersen et al., 2004; Ropenga et al., 2004; Bustin et al., 2005; Huggett et al., 2005; Wong and Medrano, 2005), this being particularly relevant for in-situ studies with annual mRNA level recording. We have chosen three classically used reference RNAs: actin mRNA, encoding for a cytoskeleton protein; GAPDH mRNA, involved in glycolysis, and 18S ribosomal RNA. The latter is considered to be a good indicator of total RNA, in other words of the number of cells, but the possibility that rRNA level could vary independently of the expression level of genes cannot be excluded. The use of a gene involved in glucose metabolism, such as GAPDH, did not appear appropriated given the changes in that metabolism in the oyster reproduction cycle, especially during gametogenesis (Livingstone, 1981; Heude-Berthelin et al., 2003). The inter-comparison between various reference RNAs allowed a better knowledge of the fluctuations throughout the natural annual cycle. Finally, we chose actin mRNA and verified that the observed seasonal pattern of stress-inducible genes was not due to the variation of actin itself. A prerequisite for the use of mRNA levels of genes as markers of oyster stress was to figure out their natural range of fluctuation to serve as a basis for all subsequent comparisons and to be able to assess the significance of observed changes.

Because quite high inter-individual variability was expected, a choice was made to pool samples. Each sampling consisted in twenty oysters for whole soft tissue and another twenty for isolated gills. Of course we are well aware that since five oysters were pooled into one sample, this procedure may be suspected to bias the estimation of variability. In addition, the data exhibited very heteroscedastic variability. This violated important assumptions underlying the analysis of variance and invalidated most parametric methods to estimate the significance of differences. This is why Mann-Whitney test was ran to compare the medians of two samples.

In the entire data set obtained in STV, we observed overall high levels of mRNA between January and April in both gills and soft part homogenate. In whole soft parts, a secondary increase in mRNA level was noticed in the summer period between June and August, especially for SOD and Hsc72 mRNA. Two distinct hypotheses could be proposed to explain these fluctuations: either they were seasonal or they reflected changes in the source of a local pollutant such as radionuclides released by the AREVA plant or other stressor, which may or may not have been anthropogenic. The hypothesis of changes in the impact of liquid radioactive waste from the AREVA plant seemed unlikely for the following reasons: At that distance from the point of release, radionuclide concentrations in seawater are quite stable and radionuclide transfer kinetics between seawater and biological compartments smooth out changes in marine species even further (Fiévet and Plet, 2003; Fiévet et al., in press). Another argument came from the comparison between data obtained in St-Vaast and the three other sampling locations, including the reference site on the Atlantic coast, which provided no evidence for any statistically significant systematic difference in St-Vaast (further discussed below). As far as fluctuations of other possible pollutants are concerned, pressure by unidentified sources of environmental annual cyclic stressor obviously cannot be ruled out (metals, PAH, parasitism, toxic blooms, etc.). Extrapolations from seawater quality monitoring program data indicated that the four locations did not strongly differ regarding metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyl (PCB) (Ifremer, 2005a; Ifremer, 2005b; Ifremer, 2005c) but no additional measurements were made. The hypothesis of seasonal fluctuations is supported by the following arguments: synchronicity between winter mRNA level peaks and seawater winter temperature was observed repeatedly over the whole time period and with a one-month shift for both

parameters between 2004 and 2005. The main seasonal trend was confirmed with quarterly samplings in all four locations studied.

On the other hand, a direct role of temperature on the mRNA level of stress-inducible genes cannot be asserted from the data obtained, even if 60% to 80% of the variance were explained using the hypothesis of an inverse linear relationship, depending on the gene and the oyster extract considered. Indeed, mRNA levels of stress-related genes may be influenced by physiological processes other than stress, which are in phase with seasonal temperature changes. For example, the annual metabolic cycle of oysters is largely driven by reproduction and linked to temperature. We observed that the period of increase in the mRNA level (January-February-March) coincided with gametogenesis, more precisely the stage in which the oocyte grows in diameter ([Lango-Reynoso et al., 2000](#)) and the reserve tissue increases ([Heude-Berthellin, 2000](#)). Moreover, we observed that mRNA levels fell in August-September every year (2004, 2005): this was in phase with the end of the spawning period. This decrease after the spawning period was observed in *Corbicularia*, with minimum values of MT protein concentrations observed after the spawning period ([Baudrimont et al., 1997](#)).

Comparing the different locations was a major goal of this study. On the basis of quarterly samplings, seasonal fluctuations were observed in all four sites with similar magnitude. Mann-Whitney test comparisons between the reference site (Carnac, Atlantic coast) values and the English Channel sites values pointed out some scattered statistically significant differences. However, no increase (or decrease) in mRNA levels could be associated with the exposure of sampling locations to liquid radioactive waste from the AREVA reprocessing plant in La Hague. Finally, of all the factors capable of modifying the mRNA levels of stress-inducible genes, our data turned out to appear most influenced by the season, even though we focused on artificial radionuclides in North Cotentin in this study. A principal component

analysis was performed to look further into this extensive dataset (sampling locations, genes, sampling quarters). This multivariate analysis showed that the dataset was highly structured by seasonality, with a strong contrast between winter months (January, March) and summer months (June, September), for all four locations. Neither of the first two axes was generated by the "location" parameter. This meant that this descriptor did not highly structure the dispersion of the data.

Since the genes considered in this study are presumably influenced by a variety of biotic and abiotic factors, one may wonder whether any seasonal patterns exist. Interestingly, the genes studied showed the same general fluctuation pattern. Most data available from the literature on environmental ecotoxicological studies regarding those stress markers were obtained at the level of proteins or physiological functions. However, it is worth briefly reviewing them in order to compare existing results with the actual pattern observed at transcriptional level.

Regarding oxidative stress, previous studies showed a correlation between antioxidant defences and seasonality, with respect to the reproductive period and food intake (Viarengo et al., 1991; Solé et al., 1995). In particular, in the summer, temperature and food availability induce oxygen consumption and cellular oxyradical generation, which are offset by increasing antioxidant defences. Viarengo et al. (1991) suggested that the decrease in activity of the antioxidant defence system during the winter could be directly responsible for an enhanced susceptibility of mussels to oxidative stress in this period. Similarly, Niyogi et al. (2001) observed that the physiological fluctuations of antioxidant defence systems were inversely related to lipid peroxidation, indicating an enhanced susceptibility of oyster tissues to oxidative stress during the post-monsoon or winter period. Sheehan and Power (1999) emphasize that oxidative stress is a highly seasonal phenomenon in bivalves. In addition, the modulation of oxidative stress by environmental pollutants obviously interferes and makes

interpretation of biomonitoring data difficult. The fluctuation pattern obtained for Crassostrea gigas SOD mRNA in this study corroborates the general consideration that the summer is a stressful period with high level of oxidative stress. But we also underlined that the colder period between January and April was characterized by even higher SOD mRNA levels, which we cannot currently explain.

Metallothionein has been widely used as a biomarker in field and laboratory studies, in particular in relation to its function in metal detoxification (Baudrimont et al., 1997; Ringwood et al., 1998; Geffard et al., 2001, 2002, 2005; Tanguy et al., 2002; Irato et al., 2003; Bodin et al., 2004; for a review, see Amiard et al., 2006). MT was also clearly shown to be involved in scavenging free radicals during oxidative damage in vertebrates (Sato and Bremner, 1993; Chubatsu and Meneghini, 1993; Dalton et al., 1994; Cai et al., 1999; You et al., 2002). In molluscs, the antioxidant role of metallothionein has been shown in bivalves and gastropods (Roesijadi et al., 1997; Anderson et al., 1999; Viarengo et al., 1999; Viarengo et al., 2000; Leung and Furness, 2001; Cavaletto et al., 2002; Bebianno et al., 2005), providing evidence that metallothionein is effective in protecting cells and the entire organism against oxidative stress. Amiard et al. (2006) discussed the confounding factors affecting concentrations of MT: temperature (Serafim et al., 2002) and salinity (Leung et al., 2002). Among confounding factors, the reproductive cycle was found to be strongly correlated with the annual variation in metallothionein level of the Asiatic clam (Corbicula fluminea) in an unpolluted site in France (Baudrimont et al., 1997). Interestingly, we observed that MT mRNA levels fell in August-September every year (2004, 2005) in phase with the end of the spawning period in the oyster.

Concerning the Hsp family gene, increased levels of Hsps have been associated with fluctuations in environmental temperatures in mussels and marine snails (Chapple et al., 1998; Hofmann and Somero, 1995; Tomanek and Somero, 1999, Minier et al., 2000; Hofmann et al., 2002) and enhanced thermal tolerance in oysters (Clegg et al., 1998, Piano et al., 2002). However, as underlined by Encomio and Chu (2005), it has not been unequivocally demonstrated that seasonal variation in Hsps corresponds directly to seasonal temperature changes. These authors showed in Crassostrea virginica, that total amounts of Hsp70 did not correlate positively with seasonal variations in temperature. Similarly, subtidal mussels (Mytilus sp.) were shown to express higher levels of Hsp70 in winter than in summer (Roberts et al., 1997). Other factors such as salinity or disease were reported to alter Hsp expression (Shumway and Koehn, 1982; Werner and Hinton, 2000). In our study, we observed a small increase in mRNA levels of Hsp family members (Hsp70, Hsc72 and Hsp90) in whole soft tissue of oysters during the summer period but also high mRNA levels in the winter between January and April.

5-CONCLUSION

We did not find any evidence for any relationship between changes in these mRNA levels and oysters' exposure to liquid radioactive waste from the AREVA reprocessing plant in La Hague. The fact that those radionuclide releases result in a very small increase in radioactivity in oysters, especially compared with natural radioactivity, is more than likely an explanation. Our data showed that, in the natural environment, mRNA levels of stress-inducible genes in oysters fluctuate seasonally. This provided knowledge of natural variations in these genes' expression levels, especially seasonal fluctuations and natural inter-individual variability. This was necessary preliminary work before we could tackle the "chronically low dose exposure"

issue. On the basis of our knowledge of natural variability, as well as seasonal changes, through this study we have determined that the next step is now to artificially expose oysters to higher radionuclide concentrations and other kinds of stress under laboratory conditions and to verify the effects on the mRNA levels of the genes studied.

REFERENCES

- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 2006; 76: 160-202.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res* 2004; 64: 5245-5250.
- Anderson RS, Patel KM, Roesijadi G. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev Comp Immunol* 1999; 23: 443-449.
- Bailly du Bois P, Dumas F. Fast hydrodynamic model for medium- and long-term dispersion in seawater in the English Channel and southern North Sea, qualitative and quantitative validation by radionuclide tracers. *Ocean Modelling* 2005; 9: 169-210.
- Baptist JP, Wolfe DA, Colby DR. Effects of chronic gamma radiation on the growth and survival of juvenile clams (*Mercenaria mercenaria*) and scallops (*Argopecten irradians*). *Health Phys* 1975; 30: 79-82.
- Baudrimont M, Lemaire-Gony S, Ribeyre F, Métivaud J, Boudou A. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp Biochem Physiol C, Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1997; 118: 361-367.
- Bebianno MJ, Company R, Serafim A, Camus L, Cosson RP, Fiala-Medoni A. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat Toxicol* 2005; 75: 354-373.
- Bodin N, Burgeot T, Bocquené G, Menard D, Stanisière JY, Minier C, Boutet I, Amat A, Cherel Y, Budzinski H. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comp Biochem Physiol C, Pharmacol Toxicol Endocrinol* 2004; 138: 411-427.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 597-601.
- Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian MG. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 1999; 132: 85-98.
- Cai L, Cherian MG. Zinc-metallothionein protects from DNA damage induced by radiation better than glutathione and copper- or cadmium-metallothioneins. *Toxicol Lett* 2003; 136: 193-198.
- Calini V, Urani C, Camatini M. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol In Vitro* 2003; 17: 561-566.
- Cavaletto M, Ghezzi A, Burlando B, Evangelisti V, Ceratto N, Viarengo A. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002; 131: 447-455.
- Chapple JP, Smerdon GR, Berry RJ, Hawkins AJS. Seasonal changes in stress-70 protein levels reflect thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis* L. *J Exp Mar Biol Ecol* 1998; 229: 53-68.
- Chubatsu LS, Meneghini R. Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem J* 1993; 291: 193-198.

- Clegg JS, Uhlinger KR, Jackson SA, Cherr GN, Rifkin E, Friedman CS. Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol Marine Biol Biotechnol* 1998; 7: 21-30.
- Cooley JL. Effects of chronic environmental radiation on a natural population of the aquatic snail *Physa heterostropha*. *Radiat Res* 1973; 54: 130-140.
- Dalton T, Palmiter RD, Andrews GK. Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factory antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucl Acid Res* 1994; 22: 5016–5023.
- Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992; 89: 3439-3442.
- Ehrhart JC, Duthu A, Ullrich S, Appella E, May P. Specific interaction between a subset of the p53 protein family and heat shock proteins hsp72/hsc73 in a human osteosarcoma cell line. *Oncogene* 1988; 3: 595-603.
- Encomio VG, Chu F-LE. Seasonal variation of heat shock protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (Dermo). *J Shellfish Res* 2005; 24: 167-175.
- Fiévet B, Plet D. Estimating biological half-lives of radionuclides in marine compartments from environmental time-series measurements. *J Environ Radioact* 2003; 65: 91-107.
- Fiévet B, Germain P. Observatoire Marin Atlantique – Manche. Bilan des résultats de mesure par spectrométrie gamma entre 1993 et 2003. IRSN report DEI/SECRE 2004-018, 2004, 86pp.
- Fiévet B, Voiseux C, Rozet M, Masson M, Bailly du Bois P. Transfer of radiocarbon liquid releases from the AREVA La Hague spent fuel reprocessing plant in the English Channel. *J Envir Radioact* (in press).
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Mouneyrac C. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and a metal-rich sites. *Biomarkers* 2001; 6: 91–107.
- Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 2002; 7: 123–137.
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard JC. Do seasonal changes interfere with metallothionein induction by metals in mussels *Mytilus edulis*? *Ecotox Env Saf* 2005; 61: 209–220.
- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA Prevails over Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and [beta]-Actin Genes as Internal Standard for Quantitative Comparison of mRNA Levels in Invasive and Noninvasive Human Melanoma Cell Subpopulations. *Anal Biochem* 2001; 295: 17-21.
- Greenstock CL, Jinot CP, Whitehouse RP, Sargent MD. DNA radiation damage and its modification by metallothionein. *Free Radic Res Commun* 1987; 2: 233-239.
- Guo G, Wang T, Tamae D, Ogi J, Khaletskiy A, Li Z, Li JJ, Longmate JA, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, Weydert C, Spitz DR, Oberley LW, Huang TT. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 2362-2378.
- Hagger JA, Atienzar FA, Jha AN. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol* 2005; 74: 205-217.
- Heude-Berthelin C. Etude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. University of Caen/Basse-Normandie, Caen, 2000, 156 pp.

- Heude-Berthelin C, Fiévet B, Leclerc G, Germain P, Kellner K, Mathieu M. *In vivo* and *in vitro* approaches to the analysis of glycogen metabolism in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Shellfish Res* 2003; 22: 715-720.
- Hinton, T.G.. Determining significant endpoints for ecological risk analyses. University of Georgia, Savannah River Ecology Laboratory, 2000, 27 pp.
- Hofmann G, Somero G. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J Exp Biol* 1995; 198: 1509-1518.
- Hofmann GE, Buckley BA, Place SP, Zippay ML. Molecular chaperones in ectothermic marine animals: Biochemical function and gene expression. *Integr Comp Biol* 2002; 42: 808-814.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005; 6: 279–284.
- Ifremer. Résultats de la Surveillance de la Qualité du Milieu Marin Littoral, Edition 2005. Haute et Basse-Normandie. Ifremer, Laboratoires Environnement et Ressources de Normandie, 2005a, 82 pp.
- Ifremer. Résultats de la Surveillance de la Qualité du Milieu Marin Littoral, Edition 2005. Ille et Vilaine et Côtes d'Armor. Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources de Saint-Malo, 2005b, 85 pp.
- Ifremer. Résultats de la Surveillance de la Qualité du Milieu Marin Littoral, Edition 2005. Morbihan, Loire-Atlantique, Vendée nord. Ifremer, Laboratoire côtier Morbihan et Pays de Loire, 2005c, 112 pp.
- Irato P, Santovito G, Cassini A, Piccinni E, Albergoni V. Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis* and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003; 44: 476–484.
- Jha AN, Dogra Y, Turner A, Millward GE. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutat Res* 2005; 586: 47-57.
- Kang CM, Park KP, Cho CK, Seo JS, Park WY, Lee SJ, Lee YS. Hspa4 (HSP70) is involved in the radioadaptive response: results from mouse splenocytes. *Radiat Res* 2002; 157: 650-655.
- Kim B-R, Nam H-Y, Kim S-U, Kim S-I, Chang Y-J. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 1869-1872.
- Lango-Reynoso F, Chavez-Villalba J, Cochard JC, Le Pennec M. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 2000; 190: 183-199.
- Leung KMY, Furness RW. Metallothionein induction and condition index of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) exposed to cadmium and hydrogen peroxide. *Chemosphere* 2001; 44: 321–325.
- Leung KMY, Svavarsson J, Crane M, Morrith D. Influence of static and fluctuating salinity on cadmium uptake and metallothionein expression by the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.). *J Exp Mar Biol Ecol* 2002; 274: 175–189
- Livingstone DR. Induction of enzymes as a mechanism for the seasonal control of metabolism of marine invertebrates: glucose 6-phosphate dehydrogenases from the mantle and hepatopancreas of the common mussel *Mytilus edulis* L. *Comp Biochem Physiol* 1981; 69B: 147-156.
- Matsumoto H, Wang X, Ohnishi T. Binding between wild-type p53 and hsp72 accumulated after UV and gamma-ray irradiation. *Cancer Lett* 1995; 92, 127-133.

- Masson M. Carbone 14 et tritium le long des côtes de l'Atlantique et de la Manche. IRSN report DEI/SECRE 2004-020, 2004, 13 pp.
- Mihok S. Chronic exposure to gamma radiation of wild populations of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). J Environ Radioact 2004; 75: 233-266.
- Minier C, Borghi V, Moore MN, Porte C. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol 2000; 50: 167-176.
- Niyogi S, Biswas S, Sarker S, Datta AG. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. Sci Total Environ 2001; 281: 237-246.
- Otero G, Avila MA, Emfietzoglou D, Clerch LB, Massaro D, Notario V. Increased manganese superoxide dismutase activity, protein, and mRNA levels and concurrent induction of tumor necrosis factor alpha in radiation-initiated Syrian hamster cells. Mol Carcinog 1996; 17: 175-180.
- Piano A, Asirelli C, Caselli F, Fabbri E. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. Cell Stress Chaperones 2002; 7: 250-257.
- Rackham BD, Woodhead DS. Effects of chronic gamma-irradiation on the gonads of adult *Ameioba splendens* (Osteichthyes: Teleostei). Int J Radiat Biol 1984; 45: 645-656.
- Ringwood AH, Connors DE, DiNovo A. The effects of copper exposures on cellular responses in oysters. Mar Environ Res 1998; 46: 591-595.
- Roberts DA, Hofmann GE, Somero GN. Heat-shock protein expression in *Mytilus californianus*: Acclimatization (seasonal and tidal-height comparisons) and acclimation effects. Biol Bull 1997; 192: 309-320.
- Roesijadi G, Brubacher LL, Unger ME, Anderson RS. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium in vitro. Comp Biochem Physiol C, Pharmacol Toxicol Endocrinol 1997; 118: 171-176.
- Ropenga A, Chapel A, Vandamme M, Griffiths NM. Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: A caveat. Radiat Res 2004; 161, 597.
- Sato M, Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein. Free Radic Biol Med 1993; 14: 325-337.
- Serafim A, Company RM, Bebianno MJ, Langston WJ. Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. Mar Environ Res 2002; 54: 361-365.
- Sheehan D, Power A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp Biochem Physiol C, Pharmacol Toxicol Endocrinol 1999; 123: 193-199.
- Sierra-Rivera E, Voorhees GJ, Freeman ML. Gamma irradiation increases hsp-70 in Chinese hamster ovary cells. Radiat Res 1993; 135: 40-45.
- Shumway SE, Koehn RK. Oxygen consumption in the American oyster *Crassostrea virginica*. Mar Ecol Prog Ser 1982; 9: 59-68.
- Solé M, Porte C, Albaiges J. The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. Sci Total Environ 1995; 159: 147-153.
- Tanguy A, Boutet I, Bonhomme F, Boudry P, Moraga D. Polymorphism of metallothionein genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to metal exposure. Biomarkers 2002; 7: 439-450.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol 1999; 75: 291-295.

- Theodorakis CW, Shugart LR. Genetic ecotoxicology III: the relationship between DNA strand breaks and genotype in mosquito fish exposed to radiation. *Ecotoxicology* 1998; 7: 227-236.
- Tomanek LS, Somero GN. Evolutionary and acclimation induced variation in the heat shock responses on congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography. *J Exp Biol* 1999; 202: 2925-2936.
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp Biochem Physiol C, Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1991; 100: 187-190.
- Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am J Physiol* 1999; 277: R1612-1619.
- Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol* 2000; 46: 407-417.
- Werner I, Hinton DE. Spatial profiles of hsp70 proteins in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*) in northern San Francisco Bay may be linked to natural rather than anthropogenic stressors. *Mar Environ Res* 2000; 50: 3379-3384.
- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 2005; 39: 75-85.
- Woodhead DS. The effects of chronic irradiation on the breeding performance of the guppy, *Poecilia reticulata* (Osteichthyes: Teleostei). *Int J Radiat Biol* 1977; 32: 1-22.
- Yamaoka K, Sato EF, Utsumi K. Induction of two species of superoxide dismutase in some organs of rats by low dose X-irradiation. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1994; 26: 205-214.
- You HJ, Oh DH, Choi CY, Lee DG, Hahm KS, Moon AR, Jeong HG. Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1573: 33-38.

ACKNOWLEDGEMENTS

Emilie FARCY was supported in part by a fellowship from "Région Basse-Normandie". This study was part of the ENVIRHOM research programme, supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN). The authors would like to thank Luc Solier (Laboratoire de Radioécologie de Cherbourg Octeville, IRSN) for gamma spectrometry analysis and the Laboratoire de Mesure de la Radioactivité dans l'Environnement (IRSN) for alpha emitter radionuclide analysis in oyster samples. The authors are indebted to Juliette Royer et Laurence Challier (Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marine, University of Caen - Basse Normandie) for their assistance with statistics and principal component analysis.

FIGURE CAPTIONS

Table 1: Primer sequences and accession number.

Table 2: Whole soft tissue concentrations of artificial gamma emitter radionuclides in oysters from St-Vaast (STV), expressed in Bq.kg^{-1} dry weight \pm measurement uncertainty. Values below the detection limit are indicated by the symbol -.

Table 3: Whole soft tissue concentrations of transuranic radionuclides in oysters from Carnac (CRC), Cancale (CCL) and St-Vaast (STV), expressed in Bq.kg^{-1} dry weight \pm measurement uncertainty. Values below the detection limit are indicated by the symbol <.

Table 4: Correlation coefficient between mRNA levels in whole soft tissue and gills.

Table 5: Correlation coefficient between mRNA levels in STV and temperature of the seawater in Goury Harbour between January 2004 and September 2005. In bold: values >0.60 .

Table 6: Correlation matrix on axes 1 and 2. In bold: values >0.7 . The correlation is given by the angle between the descriptor and axis, the closer to unity (unsigned value), the stronger the correlation. The five genes explained component one well.

Table 7: Matrix of the test values for the illustrative parameter. For each axis and each illustrative parameter, the test value expresses the statistical significance of the parameter's coordinate on this axis. In bold: significant values at the level of significance $\alpha = 0.05$, which implies absolute values >2.0 .

Figure 1: Map showing the AREVA reprocessing plant and the sampling locations along the French coast.

Figure 2: mRNA level fluctuations of actin (a) and GAPDH (b) normalized to 18S rRNA.

Figure 3: Monthly values of seawater temperature in Goury-Harbour near St-Vaast. In grey: the period with a temperature $<10^{\circ}\text{C}$. The grey bands indicate the periods with seawater temperature below 10°C .

Figure 4: Hsp70 (a), Hsc72 (b), Hsp90 (c) mRNA levels in gills (dotted line) and whole soft tissues (solid line) in oysters collected monthly in STV between January 2004 and September 2005. * means a statistically significant difference ($p<0.05$) between the two paired data (Mann-Whitney test, $n=4$ pools of 5 individuals) and the associated value corresponds to their ratio. The grey bands indicate the periods with seawater temperature below 10°C .

Figure 5: SOD (a) and MT (b) mRNA levels in gills (dotted line) and whole soft tissues (solid line) in oysters collected monthly in STV between January 2004 and September 2005. * means a statistically significant difference ($p<0.05$) between the two paired data (Mann-Whitney test, $n=4$ pools of 5 individuals) and the associated value corresponds to their ratio. The grey bands indicate the periods with seawater temperature below 10°C .

Figure 6: mRNA levels of Hsp70 (a), Hsc72 (b), Hsp90 (c) in oysters collected quarterly in CRC (white), CCL (hachured), ASN (grey) and STV (black). * placed above a bar for locations exposed to radionuclide releases (STV, ASN, CCL) means a statistically significant difference in mRNA level ($p < 0.05$) between this location and the reference site (CRC) (Mann-Whitney test, $n=4$ pools of 5 individuals).

Figure 7: mRNA levels of SOD (a) and MT (b) in oysters collected quarterly in CRC (white), CCL (hachured), ASN (grey) and STV (black). * placed above a bar for locations exposed to radionuclide releases (STV, ASN, CCL) means a statistically significant difference in mRNA level ($p < 0.05$) between this location and the reference site (CRC) (Mann-Whitney test, $n=4$ pools of 5 individuals).

Figure 8: Correlation circle for the variables (genes) on axes 1 and 2.

Figure 9: Principal component analysis biplot. The size of the symbol is proportional to the contribution (squared cosines of the variable). Axis 1 clearly separated data as a function of time and this first axis showed a clear strong contrast between winter and summer data.

TABLES

Table 1: Primer sequences and accession number.

Gene (or rRNA)	GenBank accession #	Forward Primer	Reverse Primer
*actin	AF026063	5' GCCCTGGACTTCGAACAA 3'	5' CGTTGCCAATGGTGATGA 3'
*18S	AB064942	5' CGGGGAGGTAGTGAC GAA 3'	5' ACCAGACTTGCCCTCCAA 3'
*GAPDH	AJ544886	5' TTGTCTTGCCCCTCTTGC 3'	5' CGCCAATCCTTGTTGCTT 3'
Hsp70	AJ305315	5' AGCAAGCCAGCACAGCA 3'	5' GCGATGATTTCCACCTTC 3'
Hsc72	AF144646	5' GAGGATCGCAGCCAAGAA 3'	5' TATCGCCCTCGCTGATCT 3'
Hsp90	AJ431681	5' GGAGAGCAAAACCCTCACC 3'	5' TGGCAATGGTTCCAAGGT 3'
SOD	AJ496219	5' AACCCCTTCAACAAAGAGCA 3'	5' TTTGGCGACACCGTCTTC 3'
**MT	AJ243263 AJ242657	5' GGACCGGAAAACCTGCAAA 3'	5' CCAGTGCATCCTTTACCACA 3'

* used to normalize mRNA.

** This pair of primers did not discriminate between two identified members of oyster MTs: MT1 (accession # AJ243263) and MT2 (accession # AJ242657).

Table 2: Whole soft tissue concentrations (in Bq.kg⁻¹ dry weight) of artificial gamma emitter radionuclides in oysters from St-Vaast.

Month	⁶⁰ Co	¹³⁷ Cs
Jul-02	0.18 ± 0.17	-
Aug-02	0.19 ± 0.14	-
Sep-02	0.18 ± 0.17	-
Dec-02	-	0.50 ± 0.40
Apr-03	0.20 ± 0.14	0.16 ± 0.14
Jul-03	-	0.34 ± 0.13
Aug-03	0.14 ± 0.12	-
Sep-03	0.12 ± 0.11	-
Nov-03	0.14 ± 0.12	-
Dec-03	0.16 ± 0.13	-
Mar-04	0.23 ± 0.14	-

Table 3: Whole soft tissue concentrations (in Bq.kg⁻¹ dry weight) of transuranic radionuclides in oysters from Carnac (CRC), Cancale (CCL) and St-Vaast (STV).

Location	Month	²⁴¹ Am	²⁴⁴ Cm	²³⁸ Pu	²³⁹ Pu + ²⁴⁰ Pu
CRC	Jun-04	0.0011 ± 0.0003	< 0.0001	0.0004 ± 0.0002	0.0101 ± 0.0009
CCL	Jun-04	0.0167 ± 0.0019	0.0018 ± 0.0004	0.0086 ± 0.0011	0.0280 ± 0.0024
STV	Aug-02	0.0289 ± 0.0051	0.0042 ± 0.0019	0.0073 ± 0.0020	0.0153 ± 0.0029
STV	Dec-02	0.0042 ± 0.0005	0.0008 ± 0.0002	0.0100 ± 0.0020	0.0255 ± 0.0033
STV	Jun-04	0.0152 ± 0.002	0.0021 ± 0.0006	0.0105 ± 0.0140	0.0273 ± 0.0024

Table 4: Correlation coefficient between mRNA levels in whole soft tissue and gills.

gene	r
Hsp70	0.83
Hsc72	0.27
Hsp90	0.55
SOD	0.44
MT	0.91

Table 5: Correlation coefficient between mRNA levels in STV and temperature of the seawater in Goury Harbour.

r	Whole soft tissue	Gills
Hsp70	-0.50	-0.74
Hsc72	-0.24	-0.53
Hsp90	-0.53	-0.77
SOD	-0.18	-0.68
MT	-0.64	-0.66

Table 6: Correlation matrix on axes 1 and 2.

Variables	Correlation Variable-Factor (axis 1)	Correlation Variable-Factor (axis 2)
Hsp70	-0.87	0.33
Hsc72	-0.83	-0.03
Hsp90	-0.71	-0.52
SOD	-0.81	0.47
MT	-0.78	-0.37

Table 7: Matrix of the test values for the illustrative parameter.

Descriptor	Test-value (axis 1)	Test-Value (axis 2)
STV	0.0	0.1
CCL	-1.6	-0.8
ASN	0.4	0.8
CRC	1.3	-0.1
March 2004	-0.3	-0.2
June 2004	2.3	-0.4
Sept 2004	4.1	-2.9
Jan 2005	-4.1	0.4
March 2005	-6.1	0.9
June 2005	3.1	2.4

Figure 1: Map showing the AREVA reprocessing plant and the sampling locations along the French coast.

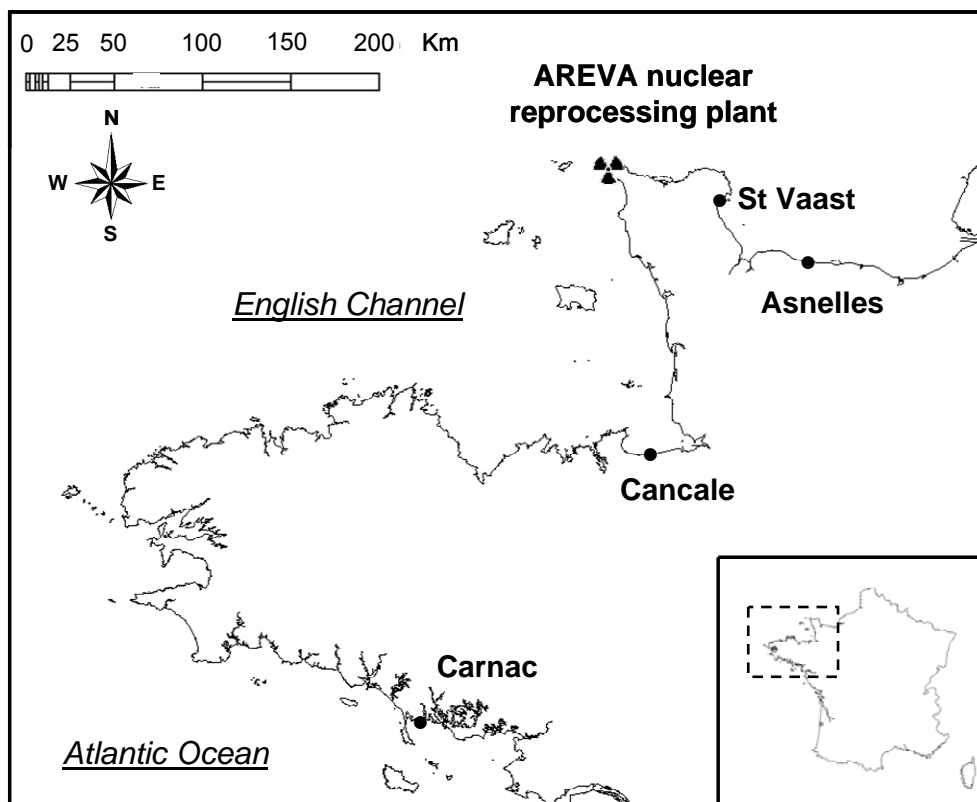


Figure 2: mRNA level fluctuations of actin (a) and GAPDH (b) normalized to 18S rRNA.

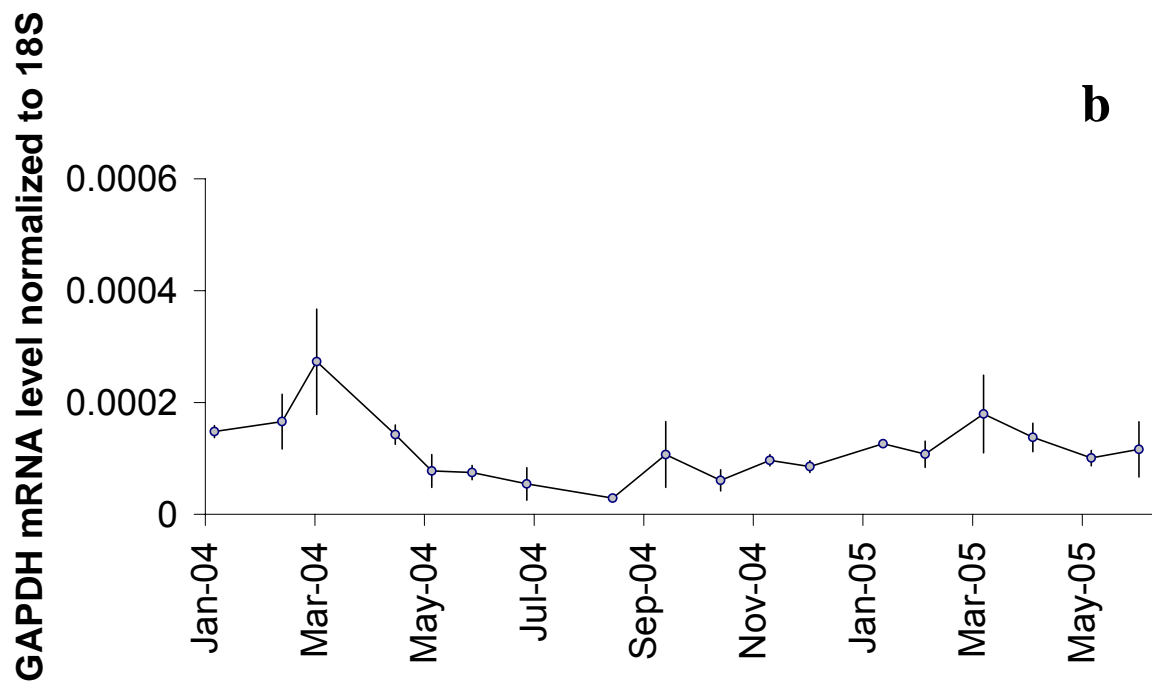
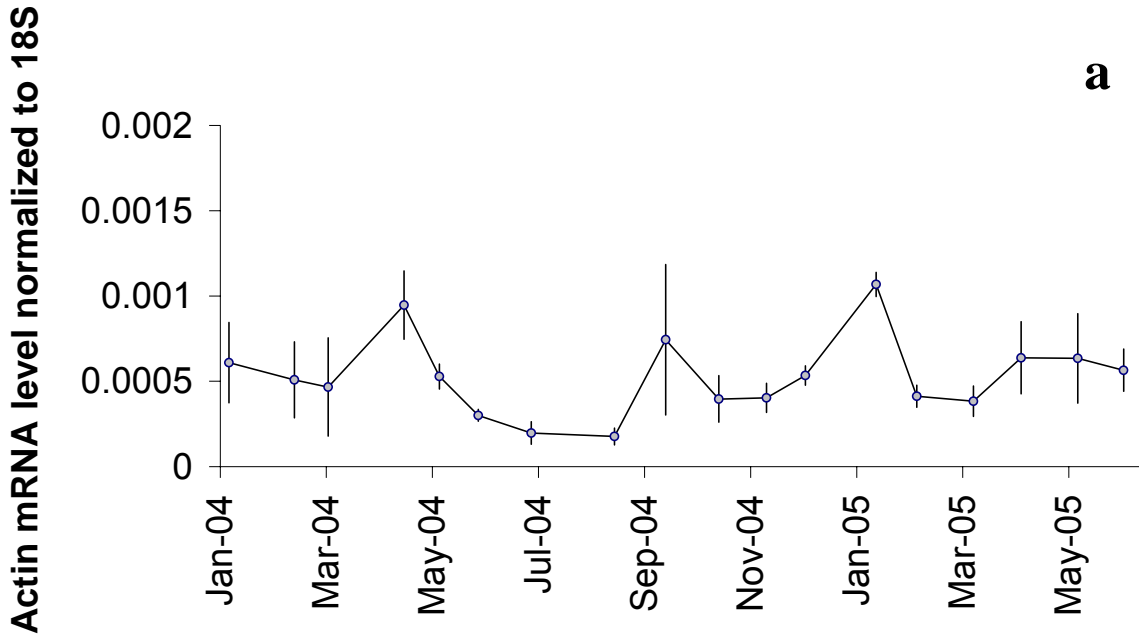


Figure 3: Monthly values of seawater temperature in Goury-Harbour near St-Vaast.

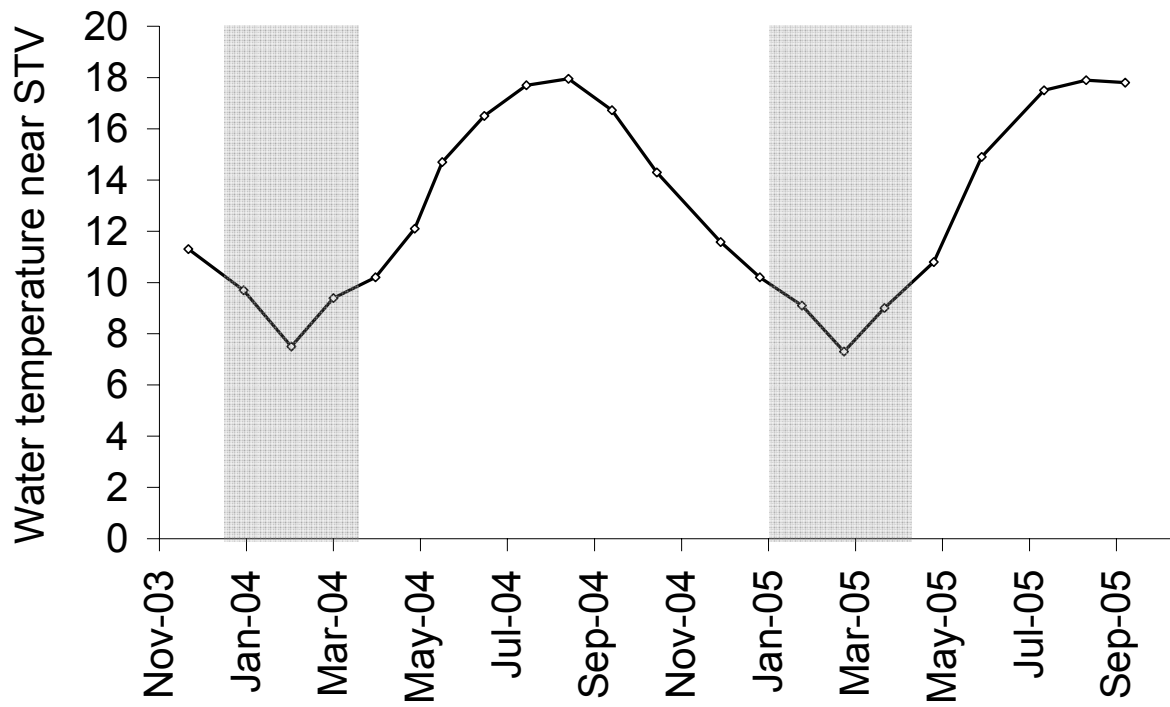


Figure 4: Hsp70 (a), Hsc72 (b), Hsp90 (c) mRNA levels in gills and whole soft tissues in oysters collected monthly in STV between January 2004 and September 2005.

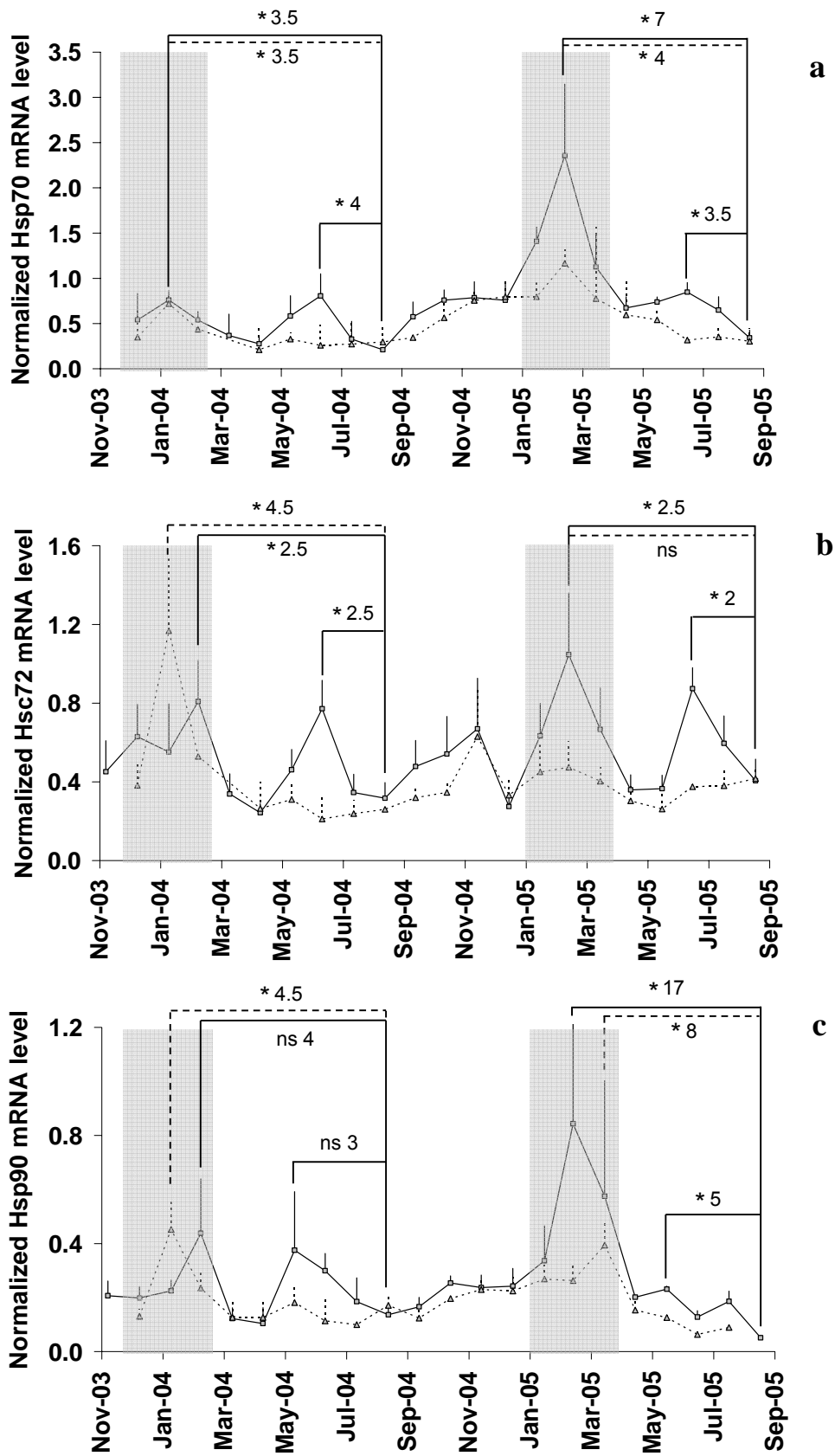


Figure 5: SOD (a) and MT (b) mRNA levels in gills and whole soft tissues in oysters collected monthly in STV between January 2004 and September 2005.

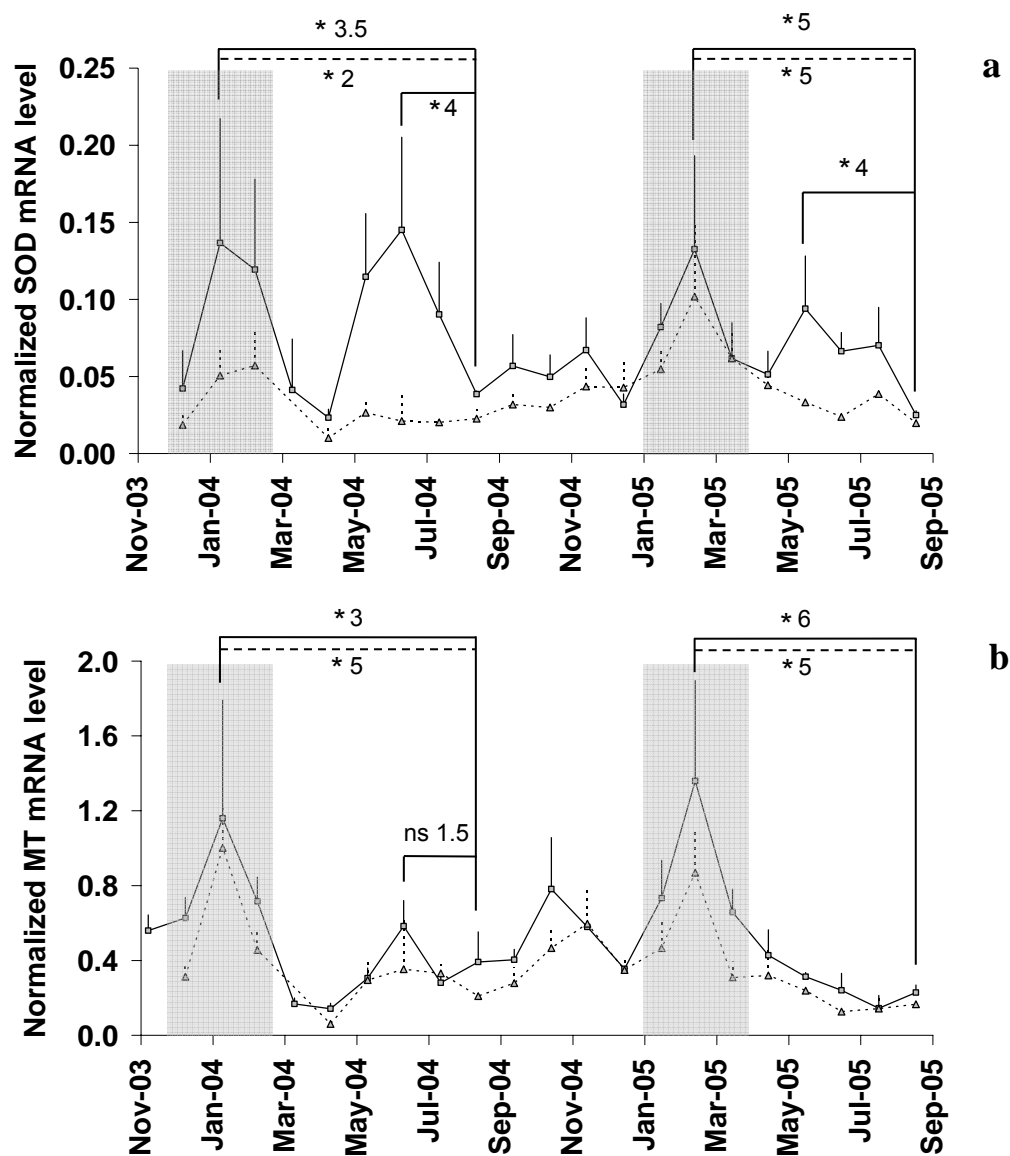


Figure 6: mRNA levels of Hsp70 (a), Hsc72 (b), Hsp90 (c) in oysters collected quarterly in CRC (white), CCL (hachured), ASN (grey) and STV (black).

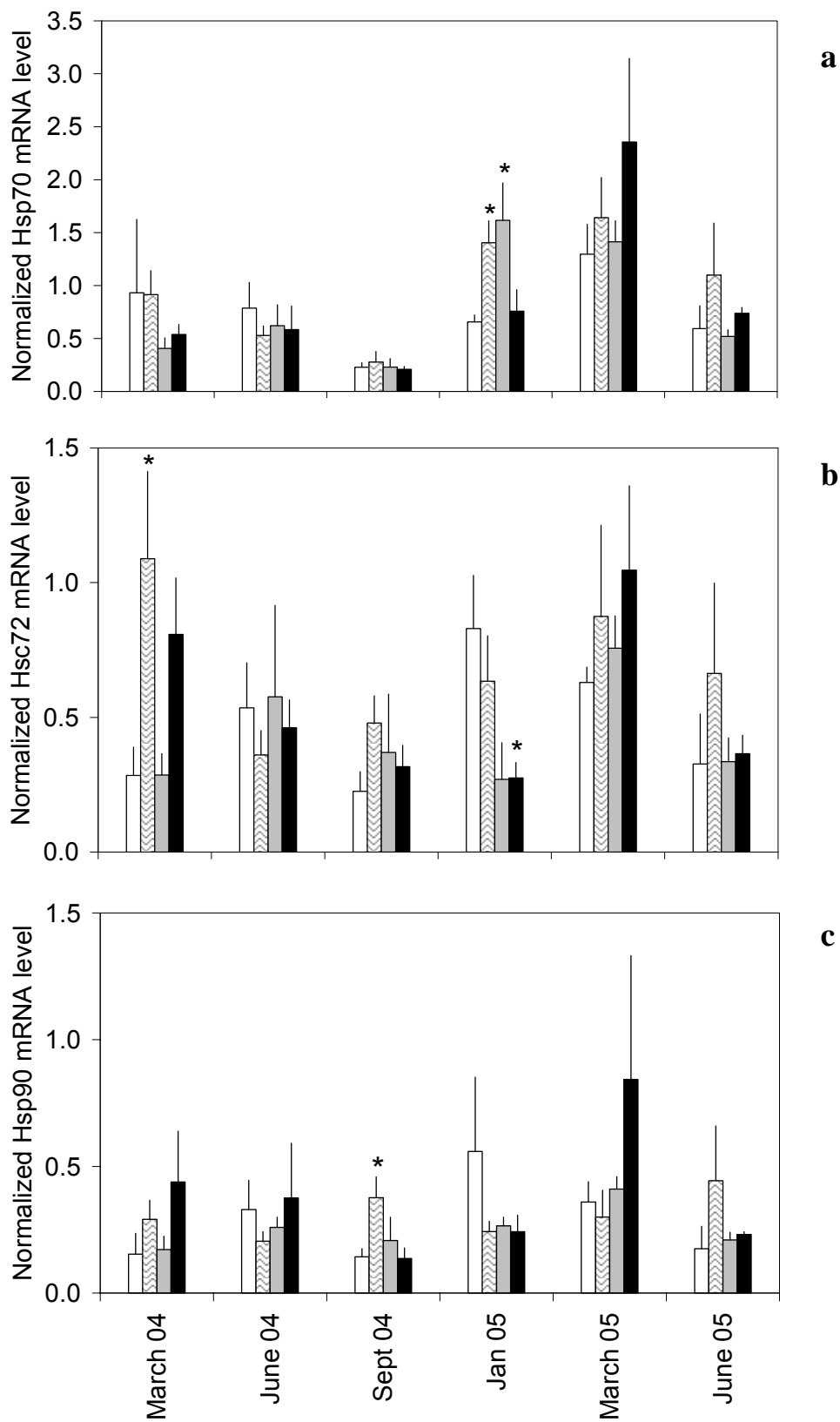


Figure 7: mRNA levels of SOD (a) and MT (b) in oysters collected quarterly in CRC (white), CCL (hachured), ASN (grey) and STV (black).

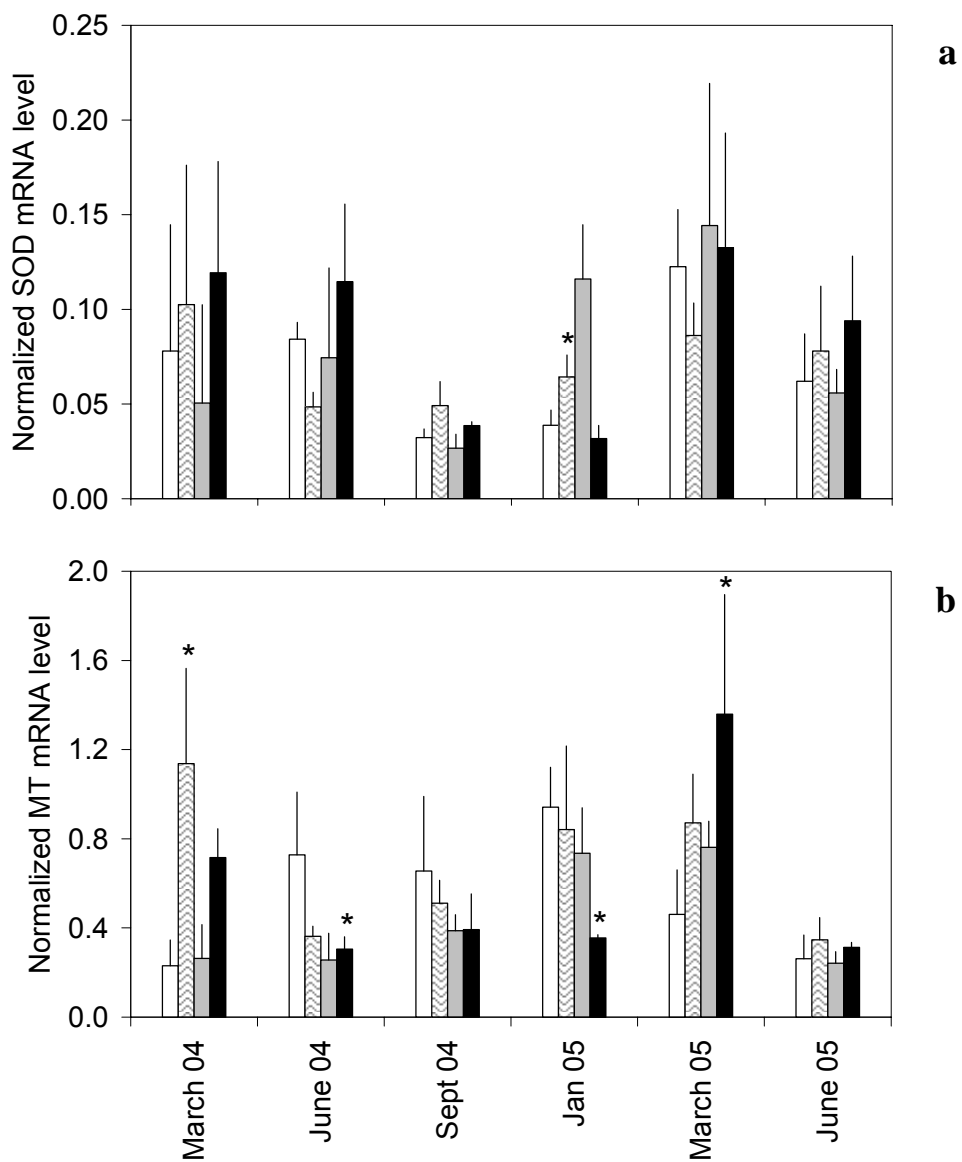


Figure 8: Correlation circle for the variables (genes) on axes 1 and 2.

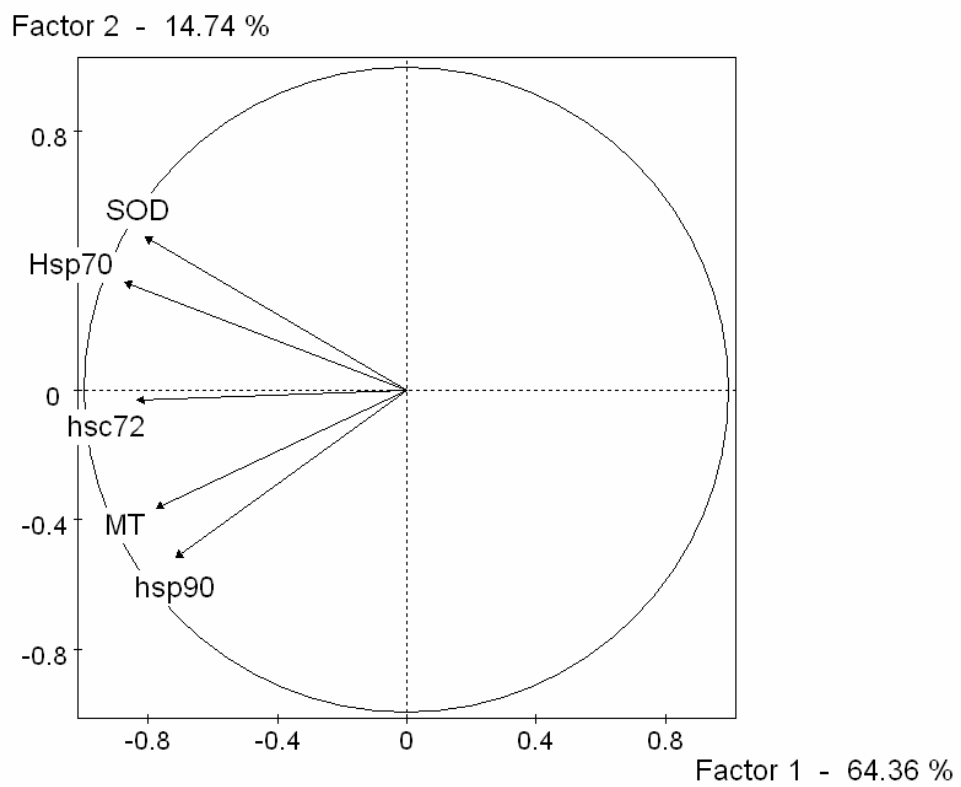


Figure 9: Principal component analysis biplot.

